

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 06/09/2024.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



**PERFIL TRANSCRICIONAL DO SECRETOMA DO
MICROAMBIENTE TUMORAL PARA IDENTIFICAÇÃO DE
POTENCIAIS MEDIADORES DE CAQUEXIA.**

SARAH SANTILONI CURY

BOTUCATU – SP

2022



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

PERFIL TRANSCRICIONAL DO SECRETOMA DO MICROAMBIENTE
TUMORAL PARA IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS MEDIADORES DE
CAQUEXIA.

CANDIDATA: SARAH SANTILONI CURY

ORIENTADOR: PROF. DR. ROBSON FRANCISCO CARVALHO

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, como parte dos
pré-requisitos necessários para obtenção do
título de Doutor no Programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas (Genética).

BOTUCATU – SP

2022

Ficha catalográfica

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Cury, Sarah Santiloni.

Perfil transcricional do secretoma do microambiente tumoral para identificação de potenciais mediadores de caquexia / Sarah Santiloni Cury. - Botucatu, 2022

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Robson Francisco Carvalho

Capes: 20205007

1. Biologia computacional. 2. Biologia de sistemas.
3. Caquexia. 4. Secretoma.

Palavras-chave: Bioinformática; Biologia de sistemas;
Caquexia associada ao câncer.

Dedicatória

À Deus, Ademir Santiloni e aos pacientes, dedico.

Agradecimentos

Ao meu marido *Leandro Santos*.

Aos meus familiares, em especial minha mãe *Valquiria Santiloni*, meu irmão *Caio Santiloni Cury* e minha avó *Valquiria Cury*.

Aos meus parceiros de pós-graduação *Jakeline Oliveira*, *Amanda Schnepfer*, *Victória Schmidt*, *Eliane Pilan*, *Jeferson Souza* e *Ana Luiza Bonaldo*. Aos parceiros de Laboratório de Biologia do Músculo Estriado (LBME) *Bruna Zanella*, *Jéssica Silvino*, *Érika Perez*, *Guilherme Gutierrez* e professora *Maeli Dal Pai*.

Aos colaboradores desse trabalho *Diogo de Moraes*, *Dra. Paula Paccielli Freire*, *Jakeline Oliveira*, *Dra. Érica Nishida Hasimoto*, *Dra. Patricia Pintor dos Reis* e *Dr. Miguel Batista*.

Aos pacientes que participaram deste estudo.

A todos os meus amigos e colaboradores.

Ao Departamento de Clínica Genética do Hospital de Vejle, Dinamarca. Em especial à *Dra. Silvia Rogatto*, *Dra. Luisa Matos do Canto* e *Naiade Calanca*.

Aos funcionários, docentes e alunos do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB) – UNESP.

Aos membros da banca de avaliação da qualificação e tese do doutorado: *Dr. Otávio Marques*, *Dr. Dr. Luiz Araújo*, *Dra. Silvia Rogatto*, *Dra. Graziela Romagnoli*, *Dr. João Agostinho Machado Neto*, *Dra. Patricia Pintor dos Reis* e *Dr. Luis Fernando Barbisan*.

Ao programa de Pós-Graduação Ciências Biológicas (Genética) do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB) - UNESP.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro (Processo: 141601/2019-1) cedido para execução deste trabalho.

Ao meu orientador professor *Robson Francisco Carvalho*.

Epígrafe

A Sabedoria é resplandecente e sempre viçosa. Ela é facilmente contemplada por aqueles que a amam, e se deixa encontrar por aqueles que a procuram. Ela até se antecipa, dando-se a conhecer aos que a desejam. Quem por ela madruga não se cansará, pois a encontrará sentada à sua porta. Meditar sobre ela é a perfeição da inteligência; e quem ficar acordado por causa dela em breve há de viver despreocupado. Pois ela mesma sai à procura dos que a merecem, cheia de bondade, aparece-lhes nas estradas e vai ao seu encontro em todos os seus projetos.

(Livro da Sabedoria 6,12-16)

Sumário

Resumo	6
Abstract	8
1. Introdução	9
Caquexia associada ao câncer	9
Caquexia associada ao câncer de pulmão	10
Caquexia associada ao câncer de pâncreas	13
Inflamação derivada do tumor na caquexia associada ao câncer	15
Microambiente tumoral na caquexia associada ao câncer	18
Transcriptoma “single-cell” para análise do microambiente tumoral	22
Secretoma tumoral	23
Reanálise de dados de transcriptoma tumoral para identificação de mediadores da caquexia	26
Principais perguntas da tese	29
Hipótese	30
2. Objetivos	31
3. Capítulos	32
CAPÍTULO 1	32
CAPÍTULO 2	53
4. Considerações finais	67
5. Conclusões	68
5. Referências bibliográficas	69
6. Materiais suplementares	85
7. Anexos	96

Resumo

A caquexia é uma síndrome metabólica comumente encontrada em pacientes com cânceres de pâncreas ou pulmão. É caracterizada pela perda de massa muscular, com ou sem perda de tecido adiposo, a qual não pode ser revertida por suporte nutricional, e que induz pior resposta aos tratamentos radio e quimioterápicos e menor sobrevida. Os pacientes com caquexia apresentam alterações funcionais em processos fisiológicos, metabólicos e imunológicos, que resultam em desequilíbrio energético e proteico. Mediadores plasmáticos circulantes (fatores indutores de caquexia; FICs) desempenham um papel crucial no desenvolvimento de alterações sistêmicas que ocorrem na caquexia associada ao câncer. Embora muitos fatores derivados do tumor já tenham sido implicados com a patogênese da síndrome, as associações foram geralmente baseadas em seus níveis plasmáticos ou no perfil de expressão gênica na massa tumoral, mas ainda não é conhecido perfil de expressão dos FICs em células específicas que compõe o microambiente tumoral (MAT). Além das células tumorais, o MAT é composto por células residentes e recrutadas e pelas moléculas secretadas por essas células (secretoma). O presente projeto tem como objetivos caracterizar: 1) o perfil transcricional do secretoma de células do MAT de pacientes com câncer de pulmão (carcinoma pulmonar de células não pequenas; CPCNP), e 2) o perfil de expressão de FICs secretados em células individuais de pacientes com câncer de pâncreas (adenocarcinoma ductal pancreático; ADP). Para isso, foram utilizados dados de expressão gênica global, disponíveis publicamente, de pacientes potencialmente caquéticos com CPCNP (determinados por análises tomográficas) e ADP, separadamente. Os dados transcriptômicos dos componentes do secretoma foram correlacionados com dados clínicos e de composição de células do sistema imune do MAT. Finalmente, avaliamos computacionalmente a potencial ação sinérgica de FICs, selecionados do secretoma, e sua interação com tecidos e órgãos afetados na caquexia através de predições de ligantes e receptores. Nossa estratégia permitiu identificar que pacientes caquéticos com CPCNP apresentam altos níveis de expressão de citocinas pró-inflamatórias derivadas principalmente de células T CD8. Além disso, esses pacientes apresentam um aumento de células exauridas em seu MAT. Para a análise dos pacientes com câncer de pâncreas, foi possível caracterizar o perfil celular de mediadores centrais da caquexia em resolução de células única, e prever suas interações com receptores de tecidos-alvo na caquexia. Esses mediadores foram detectados como expressos em altos níveis pelas células neoplásicas pancreáticas. Dessa forma, nossos achados caracterizam o perfil de expressão de FICs secretados por células específicas do MAT em tumores de pulmão e pâncreas, bem como suas interações com o músculo esquelético, fígado e tecido adiposo. Em conjunto, nossos resultados servirão de base para o desenvolvimento de futuras estratégias

terapêuticas visando à minimização da perda de massa muscular, aumentando, assim, a sobrevida e a qualidade de vida dos pacientes com caquexia associada aos cânceres de pulmão e pâncreas.

Transcriptional Profile of Tumor Microenvironment Secretome for Identification of Potential Cachexia Mediators.

Cachexia is a metabolic syndrome commonly found in pancreatic and lung cancer patients. It is characterized by loss of muscle mass, with or without loss of adipose tissue, which cannot be reversed by nutritional support, which induces worse response to radio and chemotherapy and lower survival. Cachectic patients have functional changes in physiological, metabolic, and immunological processes that result in energy and protein imbalance. Circulating plasma mediators (cachexia inducing factors; CIFs) play a crucial role in the development of systemic alterations that occur in cancer-associated cachexia. Although many tumor-derived factors have already been implicated in the pathogenesis of the syndrome, the associations were generally based on their plasma levels or gene expression profile in bulk tumor tissues, but the CIFs expression profile in single cells within the tumor microenvironment (TME) is not yet known. In addition to cancer cells, TME is composed of resident host cells and recruited cells, the products secreted by these cells (secretome). This project aims to characterize: 1) the secretome transcriptional profile of the TME cells from patients with lung cancer (non-small cell lung carcinoma; NSCLC), and 2) the expression profile of secreted CIFs in single cells of patients with pancreatic cancer (ductal adenocarcinoma). pancreatic; PDAC). Publicly available global gene expression data from potentially cachectic patients with NSCLC (determined by CT scans) and PDAC were individually evaluated. Transcriptomics data of secretome factors were correlated with clinical data and tumor immune composition of TME. Finally, we computationally evaluated the potential synergistic action of CIFs, selected in the secretome, and their interactions with tissues and organs affected in cachexia using predictions of ligands and receptors. Our strategy allowed us to identify NSCLC cachectic patients with high expression of pro-inflammatory cytokines mainly derived from CD8 T cells. In addition, these patients showed an increase in exhausted cells in their TME. In pancreatic cancer, it was possible to identify a core of pro-cachectic mediators, in single-cell resolution, able to interact with receptors in cachexia target tissues. These mediators are expressed at high levels by pancreatic neoplastic cells. Thus, our findings point to cachexia mediators secreted by specific TME cells in lung and pancreatic tumors with the potential to interact with muscle, liver, and adipose tissue. Taken together, our results may contribute as a basis for the development of future therapeutic strategies aiming to decrease muscle mass loss, thus increasing the survival and quality of life of patients with cancer cachexia.

1. Introdução

Caquexia associada ao câncer

A caquexia é definida como uma síndrome metabólica complexa caracterizada pela perda de massa muscular, com ou sem perda de tecido adiposo, a qual não pode ser revertida por suporte nutricional¹. Os pacientes com essa síndrome apresentam alterações funcionais em processos fisiológicos, metabólicos e imunológicos que resultam em desequilíbrio energético e proteico². A caquexia pode estar associada com resistência à insulina, anorexia e inflamação¹.

Existe uma variedade de condições agudas ou crônicas associadas à caquexia. A síndrome é observada em pacientes após extensa lesão traumática e sepse³. Doenças infecciosas, como AIDS, malária e tuberculose, assim como doenças crônicas como fibrose cística, cirrose hepática, doença de Crohn, artrite reumatoide, acidente vascular cerebral, doenças degenerativas neurológicas, doença renal crônica, doença pulmonar obstrutiva crônica, insuficiência cardíaca crônica e o câncer também estão frequentemente associadas a caquexia³⁻⁶.

A caquexia associada ao câncer é uma síndrome multifatorial que afeta até 80% dos pacientes em estágios avançados da doença, e representa a causa direta de morte de até 20% de todos os pacientes oncológicos⁷. A caquexia está altamente associada a tipos específicos de tumores, como o de pâncreas, esôfago, estômago, fígado e pulmão e, da mesma forma, os pacientes com essas neoplasias têm o mais alto grau de perda de peso⁸⁻¹³. Em contrapartida, os pacientes acometidos por câncer de tireoide, mama, melanoma ou próstata apresentam um menor risco em desenvolver a síndrome (20-30% dos pacientes)¹⁴. A etiologia da caquexia associada ao câncer nos diferentes tipos tumorais envolve interações complexas e específicas entre o tumor e o hospedeiro que ainda não estão completamente elucidadas.

A característica clínica mais proeminente da caquexia associada ao câncer é a perda de peso nos adultos, a qual pode ser corrigida pela retenção fluídica¹⁵. A caquexia no câncer emerge a partir

de alterações metabólicas induzidas pela presença do tumor, a qual acarreta perda de apetite (anorexia), anemia, baixos níveis de testosterona e de outros hormônios anabólicos¹⁵. A diminuição na ingestão do alimento e a anorexia acentuam a perda de massa muscular e corpórea, resultando numa condição de astenia, fraqueza, imobilidade e insuficiência cardíaca ou respiratória¹⁶. O estado caquético no câncer representa prognóstico desfavorável, e diminuição da qualidade de vida e da resposta aos tratamentos radio e quimioterápicos^{17,18}. A caquexia afeta uma proporção considerável de pacientes com câncer de pulmão¹⁹, com até 80% dos pacientes apresentando alto risco de desenvolver a síndrome dependendo do estágio tumoral¹⁴.

Caquexia associada ao câncer de pulmão

O câncer de pulmão é o mais comum no mundo - mais de 2 milhões de novos casos foram diagnosticados em 2020 - e é o que mais leva ao óbito, sendo responsável por mais de 1 milhão de mortes²⁰. Segundo o INCA (Instituto Nacional de Câncer, 2020, <http://www.inca.gov.br/>), no Brasil, são estimados 17.760 novos casos de câncer de traqueia, brônquios e pulmão entre os homens, e 12.440 novos casos entre as mulheres²¹. O câncer de pulmão é uma das principais causas de morte evitáveis, pois é geralmente diagnosticado em estágios mais avançados da doença²²; a sobrevida média em um total de cinco anos varia entre 13 a 21%, em países desenvolvidos, e entre 7 e 10%, nos países em desenvolvimento²¹. O câncer de pulmão apresenta-se em duas formas principais, que são classificadas de acordo com sua característica histológica: câncer pulmonar de células pequenas (CPCP, da sigla, em inglês, SCLC, *Small-Cell Lung Cancer*), que representa cerca de 15% de todos os tipos de câncer de pulmão, e o câncer pulmonar de células não pequenas (CPCNP, da sigla, em inglês, NSCLC, *Non-Small-Cell Lung Cancer*), que prevalece em cerca de 85% dos casos^{22,23}. Os CPCNP mais frequentes são de três subtipos: adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas (*Squamous-cell carcinoma*, em inglês) e carcinoma de grandes células (em inglês, *Large-cell Lung Cancer*)²³, sendo o adenocarcinoma e o carcinoma de células escamosas os mais comumente encontrados na população^{23,24}. O fumo ou

exposição passiva ao tabaco estão associados à 90% dos casos de câncer de pulmão²⁵. Fumar pode causar todos os tipos de câncer, porém, está fortemente relacionado com CPCP e carcinoma de células escamosas; e o adenocarcinoma é o tipo mais comum em pacientes não fumantes²³. Além dos diferentes fatores de riscos envolvidos com a etiologia de cada subtipo, sabe-se que o subtipo pode determinar o melhor tratamento²⁶. Os subtipos de CPCNP possuem distinções moleculares importantes: mutações em *EGFR* e translocações em *ALK* são aberrações gênicas frequentemente encontradas em pacientes com adenocarcinoma pulmonar²⁷. As terapias personalizadas para essas alterações em adenocarcinomas mostraram-se eficazes para o tratamento da doença quando comparado à quimioterapia padrão²⁸. Esses achados, além de modificar a forma de tratar esses pacientes, mudou também a classificação histopatológica do câncer de pulmão, pois a terminologia CPCNP não abrange essas especificidades. Em 2015, o termo CPCNP foi revisto e excluído, determinando-se os adenocarcinomas e carcinomas de células escamosas como os mais prevalentes tipos histológicos de tumores pulmonares epiteliais²⁶. Entretanto, a prevalência de caquexia é geralmente reportada para CPCNP e CPCP, sem distinção dos subtipos²⁶. Estima-se que 83% dos pacientes com CPCNP apresentam a síndrome, enquanto 61% dos pacientes com CPCP possuem caquexia-anorexia²⁹. Pacientes com os subtipos mais prevalentes de CPCNP (adenocarcinomas e carcinomas de célula escamosas) apresentam caquexia em frequências similares³⁰. Considerando-se que a caquexia tem maior prevalência em CPCNP do que em CPCP, e ainda, que o risco de desenvolvimento de caquexia é similar para os subtipos de CPCNP, este presente estudo busca ampliar a compreensão da caquexia considerando os pacientes com CPCNP, com enfoque em dados de adenocarcinoma e carcinomas de células escamosas combinados.

