

Rodrigo Xavier das Neves

**INFLAMAÇÃO E ALTERAÇÃO METABÓLICA NA CAQUEXIA:  
PAPEL DOS ADIPÓCITOS, DO FÍGADO E DA MODULAÇÃO  
OFERECIDA PELA MICROBIOTA INTESTINAL**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em  
Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências  
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para  
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo, SP  
2016

Rodrigo Xavier das Neves

**INFLAMAÇÃO E ALTERAÇÃO METABÓLICA NA CAQUEXIA:  
PAPEL DOS ADIPÓCITOS, DO FÍGADO E DA MODULAÇÃO  
OFERECIDA PELA MICROBIOTA INTESTINAL**

Tese apresentada ao Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Marília Cerqueira Leite Seelaender

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na biblioteca do ICB quanto na biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo, SP  
2016

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do  
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Neves, Rodrigo Xavier das.

Inflamação e alteração metabólica na caquexia: papel dos adipócitos, no fígado e da modulação oferecida pela microbiota intestinal / Rodrigo Xavier das Neves. – São Paulo, 2016.

Orientador: Profa. Dra. Marília Cerqueira Leite Seelaender.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Metabolismo do tecido adiposo associado a caquexia.

Versão do título para o Inglês: Cancer cachexia inflammation and metabolic: contribution of adipocyte, of the liver and modulation by intestinal microbiota.

1. Caquexia 2. Tecido adiposo branco 3. Inflamação 4. Microbiota  
5. Inflamassoma I. Seelaender, Profa. Dra. Marília Cerqueira Leite II.  
Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB051/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Rodrigo Xavier das Neves.

Título da Tese: Inflamação e alteração metabólica na caquexia: papel dos adipócitos, no fígado e da modulação oferecida pela microbiota intestinal.

Orientador(a): Profa. Dra. Marília Cerqueira Leite Seelaender.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

**“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.”**

*Chico Xavier*



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP: 05508-900 São Paulo, SP - Brasil  
Telefone: (55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

## CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 050 nas fls. 102 do livro 02 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Marília Cerqueira Leite Seelaender**, Coordenadora da Linha de pesquisa "*Alterações metabólicas e morfofuncionais mediadas pela atividade física e suplementação nutricional em ratos caquéticos*" do qual participam o(s) aluno(s) **Fernando de Oliveira Rosa, Rodolfo Gonzales Camargo, Henrique Quintas Ribeiro, Luana Sabetay Oliveira Levy, Renata Silvério, Patricia Esther Rocha, Luiz Carlos Carnevali, Lucas Maceratesi Enju, Felipe Fedrizzi Donatto, Michele Joana Alves, Paulo Rogério, Felipe Capel D'Ambrosio, Adriana Jaime Sbampato Assad, Marcos Pisotano, Rodrigo Xavier das Neves, Julia Laurindo Giacomini** e a pesquisadora **Anelisa Magalhães**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em 19.04.2011, com validade de 3 anos.

São Paulo, 20 de abril de 2011.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA  
Coordenador  
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER  
Secretário  
- CEUA - ICB/USP

## 1. Modification Review Submission Form (Animal Studies Only)-Version 2.0

### 1. Modification Review Submission Form

(version 1.2 2-5-2012)

#### 1.1 Protocol Number:

LEI-003-B

#### 1.2 Protocol Title:

Basic Research Protocol- Immunomodulation and Immunotherapy in naive and tumor bearing mice

#### 1.3 \* Principal Investigator Information

Principal Investigator:

Giorgio Trinchieri MD, MD

Principal Investigator E-Mail Address:

trinchig@nihd.nih.gov

Principal Investigator Building/Room/MSC:

37/4148AA/162

Principal Investigator Primary Phone Number:

301.846.1323

Principal Investigator Fax:

301-496-0734

#### 1.4 Instructions:

All changes must relate to a previously approved proposal.

#### 1.5 \* Proposal modifications include: (check all that apply)

- |  |  |  |   |
|--|--|--|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> Proposal personnel including Emergency personnel (additions/deletions) | <input type="checkbox"/> New animal requirements   | <input type="checkbox"/> Modification of experimental design, animal procedures or materials | <input type="checkbox"/> Survival Surgery |
| <input type="checkbox"/> Hazardous agents  | <input type="checkbox"/> Animal Facilities and Research Locations (including Emergency Treatment and Care) |  |   |

## 2. Key Study Personnel Changes

### 2.1 Additions/Deletions of individuals authorized to conduct procedures involving animals under this proposal:

\* Please add a Principal Investigator for the study:

If applicable, please select the Protocol Staff personnel:

A) Additional Investigators

B) Research Staff

Xavier Das Neves, Rodrigo

Other Key Research Personnel

\* Please add a Study Contact:

The Project Contact(s) will receive all important system notifications along with the Principal Investigator. (e.g. The project contact(s) are typically either the Study Coordinator or the Principal Investigator themselves).

Please select any existing Personnel you wish to remove:

### 2.2 \* If Personnel changes, are there any additions of individuals authorized to conduct proposal procedures?

- Yes  
 No  
 No selection made

### 2.3 List the names of authorized individuals (including PI, and Co-PI) who will conduct procedures involving animals under this proposal.

For individuals not proficient in performing the procedures list the name of the person who will provide their training.

Name	Procedures performed on this study (i.e. injections, breeding, CO2, euthanasia, etc.)	Experience in Performing Proposed Procedures (# of years)	If Not Proficient in Procedures, Indicate Who Will be Responsible for Training	Perform Radiation Procedures
Rodrigo Xavier Das Neves	Injections, CO2, euthanasia, oral gavage, surgery	5 years	<none>	<input type="radio"/> Yes <input checked="" type="radio"/> No <input type="radio"/> No selection made

### 3. Rationale for Modifications

#### 3.1 \* Provide rationale for the modifications:

Incoming new personnel to the lab

### 4. Submission Attachments

#### 4.1 \* Attachments include: (check all that apply)

- |   |   |  |  |
|---|---|--|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> No attachment necessary                                     | <input type="checkbox"/> Registration documents for the added use of recombinant DNA or potential human pathogens | <input type="checkbox"/> MSDS              | <input type="checkbox"/> Publication       |
| <input type="checkbox"/> IBC documentation  | <input type="checkbox"/> Relevant correspondence  | <input type="checkbox"/> IRB documentation | <input type="checkbox"/> MBTM test results |
| <input type="checkbox"/> Supporting published techniques<br>If Other, please specify:<br><none> | <input type="checkbox"/> Other approved ASP (as reference)  | <input type="checkbox"/> SOPs              | <input type="checkbox"/> Other             |

If Other, please specify:

<none>

Attach/Upload the required study documents:

No electronic document has been associated.

#### 4.2 Submission Routing Instructions:

Route to:

PI

Added Proposal Personnel (if applicable)



## **DEDICATÓRIA**

**Dedico esta Tese a todos que acreditaram que eu seria capaz de conseguir vencer mais esta batalha, em especial minha mãe Joana que sempre esteve do meu lado nos momentos que eu sempre precisei, a minha noiva Daniela que me aturou com muita paciência e amor, a minha irmã Luana que me ajudou sempre que eu precisei e ao meu pai Geraldo por todos os momentos.**

## AGRADECIMENTO

Primeiramente agradeço a Deus por te me dado saúde para poder chegar ao fim desta luta.

A Minha orientadora, Prof. Dra. Marília C L Seelaender que perdeu horas de sua vida me ensinando tanto técnicas laboratoriais quanto ser um homem comprometido com os meus compromissos e a confiança que depositou em meu trabalho.

A todos os colegas de laboratório, em especial Daniela Riccardi, Emídio Matos, Raquel Galvão, Katrin Radloff, Michele Alves, Rodolfo Camargo, Daniela Caetano e Joanna Carola, também aos não do laboratório, como Dr. Alex, Edson, Alexandre, Loreana, Dra. Patrícia e Dr. Thiago, Felipe Henriques, que ajudaram de alguma forma para a conclusão desta Tese. À Emília Ribeiro, pelo excelente suporte técnico, aos profissionais da Biblioteca que sempre estiveram à disposição para ajudar no que fosse necessário.

Aos Professores do ICB em especial o Dr. José Cesar Neto, o Dr. Willian, Dr. Emer, Dra. Alison, Dra. Edna, Dra. Marinilce e Dr. Niels e também os não associados ao ICB, como Dr. Miguel e Dr. Fábio aos demais que me ajudaram muito na minha formação como aluno e me preparando para a vida profissional.

A todos da secretaria, em especial à Regina, que sempre me orientou sobre todos os procedimentos necessários e sempre ajudou no que foi preciso durante todo o Doutorado.

Ao Professor M.D. Giorgio Thrinchieri, por me dar uma excelente oportunidade de trabalhar em seu laboratório durante 10 meses e todo o seu tempo com conversas para uma melhor compreensão do projeto. Sua equipe que foi maravilhosa, Robin, Cheryl, Ming, Sharon, Rosi, Amiran, Roy, Ernesto, Barbara, Bathay, Arsa, April and Loretta.

Ao NIH pelo apoio financeiro durante o meu estágio no exterior

A minha mãe, Joana Cele Xavier das Neves, meu pai, Geraldo Moreira das Neves, minha irmã, Luana Xavier das Neves, minha afilhada, Pietra e a minha noiva, Daniela M R Riccardi, por todos os meus bons e ruins momentos, pois sempre estiveram ao meu lado.

Aos meus avós (Francisco e Efigênia; Antônio e Laura) que nunca deixaram de torcer por mim, mesmo estando onde eles estão.

A Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro desenvolvido no Brasil e no exterior.

## RESUMO

NEVES, R X. das **Inflamação e alteração metabólica na caquexia: papel dos adipócitos, do fígado e da modulação oferecida pela microbiota intestinal.** 2016. f. 109. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A caquexia associada ao câncer é uma síndrome complexa caracterizada pela diminuição do peso corporal, depleção dos estoques de gordura, diminuição da massa muscular, anorexia, astenia e distúrbios metabólicos. Utilizando modelo animal, estudamos a participação dos adipócitos, do fígado e da microbiota intestinal para a inflamação sistêmica crônica associada aos sintomas do quadro. Os principais aspectos avaliados foram aumento dos fatores inflamatórios, alteração da via do NF- $\kappa$ B e do inflamassoma, modulação pela microbiota durante progressão da caquexia. Para verificar o comportamento dos adipócitos e do fígado utilizamos ratos Wistar macho de 8 semanas, divididos em dois grupos principais: i) controle; ii) tumor. Este último foi subdividido em 2 grupos: a) 7<sup>o</sup> e b) 14<sup>o</sup> dia após a inoculação das células tumorais do carcinoma de Walker 256, inoculadas subcutaneamente ( $2 \times 10^7$  de células em 1,0 mL). Para avaliar o comportamento da microbiota durante o quadro de caquexia utilizamos camundongos C57Bl/6, convencionais e *Germ free* de 8-10 semanas, os quais dividimos em quatro grupos: i) Convencional controle; ii) *Germ Free* controle; iii) Convencional tumor; iv) *Germ Free* tumor. A linhagem tumoral usada para esse modelo foi Lewis Lung Carcinoma (LLC), inoculadas subcutaneamente ( $4 \times 10^6$  de células em 0,2 mL). Houve uma indução da via inflamassoma na fase terminal da caquexia e com aumento da expressão proteica de IL-1 $\beta$  clivada tanto local, adipócitos isolados do tecido adiposo branco (TAB) mesentérico (MEa) e fígado, quanto sistêmica. Quanto à relação da microbiota com a caquexia, observamos que a doença é exacerbada nos camundongos *Germ Free*, pois verificamos que a via da lipólise está mais ativa no tecido adiposo epididimal, comparado aos camundongos do grupo convencional tumor. Em conclusão, os adipócitos isolados do TAB mesentérico e o fígado desempenham um papel importante no estabelecimento da inflamação, por meio de ativação das vias do NF- $\kappa$ B e do inflamassoma enquanto; que a simbiose a integridade da microbiota parece ser essencial para combater a redução do tecido adiposo imposta pela caquexia.

**Palavras-chave:** Caquexia. Tecido adiposo branco. Inflamação. Microbiota. Inflamassoma.

## ABSTRACT

NEVES, R X. das **Cancer cachexia inflammation and metabolic: contribution of adipocyte, of the liver and modulation by intestinal microbiota.** 2016. p. 109. PhD Thesis (Tissue and Celular Biology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Cancer-cachexia is a complex syndrome characterized by decreased body weight, depletion of fat stores, decreased muscle mass, anorexia, asthenia and metabolic disorders. Employing animal models, we studied the role of adipocytes and liver inflammation and what would be the role of microbiota along the progression of cachexia associated with cancer. The main aspects evaluated were inflammation, modulation of NF- $\kappa$ B and the inflammasome, and importance of the microbiota during the progression of cachexia. To asses the contribution of adipocytes and the liver. Eight weeks-old male rats, divided into two main groups: i) control; ii) tumor were studied. The latter was divided into 2 groups: a) 7<sup>o</sup> and b) 14<sup>o</sup> day after tumor cell inoculation Walker 256, which was injected subcutaneously ( $2 \times 10^7$  cells in 1.0 mL). To assess microbial relevance during the development of cachexia, C57BL/6 conventional mice and Germ Free 8-10 weeks, were studied and divided into four groups: i) Conventional control; ii) Germ Free control; iii) Conventional tumor; iv) Germ Free tumor. The tumor cell lineage employed in this model was the Lewis Lung Carcinoma (LLC), which was injected subcutaneously ( $4 \times 10^6$  cells in 0.2 mL). Adipocytes isolated from white adipose tissue mesentericTAB, mesenteric and the liver, showed inflammasome active in the terminal phase of cachexia, when an increase in expression of cleaved IL-1 $\beta$  protein was observed. As for the relationship of the microbiota with cachexia, the establishment of the syndrome was quickly in the Germ Free mice, as lipolysis was more active in epididymal adipose tissue compared to conventional tumor mice. In conclusion, adipocytes isolated from the mesenteric depot and liver seem to play a relevant role in the establishment of inflammation, through the activation of the NF- $\kappa$ B and inflammasome pathways. Microbiota integrity seems to be essential for preventing adipose tissue of lipolysis generated by cancer-cachexia.

**Keywords:** Cachexia. White adipose tissue. Inflammation. Microbiota. Inflammasome.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Estágios da caquexia associada ao câncer.....	19
<b>Figura 2</b> – Ligação e subsequente ativação da via do inflamassoma por amiloide e agregado de proteínas mal formadas.....	24
<b>Figura 3</b> – Expressão gênica e proteica de citocinas inflamatórias no tecido adiposo branco durante a progressão da caquexia.....	41
<b>Figura 4</b> – Expressão gênica e proteica de citocinas inflamatórias em células adiposas isoladas durante a progressão da caquexia.....	43
<b>Figura 5</b> – Expressão gênica dos fatores de transcrição envolvidos na vias inflamatórias em células adiposas isoladas durante a progressão da caquexia.....	43
<b>Figura 6</b> – Expressão de citocinas inflamatórias no fígado durante a progressão da caquexia.....	45
<b>Figura 7</b> – Expressão gênica da via do inflamassoma em células adiposas isoladas durante a progressão da caquexia.....	46
<b>Figura 8</b> – Expressão de citocinas inflamatórias no fígado durante a progressão da caquexia.....	47
<b>Figura 9</b> – Imunohistoquímica para CD68.....	47
<b>Figura 10</b> – Expressão gênica dos fatores de transcrição envolvidos na via inflamatória no fígado durante a progressão da caquexia.....	48
<b>Figura 11</b> – Expressão proteica de fatores inflamatórios no fígado durante a progressão da caquexia.....	49
<b>Figura 11</b> – Expressão gênica da via do inflamassoma em células adiposas isoladas durante a progressão da caquexia.....	47
<b>Figura 12</b> – Expressão gênica da via do inflamassoma no fígado durante a progressão da caquexia.....	50
<b>Figura 13</b> – IL-1 $\beta$ sérica durante na fase terminal da caquexia.....	51
<b>Figura 14</b> – Perda de peso e peso dos tecidos dos grupos Convencionais e <i>Germ Free</i> , com e sem caquexia.....	52
<b>Figura 15</b> – Expressão gênica no TAB epididimal, durante a progressão da caquexia.....	50
<b>Figura 16</b> – Imunohistoquímica para UCP-1.....	53
<b>Figura 17</b> – Expressão proteica de proteínas da via da lipólise no TAB epididimal, durante a progressão da caquexia.....	54

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Lista de <i>Primers</i> .....	33
<b>Tabela 2</b> – Peso corporal e dos tecidos dos grupos Controle (C) e Caquéticos (TB).....	40
<b>Tabela 3</b> – Perfil lipídico durante a progressão da caquexia.....	40

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC: Acetil-CoA Carboxilase  
CEBP  $\alpha$ : CCAAT-Enhancer Binding Protein Alpha  
CPT: Carnetina Palmiotransferase  
FABP: Proteína Ligadora de Ácido Graxo  
FAS: Ácido Graxo Sintase  
HSL: Lípase de Hormônio Sensivo  
IL-1: Interleucina 1  
IL-10: Interleucina 10  
IL-1 $\beta$ : Interleucina 1 beta  
IL-6: Interleucina 6  
IL-8: Interleucina 8  
INF- $\gamma$ : Interferon gamma  
JNK: Jun-Kinase  
LPL: Lípase Lipoproteica  
MAPK: Mitogen activated Protein Kinase  
MCP-1: Monocyte Chemotactic Protein  
MIF: Fator Mobilizador de Lipídios  
mRNA: Ácido Ribonucleico Mensageiro  
TAG: Triacilglicerol  
PIF: Fator indutor de Proteólise  
PPAR  $\gamma$ : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma  
SDC-1: Esteroil CoA Desaturase 1  
SREBP 1C: Sterol Regulatory Element Binding Protein  
TAB: Tecido Adiposo Branco  
TAE: Tecido Adiposo Epididimal  
TAM: Tecido Adiposo Marrom  
TAME: Tecido Adiposo Mesentérico  
TARP: Tecido Adiposo Retroperitoneal  
TNFR1: Receptor Fator de Necrose Tumoral  
TNF- $\alpha$ : Fator de Necrose Tumoral Alfa

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	18
1.1 Apresentação da tese.....	18
Parte I.....	18
1.2 Caquexia associada ao câncer.....	18
1.3 Caquexia e resposta do hospedeiro.....	20
1.4 Vias inflamatórias.....	22
Parte II.....	25
1.5 O estudo da microbiota e a relação com o desenvolvimento da caquexia associada ao câncer.....	25
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	28
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	29
3.1 Geral.....	29
3.2 Específicos.....	29
<b>4 MATERIAL E MÉTODO</b> .....	30
4.1 Determinação gerais.....	30
4.1.1 <i>Animais</i> .....	30
4.1.2 <i>Desenho experimental</i> .....	30
4.1.3 <i>Inoculação do tumor Walker 256</i> .....	30
4.1.4 <i>Obtenção do soro</i> .....	30
4.2 Análises bioquímicas.....	31
4.2.1 <i>Determinações séricas</i> .....	31
4.3 Análise histológica.....	31
4.3.1 <i>Obtenção e processamento do tecido</i> .....	31
4.4 Isolamento de células adiposas.....	31
4.5 Análise da expressão gênica por qRT-PCR.....	32
4.5.1 <i>Extração do RNA total</i> .....	32
4.5.2 <i>Reação de transcrição reversa (RT)</i> .....	32
4.5.3 <i>Seleção dos primers</i> .....	32
4.5.4 <i>Reação em cadeia polimerase em tempo real (qRT-PCR)</i> .....	34
4.6 Análise da expressão protéica – <i>Western blotting</i> .....	34
4.6.1 <i>Extração proteica</i> .....	34
4.6.2 <i>Eletroforese SDS-PAGE</i> .....	35
4.6.3 <i>Transferência</i> .....	35
4.6.4 <i>Bloqueio e incubação</i> .....	35
4.6.5 <i>Exposição e desenvolvimento do filme</i> .....	36
4.7 Enzyme-linked immunoabsorbent assay ( <i>ELISA</i> ).....	36
4.8 Parte II – Referente ao estudo da microbiota.....	36
4.8.1 <i>Animais</i> .....	36
4.8.2 <i>Desenho experimental e implantação das células tumorais</i> .....	37
4.8.3 <i>Variação do peso corporal e obtenção dos tecidos</i> .....	37



4.9 Análise histológica.....	37
4.9.1 Obtenção e processamento do tecido.....	37
4.9.2 Desparafinização/Hidratação.....	38
4.9.3 Hematoxilina e Eosina (H&E).....	38
4.9.4 Imunohistoquímica.....	38
4.9.5 Análise das imagens.....	38
4.10 qPCR RT e Western blot.....	38
4.11 Análise estatística.....	39
<b>5 RESULTADOS</b> .....	40
5.1 Parâmetros de validação da caquexia.....	40
5.2 Inflamação durante a caquexia associada ao câncer.....	40
5.3 Estudo dos adipócitos durante o desenvolvimento da caquexia associada ao câncer.....	42
5.4 Estudo do fígado durante o desenvolvimento da caquexia associada ao câncer.....	46
5.5 Contribuição do tecido adiposo e fígado para o desenvolvimento da caquexia associada ao câncer.....	51
5.6 Resultado do estudo da microbiota.....	
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	55
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	61
REFERÊNCIAS*.....	62
ANEXO 1 – Artigo publicado.....	72
ANEXO 2 – Artigo enviado a publicação.....	84

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Apresentação da tese

A tese está elaborada em dois capítulos. O primeiro é composto por resultados realizados no Brasil, sob a orientação da Professora Dra. Marília Seelaender; parte desses resultados publicamos em artigo (Anexo-1) (*Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle - White adipose tissue cells and the progression of cachexia: Inflammatory pathways*); da outra parte dos resultados, escrevemos um segundo artigo “Cachexia causes time-dependent activation of the inflammasome in the liver”, que foi enviado para publicação. O segundo capítulo da tese é composto por resultados obtidos nos Estados Unidos da América, em colaboração com o Professor M. D. Giorgio Trinchieri, atualmente, diretor do programa “Cancer and inflammation Program” no “National Health Institute” (NCI-NIH). Nesse estudo, abordamos a modulação exercida pela microbiota ao longo da progressão da caquexia associada ao câncer com enfoque no tecido adiposo.

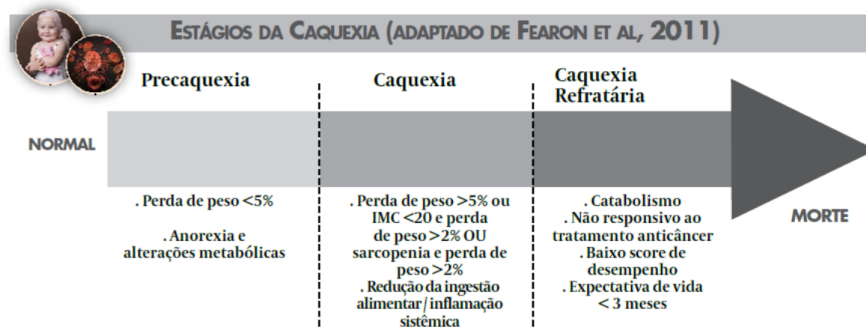
## Parte I

## 1.2 Caquexia associada ao câncer

A palavra caquexia tem origem grega: “*kakos*” significa má e “*hexis*” significa condição (TISDALE, 1997). Este quadro foi descrito há mais de 2.000 anos, sendo evidente em alguns tipos de cânceres, não estando, contudo, restrito somente a essa doença. A caquexia aparece associada à síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), aos grandes traumas, às moléstias digestivas, à insuficiência renal, à doença respiratória, à artrite reumatoide, à insuficiência cardíaca, entre outras (TISDALE, 1997; TODOROV et al., 1996; ZEYDA e STULNIG, 2007).

Trata-se de uma síndrome de etiologia complexa e causa desconhecida, que está associada à redução de efeitos terapêuticos, como quimioterapia e radioterapia, e à qualidade de vida (ARGILÉS et al., 2010; TISDALE et al., 1996). Os principais sintomas são diminuição do peso corporal, com depleção do TAB e do músculo estriado esquelético, além da redução do apetite e da albumina sérica, aumento dos níveis de citocinas inflamatórias, alterações do perfil lipídico e incremento constante da proteína C-reativa no soro (EVANS et al., 2008; TISDALE, 1997).

Recentemente, propôs-se que a síndrome da caquexia seja dividida em três estágios (pré-caquexia, caquexia e caquexia refratária); o primeiro estágio é descrito por alterações metabólicas e redução da massa corporal (<5%), enquanto, no segundo estágio, o paciente é diagnosticado com redução de 5% ou mais da massa corporal, seguido por anorexia e inflamação sistêmica. No último estágio, o paciente não responde mais aos tratamentos anticâncer e a expectativa de vida não excede mais que 3 meses (FEARON et al., 2011; MUSCARITOLI et al., 2010). A figura 1 explica como são definidas as fases da caquexia.



**Figura 1-** Estágios da Caquexia associada ao câncer. Fonte: Consenso Brasileiro de Caquexia e Anorexia (2011).

A redução da massa corpórea é considerada como o principal marcador clínico para a caquexia. No entanto, para o diagnóstico mais preciso, outros sinais devem ser considerados, tais como marcadores bioquímicos plasmáticos (hipertrigliceremia, hipercolesterolemia e aumento de citocinas pró-inflamatórias), anorexia e anemia (ARGILÉS; ALVAREZ; LÓPEZ-SORIANO, 1997; FEARON; MOSES, 2002; INUI, 2002). Sugere-se, ainda, que a caquexia esteja relacionada com o consumo e o gasto de energia, pois pacientes com câncer relatam saciedade durante o desenvolvimento da caquexia, diminuindo seu consumo energético (TISDALE, 1997). Em modelos animais de caquexia induzida por tumor, em geral, os animais tornam-se anoréxicos somente no período terminal (BING; TRAYHURN, 2008). Entretanto, a perda de massa corporal de animais caquéticos não pode ser explicada somente pela redução do apetite (BING et al., 2000).

