

2º CICLO DE ESTUDOS

MESTRADO EM MEDICINA E ONCOLOGIA MOLECULARES

O IMPACTO DA VITAMINA D E DO NGF NA CAQUEXIA: UM ESTUDO DE VARIANTES POLIMÓRFICAS EM DOENTES ONCOLÓGICOS

Anna Flávia Xavier de Moraes Borba Chaves
Gomes

M

2025

O IMPACTO DA VITAMINA D E DO NGF NA CAQUEXIA: UM ESTUDO DE VARIANTES POLIMÓRFICAS EM DOENTES ONCOLÓGICOS

Anna Flávia Xavier de Moraes Borba Chaves Gomes

Dissertação de candidatura ao Grau de Mestre em Medicina e Oncologia Moleculares
submetida à Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Orientador - Professor Doutor Rui Manuel de Medeiros Melo Silva, PharmD, PhD

Categoria - Professor Catedrático Convidado no Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar

Afiliação - Vice-diretor do Centro de Investigação do IPO Porto (CI-IPOP) e coordenador de grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral do CI-IPOP, Porto Comprehensive Cancer Center Raquel Seruca (Porto.CCC) & CI-IPOP@RISE (Health Research Network)

Coorientadora - Doutora Valéria Delgado Tavares, PhD

Categoria - Investigadora pós-doutorada

Afiliação - Grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral do CI-IPOP, Porto Comprehensive Cancer Center Raquel Seruca (Porto.CCC) & CI-IPOP@RISE (Health Research Network) / Liga Portuguesa Contra o Cancro - Núcleo Regional Norte (LPCC-NRN)

Agradecimentos

Agradeço, a todo o instante, a bondade misericordiosa de Deus que nos consagra com saúde para termos bons frutos em vida.

Essa é mais uma etapa que trilho em minha formação. Devo admitir que conciliar as urgências médicas com a produção desse trabalho foi uma árdua tarefa que, de forma alguma, conseguiria desempenhar sozinha. Minha gratidão se estende aos Professores Doutores Rui Medeiros e Valéria Tavares que me apoiaram com compreensão e entusiasmo no caminho. Agradeço também ao Diretor Professor Doutor Henrique Almeida que me acolheu desde o início do ano letivo assim como a cada professor que encontrei no ciclo de estudos do Mestrado de Medicina e Oncologia Moleculares. Agradeço com muito carinho a minha amiga Ana Carolina Leão, que trilhou um impecável caminho ao lado desses docentes e fomentou, junto a eles, esse trabalho.

Agradeço a todos que lutaram antes de mim para fazer da ciência um palanque sério e esperançoso. Agradeço, nesse âmbito também, a todos os meus professores da infância, do ensino médio e superior que foram inspiração e sinônimos de dedicação.

Acredito que quem vem do amor para o amor é feito e, desse modo, minha gratidão maior personifica-se na minha amada mãe Nhelma, que, nem nos melhores sonhos, imaginara alcançar tantas vitórias a cuidar de três filhas com amor, disciplina e dolorosas batalhas vencidas com a bênção do meu pai que tão precocemente foi habitar o céu. Às minhas amadas irmãs, digo, com toda a certeza, que meu amor é infindo e puro e agradeço por vencerem junto comigo, pois nossas vitórias são conjuntas. À minha amada Teteu, obrigada por ser porto seguro e por me ensinar o que é amar com saudade. Ao meu amor Matheus, meu companheiro diário, meu lar, minha certeza de querer voltar para casa diariamente, obrigada por ser meu melhor amigo, minha calma e otimismo. Por fim, agradeço aos meus amados Daniel e Lua, meus sobrinhos tão especiais que me mostraram um amor sobremaneira. Sem dúvida, esse trabalho é para dar orgulho a essas duas perspicazes e amadas crianças e para inspirá-las a almejar vitórias.

Lista de abreviaturas

A

A: Adenina

ADN: Ácido desoxirribonucleico

C

C: Citocina

CAC: Caquexia associada a cancro

CASC-IN: Ferramenta de pontuação de caquexia

D

DMO: Desmineralização óssea

DRC: Doença renal crónica

E

ECOG-PS: *Eastern cooperative oncology group performance status*

EDTA: Ácido etilenodiaminotetraacético

G

G: Guanina

GOMPV: Grupo de oncologia molecular e patologia viral

H

HWE: Equilíbrio de Hardy-Weinberg

I

IC: Intervalo de confiança

IMC: Índice de massa corporal

IPO: Instituto português de oncologia

IFN γ : Interferon-gama

IL: Interleucina

L

LLC: carcinoma pulmonar de Lewis (do inglês “*Lewis Lung Carcinoma*”)

M

MAF: Frequência do alelo variante (do inglês “*minor allele frequency*”)

mRNA: RNA mensageiro

N

N: Número de doentes

NGF: Fator de crescimento nervoso (do inglês “*Nerve Growth Factor*”)

O

OR: *odds ratio*

P

PCR: Proteína C reativa

Q

qPCR: Reação em cadeia polimerase em tempo real (do inglês “*Polymerase Chain Reaction*”)

S

SG: Sobrevivência global

SNP: Polimorfismo de nucleótido único (do inglês “*Single-nucleotide polymorphism*”)

T

T: Timina

U

Ubiquitina-proteassoma (UPS)

V

VDR: Recetor da vitamina D

X

χ^2 : Teste do qui-quadrado de Pearson

Resumo

De acordo com o Observatório Global do Cancro, a Europa representa menos de 10% da população mundial, mas é responsável por 22,4% de todos os casos de cancro. Entre as complicações metabólicas associadas a doenças malignas, destaca-se a caquexia associada ao cancro (CAC), uma síndrome paraneoplásica multifatorial que envolve profundas alterações metabólicas em diferentes tecidos e órgãos. O estudo dos mecanismos moleculares subjacentes à CAC tem sido um dos principais focos da investigação oncológica. Entre os mediadores potencialmente implicados, a vitamina D tem assumido particular relevância. Classificada como um secoesteroide lipossolúvel, tem sido amplamente estudada nas últimas décadas, revelando papéis fisiológicos que ultrapassam o metabolismo do cálcio e a mineralização óssea. Destaca-se, entre esses, a sua influência sobre o sistema imunológico e outros tecidos periféricos, em virtude da ampla expressão do seu recetor VDR [do inglês “*vitamin D receptor*” (VDR)]. A variação na expressão do VDR no tecido muscular constitui um aspeto particularmente relevante, uma vez que baixos níveis circulantes de vitamina D têm sido associados a alterações do metabolismo muscular, incluindo atrofia, sarcopenia, caquexia e défices na recuperação muscular. De forma complementar, o fator de crescimento nervoso (NGF, do inglês “*nerve growth factor*”) desempenha um papel importante no metabolismo da glicose e dos lípidos, na interferência de agentes inflamatórios, no controlo do comportamento alimentar, além de suas funções bem estabelecidas na neuroplasticidade. Alterações genéticas que modulam os níveis de VDR e NGF podem, portanto, contribuir para distúrbios metabólicos observados em contexto de caquexia. Entre as variantes genéticas identificadas, destaca-se o polimorfismo de nucleótido único (SNP, do inglês “*single-nucleotide polymorphism*”) *VDR* rs731236 (A>G), que pode afetar a expressão, estabilidade ou regulação do mRNA do VDR, e o SNP *NGF* rs6330 (G>A), uma variante missense capaz de influenciar a expressão do NGF consoante o contexto biológico. Tendo em conta as implicações clínicas, o presente projeto de mestrado teve como objetivo avaliar o impacto das variantes genéticas *VDR* rs731236 e *NGF* rs6330, em associação com o estado inflamatório, na ocorrência de CAC e na sobrevivência de doentes oncológicos. Para caracterizar o estado inflamatório, recorreram-se a dois marcadores amplamente utilizados em estudos prognósticos de diversos tipos de cancro: a razão neutrófilo-linfócito (NLR, do inglês “*neutrophil-to-lymphocyte ratio*”) e o índice prognóstico nutricional (PNI, do inglês “*prognostic nutritional index*”). Foram incluídos

141 doentes que cumpriram os critérios de inclusão, recrutados no Instituto Português de Oncologia do Porto (IPO Porto) entre março de 2023 e maio de 2024. O diagnóstico de CAC foi estabelecido segundo os critérios de Fearon e CASC-IN. Ambos os SNPs foram genotipados com recurso à técnica PCR (do inglês “*polymerase chain reaction*”) em tempo real, utilizando a metodologia de discriminação alélica TaqMan. Os resultados mostraram que o SNP rs6330 do gene *NGF* não apresentou associações significativas com o estado de CAC (presença versus ausência de CAC) nem com a sobrevivência dos doentes, independentemente da presença de caquexia. Em contraste, o genótipo GG do SNP *VDR* rs731236 demonstrou um efeito protetor face ao desenvolvimento de CAC, de acordo com as classificações de Fearon e CASC-IN ($p < 0,05$). Este mesmo genótipo associou-se também a uma maior sobrevivência global. Estes resultados preliminares revelam-se promissores na avaliação de doentes oncológicos e poderão contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas personalizadas, direcionadas à mitigação da caquexia em grupos de alto risco. Além disso, reforçam a importância de futuros estudos que explorem intervenções baseadas na modulação da vitamina D como potencial abordagem terapêutica adjuvante.

Palavras-chave: neoplasias; caquexia; vitamina D; fator de crescimento do nervo; polimorfismo de nucleótido único.

Índice de figuras

Figura 1: Proteínas associadas à patogénese de CAC.....	3
Figura 2: Fases da miogénese.....	13
Figura 3: A via UPS e a hipovitaminose D.....	14
Figura 4: Diferentes tipos tumorais	19
Figura 5: Prevalência por Fearon.	20
Figura 6: Prevalência pela CASC-IN.....	20
Figura 7: Prevalência duplamente diagnosticada.....	21
Figura 8: Análise de sobrevida global e o SNP do VDR... ..	25
Figura 9: O forte impacto do genótipo GG do VDR na SG	26
Figura 10: Distribuição dos genótipos do SNP do NGF e a SG.....	27
Figura 11: O alelo ‘A’ do SNP do NGF e a SG.....	27
Figura 12: A vitamina D com o VDR e o ciclo celular.....	30
Figura 13: O NGF e o complexo Vitamina D e VDR na CAC.....	32

Índice de tabelas

Tabela 1: Distribuição dos SNPs relacionados com o PNI e NLR.....	21
Tabela 2: Distribuição do SNP do VDR e a ferramenta CASC-IN.....	22
Tabela 3: Distribuição do SNP do VDR e os critérios de Fearon.....	23
Tabela 4: Distribuição do SNP do VDR em duplo diagnóstico da caquexia.....	23
Tabela 5: Distribuição do alelo ‘A’ do SNP do VDR.....	24
Tabela 6: Distribuição genotípica para o SNP do NGF.....	24

Índice

Agradecimentos	iii
Lista de abreviaturas	iiiv
Resumo	vii
Índice de figuras	ix
Índice de tabelas	x
1. Introdução	1
1.1. Cancro e caquexia.....	1
1.2. Fator de crescimento nervoso (NGF) e SNP rs6330 (G>A).....	3
1.3. NGF: papel em caquexia associada a cancro.....	5
1.4. Vitamina D e SNP rs731236 (A>G).....	6
1.5. VDR: papel em caquexia associada a cancro	9
2. Objetivos.....	15
2.1. Objetivo geral:	15
2.2. Objetivos específicos:.....	15
3. Materiais e métodos.....	16
3.1. Desenho experimental	16
3.2. Critérios de inclusão e exclusão	16
3.3. Índices inflamatórios	17
3.4. Processamento de Amostras e Extração de ADN Genómico	17
3.5. Seleção e Genotipagem de SNPs.....	17
3.5. Análise estatística	18
4. Resultados.....	19
5. Discussão	28
6. Conclusão e perspetivas futuras	32
7. Referências bibliográficas	34

1. Introdução

1.1. Cancro e caquexia

Pelo Observatório Global do Cancro, a Europa representa menos de 10% da população mundial, mas representa 22,4% de todos os casos de cancro. Quase três milhões de pessoas foram recentemente diagnosticadas com cancro na Europa e cerca de 1,27 milhão morreu devido à doença em 2020. As doenças malignas são a segunda maior causa de morte mais frequente na Europa, apenas superada pelas doenças cardiovasculares (1).

Um dos focos dos estudos oncológicos é a caquexia associada a cancro (CAC). Trata-se de uma síndrome paraneoplásica multifatorial que envolve diversas vias metabólicas em diferentes tecidos e órgãos. Esta complicação é caracterizada pela perda contínua de massa muscular esquelética, com ou sem perda de massa gorda, que não pode ser totalmente revertida pelo suporte nutricional convencional e, portanto, leva ao comprometimento funcional progressivo (2). Mais de 50% dos doentes com cancro desenvolvem CAC. Essa percentagem aumenta para 86% nas últimas 2 semanas de vida e cerca de 20% de todas as mortes por cancro podem ser atribuídas à CAC (3).

A condição CAC é frequentemente estudada e tratada de forma independente, embora esteja fortemente ligada à inflamação sistémica crónica, caracterizada pela produção prolongada de citocinas pró-inflamatórias (4). Sem dúvidas, CAC trata-se de uma patologia complexa que compreende distúrbios inflamatórios e metabólicos (5). Anorexia, inflamação e perturbações da homeostase hormonal e metabólica contribuem significativamente para o início e a progressão da caquexia. Nesse sentido, insulina, angiotensina, leptina e miostatina, juntamente com inúmeras citocinas, incluindo interleucina-6 (IL-6), interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral alfa (TNF α), demonstraram desempenhar um papel central (3).

A CAC, cuja principal apresentação clínica é a perda de peso involuntária, é significativamente subdiagnosticada e subtratada no contexto clínico (6). As características fisiológicas mais presentes são um balanço energético negativo devido à ingestão alimentar reduzida e às perturbações metabólicas (7).

A vitamina D, um secoesteroide lipossolúvel, tem sido considerada como um potencial biomarcador e/ou alvo terapêutico no contexto de caquexia. Segundo as evidências, a vitamina D apresenta papéis fisiológicos que ultrapassam o metabolismo do cálcio e a mineralização óssea, incluindo sua interação com o sistema imunológico e

tecidos corporais, tendo em vista a expressão do recetor de vitamina D (VDR) (8). Um aspeto importante a ser considerado no estudo da vitamina D e do metabolismo da fibra muscular está relacionado à diferente expressão do VDR, o qual varia no tecido muscular. A correlação entre baixos níveis circulantes de vitamina D e distúrbios do metabolismo muscular é documentada em vários contextos, incluindo recuperação muscular, atrofia, sarcopenia e caquexia (9). Deste modo, a vitamina D e suas inúmeras funções biológicas, mediadas pelo VDR, são alvos de muitos estudos.