Embora existam avanços no diagnóstico precoce e tratamento padrão, o câncer de pulmão é frequentemente diagnosticado em um estágio avançado e tem prognóstico desfavorável²³. Dentre as causas desse prognóstico desfavorável do câncer de pulmão, destaca-se o desenvolvimento de caquexia em muitos pacientes, o que contribui para maior mortalidade da doença; estima-se que apenas 20%

dos pacientes em risco de desenvolvimento da caquexia sobrevivem até 5 anos após o diagnóstico^{14,31-33}. A perda de massa muscular esquelética na caquexia associada ao câncer de pulmão pode levar a uma substancial perda de peso e diminuição do índice de massa corporal (IMC), os quais estão associados a pior evolução em pacientes com CPCNP^{31,34,35}.

Estudos utilizando imagens de tomografia computadorizada (TC) revelaram perda de massa muscular oculta em pacientes com CPCNP com peso corporal estável^{19,36}. Além disso, em pacientes com CPCNP, tanto a perda de massa muscular bem como a detecção, por imagens de TC, de uma menor área muscular (muscularidade) têm sido associadas a um menor tempo de progressão do tumor, maior risco de toxicidade por quimioterapia e menor sobrevida^{19,36-41}. A perda de massa muscular, detectada por imagens de TC, também afeta negativamente o estado funcional e a qualidade de vida desses pacientes^{42,43}. A detecção de uma área muscular através de imagens de TC tem sido associada à alterações nas concentrações de marcadores de inflamação (albumina sérica e proteína C-reativa) [revisado por Collins et al.,⁴⁴]. Estudo recente desenvolvido por nosso grupo de pesquisa demonstrou que a área dos músculos peitorais é um importante preditor de caquexia associada ao CPCNP, pois pacientes com baixa muscularidade apresentam aumento na expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias, como IL-8, IL-6 e CSF3, no tecido tumoral, as quais estão associados a uma menor sobrevida³⁰. Entretanto, ainda não são totalmente conhecidos os mecanismos moleculares e as principais células tumorais que contribuem para a produção dessas citocinas nos carcinomas pulmonares.

O câncer de pulmão é relevante para o estudo da caquexia e identificação de potenciais marcadores moleculares e alvos terapêuticos, pois é possível separar pacientes com câncer que desenvolvem a síndrome dos que não são acometidos, e investigar suas diferenças. Entretanto, a síndrome é ainda mais relevante no câncer de pâncreas, pois acomete 80-90% dos pacientes¹³, portanto,

resultados identificados em câncer de pâncreas também podem auxiliar na compreensão da síndrome. Veremos isso com maiores detalhes no tópico abaixo.

Caquexia associada ao câncer de pâncreas

O tipo histológico de câncer de pâncreas mais comum é o adenocarcinoma, o qual se origina no tecido glandular (tumores na região exócrina), e podem surgir a partir do epitélio ductal ou de células acinares⁴⁵. O adenocarcinoma ductal do pâncreas (ADP) representa 80-90% dos tipos histológicos⁴⁶. Apesar de não ser um dos tipos de câncer mais incidente entre homens e mulheres - pois é responsável por cerca de 2% dentre todos os tipos de câncer diagnosticados - o câncer de pâncreas é agressivo e de difícil detecção, apresentando, portanto, alta taxa de mortalidade²¹. Estima-se que menos de 8% dos pacientes com câncer de pâncreas sobrevivem até cinco anos após o diagnóstico⁴⁷. No Brasil, em 2018, cerca de 5.497 homens e 5.601 mulheres foram à obtido pela doença, de acordo com os dados publicados pelo INCA²¹. Mundialmente, o câncer de pâncreas, é a sétima principal causa de morte⁴⁸, mas projeta-se que futuramente o câncer de pâncreas irá ultrapassar o câncer de mama como a terceira principal causa de morte na Europa⁴⁹. Em 2020, 495.773 novos casos foram diagnosticados no mundo e 466.003 pacientes foram a óbito, destacando-se, mais uma vez, a alta mortalidade do câncer de pâncreas²⁰. Mesmo considerando a dificuldade de determinar quantas dessas mortes resultam diretamente da caquexia, é bastante evidente que a caquexia contribui significativamente para as altas taxas de mortalidade do câncer de pâncreas⁵⁰.

A caquexia associada ao ADP apresenta a maior prevalência dentre todos os tipos de câncer, sendo encontrada em 80 a 90% dos pacientes¹³, podendo ocorrer até mesmo em pacientes em estágios iniciais da doença, em que a ressecção cirúrgica do tumor ainda é possível⁵¹. Por essa razão, o ADP é o câncer mais amplamente estudado na busca de biomarcadores da caquexia e de mecanismos moleculares pela qual a síndrome se estabelece⁵²⁻⁵⁶. Entretanto, ainda há certa discordância entre alguns achados. Embora IL-6, IL-1 β , TNF- α , INF- γ sejam amplamente utilizados como biomarcadores

circulantes de caquexia capazes de induzir alterações morfofisiológicas no músculo esquelético⁵⁷, Talbert e colaboradores demonstraram baixos níveis séricos dessas citocinas inflamatórias em pacientes com ADP, as quais não se associaram à caquexia nas condições investigadas, mas outros fatores como leptina, GM-CSF e MCP-1 foram associadas à síndrome⁵². Esses resultados reforçam a necessidade de se estudar mais profundamente os fatores indutores de caquexia em pacientes com ADP para se atingir um consenso. Ainda assim, é evidente que a inflamação é extremamente relevante no câncer de pâncreas. De fato, nosso grupo de pesquisa demonstrou recentemente que o ADP apresenta aumento na expressão gênica de significativa parte dos mais conhecidos fatores indutores de caquexia, enquanto tumores menos associados à síndrome regulam positivamente apenas uma pequena parcela desses fatores⁵⁸. Além disso, tumores pancreáticos com baixa pureza tumoral, ou seja, com baixa quantidade de células neoplásicas e alta quantidade de infiltração de células normais (como células imunes, fibroblastos, etc.) também expressam, em maiores proporções, os fatores que induzem caquexia⁵⁸. Esses resultados demonstram que a inflamação derivada do microambiente tumoral tem um papel chave no desenvolvimento de caquexia. **Todavia, a caracterização das células que promovem a baixa pureza tumoral encontrada nos tumores de pâncreas, e por consequência, seus mecanismos moleculares que contribuem para o processo inflamatório, necessitam maiores investigações.**

Considerando a relevância da caquexia para o câncer de pulmão e de pâncreas, e ainda, a urgência de se compreender a influência do microambiente imune tumoral na indução de alterações imunológicas que contribuem para o estado caquético nesses pacientes, este estudo busca entender a origem da inflamação derivada de tumores de pulmão e pâncreas, como também investigar se os mecanismos imunológicos são semelhantes ou distintos em cada um dos tipos tumorais. Entretanto, a relevância da inflamação na caquexia é evidente para ambos os cânceres de pulmão e pâncreas.

Inflamação derivada do tumor na caquexia associada ao câncer

A etiologia da caquexia associada ao câncer no câncer de pâncreas e pulmão envolve interações tumor-hospedeiro muito complexas e específicas que ainda precisam ser completamente elucidadas. A ação combinatória de mediadores solúveis (fatores indutores de caquexia) secretados por células cancerosas e do microambiente tumoral⁵⁸, incluindo muitas citocinas pró-inflamatórias, contribuem para a inflamação sistêmica, e atuam diretamente no músculo esquelético induzindo a perda de massa muscular^{13,18,59,60}. Consequentemente, os esforços para identificar mediadores e biomarcadores estão centrados nos níveis desses fatores caquéticos no plasma^{52,61-65}. Muitos desses fatores que circulam no sangue são derivados de células cancerosas e do microambiente tumoral⁵⁸. Entretanto, ainda não está claro quais são as principais células tumorais responsáveis pela produção desses fatores. Portanto, a caracterização do perfil de expressão gênica célula-específica tem o potencial de revelar padrões transcricionais que contribuem para compreensão dos mecanismos pelos quais ocorre o desenvolvimento de caquexia no câncer de pulmão e pâncreas.

Dentre as citocinas pró-inflamatórias associadas à caquexia, as interleucinas (IL-1 β , IL-6), o fator de necrose tumoral (TNF- α) e o interferon (INF- γ) tem uma grande importância pois atuam sistemicamente para o desenvolvimento de alterações celulares e moleculares que resultam na perda de função e massa muscular^{13,18,59}. Esses fatores caquéticos podem ser produzidos e secretados pela célula tumoral ou pelas células do microambiente tumoral (MAT)^{13,66}. De forma geral, as citocinas pró-inflamatórias são liberadas na circulação sanguínea e induzem uma inflamação sistêmica que afeta principalmente o cérebro, fígado, e os tecidos adiposo e muscular esquelético, com consequente indução de anorexia, aumento da produção de proteínas de fase aguda, perda de tecido adiposo e massa muscular^{18,67} (**Figura 1**). No entanto, a detecção dos níveis circulantes destas citocinas pró-inflamatórias geralmente são realizadas em pacientes com doença avançada, incluindo muitos pacientes submetidos à segunda ou terceira linhas de tratamento quimioterápico.

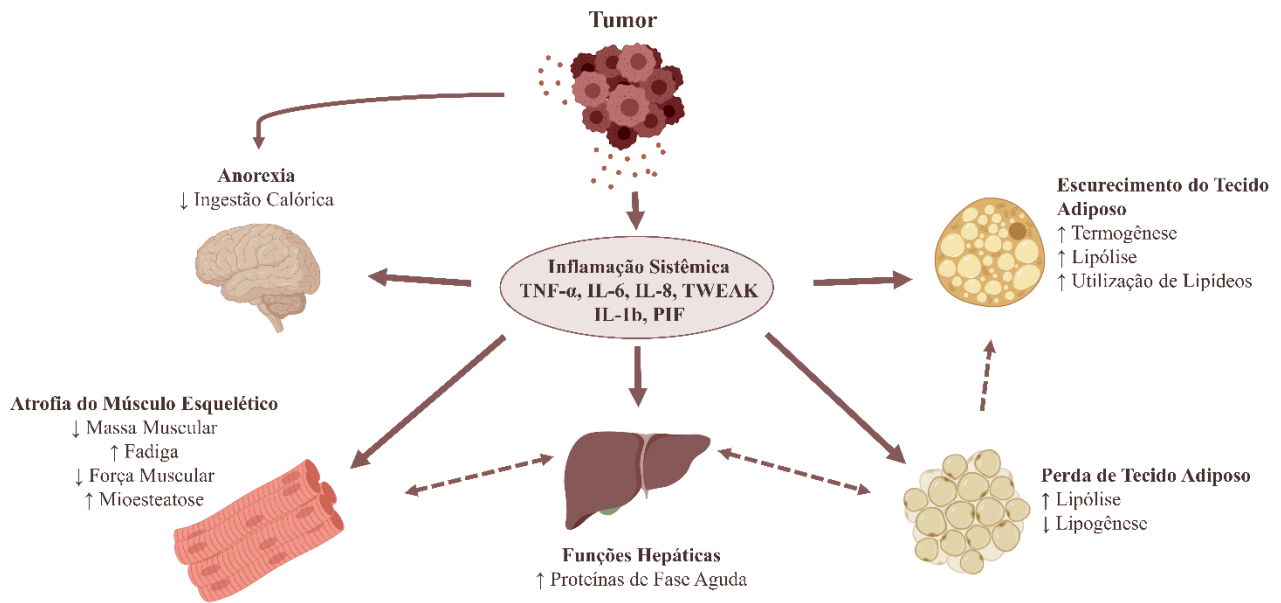


Figura 1. Alterações metabólicas em tecidos-alvo induzidas pelo secretoma tumoral durante a caquexia associada ao câncer. Citocinas pró-inflamatórias e fatores solúveis são secretados pelo microambiente tumoral e induzem alterações metabólicas em diversos órgão e tecidos: modificação do controle neuroendócrino do apetite no sistema nervoso central; escurecimento e perda do tecido adiposo; aumento da síntese de proteínas de fase aguda no fígado; e redução da massa muscular (adaptado de Tsoi & Robertson¹⁸).