Muitos pesquisadores propõem que, na etiologia e na progressão do quadro de caquexia (ARGILÉS et al., 2003, 2005), há desequilíbrio homeostático de fatores pró-caquéticos no organismo (fator de necrose tumoral- $\alpha$  – TNF- $\alpha$ ; interleucina-6 – IL-6; interleucina-1 – IL-1 $\beta$ , interferon- $\gamma$  – INF- $\gamma$ ; fator neurotrófico ciliar; fator inibitório de leucemia) e anticaquéticos (receptor solúvel de TNF- $\alpha$  – sTNFR; receptor solúvel de IL-6 – sIL-6R; receptor antagonista da IL-1 – IL-1ra; IL-4; IL-10; IL-15), em concomitância à presença de produtos secretados pelo tumor. Entre estes, estão o Fator Mobilizador de

Lipídios (LMF), que atua na lipólise do tecido adiposo branco, e o Fator Indutor de Proteólise (PIF), que gera a degradação proteica exacerbada. Consequentemente, tanto o organismo hospedeiro como o tumor contribuem para a progressão da síndrome (TISDALE, 2005).

### 1.3 Caquexia e resposta do organismo

Como visto, a relação do hospedeiro e do tumor na progressão da caquexia associada ao câncer pressupõe que os vários compartimentos do organismo não são apenas alvos da síndrome, mas sim importantes contribuintes para sua progressão. Um compartimento em especial parece ter relevante papel: o tecido adiposo branco (TAB). Nos últimos anos, esse tecido tem sido associado à secreção de grande gama de peptídeos com propriedades inflamatórias (BATISTA, M. L. et al., 2012; NEVES et al., 2015).

Atualmente, sabe-se que o TAB apresenta uma variedade de funções, tal como secreção de adipocinas, as quais podem influenciar diretamente o quadro da obesidade e conduzir ao quadro de diabete Mellitus tipo 2 e/ou aterosclerose (SKURK et al., 2005).

Tradicionalmente, o TAB era considerado apenas um sítio de estoque de lipídios e, conseqüentemente, de reserva energética. A partir de 2004, com a descoberta da leptina pelo grupo do Dr. Friedman, da Universidade Columbia de Nova York (ZHANG et al., 1994), e da adiponectina, em 1995 (SCHERER et al., 1995), ambas conhecidas como adipocinas, o TAB passou a ser considerado um órgão endócrino, com capacidade não só de secretar as adipocinas supracitadas, mas também de expressar resistina, TNF, IL-6, IL-10, IL-1b, IL-1a, entre outras diversas citocinas e quimiocinas (BERG; COMBS; SCHERER, 2002; BING et al., 2004). As adipocinas, além de regularem o metabolismo do adipócito, também possuem ação endócrina e auxiliam na regulação da homeostase energética e de diversos parâmetros fisiológicos (BERG; COMBS; SCHERER, 2002; BING et al., 2004).

Em pacientes obesos, foi observado aumento na circulação sanguínea da proteína MCP-1 (proteína-1 quimioatraente de monócito) (BRUUN et al., 2005). Este quimioatraente tem como função recrutar monócitos para o sítio de inflamação. Em outro estudo, também realizado com pacientes obesos, verificou-se que o TAB era capaz de grande expressão do gene MCP-1 e que a mesma estava correlacionada positivamente com o aumento do número de macrófagos infiltrados no tecido (WEISBERG et al., 2003).

A composição do TAB não é restrita às células adiposas, mas também inclui células imunológicas, que compõem a fração vascular estromal (FVE), além de nervos e vasos (HAUSMAN et al., 2001). A relevância e a proporção relativa dessas populações celulares são variáveis, de acordo com o sítio anatômico de depósito adiposo analisado

(DIGIROLAMO et al., 1998; DIGIROLAMO; FINE, 2001; HAUSMAN et al., 2001; HAUSMAN et al., 2003). Estudos publicados pelo nosso grupo, realizados em modelos animais, relatam diferenças entre os depósitos viscerais (características morfológicas e bioquímicas) durante a progressão da síndrome de caquexia (BATISTA, M. L., Jr. et al., 2012; MACHADO; COSTA ROSA; SEELAENDER, 2004).

Dois importantes processos no TAB durante a vigência da caquexia têm sido alvo de interesse: a lipólise e o *browning*. A lipólise é processo no qual enzimas denominadas lipolíticas “removem” ácidos graxos da gotícula lipídica por meio da quebra do triacilglicerol (LASS, 2011). As principais enzimas envolvidas nesse processo são a lipase do tecido adiposo (ATGL), a lipase hormônio sensível (HSL) e a lipase monoacilglicerol (MGL), que são estimuladas pela ligação de fatores a receptores de membrana, como o receptor adrenérgico beta, então fosforiladas e em sequência, ativadas, iniciando o processo de quebra do triacilglicerol em ácidos graxos livres. Por sua vez, o *browning* é um processo distinto, que induz o perfil de adipócitos marrom, com indução de proteínas típicas do mesmo, como UCP-1, PGC-1 $\alpha$ , PPAR $\alpha$ , CIDEA, entre outros (PORPORATO, 2016). Ambos os processos estão relacionados com a redução do TAB na progressão da caquexia (AGUSTSSON et al., 2007; BING; TRAYHURN, 2009; KIR et al., 2016).

Outro órgão com capacidade de induzir e manter a inflamação sistêmica durante o quadro de caquexia é o fígado (MARTIGNONI et al., 2009). O fígado é a maior glândula e o segundo maior órgão do corpo humano, apresentando papel importante no organismo, como órgão central no controle de vias metabólicas. O fígado age também como um depósito, armazenando água, ferro, cobre e as vitaminas A, D e complexo B (MADRIGAL-MATUTE; CUERVO, 2016). Uma das mais relevantes proteínas secretadas pelo fígado, na fisiologia, e cuja redução é marcador importante no diagnóstico de caquexia associada ao câncer, é a albumina (EVANS et al., 2008).

Estudos têm mostrado que a redução da albumina está correlacionada com o surgimento da caquexia em pacientes com câncer (CAMARGO et al., 2015). Durante a caquexia associada ao câncer, o fígado contribui para progressão da doença, tornando-se incapaz de sanar o desequilíbrio energético imposto pelo ciclo de Cori frente à incapacidade hepática do organismo caquético em realizar processos oxidativos (SEELAENDER et al., 1996). Ademais, o fígado, na vigência da síndrome, secreta fatores inflamatórios, como citocinas e eicosanoides (SEELAENDER et al., 1996; DUMAS et al., 2011; KAZANTZIS; SEELAENDER, 2005; MARTIGNONI et al., 2009; NARSALE et al., 2015).

As principais células presentes no fígado são hepatócitos, células epiteliais biliares, células sinusoidais e células do sistema imunológico. As células imunológicas são representadas, principalmente, pelos macrófagos residentes, conhecidos como células de Kupffer, que somam por volta de 10% do total de células hepáticas (SEELAENDER; KAZANTZIS; COSTA ROSA, 1999). De acordo com (MARTIGNONI et al., 2009), foi observado que a proteína CD68, uma proteína importante para reconhecimento das células da linhagem mieloide (macrófago, monócitos e células dendríticas), está aumentada no fígado de pacientes caquéticos associado ao câncer, comparado aos não caquéticos; tal achado esteve correlacionado com a maior agressividade do tumor.

#### 1.4 vias inflamatórias

Uma vez que é incontestável, na literatura, que a caquexia esteja associada com a inflamação sistêmica crônica, iremos discutir as vias participantes no processo inflamatório durante o quadro de caquexia associada ao câncer.

As citocinas, como TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , entre outras, apresentam indução de síntese através da atividade da via do *Nuclear factor of Kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1* (NF- $\kappa$ B). Descrito em 1986 em linfócitos B, a via do fator de transcrição NF- $\kappa$ B está presente em muitas diferentes células do organismo, não estando restrita somente às células do sistema imunológico (BAEUERLE; BALTIMORE, 1996). Muitos estudos têm relatado a superativação da via em doenças como obesidade, diabetes e câncer (BATISTA, M. L. et al., 2012; NEVES et al., 2015; RIUS et al., 2008; YIN, PENG, et al., 2014).

O complexo proteico NF- $\kappa$ B é composto por 5 proteínas: p65 (RelA), p50, p52, c-Rel e RelB (RIUS et al., 2008). O homo ou heterodímero deixa o citoplasma, em direção ao núcleo, onde se liga em região alvo no DNA. A forma mais estudada de ligação ao DNA é o heterodímero p65-p50, que desencadeia a síntese de citocinas ou quimiocinas pró-inflamatórias (BAEUERLE; BALTIMORE, 1996; MOHAMED; MCFADDEN, 2009; WANG; CASSIDY, 2003). No entanto, um estudo mostra que o heterodímero p50-p52, ao ligar-se ao DNA no mesmo sítio de ligação do heterodímero p65-p50, é capaz de inibir a atividade do mesmo (NOLAN et al., 1993). As proteínas p50 e p52 são sintetizadas como moléculas precursoras inativas, p100 e p105, respectivamente (NOLAN et al., 1993).

A translocação do heterodímero p65-p50 do citoplasma para o núcleo ocorre quando o complexo inibitório ligado ao heterodímero no citoplasma é fosforilado, consequentemente recebendo a adição de ubiquitina e sendo conduzido à degradação no proteassomo 26S (MAGNANI et al., 2000). O complexo inibitório é formado pela família do *nuclear factor of*

*kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor* (I $\kappa$ B $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\epsilon$ ) e é fosforilado pela quinase *Chuk conservada hélice-laço-hélice de quinase ubíqua* (IKK), quando um estímulo é transduzido a ele (BATISTA, M. L. et al., 2012; MAGNANI et al., 2000).

O estímulo para a ativação da via do NF- $\kappa$ B pode ser por fator extra ou intracelular. Os receptores da família *Toll like receptor* (TLR) podem desencadear essa ativação (MITCHELL; VARGAS; HOFFMANN, 2016). Por exemplo: o TLR4, ao receber a ligação de lipossacarídeo em sua porção extracelular, gera sinais intracelulares que desencadeiam a ativação de segundos mensageiros, *TNF receptor associated factor* (TRAF6) e *Myeloid differentiation primary response gene 88* (MYD88); em seguida, a mensagem é transduzida à quinase *inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase* (IKK) e, conseqüentemente, ocorre a liberação do heterodímero p65-p50 para translocação nuclear e ligação no DNA (MITCHELL; VARGAS; HOFFMANN, 2016; VERSTREPEN et al., 2008;). No entanto, o estímulo pode ocorrer também por ativação intracelular; por exemplo, os TLR7 e 9, quando estimulados por RNA ou DNA viral, respectivamente, induzem segundos mensageiros da via de ativação do TLR4, como o recrutamento das proteínas, TRAF6 e MYD88, ativadoras da quinase IKK (BERNARD; O'NEILL, 2013; KRIEG, 2002; SUZUKI; SAITO, 2006).

Estudos em pacientes obesos mostram aumento da atividade da via do NF- $\kappa$ B em tecido adiposo e, conseqüentemente, inflamação local (GUILHERME et al., 2008). Nosso grupo tem relatado que a atividade da via do NF- $\kappa$ B, no tecido adiposo branco de pacientes caquéticos associados ao câncer ou em células adiposas isoladas de ratos com caquexia, apresenta-se elevada (BATISTA, M. L. et al., 2012; BATISTA et al., 2013; CAMARGO et al., 2015; NEVES et al., 2015).

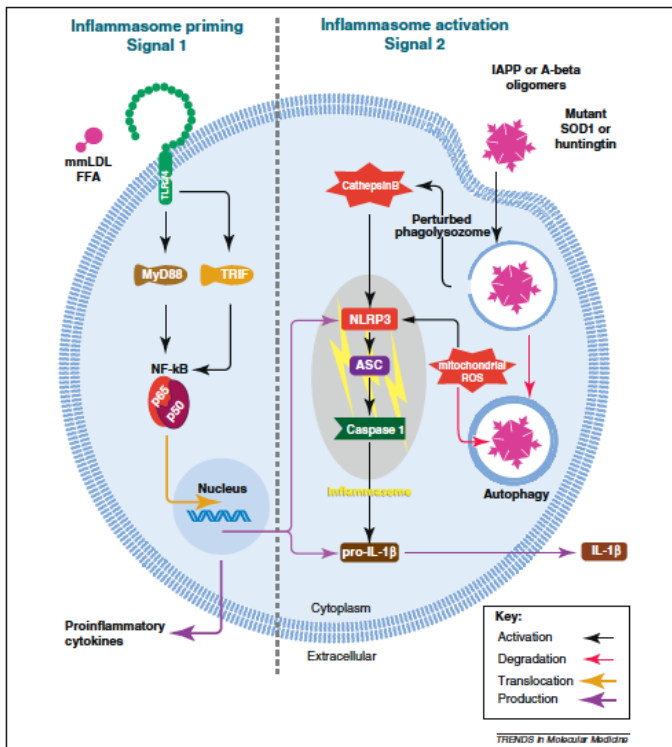
Recentemente, foi descrita uma família de receptores da imunidade inata que tem ganhado muita atenção no estudo das doenças inflamatórias. Trata-se da família do complexo inflamassoma, conhecida como *Nod Like Receptors* (NLR), pois algumas citocinas necessitam, além da transcrição e da tradução, passar por passo de ativação, por meio da clivagem em regiões específicas, permitindo-lhes desenvolver sua capacidade de modulação biológica (JO et al., 2016; LAPPAS, 2014). A clivagem das citocinas, por exemplo, de IL-1 $\beta$  e IL-18, somente ocorre quando o complexo do inflamassoma é ativo (JO et al., 2016). Diferentemente dos receptores TLR, os NLR consistem em proteínas solúveis que são encontradas no citoplasma e sinalizam em resposta a patógenos intracelulares (GUO; CALLAWAY; TING, 2015).

O inflamassoma é composto por dois compartimentos proteicos, o NOD-like receptor (NLR) family (NLRP1, NLRP2, NLRP3, NLRP6, NLRC4, and NLRP12) e o *haematopoietic*

*interferon-inducible nuclear antigens domain-containing protein* (PYHIN) family (SCHRODER; TSCHOPP, 2010). Sua principal função é ativar as citocinas inflamatórias pré-maduras, IL-1 $\beta$  e IL-18, nas formas maduras. Após a ativação, as mesmas são secretadas, tanto local quanto sistemicamente (LAPPAS, 2014; LATZ, 2010).

Entre as proteínas do complexo inflamassoma, o NLRP3 é o mais bem estudado, devido à sua associação com importantes doenças metabólicas e inflamatórias crônicas, tais como Alzheimer, diabetes e obesidade (WEN; TING; O'NEILL, 2012). Considera-se que a ativação do NLRP3 seja gerada por perturbações no citoplasma, que podem ser causadas por *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP), tais como LPS, RNA bacteriano e viral, ou por *damage-associated molecular patterns* (DAMP), tais como ATP extracelular, cristais de ácido úrico ou de colesterol, hiperglicemia, amianto, sílica, asbesto e radiação UV (MARTINON; MAYOR; TSCHOPP, 2009). Em estudos realizados com modelos *knockout* tanto para NLRP3 quanto para Caspase-1, os camundongos mostraram-se resistentes a desenvolver obesidade e resistência à insulina, quando submetidos à dieta rica em gordura (STIENSTRA et al., 2010; VANDANMAGSAR et al., 2011).

A figura 2 ilustra os passos de ativação da via do NF- $\kappa$ B e do inflamassoma na produção de IL-1 $\beta$  total (pré-madura) e sua ativação (madura).



**Figura 2-** Ligação e subsequente ativação da via do inflamassoma por amiloide e agregado de proteínas mal formadas.

Nota fonte: Disease-associated amyloid and misfolded protein aggregates activate the inflammasome Seth L. Masters & Luke A.J. O'Neill. Trends in Molecular Medicine. Volume 17, Issue 5, May 2011, Pages 276–282.



## Parte II

### 1.5 A microbiota na caquexia associada ao câncer

O trato gastrointestinal (TGI) pode ser considerado um ecossistema extremamente complexo, sendo composto por grande diversidade de espécie que apresentam diferentes funções no hospedeiro humano. No entanto, a microbiota não está presente somente no TGI, ela pode ser encontrada também nas cavidades oral e nasal, além de cabelo, olhos, vagina, pulmão, pele, pavilhão auricular, etc. (PENDERS et al., 2006). A microbiota do TGI é a mais amplamente estudada, devido à importância no papel de proteção, ao constituir-se como importante barreira contra micro-organismo patogênicos, ao participar do metabolismo de carboidratos, ao produzir nutrientes e, ainda, ao estar diretamente envolvida na modulação do sistema imune (BÖRNIGEN et al., 2013; MARCOBAL et al., 2013). A microbiota é composta por cepas de bactérias, podendo ser consideradas saudáveis (simbióticas) ou patogênicas (disbióticas) (PENDERS et al., 2006).

O microbioma é o meio ambiente ocupado pela microbiota no qual encontramos produtos e metabólitos produzidos pela mesma, como também produtos e metabólitos produzidos pelo hospedeiro (WHITESIDE et al., 2015). O microbioma é extremamente sensível a influências externas, sendo facilmente modulado. Estudo mostra que o tratamento com antibióticos afeta mais de 87% dos metabólitos produzidos e desestabiliza importantes vias na fisiologia do hospedeiro (CANI et al., 2008).

Tradicionalmente, é largamente aceito que o desenvolvimento da microbiota intestinal tem início no parto; por isso, aqueles indivíduos que nasceram de parto normal apresentam microbiota diferente dos que nasceram por cesariana (BRUMBAUGH et al., 2016). As primeiras bactérias que colonizam o intestino do recém-nascido são aquelas provenientes do canal vaginal e do períneo da mãe; a maioria dessas bactérias é anaeróbia, diferentemente do encontrado nos partos realizados por cesáreas, nos quais a microbiota é caracterizada por microrganismos aerófilos, provenientes do ambiente e dos profissionais da área de saúde (BRUMBAUGH et al., 2016; MUELLER et al., 2016).

Na microbiota do recém-nascido sob aleitamento materno, há grande predomínio de bifidobactérias e lactobacilos (> 90%), havendo pequena quantidade de espécies bacterianas potencialmente patogênicas (ANDREAS; KAMPMANN; MEHRING LE-DOARE, 2015). O leite humano é um dos principais fatores para a iniciação e o desenvolvimento da microbiota intestinal, por representar uma fonte contínua de substrato aos microrganismos por várias semanas após o nascimento. Além desse benefício, o leite humano contém prebióticos que

auxiliam no crescimento de grupos, selecionados de bactérias consideradas saudáveis (ANDREAS; KAMPMANN; MEHRING LE-DOARE, 2015; LIU et al., 2016).

Apesar de a microbiota ser considerada madura quando a criança atinge os seus 8-10 anos, ela ainda pode ser alterada por fatores externos, como alimentação, doenças, meio ambiente, etc. (ACTIS, 2014; TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ et al., 2004;). A microbiota de animais transgênicos (ob/ob) com capacidade de desenvolver obesidade apresenta-se diferente daquela de animais controles (RABOT et al., 2010). Estudos, realizados com camundongos *wild type* submetidos à dieta rica em lipídeos, mostraram composição da microbiota diferente de quando se iniciou a dieta (RABOT et al., 2010). Para enfatizar o quanto a microbiota é essencial para o desencadeamento da obesidade, foi realizado um estudo em que animais livres da microbiota submetidos à mesma dieta rica em lipídeos não apresentaram sobrepeso após 16 semanas de tratamento indutor da doença, enquanto o controle ganhava peso a cada semana (DING et al., 2010).

A relação entre microbiota e doença não acontece somente na obesidade, mas também, por exemplo, no desenvolvimento do diabetes (TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ et al., 2004). Camundongos livres de microbiota apresentam melhor sensibilidade à insulina, tanto quando tratados com dieta normal, quanto quando tratados com dieta rica em lipídeos (RABOT et al., 2010). A microbiota mostra-se também essencial no tratamento de câncer, pois um estudo recente mostrou que animais com câncer tratados com antibióticos não respondem ao tratamento quimioterápico (cisplatina), enquanto a redução da massa tumoral nos animais controle não é encontrada nos animais tratados com antibiótico (IIDA et al., 2013).

Existem poucos estudos sobre a composição da microbiota em modelos de caquexia associada ao câncer; embora alguns estudos relatem que durante a progressão da caquexia acontecem alterações nas junções epiteliais da parede do intestino, permitindo a translocação bacteriana para o sangue e os órgãos específicos, como linfonodos (JIANG et al., 2014). Pouco se sabe sobre a participação dessas bactérias na contribuição ou na amenização da progressão do quadro de caquexia. Em pacientes com caquexia associada ao câncer gastrointestinal, relatou-se redução das proteínas ocludinas e claudinas presentes nas junções epiteliais e tal redução teve como consequência a maior permeabilização (JIANG et al., 2014). Nesse mesmo estudo, foi verificado que os pacientes sem e com caquexia sofrem translocação bacteriana no soro e nos linfonodos mesentéricos; no entanto, nos pacientes caquéticos, essa translocação aconteceu em maior número e diversidade de bactérias.

A microbiota está, assim, estreitamente relacionada com a modulação das células do sistema imune, podendo ativar ou inibir um grupo específico de linfócitos T regulatórios ou

até mesmo modular a ativação das células dendríticas (BENGMARK, 2013). Estudos realizados em pacientes caquéticos mostraram que, durante a translocação bacteriana, há aumento das citocinas pró-inflamatórias séricas, como IL-6, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ , comparado aos indivíduos não caquéticos (VARIAN et al., 2016).

O grande desafio no estudo da microbiota em pacientes caquéticos é restabelecer a simbiose como forma terapêutica no combate da caquexia, uma vez alterada durante a progressão do quadro. Como discutido, a translocação de bactérias em pacientes caquéticos está associada com o aumento de citocinas pró-inflamatórias séricas e, conseqüentemente, agrava o quadro.

A hipótese desse estudo foi mostrar o papel de distintos compartimentos durante a progressão da caquexia associada ao câncer e vias inflamatórias, como a do NF- $\kappa$ B e a do inflamassoma, sendo, esta última, ainda não estudada em modelos de caquexia.

## 2 JUSTIFICATIVA

Atualmente, doenças cardiovasculares e câncer são as principais causas de morte no mundo. No câncer, a caquexia acomete 80% dos pacientes em estado terminal, sendo causa direta de morte entre 20-40 % dos mesmo e diminuindo a resposta ao tratamento quimio- e radioterápico.

A caquexia é caracterizada pela progressiva perda de tecido muscular e adiposo, acompanhada pelo distúrbio do perfil bioquímico e a produção de citocinas pró-inflamatórias, tanto em pacientes com câncer quanto em modelos animais. Durante a progressão da caquexia há efetiva contribuição de compartimentos e órgãos, como TAB, fígado e entre outros na inflamação sistêmica e crônica. Frente a esses dados, surgiram-nos algumas dúvidas: 1) Existe heterogeneidade na capacidade inflamatória nos diferentes depósitos de TAB na progressão da caquexia? 2) Qual é a contribuição dos adipócitos *per se* para a inflamação do TAB? 3) Qual é contribuição do fígado nesse cenário? 4) Há contribuição do fígado? 5) qual é o papel da microbiota. Para responder essas questões, estudamos a progressão da caquexia no modelo animal utilizando o carcinossarcoma Walker 256 e o de Lewis Lung Carcinoma.

## **3 OBJETIVOS**

### **3.1 Geral**

Investigar qual é a contribuição dos adipócitos isolados do TAB de diferentes regiões anatômicas e do fígado para progressão do quadro de caquexia associada ao câncer e a relevância da microbiota intestinal na progressão da síndrome.

### **3.2 Específicos**

- Caracterização do quadro de caquexia;
- Analisar a expressão gênica e proteica das citocinas pró e anti-inflamatórias em células adiposas, tecido adiposo e fígado;
- Verificar qualitativamente a infiltração de células imunes no fígado;
- Avaliar proteínas e genes da via do NF- $\kappa$ B e a do inflamassoma nos adipócitos isolados e no fígado;
- Correlacionar o conteúdo proteico de IL-1 $\beta$  do soro com o conteúdo das células adiposas e do fígado;
- Determinar a importância da microbiota no quadro de caquexia, com enfoque nas alterações no tecido adiposo.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Determinações gerais

#### 4.1.1 Animais

O estudo foi realizado com 50 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar (230-250 g) não isogênicos, com 8 semanas de vida, obtidos no biotério central do Instituto de Ciências Biomédicas I (ICB I) da Universidade de São Paulo (USP), mantidos no biotério de experimentação do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Durante o experimento, os animais foram mantidos em gaiolas plásticas, em ambiente com temperatura entre 23 a 25 °C e iluminação com ciclos de claro/escuro de 12/12 horas. O estudo encontra-se aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (062/04CEEA).