Polimorfismos no gene *VDR* podem alterar a concentração ou a resposta celular da vitamina D, o que influencia o estresse oxidativo, o metabolismo de lipídios e glicose e o processo inflamatório (10). O polimorfismo de nucleotídeo único (SNP, do inglês “*single-nucleotide polymorphism*”) rs731236 (A>G) no gene *VDR* é uma variação genética localizada no exão 9, mais especificamente na região 3'UTR (do inglês “*untranslated region*”), modulando a expressão e estabilidade do mRNA (11). De acordo com a literatura, o genótipo AA deste polimorfismo associa-se a níveis séricos aumentados de proteína C reativa (PCR), um marcador de inflamação sistémica, em doentes com CAC (12).

Assim como o VDR, uma outra molécula promissora no estudo da patogénese de CAC é o fator de crescimento nervoso (NGF, do inglês “*nerve growth factor*”). Foi demonstrado que o NGF participa do metabolismo da glicose e dos lipídios, bem como do comportamento alimentar (13). Doentes com obesidade apresentam níveis alterados de NGF (13-15). Embora sejam necessários mais estudos para identificar os mecanismos subjacentes, o NGF parece contribuir para a inflamação e distúrbios metabólicos associados a alterações no peso corporal e o SNP rs6330 (G>A) no gene *NGF* modula a expressão dessa proteína (14 - 16).

As citocinas que envolvem o processo inflamatório da caquexia, a incluir o metabolismo de lipídios e proteínas, sob influência da vitamina D e do NGF não podem ser vistas de forma isolada (**Figura 1**). Portanto, daremos ênfase, no presente estudo, ao envolvimento do NGF e da vitamina D com seu VDR em confluência nessas cascatas inflamatórias essenciais para a qualidade de vida do doente oncológico.

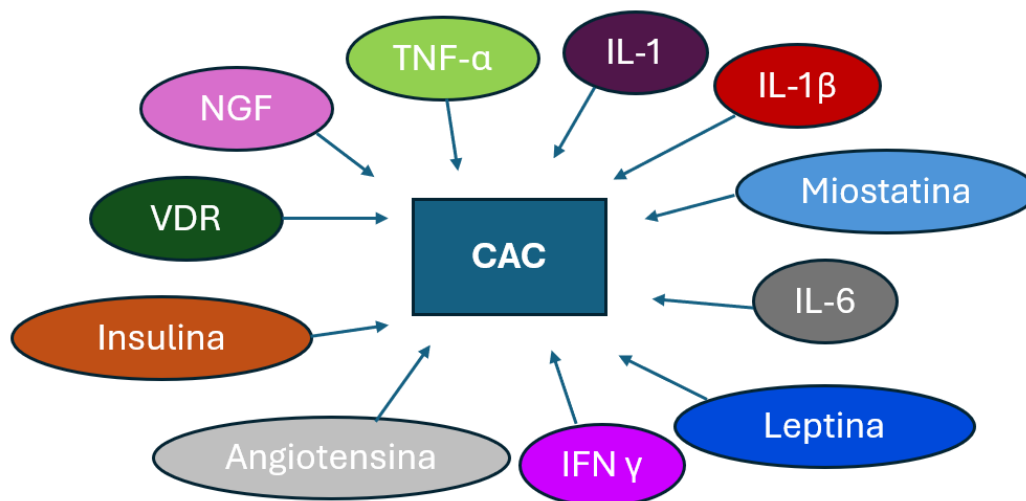


Figura 1: Proteínas associadas à patogênese de CAC. A caquexia associada a cancro (CAC) não pode ser vista de forma isolada. Diversas proteínas e receptores estão ativamente envolvidos nesta síndrome paraneoplásica.

1.2. Fator de crescimento nervoso (NGF) e SNP rs6330 (G>A)

Em 1986, a médica e neurologista italiana Rita Levi-Montalcini recebeu o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina por suas descobertas sobre o NGF, cujas pesquisas tiveram início por volta de 1951. Anos depois, ela contou com a colaboração de Stanley Cohen, que também foi agraciado com o Nobel. Esse trabalho representou um marco fundamental para o avanço das neurociências, abrindo caminho para a compreensão dos mecanismos de crescimento e diferenciação das células nervosas (17).

O NGF, primariamente expresso nas glândulas submandibulares, é uma proteína neurotrófica [família das neurotrofinas (NT)] de secreção interna composta por 118 aminoácidos divididos em 3 subunidades: α , β e γ . A subunidade β é a responsável pela atividade biológica e a subunidade γ é uma protease responsável pela transformação do transcrito pró-NGF na sua forma ativa. A subunidade α , por sua vez, permanece pouco compreendida (18-20).

O NGF é um modulador-chave do eixo imune-neuroendócrino responsável por diversas funções biológicas como a cascata inflamatória (10, 21-24). Esta proteína se liga a dois receptores, o recetor de tropomiosina quinase A (TrkA) e o recetor de neurotrofina p75 (p75NTR), de alta afinidade e baixa afinidade, respetivamente (19).

As NT incluem, além do NGF, o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e as neurotrofinas 3, 4 e 5 (NT-3, NT-4 e NT-5). Essas moléculas são produzidas tanto pelo sistema nervoso central (SNC) quanto pelos tecidos periféricos, desempenhando um papel essencial na sobrevivência, diferenciação e funcionalidade dos neurônios,

especialmente por meio da regulação das estruturas sinápticas. As NT são inicialmente sintetizadas como pré-proteínas, que sofrem clivagem e modificações pós-traducionais até atingirem seu estado maduro. Nessa forma, podem ser secretadas e se ligar aos seus recetores específicos. Como mencionado anteriormente, os recetores TrkA e p75NTR são os principais alvos das neurotrofinas, mediando seus efeitos biológicos (20). Essa ligação induz a autofosforilação e dimerização do TrkA de modo a ativar as cascatas de sinalização intracelular das cinases reguladas por sinais extracelulares, as chamadas via ERK (do inglês “*extracellular signal-regulated kinases*”), via Akt/PI3K e a via fosfolipase- γ (PLC- γ) (25). O NGF, assim, pode desempenhar suas funções como proteína essencial para o crescimento e desenvolvimento dos neurônios ao ativar essas cascatas de sinalização intracelular que resultarão na transcrição dos genes codificantes das proteínas de sobrevivência neuronal e no bloqueio da apoptose (20).

O NGF atua na regeneração axonal após lesões nervosas, na manutenção dos neurônios colinérgicos do prosencéfalo, na plasticidade sináptica, na formação de novos neurônios (neurogênese) e atua também em um importante pilar imunológico e inflamatório (20, 26). Por ser produzido por células do SNC, por órgãos periféricos (principalmente pela bexiga e pelo colón) e por células do nosso sistema imunitário, além de atuar a nível de respostas inflamatórias, o NGF tem papel na sobrevivência celular endotelial, influencia a secreção de hormonas das glândulas suprarrenais e estimula a proliferação de células epiteliais e de fibroblastos na cicatrização de feridas. Paralelamente, o NGF está envolvido na modulação da dor, sendo, também por isso, um importante alvo de investigação (20, 25, 27).

O SNP rs6330 (G>A) do *NGF*, localizado no exão, origina uma alteração missense que resulta na substituição do aminoácido alanina (Ala) por valina (Val) na posição 35 (Ala35Val) (16). Em 2014, Zakharyan e colaboradores observaram, em análises intergrupais de doentes com esquizofrenia e grupo controle, níveis plasmáticos de NGF significativamente superiores em homozigotos GG do SNP rs6330 quando comparados aos portadores do alelo A (genótipos GA e AA) tanto em doentes quanto em controles (16). De acordo com as observações dos autores, a variante genética afeta o processamento intracelular e a secreção de NGF (28).

1.3. NGF: papel em caquexia associada a cancro

O NFG tem sido estudado relativamente ao seu envolvimento na regulação do peso corporal. Foi demonstrado que esta proteína participa no metabolismo da glicose e dos lipídios e contribui para a inflamação e distúrbios metabólicos associados a alterações no peso corporal (13, 15).

Nesse contexto, em 2011, Yi Ye e colaboradores realizaram um estudo em murinos portadores de carcinoma espinocelular oral, com o objetivo de avaliar os efeitos da aplicação injetável de um anticorpo anti-NGF. Observou-se ganho de peso na maioria dos subgrupos com carcinoma espinocelular, bem como no grupo controle de murinos saudáveis. Os autores verificaram que os animais tratados com anti-NGF apresentaram níveis plasmáticos de TNF- α e IL-6 cerca de 50% inferiores aos dos grupos não tratados. Nos modelos de tumor de língua em murganhos, observou-se correlação positiva entre os níveis de IL-6 e a perda de peso ($R = 0,6$; $p < 0,05$), assim como entre TNF- α e perda ponderal ($R = 0,8$; $p < 0,001$). Na mesma análise, constatou-se correlação inversa entre os níveis de leptina - tanto plasmática quanto tecidual - e a perda de massa corporal, indicando que concentrações reduzidas de leptina estavam associadas a maiores perdas de peso. Além disso, a administração do anti-NGF resultou em um aumento de três a quatro vezes nos níveis de leptina, tanto no plasma quanto no tecido adiposo, principal fonte dessa adipocina (14).

A leptina, por sua vez, é uma hormona produzida, predominantemente, pelo adipócito e atua como um sinalizador da quantidade de energia acumulada e de massa gorda existente no organismo e é antagonizada pelo neuropeptídeo Y (NPY), que é um agente estimulador de apetite. Os recetores da leptina estão localizados no hipotálamo e os níveis circulantes da leptina são responsáveis pela inibição da ingestão alimentar e pelo aumento da termogénese, o que contribui para a manutenção de adequadas reservas lipídicas e manutenção do peso corporal (29, 30). A avaliação dessa hormona em contexto de cancro e CAC é ambígua, uma vez que a leptina se comporta de forma variada. Nomeadamente, a leptina sérica é reduzida em doentes caquéticos com tumores no trato digestivo (30) e cancro do ovário (31). No entanto, os níveis de leptina encontram-se elevados em doentes com cancro de mama e de próstata (32, 33). No caso de doentes com cancro oral, os níveis reduzidos de leptina são acompanhados por uma diminuição da massa corporal (34-36). Yi Ye e colaboradores (2011) observaram que os níveis plasmáticos de leptina nos ratos se correlacionam com os níveis no tecido adiposo e, como

a leptina plasmática é proporcional aos próprios níveis nos estoques de gordura, para os investigadores, não foi surpreendente que murganhos com cânceres não tratados tenham diminuído a leptina plasmática devido à perda de massa gorda (antes da aplicação do Anti-NGF e após aplicação do Anti-NGF) (14).

Para além da IL-6 e do TNF- α vistos por Yi Ye, os biomarcadores clínicos, em geral, são essenciais para o diagnóstico precoce e o monitoramento da progressão da CAC. Esses marcadores incluem parâmetros inflamatórios, metabólicos, hormonais e bioquímicos que refletem a perda de peso, a degradação muscular e o estado metabólico do doente (6, 37). Entre os principais biomarcadores estão os mediadores da inflamação sistêmica, notadamente as proteínas de fase aguda, que alguns autores consideram os melhores indicadores de caquexia. A PCR, por exemplo, está frequentemente elevada em doentes com caquexia, indicando inflamação sistêmica e é sabido que as citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6 e TNF- α , desempenham um papel fundamental na promoção da inflamação e da degradação muscular e a IL-1 β contribui para a disfunção metabólica (6, 7, 38).

Já é bem estabelecida a relação entre NGF e essas citocinas que participam da degradação muscular: IL-1, IL-6, TNF- α e IL-1 β , sendo o NGF o estimulador das demais citocinas em situações de estresse inflamatório (39-45). Woolf e colaboradores (1997), inclusive, observaram a relação inversa: a IL-1 β como indutora do NGF ao ser estimulada pelo TNF- α . Nesse estudo, ele provocou inflamação local com injeção de Adjuvante Completo de Freund (CFA) em ratos e observou o aumento tanto do NGF como do TNF- α e da IL-1 β . Nesses mesmos ratos, ele realizou aplicação de TNF- α e flagrou aumento de NGF e IL-1 β (45). Uma das formas do NGF de induzir a produção do TNF- α é através da via de sinalização intracelular NF- κ B (fator nuclear kappa B), mas, na realidade, poucos são os estudos que observam isso como estimulações diretas tendo em vista a cascata inflamatória que engloba as citocinas de forma geral (46).

Tais relações ratificam a pluralidade dos processos inflamatórios envolta da CAC e a importância dessa condição não ser avaliada de forma isolada.

1.4. Recetor da vitamina D e SNP rs731236 (A>G)

A vitamina D, um pré-hormônio secoesteroide lipossolúvel, além atuar no metabolismo do cálcio e da formação óssea, relaciona-se com o sistema imunológico e uma ampla variedade de tecidos corporais como cérebro, coração, pele, intestino,

gônadas, próstata, mamas e células imunológicas, além de ossos, rins e paratireoides e também pelo fato que a vitamina D regula a expressão de mais de 100 genes por meio VDR (8).

A principal via de obtenção de vitamina D em humanos é por meio da síntese cutânea sob a ação dos raios ultravioleta. A produção de vitamina D na pele supre de 80% a 100% das necessidades corporais. O precursor, 7-desidrocolesterol (pró-vitamina D), sintetizado pelo fígado a partir do colesterol, é convertido na pele enquanto o indivíduo é exposto ao sol. Por meio da isomerização térmica, a pré-vitamina D se converte em vitamina D e, na circulação, liga-se à proteína de ligação à vitamina D (DBP) e segue para o fígado, onde um grupo hidroxilo se liga ao átomo de carbono 25 para gerar 25-hidroxivitamina D ou 25(OH)D (calcidiol). Após essas etapas, a 25(OH)D é libertada na circulação, passando por uma nova etapa de ativação nos rins, onde a 1- α -hidroxilase converte a 25(OH)D em 1,25 di-hidroxivitamina D ou 1,25(OH)D (calcitriol), transformando-a assim em sua forma ativa, que é distribuída para diferentes tecidos corporais, como osso, tecido muscular ou intestino (9).

O calcitriol, por sua vez, exerce seus efeitos principais ao interagir com o VDR. Esse recetor é um fator de transcrição ligante-dependente que regula a transcrição génica e a função celular em diversos tecidos. A vitamina D, ao se ligar ao VDR, forma um complexo com o recetor retinóico X (RXR) que, dimerizado, se liga aos elementos responsivos à vitamina D (VDREs). Dessa forma, provoca a migração dos mesmos para o núcleo celular, onde exercem seus efeitos regulatórios ligando-se a sequências específicas do DNA. No núcleo, o complexo VDR e VDREs é capaz de formar interações que podem reprimir ou ativar um determinado número de genes implicados nas mais diversas funções biológicas (47, 48).