A IL-6 também apresenta-se aumentada no soro de pacientes caquéticos em estágios iniciais e tardios da doença, e tem se mostrado essencial na atrofia muscular em diversos modelos experimentais de caquexia associada ao câncer^{68,69}. A inibição da STAT3, um de seus alvos, atenua a perda de massa muscular, demonstrando o potencial dessa citocina como alvo farmacológico no tratamento da caquexia⁷⁰. Os níveis circulantes de IL-6 também estão elevados em diversos modelos experimentais de caquexia associada ao câncer, nos quais apresenta um envolvimento direto na perda de massa muscular⁷¹⁻⁷⁴. Medicamentos anti-IL-6 estão atualmente em desenvolvimento, sendo o anticorpo monoclonal humanizado clazakizumabe (ALD518) o único agente anti-IL6 específico que foi avaliado em ensaios clínicos para o tratamento da síndrome⁷⁵. O ensaio clínico em fase II utilizando-se desse tratamento foi conduzido em uma população de 124 pacientes com CPCNP incuráveis, diagnosticados com caquexia definida por perda de peso corporal maior que 5% nos últimos 3 meses⁷⁶. O clazakizumabe inibe a IL-6, é bem tolerado, e melhora a anemia e caquexia nesses pacientes^{76,77}, mas

não induz reversão do quadro e não altera a sobrevida global dos pacientes⁷⁸. Inibidores de TNF- α e IL-1a também estão sendo testados em estudos clínicos de fases II e III. A talidomida (inibidor de TNF- α com ação anti-inflamatória) mostrou-se eficaz em aumentar o apetite e reduzir a perda de peso e massa magra em pacientes com caquexia associada ao câncer de pâncreas, e o MABp1 (anticorpo anti-IL-1a) aumentou significativamente a sobrevida e reduziu perda de massa muscular de pacientes com câncer colorretal (revisado por Cao et. al.,⁷⁸). Mais estudos são necessários para confirmar a eficácia dessas e outras drogas no tratamento da caquexia, pois ainda não há protocolo atual ou intervenção bem-sucedida para o tratamento da caquexia associada o câncer⁷⁸. O único medicamento disponível atualmente para o tratamento da caquexia é a anamorelina – um agonista do receptor da grelina⁷⁹. O medicamento foi aprovado, até o momento, para alguns tipos de câncer (CPCNP e cânceres gastrointestinais), somente no Japão⁸⁰. Estudos clínicos de fase II e III demonstram que a anamorelina contribui para diminuição da perda de peso, recuperação de massa muscular, apetite e qualidade de vida, embora não tenha eficácia na recuperação da função muscular (força) e, tampouco, aumenta a sobrevida dos pacientes⁷⁸.

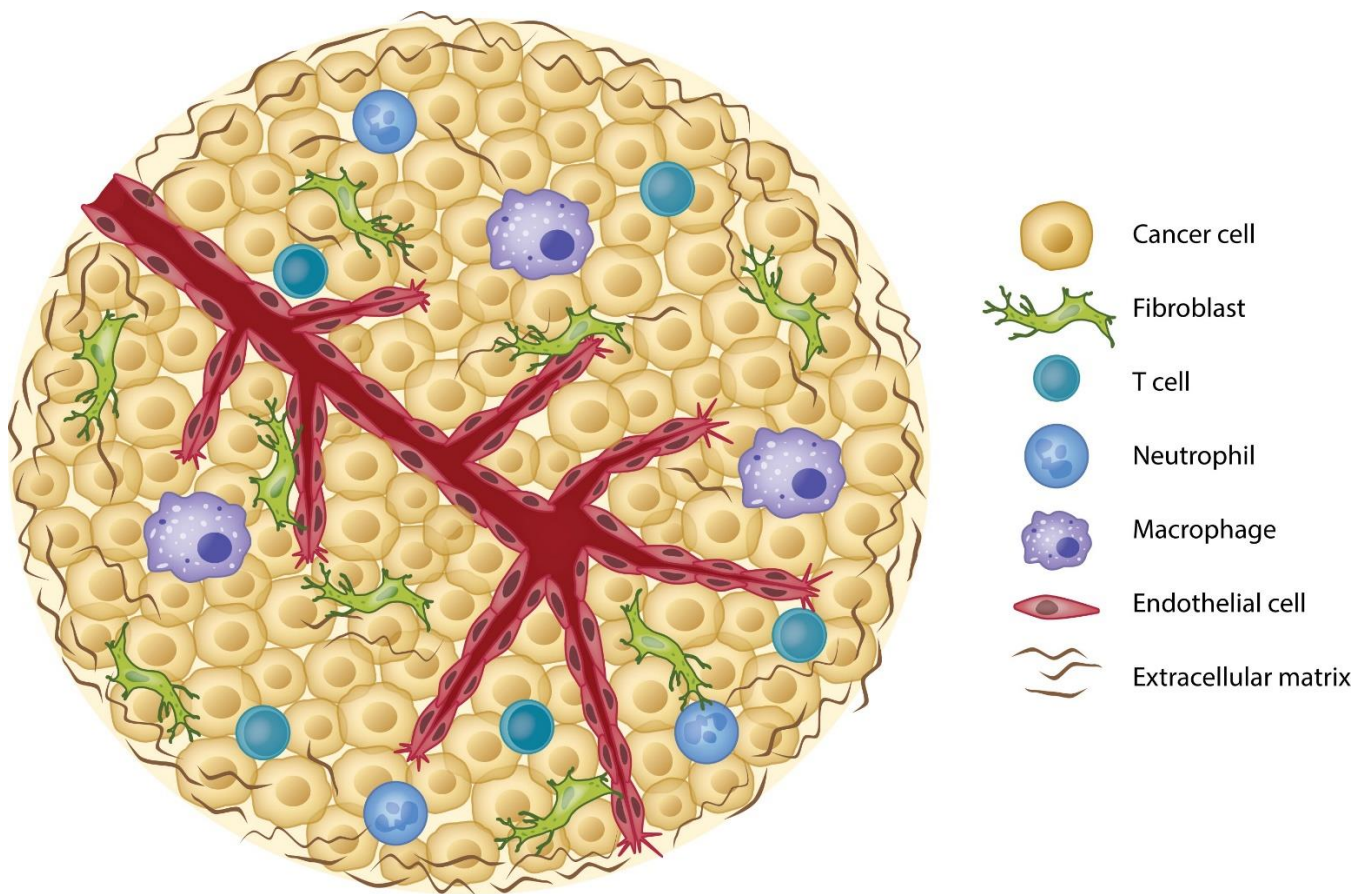
Outra importante citocina pró-inflamatória mais recentemente estudada na caquexia é a interleucina-8 (IL-8). A expressão de IL-8 nos tecidos tumorais está associada ao estado caquético e ao pior prognóstico em câncer de pâncreas^{81,82}. Os pacientes caquéticos com alta expressão de IL-8 nos tecidos tumorais apresentaram menor sobrevida global ou sobrevida livre de doença⁸². Além disso, existe uma associação entre o aumento no nível de expressão de IL-8 em amostras de tumor pareadas com amostras de soro e o tamanho do tumor desses mesmos pacientes⁸². Também já foi demonstrado uma associação entre o aumento da IL-8 no microambiente tumoral e sistêmico com o aumento da perda de peso e massa muscular em camundongos induzidos à caquexia pelo xenotransplante de tumores pancreáticos de pacientes caquéticos⁸¹. Além disso, nosso grupo de pesquisa demonstrou que pacientes com câncer de pulmão que possuem menor área de músculos peitorais apresentam um

aumento de expressão gênica de *IL8* no tecido tumoral³⁰. Ainda, nesse mesmo estudo, demonstramos que a IL-8 recombinante é capaz de induzir diretamente a atrofia em C2C12 miotubos “in vitro”.

Essas informações demonstram que a caquexia associada ao câncer está extremamente relacionada com inflamação sistêmica, a qual parece ser provocada pelos efeitos do aumento de citocinas pró-inflamatórias e outros fatores solúveis produzidas pelo paciente em resposta ao tumor, ou ainda pelo tumor em si, em especial por fatores secretados por células do MAT (como revisado por Tsoli et al.,¹⁸). De fato, macrófagos ativados infiltrados no MAT de ratos caquéticos são responsáveis por secretar citocinas que podem contribuir para o desequilíbrio metabólico observado na caquexia⁶⁶. Portanto, a análise do perfil de expressão de genes que codificam proteínas preditas como secretadas no MAT de pacientes com caquexia associada ao câncer de pulmão e pâncreas, bem como a determinação das células do MAT responsáveis pela secreção dessas moléculas, pode contribuir para a identificação de mediadores e biomarcadores da síndrome.

Microambiente tumoral na caquexia associada ao câncer

O MAT é composto por células tumorais e não tumorais que podem compreender: células neoplásicas, células hospedeiras residentes e recrutadas, produtos secretados dessas células (tais como citocinas e quimiocinas) e pelos componentes não celulares dispostos na matriz extracelular^{83,84}. O MAT contém células do sistema imunológico, células de vasos sanguíneos e linfáticos, bem como fibroblastos, células epiteliais, pericitos e, eventualmente, adipócitos⁸⁵ (**Figura 2**). As células não tumorais do MAT têm uma função dinâmica e frequentemente promotora de tumores em todos os estágios da carcinogênese⁸⁶. A comunicação intercelular no MAT é impulsionada por uma rede complexa e dinâmica de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, enzimas de remodelação de matriz e citocinas inflamatórias num meio com grandes perturbações nas propriedades físicas e químicas do tecido⁸⁴.



AR Lau AN, Vander Heiden MG. 2020. *Annu. Rev. Cancer Biol.* 4:17–40

Figura 2. Esquema representativo da composição do microambiente tumoral, que pode consistir-se em: células neoplásicas, células estromais (fibroblastos e endoteliócitos), células imunes (células T, neutrófilos e macrófagos) e componentes acelulares da matriz extracelular. *Cancer cell*: célula neoplásica; *Fibroblast*: fibroblasto; *T cell*: célula T; *Neutrophil*: neutrófilo; *Macrophage*: macrófago; *Endothelial cell*: células endoteliais; *Extracellular matrix*: matriz extracelular. Ilustração criada por Lau and Vander Heiden, 2020⁸⁷.

O MAT de diferentes órgãos é distinto e, portanto, intercomunicação entre células tumorais infiltrando um órgão específico e o microambiente desse órgão é diferente quando comparado com outros órgãos⁸³. Dados genômicos e transcriptômicos derivados de amostras de massa tumoral têm sido utilizados para estudar o MAT; e as medidas de infiltração imune definem subtipos moleculares de câncer de ovário, melanoma e pâncreas^{88–90}, sendo a expressão de genes do sistema imune variável de acordo com o subtipo molecular em outros tipos tumorais⁹¹. A caracterização do microambiente

imune utilizando as assinaturas de expressão gênica, análise de receptores de células T, repertório de receptores de células B e análises para identificar alvos imunológicos neo-antigênicos, fornecem uma riqueza de informações em muitos tipos de câncer e têm valor prognóstico⁹²⁻¹⁰⁰. Uma extensa análise imunogenômica em mais de 10.000 casos, compreendendo 33 tipos diferentes de câncer, utilizando dados compilados do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) identificou seis subtipos imunes, classificados como: cicatrização de feridas, dominante de IFN- γ , inflamatório, depletado de linfócitos, imunologicamente silencioso e dominante de TGF- β . Esses subtipos foram caracterizados por diferenças nas assinaturas de macrófagos ou linfócitos, proporção de células Th1:Th2 e extensão da heterogeneidade intratumoral, aneuploidia, extensão da carga neo-antigênica, proliferação celular global, expressão de genes imunomoduladores e prognóstico¹⁰¹. Esse estudo demonstrou que o subtipo imunológico de cada tumor se associa ao desfecho clínico da doença, principalmente às taxas de sobrevida dos pacientes de acordo com seu subtipo.

Outro aspecto bastante relevante para compreensão do MAT é a pureza do tumor, determinada pela proporção de células malignas na composição heterogênea de tipos celulares que compõem o tumor. Até recentemente, a pureza do tumor era estimada por um patologista, principalmente por análise visual ou de imagem de células tumorais. Com o avanço das tecnologias genômicas, muitos novos métodos computacionais surgiram para inferir a pureza do tumor. Esses métodos fazem estimativas usando diferentes tipos de informações genômicas, como expressão gênica¹⁰², variação de número de cópias somáticas¹⁰³⁻¹⁰⁵, mutações somáticas^{103,106} e metilação do DNA^{103,107}. Aran *et al.*¹⁰⁸ realizaram uma análise *Pan-Cancer* utilizando 21 tipos tumorais do TCGA, a qual demonstrou que, independentemente do método utilizado, os padrões de pureza diferem por tipo de câncer, com alta pureza (acima de 90% de células neoplásicas) em carcinoma adrenocortical e glioma de baixo grau, e baixa pureza (<70% de células neoplásicas) em cânceres resultantes de exposições crônicas mutagênicas, como o adenocarcinoma de pulmão, carcinoma de células escamosas e carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço. Os tumores pancreáticos (principalmente) e pulmonares são

conhecidos por apresentarem a mais alta prevalência de caquexia^{13,14}, também apresentam baixa pureza tumoral, caracterizada por uma baixa celularidade neoplásica e uma alta fração leucocitária infiltrada no microambiente tumoral^{101,109}. Além disso, os tumores de pâncreas classificados como de baixa pureza são aqueles que apresentam maior expressão de genes do secretoma associados à indução de caquexia⁵⁸.

Como a ação combinatória de mediadores solúveis secretados (secretoma) por células tumorais e células do microambiente tumoral, incluindo muitas citocinas pró-inflamatórias, contribui para a inflamação sistêmica e atua diretamente no músculo esquelético para induzir a perda de massa^{13,18,59,60}, a caracterização celular e molecular do MAT pode fornecer novos conhecimentos para compreensão da caquexia associada ao câncer. De fato, Matsuyama *et al.*¹¹⁰ demonstraram que diferenças no microambiente onde as células tumorais se desenvolvem podem afetar a progressão e o fenótipo da caquexia associada ao câncer através de alterações em vários fatores circulantes derivados do microambiente tumoral. Além disso, a intercomunicação entre o tumor e tecidos periféricos é mais pronunciado em pacientes caquéticos, em comparação com pacientes com peso estável¹¹¹. Portanto, embora ainda pouco explorada, a caracterização do perfil de expressão gênica de cada célula individual que compõe o MAT na caquexia do câncer é de fundamental relevância pois pode revelar mediadores de comunicação celular do MAT e gerar novos alvos para tratamento da caquexia e biomarcadores para diagnóstico precoce da síndrome.

A composição e função do MAT pode indicar a terapia mais adequada para pacientes oncológicos. A imunoterapia, por exemplo, tem como principal objetivo regular o microambiente tumoral reduzindo a presença de antígenos tumorais¹¹². A evasão imunológica no MAT é mediada pela sinalização PD-L1 expresso pelas células neoplásicas e seu ligante PD-1 nas células T¹¹³. Inibidores de *checkpoint* imunológico dessas moléculas tem mostrado eficácia na restauração da citotoxicidade de células T¹¹². Além disso, estudos recentes demonstram que pacientes com caquexia associada ao

câncer possuem maiores taxas de falha em monoterapia com pembrolizumabe (anti-PD-1) do que os pacientes com câncer não-caquéticos¹¹⁴. Portanto, a compreensão do MAT pode revelar novos potenciais tratamentos imunoterápicos para aumentar sua eficácia em pacientes com caquexia associada ao câncer.

Transcriptoma “single-cell” para análise do microambiente tumoral

O rápido desenvolvimento do sequenciamento de RNAs de células individuais (do inglês, *single-cell transcriptome*; scRNA-seq) também tem oferecido oportunidades sem precedentes para o estudo da heterogeneidade molecular e celular do ecossistema do MAT de diferentes tipos de cânceres associados com a caquexia como, por exemplo, de pâncreas, cabeça e pescoço, fígado e pulmão^{115–122}. Estudos com scRNA-seq em câncer de pulmão focam principalmente na caracterização do infiltrado inflamatório do tumor para avaliar a potencial resposta à tratamentos imunoterápicos, mostrando-se uma nova abordagem para estratificar os pacientes e revelar assinaturas imunes no câncer de pulmão^{122,123}. Além disso, o scRNA-seq em carcinomas pancreáticos, embora ainda em menor extensão, tem sido realizado para caracterizar globalmente o perfil e composição de tumores pancreáticos^{124,125}.