#### 4.1.2 Desenho experimental

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais: **(1) controle e (2) tumor**. O grupo tumor foi subdividido, sendo o primeiro subgrupo denominado 7 dias (T7), constituído por animais sacrificados 7 dias após a inoculação; e o segundo, 14 dias (T14), sacrificados 14 dias após a inoculação. Um grupo controle sem tumor foi também atribuído a cada grupo experimental, para controle do ganho/perda de peso corporal e tecidual.

#### 4.1.3 Inoculação do tumor de Walker 256

O tumor de Walker 256 foi inoculado subcutaneamente no flanco direito, em suspensão de 0.5 mL de solução salina 0,9% contendo  $2 \times 10^7$  de células tumorais (MACHADO et al., 2004; SEELAENDER et al., 1996). As células do tumor Walker de 256 foram retiradas de ratos mantidos para obtenção das células tumorais *in vivo* (MACHADO et al., 2004; SEELAENDER et al., 1996).

#### 4.1.4 Obtenção de soro e tecidos

Todos os animais utilizados nos experimentos foram sacrificados por decapitação sem anestesia. O sangue dos animais foi coletado em tubos cônicos de 15 ml. O soro foi separado após a centrifugação das amostras em 2500 rpm por 15 minutos, à 4 °C. Após o término da centrifugação, o soro foi armazenado à -80 °C para posterior análise.

Os tecidos foram extraídos imediatamente após o sacrifício e armazenados adequadamente de acordo com o protocolo planejado. Para os protocolos de qPCR RT e

ELISA os tecidos foram colocados rapidamente em nitrogênio líquido e estocados à -80 °C. Tecidos para análise histológica foram colocados diretamente em meio de criopreservação OCT (Sakura Finetek Japan Co., Ltd., Tokyo, Japan), congelados em nitrogênio líquido e estocados à -20 °C. No entanto, para isolamento das células adiposas os tecidos foram lavados previamente em salina e disposto em tampão específico ao protocolo, item 4.4.

## 4.2 Análises bioquímicas

### 4.2.1 Determinações plasmáticas

A determinação da concentração de triglicerídeos e HDL-colesterol foi realizada com o auxílio de kits comerciais colorimétricos Labtest<sup>®</sup>, enquanto que para a determinação dos ácidos graxos livres (NEFA) adotou-se o kit Wako Chemicals (USA) e para glicerol, o Sigma-Aldrich (Switzerland).

## 4.3 Análise histológica

### 4.3.1 Obtenção e processamento do tecido

As amostras de fígado foram colocadas em cassetes de plástico, montados com meio de criopreservação OCT (Sakura Finetek Japan Co., Ltd., Tokyo, Japan), congelados em nitrogênio líquido a -170 °C. Cortes de 7 µm de espessura foram fixados em metanol/acetona (1:1) e permeabilizados com 0,02% tween 20 in PBS (PBS-T). Uma lâmina de cada animal foi corada com Hematoxilina e Eosina (H&E) para uma avaliação histológica prévia do fígado. A outra lâmina das mesmas amostras foi fixada, permeabilizada, bloqueada com 5% de soro de cabra em PBS-T; e após 1h, os cortes foram incubados com anticorpos CD68 1:200 (Abcam, ab 31630, rabbit) overnight a 4 °C, para detectar macrófagos. Para observação adotou-se o anticorpo secundário conjugado com Biotina 1/500 (goat anti-rabbit IgG H&L ab97049), Kit ABC para uma maior intensidade de quimiluminescência (Vector Laboratories) e por fim, o DAB3,3-diaminobenzidine (Sigma, St. Louis, MO). Os cortes foram contra-corados com Hematoxilina.

Os cortes foram digitalizados com aumento de 40 x. As imagens foram obtidas utilizando um microscópio óptico Leica, modelo DMLP, com câmera CCD LG, modelo GC-415N-MD.

## 4.4 Isolamento de células adiposas

Os diferentes tecidos adiposos foram extraídos e lavados em salina estéril 0,9%. As amostras (0,8 g) foram colocadas imediatamente em meio de digestão DMEM (Sigma-

D5671), albumina 5% e colagenase do tipo I 2 mg/mL (Life-Technologies 17100-017), por 60 min a 37 °C. O resultado da digestão foi filtrado utilizando um filtro de *nylon* (250 µm) e centrifugado por 1 min, a 500 rpm, à temperatura ambiente. A camada de adipócitos maduros dos diferentes depósitos, Mesentérico (MEa). Retroperitoneal (RPa) e Epididimal (Ea), presente no sobrenadante, foram retirados e lavados em salina estéril 0.9% e estocados à -80 °C para análises de qPCR RT, Western blot e ELISA.

#### 4.5 Análise da expressão gênica por qPCR RT

##### 4.5.1 Extração do RNA total

O RNA total foi isolado de tecido do TAB (300 mg), do fígado (50 mg) e das células adiposas, utilizando o reagente TRIzol<sup>®</sup>, como no protocolo fornecido pelo fabricante (Invitrogen<sup>™</sup>). A integridade do RNA foi verificada por eletroforese, usando 2,2 M formaldeído e gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio. A concentração do RNA foi determinada medindo-se a absorção ótica da amostra no comprimento de onda de 260/280 nm.

##### 4.5.2 Reação de transcrição reversa (RT)

As amostras de RNA foram transcritas para cDNA em termociclador (Techne, Cambridge, UK). Para síntese do cDNA foi utilizado 1 µg de RNA total de cada amostra e o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Invitrogen no. 4375575) com o volume final de 20 µl. A transcrição reversa foi efetuada em um ciclo único, cujas etapas foram: i) 10 minutos a 25 °C; ii) 120 minutos a 37 °C; iii) 5 segundos a 85 °C; e iv) termina a 4 °C. A amostra de cDNA obtida foi estocada a -20 °C, até que fosse realizado o experimento.

##### 4.5.3 Seleção dos primers

Os *primers* foram sintetizados pela IDT (Integrated DNA Technologies). Para determinar a sequência do *primer* utilizou-se o *Genbank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>). A seguir, utilizando o software *spidey* (disponível on-line em [www.ncbi.nlm.nih.gov/spidey/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/spidey/)) e o alinhamento, eliminou-se os íntrons do gene alvo. Com isto o *software* apresenta apenas os éxons do gene alvo, e com o *software* primer 3 (disponível on-line no site [www.genome.wi.mit.edu](http://www.genome.wi.mit.edu)), selecionamos os candidatos a *primer* de acordo com os seguintes critérios: i) comprimento entre 18 e 24 bp; ii) T<sub>m</sub> entre 58 e 62 °C; iii) comprimento do produto amplificado entre 80 a 120 bp; e iv) as sequências *Forward* e *Reverse* nunca devem sair do mesmo éxon. Para determinar a especificidades do primer, as sequências foram comparadas com o *Genbank* usando o programa *Blast* (disponível em



www.ncbi.nlm.gov). Candidatos a primer que mostraram alta identidade somente com o gene alvo foram os escolhidos.

**Tabela 1-** Lista de *Primers*

Genes (Espécie)	Sequências 5' → 3'
<i>Il-6</i> (Rattus norvegicus) (NM 012589.2)	Fw: GAA GCT GAA GAC CCT CTG GA Rev: TAA GCC TCG GAC TTG TGA AGT GGT
<i>Il-10</i> (Rattus norvegicus) (NM 012854.2)	Fw: AAG GCA TTC TTC ACC TGC TC Rev: CCA AGC TGA GAA CCA AGA CC
<i>Tnf-α</i> (Rattus norvegicus) (NM 012675.3)	Fw: ATC ACT CCA AAG TGC AGC AG Rev: CTC TCT CCC CTG GAA AGG AC
<i>p50</i> (Rattus norvegicus) (NM 001276711.1)	Fw: AGG TCC AGA AAG ATG ACA TCC A Rev: CAA TGG CAA ACT GTC TGT GAA
<i>p65</i> (Rattus norvegicus) (NM 199267.2)	Fw: ATG CAT CCA CAG CTT CCA G Rev: TGC TCC TCT ATG GGA ACT TGA
<i>Tlr4</i> (Rattus norvegicus) (NM 019178.1)	Fw: TCT AAA TGC CAA CTG GAA CAG A Rev: ATG GGA TGG ATC CAG AAA CA
<i>Myd88</i> (Rattus norvegicus) (NM 198130.1)	Fw: GCG AGC TCA TTG AGA AAA GG Rev: ACA CCT GGA GAC AGG CTG A
<i>Traf6</i> (Rattus norvegicus) (NM 001107754.2)	Fw: AAG TCC ATA AGG GAT GCA GGT Rev: TCG CTT TGC AAA ATT GTC AG
<i>Ikk-α</i> (Rattus norvegicus) (NM 001107588.1)	Fw: TCA AGA TGT TGG TGG GAA GAT A Rev: CTC TGG GGC CAA ATA CTG TAA
<i>Nlrp1</i> (Rattus norvegicus) (NM 001145755.2)	Fw: GCT TCA GCC CCC AAA GAT Rev: TTG TCC AAG AGA GGG TCC AC
<i>Nlrp3</i> (Rattus norvegicus) (NM 001191642.1)	Fw: GCT GAA CTT GAG CAA CAA CG Rev: CAC CCA ACT GTA GGC TCT GC
<i>Tlr2</i> (Rattus norvegicus) (NM 198769.2)	Fw: TTT GAT CAC TGC ACC CTC AA Rev: ATG TGC AGG CTC CGT ATT GT
<i>Hif1a</i> (Rattus norvegicus) (NM 024359.1)	Fw: CAA CTG CCA CCA CTG ATG A Rev: GGG TAG AAG GTG GAG ATG C
<i>Caspase1</i> (Rattus norvegicus) (NM 012762.2)	Fw: ACA TCT TTC TCC GAG GGT TG Rev: CAC CTC TTT CAC CAT CTC CAG
<i>Rpl19</i> (Rattus norvegicus) (NM 031103.1)	Fw: GAG GGA CGC TTC ATT TCT TG Rev: CAT GGA GCA CAT CCA CAA AC
<i>Rpl27</i> (Rattus norvegicus) (NM 022514.1)	Fw: CCT CAT GCC CAC AAG GTA CT Rev: CTG TCT TGT ATC GCT CCT CAA A

#### 4.5.4 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR)

A expressão dos genes (Tabela 1) foi quantificada por qPCR RT, método descrito por (KUBISTA; et al., 2006), utilizando o aparelho QuantStudio™ 12K Flex (Applied Biosystems) e SYBER Green 2x como marcador de fluorescência (Invitrogen, USA). Para reação foi utilizado 2 µl de cDNA da amostra para um volume final de 10 µl. A concentração de cDNA foi de 10 ng por amostra e foi utilizado um intervalo de 200-800 nM de acordo com o primer, utilizando 5 µl do mix SYBER Green 2 x (4309155, Applied Biosystems), que contém dNTP Tampão de reação, Taq DNA polimerase SYBER green 2 x. A reação ocorreu do seguinte modo: primeiramente, um ciclo de 50 °C por 2 minutos e 95 °C por 10 minutos; seguido de 40 ciclos de amplificação: i- a desnaturação a 95 °C por 15 segundos, ii- anelamento a 63 °C por 60 segundos e iii- extensão a 72 °C, por 2 minutos.

Os dados obtidos foram expressos como um limiar de ciclagem ( $C_t$ ) que representa uma linha de base de detecção de fluorescência, correspondente à fase exponencial. Baseando-se no  $C_t$  obtido, estimamos a quantidade inicial de cDNA aplicado nas diferentes amostras. Assim o valor do  $C_t$  está correlacionado com os níveis de mRNA utilizado na reação (Heid, 1996). A expressão gênica foi determinada através da fórmula:  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , descrita por K. Livak no Manual do usuário do Biosystem Sequence Detector Bulletin 2, onde  $\Delta\Delta C_t = [C_t \text{ alvo (amostra Tumor)} - C_t \text{ controle interno (mesma amostra)}] - [C_t \text{ alvo (amostra controle)} - \text{controle interno (mesma amostra)}]$ . Os resultados foram expressos com base na relação do mRNA de cada gene de interesse, relativizado com o conteúdo de mRNA do controle interno.

#### 4.6 Análise da expressão protéica – (Western blot)

##### 4.6.1 extração proteica

As células adiposas e o fígado foram homogeneizados em tampão RIPA (Radio Immuno Precipitation Assay Buffer) 50 mM Tris, pH 7.4, 150mM de NaCL, 5 mM de EDTA, 0,1% de SDS, 0,5% de Deoxiglicolato, 1% de Triton X-100 com o coquetel de inibidor de proteases e fosfatase (Roche®, Brasil). Após a homogeneização a solução foi centrifugada em 14000 rpm por 30 minutos a 4 °C, a fração rica em proteína foi removida para fígado a sobrenadante enquanto para adipócitos e TAB a intermediária todas foram coletadas e estocadas a -20 °C para posteriores análises.

#### 4.6.2 Eletroforese SDS-PAGE

A dosagem de proteína foi realizada conforme o método descrito no BCA kit para quantificação de proteína (Pierce, IL, USA) utilizando-se albumina como referência. As proteínas foram desnaturadas através do calor (95 °C por 10 minutos), em tampão de amostra (Laemmli 4 x) 4% SDS, 20% Glicerol, Tris-HCL 0,125 M pH 6,8, DTT 0,2 M e 0,02% Azul de bromofenol. Após esse procedimento, o volume equivalente a 30-70 µg de proteínas das amostras e 5µL do padrão de peso molecular (BioRad) foram aplicados ao gel de poliacrilamida (5% para retenção e 10% Tricina SDS-PAGE para separação das proteínas) e as proteínas foram separadas por eletroforese por cerca de 1 hora e 20 minutos, a 110V.

#### 4.6.3 Transferência

As proteínas das amostras separadas no gel de eletroforese foram transferidas para a membrana de PVDF (Hybond X-tra<sup>®</sup>, Amersham) utilizando o método semi seco à 25 V por 40 min (Trans-Blot Turbo Blotting System, Bio-Rad, USA) com a solução de transferência, 20 mM Tris, 150 mM Glicina e 10% Metanol. Ao final da eletro-transferência, cada membrana foi lavada em PBS-T, rapidamente corada com vermelho de ponceau e descorada com água destilada e PBS-T.

#### 4.6.4 Bloqueio e incubação

As membranas foram incubadas por 1 hora com 5% de leite em pó desnatado em PBS-T para bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos. Decorrido este período, as membranas foram lavadas com PBS-T e incubadas (*overnight*), sob agitação (agitador orbital, Red Rotor, Hofer) em solução de anticorpos para anti-IL-1β (Santa Cruz, SC-1251, Goat), p65 (Cell Signalling, C22B4, Rabbit), Myd88 (Santa cruz, SC-11356, Goat), TNFr1 (Santa Cruz, SC-1070, Mouse), p50 (Santa Cruz, SC-8414, Rabbit), Gapdh (Sigma, G9545, Rabbit) pJNK (Cell Signalling, 9552, Rabbit) em 4 °C. Após este período, as membranas foram lavadas com PBS-T e incubadas com o anticorpo secundário (goat anti-rabbit IgG ou chicken anti-goat IgG) conjugado com peroxidase por 2 horas e após a incubação do secundário, foi realizada mais um lavagem com PBS-T e incubada por 3 minutos com ECL (Amersham, UK).

#### 4.6.5 Exposição e desenvolvimento do filme

O desenvolvimento foi realizado em uma sala escura, sob luz vermelha e utilizando o kit de revelação e fixação (Kodak). O filme foi colocado acima da membrana por tempo determinado de acordo com o anticorpo, seguindo-se transferência para o revelador por um

minuto, depois passagem em água rapidamente e fixador, por 30 segundos. As bandas foram registradas após a obtenção de imagem em scanner (EPSON STYLUS CX3200). A intensidade das bandas foi quantificada pelo software ImageJ<sup>®</sup>.

#### 4.7 Dosagem de citocinas por Enzyme-linked immune absorbent assay (ELISA)

Para dosagem das citocinas foi utilizado o método (ELISA) de captura (ReD System, Inc., Minneapolis, USA). As amostras utilizadas foram as mesmas utilizadas para Western blot, provenientes dos diferentes grupos experimentais. Placas de 96 poços foram sensibilizadas com 100 µl de anticorpo monoclonal de acordo com a proteína específica, IL-6 (DY506), TNF- $\alpha$  (DY510), IL-10 (DY522) e IL-1 $\beta$  (DY501), e incubadas *overnight* à 4 °C. Após este período, os poços foram lavados por três vezes com o tampão para lavagem (0,05% Tween 20 em PBS pH 7,4). Posteriormente, as placas foram bloqueadas, para evitar ligações inespecíficas com 300 µl de solução de bloqueio (1% BSA em PBS, pH 7,4, 0,2 µm filtrado) e incubadas por uma hora em temperatura ambiente.

Após o período, foi adicionado 100 µl da amostra por poço e dos padrões diluídos previamente em reagente de diluição. Para IL-6 o intervalo da concentração variou de 125–8000 pg/ml, enquanto para o TNF- $\alpha$ , a IL-10 e a IL-1 $\beta$  o intervalo foi de 62,5–4000 pg/ml. Em dois poços foram colocados apenas o reagente de diluição para caracterização do branco. A placa foi incubada por 2 horas em temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 100 µl do anticorpo de detecção (Anticorpo anti-rato biotinilado), diluído previamente em reagente de diluição na concentração estabelecida, cobertos com fita adesiva e incubado por 2 horas em temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados 100 µl de *Streptavidina-HRP* (1:250) por poço e incubados por 30 minutos em temperatura ambiente, evitando o contato direto com a luz. Por fim, foi adicionado a solução de substrato (mistura dos reagentes de cores A – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> B – (Tetrametibenzidina), na diluição 1:1, por poços e incubado por 30 minutos em temperatura ambiente, onde se evitou o contato direto com a luz. A reação foi interrompida com 50 µl da solução Stop (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 30%) por poço sob agitação lenta. A leitura foi realizada em leitor de ELISA (PowerWave<sup>™</sup>, Bio-tek), utilizando-se filtro de 450 nm.

#### 4.8 Parte II - referente ao estudo da microbiota

##### 4.8.1 Animais

O estudo foi realizado com aproximadamente 50 camundongos machos da linhagem C57Bl/6, com 7-10 semanas de vida, obtidos no biotério do prédio 37 localizado no Campus NIH-Bethesda. Durante o experimento, os animais foram mantidos em gaiolas plásticas em

ambiente com temperatura entre 23 a 25 °C e iluminação com ciclos de claro/escuro de 12/12 horas. Os camundongos *Germ Free* foram obtidos do biotério somente para camundongos Germ Free NCI-Frederick e mantidos durante todo o experimento e, no 17º dia após a inoculação das células tumorais, os animais foram enviados para o laboratório em Bethesda para eutanásia (LEI-003).

#### *4.8.2 Desenho experimental e implantação das células tumorais*

Os camundongos foram divididos em 4 grupos, (1) grupo Convencional Controle (Conv), (2) Convencional Tumor (Conv TB), (3) *Germ Free* (GF) e (4) Germ Free Tumor (GF). As células tumorais utilizadas para indução da caquexia associada ao câncer foram *Lewis Lung Carcinoma* (LLC), elas foram cultivadas e mantidas em garrafas de cultura à 37°C em uma atmosfera humidificada, a 5% de CO<sub>2</sub> em meio especificado pela empresa ATTC. As células foram injetadas subcutaneamente no flanco direito dos camundongos  $4 \times 10^6$  células viáveis diluídas em solução salina à 0,9%. Os animais controle receberam o mesmo volume de salina à 0,9%. A viabilidade celular foi avaliada por exclusão de Trypan Blue.

#### *4.8.3 Variação do peso corporal e obtenção dos tecidos*

Os animais foram pesados antes e 17 dias após inoculação das células tumorais. Todos os animais utilizados nos experimentos foram sacrificados por deslocamento cervical após serem anestesiados com O<sub>2</sub>. Os tecidos foram extraídos imediatamente após o sacrifício e armazenados adequadamente de acordo com o protocolo planejado. Para os protocolos de qPCR RT e Western Blot os tecidos foram colocados rapidamente em gelo seco aproximadamente -78 °C e estocados à -80 °C. Tecidos para análise histológica foram colocados em Formalina por 24h, transferido para álcool 70% e armazenados em 4 °C até o procedimento. Os tecidos extraídos foram gastrocnêmio, tecidos adiposos (retroperitoneal e epididimal) e fígado.

### 4.9 Análise histológica

#### *4.9.1 Obtenção e processamento do tecido*

Os fragmentos dos diferentes depósitos TAB armazenados em formalina, por 24h, a 4°C, para a fixação. Os tecidos fixados foram então desidratados com concentrações crescentes de álcool: 70, 95 e 100%. Após a desidratação foram clareadas com banhos de xilol e finalmente, incrustadas (ou incluídas) em parafina Paraplast X-tra da SEM e emblocados em Tissue Cassetes da Fisher Scientific. As amostras foram cortadas no micrótomo rotatório R

Jung-Heidelberg. Cortes de 5  $\mu$ m de espessura foram colocados sobre lâminas previamente cobertas com polilisina.

#### 4.9.2 Desparafinização/Hidratação

Os cortes foram desparafinizados com 2 banhos sucessivos de 30 minutos de xilol. A seguir foram hidratados em e banhos de 5 minutos com concentrações decrescentes de álcool: 100, 95 e 70 %, respectivamente, e, por fim, lavados em água destilada.

#### 4.9.3 Hematoxilina e Eosina (HeE)

A coloração com HeE (Hematoxilina e Eosina) foi realizada após a desparafinização e hidratação das lâminas na seguinte sequência: i) 2 minutos com hematoxilina; e ii) 1 minuto com eosina. Após o processo de coloração, a lâmina foi fechada com permonte.

#### 4.9.4 Imunohistoquímica

Para a imunohistoquímica, as laminas foram bloqueadas com 5% de soro de cabra em PBS-T; após 1h, os cortes foram incubados com anticorpos UCP-1 1:200 (Cell Signaling, , rabbit) overnight a 4 °C. Para observação adotou-se o anticorpo secundário conjugado com Biotina 1/500 (goat anti-rabbit IgG H&L ab97049), Kit ABC para uma maior intensidade de quimiluminescência (Vector Laboratories) e por fim, o DAB3,3-diaminobenzidine (Sigma, St. Louis, MO). Os cortes foram contra-corados com Hematoxilina.

#### 4.9.5 Análise das imagens

Os cortes tanto em H&E quanto imunohistoquímica foram digitalizados com aumento de 20 x. As imagens foram obtidas utilizando um microscópio óptico Leica, modelo DMLP, com câmera CCD LG, modelo GC-415N-MD.

#### 4.10 qPCR RT e Western blot

Os procedimentos utilizados para as técnicas qPCR RT e Western blot foram as mesmas descritas nos subcapítulos 4.5 e 4.6 da tese. As sequências de *Primers* usadas para espécie camundongo foram: UCP1 *Forward* AGGCTTCCAGTACCATTAGG e *Reverse* CTGAGTGAGGCAAAGCTGATTT; PPAR $\alpha$  *Forward* AGAGCCCCATCTGTCCTCTC e *Reverse* ACTGGTAGTCTGCAAACCAAA; PGC-1 $\alpha$  *Forward* CCCTGCCATTGTTAAGACC e *Reverse* TGCTGCTGTTCCCTGTTTTC; PRDM16 *Forward* CAGCACGGTGAAGCCATTC e *Reverse* GCGTGCATCCGCTTGTG; Sirt-1 *Forward* GCTGACGACTTCGACGACG e *Reverse* TCGGTCAACAGGAGGTTGTCT. E os anticorpos usados foram: Anti-HSL (Cell Signalling, 4107, Rabbit); Anti-Phospho-HSL

Ser660 (Cell Signalling 4126, Rabbit); Antibody Anti-ATGL (Cell Signalling 2138, Rabbit); Anti-Phospho-HSL Ser565 (Cell Signalling 4137, Rabbit); Anti-Phospho-Adipose Triglyceride Lipase Ser406 (ab, 135093, Rabbit); Anti-Actin (Cell Signalling, 4970, Rabbit); anti secundário (Cell Signalling, goat anti-rabbit IgG)

#### 4.11 Análise estatística

Os dados obtidos no Brasil, estão expressos como média e erro padrão da média. As diferenças relativas nos grupos de estudos (T0, T7 e T14) foram analisadas com *software* GraphPad5 (GraphPad, San Diego, CA, USA) e o nível de significância foi determinado pelo *One-Way ANOVA* seguido pelo pós-teste de *Tukey* para comparação entre os grupos. Para os resultados relacionados massa corporal e tecidual no grupo câncer (T7 e T14) e controle (C7 e C14) utilizamos *two-way ANOVA*, seguido pelo pós-teste de *Tukey*. O nível de significância estabelecido foi de  $p < 0,05$ .

Os resultados do estudo da microbiota, estão expressos como média e erro padrão da média. As diferenças relativas nos grupos de estudos (Conv, Conv TB, *Germ Free* e *Germ Free* TB) foram analisadas com *software* GraphPad5 (GraphPad, San Diego, CA, USA). O nível de significância foi determinado pelo *two-way ANOVA*, seguido pelo pós-teste de *Tukey*. O nível de significância estabelecido foi de  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Parâmetros de validação da caquexia

Após 14 dias da inoculação das células tumorais, os animais apresentaram redução no peso corporal (10,6%;  $p < 0,05$ ) e na massa do TAB (42,5% em TAME e 40,2% em TARP;  $p < 0,05$ ) (Tabela 2), comparado aos animais do grupo controle de mesma idade. A caquexia terminal foi acompanhada pelo aumento da concentração de AGL, HDL e TG no plasma (Tabela 3).