A vitamina D também desempenha um papel na redução da produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Inclusive, a deficiência desta vitamina tem sido associada ao risco e à gravidade de diversas doenças, incluindo cancro, doenças cardiovasculares, sarcopenia, osteoartrite e infeções (12).

Alguns SNPs no gene *VDR* estão relacionados, inclusive, com a cascata inflamatória da artrite reumatoide, espondilite e doença de Crohn, por exemplo, assim como com a secreção de insulina em doentes com diabetes mellitus (DM) (49). Da mesma forma, em 2011, Borges e colaboradores observaram que a vitamina D apresenta um possível papel nas células T mediadas por imunidade e resposta inflamatória e tem efeitos benéficos na melhoria de várias doenças autoimunes (50). Em conformidade com isso, a

reposição de vitamina D já foi relacionada à diminuição de marcadores inflamatórios, como a PCR, e relacionada com o aumento da Capacidade Antioxidante Total (CAT) (49).

A ratificar esses resultados, pesquisadores têm demonstrado que a vitamina D pode ter um papel no estado de inflamação através de diversos efeitos sobre as células inflamatórias (51). Ao encontro disso, Shea e colaboradores, em 2008, observaram uma relação negativa entre vitamina D e marcadores da inflamação e do estresse oxidativo (52). A também corroborar, Asemi e colaboradores, em 2013, em um estudo realizado com gestantes, observaram que, após a suplementação da vitamina D, houve redução dos níveis de PCR e aumento da CAT (53). Da mesma forma, Barker et al., em 2015, observaram que a suplementação de vitamina D em adultos saudáveis pode aumentar os níveis de IL-10 e interferon gama (IFN- γ) (citocinas anti-inflamatórias) mesmo em indivíduos inicialmente com baixos níveis séricos de 25-hidroxivitamina D (54).

Os polimorfismos do VDR são inúmeros e estão submetidos à investigação de diversas formas. No presente estudo, nosso alvo é o SNP rs731236 (TaqI) (A>G). Esse SNP é localizado no exão 9 do gene *VDR* e situa-se especificamente na região 3' não traduzida (3'UTR, do inglês “*untranslated region*”). Embora essa variação não altere a sequência de aminoácidos da proteína codificada, ela pode influenciar a expressão, estabilidade ou regulação do mRNA (11).

É o VDR o ponto chave para a atividade da Vitamina D. O VDR tem o locus genómico localizado no cromossoma 12q13.1 (cromossoma 12, braço longo, região 1, banda 3 e sub-banda 1). Trata-se de um gene extenso, com pouco mais de 100 kb (55). Abdelsattar e colaboradores (2023) realizaram uma investigação com o objetivo de analisar a relação entre a doença renal crónica (DRC) e a doença de desmineralização óssea (DMO). Nesse estudo, os autores avaliaram o SNP rs731236 (TaqI) do gene *VDR*, em associação com os níveis séricos de vitamina D e a ocorrência de DMO. Os doentes com DMO associada à DRC e portadores do genótipo GG apresentaram redução significativa dos níveis séricos de 25(OH)D. Além disso, a presença do genótipo GG aumentou de forma expressiva a suscetibilidade à DMO-DRC (razão de probabilidades [do inglês “*odds ratio*”, OR]: 19,6; IC 95%: 4,3–89,9; $p < 0,01$), quando comparada aos genótipos AA ou AG. De igual modo, a presença do genótipo GG aumentou em 7,25 vezes a probabilidade de deficiência de 25(OH)D em doentes com DMO-DRC (IC 95%: 2,21–23,80; $p < 0,01$) (56). De forma consistente, Bala Waziri e colaboradores (2018)

também observaram, em indivíduos com DRC, níveis séricos de vitamina D significativamente mais baixos nos portadores do genótipo GG (57).

1.5. VDR: papel em caquexia associada a cancro

A correlação entre baixos níveis circulantes de vitamina D e distúrbios do metabolismo muscular, incluindo recuperação muscular deficiente, atrofia, sarcopenia e caquexia, tem sido amplamente investigada em diversos contextos clínicos e experimentais (28). A hipovitaminose D também foi extensivamente estudada em associação com diferentes tipos de cancro (58–60).

Em modelos celulares, vários mecanismos pelos quais a vitamina D influencia a função do músculo esquelético foram elucidados. Esses mecanismos dividem-se em efeitos genómicos e efeitos não genómicos. Os efeitos genómicos resultam da ligação da vitamina D ao recetor nuclear VDR, que atua como fator de transcrição, regulando a expressão de genes envolvidos no crescimento, diferenciação e metabolismo muscular. Por outro lado, os efeitos não genómicos decorrem da interação da vitamina D com recetores de membrana, desencadeando uma ativação rápida de vias de sinalização intracelular (61-63).

De forma particular, a vitamina D promove a migração e diferenciação dos progenitores do músculo esquelético para locais de lesão, facilitando a remodelação tecidular. Contudo, o número de cópias do gene *VDR* diminui com a idade, o que contribui para a redução da força e da massa muscular observadas no envelhecimento (63, 64). Em 2003, Endo e colaboradores avaliaram o diâmetro das fibras musculares de murganhos com gene *VDR* nulo. Estes animais apresentaram uma redução de cerca de 20% no tamanho das fibras musculares relativamente aos murganhos selvagens, além de fibras de tamanho irregular, apesar da ocorrência normal da diferenciação dos miócitos. Estas anomalias foram acompanhadas por expressão aberrante e persistente de Myf5, miogenina, E2A e isoformas iniciais da cadeia pesada da miosina, genes que normalmente são regulados negativamente nas fases iniciais da miogénese (65).

A CAC caracteriza-se por anorexia, inflamação, resistência à insulina e aumento da degradação proteica muscular (66). A resistência à insulina, por sua vez, está relacionada à hipovitaminose D, e a suplementação de vitamina D tem demonstrado melhorar tanto a resistência como a sensibilidade à insulina (67). Quase todas as formas de caquexia estão

intimamente associadas à inflamação crónica e a níveis elevados de citocinas inflamatórias e pró-inflamatórias, tais como IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ . Entre as diferentes vias envolvidas na produção destas moléculas, destaca-se o eixo vitamina D–VDR, cujo papel, incluindo o de polimorfismos genéticos do *VDR*, é considerado determinante na modulação da resposta inflamatória (12, 68).

Punzi e colaboradores (2012) avaliaram os polimorfismos BsmI, ApaI, TaqI e FokI do gene *VDR* em doentes com CAC e observaram que os genótipos AA se associavam a valores médios mais elevados de PCR. O alelo A estava sobrerrepresentado entre os doentes com CAC, sobretudo naqueles com níveis aumentados do marcador de inflamação sistémica. Os investigadores concluíram que portadores do alelo A são mais suscetíveis a desenvolver caquexia como consequência dessa inflamação persistente (12). Apesar da relevância biológica do eixo vitamina D–VDR, existem poucos estudos sobre o impacto da suplementação de vitamina D em doentes com CAC. Num estudo de 2000, envolvendo 16 doentes com cancro da próstata metastático avançado, a administração diária de 2000 UI de vitamina D, associada a 500 mg de cálcio durante 12 semanas, resultou em melhoria da força muscular, embora a composição corporal não tenha sido avaliada (69). Em modelos animais, observou-se que roedores com hepatoma AH130 apresentavam redução significativa da vitamina D circulante, associada à caquexia, comparativamente aos controlos. Essa deficiência foi acompanhada por aumento do mRNA do *VDR* no músculo esquelético. Após administração de vitamina D, verificou-se elevação dos níveis séricos e da expressão muscular do VDR, mas sem alteração significativa no peso corporal ou na massa muscular. Neste mesmo estudo, mioblastos tratados com vitamina D não se diferenciaram adequadamente, formando estruturas multinucleadas anómalas e com baixo teor de miosina de cadeia pesada. Este tratamento induziu superexpressão do VDR e inibição da miogénese, efeito que foi revertido quando o VDR foi silenciado, sugerindo que a superexpressão do VDR contribui para a perda muscular, interferindo no processo regenerativo. Ainda nesse estudo, murganhos com carcinoma pulmonar de Lewis (LLC) apresentaram diminuição significativa do peso corporal e da massa muscular, acompanhada por aumento da expressão de VDR no músculo esquelético, embora os níveis plasmáticos de vitamina D não se diferenciassem dos controlos (70).

Em contrapartida, Ryan et al., em 2018, demonstraram que o tratamento com vitamina D preveniu as alterações induzidas pelo LLC em mioblastos, sugerindo um efeito protetor da suplementação na fraqueza muscular associada à caquexia (71). Num

estudo clínico com 308 doentes submetidos a quimioterapia para cancro da mama (2006–2012), Zeichner et al, observaram que a sobrevivência livre de doença foi significativamente maior entre os indivíduos que receberam suplementação de vitamina D, em comparação com os não suplementados (72). Por outro lado, Penna et al. (2017) argumentaram que a suplementação de vitamina D pode, em determinadas condições, prejudicar a regeneração muscular na caquexia, possivelmente por induzir níveis excessivos de VDR (73). Em 2015, num estudo com adultos com hipovitaminose D, a suplementação foi associada a melhor recuperação muscular após lesão induzida, reforçando o potencial papel da vitamina D na regeneração tecidual (63).

Ainda no contexto da miogênese, a deficiência de vitamina D está associada a anormalidades do músculo esquelético, incluindo redução do conteúdo de actomiosina, diminuição dos níveis de cálcio no retículo sarcoplasmático e baixos níveis séricos de creatina quinase (74). É uma condição frequente em indivíduos idosos, sendo considerada um marcador independente de fragilidade e mortalidade (75).

Para explicar essas afirmativas acima, em cultura de miócitos, Camperi e colaboradores, observou um rápido declínio dos níveis de VDR à medida que a diferenciação celular progredia; tal redução é acompanhada por níveis aumentados de miogenina, um dos marcadores de diferenciação miogênica. Quando a diferenciação foi induzida na presença de vitamina D, os níveis de fatores regulatórios miogênicos, como PAX7 e miogenina, foram significativamente reduzidos, tanto em 2 quanto em 4 dias após a mudança para o meio de diferenciação sob uso de vitamina D (no primeiro dia, VDR e miogenina crescem juntos). O PAX7 é um fator de transcrição essencial para manter a identidade das células satélites, pois ele as mantém em repouso e promove a replicação sem iniciar a diferenciação já que, no momento da diferenciação, os genes da Miogenina, MyoD e Myf5 que são ativados enquanto o PAX7 é reprimido. Nesse mesmo estudo, não houve diferença quanto à expressão de MyoD no grupo controlo e no suplementado com vitamina D. Ao mesmo tempo, paralelamente à redução da miogenina, o VDR foi superexpresso tanto no nível de mRNA quanto no nível de proteína de maneira negativamente correlacionada com um $p = 0,0031$. Tais dados ratificam Endo e colaboradores que avaliaram o diâmetro da fibra muscular de murganhos com o gene *VDR* nulo e encontraram uma diminuição de cerca de 20% no tamanho da fibra muscular quando comparada aos selvagens e apresentavam tamanho variável nessas fibras e, apesar dessas alterações, a diferenciação geral dos miócitos ocorreu. Essas anormalidades foram acompanhadas por expressão aberrantemente alta e persistente de

Myf5, miogenina, E2A e isoformas iniciais da cadeia pesada da miosina, que normalmente são reguladas negativamente em estágios iniciais da miogênese. Além disso, o tratamento de células mioblásticas positivas para *VDR* com vitamina D in vitro causou a regulação negativa desses fatores. Esses resultados sugerem que o VDR desempenha um papel fisiológico no desenvolvimento do músculo esquelético, participando da regulação negativa temporalmente estrita dos fatores de transcrição mioregulatórios. (65, 70).

A miogênese diz respeito a uma orquestração de fases onde os fatores reguladores miogênicos (MRFs) ativam cada etapa: manutenção da célula satélite quiescente (célula tronco do músculo inativa) que está sob responsabilidade da ativação da PAX7; ativação celular para tornar a célula satélite um mioblasto ativo que teremos o MyoD e o Myf5 ativos e ainda há presença da PAX7; etapa de proliferação onde os mioblastos se multiplicam sob efeito da MyoD, Myf5 e PAX7 ativos; após essa proliferação celular, chegaremos à diferenciação, onde a PAX7 será reprimida, o MyoD aumentará sua atividade, a Miogenina e a Mef2 começarão a ser expressa e os mioblastos se diferenciarão e perderão a capacidade de se dividir e se fundirão, sob efeito da Miogenina e da Mef2 e silenciamento da PAX, da MyoD e do Myf5 (**Figura 2**). É essa fusão dos mioblastos entre si que formarão miotubos multinucleados com a expressão de miosinas de cadeias pesadas e evoluirão com marcadores contráteis com, além da miosina, a actina e a troponina; em seguida, o PAX7 volta a ficar ativo e parte das células voltam ao estado quiescente (70). Camperi e colaboradores mostraram que a vitamina D aumenta muito a expressão do VDR, porém, isso vem acompanhado de redução da miogenina, o que provoca inibição da diferenciação miogênica e a fusão dos mioblastos. Tais fatores estão intimamente ligados ao músculo caquético, no qual a supressão da miogenina é clara. Camperi et al. ainda observaram o gene da miogenina e mostraram a presença de 15 elementos responsivos a VDR previstos no início da transcrição da miogenina, o que significa uma forte associação do VDR com o gene promotor da miogenina. Nessa condição, testaram silenciar o VDR e perceberam que as células C2C12 com o VDR silenciado não eram mais sensíveis ao tratamento com VitD e se diferenciavam normalmente em miotubos maduros (70).

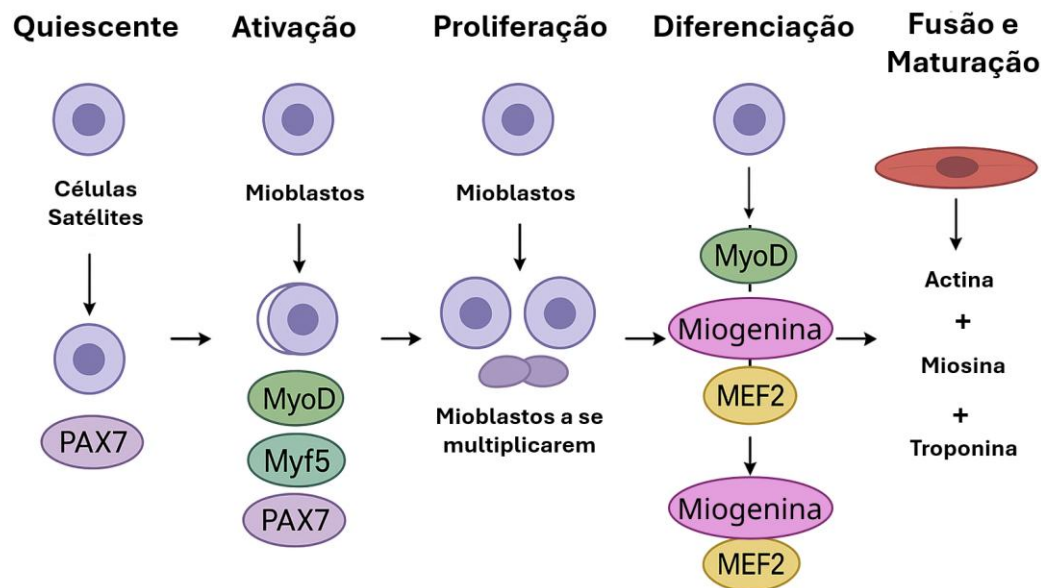


Figura 2: Fases da miogénese: A orquestração da miogénese por fases com os respetivos fatores reguladores miogénicos (MRFs).