Embora os diferentes tipos de células e tecidos tenham sido historicamente caracterizados pela sua morfologia e seu fenótipo, o recente desenvolvimento de métodos moleculares permitiu descrições cada vez mais precisas de suas propriedades, tipicamente medindo padrões de expressão de proteínas ou RNA mensageiro^{126–128}. Os avanços tecnológicos também expandiram a multiplicação de medidas, de modo que o RNA-Seq pode agora enumerar praticamente todas as moléculas de RNAs mensageiros de uma única célula^{129–134}. Essa nova abordagem forneceu *insights* sobre a biologia celular e composição de órgãos de vários organismos. A caracterização global de células T em CPCNP, através de scRNA-seq, revelou a existência de 16 subgrupos de células T CD4+ e CD8+ com diferentes estados

funcionais e dinâmica dentro do MAT, a qual se associou ao prognóstico dos pacientes, fornecendo, assim, novos parâmetros para estratificação do CPCNP¹²².

Apesar de o scRNA-Seq ter surgido como uma técnica poderosa para caracterizar a heterogeneidade celular de tumores, atualmente é impraticável em coortes com grandes quantidades de amostras, e não pode ser utilizada com amostras coletadas e fixadas como parte do atendimento clínico de rotina. Entretanto, o perfil de expressão gênica de células individuais, obtido nesses experimentos de scRNA-Seq, pode ser utilizado como referência para dissecar *in silico* amostras tumorais complexas, estimando a abundância dos tipos celulares a partir dos dados do transcriptoma da massa tumoral. Vários algoritmos já foram desenvolvidos para prever os tipos celulares a partir dados de expressão gênica de tecidos tumorais, incluindo EPIC¹³⁵, ESTIMATE¹⁰², XCell¹³⁶, CIBERSORT¹³⁷ e CIBERSORTx¹³⁸. Portanto, análises de transcriptomas obtidos por RNA-Seq podem ser utilizados para determinar os tipos celulares presentes nos tumores de pacientes caquéticos, comparando-se com o perfil de expressão gênica de células individuais obtidos por scRNA-Seq, a partir do mesmo tipo tumoral. Essa análise também tem o potencial de inferir o secretoma tumoral de cada uma das células que o compõe, auxiliando na identificação das células responsáveis pela secreção de fatores caquéticos no MAT.

Secretoma tumoral

Recentes avanços na genômica, transcriptômica e proteômica tem auxiliado a esclarecer o efeito do tumor em tecidos e órgãos adjacentes ou distantes através da análise do seu secretoma⁵⁹. Secretoma representa o conjunto de macromoléculas secretadas por células, as quais permitem comunicação celular^{139,140}. O termo secretoma foi cunhado por Tjalsma e colaboradores para denotar todos os fatores secretados por uma célula e, também, os constituintes da via secretória¹⁴¹. A definição de secretoma, então, foi revisada para incluir apenas proteínas secretadas no espaço extracelular^{139,140}.

O secretoma tumoral apresenta um papel importante em aspectos conhecidos do câncer, como proliferação celular, apoptose, angiogênese, alteração no metabolismo energético e desenvolvimento de resistência contra a terapias anticâncer¹³⁹. O secretoma tumoral pode ser avaliado através de meio condicionado de linhagens celulares, líquidos intersticiais do tecido/tumor e fluídos corporais (revisado por Schaaij-Visser et al.,¹⁴²). Portanto, a análise do secretoma tem grande potencial em revelar mediadores, biomarcadores e alvos para tratamento da caquexia. Muitas metodologias estão disponíveis para a identificação dos componentes do secretoma; entretanto, o uso de ferramentas ômicas (microarranjos, sequenciamento e espectrometria de massas) tem se destacado nos últimos anos (revisado por Mukherjee et al.,¹⁴³). Análises proteômicas revelaram que o secretoma de pacientes com câncer de pulmão, mama e colorretal possui biomarcadores relacionados ao aumento de sobrevida dos pacientes (revisado por Schaaij-Visser et al.,¹⁴²).

As proteínas podem ser secretadas por uma célula através de vias de secreção clássica e não-clássica. As proteínas são, majoritariamente, secretadas pela via clássica, as quais são destinadas ao meio extracelular, em vesículas, pelo retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi¹⁴⁴. Para ser destinada à essa via, é necessário que a proteína contenha em sua sequência de aminoácidos um peptídeo-sinal e um sítio de clivagem antes da região de sequência madura¹⁴⁵. As proteínas secretadas por vias não-canônicas geralmente são localizadas no citoplasma ou núcleo células (proteínas com peptídeo-sinal também podem ser secretadas por outras rotas celulares) e podem ser secretadas através de microvesículas, exossomos, canais ou transportadores de membrana, lisossomos secretórios, etc¹⁴⁶. Entretanto, independente da via de secreção, é possível prever, através de ferramentas computacionais, a secreção de proteínas. A análise da sequência de peptídeos de uma proteína pode ser utilizada para estimar a presença do peptídeo-sinal¹⁴⁵ ou redes neurais podem prever proteínas secretadas por vias não-clássicas¹⁴⁷. O banco de dados *Human Protein Atlas* (HPA) possui a classificação mais atualizada do secretoma humano. Essa extensiva caracterização foi possível através das ferramentas computacionais anteriormente citadas e, também, pelo mapeamento e classificação da

localização subcelular em dezenas de milhares de imagens de microscopia confocal de alta resolução de proteínas humanas marcadas por imunofluorescência¹⁴⁸.

Algumas abordagens transcriptômicas têm sido utilizadas para desvendar o secretoma de uma célula ou de um tipo de tecido específico¹⁴⁹. Em um estudo pioneiro de análise do transcriptoma utilizando microarranjos, Welsh *et al.*¹⁵⁰ descreveram o aumento da expressão de 74 genes que codificam proteínas secretadas em cânceres humanos. Apesar do número reduzido de genes preditos como codificadores de proteínas secretadas e do número relativamente baixo de amostras de tecido analisadas nesse estudo, uma fração significativa desses genes de secretoma, que apresentavam aumento da expressão em carcinomas, foi validada como desregulada no câncer ou com aplicações no diagnóstico e na terapia da doença. A utilização de dados transcriptômicos para predição de proteínas secretadas é vantajosa, pois as técnicas de sequenciamento de RNA possuem uma maior resolução quando comparadas às metodologias de proteômica. Além disso, o grande potencial da predição do secretoma através do transcriptoma foi amplamente explorado em nosso laboratório para assegurar sua aplicação. Recentemente, nosso grupo de pesquisa realizou uma análise computacional para predição do secretoma, a partir de dados do transcriptoma obtidos por tecnologia de microarranjos, para identificar proteínas potencialmente secretadas pelo tumor de pacientes com câncer retal localmente avançado¹⁵¹ e câncer de laringe¹⁵². Essa estratégia foi efetiva, uma vez que as proteínas preditas como secretadas pelos tumores foram posteriormente validadas como apresentando níveis aumentados no soro¹⁵¹ e plasma¹⁵² em conjuntos independentes de pacientes.

Outra aplicação da análise do secretoma é a possibilidade de elucidar mecanismos de comunicação celular a partir dos dados de expressão gênica dos receptores dos fatores secretados em células ou tecidos alvo¹⁵³. Os tumores e MAT são constituídos por complexas interações celulares que modificam as funções das células imunológicas locais. Estudar a comunicação célula-célula dentro desse contexto pode auxiliar e orientar o desenvolvimento de terapias ou imunoterapias eficazes contra

o câncer ¹⁵³. Ainda, considerando o caráter sistêmico da caquexia em que citocinas afetam diversos órgãos e tecidos distantes, a análise da comunicação entre fatores secretados pelo tumor e órgão-alvo também pode auxiliar em futuras terapias para reduzir os efeitos sistêmicos da caquexia.

Para nosso conhecimento, nenhum estudo explorou esses dados na busca de elementos do secretoma produzidos especificamente pelas células neoplásicas e células do MAT na caquexia e sua relação com tecidos alvo; em especial, pela dificuldade de obtenção de dados clínicos e moleculares de pacientes com caquexia (revisado por Penna et al.,¹⁵⁴), principalmente de dados de sequenciamento *single-cell*. Entretanto, com o avanço de tecnologias para a análise de expressão gênica na última década, experimentos em larga escala, como de microarranjos e de novas metodologias de sequenciamento, tem gerado grandes quantidades de dados de que são depositados em bancos públicos (revisado por Rung et al.,¹⁵⁵). Os dados públicos, geralmente, podem ser combinados com novos dados gerados pelos pesquisadores, ou então serem reanalisados para responder questões diferentes daquelas colocadas nos estudos originais¹⁵⁶. A integração de dados ômicos disponíveis em bancos de dados é capaz de gerar *insights* biológicos, que, talvez, em estudos individuais não pudessem ser obtidos (revisado por Rung et al.,¹⁵⁵). De fato, buscando melhor compreender o papel do secretoma tumoral na caquexia, reanalisando dados em larga escala de 12 tipos tumorais disponíveis no TCGA, demonstramos que o câncer de pâncreas – aquele com maior prevalência de caquexia – é também o que mais regula positivamente a expressão de genes do secretoma, sugerindo que o secretoma tumoral é essencial no desenvolvimento da caquexia e deve ser mais compreendido e explorado⁵⁸.

Reanálise de dados de transcriptoma tumoral para identificação de mediadores da caquexia

O uso de informações genéticas e clínicas disponíveis no banco de dados TCGA tem facilitado a obtenção desses dados para estudos em larga escala, estendendo sua avaliação para vários tipos tumorais (68 tipos de tumores primários estão inclusos no TCGA, englobando mais de 33 mil casos)

¹⁵⁷. Além disso, o portal *Genotype-Tissue Expression* (GTEx) possui dados de sequenciamento de

RNA de tecidos normais de indivíduos que não possuíam alterações neoplásicas, sendo o banco de dados mais completo para utilização como controles dos casos tumorais ¹²⁸. De maneira semelhante, o banco de dados *Cancer Cell Line Encyclopedia* (CCLE) também comporta dados genômicos globais de 1457 linhagens celulares de câncer e, tendo em vista que linhagens celulares de tumores humanos mantém muitas características da biologia tumoral, a análise do perfil global de expressão gênica de linhagens celulares pode auxiliar na descoberta de novos fármacos e mecanismos envolvidos em diferentes propriedades do desenvolvimento e progressão tumoral¹⁵⁸. A correlação de dados transcriptômicos de linhagens celulares e do tecido tumoral pode revelar moléculas importantes para o câncer, em específico, nas alterações moleculares provenientes das células neoplásicas *in situ*.

Os estudos globais que utilizam dados transcriptômicos inseridos em bancos de dados biológicos tem se mostrado de extrema importância para se extrair conhecimentos de impacto na pesquisa e tratamento do câncer. Robinson *et al.*, ¹⁵⁹ realizaram uma análise *Pan-Cancer* (utilizando dados do TCGA) da expressão gênica de componentes do secretoma, a qual resultou em listas ordenadas de candidatos a biomarcadores diagnósticos detectáveis em fluidos biológicos. Essa investigação também revelou os padrões e as funções biológicas associadas às alterações na expressão de proteínas secretadas em diferentes tipos tumorais, focando principalmente em um conjunto específico de proteínas do secretoma. Essa estratégia reduziu a complexidade do secretoma ao estreitar a gama de moléculas secretadas necessárias para explorar questões fundamentais relacionadas à expressão alterada de genes que codificam proteínas do secretoma em diferentes tipos tumorais. No entanto, a complexidade do secretoma ainda está longe de ser completamente entendida e a seleção de diferentes estratégias metodológicas, ou de tipos específicos de tumores ou células do MAT, podem levar a novos *insights* sobre as funções biológicas do secretoma na caquexia. O secretoma produzido pelas massas tumorais dos cânceres associados à caquexia já foi globalmente caracterizado por nosso grupo de pesquisa ⁵⁸. Entretanto, demos maior foco nos fatores indutores de caquexia clássicos, como IL6, IFNG, IL8, etc. Por isso, ainda é necessário definir os fatores centrais do secretoma, relacionados

à inflamação e outras citocinas, a partir da expressão gênica, em resolução *single-cell*, de tumores com alta prevalência de caquexia, e que não são habitualmente explorados na caquexia. Portanto, o uso de dados públicos para análise do secretoma tumoral além de ser extremamente importante para a compreensão da biologia tumoral¹⁴² pode, também, auxiliar na identificação de moléculas potencialmente responsáveis pela modulação do MAT. Para nosso conhecimento, não existem estudos que utilizam-se de informações de bancos de dados públicos e correlacionem globalmente dados de secretoma do MAT de pacientes caquéticos com dados de composição do microambiente tumoral para investigar mediadores da caquexia associada ao câncer.

5. Conclusões

A caracterização do perfil transcricional tumoral do secretoma permitiu a definição da composição celular do microambiente tumoral e revelou potenciais mediadores de caquexia derivados do tumor.

Nos pacientes com câncer de pulmão, a baixa muscularidade, aferida pela área dos músculos peitorais em tomografias computadorizadas, está relacionada ao prognóstico desfavorável (menor sobrevida e maior frequência de recorrência tumoral). A análise do secretoma tumoral desses pacientes demonstrou enriquecimento de perfil inflamatório com aumento de expressão de biomarcadores de caquexia, provenientes de células do microambiente imune tumoral, principalmente por células T CD8+. Além disso, observamos um aumento da citotoxicidade e exaustão de células T em pacientes potencialmente caquéticos. Análises de transcriptomas musculares revelaram expressão de receptores que interagem com genes do secretoma aumentados nos pacientes com baixa muscularidade, demonstrando potenciais vias de comunicação tumor-músculo.

No câncer de pâncreas, análise pan-câncer de dados do TCGA revelou novos potenciais fatores pró-caquéticos centrais em cânceres associados à alta prevalência de caquexia, que participam da via de interação citocina receptor de citocina. Nós demonstramos que esses fatores participam na indução de caquexia por interagirem com tecidos alterados, em diferentes graus, durante a caquexia. Adipócitos apresentaram maior frequência de expressão de receptores para os fatores centrais identificados, enquanto células do tecido ósseo possuem expressão de poucos receptores. Além disso, a reanálise de dados de scRNA-seq demonstrou que as células neoplásicas ductais pancreáticas são as principais produtoras desses fatores.