**Tabela 2** - Peso corporal e dos tecidos dos grupos Controle (C) e Caquéticos (TB)

	Inicial					2-Way Anova p-values		
	T0	C7	TB7	C14	TB14	Tempo	Tumor	Tempo/Tumor
MC-T (g)	220,8±18,4	264,4±21,4	247,8±17,8	285,4±19,7**	255,1±21,4*	ns	* $p < 0,05$	** $p < 0,01$
MT (g)			4,4±2,53		12,05±6,43			
Fígado (g)	6,32±0,72		8,60±0,71	11,03±1,13	11,17±1,56*	* $p < 0,05$	ns	ns
TAME (g)	1,03±0,33	1,82±0,47	1,37±0,32	2,54±0,43**#	1,46±0,22&&	# $p < 0,05$	&& $p < 0,01$	** $p < 0,01$
TEA (g)	1,52±0,38	2,15±0,34	2,04±0,41	3,46±0,40	2,83±0,45	ns	ns	ns
TARP (g)	0,87±0,38	2,12±0,35	1,39±0,40	3,45±0,48**	2,06±0,46*#	# $p < 0,05$	* $p < 0,05$	** $p < 0,01$

NOTA: C: controle; TB: câncer-caquexia; MC-T: massa corporal – massa tumoral; MT: massa tumoral; TAME: tecido adiposo mesentérico; TEA: tecido adiposo epididimal; TARP: tecido adiposo retroperitoneal. Dados expressos em média ± erro padrão; n=5/grupo.

**Tabela 3** - Perfil lipídico durante a progressão da caquexia

	T0		T7		T14				
Glicerol (mg/mL)	0,14	±	0,09	0,09	±	0,02	0,11	±	0,04
AGL (mE/mL)	0,75	±	0,03	0,80	±	0,03	1,25	±	0,22*
HDL (mg/dL)	43,73	±	2,24	46,80	±	4,54	52,12	±	1,15 <sup>#</sup>
TG (mg/dL)	82,95	±	5,38	114,81	±	29,00	151,30	±	50,18*

NOTA: T0, T7 e T14: tempo em dias após a inoculação das células tumorais; AGL: ácido graxo livre; HDL: lipoproteína de alta densidade; TG: triacilglicerol. Dados expressos em média ± erro padrão; n=5/grupo. \* $p < 0,05$  diferença entre os tempos; <sup>#</sup>  $p < 0,05$  em relação ao T0.

### 5.2 Inflamação durante a caquexia associada ao câncer

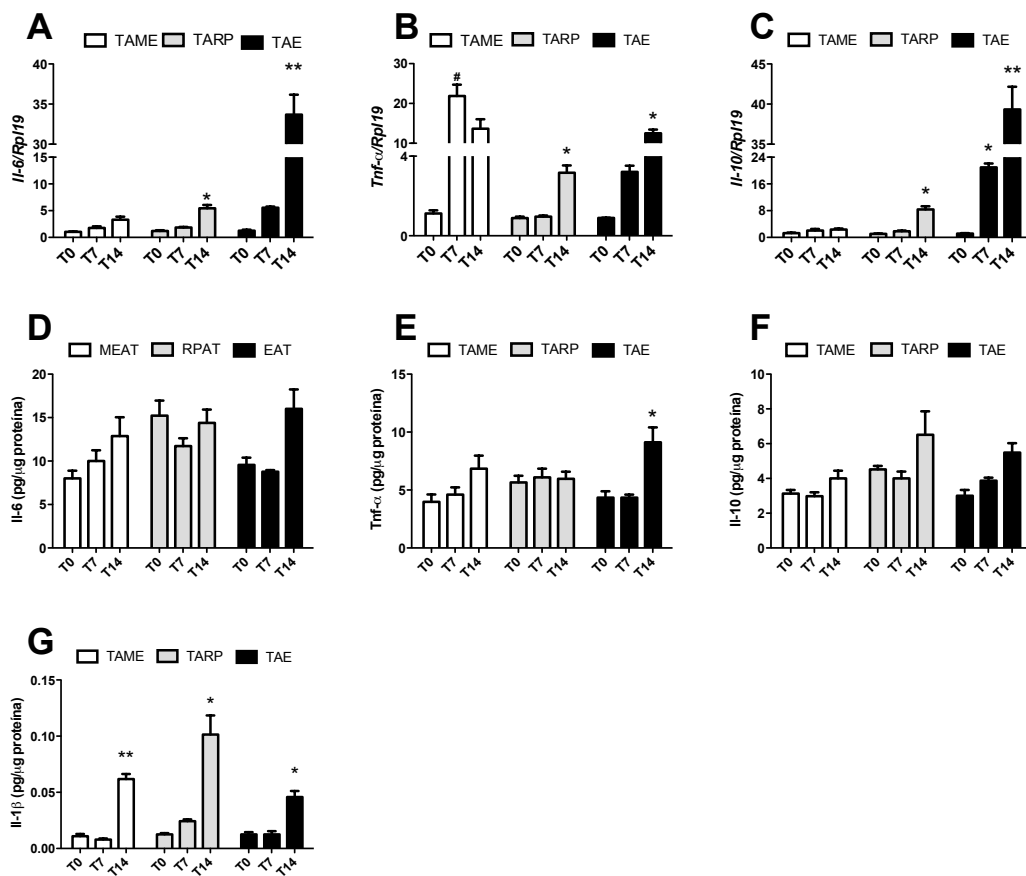
Tecido adiposo mesentérico: foi observado aumento na expressão gênica do Tnf- $\alpha$  (Figura 3-B) no T7, mantido até o T14 ( $p < 0,05$ ), quando comparado ao T0. O conteúdo proteico de Il-1 $\beta$  (Figura 3-G) se apresentou elevado no T14 ( $p < 0,05$ ) em relação ao T0.

Tecido adiposo retroperitoneal: aumento da expressão dos genes de Il-6 e Tnf- $\alpha$  (Figuras 3-A e B) foi detectado somente no estágio final da caquexia (T14;  $p < 0,05$ ). Para o conteúdo proteico de Il-1 $\beta$  (Figura 3-G), verificamos aumento semelhante ao TAME ( $p < 0,05$ ;



T14); no entanto, embora a expressão gênica da citocina anti-inflamatória Il-10 (Figura 3-C) tenha sido elevada no T14 ( $p < 0,05$ ), seu conteúdo proteico (Figura 3-F) não apresentou diferença significativa.

Tecido adiposo epididimal: neste tecido, a expressão das citocinas pró-inflamatórias Il-6 e Tnf- $\alpha$  (Figuras 3-A e B) estava aumentada somente no T14 ( $p < 0,05$ ). Ao mesmo tempo, houve aumento na expressão proteica de Tnf- $\alpha$  e Il-1 $\beta$  (Figuras 3-E e G) ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao T0. Contudo, semelhantemente ao observado no TARP, a expressão gênica da citocina Il-10 (Figura 3-C) mostrou-se elevada no T7 e manteve-se assim até o T14, comparando-se tempos ( $p < 0,05$ ).



**Figura 3** - Expressão gênica e proteica de citocinas inflamatórias no tecido adiposo branco durante a progressão da caquexia. A - expressão gênica de Il-6; B - expressão gênica de Tnf- $\alpha$ ; C - expressão gênica de Il-10; D - expressão proteica de Il-6, E - expressão proteica de Tnf- $\alpha$ , F - expressão proteica de Il-10; G - expressão proteica de Il-1 $\beta$ . TAME: tecido adiposo mesentérico; TARP: tecido adiposo retroperitoneal; TAE: tecido adiposo epididimal; T0, T7 e T14: tempo em dias após a inoculação das células tumorais. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão;  $n=5$ /grupo. \* $p < 0,05$  diferença entre os tempos; \*\* $p < 0,01$  diferença entre os tempos; # $p < 0,05$  em relação ao T0.

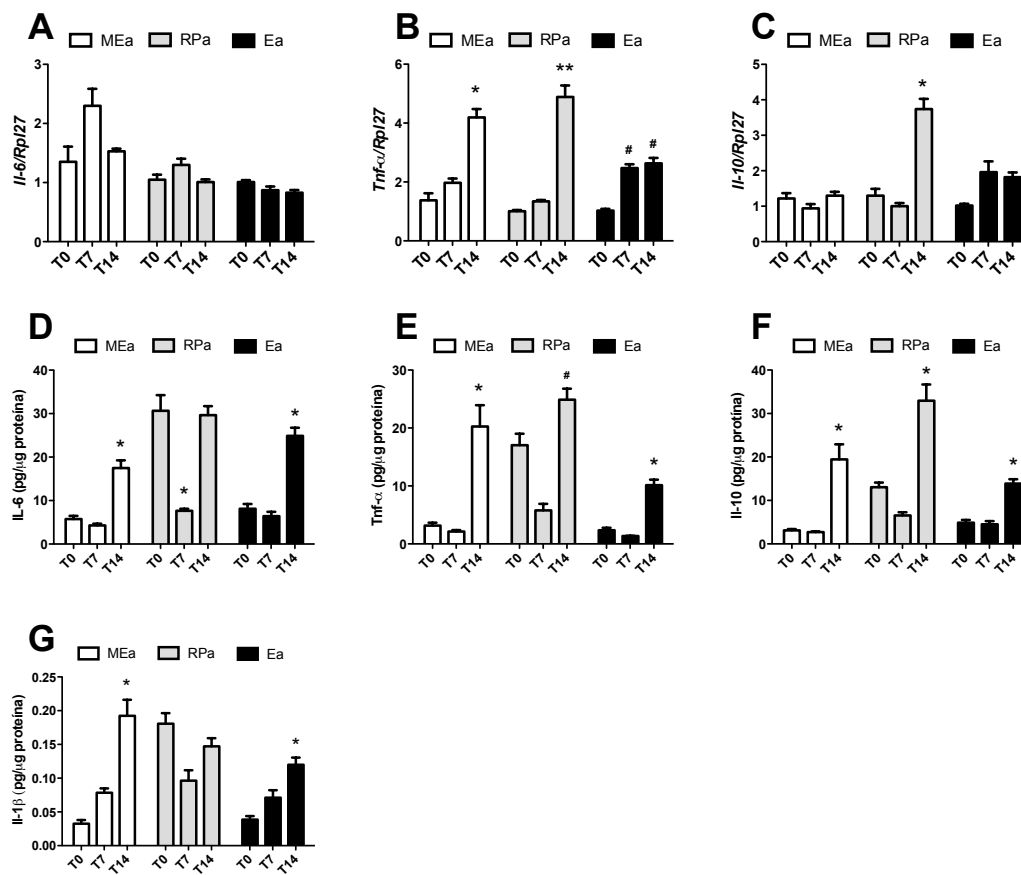
### 5.3 Estudo dos adipócitos durante o desenvolvimento da caquexia associada ao câncer

O tecido adiposo é composto por diferentes tipos celulares, todos com grande potencial inflamatório. Assim, procuramos entender qual seria a relevância das células adiposas *per se* contribuindo na inflamação local e sistêmica ocasionada pela caquexia.

Adipócitos mesentéricos (MEa): nas células isoladas do tecido adiposo mesentérico (MEa), somente a expressão gênica da citocina Tnf- $\alpha$  (Figura 4-B) apresentou-se elevada no T14 ( $p < 0,05$ ) em relação aos demais tempos. Em adição, verificamos aumento na expressão proteica de Il-6, Tnf- $\alpha$ , Il-10 e Il-1 $\beta$  (Figuras 4-D, E, F e G) no estágio terminal da caquexia (T14;  $p < 0,05$ ). O conteúdo proteico encontrado em MEa de IL-1 $\beta$  teve comportamento similar ao encontrado no TAME. Assim, especulamos que o aumento das outras citocinas, como Il-6, Tnf- $\alpha$  e Il-10, nos MEa foi insuficiente para afetar valores significativos em T14 comparado a T0 no tecido total (TAME).

Adipócitos retroperitoneais (RPa): células adiposas isoladas do tecido adiposo retroperitoneal (RPa) apresentaram a expressão gênica de Tnf- $\alpha$  (Figura 4-B) aumentada em T14, em comparação com o T0 ( $p < 0,05$ ). Tal incremento foi paralelo ao encontrado no tecido (TARP) no mesmo tempo (T14). Observamos valores elevados na expressão gênica de Il-10 (Figura 4-C) em T14, comparado aos tempos T0 e T7 ( $p < 0,05$ ) nessas células. O aumento de Il-10 pode estar associado ao aumento da expressão do gene de TNF- $\alpha$  nessas células. Como já mencionado, o conteúdo proteico de Il-1 $\beta$  (Figura 3-G) mostrou-se elevado no TARP, mas não em RPa e, portanto, postulamos uma possível contribuição da FVE, composta pelos demais tipos celulares que não o adipócito maturo do tecido. Apesar de encontrarmos concentração elevada das proteínas de Il-6 e TNF- $\alpha$  (Figura 4-D e E) em adipócitos obtidos no T14, comparado com o T0, o aumento nos adipócitos não foi suficiente para ser refletido em aumento tecidual (TARP).

Adipócitos epididimais (Ea): no Ea, apenas a expressão gênica de Tnf- $\alpha$  (Figura 4-B) elevou-se no T14 em relação a T0 ( $p < 0,05$ ). Contudo, o conteúdo proteico de todas as citocinas pró-inflamatórias (Figuras 4-D, E e G) apresentou-se elevado na fase terminal da caquexia (T14) ( $p < 0,05$ ). Provavelmente, o aumento do conteúdo proteico de Tnf- $\alpha$  e Il-1 $\beta$  no TAE seja decorrência da produção pelo Ea. Os adipócitos (Ea) mostraram aumento da expressão proteica de Il-10 (Figura 4-F) na fase terminal da caquexia ( $p < 0,05$ ), talvez numa tentativa de compensar a inflamação crescente.



**Figura 4-** Expressão gênica e proteica de citocinas inflamatórias em células adiposas isoladas durante a progressão da caquexia. A - expressão gênica de Il-6; B - expressão gênica de Tnf- $\alpha$ ; C - expressão gênica de Il-10; D - expressão proteica de Il-6; E - expressão proteica de Tnf- $\alpha$ ; F - expressão proteica de Il-10; G- expressão proteica de Il-1 $\beta$ . MEa: adipócito mesentérico; RPa: adipócito retroperitoneal; Ea: adipócito epididimal; T0, T7 e T14: tempo em dias após a inoculação das células tumorais. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão; n=5/grupo. \*p<0,05 diferença entre os tempos; & p<0,05 em relação ao T7.

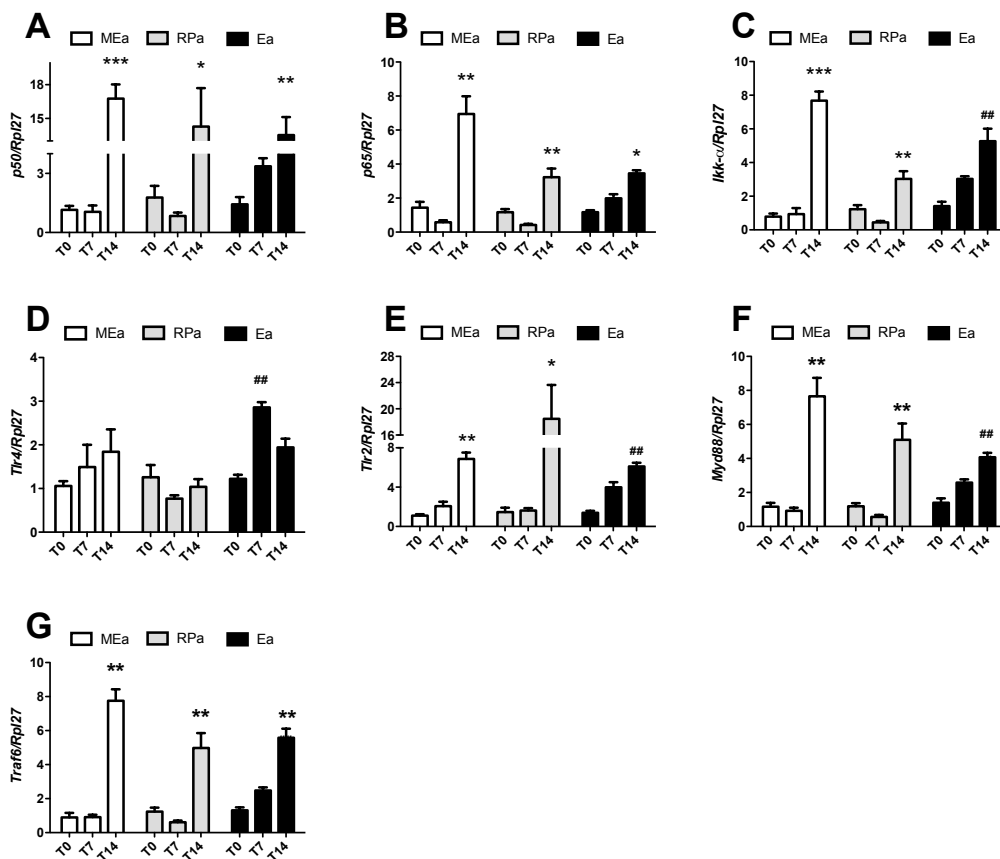
Em seguida, avaliamos vias relacionadas com a indução de citocinas inflamatórias nos adipócitos de diferentes depósitos.

MEa: a expressão dos genes *fator nuclear kappa B* (NF- $\kappa$ B), subunidades p50 e p65, Ikk- $\alpha$ , Tlr2, Myd88 e Traf6 (Figuras 5-A, B, C, E, F e G), apresentou-se aumentada no T14 comparado ao T0 (p<0,05). Desse modo, observamos que todos os genes da via de Tlr/NF- $\kappa$ B foram regulados positivamente durante a caquexia associada ao câncer. Em concordância ao encontrado na expressão gênica, a expressão das proteínas NF- $\kappa$ Bp65 e MyD88 (Figuras 6-B e C) aumentou na fase terminal da caquexia, comparado ao T0 (p <0,05).

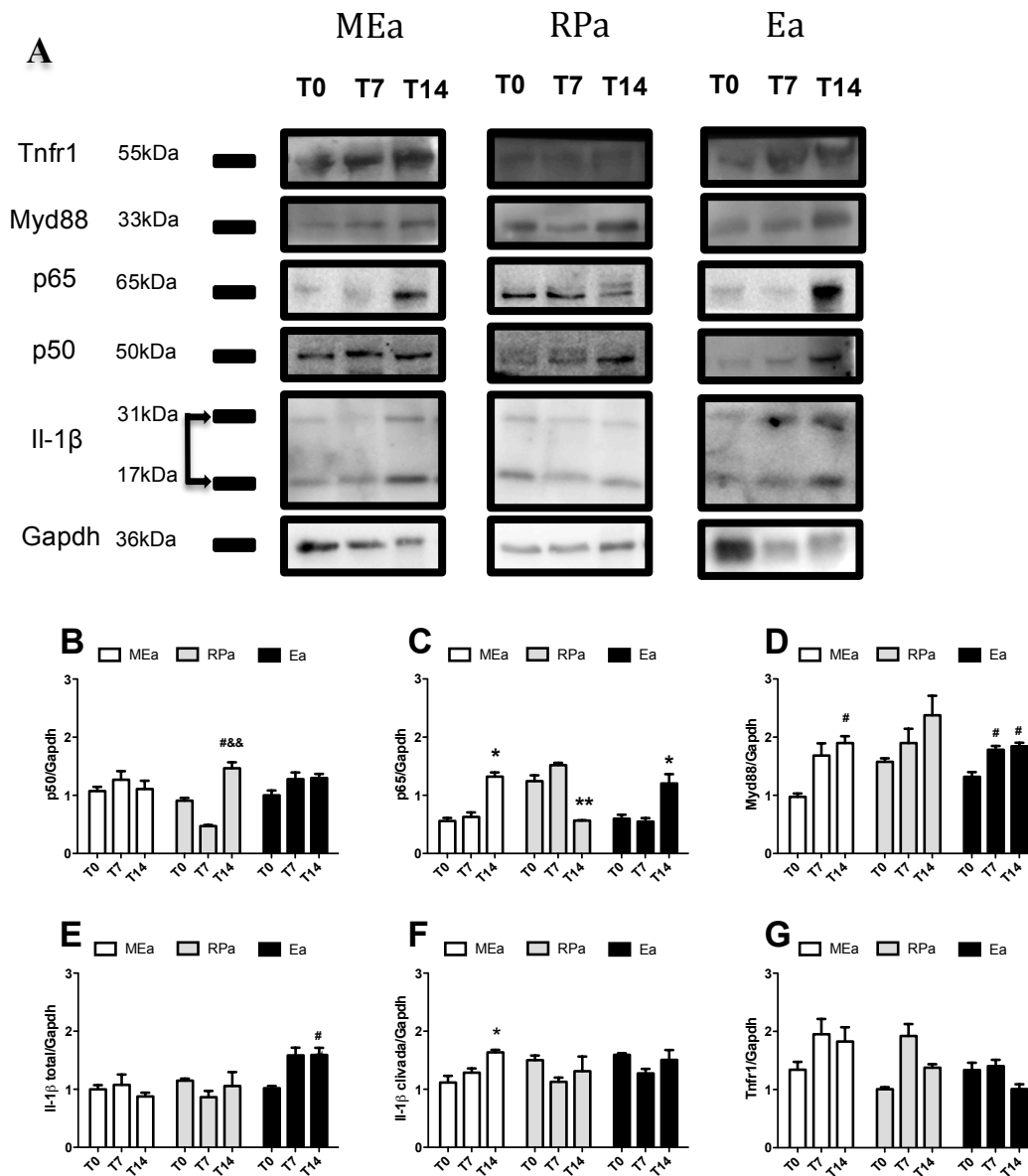
RPa: a expressão gênica da via Tlr/NF- $\kappa$ B nessas células foi semelhante à descrita para MEa. Os genes de NF- $\kappa$ Bp50 e p65, Ikk- $\alpha$ , Tlr2, MyD88 e Traf6 (Figuras 5-A, B, C, D, F e G) aumentaram em T14 comparado com T0 (p<0,05). No entanto, em contraste com os resultados da expressão proteica relatados para MEa, o conteúdo proteico de NF- $\kappa$ Bp50

aumentou no T14 e, na contramão, o de NF- $\kappa$ Bp65 (Figuras 6-A e B) diminuiu no T14 – sempre quando comparado ao T0 ( $p < 0,05$ ).

Ea: essa população celular mostrou novamente comportamento paralelo ao de MEa. A expressão gênica de NF- $\kappa$ Bp50, p65, Ikk- $\alpha$ , Tlr2, MyD88 e Traf6 (Figuras 5-A, B, C, D, F e G) aumentou na fase terminal da caquexia, comparando-se com T0 ( $p < 0,05$ ). O conteúdo das proteínas NF- $\kappa$ Bp65 e Myd88 (Figuras 6-B e C) apresentou-se elevado no T14 em relação ao T0 ( $p < 0,05$ ).



**Figura 5-** Expressão gênica dos fatores de transcrição envolvidos na via inflamatória em células adiposas isoladas durante a progressão da caquexia. A- expressão gênica de NF- $\kappa$ Bp50, B- expressão gênica de NF- $\kappa$ Bp65, C- expressão gênica de Ikk- $\alpha$ , D- expressão gênica de Tlr4, E- expressão gênica de Tlr2, F- expressão gênica de Myd88 e G- expressão gênica de Traf6. MEa: adipócito mesentérico; RPa: adipócito retroperitoneal; Ea: adipócito epididimal; T0, T7 e T14: tempo em dias após a inoculação das células tumorais. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão; n=5/grupo. \*\*\* $p < 0,01$  diferença entre todos os grupos, para o mesmo tecido; # $p < 0,05$  vs T0; ## $p < 0,01$  vs T0.



**Figura 6-** Expressão proteica em células adiposas isoladas durante a progressão da caquexia. A- As imagens dos blots selecionadas são representativas para NF- $\kappa$ Bp50 e p65, Myd88, Il-1 $\beta$  (total e a forma clivada), Tnfr1 e Gapdh (proteína normalizadora), B-F a expressão proteica foi realizada pelo software *Image j*. MEa: adipócito mesentérico; RPa: adipócito retroperitoneal; Ea: adipócito epididimal; T0, T7 e T14: tempo em dias após a inoculação das células tumorais. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão; n=3/grupo. \*p<0,05 vs todos os todos o grupos, para o mesmo tecido; #p<0,01 vs T0; &&p<0,05 vs T7.

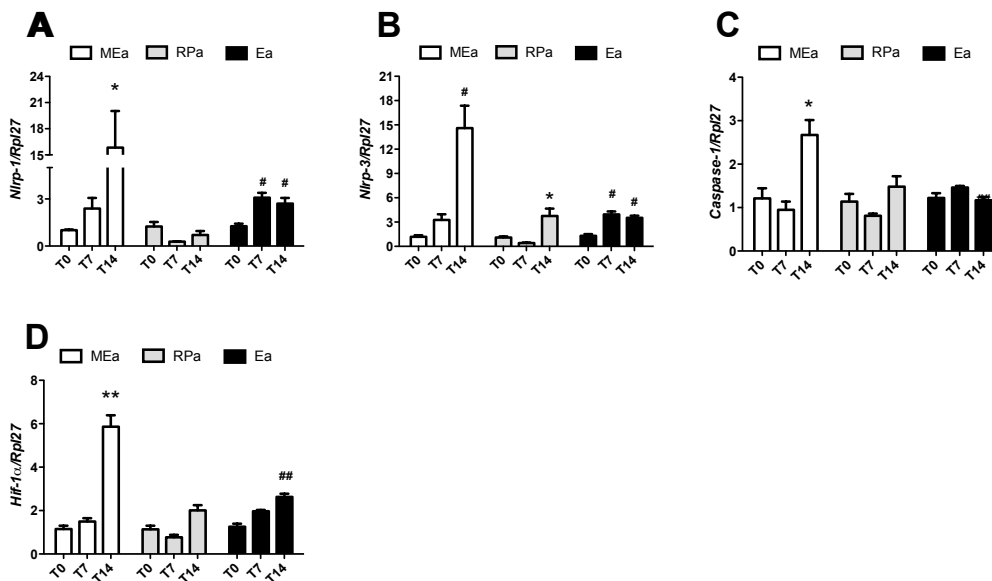
Ao observarmos o aumento da proteína IL-1 $\beta$  clivada, fomos verificar o comportamento da via do inflamassoma, uma vez conhecido na literatura seu papel na clivagem da pré-madura IL-1 $\beta$  à madura.