Recentemente, ainda sobre os miócitos, demonstrou-se que a deficiência de vitamina D induz atrofia muscular por hiperativação da via ubiquitina-proteassoma (UPS), principal via catabólica envolvida na degradação proteica e na caquexia oncológica, em conjunto com a autofagia. A UPS é o principal sistema intracelular de degradação de proteínas marcadas por ubiquitinação e regula a qualidade proteica, o ciclo celular, a diferenciação e o metabolismo muscular (**Figura 3**). Os marcadores clássicos de ativação da UPS no músculo são o MuRF1 e o Atrogin-1/MAFbx, ambos regulados pela vitamina D e pelo VDR, dado que níveis adequados de vitamina D reduzem a sua transcrição (76).

Em termos mecanísticos, a via UPS envolve três etapas principais: a ativação da ubiquitina (E1), sendo que a enzima E1 usa ATP para ativar a molécula de ubiquitina (Ub); a conjugação (E2), em que a ubiquitina é transferida da E1 para a enzima E2 (ubiquitina-conjugadora); e a ligação (E3), em que a enzima E3 (ubiquitina-ligase) reconhece a proteína-alvo e transfere a ubiquitina da E2, conferindo especificidade ao processo. A poliubiquitinação da proteína-alvo atua como sinal para a sua degradação pelo proteassoma 26S. No músculo esquelético, a hiperativação do sistema ubiquitina-proteassoma conduz à degradação excessiva de proteínas contráteis (actina e miosina), resultando em perda de massa muscular (atrofia) e caquexia oncológica, especialmente

quando associada à autofagia (76). De forma consistente com o papel protetor da vitamina D no músculo, estudos em doentes idosos demonstraram que a suplementação de vitamina D melhora a função muscular e contribui para a prevenção da atrofia associada à idade (77).

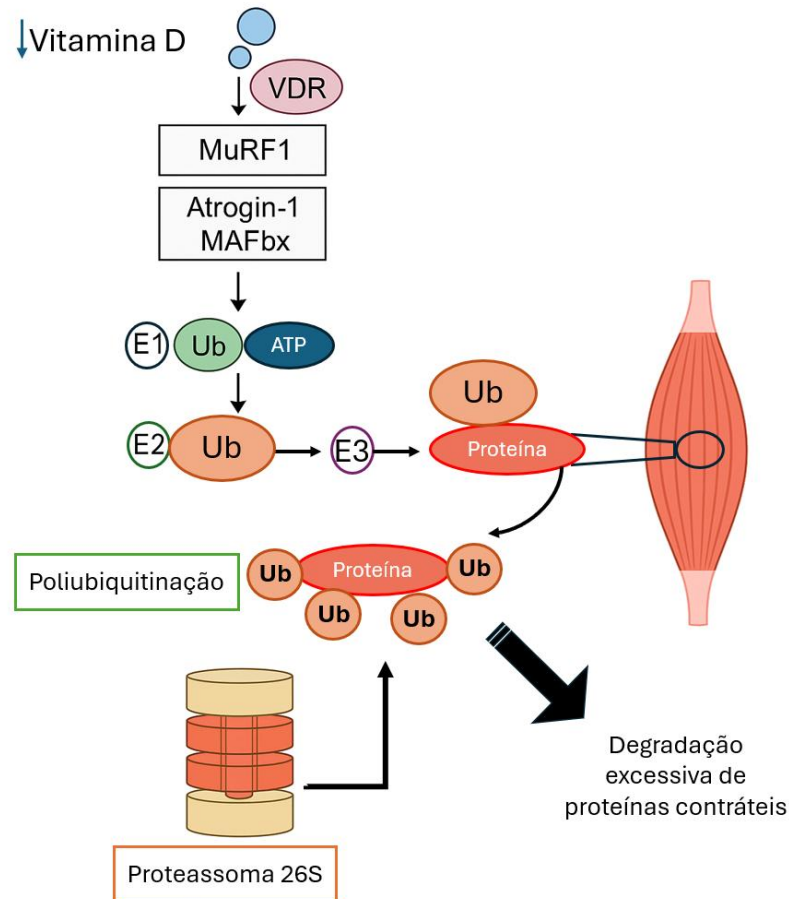


Figura 3: A via UPS e a hipovitaminose D. A via ubiquitina-proteassoma terá fatores transcripcionais tais quais MuRF1 e Atrogin-1/MAFbx ativados diante da hipovitaminose D o que gera atividade catabólica aumentada.

Tendo em conta a relevância da vitamina D e do seu recetor VDR na regulação da resposta inflamatória, do metabolismo muscular e dos mecanismos associados à caquexia, bem como o papel do NGF em processos inflamatórios e de remodelação tecidular, torna-se pertinente investigar de que forma variações genéticas nestes sistemas podem influenciar a evolução clínica de doentes oncológicos.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral:

Avaliar o impacto dos polimorfismos *NGF* rs6330 e *VDR* rs731236 no desenvolvimento da CAC e na sobrevivência dos doentes oncológicos.

2.2. Objetivos específicos:

- Analisar a distribuição genotípica do *NGF* rs6330 e *VDR* rs731236 na coorte dos doentes oncológicos;
- Relacionar os SNPs com os índices inflamatórios (NLR e PNI) nos doentes oncológicos;
- Verificar se há associação entre os dos SNPs e o desenvolvimento de CAC;
- Explorar o valor prognóstico das variantes genéticas relativamente a sobrevivência dos doentes oncológicos com ou sem a presença de CAC;
- Discutir sobre o papel dos SNPs na cascata inflamatória envolvida na patogénese de CAC.

3. Materiais e métodos

3.1. Desenho experimental

Foi realizado um estudo observacional transversal no Instituto Português de Oncologia do Porto (IPO Porto). A população-alvo foi os doentes com doença oncológica ativa, seguidos pela consulta pré-cirúrgica, Hospital de Dia (quimioterapia e infusão de outras terapêuticas antitumorais) e pela consulta de cuidados paliativos do IPO Porto. O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Investigação em Seres Humanos do IPO-Porto (CES. 131/022 e 237/020) após uma revisão exaustiva das implicações éticas do estudo.

3.2. Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos no estudo doentes com diagnóstico estabelecido de doença oncológica, em seguimento no IPO Porto, com idade ≥ 19 anos e com Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status (ECOG-PS) ≤ 3 . Por outro lado, foram excluídos aqueles que faziam parte de um protocolo de colaboração ou admitidos para uma segunda opinião, doentes que tomavam medicação prescrita com o objetivo específico de tratar a anorexia, indivíduos com alteração cognitiva ou do nível de consciência, barreira linguística e aqueles que se recusaram a participar no estudo. Um total de 141 doentes oncológicos recrutados entre março de 2023 e maio de 2024 preencheram os critérios e foram incluídos no estudo. Cada doente forneceu consentimento informado por escrito antes da inclusão no estudo em conformidade com a Declaração de Helsínquia.

O diagnóstico de CAC foi efetuado por uma nutricionista com experiência na avaliação desta patologia e os recursos utilizados foram os critérios de Fearon e a ferramenta CASC-IN. A avaliação foi realizada no mesmo dia em que cada doente foi recrutado.

3.3. Índices inflamatórios

Os índices inflamatórios foram calculados a partir das análises realizadas no sangue periférico de cada doente. O PNI foi calculado como o valor da albumina sérica (g/L) + 5 × linfócitos totais ($\times 10^9$ /L) [140] e o NLR como a contagem total de neutrófilos ($\times 10^9$ /L)/contagem total de linfócitos ($\times 10^9$ /L) [147].

3.4. Processamento de Amostras e Extração de ADN Genómico

Aquando do recrutamento dos doentes, foram colhidas amostras de sangue periférico no serviço de flebotomia do IPO Porto, utilizando um método padrão de venopunção. As colheitas foram realizadas em tubos contendo ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA).

Ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico foi extraído das amostras de sangue previamente armazenadas, utilizando o kit “MagaBio plus Virus DNA/RNA Purification Kit II” (BSC71S1E, Bioflux®, Japão) num extrator automatizado MGISP-NE32 (MGI Tech), seguindo as instruções do fabricante. A pureza e concentração do ADN foram avaliadas utilizando um espectrofotómetro NanoDrop Lite (Thermo Scientific®, Waltham, MA, EUA). Após a extração, as amostras de ADN foram conservadas a -20 °C até à sua utilização.

3.5. Seleção e Genotipagem de SNPs

As variantes genéticas foram selecionadas para o estudo com base na sua relevância na modulação da atividade das respetivas proteínas (ver **seção 1. Introdução**). Além disso, a frequência do alelo variante [do inglês “*minor allele frequency*”, (MAF)] foi um importante critério de seleção. Tendo em conta o tamanho amostral, foram selecionados SNPs com MAF superior a 15% de modo a garantir a representação de todos os genótipos na população de estudo.

A genotipagem dos polimorfismos foi realizada através da técnica PCR [do inglês, “*polymerase chain reaction*”] em tempo real (RT-PCR) com recurso a um equipamento PCR StepOnePlus™ (Applied Biosystems®, Carlsbad, CA, EUA), utilizando o método de discriminação alélica TaqMan®. As reações de PCR foram preparadas com 2,5 µL de TaqPath™ ProAmp™ Master Mix (1x), 2,375 µL de água livre de ADN e ARN, 0,125 µL de assay TaqMan® para cada SNP (C__2525309_10 para o *NGF* rs6330 e

C__2404008_10 para o *VDR* rs731236) e 1,0 μ L de ADN genómico, perfazendo um volume total de 6 μ L por reação. Em cada ensaio foram incluídos controlos negativos (sem ADN), com o objetivo de detetar possíveis falsos positivos. Como medida de controlo de qualidade, mais de 15% das amostras foram selecionadas aleatoriamente para repetição do teste, tendo-se verificado total concordância entre os resultados. A análise dos dados de amplificação foi efetuada com o software StepOne, versão 2.3 (Applied Biosystems®). Os resultados da genotipagem foram revistos de forma independente por dois investigadores, que desconheciam as características dos doentes.

3.6. Análise estatística

A análise estatística foi conduzida utilizando o software IBM SPSS Statistics (versão 29, IBM Corp., Armonk, NY, EUA).

Tendo em consideração o número de participantes, a verificação da normalidade das variáveis foi realizada através do teste de Kolmogorov-Smirnov. Consoante os resultados obtidos, as variáveis contínuas foram descritas com base na média (quando apresentavam distribuição normal) ou na mediana (distribuição não normal).

A distribuição genotípica e alélica dos SNPs foi comparada com os dados referentes à população ibérica disponíveis na base de dados Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>, última consulta em 18/08/2025). O equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) foi avaliado recorrendo ao teste do qui-quadrado de Pearson (χ^2). Este mesmo teste foi utilizado para avaliar a existência de associações entre os SNPs e características dos doentes.

O efeito dos SNPs sobre a sobrevivência global (SG) foi analisado através do método de Kaplan-Meier. A escolha do modelo genético mais adequado (dominante ou recessivo) baseou-se numa análise preliminar das curvas de sobrevivência utilizando o modelo aditivo. Para o efeito, SG foi definida como o intervalo entre a data de recrutamento (correspondente à data de diagnóstico de CAC para os doentes com a condição) e a data de morte dos doentes por qualquer causa (evento) ou a última avaliação clínica (censura).

Adicionalmente, para avaliar o impacto dos SNPs tanto na ocorrência de CAC (teste χ^2) como na SG (método Kaplan-Meier), foram realizadas análises estratificadas com base em características mais relevantes dos doentes.

Todos os testes foram bilaterais, com um nível de significância de 5%.

4. Resultados

4.1. Características da população de estudo

Dos 141 doentes recrutados para o estudo, 54,6% eram do sexo feminino ($n = 77$). A idade média e o índice de massa corporal (IMC) médio foram, respetivamente, $62,8 \pm 1,17$ anos e $26,1 \pm 0,5$ kg/m². Quanto às características clinicopatológicas, a maioria dos doentes (63,8%) apresentava doença metastática ao recrutamento. Relativamente ao tipo de neoplasia (**Figura 4**), os tumores mais frequentes foram os do trato gastrointestinal (39,0%), seguidos pelos da mama (13,5%), pulmão (11,4%) e urológicos (11,3%). Tumores da cabeça e do pescoço representaram 8,5% dos casos, enquanto os ginecológicos corresponderam a 6,4%. Foram ainda observados tumores hematológicos e de pele (ambos com 3,5%), sarcomas (2,1%) e, em menor proporção, tumores do sistema nervoso central (0,7%).