5. Referências bibliográficas

Introdução:

1. Fearon K, Strasser F, Anker SD, et al. Definition and classification of cancer cachexia: An international consensus. *The Lancet Oncology*. 2011;12(5):489-495. doi:10.1016/S1470-2045(10)70218-7
2. Evans WJ, Morley JE, Argilés J, et al. Cachexia: A new definition. *Clinical Nutrition*. 2008;27(6):793-799. doi:10.1016/j.clnu.2008.06.013
3. von Haehling S, Anker SD. Cachexia as a major underestimated and unmet medical need: Facts and numbers. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. 2010;1(1):1-5. doi:10.1007/s13539-010-0002-6
4. Cohen S, Nathan JA, Goldberg AL. Muscle wasting in disease : molecular mechanisms and promising therapies. *Nature Publishing Group*. 2015;14(1):58-74. doi:10.1038/nrd4467
5. Busquets S, Stemmler B, Lo FJ. Cachexia and sarcopenia : mechanisms and potential targets for intervention. *Curr Opin Pharmacol*. 2015;22:100-106. doi:10.1016/j.coph.2015.04.003
6. Haehling S Von, Anker MS, Anker SD. Prevalence and clinical impact of cachexia in chronic illness in Europe , USA , and Japan : facts and numbers update 2016. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2016;7(5):507-509. doi:10.1002/jcsm.12167
7. Fearon KCH, Glass DJ, Guttridge DC. Cancer cachexia: mediators, signaling, and metabolic pathways. *Cell metabolism*. 2012;16(2):153-166. doi:10.1016/j.cmet.2012.06.011
8. Harimoto N, Shirabe K, Yamashita YI, et al. Sarcopenia as a predictor of prognosis in patients following hepatectomy for hepatocellular carcinoma. *British Journal of Surgery*. 2013;100(11):1523-1530. doi:10.1002/bjs.9258
9. Pressoir M, Desné S, Berchery D, et al. Prevalence, risk factors and clinical implications of malnutrition in french comprehensive cancer centres. *British Journal of Cancer*. 2010;102(6):966-971. doi:10.1038/sj.bjc.6605578
10. Bozzetti F. Screening the nutritional status in oncology: A preliminary report on 1,000 outpatients. *Supportive Care in Cancer*. 2009;17(3):279-284. doi:10.1007/s00520-008-0476-3
11. Segura A, Pardo J, Jara C, et al. An epidemiological evaluation of the prevalence of malnutrition in Spanish patients with locally advanced or metastatic cancer. *Clinical Nutrition*. 2005;24(5):801-814. doi:10.1016/j.clnu.2005.05.001
12. Hébuterne X, Lemarié E, Michallet M, De Montreuil CB, Schneider SM, Goldwasser F. Prevalence of malnutrition and current use of nutrition support in patients with cancer. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*. 2014;38(2):196-204. doi:10.1177/0148607113502674
13. Baracos VE, Martin L, Korc M, Guttridge DC, Fearon KCH. Cancer-associated cachexia. *Nature Publishing Group*. 2018;4:1-18. doi:10.1038/nrdp.2017.105
14. Anker MS, Holcomb R, Muscaritoli M, et al. Orphan disease status of cancer cachexia in the USA and in the European Union: a systematic review. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*. 2019;10(1):22-34. doi:10.1002/jcsm.12402
15. Donohoe CL, Ryan AM, Reynolds J V. Cancer Cachexia : Mechanisms and Clinical Implications. *Gastroenterol Res Pract*. 2011;2011:601430. doi:10.1155/2011/601434
16. Tisdale MJ. Biology of cachexia. *Journal of the National Cancer Institute*. 1997;89(23):1763-1773.

17. Tisdale MJ. Cachexia in cancer patients. *Nature reviews cancer*. 2002;3(11):883-889. doi:10.1038/nrg927
18. Tsoli M, Robertson G. Cancer cachexia : malignant inflammation, tumorkines, and metabolic mayhem. *Trends Endocrinol Metab*. 2013;24(4):174-183. doi:10.1016/j.tem.2012.10.006
19. Baracos VE, Reiman T, Mourtzakis M, Gioulbasanis I, Antoun S. Body composition in patients with non-small cell lung cancer: a contemporary view of cancer cachexia with the use of computed tomography image analysis. *Am J Clin Nutr*. 2010;91(4):1133-1137. doi:10.3945/ajcn.2010.28608C.INTRODUCTION
20. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA A Cancer J Clin*. Published online February 4, 2021:caac.21660. doi:10.3322/caac.21660
21. Instituto Nacional de Cancer José Alencar Gomes da Silva. *Estimativa 2020: Incidência de Câncer No Brasil*. Vol 66. Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA); 2019.
22. Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature Publishing Group*. 2018;553(7689):446-454. doi:10.1038/nature25183
23. Mitchell G, Mitchell C. Lung cancer. *Aust Fam Physician*. 2004;33(5):321-325.
24. Wahbah M, Boroumand N, Castro C, El-zeky F, Eltorkey M. Changing trends in the distribution of the histologic types of lung cancer : a review of 4439 cases. *Ann Diagn Pathol*. 2007;11(2):89-96. doi:10.1016/j.anndiagpath.2006.04.006
25. Hecht SS. Tobacco Smoke Carcinogens and Lung Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1999;91(14):1194-1210.
26. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors. *Journal of Thoracic Oncology*. 2015;10(9):1243-1260. doi:10.1097/JTO.0000000000000630
27. Garraway LA. Genomics-Driven Oncology: Framework for an Emerging Paradigm. *JCO*. 2013;31(15):1806-1814. doi:10.1200/JCO.2012.46.8934
28. Saito M, Suzuki H, Kono K, Takenoshita S, Kohno T. Treatment of lung adenocarcinoma by molecular-targeted therapy and immunotherapy. *Surg Today*. 2018;48(1):1-8. doi:10.1007/s00595-017-1497-7
29. Del Ferraro C, Grant M, Koczywas M, Dorr-Uyemura LA. Management of Anorexia-Cachexia in Late-Stage Lung Cancer Patients: *Journal of Hospice & Palliative Nursing*. 2012;14(6):397-402. doi:10.1097/NJH.0b013e31825f3470
30. Cury SS, de Moraes D, Freire PP, et al. Tumor Transcriptome Reveals High Expression of IL-8 in Non-Small Cell Lung Cancer Patients with Low Pectoralis Muscle Area and Reduced Survival. *Cancers (Basel)*. 2019;11(9). doi:10.3390/cancers11091251
31. Unit L, Hospital RM, Road D. Do patients with weight loss have a worse outcome when undergoing chemotherapy for lung cancers ? *Br J Cancer*. 2004;90(10):1905-1911. doi:10.1038/sj.bjc.6601781
32. Del Ferraro C, Grant M, Koczywas M, Dorr-Uyemura L. Management of Anorexia-Cachexia in Late Stage Lung Cancer Patients. *J Hosp Palliat Nurs*. 2012;14(6). doi:10.1097/NJH.0b013e31825f3470
33. Miller A, Mcleod L, Alhanyani S, et al. Blockade of the IL-6 trans-signalling / STAT3 axis suppresses cachexia in Kras-induced lung adenocarcinoma. *Oncogene*. 2016;36(21):3059-3066. doi:10.1038/ncr.2016.437
34. Mytelka DS, Li L, Benoit K. Post-diagnosis weight loss as a prognostic factor in non-small cell lung cancer. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. 2018;9(1):86-92. doi:10.1002/jcsm.12253

35. Dahlberg SE, Schiller JH, Bonomi PB, et al. Body mass index and its association with clinical outcomes for advanced non-small-cell lung cancer patients enrolled on eastern cooperative oncology group clinical trials. *Journal of Thoracic Oncology*. 2013;8(9):1121-1127. doi:10.1097/JTO.0b013e31829c942
36. Martin L, Birdsell L, MacDonald N, et al. Cancer cachexia in the age of obesity: Skeletal muscle depletion is a powerful prognostic factor, independent of body mass index. *Journal of Clinical Oncology*. 2013;31(12):1539-1547. doi:10.1200/JCO.2012.45.2722
37. Stene GB, Helbostad JL, Amundsen T, et al. Changes in skeletal muscle mass during palliative chemotherapy in patients with advanced lung cancer. *Acta Oncol*. 2015;54(3):340-348. doi:10.3109/0284186X.2014.953259
38. Prado CMM, Lieff JR, Mccargar LJ, et al. Prevalence and clinical implications of sarcopenic obesity in patients with solid tumours of the respiratory and gastrointestinal tracts : a population-based study. :629-635. doi:10.1016/S1470-2045(08)70153-0
39. Arrieta O, De la Torre-Vallejo M, López-Macías D, et al. Nutritional Status , Body Surface , and Low Lean Body Mass / Body Mass Index Are Related to Dose Reduction and Severe Gastrointestinal Toxicity Induced by Afatinib in Patients With Non-Small Cell Lung Cancer. *Oncologist*. Published online 2015:967-974.
40. Fløtten Ø, Hjermsstad MJ, Aass N, Jordhøy M. Low muscle mass is associated with chemotherapy-induced haematological toxicity in advanced non-small cell lung cancer. Published online 2015:1-7. doi:10.1016/j.lungcan.2015.07.001
41. Kinsey CM, San Jose Estepar R, Van der Velden J, et al. Lower Pectoralis Muscle Area Is Associated with a Worse Overall Survival in Non – Small. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2017;26(January):38-44. doi:10.1158/1055-9965.EPI-15-1067
42. Bye A, Sjøblom B, Wentzel-Larsen T, et al. Muscle mass and association to quality of life in non-small cell lung cancer patients. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. 2017;8(5):759-767. doi:10.1002/jcsm.12206
43. Kilgour RD, Vigano A, Trutschnigg B, et al. Cancer-related fatigue: The impact of skeletal muscle mass and strength in patients with advanced cancer. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. 2010;1(2):177-185. doi:10.1007/s13539-010-0016-0
44. Collins J, Noble S, Chester J, Coles B, Byrne A. The assessment and impact of sarcopenia in lung cancer : a systematic literature review. *BMJ Open*. 2014;4(1):e003697. doi:10.1136/bmjopen-2013-003697
45. Fong ZV, Winter JM. Biomarkers in Pancreatic Cancer. *The Cancer Journal*. 2012;18(6):530-538. doi:10.1097/PPO.0b013e31827654ea
46. Kleeff J, Korc M, Apte M, et al. Pancreatic cancer. *Nature Reviews Disease Primers*. 2016;2(1):16022. doi:10.1038/nrdp.2016.22
47. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2020;70(1):7-30. doi:10.3322/caac.21590
48. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre L, Jemal A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394-424. doi:10.3322/caac.21492
49. Ferlay J, Partensky C, Bray F. More deaths from pancreatic cancer than breast cancer in the EU by 2017. *Acta Oncologica*. 2016;55(9-10):1158-1160. doi:10.1080/0284186X.2016.1197419
50. Pausch T, Hartwig W, Hinz U, et al. Cachexia but not obesity worsens the postoperative outcome after pancreatoduodenectomy in pancreatic cancer. *Surgery*. 2012;152(3):S81-S88. doi:10.1016/j.surg.2012.05.028

51. Bachmann J, Heiligensetzer M, Krakowski-Roosen H, Büchler MW, Friess H, Martignoni ME. Cachexia Worsens Prognosis in Patients with Resectable Pancreatic Cancer. *Journal of Gastrointestinal Surgery*. 2008;12(7):1193-1201. doi:10.1007/s11605-008-0505-z
52. Talbert EE, Lewis HL, Farren MR, et al. Circulating monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) is associated with cachexia in treatment-naïve pancreatic cancer patients. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. 2018;1. doi:10.1002/jcsm.12251
53. Gilabert M, Calvo E, Airoidi A, et al. Pancreatic cancer-induced cachexia is Jak2-dependent in mice. *Journal of cellular physiology*. 2014;229(10):1437-1443. doi:10.1002/jcp.24580
54. Delitto D, Judge SM, George TJ, et al. A clinically applicable muscular index predicts long-term survival in resectable pancreatic cancer. *Surgery (United States)*. 2017;161(4):930-938. doi:10.1016/j.surg.2016.09.038
55. Zhong X, Pons M, Poirier C, et al. The systemic activin response to pancreatic cancer: implications for effective cancer cachexia therapy. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. 2019;10(5):1083-1101. doi:10.1002/jcsm.12461
56. Judge SM, Nosacka RL, Delitto D, et al. Skeletal Muscle Fibrosis in Pancreatic Cancer Patients with Respect to Survival. *JNCI Cancer Spectrum*. 2018;2(3). doi:10.1093/jncics/pky043
57. Armstrong VS, Fitzgerald LW, Bathe OF. Cancer-Associated Muscle Wasting—Candidate Mechanisms and Molecular Pathways. *IJMS*. 2020;21(23):9268. doi:10.3390/ijms21239268
58. Freire PP, Fernandez GJ, de Moraes D, et al. The expression landscape of cachexia-inducing factors in human cancers. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. 2020;11(4):947-961. doi:10.1002/jcsm.12565
59. Twelkmeyer B, Tardif N, Rooyackers O. Omics and cachexia. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2017;20(3):181-185. doi:10.1097/MCO.0000000000000363
60. Argilés JM, Stemmler B, López-Soriano FJ, Busquets S. Inter-tissue communication in cancer cachexia. *Nature Reviews Endocrinology*. Published online 2018. doi:10.1038/s41574-018-0123-0
61. Penafuerte CA, Gagnon B, Sirois J, Murphy J, Macdonald N, Tremblay ML. Identification of neutrophil-derived proteases and angiotensin II as biomarkers of cancer cachexia. *British Journal of Cancer*. 2016;114(6):680-687. doi:10.1038/bjc.2016.3
62. Lerner L, Hayes TG, Tao N, et al. Plasma growth differentiation factor 15 is associated with weight loss and mortality in cancer patients. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. 2015;6(4):317-324. doi:10.1002/jcsm.12033
63. Lerner L, Tao J, Liu Q, et al. MAP3K11/GDF15 axis is a critical driver of cancer cachexia. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. 2016;7(4):467-482. doi:10.1002/jcsm.12077
64. Fukawa T, Yan-Jiang BC, Min-Wen JC, et al. Excessive fatty acid oxidation induces muscle atrophy in cancer cachexia. *Nature Medicine*. 2016;22(6):666-671. doi:10.1038/nm.4093
65. McLean JB, Moylan JS, Horrell EMW, Andrade FH. Proteomic analysis of media from lung cancer cells reveals role of 14-3-3 proteins in cachexia. *Frontiers in Physiology*. 2015;6(APR):1-8. doi:10.3389/fphys.2015.00136
66. Laine A, Iyengar P, Pandita T. The role of inflammatory pathways in cancer-associated cachexia and radiation resistance. *Mol Cancer Res*. 2013;11(9):967-972. doi:10.1158/1541-7786.MCR-13-0189
67. Petruzzelli M, Wagner EF. Mechanisms of metabolic dysfunction in cancer-associated cachexia. *Genes Dev*. 2016;30(5):489-501. doi:10.1101/gad.276733.115.GENES