MEa: a expressão dos genes relacionados com a atividade da via de inflamassoma foi alterada durante a progressão da caquexia. A expressão gênica de Nlrp-1, -3 e Caspase-1 (Figuras 7-A, B e C) mostrou-se elevada no T14 (p<0,01) em relação ao T0. Em adição aos

resultados encontrados da via do inflamassoma, verificamos aumento da proteína Il-1 $\beta$  clivada (Figura 6-F) no T14 em relação ao T0 ( $p < 0,05$ ).

RPa: no RPa, apenas a expressão do gene de Nlrp3 (Figura 7-B) foi aumentada em T14 comparado com o T0 ( $p < 0,05$ ).

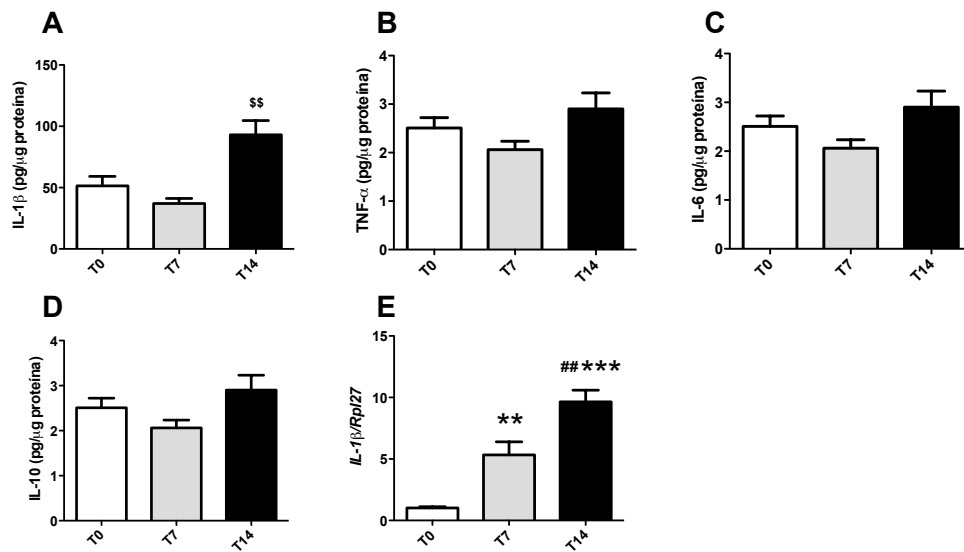
Ea: a expressão dos genes de Nlrp-1 e -3 (Figura 7-A e B) aumentou em T14 em comparação com o T0 ( $p < 0,01$ ). No entanto, não observamos mudanças no conteúdo da proteína Il-1 $\beta$  clivada e na expressão gênica de Caspase-1.



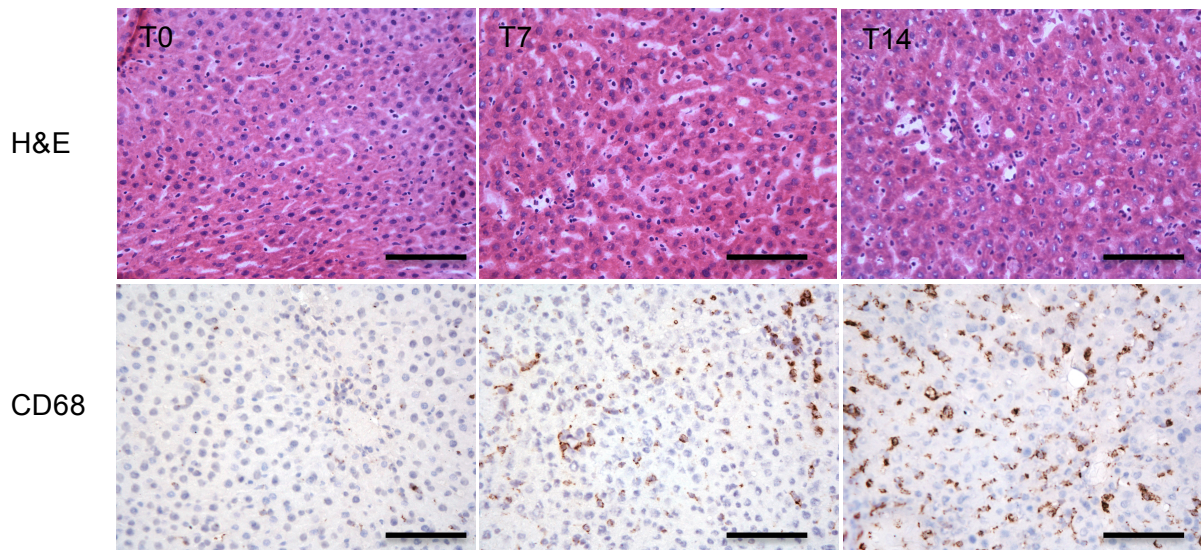
**Figura 7-** Expressão gênica da via do inflamassoma em células adiposas isoladas durante a progressão da caquexia. A- Expressão gênica de Nalp1, B- Expressão gênica de Nalp3, C- Expressão gênica de Caspase 1 e D- Expressão gênica de Hif-1 $\alpha$ . MEa: adipócito mesentérico; RPa: adipócito retroperitoneal; Ea: adipócito epididimal; T0, T7 e T14: tempo em dias após a inoculação das células tumorais. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão; n=4/grupo. \* $p < 0,05$  vs todos os grupos para o mesmo tecido; # $p < 0,05$  vs T0; ## $p < 0,01$  vs T0.

#### 5.4 Estudo do fígado durante o desenvolvimento da caquexia associada ao câncer

Avaliamos o comportamento do fígado na produção de citocinas pró-inflamatórias. Para a citocina Il-1 $\beta$  (Figura 4-E), observamos que a expressão gênica estava elevada no T7 e manteve-se até o T14, quando comparada entre os tempos ( $p < 0,01$ ). O conteúdo proteico da Il-1 $\beta$  (Figura 4-A), no T14, seguiu o relatado para a expressão gênica ( $p < 0,01$ ). Porém, o conteúdo proteico das demais citocinas avaliadas, como Tnf- $\alpha$ , Il-6 e Il-10 (Figuras 4-B, C e D), não apresentou diferença significativa. Em seguida, procuramos avaliar o perfil de macrófagos infiltrados no fígado durante a progressão da síndrome. Observamos que o número de macrófagos residentes aumentou já em T7 e este aumento foi ainda mais pronunciado, quando observamos a fase terminal da caquexia, correspondente a T14 (Figura 5-A-F).



**Figura 8** - Expressão de citocinas inflamatórias no fígado durante a progressão da caquexia. A - expressão proteica de IL-1 $\beta$ ; B - expressão proteica de Tnf- $\alpha$ ; C - expressão proteica de IL-6; D - expressão proteica de IL-10; E - expressão gênica de IL-1 $\beta$ . T0, T7 e T14: tempo em dias após a inoculação das células tumorais. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão; n=5/grupo. <sup>ss</sup>p<0,001 diferença entre os tempos.

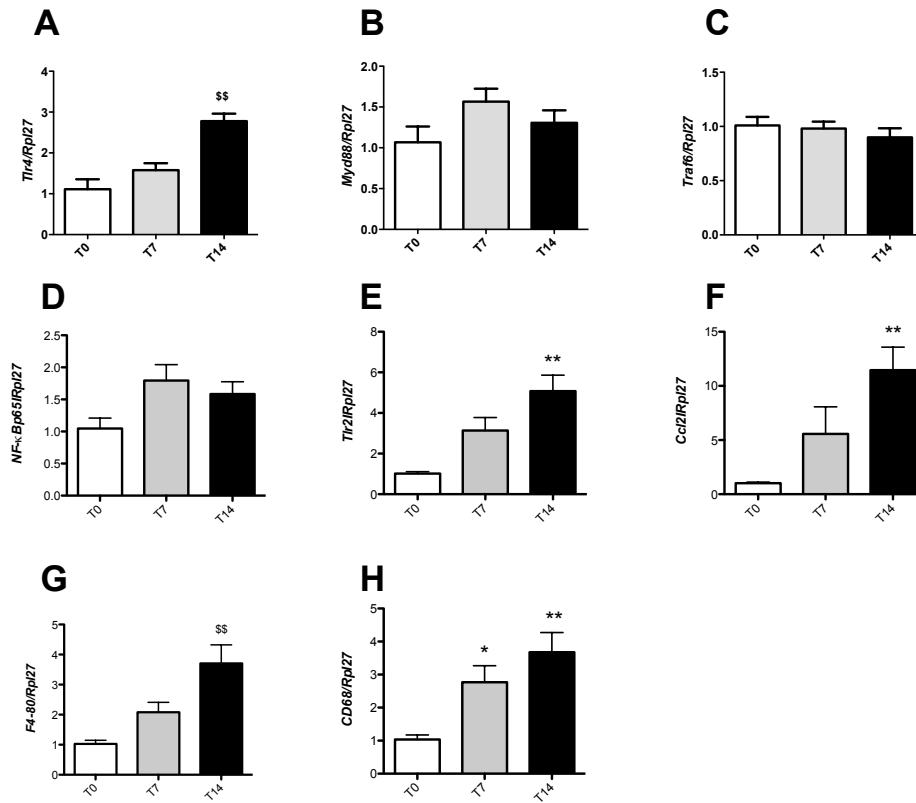


**Figura 9** - Coloração de Hematoxilina e Eosina (H&E) e imunohistoquímica para CD68. T0= controle, T7= 7 dias após inoculação das células tumorais e T14= 14 dias após inoculação das células tumorais. A escala é de 100  $\mu$ m.

Ao verificarmos o aumento qualitativo de macrófagos infiltrados e o aumento no conteúdo proteico de IL-1 $\beta$ , fomos avaliar genes e proteínas importantes para produção da IL-1 $\beta$  na progressão da caquexia no fígado.

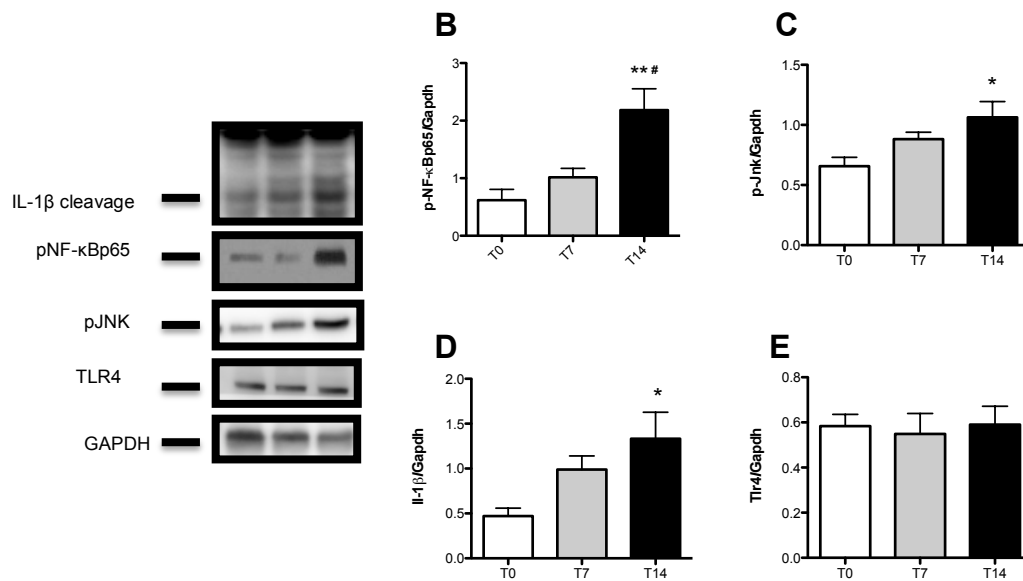
A expressão dos genes de Tlr4, Tlr2, Ccl-2 e F4/80 (Figuras 10-A, E, F e G) aumentou no T14 em relação ao T0 (p<0,01), enquanto a expressão gênica de CD68 (Figura 8-H) apresentou-se aumentada no dia 7 e manteve-se até o dia 14 (p<0,01). Em adição,

encontramos aumento no conteúdo proteico de pNF- $\kappa$ Bp65 e pJNK (Figuras 11-B e C) no T14 comparado com T0 ( $p < 0,05$ ), apesar de observarmos que a expressão gênica de NF- $\kappa$ Bp65, MyD88 e Traf-6 não estar alterada durante o desenvolvimento da caquexia.



**Figura 10-** Expressão gênica dos fatores de transcrição envolvidos na via inflamatória no fígado durante a progressão da caquexia. A- expressão gênica de Tlr4. B- expressão gênica de Myd88. C- expressão gênica de Traf6. D- expressão gênica de NF- $\kappa$ Bp65. E- expressão gênica de Tlr2. F- expressão gênica de Ccl2. G- expressão gênica de CD68. H- expressão gênica de F4/80. T0, T7 e T14: tempo em dias após a inoculação das células tumorais. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão; n=5/grupo. \* $p < 0,05$  vs T0; \*\* $p < 0,001$  vs T0; \*\*\* $p < 0,0001$  vs T0; ## $p < 0,001$  vs T7; \$\$ $p < 0,001$  vs todos os tempos.

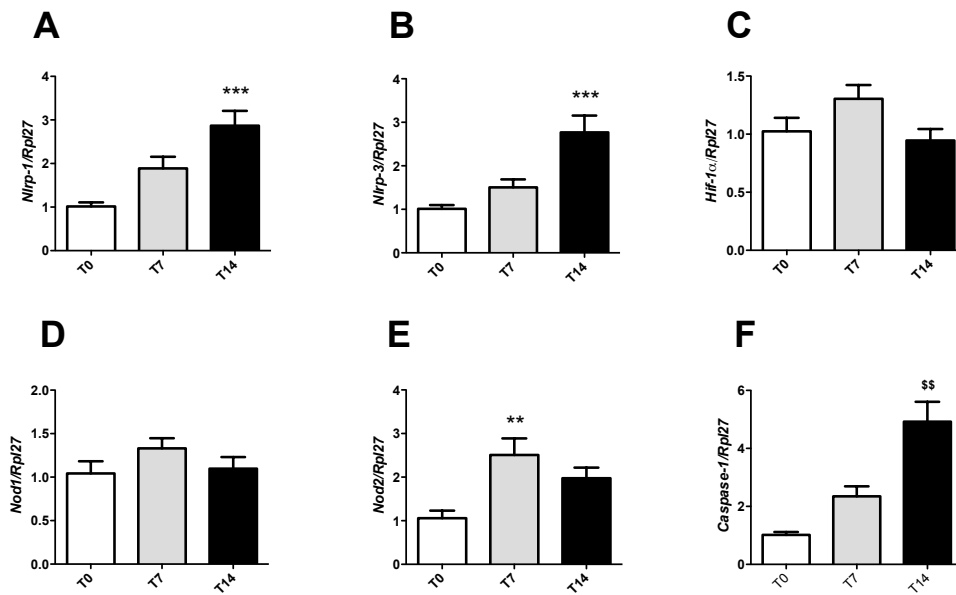




**Figura 11-** Expressão proteica no fígado durante a progressão da caquexia. A- As imagens dos blots selecionadas são representativas para pNF- $\kappa$ Bp65, pJnk, Tlr4 e IL-1 $\beta$  (total e a forma clivada) e Gapdh (proteína normalizadora), B-F expressão proteica foi realizada pelo software *Image j*. T0, T7 e T14: tempo em dias após a inoculação das células tumorais. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão; n=3/grupo. \* $p$ <0,05 vs T0; \*\* $p$ <0,001 vs T0; # $p$ <0,05 vs T7.

Semelhantemente ao encontrado no adipócito isolado de MEa, encontramos, no fígado, aumento da proteína IL-1 $\beta$  clivada. Assim, fomos analisar a expressão gênica de genes importante da via do inflamassoma.

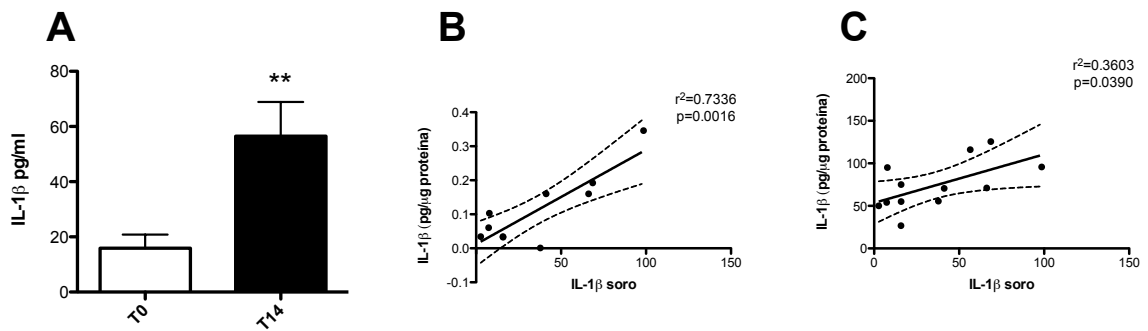
A expressão gênica de Nlrp-1, -3 e Caspase-1 (Figura 12-A, B e F) aumentou no T14 comparado aos tempos ( $p$ <0,01), enquanto a expressão do gene Nod 2 (Figura 12-E) elevou-se apenas no T7 ( $p$ <0,01), retornando ao nível basal no T14. Em seguida, avaliamos o conteúdo proteico de IL-1 $\beta$  clivada (Figura 10-D), que apresentou-se elevada na fase terminal da caquexia ( $p$ <0,05), concomitantemente com a expressão dos genes envolvido na via do inflamassoma.



**Figura 12-** Expressão gênica da via do inflamassoma no fígado durante a progressão da caquexia. T0, T7 e T14: tempo em dias após a inoculação das células tumorais. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão;  $n=5$ /grupo. A- Expressão gênica de Nlrp1. B- Expressão gênica de Nlrp3. C- Expressão gênica de Hif-1 $\alpha$ . D- Expressão gênica de Nod1. E- Expressão gênica de Nod2. F- Expressão gênica de Caspase 1. \* $p<0,05$  vs T0; \*\* $p<0,001$  vs T0; \*\*\* $p<0,0001$  vs T0; \$\$ $p<0,001$  vs comparado todos os tempos.

### 5.5 Contribuição do tecido adiposo e fígado para o desenvolvimento da inflamação sistêmica

Para avaliar se o adipócito e as células imunológicas residentes no fígado estavam contribuindo para a inflamação sistêmica, decidimos avaliar o perfil da proteína IL-1 $\beta$  no soro dos animais. Encontramos aumento da proteína IL-1 $\beta$  sérica (Figura 13-A) no T14 ( $p<0,01$ ). Após detectarmos o quadro de inflamação sistêmica nos animais, buscamos observar qual seria a correlação do aumento sérico dessa proteína com aqueles verificados no MEa e no fígado. Encontramos, tanto para o MEa quanto para o fígado (Figuras 13-B e C), correlação positiva e significativa ( $p<0,001$  e  $0,03$ ). Sendo assim, os resultados sugerem que ambos, MEa e células imunes residentes no fígado, podem estar contribuindo como mantenedores da inflamação sistêmica.

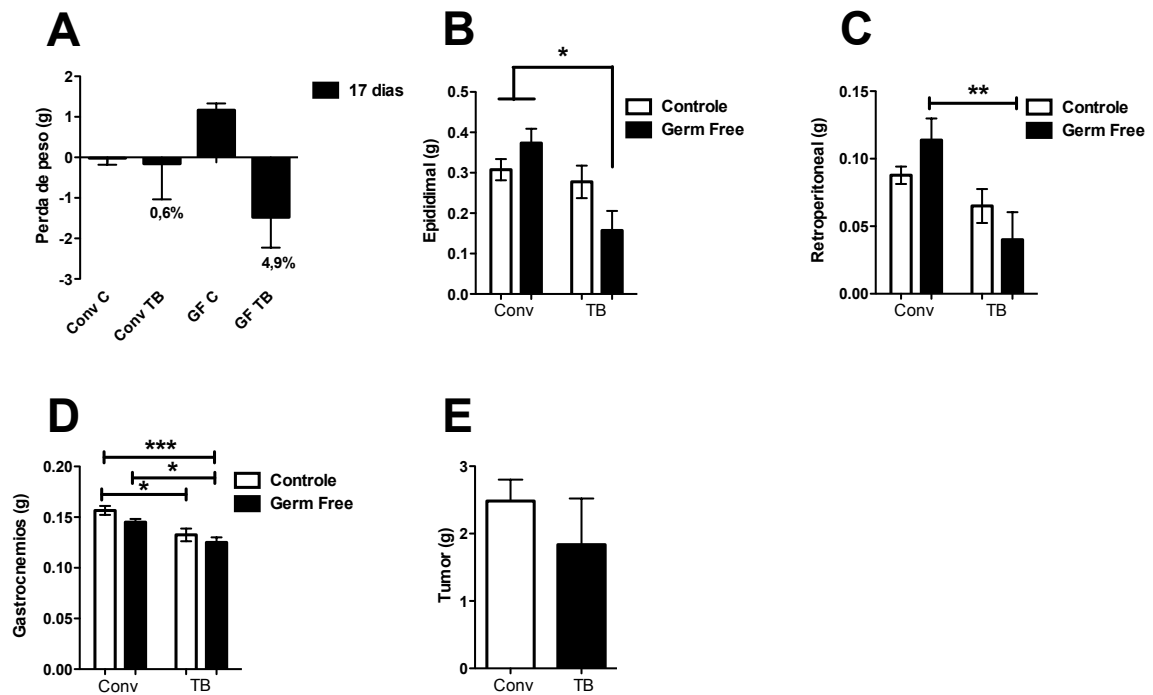


**Figura 13-** IL-1 $\beta$  sérica durante na fase terminal da caquexia. Os resultados estão expresso como média (n=5-7)  $\pm$  E.P.M. O soro foi coletado no tempo T0 e T14 após a inoculação das células tumorais. \*\*p<0,01 vs T0.

## 5.6 Resultados do estudo da microbiota

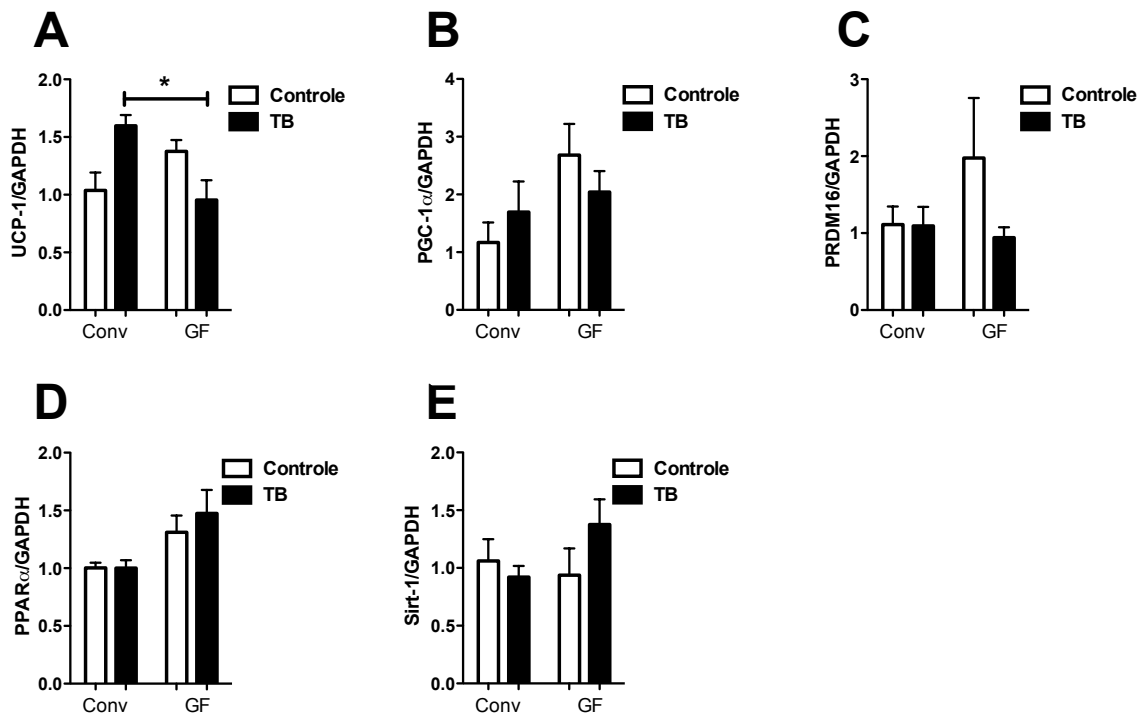
Utilizamos o modelo de camundongo *Germ Free* para avaliar o quanto a microbiota pode estar relacionada com o desenvolvimento da caquexia induzida pelo carcinoma de Lewis *Lung Carcinoma* (LLC).