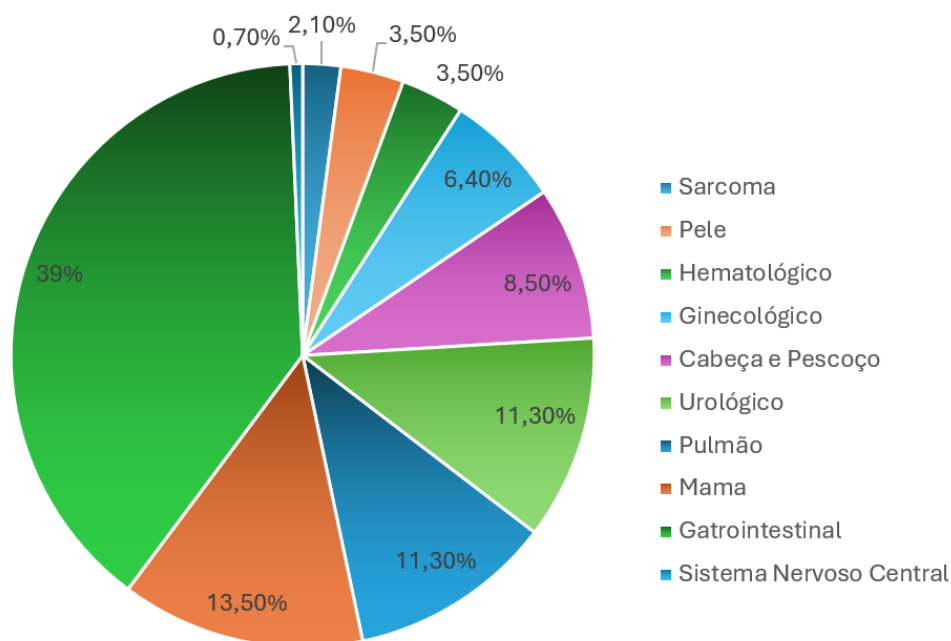
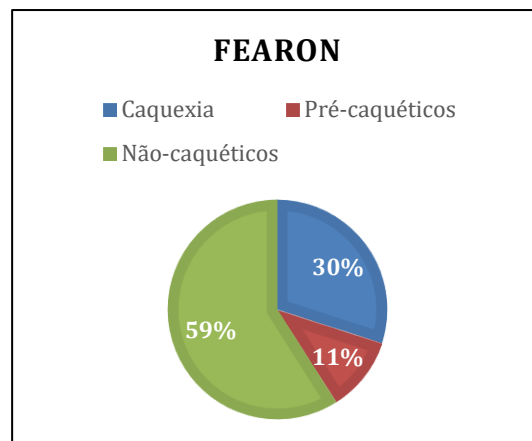


Figura 4: **Diferentes tipos tumorais.** Distribuição tumoral entre o grupo estudado ($N=141$)

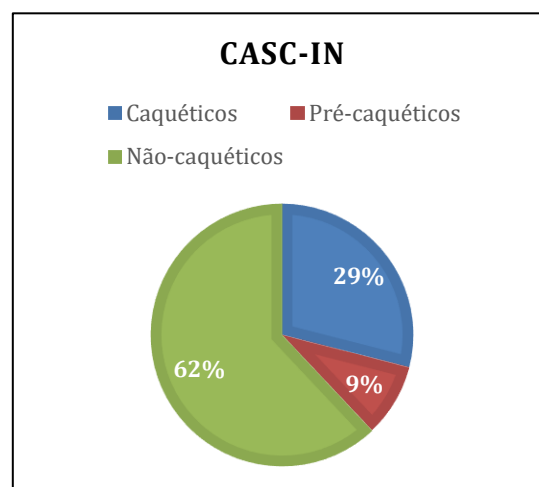
No que diz respeito ao tratamento oncológico, 31,3% dos doentes encontravam-se em quimioterapia, 22,7% em cuidados paliativos exclusivos, e 12,8% recebiam uma combinação de quimioterapia e imunoterapia. Outros regimes terapêuticos incluíram cirurgia (10,0%), imunoterapia isolada (10,0%), quimioterapia com radioterapia (5,8%),

terapia hormonal combinada com imunoterapia (3,6%), terapia hormonal isolada (2,3%) e quimioterapia associada a terapia hormonal (1,5%).

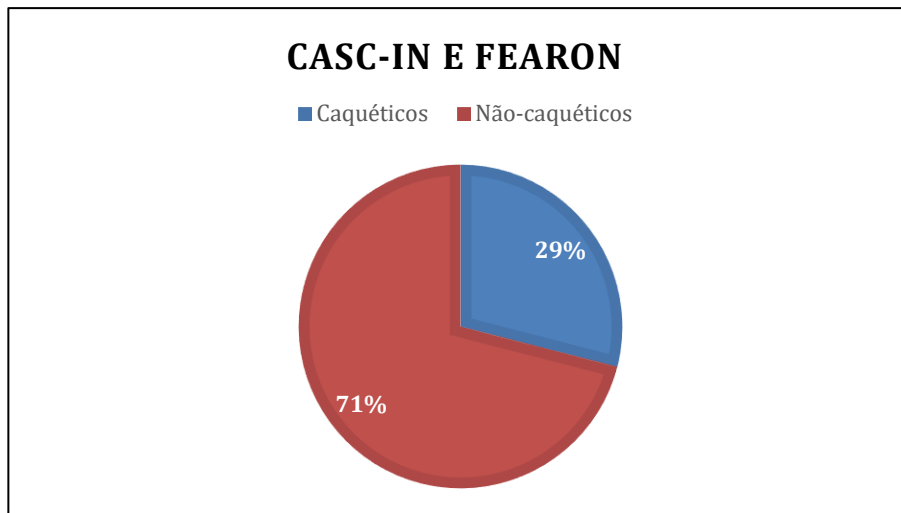
A amostra apresentou maior prevalência de doentes sem caquexia: 59% para os critérios de Fearon, 62% para o CASC-IN e 71% para caquexia com diagnóstico duplo (isto é, utilizando ambas as ferramentas). A caquexia apresentou prevalência semelhante, de aproximadamente 30%, utilizando ambas as ferramentas (**Figuras 5, 6 e 7**).



*Figura 5: **Prevalência por Fearon.** Prevalência da caquexia na amostra estudada segundo os critérios de Fearon.*



*Figura 6: **Prevalência pela CASC-IN.** Prevalência da caquexia na amostra estudada segundo a ferramenta CASC-IN.*



*Figura 7: **Prevalência duplamente diagnosticada.** Prevalência da caquexia na amostra estudada duplamente diagnosticada: critérios de Fearon e ferramenta CASC-IN.*

4.2. Associação entre os SNPs e os índices inflamatórios

Não foram observadas associações estatisticamente significativas entre os SNPs avaliados e os índices inflamatórios PNI e NLR, quer analisados individualmente, quer em combinação (teste χ^2 , $p > 0,05$; **Tabela 1**).

*Tabela 1: **Distribuição dos SNPs relacionados com o PNI e NLR.** Distribuição genotípica na população estudada com a avaliação do PNI baixo e NLR alto (ambos indicadores de pior prognóstico) sem resultados significativos no público estudado.*

SNP	Genótipo	Outros	PNI baixo + NLR alto	Total
VDR rs731236	AA	39 (76,5%)	12 (23,5%)	51 (39%)
	AG	44 (80%)	11 (20%)	55 (42%)
	GG	20 (80%)	5 (20%)	25 (57%)
	Total	103 (78,6%)	28 (21,4%)	131(100%)
NGF rs6330	GG	31 (86%)	5 (14%)	36 (27,5%)
	AG	49 (72%)	19 (28%)	68 (52%)
	AA	23 (85%)	4 (15%)	27(20,5%)
	Total	103 (78,6%)	28 (21,4%)	131(100%)

4.3. Impacto dos SNPs no status CAC

Na análise do polimorfismo rs731236 (A>G) do gene *VDR*, foi observada uma forte associação entre o genótipo AA e a presença de caquexia nos doentes oncológicos. Dos 140 doentes oncológicos estudados, 53 apresentam genótipo AA, 58 apresentam AG e 27 apresentam GG. Foi encontrada forte associação do genótipo AA com a caquexia na população estudada com a ferramenta CASC-IN. Pelo Pearson Chi-Square, temos um $p = 0,049$, pelo Likelihood Ratio, temos um $p = 0,025$ que ratifica o achado do Pearson e por associação linear, temos um Linear-by-Linear Association $p = 0,004$ e isso sugere que existe uma tendência linear entre os genótipos e a gravidade da caquexia (GG → AG → AA) (**Tabela 2**).

Tabela 2: Distribuição do SNP do VDR e a ferramenta CASC-IN. Distribuição genotípica para o rs731236 do VDR na população estudada com base na ferramenta CASC-IN para a caquexia (Linear-by-Linear Association $p = 0,004$).

		CASC-IN			
		Sem Caquexia	Pré-caquético	Caquético	Total
<i>VDR</i> _rs731236	AA	27 (50,9%)	5 (9,4%)	21 (39,6%)	53 (38,4%)
	AG	37 (63,8%)	4 (6,9%)	17 (29,3%)	58 (42%)
	GG	22 (81,5%)	3 (11,1%)	2 (7,4%)	27 (19,6%)
Total		86 (62,3%)	12 (8,7%)	40 (29%)	138 (100%)

Pelos critérios diagnósticos de Fearon, na população estudada, também houve forte associação do genótipo AA do rs731236 do *VDR* na mesma linearidade para o risco de apresentar caquexia: GG → AG → AA. Para o Pearson Chi-Square, obtivemos um $p = 0,031$, para ratificar esse resultado, o Likelihood Ratio apresentou um $p = 0,016$, e o Linear-by-Linear Association com um $p = 0,002$ (**Tabela 3**).

Tabela 3: Distribuição do SNP do VDR e os critérios de Fearon. Distribuição genotípica para o rs731236 do VDR na população estudada com base nos critérios de FEARON para a caquexia.

		FEARON			
		Sem caquexia	Pré-caquético	Caquético	Total
VDR_rs731236	AA	27 (49,1%)	5 (9,1%)	23 (41,8%)	55 (39,3%)
	AG	34 (58,6%)	7 (12,1%)	17 (29,3%)	58 (41,4%)
	GG	22 (81,5%)	3 (11,1%)	2 (7,4%)	27 (19,3%)
Total		83 (59,3%)	15 (10,7%)	42 (30%)	140 (100%)

Quando unimos os dois métodos para o diagnóstico da caquexia, os resultados são ainda mais fortes e mostram, novamente, o genótipo AA do rs731236 do VDR como fator de risco. Apresenta, assim, para o Pearson Chi-Square, um $p = 0,015$ e, para ratificar esse resultado, o Likelihood Ratio apresenta um $p = 0,007$ e o Linear-by-Linear Association apresenta um $p = 0,006$ (**Tabela 4**).

Tabela 4: Distribuição do SNP do VDR em duplo diagnóstico da caquexia. Distribuição genotípica para o rs731236 do VDR na população estudada com base nos critérios de FEARON e CASC-IN para a caquexia.

		FEARON+CASC-IN		
		Sem caquexia	Caquético	Total
VDR_rs731236	AA	34 (61,8%)	21(38,2%)	55 (39,3%)
	AG	41 (70,7%)	17 (29,3%)	58 (41,4%)
	GG	25 (92,6%)	2 (7,4%)	27 (19,3%)
Total		100 (71,4%)	40 (28,6%)	140 (100%)

Ao analisar a presença do alelo ‘A’ no rs731236 do VDR (seja AA ou AG) em comparação ao genótipo GG, novamente obtivemos forte significância. Um Pearson Chi-Square com o $p = 0.007$, um Continuity Correction com um $p = 0,013$, o Likelihood Ratio com um $p = 0.003$, o *Fisher’s Exact Test*, tanto unilateral ($p = 0,004$) como bilateral ($p =$

0.008) e, por fim, a Linear-by-Linear Association com um $p = 0,007$. Tais resultados mostram forte associação entre a presença do alelo A e a caquexia (**Tabela 5**).

Tabela 5: Distribuição do alelo 'A' do SNP do VDR. Presença do alelo A versus o genótipo GG para o rs731236 do VDR na população estudada com base nos critérios de FEARON e CASC-IN para a caquexia.

		FEARON+CASC-IN		
		Sem caquexia	Caquéticos	Total
VDR_rs731236	Alelo A	75 (66,4%)	38 (33,6%)	113 (80,7%)
	GG	25 (92,6%)	2 (7,4%)	27 (19,30%)
Total		100 (71,4%)	40 (28,6%)	140 (100%)

Em contrapartida, o polimorfismo rs6330 do gene *NGF* não demonstrou qualquer associação significativa com a caquexia, independentemente do critério diagnóstico utilizado, mesmo quando combinados (teste χ^2 , $p > 0,05$; **Tabela 6**), sugerindo ausência de relação entre os genótipos deste SNP e o desenvolvimento da síndrome.

Tabela 6: Distribuição genotípica para o SNP do NGF. Distribuição genotípica para SNP rs6330 (G>A) do NGF na população estudada com base nos critérios de FEARON e CASC-IN para a caquexia.

SNP	Genótipo	Sem caquexia	Com caquexia	Total
NGF rs6330	AA	31 (79,5%)	8 (20,5%)	39 (27,86%)
	AG	44 (62,9%)	26 (37,1%)	70 (50%)
	GG	25 (80,6%)	6 (19,4%)	31 (22,14%)
Total		100 (71,4%)	40 (28,6%)	140 (100%)

4.4. Impacto dos SNPs no prognóstico

No que diz respeito ao estudo da sobrevida global (independente do *status* nutricional) que levou em consideração o SNP rs731236 (TaqI) do gene VDR, a análise de sobrevida pelo método de Kaplan-Meier revelou uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos genotípicos, com destaque para o genótipo GG (amarelo). A

análise de sobrevida por Kaplan-Meier demonstrou diferenças marcantes no tempo de sobrevida global entre os três grupos genotípicos avaliados do SNP rs731236 (TaqI) do gene VDR. A curva que representa o GG tem o melhor desfecho clínico ao apresentar uma taxa acumulada de sobrevida superior a 90% ao longo de mais de 100 semanas, com escassos eventos de óbito. Já os grupos AG (verde) e AA (azul) evidenciam queda progressiva da sobrevivência, com maior incidência de eventos e menor tempo médio de sobrevida, especialmente o grupo com genótipo AG, que atinge aproximadamente 50% de sobrevivência por volta da 80ª semana. A distância visual entre as curvas, juntamente com o padrão de censura, sugere associação significativa entre o genótipo e o tempo de sobrevida, sendo o genótipo GG associado a maior sobrevida (**Figura 8**).

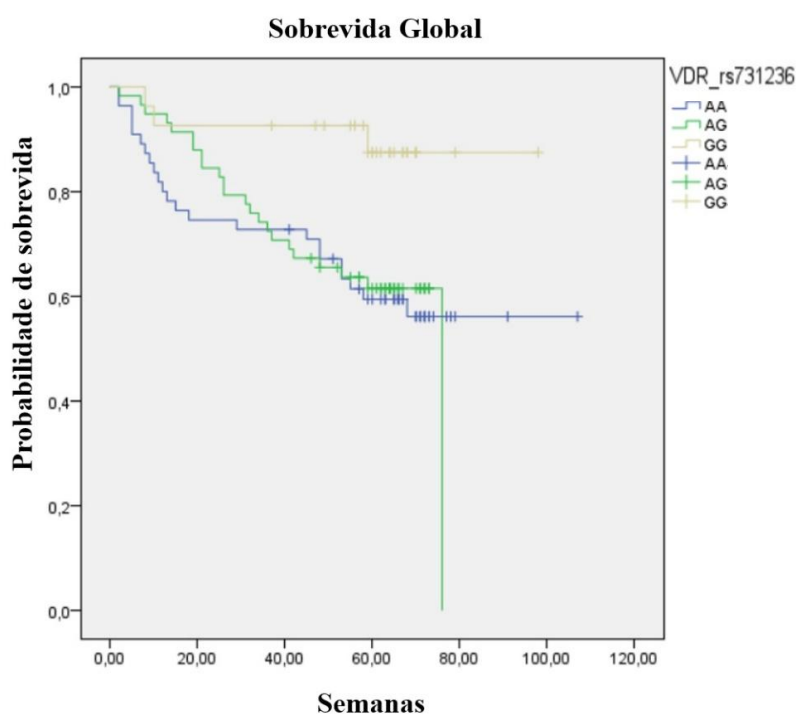


Figura 8: Análise de sobrevida global e o SNP do VDR. Análise de sobrevida global pelo método de Kaplan-Meier a avaliar a presença dos três genótipos AA, AG e GG para o rs731236 (TaqI) do gene VDR na totalidade dos doentes oncológicos independente do status nutricional (Por Log Rank: $p=0,029$)

Conforme a **Figura 9**, também pela análise de sobrevida pelo método de Kaplan-Meier, indivíduos com genótipo GG apresentaram uma sobrevida média de 89,4 semanas (IC95%: 80,0–98,8), superior à observada nos demais participantes (71,2 semanas; IC95%: 62,2–80,2). A proporção de censura no grupo GG foi de 88,9%, indicando que a maioria dos pacientes permaneceu viva ou sem progressão do evento durante o período de seguimento. A comparação entre os grupos por meio dos testes Log Rank e Breslow demonstrou significância estatística ($p = 0,008$ e $p = 0,011$, respectivamente), o que

confirma a associação entre o genótipo GG e maior tempo de sobrevida. Esses achados sugerem um possível efeito protetor do alelo G contra a progressão clínica do desfecho avaliado.