68. Han J, Meng Q, Shen L, Wu G. Interleukin-6 induces fat loss in cancer cachexia by promoting white adipose tissue lipolysis and browning. *Lipids in Health and Disease*. 2018;17(1):14. doi:10.1186/s12944-018-0657-0
69. Haddad F, Zaldivar F, Cooper DM, Adams GR. IL-6-induced skeletal muscle atrophy. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)*. 2005;98(3):911-917. doi:10.1152/jappphysiol.01026.2004
70. Bonetto A, Aydogdu T, Jin X, et al. JAK/STAT3 pathway inhibition blocks skeletal muscle wasting downstream of IL-6 and in experimental cancer cachexia. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2012;303(3):E410-E421. doi:10.1152/ajpendo.00039.2012
71. Soda K, Kawakami M, Kashii A, Miyata M. Manifestations of cancer cachexia induced by colon 26 adenocarcinoma are not fully ascribable to interleukin-6. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 1995;62(3):332-336.
72. Strassmann G, Fong M, Kenney JS, Jacob CO. Evidence for the involvement of interleukin 6 in experimental cancer cachexia. *The Journal of clinical investigation*. 1992;89(5):1681-1684. doi:10.1172/JCI115767
73. White JP, Baynes JW, Welle SL, et al. The regulation of skeletal muscle protein turnover during the progression of cancer cachexia in the Apc(Min/+) mouse. *PLoS one*. 2011;6(9):e24650. doi:10.1371/journal.pone.0024650
74. Tamura S, Ouchi KF, Mori K, et al. Involvement of human interleukin 6 in experimental cachexia induced by a human uterine cervical carcinoma xenograft. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 1995;1(11):1353-1358.
75. Prado BL, Qian Y. Anti-cytokines in the treatment of cancer cachexia. *Annals of Palliative Medicine*. 2019;8(1):67-79. doi:10.21037/apm.2018.07.06
76. Schuster M, Rigas JR, Orlov S V., et al. ALD518, a humanized anti-IL-6 antibody, treats anemia in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): Results of a phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of Clinical Oncology*. 2010;28:15_suppl:7631-7631.
77. Bayliss TJ, Smith JT, Schuster M, Dragnev KH, Rigas JR. A humanized anti-IL-6 antibody (ALD518) in non-small cell lung cancer. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2011;11(12):1663-1668. doi:10.1517/14712598.2011.627850
78. Cao Z, Scott AM, Hoogenraad NJ, Osellame LD. Mediators and clinical treatment for cancer cachexia: a systematic review. *JCSM Rapid Communications*. 2021;4(2):166-186. doi:10.1002/rco2.30
79. Anker SD, Coats AJS, Morley JE. Evidence for partial pharmaceutical reversal of the cancer anorexia-cachexia syndrome: the case of anamorelin. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2015;6(4):275-277. doi:10.1002/jcsm.12063
80. Wakabayashi H, Arai H, Inui A. The regulatory approval of anamorelin for treatment of cachexia in patients with non-small cell lung cancer, gastric cancer, pancreatic cancer, and colorectal cancer in Japan: facts and numbers. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2021;12(1):14-16. doi:10.1002/jcsm.12675
81. Gerber MH, Underwood PW, Judge SM, et al. Local and Systemic Cytokine Profiling for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma to Study Cancer Cachexia in an Era of Precision Medicine. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(12):3836. doi:10.3390/ijms19123836
82. Hou YC, Wang CJ, Chao YJ, et al. Elevated Serum Interleukin-8 Level Correlates with Cancer-Related Cachexia and Sarcopenia: An Indicator for Pancreatic Cancer Outcomes. *Journal of Clinical Medicine*. 2018;7(12):502. doi:10.3390/jcm7120502
83. Maman S, Witz IP. A history of exploring cancer in context. *Nature reviews Cancer*. 2018;18(6):359-376. doi:10.1038/s41568-018-0006-7
84. Balkwill FR, Capasso M, Hagemann T. The tumor microenvironment at a glance. *Journal of cell science*. 2012;125(Pt 23):5591-5596. doi:10.1242/jcs.116392

85. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature Medicine*. 2013;19(11):1423-1437. doi:10.1038/nm.3394
86. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer cell*. 2012;21(3):309-322. doi:10.1016/j.ccr.2012.02.022
87. Lau AN, Vander Heiden MG. Metabolism in the Tumor Microenvironment. *Annu Rev Cancer Biol*. 2020;4(1):17-40. doi:10.1146/annurev-cancerbio-030419-033333
88. Bailey P, Chang DK, Nones K, et al. Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature*. 2016;531(7592):47-52. doi:10.1038/nature16965
89. Cancer Genome Atlas Network. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell*. 2015;161(7):1681-1696. doi:10.1016/j.cell.2015.05.044
90. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature*. 2011;474(7353):609-615. doi:10.1038/nature10166
91. Iglesia MD, Parker JS, Hoadley KA, Serody JS, Perou CM, Vincent BG. Genomic Analysis of Immune Cell Infiltrates Across 11 Tumor Types. *Journal of the National Cancer Institute*. 2016;108(11). doi:10.1093/jnci/djw144
92. Bindea G, Mlecnik B, Tosolini M, et al. Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer. *Immunity*. 2013;39(4):782-795. doi:10.1016/j.immuni.2013.10.003
93. Brown SD, Raeburn LA, Holt RA. Profiling tissue-resident T cell repertoires by RNA sequencing. *Genome Medicine*. 2015;7(1):1-8. doi:10.1186/s13073-015-0248-x
94. Charoentong P, Finotello F, Angelova M, et al. Pan-cancer Immunogenomic Analyses Reveal Genotype-Immunophenotype Relationships and Predictors of Response to Checkpoint Blockade. *Cell Reports*. 2017;18(1):248-262. doi:10.1016/j.celrep.2016.12.019
95. S. D. Brown, R. L. Warren, E. A. Gibb, et al. Neo-antigens predicted by tumor genome meta-analysis correlate with increased patient survival. *Genome research*. 2014;24(5):743-750. doi:10.1101/gr.165985.113
96. Gentles AJ, Newman AM, Liu CL, et al. The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nature Medicine*. 2015;21(8):938-945. doi:10.1038/nm.3909
97. Iglesia MD, Parker JS, Hoadley KA, Serody JS, Perou CM, Vincent BG. Genomic Analysis of Immune Cell Infiltrates Across 11 Tumor Types. 2016;108:1-11. doi:10.1093/jnci/djw144
98. Li B, Severson E, Pignon JC, et al. Comprehensive analyses of tumor immunity: Implications for cancer immunotherapy. *Genome Biology*. 2016;17(1):1-16. doi:10.1186/s13059-016-1028-7
99. Porta-Pardo E, Godzik A. Mutation Drivers of Immunological Responses to Cancer. *Cancer Immunology Research*. 2016;4(9):789-798. doi:10.1158/2326-6066.cir-15-0233
100. Rooney MS, Shukla SA, Wu CJ, Getz G, Hacohen N. Molecular and genetic properties of tumors associated with local immune cytolytic activity. *Cell*. 2015;160(1-2):48-61. doi:10.1016/j.cell.2014.12.033
101. Thorsson V, Gibbs DL, Brown SD, et al. The Immune Landscape of Cancer. *Immunity*. 2018;48(4):812-830.e14. doi:10.1016/j.immuni.2018.03.023
102. Yoshihara K, Shahmoradgoli M, Martínez E, et al. Inferring tumour purity and stromal and immune cell admixture from expression data. *Nature Communications*. 2013;4. doi:10.1038/ncomms3612
103. Carter SL, Cibulskis K, Helman E, et al. Absolute quantification of somatic DNA alterations in human cancer. *Nature Biotechnology*. 2012;30(5):413-421. doi:10.1038/nbt.2203

104. Oesper L, Mahmoody A, Raphael BJ. THetA: inferring intra-tumor heterogeneity from high-throughput DNA sequencing data. *Genome biology*. 2013;14(7):R80. doi:10.1186/gb-2013-14-7-r80
105. Chen H, Bell JM, Zavala NA, Ji HP, Zhang NR. Allele-specific copy number profiling by next-generation DNA sequencing. *Nucleic Acids Research*. 2015;43(4):1-14. doi:10.1093/nar/gku1252
106. Andor N, Harness J V., Müller S, Mewes HW, Petritsch C. Expands: Expanding ploidy and allele frequency on nested subpopulations. *Bioinformatics*. 2014;30(1):50-60. doi:10.1093/bioinformatics/btt622
107. Zheng X, Zhao Q, Wu HJ, et al. MethylPurify: tumor purity deconvolution and differential methylation detection from single tumor DNA methylomes. *Genome biology*. 2014;15(8):419. doi:10.1186/s13059-014-0419-x
108. Aran D, Sirota M, Butte AJ. Systematic pan-cancer analysis of tumour purity. *Nature Communications*. 2015;6:1-11. doi:10.1038/ncomms9971
109. Raphael BJ, Hruban RH, Aguirre AJ, et al. Integrated Genomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell*. 2017;32(2):185-203.e13. doi:10.1016/j.ccell.2017.07.007
110. Matsuyama T, Ishikawa T, Okayama T, et al. Tumor inoculation site affects the development of cancer cachexia and muscle wasting. *International Journal of Cancer*. 2015;137(11):2558-2565. doi:10.1002/ijc.29620
111. de Matos-Neto EM, Lima JDCC, de Pereira WO, et al. Systemic inflammation in cachexia - Is tumor cytokine expression profile the culprit? *Frontiers in Immunology*. 2015;6(DEC):1-11. doi:10.3389/fimmu.2015.00629
112. Akkin S, Varan G, Bilensoy E. A Review on Cancer Immunotherapy and Applications of Nanotechnology to Chemoimmunotherapy of Different Cancers. *Molecules*. 2021;26(11):3382. doi:10.3390/molecules26113382
113. Ohaegbulam KC, Assal A, Lazar-Molnar E, Yao Y, Zang X. Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway. *Trends in Molecular Medicine*. 2015;21(1):24-33. doi:10.1016/j.molmed.2014.10.009
114. Fujii H, Araki A, Iihara H, et al. Cancer cachexia as a determinant of efficacy of first-line pembrolizumab in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Mol Clin Oncol*. 2022;16(4):91. doi:10.3892/mco.2022.2524
115. Peng J, Sun BF, Chen CY, et al. Single-cell RNA-seq highlights intra-tumoral heterogeneity and malignant progression in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cell Research*. 2019;(June). doi:10.1038/s41422-019-0195-y
116. Ligorio M, Sil S, Malagon-Lopez J, et al. Stromal Microenvironment Shapes the Intratumoral Architecture of Pancreatic Cancer. *Cell*. 2019;178(1):160-175.e27. doi:10.1016/j.cell.2019.05.012
117. Puram S V., Tirosh I, Parkh AS, et al. Single-Cell Transcriptomic Analysis of Primary and Metastatic Tumor Ecosystems in Head and Neck Cancer. *Cell*. 2017;171(7):1611-1624.e24. doi:10.1016/j.cell.2017.10.044
118. Zheng C, Zheng L, Yoo JK, et al. Landscape of Infiltrating T Cells in Liver Cancer Revealed by Single-Cell Sequencing. *Cell*. 2017;169(7):1342-1356.e16. doi:10.1016/j.cell.2017.05.035
119. Ho DWH, Tsui YM, Sze KMF, et al. Single-cell transcriptomics reveals the landscape of intra-tumoral heterogeneity and stemness-related subpopulations in liver cancer. *Cancer Letters*. 2019;459(March):176-185. doi:10.1016/j.canlet.2019.06.002
120. Zheng H, Pomyen Y, Hernandez MO, et al. Single-cell analysis reveals cancer stem cell heterogeneity in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2018;68(1):127-140. doi:10.1002/hep.29778
121. Zilionis R, Engblom C, Pfirschke C, et al. Single-Cell Transcriptomics of Human and Mouse Lung Cancers Reveals Conserved Myeloid Populations across Individuals and Species Resource Single-Cell Transcriptomics of Human and Mouse Lung Cancers Reveals Conserved Myeloid Populations across Individuals . *Immunity*. Published online 2019:1-18. doi:10.1016/j.immuni.2019.03.009

122. Guo X, Zhang Y, Zheng L, et al. Global characterization of T cells in non-small-cell lung cancer by single-cell sequencing. *Nature Medicine*. 2018;24(7):978-985. doi:10.1038/s41591-018-0045-3
123. Lavin Y, Kobayashi S, Leader A, et al. Innate Immune Landscape in Early Lung Adenocarcinoma by Paired Single-Cell Analyses. *Cell*. 2017;169(4):750-765.e17. doi:10.1016/j.cell.2017.04.014
124. Lin W, Noel P, Borazanci EH, et al. Single-cell transcriptome analysis of tumor and stromal compartments of pancreatic ductal adenocarcinoma primary tumors and metastatic lesions. *Genome Medicine*. 2020;12(1):80. doi:10.1186/s13073-020-00776-9
125. Schlesinger Y, Yosefov-Levi O, Kolodkin-Gal D, et al. Single-cell transcriptomes of pancreatic preinvasive lesions and cancer reveal acinar metaplastic cells' heterogeneity. *Nature Communications*. 2020;11(1):4516. doi:10.1038/s41467-020-18207-z
126. Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, et al. Tissue-based map of the human proteome. *Science*. 2015;347(6220):1260419-1260419. doi:10.1126/science.1260419
127. Thul PJ, Akesson L, Wiking M, et al. A subcellular map of the human proteome. *Science*. 2017;356(6340):eaal3321. doi:10.1126/science.aal3321
128. Lonsdale J, Thomas J, Salvatore M, et al. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. *Nature Genetics*. 2013;45(6):580-585. doi:10.1038/ng.2653
129. Treutlein B, Brownfield DG, Wu AR, et al. Reconstructing lineage hierarchies of the distal lung epithelium using single-cell RNA-seq. *Nature*. 2014;509(7500):371-375. doi:10.1038/nature13173
130. Angelidis I, Simon LM, Fernandez IE, et al. An atlas of the aging lung mapped by single cell transcriptomics and deep tissue proteomics. *Nature Communications*. 2019;10(1):963. doi:10.1038/s41467-019-08831-9
131. Enge M, Arda HE, Mignardi M, et al. Single-Cell Analysis of Human Pancreas Reveals Transcriptional Signatures of Aging and Somatic Mutation Patterns. *Cell*. 2017;171(2):321-330.e14. doi:10.1016/j.cell.2017.09.004
132. Halpern KB, Shenhav R, Matcovitch-Natan O, et al. Single-cell spatial reconstruction reveals global division of labour in the mammalian liver. *Nature*. 2017;542(7641):352-356. doi:10.1038/nature21065
133. Muraro MJ, Dharmadhikari G, Grün D, et al. A Single-Cell Transcriptome Atlas of the Human Pancreas. *Cell Systems*. 2016;3(4):385-394.e3. doi:10.1016/j.cels.2016.09.002
134. Shapiro E, Biezuner T, Linnarsson S. Single-cell sequencing-based technologies will revolutionize whole-organism science. *Nature reviews Genetics*. 14(9):618-630. doi:10.1038/nrg3542
135. Racle J, de Jonge K, Baumgaertner P, Speiser DE, Gfeller D. Simultaneous enumeration of cancer and immune cell types from bulk tumor gene expression data. *eLife*. 2017;6:1-25. doi:10.7554/eLife.26476
136. Aran D, Hu Z, Butte AJ. xCell: Digitally portraying the tissue cellular heterogeneity landscape. *Genome Biology*. 2017;18(1):1-14. doi:10.1186/s13059-017-1349-1
137. Newman AM, Liu CL, Green MR, et al. Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles. *Nature Methods*. 2015;12(5):453-457. doi:10.1038/nmeth.3337
138. Newman AM, Steen CB, Liu CL, et al. Determining cell type abundance and expression from bulk tissues with digital cytometry. *Nature Biotechnology*. Published online 2019. doi:10.1038/s41587-019-0114-2
139. Patel S, Ngounou Wetie A, Darie C, Clarkson B. Cancer secretomes and their place in supplementing other hallmarks of cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2014;806:409-442. doi:10.1007/978-3-319-06068-2_20