Neste protocolo, os camundongos foram acompanhados por 17 dias após a inoculação das células tumorais e eutanasiados. Quando avaliamos o peso corporal dos grupos estudados (Figuras 14- A e B), verificamos que, no 17 $^{\circ}$ . Dia, os animais *Germ Free* com tumor apresentaram redução de 4,9%, enquanto que, nos convencionais com tumor, essa redução foi de 0,6% (p<0,05). Em adição, verificamos que os depósitos adiposos EP e RP (Figuras 14- C e D) reduziram no *Germ Free* tumor comparado aos controles tanto convencional quanto *Germ Free* (p<0,05). No entanto, observamos redução do peso muscular do gastrocnêmio (Figura 14-F) em ambos os grupos com tumor, convencional e *Germ Free*, comparados aos controles (p<0,05).



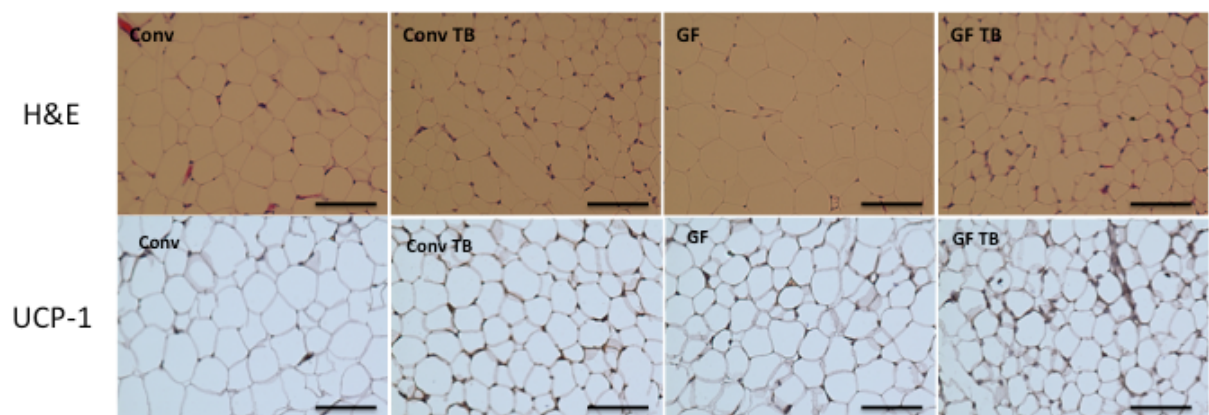
**Figura 14-** Perda de peso e peso dos tecidos dos grupos Convencionais e *Germ Free*, com e sem caquexia. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão; n=4-8grupo. A- Perda de peso corporal, B- Peso do epididimal, C- Peso do retroperitoneal, D- Peso do gastrocnêmio e E- Peso do tumor. Conv= Convencional, GF= Germ Free e TB= tumor. \*p<0,05; \*\*p<0,001; \*\*\*p<0,0001.

Em seguida, fomos verificar qual mecanismo poderia estar relacionado com a antecipação da caquexia no modelo *Germ Free*, em termos de seu efeito sobre o TAB. A literatura sustenta que o TAB pode sofrer *browning* no desenvolvimento da caquexia (KIR et al., 2016). Avaliamos genes específicos relacionados a esse perfil de alteração, como UCP-1, PPAR- $\alpha$ , PRDM16, PGC-1 $\alpha$  e Sirt-1 (Figuras 15- A, B, C, D e E). Contudo, nenhum dos genes estudados apresentou alteração de expressão no grupo *Germ Free* tumor quando comparados aos demais.



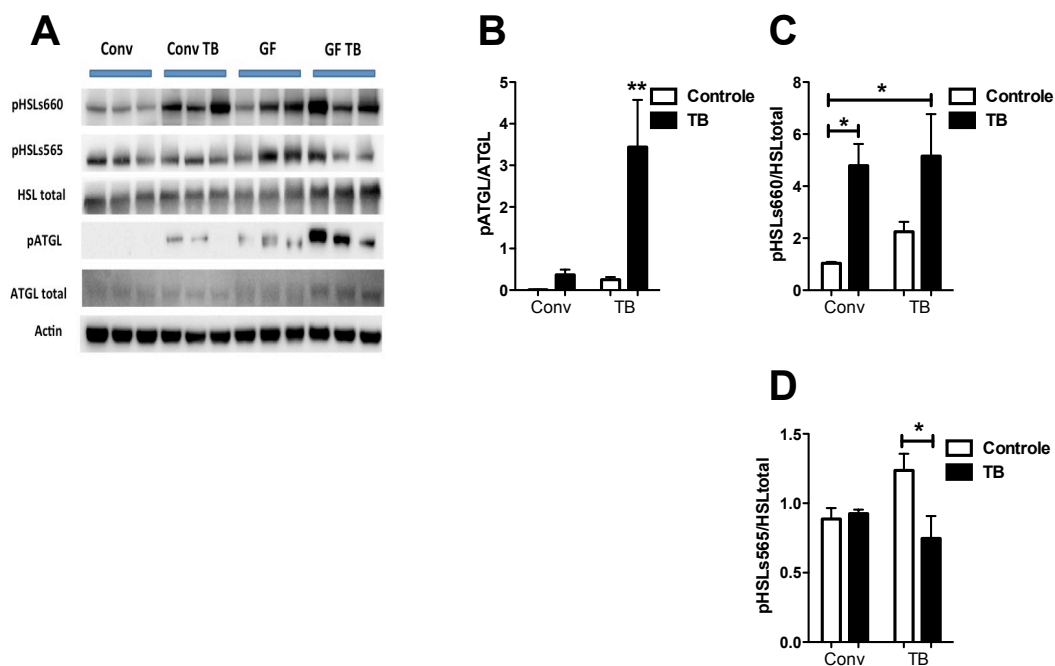
**Figura 15-** Expressão gênica no TAB, epididimal, durante a progressão da caquexia. A- Expressão gênica UCP-1, B- Expressão gênica de PGC-1 $\alpha$ , C- Expressão gênica de PRMD16, D- Expressão gênica de PPAR $\alpha$  e E- Expressão gênica de Sirt-1. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão; n=4-8/grupo. Conv= Convencional, GF= Germ Free e TB= tumor. \*p<0,05.

Para confirmar que o processo de *browning* não está ativo, obtivemos imagens histológicas do TAB epididimal, bem como marcação para UCP-1 (Figura 16). Novamente, observamos que o grupo *Germ Free* tumor não apresenta a via do *browning* aumentada, pois a expressão da proteína UCP-1 não foi distinta entre os grupos analisados, sugerindo que outras vias podem ser responsáveis pela redução do TAB.



**Figura 16-** Coloração de Hematoxilina e Eosina (H&E) e imunohistoquímica para UCP-1. Conv= Convencional, GF= Germ Free e TB= tumor. A escala é de 100  $\mu$ m.

De acordo com a literatura, a via da lipólise é bem caracterizada na caquexia associada ao câncer; sendo assim, avaliamos proteínas importantes da via lipolítica. A proteína ATGL fosforilada (Figura 17- B) aumentou apenas no grupo *Germ Free* tumor ( $p<0,01$ ), comparando todos os grupos, enquanto a HSL fosforilada no sítio serina 660 (Figura 17- C) aumentou nos grupos convencional e *Germ Free* tumores ( $p<0,05$ ). Quando avaliamos a HSL fosforilada no sítio serina 565 (Figura 17- D), responsável pela inibição da lipólise, apenas o grupo *Germ Free* controle apresentou aumento comparado ao grupo *Germ Free* tumor ( $p<0,05$ ).



**Figura 17-** Expressão proteica da via da lipólise no TAB, epididimal, durante a progressão da caquexia. A- As imagens dos blots selecionadas são representativas para pATGL, pHSLs660, pHSLs565 e Actin (proteína normalizadora), B-D expressão proteica foi realizada pelo software *Image j*. T. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão; n=3/grupo Conv= Convencional, GF= Germ Free e TB= tumor. \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,001$  vs todos os grupos.

## 6 DISCUSSÃO

A caquexia é caracterizada pela progressiva perda de tecido muscular e adiposo, acompanhada pelo distúrbio do perfil bioquímico e pela produção de citocinas pró-inflamatórias, tanto em pacientes com câncer quanto em modelos animais (DONATTO et al., 2013; EVANS et al., 2008; TISDALE, 1997). Durante a progressão da caquexia, há efetiva contribuição de compartimentos e órgãos, como TAB, nas inflamações sistêmica e crônica (DALAMAGA, 2013; DONATTO et al., 2013 LIRA et al., 2009; LIRA et al., 2011; LIRA; CARNEVALI, et al., 2012; LIRA; YAMASHITA, et al., 2012;). Frente a esses achados, surgiram-nos algumas dúvidas: 1) Existe heterogeneidade na capacidade inflamatória nos diferentes depósitos de TAB na progressão da caquexia? 2) Qual é a contribuição dos adipócitos *per se* para a inflamação do TAB? 3) Qual é contribuição do fígado nesse cenário? 4) Há contribuição do fígado? Para responder essas questões, estudamos a progressão da caquexia no modelo animal de carcinossarcoma Walker 256.

Todos os diferentes depósitos de TAB mostraram expressão de citocinas inflamatórias aumentada com a progressão da caquexia. No entanto, somente o conteúdo proteico de IL-1 $\beta$  foi consistentemente aumentado em todos os depósitos estudados. O conteúdo proteico de Tnf- $\alpha$  mostrou-se aumentado somente em TAE no estágio final da caquexia. Nossos resultados corroboram os importantes estudos realizados para descrever a biologia de cada depósito anatômico, uma vez que é bem caracterizado que os TAB de diferentes regiões anatômicas têm heterogeneidade na organização microanatômica, no metabolismo e nos aspectos fisiológicos e moleculares (DIGIROLAMO et al., 1998; POND, 1999).

Um estudo demonstrou heterogeneidade da resposta TAB durante a progressão da caquexia (BATISTA et al., 2013). O TAB subcutâneo reage mais rapidamente à síndrome já no início da caquexia, com o aumento na secreção de citocinas inflamatórias, quando comparado ao depósito mesentérico, em pacientes com caquexia associada ao câncer (BATISTA et al., 2013). Em nossos resultados, avaliamos diferentes depósitos adiposos viscerais e mostramos que o TAE apresentou leve inflamação inicial, quando comparado aos demais depósitos. Parece claro que os tecidos adiposos de diferentes depósitos apresentam dinâmica distinta em resposta à síndrome. No entanto, não havia, até momento, estudos para diagnosticar a contribuição dos adipócitos *per se* na inflamação tecidual. Estudos realizados em animais ou em humanos obesos mostram a grande participação das células do sistema

imune, infiltradas no TAB, como gatilho da inflamação tecidual (FOSTER; PAGLIASSOTTI, 2012; HAUSMAN et al., 2003; LEE et al., 2014; LEE; PETKOVA; GRANNEMAN, 2013; MACHADO; COSTA ROSA; SEELAENDER, 2004).

Após verificar que os TAB apresentaram inflamação local, como já demonstrado na literatura, fomos avaliar o comportamento das células adiposas isoladas de cada tecido.

Os adipócitos isolados de TARP apresentaram perfil anti-inflamatório, visto que o conteúdo proteico de IL-10 apresentou-se elevado, enquanto, na contramão, o conteúdo proteico de IL-1 $\beta$  apresentou-se igual ao do controle na fase terminal da caquexia. Assim, o RPa parece tentar contrabalançar a inflamação local ocasionada pela alta concentração da proteína IL-1 $\beta$  – essa sendo proveniente da FVE, considerando sua concentração elevada no tecido (TARP). Em contraste, os adipócitos isolados a partir dos tecidos mesentérico e epididimal mostraram nítido perfil pró-inflamatório. Em Ea, observamos secreção de citocinas na fase inicial, enquanto que a inflamação em MEa aconteceu na fase terminal da caquexia. Os adipócitos de ambos os depósitos contribuem de forma consistente para inflamação local, na fase terminal da caquexia, podendo ser relevantes também para o início da inflamação sistêmica.

Tais diferenças confirmam a heterogeneidade entre os adipócitos obtidos a partir de diferentes depósitos viscerais; enquanto MEa e Ea exibiram padrão pró-inflamatório progressivo, RPa aumentou a expressão da proteína de IL-10. Um estudo recente mostrou que os diferentes depósitos de TAB derivam de origens embrionárias distintas (CHAU et al., 2014). Podemos, assim, sugerir que a resposta heterogênea exibida pelas células isoladas a partir dos depósitos pode estar relacionada com a diversidade intrínseca destas células.

Depois de examinar a produção de citocinas inflamatórias nas células adiposas isoladas dos diferentes depósitos, investigamos, nos mesmos, se as vias intracelulares poderiam estar associadas com a modulação da inflamação. Em primeiro lugar, analisamos a via clássica envolvida em processos inflamatórios crônicos: NF- $\kappa$ B (KIM et al., 2013; TAMAI et al., 2010). A literatura fornece evidências detalhadas de que a via do NF- $\kappa$ B, no tecido adiposo e no fígado, é modulada na presença da obesidade (NOV et al., 2013; YIN, LEE et al., 2014; YIN, PENG et al., 2014), sendo que o mesmo trajeto de sinal é sugerido para modelos animais e pacientes com caquexia associada ao câncer (BATISTA et al., 2013; DONATTO et al., 2013).

Nossos resultados confirmam que o aumento da concentração das citocinas pró-inflamatórias, em MEa e Ea, foi acompanhado por maior expressão proteica do fator de transcrição NF- $\kappa$ Bp65 e do conteúdo proteico de MyD88. Na obesidade, o aumento da



atividade de NF- $\kappa$ Bp65 foi atribuído à infiltração de células imunitárias, ao invés dos adipócitos (LEE et al., 2014; LEE; LEE, 2014; RAHMAN et al., 2012). Este é o primeiro relato do envolvimento de adipócitos com a via do NF- $\kappa$ B durante a inflamação do TAB na caquexia associada ao câncer.

Nós apuramos aumento do conteúdo proteico de IL-1 $\beta$  em todos os TAB e em duas diferentes populações de adipócitos (MEa e Ea). Porém, o aumento da forma bioativa da proteína (IL-1 $\beta$  clivada) foi encontrado apenas em MEa. A proteína IL-1 $\beta$  é um dos principais alvos da via do inflamassoma (SCHRODER; TSCHOPP, 2010). Além de mostrarem que a via do NF- $\kappa$ Bp65 é modulada em MEa e Ea, durante a caquexia, nossos resultados confirmam que a caquexia também é capaz de modular a via do inflamassoma, frente ao aumento da IL-1 $\beta$  clivada e da expressão de genes importantes, como NLPR-1, -3 e Caspase-1, desse complexo proteico. Durante a obesidade, o aumento na atividade da via do inflamassoma está relacionado com a progressão desfavorável da doença.

Muita atenção tem sido dada às proteínas Nlrp-3 e Caspase-1, por desempenharem papel importante para o funcionamento da via (BENETTI et al., 2013; REYNOLDS et al., 2012). Estudos com modelo *knockout* para Nlrp-3 e para Caspase-1 mostram que os animais apresentam resistência a desenvolver obesidade após serem submetidos à dieta rica em gordura. Estes mesmos animais também apresentaram maior sensibilidade à insulina, em comparação com os *wild-type* (STIENSTRA et al., 2011; VANDANMAGSAR et al., 2011). Acreditamos que somos os primeiros a mostrar uma modulação da via inflamassoma nos adipócitos e, ainda, no fígado durante a caquexia associada ao câncer.

O estudo do fígado, por sua vez, apresentou resultados semelhantes ao observados nos TAB: aumento no conteúdo proteico de IL-1 $\beta$ . Como conhecido, o fígado desempenha importante papel no controle das vias metabólicas (KAZANTZIS; SEELAENDER, 2005). Em algumas doenças, incluindo a caquexia, tem sido observado desequilíbrio das taxas metabólicas; por consequência, tem se atribuído a este órgão importante papel no desencadeamento do caos metabólico, característico da síndrome (ROSA; KAZANTZIS; SEELAENDER, 1998; SEELAENDER; KAZANTZIS; COSTA ROSA, 1999).

Diferentes tipos celulares compõem o fígado; por exemplo, as células imunitárias, representadas no órgão por grande diversidade de macrófagos, conhecidas como as células de Kuppfer (TAKEZAWA; WATANABE; AKAIKE, 1995). Estudos em obesos mostraram que o número das células de Kuppfer aumentou nesses pacientes (BERTOLA et al., 2010). Observamos que, no fígado dos animais caquéticos, houve aumento qualitativo dos macrófagos residentes nos tempos analisados ao longo da progressão da caquexia. Por isso,

especulamos esse aumento de macrófagos infiltrados como um dos fatores responsáveis pelo aumento da IL-1 $\beta$ .

Assim como nos adipócitos, estudamos, no fígado, fatores de transcrição importantes para a produção de IL-1 $\beta$ . Novamente, a expressão de NF- $\kappa$ B apresentou-se elevada e concomitante à do fator de transcrição JNK. Isso sugere que a caquexia é capaz de não só modular a inflamação nos adipócitos (MEa), mas também no fígado, induzindo a produção de IL-1 $\beta$ . Da mesma forma, encontramos o conteúdo da proteína IL-1 $\beta$  clivada aumentada e, conseqüentemente, os genes da via do inflamassoma.

Finalmente, investigamos o quanto os adipócitos e o fígado estariam comprometidos com a inflamação sistêmica, tendo, para isso, verificado o conteúdo sérico da proteína IL-1 $\beta$ . Corroborando a literatura, nossos animais apresentaram inflamação sistêmica no estágio terminal da caquexia (DE MATOS-NETO et al., 2015). Ao correlacionarmos o conteúdo sérico da proteína IL-1 $\beta$  com sua produção pelo MEa e pelo fígado, identificamos significâncias positivas para ambos e demonstramos que os hospedeiros (adipócitos e fígado) contribuem como mantenedores da inflamação sistêmica durante o quadro de caquexia associada ao câncer.

Na segunda fase do estudo, examinamos o quanto a microbiota intestinal poderia estar modulada na progressão da caquexia. Para isso, estudamos o modelo de caquexia associada ao câncer, utilizando as LLC por 17 dias após a inoculação das células tumorais no modelo de camundongos *Germ Free*.

De acordo com a literatura, a composição da microbiota está relacionada com mudanças na função barreira das células epiteliais, as quais incluem permeabilidade e função das células imunológicas. Tem sido discutido que o microbioma está envolvido com o metabolismo energético e, conseqüentemente, com o estado nutricional (GENTON; CANI; SCHRENZEL, 2015).

O estudo da microbiota na caquexia é ainda novo na literatura, todavia, alguns autores relatam a influência da microbiota na progressão da doença (VARIAN et al., 2016). Foi verificado que pacientes caquéticos com câncer de colo podem ou não apresentar translocação bacteriana. Aqueles que apresentaram translocação bacteriana mostraram redução do número de linfócitos e células *Natural Killer* na circulação. Ademais, proteínas responsáveis pela junção oclusiva foram reduzidas nesses pacientes (JIANG; LIN et al., 2014).

Um estudo semelhante ao anterior, publicado pelo mesmo grupo, mas com pacientes com câncer gastrointestinal, mostrou que, nos pacientes com caquexia e translocação bacteriana no sangue periférico e no sangue da veia cólica, houve aumento das citocinas IL-6,

TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  sérica, quando comparado com pacientes caquéticos sem translocação bacteriana e pacientes com câncer, mas não caquéticos, porém com translocação bacteriana (JIANG; GUO et al., 2014).

Em nosso estudo, verificamos que o modelo de camundongo *Germ Free*, quando caquéticos, apresenta maior perda de peso corporal e de tecidos, como tecido adiposo branco e músculo estriado esquelético, quando comparado aos camundongos convencionais. Nicolas Suárez-Zamorano et al. (SUÁREZ-ZAMORANO et al., 2015) mostraram que camundongos tratados com antibióticos ou *Germ Free* apresentam redução do TAB, quando comparado a controles ou convencional, respectivamente. No entanto, nossos resultados em *Germ Free* controles não apresentaram redução do volume de TAB, quando comparados aos convencionais controles.

Um grupo de pesquisadores usou sódio sulfato dextrano (DSS) para causar danos ao intestino e observou redução da massa muscular e do TAB. Todavia, quando os animais foram tratados com antibióticos, não houve redução do peso corporal após o tratamento de DSS. Esses autores utilizaram espécies específicas de bactérias para identificar a espécie envolvida. Quando os animais foram transfectados com *Burkholderia thailandensis* ou com *Salmonella typhimurium* e tratados com DSS, os animais continuavam a perder peso como o controle tratado com DSS. Contudo, quando eles utilizaram uma outra espécie, *Escherichia spp*, em adição às cepas bacterianas anteriores, os autores relataram resultados semelhantes aos encontrados com o tratamento com antibiótico (SCHIEBER et al., 2015).

Camundongos tratados com antibiótico apresentam aumento de RNA mensageiros e proteínas normalmente expressos em tecido adiposo marrom, caracterizando mudança morfológica de TAB para tecido adiposo marrom, chamado de *browning* (SUÁREZ-ZAMORANO et al., 2015), demonstrando que o mecanismo para redução do TAB é via *browning*. A literatura fornece indícios de aumento de tecido *browning* no TAB de camundongos com caquexia associada ao câncer (KIR et al., 2016). Com essas informações, julgamos pertinente analisar se o tecido adiposo dos animais *Germ Free* caquéticos apresentava expressão aumentada desses genes. Nosso modelo de caquexia, contudo, não permitiu essa alteração, uma vez que o TAB epididimal não teve alteração de expressão gênica de genes importantes para caracterização do aparecimento de adipócitos *browning*.

A via da lipólise é uma das principais estudadas na caquexia e animais *knockout* para ATGL e HSL não mostram a redução do TAB quando inoculados com células tumorais. No entanto, pesquisadores observaram que os camundongos, quando *knockout* para ATGL, apresentavam melhor resposta contra a perda de TAB comparados ao *knockout* para HSL

(DAS et al., 2011). Os animais *Germ Free* com caquexia associada ao câncer apresentaram aumento na expressão proteica da ATGL fosforilada, quando comparados aos animais convencionais, sugerindo que a redução do TAB acentuado em *Germ Free* seja causada pela hiperativação da via lipolítica, em detrimento do processo de *browning*.

Nossos resultados apontam para o papel relevante da modulação pela microbiota intestinal nos efeitos da caquexia sobre o tecido adiposo.

## 7 CONCLUSÃO

A partir dos modelos de indução de caquexia utilizados nessa tese, podemos concluir que:

Ambos os modelos de indução da caquexia associada ao câncer (Walker 256 e LLC) foram eficazes. O modelo de Walker 256 mostrou redução no ganho da massa corpórea e da massa gorda quando comparado a controle de mesma idade, enquanto o modelo LLC ocasionou uma redução de aproximadamente 5% da massa corporal comparado ao início do protocolo.

Os adipócitos isolados dos diferentes depósitos apresentam heterogeneidade durante a progressão da caquexia. RPa apresentou-se com características anti-inflamatórias enquanto que MEa e Ea apresentaram-se com características pró-inflamatórias mostrando o conteúdo elevado de IL-1 $\beta$ .

O fígado, também, apresentou-se com características pró-inflamatórias e consequentemente foi observado um aumento qualitativo de células da linhagem mielóide infiltradas.

Mostramos que genes e proteínas da via do NF- $\kappa$ B apresentaram-se elevados em adipócitos isolados e no fígado de animais caquéticos. Genes da via do inflamassoma apresentaram-se elevados e contudo, verificamos o conteúdo IL-1 $\beta$  clivado aumentado tanto local quanto sérico.

Assim, sugerimos que o hospedeiro deixa de ser apenas vítima durante o quadro de caquexia e passa a ser contribuinte para a inflamação sistêmica crônica.

A integridade da microbiota intestinal apresenta-se extremamente importante no freamento do quadro de caquexia, pois alteração neste ambiente pode antecipar processos caracterizados na síndrome, como a lipólise, visto nesse estudo, agravada em animais *Germ Free*.

Este estudo traz importantes contribuições no estudo da caquexia, ao mostrar mecanismo ainda não estudado, como inflamassoma e também o estudo das células adiposas e fígado como mantenedores do quadro, em adição mostramos a importância da microbiota intestinal para manter o estado normal do TAB durante a progressão da doença. Sugerindo o tratamento com probióticos como forma de atenuar o quadro de caquexia.

## REFERÊNCIAS\*

ACTIS, G. C. The gut microbiome. **Inflamm Allergy Drug Targets**, v. 13, n. 4, p. 217-223, 2014. ISSN 2212-4055. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24953716> >.

ANDREAS, N. J.; KAMPMANN, B.; MEHRING LE-DOARE, K. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. **Early Hum Dev**, v. 91, n. 11, p. 629-635, Nov 2015. ISSN 1872-6232. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26375355> >.

ARGILÉS, J. M.; ALVAREZ, B.; LÓPEZ-SORIANO, F. J. The metabolic basis of cancer cachexia. **Med Res Rev**, v. 17, n. 5, p. 477-498, Sep 1997. ISSN 0198-6325. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9276862> >.