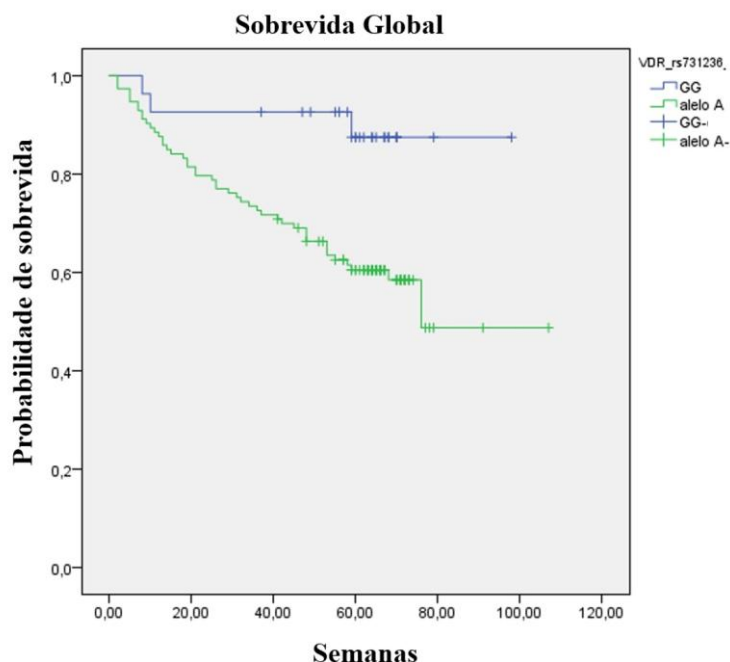


Figura 9: O forte impacto do genótipo GG do VDR na SG. Análise da sobrevida global para o rs731236 (TaqI) do gene VDR pelo método de Kaplan-Meier a avaliar a presença do alelo A (A+AG) versus o genótipo GG na totalidade dos doentes oncológicos, independente do status nutricional. (Por Log Rank: $p=0,008$)

Não foi encontrada significância estatística no que diz respeito à análise da SG associada ao SNP do VDR avaliada separadamente entre os grupos de doentes oncológicos com caquexia e o grupo de doentes oncológicos sem caquexia.

O SNP rs6330 (G>A) do NGF, por sua vez, não apresentou resultados significativos quando analisado pelo método de Kaplan-Meier para a SG na população de estudo. Da mesma forma, no grupo dos doentes oncológicos com e sem caquexia, não foi encontrada associação entre a SG e os genótipos para o rs6330 do NGF (**Figuras 10 e 11**).

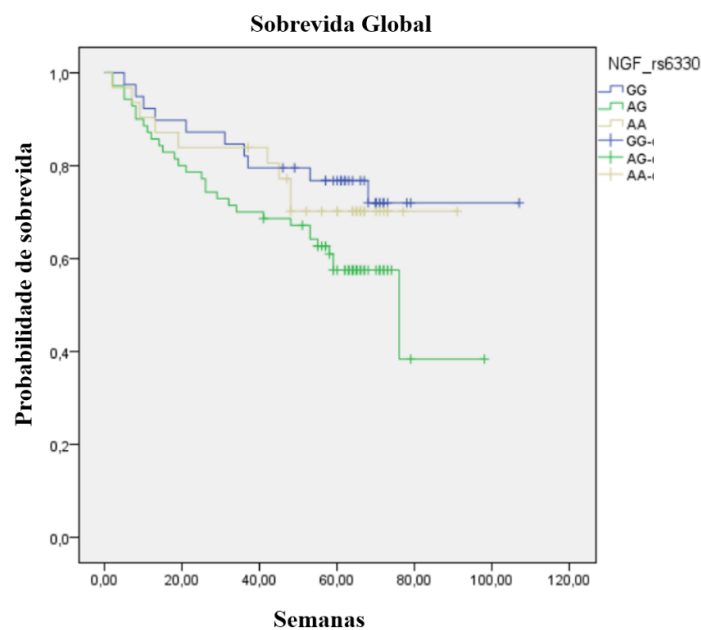


Figura 10: **Distribuição dos genótipos do SNP do NGF e a SG.** Análise de sobrevida global pelo método de Kaplan-Meier a avaliar a presença dos três genótipos AA, AG e GG para o SNP rs6330 G>A do NGF na totalidade dos doentes oncológicos, independente do status nutricional. (Por Log Rank: 0,146 e Breslow: 0,193)

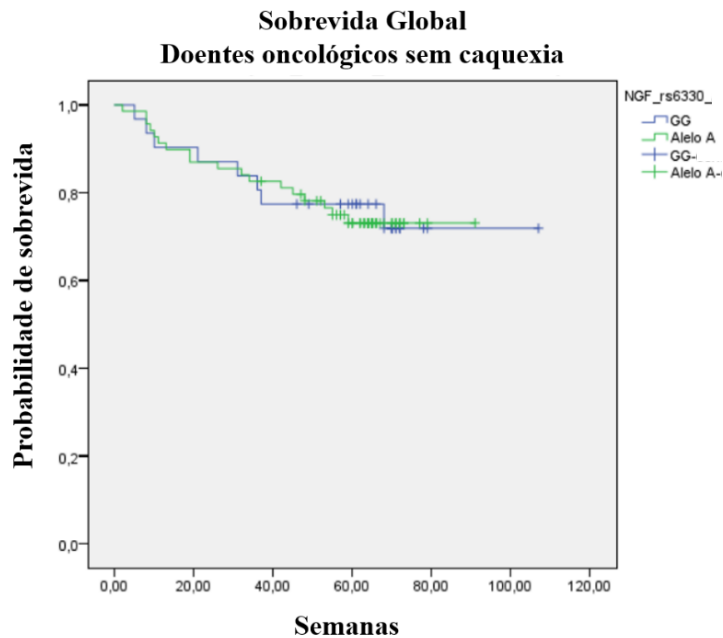


Figura 11: **O alelo 'A' do SNP do NGF e a SG.** Análise de sobrevida global pelo método de Kaplan-Meier a avaliar a presença do alelo A (AA+AG) e do genótipo GG para o SNP rs6330 G>A do NGF nos doentes oncológicos sem caquexia (Por Log Rank: 0,916 e Breslow: 0,890).

5. Discussão

Tendo como base nossa população de estudo e a complexidade envolta da CAC e o impacto da mesma na sobrevida dos doentes oncológicos, o presente estudo avaliou dois importantes polimorfismos de genes com amplas funcionalidades e verificou a associação desses SNPs com os índices inflamatórios, o desenvolvimento da caquexia e a sobrevida global.

Na população em estudo, 54,6% dos participantes eram do sexo feminino ($n = 77$) diferentemente do visto pelo observatório Global de Cancro, na Europa, onde 47,2% corresponde ao sexo feminino entre os doentes oncológicos na totalidade (sem restringir aos tipos de cancro) (1). Relativamente ao tipo de neoplasia, nossos resultados estão em consonância com o visto na população portuguesa (78).

A distribuição genotípica e alélica dos SNPs foi comparada com os dados referentes à população ibérica disponíveis na base de dados Ensembl e, em conformidade com a população ibérica, para o SNP rs731236 A>G do VDR, temos o alelo A como o mais frequente e o genótipo AG também como o mais frequente e, para o SNP rs6330 G>A do NGF, temos o alelo G como o mais frequente e o genótipo AG também como o mais frequente (79).

A prevalência de CAC diagnosticada pelos critérios de Fearon, CASC-IN e ambas as ferramentas foi semelhante, aproximadamente 30%. Esse valor é ligeiramente inferior à prevalência da doença relatada na literatura, provavelmente devido aos tipos de tumores e à heterogeneidade da amostra (3, 6, 80, 81). Em conformidade com a literatura, a caquexia está relacionada a um pior desfecho dentre os doentes oncológicos (4, 81) como pode ser observado na comparação das Figuras 7 e 8, onde temos a sobrevida entre os doentes com caquexia com decaimento importante (Figura 8) quando comparamos entre os portadores do alelo A. O que pode parecer ser contraditório é ter esse alelo selvagem “A” como indicativo de fator de risco para a Caquexia diante do fato de, em geral, estar associado a níveis mais elevados de Vitamina D e à maior atividade do VDR. No entanto, outros estudos, como já citados, encontraram relações semelhantes. Punzi e colaboradores, também observaram a associação da presença do alelo A com a caquexia e, ainda mais, com níveis consideravelmente elevados de PCR como preditor de gravidade da caquexia nos indivíduos AA em comparação a outros genótipos (12).

Conforme já dito, Camperi e colaboradores, em ratos com hepatocarcinoma, observaram que a caquexia estava relacionada com menores índices de vitamina D e essa hipovitaminose caminhava junto ao aumento da atividade do mRNA do VDR nos músculos esqueléticos. Neste mesmo estudo, foram além: viram que a suplementação da vitamina D resultou na superexpressão do VDR e na regulação negativa da miogênese com a perda muscular e observaram que, inclusive, independentemente da vitamina D circulante, a presença do tumor sempre foi associada à regulação positiva da expressão do VDR muscular tanto nos modelos com hepatocarcinoma como nos modelos de murganhos com LLC (70). Novamente, em conformidade com isso, o presente estudo encontrou o alelo 'A' não só associado à caquexia e a pior sobrevida, como também o encontrou mais frequentemente entre os doentes oncológicos. Dito isto, podemos aventar sobre a possibilidade de o ambiente do cancro gerar outros fatores ligantes ao VDR capazes de provocar superexpressão do mesmo e competir com a própria vitamina D já que não se obteve ganho de peso ou melhoramento da massa muscular mesmo com a suplementação nesses estudos pregressos.

Para também corroborar com esse achado de maior frequência do alelo 'A' entre os doentes oncológicos no estudo atual, entra o contexto da função protetora do VDR no que diz respeito a função do mesmo com o ligante vitamina D no ciclo celular e apoptose: a vitamina D e vários derivados sintéticos que apresentam atividade calcêmica reduzida, como EB1089, MC903 e KH1060, inibem o crescimento de células epiteliais, de melanoma, de sarcoma de tecido mole e leucêmicas, induzindo a parada do ciclo celular ou apoptose (82). Além disso, eles inibem a capacidade invasiva in vitro, a síntese de várias proteínas associadas à invasão (83, 84) e a angiogênese induzida por tumor (85) de células de cancro de mama, e mostram uma atividade quimiopreventiva em modelos animais de cancro colorretal e de mama (86, 87) (**Figura 12**). Nesse mesmo contexto protetor do VDR, é sabido que esse recetor é expresso na mucosa colônica normal, aumenta levemente na condição hiperplásica e é claramente menor nos estágios finais da carcinogênese (88). Consequentemente, a alta expressão de VDR está associada a um prognóstico favorável em pacientes com câncer colorretal, sugerindo que esses recetores estão envolvidos nessa patogênese e seu papel potencial como um marcador preditivo (89).

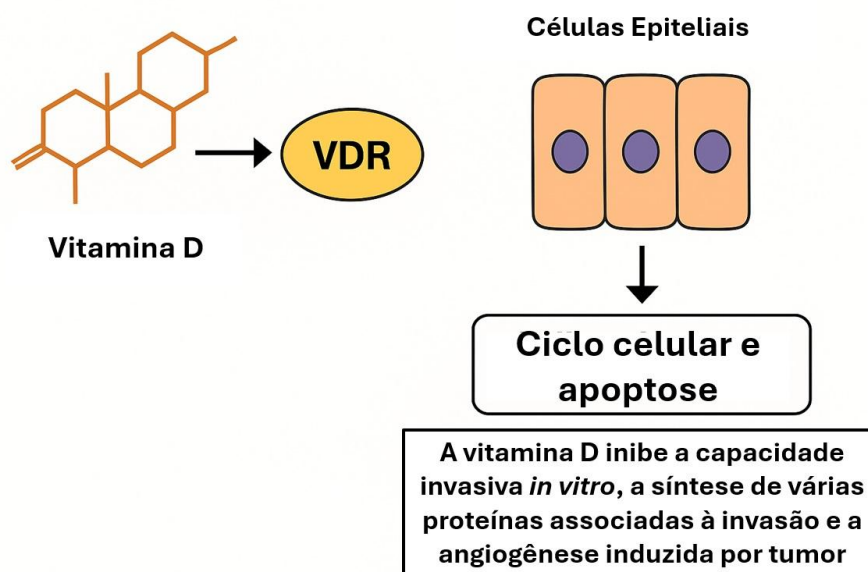


Figura 12: A vitamina D com o VDR e o ciclo celular. A importância do VDR e seu principal ligante, Vitamina D, no ciclo celular no âmbito tumoral.