140. Makridakis M, Vlahou A. Secretome proteomics for discovery of cancer biomarkers. *Proteomics, J.* 2010;73(12):2291-2305. doi:10.1016/j.jprot.2010.07.001
141. Tjalsma H, Bolhuis A, Jongbloed J, Bron S, van Dijk J. Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000;64:515-547.
142. Schaaij-visser TBM, Wit M De, Lam SW, Jiménez CR. The cancer secretome, current status and opportunities in the lung, breast and colorectal cancer context. *BBA - Proteins and Proteomics.* 2013;1834(11):2242-2258. doi:10.1016/j.bbapap.2013.01.029
143. Mukherjee P, Mani S. Methodologies to decipher the cell secretome. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1834(11):2226-2232. doi:10.1016/j.bbapap.2013.01.022
144. Rapoport TA. Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature.* 2007;450(7170):663-669. doi:10.1038/nature06384
145. Burdukiewicz M, Sobczyk P, Chilimoniuk J, Gagat P, Mackiewicz P. Prediction of Signal Peptides in Proteins from Malaria Parasites. *IJMS.* 2018;19(12):3709. doi:10.3390/ijms19123709
146. Bhattacharya A, Prakash YS, Eissa NT. Secretory function of autophagy in innate immune cells: Secretory function of autophagy. *Cell Microbiol.* 2014;16(11):1637-1645. doi:10.1111/cmi.12365
147. Bendtsen JD, Jensen LJ, Blom N, von Heijne G, Brunak S. Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. *Protein Engineering Design and Selection.* 2004;17(4):349-356. doi:10.1093/protein/gzh037
148. Sullivan DP, Winsnes CF, Åkesson L, et al. Deep learning is combined with massive-scale citizen science to improve large-scale image classification. *Nat Biotechnol.* 2018;36(9):820-828. doi:10.1038/nbt.4225
149. Mukherjee P, Mani S. Methodologies to decipher the cell secretome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics.* 2013;1834(11):2226-2232. doi:10.1016/j.bbapap.2013.01.022
150. Welsh JB, Sapinoso LM, Kern SG, et al. Large-scale delineation of secreted protein biomarkers overexpressed in cancer tissue and serum. Published online 2010.
151. Canto LM do, Cury SS, Barros-Filho MC, et al. Locally advanced rectal cancer transcriptomic-based secretome analysis reveals novel biomarkers useful to identify patients according to neoadjuvant chemoradiotherapy response. *Scientific Reports.* 2019;9(1):1-11. doi:10.1038/s41598-019-45151-w
152. Cury SS, Lapa RML, de Mello JBH, et al. Increased DSG2 plasmatic levels identified by transcriptomic-based secretome analysis is a potential prognostic biomarker in laryngeal carcinoma. *Oral Oncology.* 2020;103. doi:10.1016/j.oraloncology.2020.104592
153. Armingol E, Officer A, Harismendy O, Lewis NE. Deciphering cell–cell interactions and communication from gene expression. *Nature Reviews Genetics.* Published online 2020. doi:10.1038/s41576-020-00292-x
154. Penna F, Busquets S, Argilés JM. Experimental cancer cachexia : Evolving strategies for getting closer to the human scenario. *Seminars in Cell and Developmental Biology.* 2016;54:20-27. doi:10.1016/j.semcd.2015.09.002
155. Rung J, Brazma A. Reuse of public genome-wide gene expression data. *Nature Reviews Genetics.* 2013;14(2):89-99. doi:10.1038/nrg3394
156. Perez-Riverol Y, Zorin A, Dass G, et al. Quantifying the impact of public omics data. *Nature Communications.* 2019;10(1):3512. doi:10.1038/s41467-019-11461-w
157. Tomczak K, Czerwińska P, Wiznerowicz M. The Cancer Genome Atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge. *Contemp Oncol (Pozn).* 2015;19(1A):A68-77. doi:10.5114/wo.2014.47136

158. Barretina J, Caponigro G, Stransky N, et al. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature*. 2012;483(7391):603-607. doi:10.1038/nature11003
159. Robinson JL, Feizi A, Uhlén M, Nielsen J. A Systematic Investigation of the Malignant Functions and Diagnostic Potential of the Cancer Secretome. *Cell Reports*. 2019;26(10):2622-2635.e5. doi:10.1016/j.celrep.2019.02.025
160. Bakr S, Gevaert O, Echegaray S, et al. Data for NSCLC Radiogenomics Collection. Published online 2017. doi:10.7937/K9/TCIA.2017.7HS46ERV
161. Su AI, Wiltshire T, Batalov S, et al. A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004;101(16):6062-6067. doi:10.1073/pnas.0400782101
162. Budczies J, Klauschen F, Sinn BV, et al. Cutoff Finder: A Comprehensive and Straightforward Web Application Enabling Rapid Biomarker Cutoff Optimization. van Diest P, ed. *PLoS ONE*. 2012;7(12):e51862. doi:10.1371/journal.pone.0051862
163. Goksuluk D, Korkmaz S, Zararsiz G, Karaagaoglu A Ergun. easyROC: An Interactive Web-tool for ROC Curve Analysis Using R Language Environment. *The R Journal*. 2016;8(2):213. doi:10.32614/RJ-2016-042
164. Thul PJ, Åkesson L, Wiking M, et al. A subcellular map of the human proteome. *Science*. 2017;356(6340):eaal3321. doi:10.1126/science.aal3321
165. Shannon P. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Research*. 2003;13(11):2498-2504. doi:10.1101/gr.1239303
166. Tang Y, Li M, Wang J, Pan Y, Wu FX. CytoNCA: A cytoscape plugin for centrality analysis and evaluation of protein interaction networks. *Biosystems*. 2015;127:67-72. doi:10.1016/j.biosystems.2014.11.005
167. Robinson MD, Oshlack A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol*. 2010;11(3):R25. doi:10.1186/gb-2010-11-3-r25
168. Clark K, Vendt B, Smith K, et al. The Cancer Imaging Archive (TCIA): Maintaining and Operating a Public Information Repository. *J Digit Imaging*. 2013;26(6):1045-1057. doi:10.1007/s10278-013-9622-7
169. Wu C, Orozco C, Boyer J, et al. BioGPS: an extensible and customizable portal for querying and organizing gene annotation resources. *Genome Biol*. 2009;10(11):R130. doi:10.1186/gb-2009-10-11-r130
170. Barretina J, Caponigro G, Stransky N, et al. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature*. 2012;483(7391):603-607. doi:10.1038/nature11003
171. Yu K, Chen B, Aran D, et al. Comprehensive transcriptomic analysis of cell lines as models of primary tumors across 22 tumor types. *Nat Commun*. 2019;10(1):3574. doi:10.1038/s41467-019-11415-2
172. Chen B, Khodadoust MS, Liu CL, Newman AM, Alizadeh AA. Profiling Tumor Infiltrating Immune Cells with CIBERSORT. In: von Stechow L, ed. *Cancer Systems Biology*. Vol 1711. Methods in Molecular Biology. Springer New York; 2018:243-259. doi:10.1007/978-1-4939-7493-1_12
173. Miao Y, Zhang Q, Lei Q, et al. ImmuCellAI: A Unique Method for Comprehensive T-Cell Subsets Abundance Prediction and its Application in Cancer Immunotherapy. *Adv Sci*. 2020;7(7):1902880. doi:10.1002/adv.201902880
174. Efremova M, Vento-Tormo M, Teichmann SA, Vento-Tormo R. CellPhoneDB: inferring cell–cell communication from combined expression of multi-subunit ligand–receptor complexes. *Nat Protoc*. 2020;15(4):1484-1506. doi:10.1038/s41596-020-0292-x
175. Chen EY, Tan CM, Kou Y, et al. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics*. 2013;14(1):128. doi:10.1186/1471-2105-14-128

176. Kuleshov MV, Jones MR, Rouillard AD, et al. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(W1):W90-W97. doi:10.1093/nar/gkw377
177. Torre D, Lachmann A, Ma'ayan A. BioJupies: Automated Generation of Interactive Notebooks for RNA-Seq Data Analysis in the Cloud. *Cell Systems.* 2018;7(5):556-561.e3. doi:10.1016/j.cels.2018.10.007
178. Metsalu T, Vilo J. ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(W1):W566-W570. doi:10.1093/nar/gkv468

Capítulo 1:

1. Baracos VE, Martin L, Korc M, Guttridge DC, Fearon KCH. Cancer-associated cachexia. *Nat Rev Dis Primer* 2018;**4**:17105.
2. Kimura M, Naito T, Kenmotsu H, Taira T, Wakuda K, Oyakawa T *et al.* Prognostic impact of cancer cachexia in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Support Care Cancer* 2015;**23**:1699–1708.
3. Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature* 2018;**553**:446–454.
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**:489–495.
5. Buckinx F, Landi F, Cesari M, Fielding RA, Visser M, Engelke K *et al.* Pitfalls in the measurement of muscle mass: a need for a reference standard: Measurement of muscle mass. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2018;**9**:269–278.
6. Prado CM, Birdsell LA, Baracos VE. The emerging role of computerized tomography in assessing cancer cachexia: *Curr Opin Support Palliat Care* 2009;**3**:269–275.
7. Swensen SJ, Jett JR, Hartman TE, Midthun DE, Sloan JA, Sykes A-M *et al.* Lung Cancer Screening with CT: Mayo Clinic Experience. *Radiology* 2003;**226**:756–761.
8. Kinsey CM, San José Estépar R, van der Velden J, Cole BF, Christiani DC, Washko GR. Lower Pectoralis Muscle Area Is Associated with a Worse Overall Survival in Non–Small Cell Lung Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2017;**26**:38–43.
9. Cury SS, de Moraes D, Freire PP, de Oliveira G, Marques DVP, Fernandez GJ *et al.* Tumor Transcriptome Reveals High Expression of IL-8 in Non-Small Cell Lung Cancer Patients with Low Pectoralis Muscle Area and Reduced Survival. *Cancers* 2019;**11**.
10. Freire PP, Fernandez GJ, Moraes D, Cury SS, Dal Pai-Silva M, Reis PP *et al.* The expression landscape of cachexia-inducing factors in human cancers. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2020;**11**:947–961.
11. Sørensen J. Lung Cancer Cachexia: Can Molecular Understanding Guide Clinical Management? *Integr Cancer Ther* 2018;**17**:1000–1008.
12. Argilés JM, Stemmler B, López-Soriano FJ, Busquets S. Inter-tissue communication in cancer cachexia. *Nat Rev Endocrinol* 2019;**15**:9–20.
13. Thorsson V, Gibbs DL, Brown SD, Wolf D, Bortone DS, Ou Yang T-H *et al.* The Immune Landscape of Cancer. *Immunity* 2018;**48**:812–830.e14.
14. Bakr S, Gevaert O, Echegaray S, Ayers K, Zhou M, Shafiq M *et al.* A radiogenomic dataset of non-small cell lung

cancer. *Sci Data* 2018;**5**:180202.

15. Gevaert O, Xu J, Hoang CD, Leung AN, Xu Y, Quon A *et al.* Non–Small Cell Lung Cancer: Identifying Prognostic Imaging Biomarkers by Leveraging Public Gene Expression Microarray Data—Methods and Preliminary Results. *Radiology* 2012;**264**:387–396.
16. Ramilowski JA, Goldberg T, Harshbarger J, Kloppmann E, Lizio M, Satagopam VP *et al.* A draft network of ligand–receptor-mediated multicellular signalling in human. *Nat Commun* 2015;**6**:7866.
17. Kim M, Mun H, Sung CO, Cho EJ, Jeon H-J, Chun S-M *et al.* Patient-derived lung cancer organoids as in vitro cancer models for therapeutic screening. *Nat Commun* 2019;**10**:3991.
18. Newman AM, Steen CB, Liu CL, Gentles AJ, Chaudhuri AA, Scherer F *et al.* Determining cell type abundance and expression from bulk tissues with digital cytometry. *Nat Biotechnol* 2019;**37**:773–782.
19. Guo X, Zhang Y, Zheng L, Zheng C, Song J, Zhang Q *et al.* Global characterization of T cells in non-small-cell lung cancer by single-cell sequencing. *Nat Med* 2018;**24**:978–985.
20. Henriques F, Lopes MA, Franco FO, Knobl P, Santos KB, Bueno LL *et al.* Toll-Like Receptor-4 Disruption Suppresses Adipose Tissue Remodeling and Increases Survival in Cancer Cachexia Syndrome. *Sci Rep* 2018;**8**:18024.
21. Beluzi M, Peres SB, Henriques FS, Sertié RAL, Franco FO, Santos KB *et al.* Pioglitazone Treatment Increases Survival and Prevents Body Weight Loss in Tumor–Bearing Animals: Possible Anti-Cachectic Effect. *PLOS ONE* 2015;**10**:e0122660.
22. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* 2001;**25**:402–408.
23. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002;**3**:research0034.1.
24. Vagnildhaug OM, Brunelli C, Hjermstad MJ, Strasser F, Baracos V, Wilcock A *et al.* A prospective study examining cachexia predictors in patients with incurable cancer. *BMC Palliat Care* 2019;**18**:46.
25. Derksen JWG, Kurk SA, Oskam MJ, Peeters PHM, Punt CJA, Koopman M *et al.* Factors Contributing to Cancer-Related Muscle Wasting During First-Line Systemic Treatment for Metastatic Colorectal Cancer. *JNCI Cancer Spectr* 2019;**3**:pkz014.
26. Underwood PW, Zhang DY, Cameron ME, Gerber MH, Delitto D, Maduka MU *et al.* Nicotine Induces IL-8 Secretion from Pancreatic Cancer Stroma and Worsens Cancer-Induced Cachexia. *Cancers* 2020;**12**:329.
27. Marhold M, Topakian T, Unseld M. Sarcopenia in cancer—a focus on elderly cancer patients. *Memo - Mag Eur Med Oncol* 2020 doi:10.1007/s12254-020-00637-6.
28. Shiono M, Huang K, Downey RJ, Consul N, Villanueva N, Beck K *et al.* An analysis of the relationship between metastases and cachexia in lung cancer patients. *Cancer Med* 2016;**5**:2641–2648.
29. Garrido P, Olmedo ME, Gómez A, Paz Ares L, López-Ríos F, Rosa-Rosa JM *et al.* Treating KRAS-mutant NSCLC: latest evidence and clinical consequences. *Ther Adv Med Oncol* 2017;**9**:589–597.
30. Armingol E, Officer A, Harismendy O, Lewis NE. Deciphering cell–cell interactions and communication from gene expression. *Nat Rev Genet* 2020 doi:10.1038/s41576-020-00292-x.
31. Seto DN, Kandarian SC, Jackman RW. A Key Role for Leukemia Inhibitory Factor in C26 Cancer Cachexia. *J Biol Chem* 2015;**290**:19976–19986.