ARGILÉS, J. M. et al. Mediators involved in the cancer anorexia-cachexia syndrome: past, present, and future. **Nutrition**, v. 21, n. 9, p. 977-985, Sep 2005. ISSN 0899-9007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16043325> >.

\_\_\_\_\_. Catabolic mediators as targets for cancer cachexia. **Drug Discov Today**, v. 8, n. 18, p. 838-844, Sep 2003. ISSN 1359-6446. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12963320> >.

\_\_\_\_\_. Cancer cachexia: the molecular mechanisms. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 35, n. 4, p. 405-409, Apr 2003. ISSN 1357-2725. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12565701> >.

\_\_\_\_\_. Optimal management of cancer anorexia-cachexia syndrome. **Cancer Manag Res**, v. 2, p. 27-38, 2010. ISSN 1179-1322. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21188094> >.

BAEUERLE, P. A.; BALTIMORE, D. NF-kappa B: ten years after. **Cell**, v. 87, n. 1, p. 13-20, Oct 1996. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8858144> >.

BATISTA, M. L., JR. et al. Heterogeneous time-dependent response of adipose tissue during the development of cancer cachexia. **J Endocrinol**, v. 215, n. 3, p. 363-373, Dec 2012. ISSN 0022-0795.

\_\_\_\_\_. Adipose tissue-derived factors as potential biomarkers in cachectic cancer patients. **Cytokine**, v. 61, n. 2, p. 532-539, Feb 2013. ISSN 1043-4666.

BATISTA, M. L. et al. Adipose tissue inflammation and cancer cachexia: possible role of nuclear transcription factors. **Cytokine**, v. 57, n. 1, p. 9-16, Jan 2012. ISSN 1096-0023. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22099872> >.

---

\*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BENETTI, E. et al. The NLRP3 Inflammasome as a novel player of the intercellular crosstalk in metabolic disorders. **Mediators Inflamm**, v. 2013, p. 678627, 2013. ISSN 1466-1861. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23843683> >.

BENGMARK, S. Gut microbiota, immune development and function. **Pharmacol Res**, v. 69, n. 1, p. 87-113, Mar 2013. ISSN 1096-1186. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22989504> >.

BERG, A. H.; COMBS, T. P.; SCHERER, P. E. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. **Trends Endocrinol Metab**, v. 13, n. 2, p. 84-89, Mar 2002. ISSN 1043-2760. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11854024> >.

BERNARD, N. J.; O'NEILL, L. A. Mal, more than a bridge to MyD88. **IUBMB Life**, v. 65, n. 9, p. 777-786, Sep 2013. ISSN 1521-6551. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23983209> >.

BERTOLA A.; BONNAFOUS S.; ANTY R.; PATOURAUX S.; SAINT-PAUL MC.; IANNELLI A.; GUGENHEIM J.; BARR J.; MATO J. M.; LE MARCHAND-BRUSTEL Y.; TRAN A.; GUAL P. Hepatic expression patterns of inflammatory and immune response genes associated with obesity and NASH in morbidly obese patients. **PLoS One** 5: e13577, 2010.

BING, C. et al. Zinc-alpha2-glycoprotein, a lipid mobilizing factor, is expressed in adipocytes and is up-regulated in mice with cancer cachexia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 8, p. 2500-2505, Feb 2004. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14983038> >.

\_\_\_\_\_. Increased gene expression of brown fat uncoupling protein (UCP)1 and skeletal muscle UCP2 and UCP3 in MAC16-induced cancer cachexia. **Cancer Res**, v. 60, n. 9, p. 2405-2410, May 2000. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10811117> >.

BING, C.; TRAYHURN, P. Regulation of adipose tissue metabolism in cancer cachexia. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 11, n. 3, p. 201-207, May 2008. ISSN 1363-1950. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18403913> >.

BRUMBAUGH, D. E. et al. Mode of Delivery Determines Neonatal Pharyngeal Bacterial Composition and Early Intestinal Colonization. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, Mar 2016. ISSN 1536-4801. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27035381> >.

BRUUN, J. M. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 release is higher in visceral than subcutaneous human adipose tissue (AT): implication of macrophages resident in the AT. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 90, n. 4, p. 2282-2289, Apr 2005. ISSN 0021-972X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15671098> >.

BÖRNIGEN, D. et al. Functional profiling of the gut microbiome in disease-associated inflammation. **Genome Med**, v. 5, n. 7, p. 65, 2013. ISSN 1756-994X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23906180> >.

CAMARGO, R. G. et al. NF- $\kappa$ Bp65 and Expression of Its Pro-Inflammatory Target Genes Are Upregulated in the Subcutaneous Adipose Tissue of Cachectic Cancer Patients. **Nutrients**, v. 7, n. 6, p. 4465-4479, Jun 2015. ISSN 2072-6643. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26053616> >.

CANI, P. D. et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. **Diabetes**, v. 57, n. 6, p. 1470-1481, Jun 2008. ISSN 1939-327X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18305141> >.

CHAU, Y. Y. et al. Visceral and subcutaneous fat have different origins and evidence supports a mesothelial source. **Nat Cell Biol**, v. 16, n. 4, p. 367-375, Apr 2014. ISSN 1476-4679. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24609269> >.

DALAMAGA, M. Interplay of adipokines and myokines in cancer pathophysiology: Emerging therapeutic implications. **World J Exp Med**, v. 3, n. 3, p. 26-33, Aug 2013. ISSN 2220-315X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24520543> >.

DAS, S. K. et al. Adipose triglyceride lipase contributes to cancer-associated cachexia. **Science**, v. 333, n. 6039, p. 233-238, Jul 2011. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21680814> >.

DE MATOS-NETO, E. M. et al. Systemic Inflammation in Cachexia - Is Tumor Cytokine Expression Profile the Culprit? **Front Immunol**, v. 6, p. 629, 2015. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26732354> >.

DIGIROLAMO, M.; FINE, J. B. Cellularity measurements. **Methods Mol Biol**, v. 155, p. 65-75, 2001. ISSN 1064-3745. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11293084> >.

DIGIROLAMO, M. et al. Qualitative regional differences in adipose tissue growth and cellularity in male Wistar rats fed ad libitum. **Am J Physiol**, v. 274, n. 5 Pt 2, p. R1460-1467, May 1998. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9612415> >.

DING, S. et al. High-fat diet: bacteria interactions promote intestinal inflammation which precedes and correlates with obesity and insulin resistance in mouse. **PLoS One**, v. 5, n. 8, p. e12191, 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20808947> >.

DONATTO, F. F. et al. Resistance exercise modulates lipid plasma profile and cytokine content in the adipose tissue of tumour-bearing rats. **Cytokine**, v. 61, n. 2, p. 426-432, Feb 2013. ISSN 1043-4666.

DUMAS, J. F. et al. Efficiency of oxidative phosphorylation in liver mitochondria is decreased in a rat model of peritoneal carcinosis. **J Hepatol**, v. 54, n. 2, p. 320-327, Feb 2011. ISSN 1600-0641. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21094554> >.

EVANS, W. J. et al. Cachexia: a new definition. **Clin Nutr**, v. 27, n. 6, p. 793-799, Dec 2008. ISSN 1532-1983. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18718696> >.



FEARON, K. et al. Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. **Lancet Oncol**, v. 12, n. 5, p. 489-495, May 2011. ISSN 1474-5488. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21296615> >.

FEARON, K. C.; MOSES, A. G. Cancer cachexia. **Int J Cardiol**, v. 85, n. 1, p. 73-81, Sep 2002. ISSN 0167-5273. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12163211> >.

FOSTER, M. T.; PAGLIASSOTTI, M. J. Metabolic alterations following visceral fat removal and expansion: Beyond anatomic location. **Adipocyte**, v. 1, n. 4, p. 192-199, Oct 2012. ISSN 2162-3945. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23700533> >.

GENTON, L.; CANI, P. D.; SCHRENZEL, J. Alterations of gut barrier and gut microbiota in food restriction, food deprivation and protein-energy wasting. **Clin Nutr**, v. 34, n. 3, p. 341-349, Jun 2015. ISSN 1532-1983. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25459400> >.

GUILHERME, A. et al. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, n. 5, p. 367-377, May 2008. ISSN 1471-0080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18401346> >.

GUO, H.; CALLAWAY, J. B.; TING, J. P. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. **Nat Med**, v. 21, n. 7, p. 677-687, Jul 2015. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26121197> >.

HAUSMAN, D. B. et al. The biology of white adipocyte proliferation. **Obes Rev**, v. 2, n. 4, p. 239-254, Nov 2001. ISSN 1467-7881. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12119995> >.

\_\_\_\_\_. Regional fat pad growth and cellularity in obese zucker rats: modulation by caloric restriction. **Obes Res**, v. 11, n. 5, p. 674-682, May 2003. ISSN 1071-7323. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12740458> >.

HIDA, N. et al. Commensal bacteria control cancer response to therapy by modulating the tumor microenvironment. **Science**, v. 342, n. 6161, p. 967-970, Nov 2013. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24264989> >.

INUI, A. Cancer anorexia-cachexia syndrome: current issues in research and management. **CA Cancer J Clin**, v. 52, n. 2, p. 72-91, 2002 Mar-Apr 2002. ISSN 0007-9235. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11929007> >.

JIANG, Y. et al. The altered tight junctions: an important gateway of bacterial translocation in cachexia patients with advanced gastric cancer. **J Interferon Cytokine Res**, v. 34, n. 7, p. 518-525, Jul 2014. ISSN 1557-7465. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24720758> >.

\_\_\_\_\_. Bacterial translocation contributes to cachexia and its possible pathway in patients with colon cancer. **J Clin Gastroenterol**, v. 48, n. 2, p. 131-137, Feb 2014. ISSN 1539-2031. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24162171> >.

JO, E. K. et al. Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. **Cell Mol Immunol**, v. 13, n. 2, p. 148-159, Mar 2016. ISSN 2042-0226. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26549800> >.

KAZANTZIS, M.; SEELAENDER, M. C. Cancer cachexia modifies the zonal distribution of lipid metabolism-related proteins in rat liver. **Cell Tissue Res**, v. 321, n. 3, p. 419-427, Sep 2005. ISSN 0302-766X (Print) 0302-766x.

KIM, S. et al. Endoplasmic reticulum stress is sufficient for the induction of IL-1 $\beta$  production via activation of the NF- $\kappa$ B and inflammasome pathways. **Innate Immun**, Nov 2013. ISSN 1753-4267. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24217221> >.

KRIEG, A. M. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. **Annu Rev Immunol**, v. 20, p. 709-713, 2002. ISSN 0732-0582. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11861616> >.

LAPPAS, M. Activation of inflammasomes in adipose tissue of women with gestational diabetes. **Mol Cell Endocrinol**, v. 382, n. 1, p. 74-83, Jan 2014. ISSN 1872-8057. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24055273> >.

LATZ, E. The inflammasomes: mechanisms of activation and function. **Curr Opin Immunol**, v. 22, n. 1, p. 28-33, Feb 2010. ISSN 1879-0372. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20060699> >.

LEE, B. C.; LEE, J. Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. **Biochim Biophys Acta**, v. 1842, n. 3, p. 446-462, Mar 2014. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23707515> >.

LEE, Y. H.; PETKOVA, A. P.; GRANNEMAN, J. G. Identification of an adipogenic niche for adipose tissue remodeling and restoration. **Cell Metab**, v. 18, n. 3, p. 355-367, Sep 2013. ISSN 1932-7420. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24011071> >.

LEE, Y. H. et al. Exploring the activated adipogenic niche: interactions of macrophages and adipocyte progenitors. **Cell Cycle**, v. 13, n. 2, p. 184-190, Jan 2014. ISSN 1551-4005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24394850> >.

LIRA, F. S. et al. Exercise intensity modulation of hepatic lipid metabolism. **J Nutr Metab**, v. 2012, p. 809576, 2012. ISSN 2090-0724.

\_\_\_\_\_. Regulation of inflammation in the adipose tissue in cancer cachexia: effect of exercise. **Cell Biochem Funct**, v. 27, n. 2, p. 71-75, Mar 2009. ISSN 1099-0844. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19226603> >.

\_\_\_\_\_. Exercise training decreases adipose tissue inflammation in cachectic rats. **Horm Metab Res**, v. 44, n. 2, p. 91-98, Feb 2012. ISSN 1439-4286. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22266827> >.

\_\_\_\_\_. Hypothalamic inflammation is reversed by endurance training in anorectic-cachectic rats. **Nutr Metab (Lond)**, v. 8, n. 1, p. 60, 2011. ISSN 1743-7075.

LIU, Z. et al. Human Breast Milk and Infant Formulas Differentially Modify the Intestinal Microbiota in Human Infants and Host Physiology in Rats. **J Nutr**, v. 146, n. 2, p. 191-199, Feb 2016. ISSN 1541-6100. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26674765> >.

MACHADO, A. P.; COSTA ROSA, L. F.; SEELAENDER, M. C. Adipose tissue in Walker 256 tumour-induced cachexia: possible association between decreased leptin concentration and mononuclear cell infiltration. **Cell Tissue Res**, v. 318, n. 3, p. 503-514, Dec 2004. ISSN 0302-766X (Print) 0302-766x.

MADRIGAL-MATUTE, J.; CUERVO, A. M. Regulation of Liver Metabolism by Autophagy. **Gastroenterology**, v. 150, n. 2, p. 328-339, Feb 2016. ISSN 1528-0012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26453774> >.

MAGNANI, M. et al. The ubiquitin-dependent proteolytic system and other potential targets for the modulation of nuclear factor-kB (NF-kB). **Curr Drug Targets**, v. 1, n. 4, p. 387-399, Dec 2000. ISSN 1389-4501. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11467077> >.

MARCOBAL, A. et al. A metabolomic view of how the human gut microbiota impacts the host metabolome using humanized and gnotobiotic mice. **ISME J**, v. 7, n. 10, p. 1933-1943, Oct 2013. ISSN 1751-7370. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23739052> >.

MARTIGNONI, M. E. et al. Liver macrophages contribute to pancreatic cancer-related cachexia. **Oncol Rep**, v. 21, n. 2, p. 363-369, Feb 2009. ISSN 1021-335X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19148509> >.

MARTINON, F.; MAYOR, A.; TSCHOPP, J. The inflammasomes: guardians of the body. **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 229-265, 2009. ISSN 0732-0582. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19302040> >.

MITCHELL, S.; VARGAS, J.; HOFFMANN, A. Signaling via the NFκB system. **Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med**, Mar 2016. ISSN 1939-005X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26990581> >.

MOHAMED, M. R.; MCFADDEN, G. NFκB inhibitors: strategies from poxviruses. **Cell Cycle**, v. 8, n. 19, p. 3125-3132, Oct 2009. ISSN 1551-4005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19738427> >.

MUELLER, N. T. et al. Birth mode-dependent association between pre-pregnancy maternal weight status and the neonatal intestinal microbiome. **Sci Rep**, v. 6, p. 23133, 2016. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27033998> >.

MUSCARITOLI, M. et al. Consensus definition of sarcopenia, cachexia and pre-cachexia: joint document elaborated by Special Interest Groups (SIG) "cachexia-anorexia in chronic wasting diseases" and "nutrition in geriatrics". **Clin Nutr**, v. 29, n. 2, p. 154-159, Apr 2010. ISSN 1532-1983. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20060626> >.

NARSALE, A. A. et al. Liver Inflammation and Metabolic Signaling in ApcMin/+ Mice: The Role of Cachexia Progression. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0119888, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25789991> >.

NEVES, R. X. et al. **White adipose tissue cells and the progression of cachexia inflammatory pathways**, **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle Early View**. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**: n/a p. 2015.

NOLAN, G. P. et al. The bcl-3 proto-oncogene encodes a nuclear I kappa B-like molecule that preferentially interacts with NF-kappa B p50 and p52 in a phosphorylation-dependent manner. **Mol Cell Biol**, v. 13, n. 6, p. 3557-3566, Jun 1993. ISSN 0270-7306. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8497270> >.

NOV, O. et al. Interleukin-1beta regulates fat-liver crosstalk in obesity by auto-paracrine modulation of adipose tissue inflammation and expandability. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e53626, 2013. ISSN 1932-6203.

PENDERS, J. et al. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. **Pediatrics**, v. 118, n. 2, p. 511-521, Aug 2006. ISSN 1098-4275. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16882802> >.

POND, C. M. Physiological specialisation of adipose tissue. **Prog Lipid Res**, v. 38, n. 3, p. 225-248, May 1999. ISSN 0163-7827. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10664794> >.

RABOT, S. et al. Germ-free C57BL/6J mice are resistant to high-fat-diet-induced insulin resistance and have altered cholesterol metabolism. **FASEB J**, v. 24, n. 12, p. 4948-4959, Dec 2010. ISSN 1530-6860. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20724524> >.

RAHMAN, S. M. et al. CCAAT/enhancer-binding protein  $\beta$  (C/EBP $\beta$ ) expression regulates dietary-induced inflammation in macrophages and adipose tissue in mice. **J Biol Chem**, v. 287, n. 41, p. 34349-34360, Oct 2012. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22902781> >.

REYNOLDS, C. M. et al. Dietary saturated fatty acids prime the NLRP3 inflammasome via TLR4 in dendritic cells-implications for diet-induced insulin resistance. **Mol Nutr Food Res**, v. 56, n. 8, p. 1212-1222, Aug 2012. ISSN 1613-4133. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22700321> >.

RIUS, J. et al. NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha. **Nature**, v. 453, n. 7196, p. 807-811, Jun 2008. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18432192> >.

ROSA, L. F.; KAZANTZIS, M.; SEELAENDER, M. C. The effect of Walker-256 tumour development upon Kupffer cell metabolism. **Cell Biochem Funct**, v. 16, n. 3, p. 195-202, Sep 1998. ISSN 0263-6484 (Print) 0263-6484.

SCHERER, P. E. et al. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. **J Biol Chem**, v. 270, n. 45, p. 26746-26749, Nov 1995. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7592907> >.

SCHIEBER, A. M. et al. Disease tolerance mediated by microbiome *E. coli* involves inflammasome and IGF-1 signaling. **Science**, v. 350, n. 6260, p. 558-563, Oct 2015. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26516283> >.

SCHRODER, K.; TSCHOPP, J. The inflammasomes. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 821-832, Mar 2010. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20303873> >.

SEELAENDER, M. C.; KAZANTZIS, M.; COSTA ROSA, L. F. The effect of adrenaline and Walker-256 tumour-induced cachexia upon Kupffer cell metabolism. **Cell Biochem Funct**, v. 17, n. 3, p. 151-156, Sep 1999. ISSN 0263-6484 (Print) 0263-6484.

SKURK, T. et al. Production and release of macrophage migration inhibitory factor from human adipocytes. **Endocrinology**, v. 146, n. 3, p. 1006-1011, Mar 2005. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15576462> >.

STIENSTRA, R. et al. The inflammasome-mediated caspase-1 activation controls adipocyte differentiation and insulin sensitivity. **Cell Metab**, v. 12, n. 6, p. 593-605, Dec 2010. ISSN 1932-7420. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21109192> >.

\_\_\_\_\_. Inflammasome is a central player in the induction of obesity and insulin resistance. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 37, p. 15324-15329, Sep 2011. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21876127> >.

SUZUKI, N.; SAITO, T. IRAK-4--a shared NF-kappaB activator in innate and acquired immunity. **Trends Immunol**, v. 27, n. 12, p. 566-572, Dec 2006. ISSN 1471-4906. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17046325> >.

SUÁREZ-ZAMORANO, N. et al. Microbiota depletion promotes browning of white adipose tissue and reduces obesity. **Nat Med**, v. 21, n. 12, p. 1497-1501, Dec 2015. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26569380> >.

TAKEZAWA, R.; WATANABE, Y.; AKAIKE, T. Direct evidence of macrophage differentiation from bone marrow cells in the liver: a possible origin of Kupffer cells. **J Biochem**, v. 118, n. 6, p. 1175-1183, Dec 1995. ISSN 0021-924X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8720132> >.

TAMAI, M. et al. Selective deletion of adipocytes, but not preadipocytes, by TNF-alpha through C/EBP- and PPARgamma-mediated suppression of NF-kappaB. **Lab Invest**, v. 90, n. 9, p. 1385-1395, Sep 2010. ISSN 1530-0307. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20567236> >.

TISDALE, M. J. Cancer cachexia: metabolic alterations and clinical manifestations. **Nutrition**, v. 13, n. 1, p. 1-7, Jan 1997. ISSN 0899-9007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9058439> >.

\_\_\_\_\_. Molecular pathways leading to cancer cachexia. **Physiology (Bethesda)**, v. 20, p. 340-348, Oct 2005. ISSN 1548-9213. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16174873> >.

TISDALE, M. J. et al. Catabolic factors in cancer cachexia. **In Vivo**, v. 10, n. 2, p. 131-136, 1996 Mar-Apr 1996. ISSN 0258-851X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8744791> >.

TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ, H. et al. Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. **Immunol Lett**, v. 93, n. 2-3, p. 97-108, May 2004. ISSN 0165-2478. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15158604> >.

TODOROV, P. et al. Characterization of a cancer cachectic factor. **Nature**, v. 379, n. 6567, p. 739-742, Feb 1996. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8602222> >.

VANDANMAGSAR, B. et al. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. **Nat Med**, v. 17, n. 2, p. 179-188, Feb 2011. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21217695> >.

VARIAN, B. J. et al. Beneficial bacteria inhibit cachexia. **Oncotarget**, Feb 2016. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26933816> >.

VERSTREPEN, L. et al. TLR-4, IL-1R and TNF-R signaling to NF-kappaB: variations on a common theme. **Cell Mol Life Sci**, v. 65, n. 19, p. 2964-2978, Oct 2008. ISSN 1420-682X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18535784> >.

WANG, W.; CASSIDY, J. Constitutive nuclear factor-kappa B mRNA, protein overexpression and enhanced DNA-binding activity in thymidylate synthase inhibitor-resistant tumour cells. **Br J Cancer**, v. 88, n. 4, p. 624-629, Feb 2003. ISSN 0007-0920. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12592379> >.

WEISBERG, S. P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **J Clin Invest**, v. 112, n. 12, p. 1796-1808, Dec 2003. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14679176> >.

WEN, H.; TING, J. P.; O'NEILL, L. A. A role for the NLRP3 inflammasome in metabolic diseases--did Warburg miss inflammation? **Nat Immunol**, v. 13, n. 4, p. 352-357, Apr 2012. ISSN 1529-2916. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22430788> >.

WHITESIDE, S. A. et al. The microbiome of the urinary tract--a role beyond infection. **Nat Rev Urol**, v. 12, n. 2, p. 81-90, Feb 2015. ISSN 1759-4820. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25600098> >.

YIN, J. et al. Regulation of hepatocyte growth factor expression by NF-kB and PPAR $\gamma$  in adipose tissue. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 306, n. 8, p. E929-936, Apr 2014. ISSN 1522-1555. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24569592> >.

\_\_\_\_\_. Toll-like receptor 2/4 links to free fatty acid-induced inflammation and  $\beta$ -cell dysfunction. **J Leukoc Biol**, v. 95, n. 1, p. 47-52, Jan 2014. ISSN 1938-3673. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24018354> >.

ZEYDA, M.; STULNIG, T. M. Adipose tissue macrophages. **Immunol Lett**, v. 112, n. 2, p. 61-67, Oct 2007. ISSN 0165-2478. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17719095> >.

ZHANG, Y. et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, n. 6505, p. 425-432, Dec 1994. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7984236> >.

**ANEXO A – Artigo publicado**



## White adipose tissue cells and the progression of cachexia: inflammatory pathways

Rodrigo X. Neves<sup>1</sup>, José Cesar Rosa-Neto<sup>2</sup>, Alex S. Yamashita<sup>3</sup>, Emidio M. Matos-Neto<sup>1</sup>, Daniela M. R. Riccardi<sup>1</sup>, Fabio S. Ura<sup>5</sup>, Miguel L. Batista Jr<sup>4</sup> & Marília Seelaender<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Cancer Metabolism Research Group; <sup>2</sup>Immunometabolism Research Group; <sup>3</sup>Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; <sup>4</sup>Laboratory of Adipose Tissue Biology, Center for Integrated Biotechnology, University of Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, Brazil; <sup>5</sup>Department of Physical Education, São Paulo State University, UNESP, Presidente Prudente, Brazil

### Abstract

**Background** Cachexia is a systemic syndrome leading to body wasting, systemic inflammation, and to metabolic chaos. It is a progressive condition, and little is known about its dynamics. Detection of the early signs of the disease may lead to the attenuation of the associated symptoms. The white adipose tissue is an organ with endocrine functions, capable of synthesising and secreting a plethora of proteins, including cytokines, chemokines, and adipokines. It is well established that different adipose tissue depots demonstrate heterogeneous responses to physiological and pathological stimuli. The present study aimed at providing insight into adipocyte involvement in inflammation along the progression of cachexia.

**Methods** Eight-week-old male rats were subcutaneously inoculated with a Walker 256 carcinosarcoma cell suspension ( $2 \times 10^7$  cells in 1.0 mL; tumour-bearing, T) or Phosphate-buffered saline (control, C). The retroperitoneal, epididymal, and mesenteric adipose pads were excised on Days 0, 7, and 14 post-tumour cell injection, and the adipocytes were isolated.

**Results** Mesenteric and epididymal adipocytes showed up-regulation of IL-1 $\beta$  protein expression and activation of the inflammasome pathway, contributing for whole tissue inflammation. The stromal vascular fraction of the retroperitoneal adipose tissue, on the other hand, seems to be the major contributor for the inflammation in this specific pad.