Ainda no âmbito da miogênese, na tentativa de justificar como o alelo ‘A’ no SNP VDR rs731236, que é o alelo selvagem relacionado a maior atividade do VDR, apresenta-se como fator de risco independente do status nutricional, toma-se como base a família MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), em especial a p38. A p38 MAPK é uma quinase da família MAPK relacionada à resposta inflamatória, à resposta imune, à diferenciação celular e à apoptose. A p38 MAPK fosforila fatores de transcrição como a Miogenina, Mef2 e MyoD para ativá-los. A vitamina D participa dessas etapas ao ativar o VDR e a p38 e, a depender da fase da miogênese, essa ativação não necessariamente será harmônica, como já explicado na introdução (90). Diferente de Camperi e colaboradores, Irazoki e colaboradores observaram em miócitos C2C12, que a vitamina D induz um aumento acentuado na expressão de miogenina em 24 h, que ainda é evidente em 72 h, em células C2C12 WT. Além disso, viram que os níveis de miogenina são indetectáveis em células C2C12 com silenciamento de VDR em todos os momentos estudados, o que indica que o VDR é necessário para a síntese dependente de hormônio dessa proteína marcadora de diferenciação precoce e também foi evidenciado que a expressão de miogenina desencadeada por vitamina D é dependente da ativação da p38 (90). Em um ambiente típico, no primeiro dia da diferenciação dos mioblastos, o VDR e a miogenina crescem proporcionalmente como visto por Camperi e Irazoki (70, 90). No entanto, Camperi *et al.* foram além, perceberam que, com o passar dos dias, em um

ambiente com reposição de vitamina D, os mioblastos passaram a apresentar VDR e Miogenina de forma inversamente proporcional, a partir do 3º dia da diferenciação: VDR alto e Miogenina baixa (70). Dessa forma, a hipovitaminose D, comum aos doentes oncológicos, possivelmente é acompanhada de uma atividade exacerbada da VDR e, sendo a vitamina D e o VDR essenciais no contexto da diferenciação dos mioblastos e do ciclo celular, a hipovitaminose e/ou a superexpressão do VDR podem criar o desequilíbrio propício para atrapalhar a miogênese assim como o ciclo celular. O que, mais uma vez, corrobora com os achados do estudo atual com a associação do alelo 'A' com a caquexia e diminuição da SG com a possível superexpressão do VDR a interferir na ação da miogenina e, por sua vez, na caquexia.

No que diz respeito ao PNI e ao NLR, em um estudo com doentes com carcinoma hepatocelular de Kinoshita et al., assim como nosso estudo, não encontraram forte associação com a sobrevida em comparação com outros escores, como o Escore Prognóstico de Glasgow (GPS) (91). Diferentemente, Leão Silva e colaboradores, em 2024, em um grupo com 109 doentes, encontram forte associação entre esses índices e a CAC (92).

Em relação ao SNP rs6330 (G>A) do *NGF*, não foram obtidos resultados no envolvimento do mesmo quanto à caquexia e à sobrevida apesar da cascata inflamatória tão bem estabelecida no que diz respeito ao NGF e o metabolismo da glicose, lipídeos e proteínas musculares e o envolvimento, juntamente com as citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α e interleucina-6 (IL-6), nos estados inflamatório da caquexia conforme já dito na introdução do presente estudo (5, 93, 94).

Dessa forma, tanto o VDR e a Vitamina D como o NGF são importantes alvos de estudo com viabilidades biológicas bem estabelecidas e de impacto para o meio das doenças oncológicas e precisam ser ainda mais estudadas no que diz respeito a CAC (Figura 13).

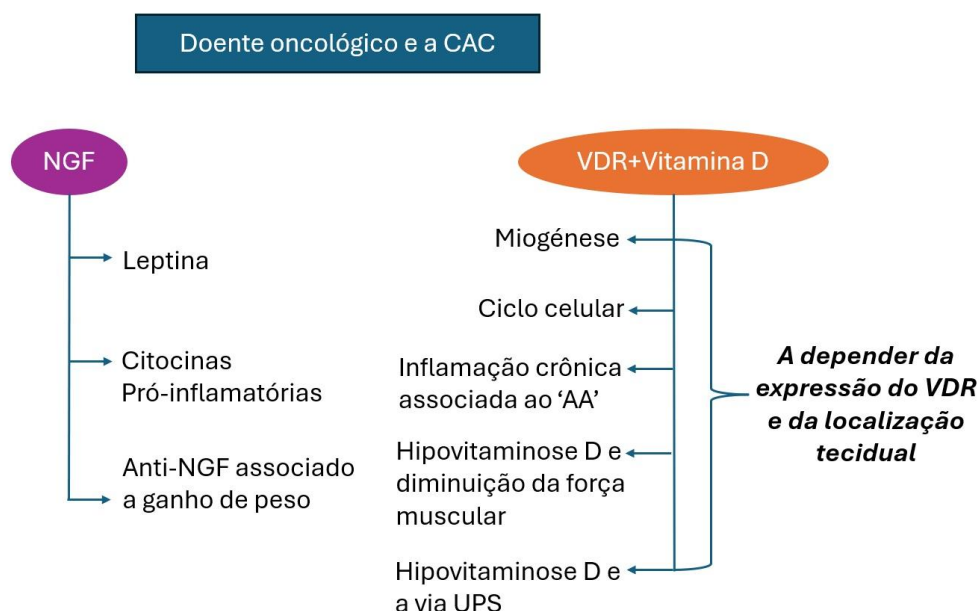


Figura 13: **O NGF e o complexo Vitamina D e VDR na CAC.** Ambos complexos a influenciar o doente oncológico e mecanismos que podem interferir na CAC sob o espectro, para o VDR, da localização tecidual e expressão gênica.

6. Conclusão e perspectivas futuras

Relativamente ao tipo de neoplasia, nosso estudo está em conformidade com o visto na população portuguesa. O alelo 'G' no SNP do *VDR* se apresenta como fator de proteção com forte relação com melhor sobrevida global independente do *status* nutricional. O alelo 'A' no SNP *VDR* se apresenta fortemente ligado à CAC assim como à pior sobrevida global independente do *status* nutricional. A heterogeneidade entre os tipos de cancro na amostra estudada reforça ainda mais a importância desses resultados.

Encontramos o alelo selvagem A no SNP do *VDR* como o mais frequente em nossa população de estudo. Como sabido, esse alelo está relacionado à maior atividade do VDR e apresenta papel protetor no que diz respeito ao ciclo celular e ao desenvolvimento tumoral em alguns cânceros. De forma inequívoca, o VDR tem papel crucial na miogênese a influenciar os MRFs e esse pode ser um dos motivos para a forte relação do alelo A no SNP do *VDR* com a caquexia. Da mesma forma, a via ubiquitina-proteassoma tem fatores claros de como a hipovitaminose D pode contribuir para a degradação muscular e caquexia. Diante disso, mais estudos podem ser feitos para acrescentar a dosagem dos níveis séricos de vitamina D, Miogenina, MEF2, MyoD e PAX7 acompanhada da medição do mRNA do VDR e da própria proteína a fim de elucidar melhor a temporalidade das fases da miogênese que o VDR passa, de facto, a fazer regulação negativa e, dessa forma, também testar a terapêutica de reposição de vitamina D nesse ambiente de cultura. Com isso, poderá relacionar esses achados aos diferentes genótipos tendo em vista a importância da compreensão da caquexia na oncologia.

Temos de um lado o VDR como protetor no ciclo do cancro e do outro o VDR associado à caquexia. A verdade é que isso flutuará em conformidade com a fase da doença e no tecido em que o mesmo se encontra: como visto em outros estudos, na fase proliferativa das células neoplásicas, teremos a superexpressão do VDR e, em contrapartida, nos estágios finais da doença, esse VDR tende a decair. Justamente nessa fase proliferativa da doença, poderemos assistir a um platô do VDR que tende a proteger o doente oncológico ao interferir no ciclo celular e na apoptose e, por outro, temos esse mesmo platô do VDR a interferir negativamente na miogênese. Dessa forma, observamos que a complexidade envolvida no ambiente das células tumorais se assegura em inúmeras vertentes e não poderá ser estudada à ótica de um único recetor e, para os próximos estudos, tanto a análise personalizada de um tipo de cancro como também as observações em meio de cultura para as diferentes fases da doença serão de grande valia.

Apesar da viabilidade biológica envolta no NGF, não conseguimos encontrar relevância em sua relação com a CAC e/ou com a sobrevida global tanto no SNP como no genótipo selvagem. Acreditamos que a avaliação sérica do NGF poderia mudar esses resultados e fica como plano futuro de investigação.

Quanto ao PNI e ao NLR, não encontramos associação com a caquexia ou com a sobrevida global nos genótipos estudados, apesar de quão bem estabelecidos estes parâmetros são para os doentes oncológicos. Acreditamos que, para os próximos estudos,

possa ser avaliada a aferência do TNF- α , PCR, IL-6 e IFN- γ a fim de correlacionar esses níveis séricos à caquexia e à sobrevida.

Em síntese, os resultados apontam para uma associação robusta entre o polimorfismo rs731236 do gene VDR e a caquexia em doentes oncológicos, bem como com a SG, sendo o alelo A (genótipos AA e AG) associado a maior risco de CAC e pior prognóstico dos doentes oncológicos. Já o polimorfismo rs6330 do gene NGF e os índices inflamatórios PNI e NLR não mostraram relevância clínica significativa neste estudo.

Na perspectiva desses achados e com essas sugestões de estudos futuros, a dedicação à medicina de precisão logo ao diagnóstico do cancro poderá contribuir com decisões terapêuticas que implicar-se-ão na qualidade de vida do doente oncológico.

7. Referências bibliográficas

1. Cancer TODAY IARC - <https://gco.iarc.who.int> Data version: Globocan 2022 (version 1.1) - 08.02.2024 © All Rights Reserved 2025
2. Silva PB, Silva LT, Gonçalves MC, Schirr RA. Prevalência de desnutrição e dor em pacientes admitidos pelo serviço de triagem em hospital oncológico. *Rev Dor*. 2013;14(4). doi:10.1590/S1806-00132013000400006
3. Argilés JM, Busquets S, Stemmler B, López-Soriano FJ. Cancer cachexia: understanding the molecular basis. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(11):754-62. doi:10.1038/nrc3829
4. Fearon K, Strasser F, Anker SD, Bosaeus I, Bruera E, Fainsinger RL, et al. Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. *Lancet Oncol*. 2011;12(5):489-95.
5. Bulló M, Peeraully MR, Trayhurn P, Folch J, Salas-Salvadó J. Circulating nerve growth factor levels in relation to obesity and the metabolic syndrome in women. *Eur J Endocrinol*. 2007;157(3):303-10.

6. Sadeghi M, Keshavarz-Fathi M, Baracos V, Arends J, Mahmoudi M, Rezaei N. Cancer cachexia: diagnosis, assessment, and treatment. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2018;127:91-104.
7. Ni J, Zhang L. Cancer cachexia: definition, staging, and emerging treatments. *Cancer Manag Res*. 2020;12:5597-605.
8. Jones BJ, Twomey PJ. Issues with vitamin D in routine clinical practice. *Rheumatology (Oxford)*. 2008;47(9):1267-8.
9. Garcia M, Seelaender M, Sotiropoulos A, Coletti D, Lancha AH. Vitamin D, muscle recovery, sarcopenia, cachexia, and muscle atrophy. *Nutrition*. 2019;60:66-9.
10. Padilha J. Relação das variantes genéticas do gene VDR com a hipovitaminose de marcadores do perfil glicêmico, lipídico, inflamatório, estresse oxidativo e antropométrico em adolescentes de escolas públicas no município de João Pessoa-PB [dissertação]. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba; 2017 [cited 2025 Jun 9]. Available from: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/123456789/12265>
11. Marozik PM, Tamulaitiene M, Rudenka E, Alekna V, Mosse I, Rudenka A, et al. Association of vitamin D receptor gene variation with osteoporosis risk in Belarusian and Lithuanian postmenopausal women. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:222.
12. Punzi T, Fabris A, Morucci G, Biagioni P, Gulisano M, Ruggiero M, et al. C-reactive protein levels and vitamin D receptor polymorphisms as markers in predicting cachectic syndrome in cancer patients. *Mol Diagn Ther*. 2012;16(2):115-24.
13. Mantyh WG, Jimenez-Andrade JM, Stake JJ, Bloom AP, Kaczmarek MJ, Taylor RN, et al. Blockade of nerve sprouting and neuroma formation markedly attenuates the development of late stage cancer pain. *Neuroscience*. 2010;171(2):588-98.
14. Ye Y, Dang D, Zhang J, Viet CT, Lam DK, Dolan JC, et al. Nerve growth factor links oral cancer progression, pain, and cachexia. *Mol Cancer Ther*. 2011;10(9):1667-76. doi:10.1158/1535-7163.MCT-11-0021
15. Taglialetela G, Foreman PJ, Perez-Polo JR. Effect of a long-term nerve growth factor treatment on body weight, blood pressure, and serum corticosterone in rats. *Int J Dev Neurosci*. 1997;15(6):703-10.
16. Zakharyan R, Atshemyan S, Gevorgyan A, Boyajyan A. Nerve growth factor and its receptor in schizophrenia. *BBA Clin*. 2014;1:24-9.
17. Nobel-winning scientist Levi-Montalcini dies in Rome at 103; biologist studied growth factor. *Fox News Channel*. 2012 Dec 30 [cited 2012 Dec 31]. Available from: <https://www.foxnews.com>

18. Woolf CJ, Safieh-Garabedian B. Inflammatory pain control by nerve growth factor and its receptor, TrkA. *Ann N Y Acad Sci.* 1997;835:416-22. doi:10.1111/j.1749-6632.1997.tb48658.x
19. Hirose M, Kuroda Y, Murata E. NGF/TrkA signaling as a therapeutic target for pain. *Pain Pract.* 2016;16(2):175-82.
20. Sofroniew MV, Howe CL, Mobley WC. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu Rev Neurosci.* 2001;24:1217-81.
21. Hristova M, Aloe L. Metabolic syndrome–neurotrophic hypothesis. *Med Hypotheses.* 2006;66(3):545-9.
22. Otten U, Marz P, Heese K, Hock C, Kunz D, Rose-John S. Cytokines and neurotrophins interact in normal and diseased states. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;917:322-30.
23. Nicol GD, Vasko MR. Unraveling the story of NGF-mediated sensitization of nociceptive sensory neurons: ON or OFF the Trks? *Mol Interv.* 2007;7(1):26-41.
24. Lewin GR, Rueff A, Mendell LM. Peripheral and central mechanisms of NGF-induced hyperalgesia. *Eur J Neurosci.* 1994;6(12):1903-12.
25. Ferreira A, Coelho A, Duarte-Cruz C. As neurotrofinas e a dor visceral: o caso particular do fator de crescimento neuronal e do fator neurotrófico derivado do cérebro. *Rev Dor.* 2021;27(1).
26. Bibel M, Hoppe E, Barde YA. Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors Trk and p75NTR. *EMBO J.* 1999;18(3):616-22.
27. Aloe L, Rocco ML, Bianchi P, Manni L. Nerve growth factor: from the early discoveries to the potential clinical use. *J Transl Med.* 2012;10:239. doi:10.1186/1479-5876-10-239
28. Syed Z, Dudbridge F, Kent L. An investigation of the neurotrophic factor genes GDNF, NGF, and NT3 in susceptibility to ADHD. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2007;144B(3):375-8.
29. Unger RH. Lipotoxic diseases. *Annu Rev Med.* 2002;53:319-36. Jequier E. Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;967:379-88.
30. Jéquier E. Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;967:379-88.