32. Yu K, Chen B, Aran D, Charalel J, Yau C, Wolf DM *et al.* Comprehensive transcriptomic analysis of cell lines as models of primary tumors across 22 tumor types. *Nat Commun* 2019;**10**:3574.
33. Kadambi A, Mouta Carreira C, Yun CO, Padera TP, Dolmans DE, Carmeliet P *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C differentially affects tumor vascular function and leukocyte recruitment: role of VEGF-receptor 2 and host VEGF-A. *Cancer Res* 2001;**61**:2404–2408.
34. Mojic M, Takeda K, Hayakawa Y. The Dark Side of IFN- γ : Its Role in Promoting Cancer Immuno-evasion. *Int J Mol Sci* 2017;**19**.
35. Zhang Y, Huang S, Gong D, Qin Y, Shen Q. Programmed death-1 upregulation is correlated with dysfunction of tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes in human non-small cell lung cancer. *Cell Mol Immunol* 2010;**7**:389–395.
36. Raskov H, Orhan A, Christensen JP, Gögenur I. Cytotoxic CD8+ T cells in cancer and cancer immunotherapy. *Br J Cancer* 2020 doi:10.1038/s41416-020-01048-4.
37. Baazim H, Schweiger M, Moschinger M, Xu H, Scherer T, Popa A *et al.* CD8+ T cells induce cachexia during chronic viral infection. *Nat Immunol* 2019;**20**:701–710.
38. Philip M, Fairchild L, Sun L, Horste EL, Camara S, Shakiba M *et al.* Chromatin states define tumour-specific T cell dysfunction and reprogramming. *Nature* 2017;**545**:452–456.
39. Bonomi P, Fidler MJ, Shah P, Borgia J. Theoretical and Practical Implications of Treating Cachexia in Advanced Lung Cancer Patients. *Cancers* 2019;**11**:1619.
40. Haehling S, Coats AJS, Anker SD. Ethical guidelines for publishing in the *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* : update 2021. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2021;**12**:2259–2261.
- S1. Hendifar AE, Chang JI, Huang BZ, Tuli R, Wu BU. Cachexia, and not obesity, prior to pancreatic cancer diagnosis worsens survival and is negated by chemotherapy. *J Gastrointest Oncol* 2018;**9**:17–23.
- S2. Permuth JB, Clark Daly A, Jeong D, Choi JW, Cameron ME, Chen D *et al.* Racial and ethnic disparities in a state-wide registry of patients with pancreatic cancer and an exploratory investigation of cancer cachexia as a contributor to observed inequities. *Cancer Med* 2019;**8**:3314–3324.
- S3. Cardena MMSG, Ribeiro-dos-Santos Â, Santos S, Mansur AJ, Pereira AC, Fridman C. Assessment of the Relationship between Self-Declared Ethnicity, Mitochondrial Haplogroups and Genomic Ancestry in Brazilian Individuals. *PLoS ONE* 2013;**8**:e62005
- S4. Marrow H. To be or not to be (Hispanic or Latino): Brazilian Racial and Ethnic Identity in the United States. *Ethnicities* 2003;**3**:427–464.
- S5. Cao Z, Scott AM, Hoogenraad NJ, Osellame LD. Mediators and clinical treatment for cancer cachexia: a systematic review. *JCSM Rapid Commun* 2021;**4**:166–186.S6. Bayliss TJ, Smith JT, Schuster M, Dragnev KH, Rigas JR. A humanized anti-IL-6 antibody (ALD518) in non-small cell lung cancer. *Expert Opin Biol Ther* 2011;**11**:1663–1668.
- S7. Ando K, Takahashi F, Kato M, Kaneko N, Doi T, Ohe Y *et al.* Tocilizumab, a Proposed Therapy for the Cachexia of Interleukin6-Expressing Lung Cancer. *PLoS ONE* 2014;**9**:e102436
- S8. Matthys P, Heremans H, Opdenakker G, Billiau A. Anti-interferon- γ antibody treatment, growth of Lewis lung tumours in mice and tumour-associated cachexia. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1991;**27**:182–187.
- S9. Talbert EE, Guttridge DC. Emerging signaling mediators in the anorexia–cachexia syndrome of cancer. *Trends Cancer* 2022;**8**:397–403.

Capítulo 2:

1. 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;12:489–495.
2. Baracos VE, Martin L, Korc M, Guttridge DC, Fearon KCH. Cancer-associated cachexia. *Nat Rev Dis Primer* 2018;4:17105.
3. Argilés JM, Stemmler B, López-Soriano FJ, Busquets S. Inter-tissue communication in cancer cachexia. *Nat Rev Endocrinol* 2019;15:9–20.
4. Tsoli M, Robertson G. Cancer cachexia: malignant inflammation, tumorkines, and metabolic mayhem. *Trends Endocrinol Metab* 2013;24:174–183.
5. Wyart E, Bindels LB, Mina E, Menga A, Stanga S, Porporato PE. Cachexia, a Systemic Disease beyond Muscle Atrophy. *Int J Mol Sci* 2020;21:8592.
6. Webster JM, Kempen LJAP, Hardy RS, Langen RCJ. Inflammation and Skeletal Muscle Wasting During Cachexia. *Front Physiol* 2020;11:597675.
7. Barkhudaryan A, Scherbakov N, Springer J, Doehner W. Cardiac muscle wasting in individuals with cancer cachexia: Cardiac wasting in cancer. *ESC Heart Fail* 2017;4:458–467.
8. Feathers LSB, Wilcock A, Manderson C, Rgn, Weller R, Rgn et al. Measuring Inspiratory Muscle Weakness in Patients with Cancer and Breathlessness. *J Pain Symptom Manage* 2003;25:305–306.
9. Dahlman I, Mejhert N, Linder K, Agustsson T, Mutch DM, Kulyte A et al. Adipose tissue pathways involved in weight loss of cancer cachexia. *Br J Cancer* 2010;102:1541–1548.
10. Bonetto A, Aydogdu T, Kunzevitzky N, Guttridge DC, Khuri S, Koniaris LG et al. STAT3 Activation in Skeletal Muscle Links Muscle Wasting and the Acute Phase Response in Cancer Cachexia. *PLoS ONE* 2011;6:e22538.
11. Freire PP, Fernandez GJ, Moraes D, Cury SS, Dal Pai-Silva M, Reis PP et al. The expression landscape of cachexia-inducing factors in human cancers. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2020;11:947–961.
12. Raphael BJ, Hruban RH, Aguirre AJ, Moffitt RA, Yeh JJ, Stewart C et al. Integrated Genomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell* 2017;32:185-203.e13.
13. Wood LD, Hruban RH. Pathology and Molecular Genetics of Pancreatic Neoplasms: *Cancer J* 2012;18:492–501.
14. Thul PJ, Åkesson L, Wiking M, Mahdessian D, Geladaki A, Ait Blal H et al. A subcellular map of the human proteome. *Science* 2017;356:eaal3321.
15. Hébuterne X, Lemarié E, Michallet M, de Montreuil CB, Schneider SM, Goldwasser F. Prevalence of Malnutrition and Current Use of Nutrition Support in Patients With Cancer. *J Parenter Enter Nutr* 2014;38:196–204.
16. Pressoir M, Desné S, Berchery D, Rossignol G, Poiree B, Meslier M et al. Prevalence, risk factors and clinical implications of malnutrition in French Comprehensive Cancer Centres. *Br J Cancer* 2010;102:966–971.

17. Tang Z, Li C, Kang B, Gao G, Li C, Zhang Z. GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic Acids Res* 2017;45:W98–W102.
18. Malod-Dognin N, Petschnigg J, Windels SFL, Povh J, Hemingway H, Ketteler R et al. Towards a data-integrated cell. *Nat Commun* 2019;10:805.
19. Shannon P. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Res* 2003;13:2498–2504.
20. Chen B, Khodadoust MS, Liu CL, Newman AM, Alizadeh AA. Profiling Tumor Infiltrating Immune Cells with CIBERSORT. In: von Stechow L, editor. *Cancer Systems Biology*. Springer New York: New York, NY; 2018. pp. 243–259.
21. Peng J, Sun B-F, Chen C-Y, Zhou J-Y, Chen Y-S, Chen H et al. Single-cell RNA-seq highlights intra-tumoral heterogeneity and malignant progression in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cell Res* 2019;29:725–738.
22. Wang Y, Song F, Zhu J, Zhang S, Yang Y, Chen T et al. GSA: Genome Sequence Archive *. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2017;15:14–18.
23. Barretina J, Caponigro G, Stransky N, Venkatesan K, Margolin AA, Kim S et al. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 2012;483:603–607.
24. Ghandi M, Huang FW, Jané-Valbuena J, Kryukov GV, Lo CC, McDonald ER et al. Next-generation characterization of the Cancer Cell Line Encyclopedia. *Nature* 2019;569:503–508.
25. Ramilowski JA, Goldberg T, Harshbarger J, Kloppmann E, Lizio M, Satagopam VP et al. A draft network of ligand–receptor-mediated multicellular signalling in human. *Nat Commun* 2015;6:7866.
26. Gilibert M, Calvo E, Airoidi A, Hamidi T, Moutardier V, Turrini O et al. Pancreatic Cancer-Induced Cachexia Is Jak2-Dependent in Mice: Jak2-DEPENDENT CACHEXIA. *J Cell Physiol* 2014;229:1437–1443.
27. Krzywinski M, Schein J, Birol I, Connors J, Gascoyne R, Horsman D et al. Circos: An information aesthetic for comparative genomics. *Genome Res* 2009;19:1639–1645.
28. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov* 2022;12:31–46.
29. Singh SK, Singh R. Cytokines and Chemokines in Cancer Cachexia and Its Long-Term Impact on COVID-19. *Cells* 2022;11:579.
30. Callaway CS, Delitto AE, D’Lugos AC, Patel R, Nosacka RL, Delitto D et al. IL-8 Released from Human Pancreatic Cancer and Tumor-Associated Stromal Cells Signals through a CXCR2-ERK1/2 Axis to Induce Muscle Atrophy. *Cancers* 2019;11:1863.
31. Cury SS, de Moraes D, Freire PP, de Oliveira G, Marques DVP, Fernandez GJ et al. Tumor Transcriptome Reveals High Expression of IL-8 in Non-Small Cell Lung Cancer Patients with Low Pectoralis Muscle Area and Reduced Survival. *Cancers* 2019;11.
32. Hou Y-C, Wang C-J, Chao Y-J, Chen H-Y, Wang H-C, Tung H-L et al. Elevated Serum Interleukin-8 Level Correlates with Cancer-Related Cachexia and Sarcopenia: An Indicator for Pancreatic Cancer Outcomes. *J Clin Med* 2018;7:502.

33. Mace TA, Shakya R, Pitarresi JR, Swanson B, McQuinn CW, Loftus S et al. IL-6 and PD-L1 antibody blockade combination therapy reduces tumour progression in murine models of pancreatic cancer. *Gut* 2018;67:320–332.
34. Heid I, Steiger K, Trajkovic-Arsic M, Settles M, Eßwein MR, Erkan M et al. Co-clinical Assessment of Tumor Cellularity in Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res* 2017;23:1461–1470.
35. Jungmann F, Kaissis GA, Ziegelmayr S, Harder F, Schilling C, Yen H-Y et al. Prediction of Tumor Cellularity in Resectable PDAC from Preoperative Computed Tomography Imaging. *Cancers* 2021;13:2069.
36. Yao W, Maitra A, Ying H. Recent insights into the biology of pancreatic cancer. *EBioMedicine* 2020;53:102655.
37. Dougan SK. The Pancreatic Cancer Microenvironment. *Cancer J* 2017;23:321–325.
38. Gunaydin G. CAFs Interacting With TAMs in Tumor Microenvironment to Enhance Tumorigenesis and Immune Evasion. *Front Oncol* 2021;11:668349.
39. Geismann, Schäfer, Gundlach, Hauser, Egberts, Schneider et al. NF- κ B Dependent Chemokine Signaling in Pancreatic Cancer. *Cancers* 2019;11:1445.
40. Narasimhan A, Zhong X, Au EP, Ceppa EP, Nakeeb A, House MG et al. Profiling of Adipose and Skeletal Muscle in Human Pancreatic Cancer Cachexia Reveals Distinct Gene Profiles with Convergent Pathways. *Cancers* 2021;13:1975.
41. Yahiaoui L, Gvozdic D, Danialou G, Mack M, Petrof BJ. CC family chemokines directly regulate myoblast responses to skeletal muscle injury: CC chemokines regulate myoblast behaviour. *J Physiol* 2008;586:3991–4004.
42. Zeng Z, Lan T, Wei Y, Wei X. CCL5/CCR5 axis in human diseases and related treatments. *Genes Dis* 2022;9:12–27.
43. Kim DA, Park SJ, Lee JY, Kim JH, Lee S, Lee E et al. Effect of CCL11 on In Vitro Myogenesis and Its Clinical Relevance for Sarcopenia in Older Adults. *Endocrinol Metab* 2021;36:455–465.
44. Noh H-J, Kim C-S, Kang J-H, Park J-Y, Choe S-Y, Hong S-M et al. Quercetin Suppresses MIP-1 α -Induced Adipose Inflammation by Downregulating Its Receptors CCR1/CCR5 and Inhibiting Inflammatory Signaling. *J Med Food* 2014;17:550–557.
45. Gilchrist A, Echeverria SL. Targeting Chemokine Receptor CCR1 as a Potential Therapeutic Approach for Multiple Myeloma. *Front Endocrinol* 2022;13:846310.
46. Westby M, van der Ryst E. CCR5 Antagonists: Host-Targeted Antivirals for the Treatment of HIV Infection. *Antivir Chem Chemother* 2005;16:339–354.