31. Gharote HP, Mody RN. Estimation of serum leptin in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2010;39(1):69-73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19817969/>
32. Ozet A, Arpaci F, Yilmaz MI, Ayta H, Ozturk B, Komurcu S, et al. Effects of tamoxifen on the serum leptin level in patients with breast cancer. *Jpn J Clin Oncol.* 2001;31(9):424-7.
33. Hsing AW, Deng J, Sesterhenn IA, Mostofi FK, Stanczyk FZ, Benichou J, et al. Body size and prostate cancer: a population-based case-control study in China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000;9(12):1335-41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11142419/>
34. Takahashi M, Terashima M, Takagane A, Oyama K, Fujiwara H, Wakabayashi G. Ghrelin and leptin levels in cachectic patients with cancer of the digestive organs. *Int J Clin Oncol.* 2009;14(4):315-20.
35. Mantovani G, Proto E, Massa E, Mulas C, Madeddu C, Mura L, et al. Induction chemotherapy followed by concomitant chemoradiation therapy in advanced head and neck cancer: a phase II study for organ-sparing purposes evaluating feasibility, effectiveness and toxicity. *Int J Oncol.* 2002;20(2):419-27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11788911/>
36. Mantovani G, Massa E, Astara G, Murgia V, Gramignano G, Ferreli L, et al. Six-week induction chemotherapy followed by concomitant chemoradiation therapy in stage IV head and neck cancer: a phase II study with organ-sparing purposes. *Oncol Rep.* 2003;10(3):759-66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12684655/>
37. Takayoshi K, Uchino K, Nakano M, Ikejiri K, Baba E. Weight loss during initial chemotherapy predicts survival in patients with advanced gastric cancer. *Nutr Cancer.* 2017;69(3):408-15.
38. Scheede-Bergdahl C, Watt HL, Trutschnigg B, Kilgour RD, Haggarty A, Lucar E, et al. Is IL-6 the best pro-inflammatory biomarker of clinical outcomes of cancer cachexia? *Clin Nutr.* 2012;31(1):85-8.
39. Zhang X, Huang J, McNaughton PA. NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels. *EMBO J.* 2005;24(24):4211-23.
40. Webster KE. Somaesthetic pathways. *Br Med Bull.* 1977;33(2):113-20.
41. Bedbrook GM. Injuries of the thoracolumbar spine with neurological symptoms. In: Vinken PJ, Bruyn GW, editors. *Handbook of Clinical Neurology.* 25th ed. Amsterdam: North-Holland; 1976. p. 437-66.

42. Campbell JN, Raja SN, Cohen RH, Wall PD, Melzack R. Peripheral neural mechanisms of nociception. In: Textbook of Pain. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1989. p. 22-45.
43. Piotrowski W, Foreman JC. Some effects of calcitonin gene-related peptide in human skin and on histamine release. *Br J Dermatol*. 1986;114(1):37-46.
44. Otten U, Goedert M, Mayer N, Stöckel K. Requirement of nerve growth factor for development of substance P-containing sensory neurones. *Nature*. 1980;287(5779):158-9.
45. Woolf CJ, Allchorne A, Safieh-Garabedian B, Poole S. Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: the contribution of tumour necrosis factor alpha. *Br J Pharmacol*. 1997;121(3):417-24.
46. Takei Y, Laskey R. Tumor necrosis factor α regulates responses to nerve growth factor, promoting neural cell survival but suppressing differentiation of neuroblastoma cells. *Mol Biol Cell*. 2008;19(3):855-64. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2262986/>
47. Jolliffe DA, Greenberg L, Hooper RL, Griffiths CJ, Camargo CA Jr, Kerley CP, et al. Single nucleotide polymorphisms in the vitamin D pathway associating with circulating concentrations of vitamin D metabolites and non-skeletal health outcomes: review of genetic association studies. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2015;148:301-9.
48. Kimball S, Fuleihan GH, Vieth R. Vitamin D: a growing perspective. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2008;45(4):339-414.
49. Cavalcante IGM, Medeiros JF, Morais JB, Lima VL, Dantas MM, Bomfim WGL, et al. Effect of vitamin D₃ supplementation and influence of BsmI polymorphism of the VDR gene on the inflammatory profile and oxidative stress in elderly women with vitamin D insufficiency: vitamin D₃ megadose reduces inflammatory markers. *Exp Gerontol*. 2015;66:6-10.
50. Borges MC, Martini LA, Rogero MM. Perspectivas atuais sobre vitamina D, sistema imunológico e doenças crônicas. *Nutrire*. 2011;27(1):399-404
51. Guillot X, Semerano L, Saidenberg-Kermanac'h N, Falgarone G, Boissier MC. Vitamin D and inflammation. *Joint Bone Spine*. 2010;77(6):552-7.
52. Shea MK, Booth SL, Massaro JM, Jacques PF, D'Agostino RB, Ordovas JM, et al. Vitamin K and vitamin D status: associations with inflammatory markers in the Framingham Offspring Study. *Am J Epidemiol*. 2008;167(3):313-20.

- 53.** Asemi Z, Samimi M, Tabassi Z, Shakeri H, Sabihi SS, Esmailzadeh A. Vitamin D supplementation affects serum high-sensitivity C-reactive protein, insulin resistance, and biomarkers of oxidative stress in pregnant women. *J Nutr.* 2013;143(9):1432-8.
- 54.** Barker T, Schneider ED, Dixon BM, Henriksen VT, Weaver LK. Supplemental vitamin D enhances the recovery in peak isometric force shortly after intense exercise in vitamin D insufficient adults. *Cytokine.* 2015;71(1):132-8.
- 55.** Şerifoğlu L, Yılmaz SG, Karaaslanlı A, Düzkalır AH, Etli MU, Özdoğan S. Association of TaqI (rs731236) polymorphism of vitamin D receptor gene with lumbar degenerative disc disease. *World Neurosurg.* 2024;188:e419-23.
- 56.** Abdelsattar HA, Nessim IG, Osman MM, Elmageed AIA, Waked EA, Khanany FM. Evaluation of vitamin D receptor TaqI (rs731236) and BsmI (rs1544410) gene polymorphisms in patients with chronic kidney disease-mineral and bone disorder. *Open Access Maced J Med Sci.* 2023;11(A):169-75. Available from: <https://oamjms.eu/index.php/mjms/article/view/10631>
- 57.** Waziri B, Dix-Peek T, Dickens C, Duarte R, Naicker S. Influence of vitamin D receptor polymorphisms on biochemical markers of mineral bone disorders in South African patients with chronic kidney disease. *BMC Nephrol.* 2018;19(1):49.
- 58.** Pereira S. Correlação entre os níveis séricos da vitamina D e os diferentes subtipos de tumores mamários [dissertação]. Coimbra: Universidade de Coimbra; 2025 [cited 2025 Aug 27]. Available from: <https://hdl.handle.net/10316/13537>
- 59.** Feldman D, Krishnan AV, Swami S, Giovannucci E, Feldman BJ. The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. *Nat Rev Cancer.* 2014;14(5):342-57. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrc3691>
- 60.** Ma Y, Zhang P, Wang F, Yang J, Liu Z, Qin H. Association between vitamin D and risk of colorectal cancer: a systematic review of prospective studies. *J Clin Oncol.* 2011;29(28):3775-82.
- 61.** Girgis CM, Clifton-Bligh RJ, Hamrick MW, Holick MF, Gunton JE. The roles of vitamin D in skeletal muscle: form, function, and metabolism. *Bone Res.* 2013;34:33-83.
- 62.** Lösel R, Wehling M. Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(1):46-56.
- 63.** Owens DJ, Sharples AP, Polydorou I, Alwan N, Donovan T, Tang J, et al. A systems-based investigation into vitamin D and skeletal muscle repair, regeneration, and hypertrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2015;309(12):E1019-30.

- 64.** Bischoff-Ferrari HA, Borchers M, Gudat F, Dürmüller U, Stähelin HB, Dick W. Vitamin D receptor expression in human muscle tissue decreases with age. *J Bone Miner Res.* 2004;19(2):265-9.
- 65.** Endo I, Inoue D, Mitsui T, Umaki Y, Akaike M, Yoshizawa T, et al. Deletion of vitamin D receptor gene in mice results in abnormal skeletal muscle development with deregulated expression of myoregulatory transcription factors. *Endocrinology.* 2003;144(11):5138-44.
- 66.** Evans WJ, Morley JE, Argilés J, Bales C, Baracos V, Guttridge D, et al. Cachexia: a new definition. *Clin Nutr.* 2008;27(6):793-9.
- 67.** von Hurst PR, Stonehouse W, Coad J. Vitamin D supplementation reduces insulin resistance in South Asian women living in New Zealand who are insulin resistant and vitamin D deficient: a randomized, placebo-controlled trial. *Br J Nutr.* 2010;103(4):549-55.
- 68.** Mantovani G, Macció A, Mura L, Massa E, Madeddu C, Mulas C, et al. Serum leptin levels and proinflammatory cytokines in advanced-stage cancer patients. *J Mol Med (Berl).* 2000;78(10):554-61.
- 69.** Van Veldhuizen PJ, Taylor SA, Williamson S, Drees BM. Treatment of vitamin D deficiency in patients with metastatic prostate cancer may improve bone pain and muscle strength. *J Urol.* 2000;163(1):187-90.
- 70.** Camperi A, Pin F, Costamagna D, Penna F, Menduina ML, Aversa Z, et al. Vitamin D and VDR in cancer cachexia and muscle regeneration. *Oncotarget.* 2017;8(13):21778-93.
- 71.** Ryan ZC, Craig TA, Wang X, Delmotte P, Salisbury JL, Lanza IR, et al. $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃ mitigates cancer cell mediated mitochondrial dysfunction in human skeletal muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;496(2):746-52.
- 72.** Zeichner SB, Koru-Sengul T, Shah N, Liu Q, Markward NJ, Montero AJ, et al. Improved clinical outcomes associated with vitamin D supplementation during adjuvant chemotherapy in patients with HER2+ nonmetastatic breast cancer. *Clin Breast Cancer.* 2015;15(1):e1-11.
- 73.** Penna F, Camperi A, Muscaritoli M, Filigheddu N, Costelli P. The role of vitamin D in cancer cachexia. *Curr Opin Support Palliat Care.* 2017;11(4):287-92.
- 74.** Zittermann A. Vitamin D in preventive medicine: are we ignoring the evidence? *Br J Nutr.* 2003;89(5):552-72. doi:10.1079/BJN2003837

- 75.** Wong YY, McCaul KA, Yeap BB, Hankey GJ, Flicker L. Low vitamin D status is an independent predictor of increased frailty and all-cause mortality in older men: the Health in Men Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(9):3821-8. doi:10.1210/jc.2013-1702
- 76.** Bhat M, Kalam R, Qadri SS, Madabushi S, Ismail A. Vitamin D deficiency-induced muscle wasting occurs through the ubiquitin proteasome pathway and is partially corrected by calcium in male rats. *Endocrinology.* 2013;154(11):4018-29. doi:10.1210/en.2013-1369
- 77.** Moreira-Pfrimer LD, Pedrosa MA, Teixeira L, Lazaretti-Castro M. Treatment of vitamin D deficiency increases lower limb muscle strength in institutionalized older people independently of regular physical activity: a randomized double-blind controlled trial. *Ann Nutr Metab.* 2009;54(4):291-300. doi:10.1159/000235874
- 78.** International Agency for Research on Cancer. Cancer Today [Internet]. Lyon: IARC; 2022 [cited 2024 Jul 29]. Available from: <https://gco.iarc.fr/today/en>
- 79.** Ensembl [Internet]. Hinxton: European Bioinformatics Institute; c2025 [cited 2025 Aug 18]. Available from: <https://www.ensembl.org>
- 80.** Cruz-Jentoft AJ, Bahat G, Bauer J, Boirie Y, Bruyère O, Cederholm T, et al. Sarcopenia: revised European consensus on definition and diagnosis. *Age Ageing.* 2019;48(1):16-31.
- 81.** Argilés JM, Busquets S, Stemmler B, López-Soriano FJ. Cancer cachexia: understanding the molecular basis. *Nat Rev Cancer.* 2014;14(11):754-62.
- 82.** Diaz GD, Paraskeva C, Thomas MG, Binderup L, Hague A. Apoptosis is induced by the active metabolite of vitamin D3 and its analogue EB1089 in colorectal adenoma and carcinoma cells: possible implications for prevention and therapy. *Cancer Res.* 2000;60(8):2304-12.
- 83.** Hansen CM, Frandsen TL, Brunner N, Binderup L. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits the invasive potential of human breast cancer cells in vitro. *Clin Exp Metastasis.* 1994;12(3):195-202.
- 84.** Koli K, Keski-Oja J. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 and its analogues down-regulate the expression of cellular invasion-associated proteases in cultured malignant cells. *Cell Growth Differ.* 2000;11(4):221-9.
- 85.** Majewski S, Szmurlo A, Marczak M, Jablonska S, Bollag W. Inhibition of tumor cell-induced angiogenesis by retinoids, 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 and their combination. *Cancer Lett.* 1993;75(1):35-9.

- 86.** Akhter J, Chen X, Bowrey P, Bolton EJ, Morris DL. Vitamin D3 analogue, EB1089, inhibits the growth of subcutaneous xenografts of the human colon cancer cell line, LoVo, in a nude mouse model. *Dis Colon Rectum*. 1997;40(3):317-23.
- 87.** van Weelden K, Flanagan L, Binderup L, Tenniswood M, Welsh J. Apoptotic regression of MCF-7 xenografts in nude mice treated with the vitamin D3 analogue EB1089. *Endocrinology*. 1998;139(4):2102-10.
- 88.** Vandewalle B, Adenis A, Hornez L, Revillion F, Lefebvre J. 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors in normal and malignant human colorectal tissues. *Cancer Lett*. 1994;86(1):67-73.
- 89.** Evans SR, Nolla J, Hanfelt J, Shabahang M, Nauta RJ, Shchepotin IB. Vitamin D receptor expression as a predictive marker of biological behavior in human colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 1998;4(7):1591-5.
- 90.** Irazoqui AP, Boland RL, Buitrago CG. Actions of 1,25(OH)₂-vitamin D3 on the cell cycle depend on VDR and p38 MAPK in skeletal muscle cells. *J Mol Endocrinol*. 2014;53(3):331-43.
- 91.** Kinoshita A, Onoda H, Imai N, Iwaku A, Oishi M, Tanaka K, et al. Comparison of the prognostic value of inflammation-based prognostic scores in patients with hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer*. 2012;107(6):988-93.
- 92.** Leão Silva AC, Santos JM, Tavares V, Ferreira T, Dias VDR, da Silva CMS, et al. The association of the prognostic nutritional index (PNI) and neutrophil-lymphocyte ratio (NLR) with cachexia in cancer patients. *Clin Nutr ESPEN*. 2024;63:S1052.
- 93.** Murphy KT, Lynch GS. Update on emerging drugs for cancer cachexia. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2009;14(4):619-32.
- 94.** George J, Cannon T, Lai V, Richey L, Zanation A, Hayes DN, et al. Cancer cachexia syndrome in head and neck cancer patients: part II. Pathophysiology. *Head Neck*. 2007;29(5):497-507.

FACULDADE DE MEDICINA