**Conclusion** Adipocytes seem to play a relevant role in the establishment of white adipose tissue inflammation, through the activation of the NF- $\kappa$ B and inflammasome pathways. In epididymal adipocytes, induction of the inflammasome may be detected already on Day 7 post-tumour cell inoculation.

**Keywords** Cancer cachexia; Adipocyte; Inflammasome; Inflammation

Received: 10 October 2014; Revised: 12 March 2015; Accepted: 15 April 2015

\*Correspondence to: Marília Seelaender, Department of Cell and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Av. Professor Lineu Prestes, 1524, CEP 05508-900, Butantã, São Paulo, SP, Brazil. Tel/Fax: 5511-3091 7225, Email: seelaend@icb.usp.br

### Background

Cancer cachexia is a syndrome with complex aetiology,<sup>1,2</sup> which affects up to 80% of patients with advanced cancer.<sup>3–6</sup> It is associated with diminished expected effects of chemotherapy and radiotherapy treatment, compromised life quality, and decreased survival.<sup>3,5–8</sup> The main symptoms include marked decrease in body weight, with depletion of both white adipose tissue (WAT) and skeletal muscle, profound metabolic disruption, reduction of appetite,

hypoalbuminemia and systemic inflammation.<sup>9,10</sup> This syndrome has been recently proposed to comprise at least three stages: the first is associated with metabolic change and with weight loss (< 5%), while in the second stage, a 5% decrease of body mass is consistently reported, along with systemic inflammation and anorexia. In the last stage, patients are no longer responsive to anticancer treatment, and the expected survival does not exceed 3 months.<sup>10</sup>

There is current evidence pointing out WAT as an important contributor to cachexia.<sup>11,12</sup> WAT biology is impaired

both in human cachexia and in animal models, and it is suggested that WAT alterations precede muscle wasting.<sup>11,12</sup> Therefore, WAT is not only a 'victim' of the syndrome, it is also a relevant player, actively synthesizing a plethora of pro-inflammatory cytokines,<sup>14</sup> which take part in contributing to systemic inflammation.

White adipose tissue is composed of different cellular elements, among which resident and infiltrated immune cells.<sup>15</sup> In addition, the proportion of the stromal vascular fraction, as well as the biology of the adipocyte, are subject to diversity according to anatomical variation, regarding vascularization and innervation of the pad.<sup>16–19</sup> This implies that the response of different depots is heterogeneous under different physiopathological conditions,<sup>20,21</sup> as reported in obesity.<sup>17,22</sup> Previous studies of our group (Seebender et al., 1996<sup>23</sup>) have reported differences in visceral WAT depots in concern to the morphology and biochemical characteristics of adipocytes in the Walker 256 animal model of cancer cachexia.

Given these considerations, we presently sought to examine whether the adipose cell participates in the establishment of whole adipose tissue inflammation and to address the hypothesis that adipocytes obtained from different anatomical fat depots behave heterogeneously during the progression of cachexia. For that purpose, we studied three pads at three time points (prior to tumour cell injection-T0; and 7 (T7) or 14 days (T14) post-inoculation). These time points, although not necessarily bearing correspondence with the three stages proposed for cachectic patients (Fearon et al., 2011<sup>24</sup>), were chosen as to provide insight on the dynamics of inflammation in WAT.

One of the main inflammatory pathways in mammalian cells is that of the nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells (NF- $\kappa$ B). NF- $\kappa$ B is composed of subunits p50, p105, p52, p100, and p65, which induce gene expression by binding to DNA target sites.<sup>18,24,25</sup> Studies with obese patients showed an increased activity of the NF- $\kappa$ B pathway in the adipose tissue and, consequently, of local inflammation.<sup>26</sup> The inflammasome pathway has also been similarly described as having an important role in the inflammation of adipose tissue in obesity.<sup>22,27,28</sup> Its major role is to activate the pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and IL-18, which are synthesized as immature proteins and require the inflammasome pathway for cleavage and release, yielding the mature, biologically active cytokine forms.<sup>29–31</sup> The pathway comprises two compartments: the (nucleotide-binding oligomerization domain) (NOD)-like receptor (NLR) family (NLRP1, NLRP2, NLRP3, NLRP6, NLRP4, and NLRP12), and the pyrin and HIN200 (haematopoietic interferon-inducible nuclear antigens) domain-containing protein (PYHIN) family.<sup>27,32</sup> To the best of our knowledge, there is no study in the literature reporting a possible contribution of this pathway to the enhanced inflammatory cytokine secretion by the adipose tissue in cachexia.

Therefore, a third aim of the present study was to investigate the pathways associated with adipocyte inflammation and their activation along the aggravation of the syndrome.

## Materials and methods

### Animals

Male adult Wistar rats (160–250 g), obtained from the Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, were maintained in metabolic cages, under a 12 h light/12 h dark cycle (lights on at 7:00 a.m.), and controlled temperature conditions (23  $\pm$  1°C), receiving water and food (commercial chow; Nuvilab, Nuvital, Brazil) *ad libitum*. The Biomedical Sciences Institute/USP Ethical Committee for Animal Research approved all the adopted procedures (050/102 ECAR), which were carried out in accordance with the ethical principles stated by the Brazilian College of Animal Experimentation. The experiments were performed as a time course study, and the rats were killed by decapitation on Days 0, 7, and 14 following subcutaneous injection of a suspension of Walker 256 tumour ( $2 \times 10^7$ ) cells,<sup>33</sup> or of the same volume of phosphate-buffered saline ( $n=5$  group); after 12 h fast, always in the interval between 8:00 and 11:00 a.m. The following groups were studied: T0 (rats euthanized on the day on which T7 and T14 were injected with the tumour cells), T7 (rats euthanized 7 days after tumour cell injection), and T14 (rats euthanized 14 days after tumour cell injection). Additional groups of non-tumour-bearing animals (C) were included, as a control for body and tissue weight on Days 7 (C7) and 14 (C14).

### Blood samples and adipose tissue collection

Approximately 8 mL of blood were collected. In brief, samples were centrifuged at 500 g at 4°C for 15 min, and serum was stored at –80°C. Epididymal adipose tissue (EAT), retroperitoneal adipose tissue (RPAT), and mesenteric adipose tissue (MEAT) (after careful removal of adjacent lymph nodes) were removed, weighed, snap frozen in liquid nitrogen, and stored at –80°C.

### Serum analysis

All serum analyses were performed with commercial kits: total cholesterol, triglycerides (TG), and high-density lipoprotein (Labtest\*, Brazil); free glycerol (Sigma-Aldrich, Switzerland); and non-esterified fatty acids (Wako Chemicals, USA).

### Adipose cell isolation

The different visceral adipose tissue pads were excised and washed in sterile saline (0.9% NaCl). The samples (0.8 g) were

placed immediately in digestion buffer (DMEM Sigma-D5671), 5% BSA, and 2 mg/ml type I collagenase (Life-technologies 17100-017), and digested for 60 min, at 37°C. The resulting suspension was then filtered through a sterile 250 µm nylon mesh and the mature adipocytes (mesenteric adipocytes (MEa), retroperitoneal adipocytes (RPa), and epididymal adipocytes (Ea)), obtained from the supernatant. The cells were washed twice with sterile 0.9% NaCl and stored at -80°C for mRNA and protein analysis.

### Real-time PCR

Total RNA was isolated from the tissues and cells, with Trizol® (Invitrogen, CA, USA), following the manufacturer's recommendations. The first strand of cDNA was generated from 2 µg of total RNA, employing a commercial kit (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Invitrogen). Polymerase chain reaction (PCR) amplification was performed in duplicates, with SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA) in the QuantStudio™ 12 K Real Time PCR (Applied Biosystems, CA, USA), employing the primers listed in Table 1. Gene expression was normalized to the *Rpl19* and *Rpl27* reference genes. Data were calculated with the 2- $\Delta\Delta$ CT method and are presented as the fold change in gene expression relative to the control sample.

### White adipose tissue adipokine levels

Rat WAT (0.4–0.7 g) was homogenized in RIPA buffer (0.625% Nonidet P-40, 0.625% sodium deoxycholate, 6.25 mM sodium phosphate, and 1 mM ethylene-diaminetetraacetic acid, at pH 7.4), containing a protease inhibitor-cocktail (Roche®, Brazil). Homogenates were centrifuged at 12 000 g for 30 min at 4°C; the supernatant was collected, and protein concentration was determined with a commercial kit (Bio-Rad, CA, USA).

Total adipose tissue protein extracts were employed for the quantitative assessment by enzyme-linked immunosorbent assay (DuoSet ELISA, R&D Systems, MN, USA) of IL-6 (DY306), TNF- $\alpha$  (DYS10), IL-10 (DYS22), and IL-1 $\beta$  (DYS01). The IL-6 assay sensitivity was found to be 8.000 pg/mL in the range of 125–8000 pg/mL. For TNF- $\alpha$ , IL-10, and IL-1 $\beta$ , the assay sensitivity was found to be 4.000 pg/mL in the range of 62.5–4000 pg/mL. All samples were assayed as duplicates, and the mean value was reported. The results were equalized to total protein.

### Western blotting

Frozen adipose tissue and adipocytes were homogenized in Radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (0.625% Nonidet P-40, 0.625% sodium deoxycholate, 6.25 mM sodium phosphate, and 1 mM ethylene-diaminetetraacetic acid at pH 7.4 with proteinase) and phosphatase inhibitors (Roche®, Brazil) and centrifuged at 15 000 g for 30 min at 4°C. The protein-rich fraction (intermediary layer) was collected and centrifuged at 12 000 g for 10 min at 4°C, the supernatant (fatty layer) was discarded, and the infranatant was collected. Protein concentration was determined with a BCA protein quantification kit (Pierce, IL, USA), with Bovine serum albumin (BSA) as a reference. Samples containing 30 µg protein were separated by electrophoresis in 10% Tricine SDS-PAGE. Proteins were then transferred to PVDF membranes at 25 V for 40 min (Trans-Blot Turbo Blotting System, Bio-Rad) in transfer buffer, consisting of 20 mM Tris, 150 mM Glycine, and 10% Methanol. PVDF membranes were then blocked in TBS containing 0.1% Tween 20 and 5% skimmed milk, for 1 h. After three washes with TBS plus 0.1% Tween 20, the PVDF membranes were incubated with primary antibodies against IL-1 $\beta$  (Santa Cruz, SC-1251, Goat), p65 (Cell signalling, C22B4, Rabbit), Myd88 (Santa Cruz, SC-11356), TNF1 (Santa Cruz, SC-1070, Mouse), p50 (Santa Cruz, SC-8414), GAPDH (Sigma, G9545, Rabbit). HRP-conjugated secondary antibody anti-rabbit and

Table 1. Primer list

Gene (species)	Sequence 5'3'
IL-6 ( <i>Rattus norvegicus</i> ) (NM 012589.2)	Fw: GAA GCT GAA GAC CCT CTG GA Rev: TAA GCC TCG GAC TTG TGA AGT GGT
IL-10 ( <i>R. norvegicus</i> ) (NM 012854.2)	Fw: AAG GCA TTC TTC ACC TGC TC Rev: CCA AGC TGA GAA CCA AGA CC
Tnf- $\alpha$ ( <i>R. norvegicus</i> ) (NM 012675.3)	Fw: ATC ACT CCA AAG TGC AGC AG Rev: CTC TCT CCC CTG GAA AGG AC
p50 ( <i>R. norvegicus</i> ) (NM 001276711.1)	Fw: AGG TCC AGA AAG ATG ACA TCC A Rev: CAA TGG CAA ACT GTC TGT GAA
p65 ( <i>R. norvegicus</i> ) (NM 199267.2)	Fw: ATG CAT CCA CAG CTT CCA G Rev: TGCTCC TCT ATG GGA ACT TGA
Tlr4 ( <i>R. norvegicus</i> ) (NM 019178.1)	Fw: TCT AAA TGC CAA CTG GAA CAG A Rev: ATG GGA TGG ATC CAG AAA CA
Myd88 ( <i>R. norvegicus</i> ) (NM 198130.1)	Fw: GCG AGC TCA TTG AGA AAA GG Rev: ACA CCT GGA GAC AGG CTG A
Tlr6 ( <i>R. norvegicus</i> ) (NM 001107754.2)	Fw: AAG TCC ATA AGG GAT GCA GGT Rev: TCG CTT TGC AAA ATT GTC AG
Ilk- $\alpha$ ( <i>R. norvegicus</i> ) (NM 001107588.1)	Fw: TCA AGA TGT TGG TGG GAA GAT A Rev: CTCTGG GGC CAA ATA CTG TAA
NLRP1 ( <i>R. norvegicus</i> ) (NM 001145755.2)	Fw: GCT TCA GCC CCC AAA GAT Rev: TTG TCC AAG AGA GGG TCC AC
NLRP3 ( <i>R. norvegicus</i> ) (NM 001191642.1)	Fw: GCT GAA CTT GAG CAA CAA CG Rev: CAC CCA ACT GTA GGC TCT GC
Tlr2 ( <i>R. norvegicus</i> ) (NM 198769.2)	Fw: TTT GAT CAC TGC ACC CTC AA Rev: ATG TGC AGG CTC CGT ATT GT
Hif-1 $\alpha$ ( <i>R. norvegicus</i> ) (NM 024859.1)	Fw: CAA CTG CCA CCA CTG ATG A Rev: GGG TAG AAG GTG GAG ATG C
Caspase 1 ( <i>R. norvegicus</i> ) (NM 012762.2)	Fw: ACA TCT TTC TCC GAG GGT TG Rev: CAC CTC TTT CAC CAT CTC CAG
<i>Rpl19</i> ( <i>R. norvegicus</i> ) (NM 031103.1)	Fw: GAG GGA CGC TTC ATT TCT TG Rev: CAT GGA GCA CAT CCA CAA AC
<i>Rpl27</i> ( <i>R. norvegicus</i> ) (NM 022514.1)	Fw: CCT CAT GCC CAC AAG GTA CT Rev: CTG TCT TGT ATC GCT CCT CAA A

anti-mouse (Cell signalling, MA, USA), and anti-goat (Abcam ab 6885-UK) for 2 h at room temperature. The resulting bands were detected by ECL (Amersham, UK). GAPDH was employed as loading control, and the blots were stripped and incubated with a GAPDH antibody (Sigma, G9545, Rabbit). Quantification of antigen-antibody complexes was performed with the Image J Analysis Software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Optical density units were obtained as pixels for fold target protein/control protein.

### Statistical analysis

Data are expressed as mean values and standard errors of the means. Differences concerning the studied groups (T0, T7, and T14) were analysed with GraphPad5 software (GraphPad, San Diego, CA, USA), and statistical significance was determined performing one-way ANOVA with post hoc Tukey's test, for comparison among groups, for each different adipose pad. Comparison among pads was not performed. For the results regarding body and tissue mass in Cachectic (T0, T7, and T14) and control (C7 and C14) animals, we employed ANOVA two-way, followed by Tukey's post-test.  $P < 0.05$  was considered significant.

## Results

Fourteen days after tumour cell injection, experimental cancer cachexia induced a reduction in body weight (10.6%;  $P < 0.05$ ) and in WAT mass (42.5% in MEAT and 40.2% in RPAT;  $P < 0.05$ ) (Table 2), compared with animals of the control group. Terminal cachexia (T14) was accompanied by increased concentrations of non-esterified fatty acid, high-density lipoprotein, and triglycerides in the plasma (Table 3).

### White adipose tissue inflammation in experimental cancer cachexia

#### Mesenteric adipose tissue

In MEAT, increased tumour necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) gene expression was found in T7 and in T14 (23.7 and

Table 3 Plasma lipid profile along cachexia progression

	T0	T7	T14
Glycerol (mg/mL)	0.14 $\pm$ 0.09	0.09 $\pm$ 0.02	0.11 $\pm$ 0.04
NEFA (mM/mL)	0.75 $\pm$ 0.03	0.80 $\pm$ 0.03	1.25 $\pm$ 0.22*
HDL (mg/dL)	48.73 $\pm$ 2.24	46.80 $\pm$ 4.54	52.12 $\pm$ 1.15*
TG (mg/dL)	82.95 $\pm$ 5.38	114.81 $\pm$ 29.00	151.30 $\pm$ 50.18*

Values are expressed as mean  $\pm$  SEM n = 5.

HDL, high-density lipoprotein; NEFA, non-esterified fatty acid; TG, triglycerides.

\* $P < 0.05$  vs. all groups.

\*\* $P < 0.05$  vs. T0.

36.5-fold, respectively;  $P < 0.05$ ) (Figure 1B), as compared with T0. Interleukin 1b (IL-1 $\beta$ ) protein content was increased (5.7-fold;  $P < 0.05$ ) in T14 (Figure 2G) in relation to T0.

#### Retroperitoneal adipose tissue

Changes in pro-inflammatory cytokine gene expression in this pad could only be detected at the end stage (T14) of cachexia, when Interleukin 6 (IL-6) and TNF- $\alpha$  ( $P < 0.05$ ) (Figure 1A,B) mRNA levels were increased. Protein expression, on the other hand, was similar to the patterns found in MEAT, as IL1 $\beta$  protein expression was higher in RPAT in T14 (30.0-fold;  $P < 0.05$ ) (Figure 2G). Interleukin 10, the only anti-inflammatory cytokine examined, showed increased gene expression in T14, despite no significant modification of protein content of the cytokine in this depot.

#### Epididymal adipose tissue

In this fat pad, pro-inflammatory cytokine mRNA expression (IL-6 and TNF- $\alpha$ ) was increased only in T14 ( $P < 0.05$ ) (Figure 1A,B). Protein expression of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  was also increased in T14 (3.7-fold and 2.03-fold, respectively;  $P < 0.05$ ) (Figure 1E,G), when compared with T0. The gene expression of IL-10 was found to be increased in T7 ( $P < 0.05$ ), and an even more conspicuous increment was observed in T14 ( $P < 0.01$ ), in relation to both T0 and T7.

### White adipose tissue cells inflammation in experimental cancer cachexia

As WAT is composed of various cells types, each potentially contributing to inflammation, we investigated whether

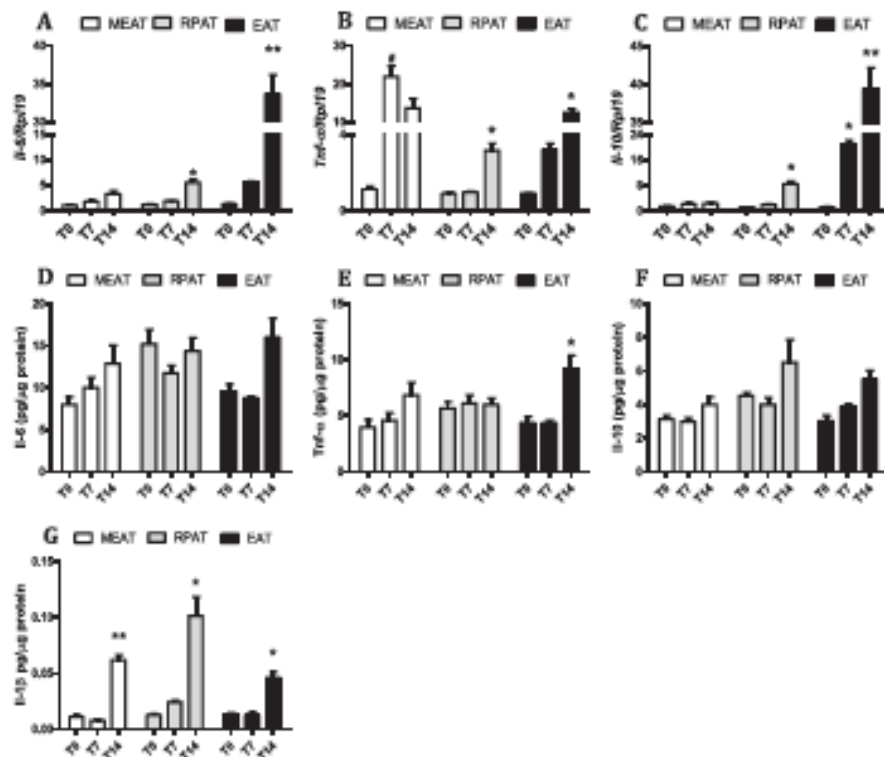
Table 2 Body and tissue mass in control (C) and cachectic (T) animals

	Initial T0	C7	T7	C14	T14	Two-way ANOVA P-values		
						Time	Tumour	Time/tumour
BM-T (g)	220.8 $\pm$ 18.4	264.4 $\pm$ 21.4	247.8 $\pm$ 17.8	285.4 $\pm$ 19.7	255.1 $\pm$ 21.4*	ns	* $P < 0.05$	** $P < 0.01$
TM (g)			4.4 $\pm$ 2.53		12.05 $\pm$ 6.43			
MEAT (g)	1.03 $\pm$ 0.33	1.82 $\pm$ 0.47	1.37 $\pm$ 0.32	2.54 $\pm$ 0.43**	1.46 $\pm$ 0.22**	* $P < 0.05$	** $P < 0.01$	** $P < 0.01$
EAT (g)	1.52 $\pm$ 0.38	2.15 $\pm$ 0.34	2.04 $\pm$ 0.41	3.46 $\pm$ 0.40	2.83 $\pm$ 0.45	ns	ns	ns
RPAT (g)	0.87 $\pm$ 0.38	2.12 $\pm$ 0.35	1.39 $\pm$ 0.40	3.45 $\pm$ 0.48	2.06 $\pm$ 0.46**	* $P < 0.05$	* $P < 0.05$	** $P < 0.01$

Values are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean n = 5.

Note: BM-T, body mass-tumour mass; C, control; EAT, epididymal adipose tissue; MEAT, mesenteric adipose tissue; ns, not significant; RPAT, retroperitoneal adipose tissue; T, cancer cachexia; TM, tumour mass.

**Figure 1** Cytokine gene and protein expression in adipose tissue along cachexia progression. (A–C) gene expression (D–G) protein expression. Results are expressed as mean ( $n=5$ )  $\pm$  SEM. Adipose tissue was obtained from animals 0, 7, and 14 days after inoculation of tumour cells. \* $P < 0.05$  difference between groups, for the same tissue; \*\* $P < 0.01$  different from all the groups for the same tissue; \* $P < 0.05$  vs. control. Mesenteric adipose tissue (MEAT), retroperitoneal adipose tissue (RPAT), and epididymal adipose tissue (EAT). (A) gene expression of IL-6, (B) gene expression of TNF- $\alpha$ , (C) gene expression of IL-10, (D) protein expression of IL-6, (E) protein expression of TNF- $\alpha$ , (F) protein expression of IL-10, and (G) protein expression of IL-1 $\beta$ .



adipocytes *per se* would be relevant to local and, possibly, to systemic inflammation.

#### Mesenteric adipocytes

In the isolated adipocytes (MEa), gene expression was solely increased for TNF- $\alpha$  (Figure 2B), despite the observed increase in protein expression of all pro and anti-inflammatory proteins in advanced cachexia (T14) in this pad (Figure 2D–G). IL-1 $\beta$  protein content increased in a similar proportion to that found in the whole mesenteric adipose depot. We thus speculate that the increase in the expression of other cytokines was insufficient to affect whole tissue values.

#### Retroperitoneal adipocytes

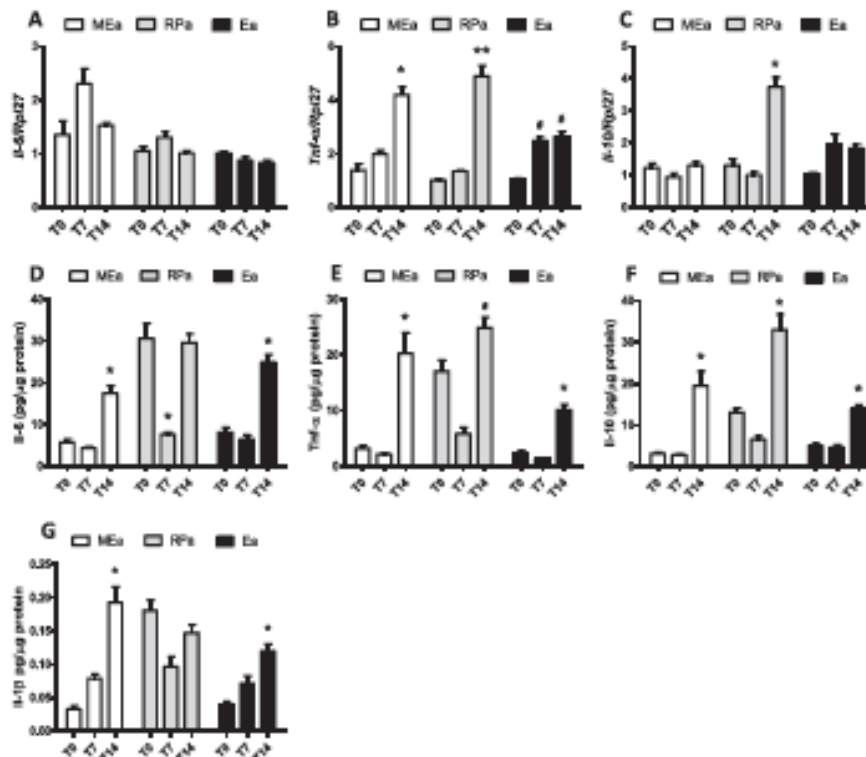
In the adipocytes isolated from the retroperitoneal pad (RPa), gene expression of TNF- $\alpha$  increased in T14 in comparison with T0 ( $P < 0.05$ ) (Figure 2B). Such increase was parallel to the

enhancement of gene expression levels found in whole retroperitoneal tissue in the same group (T14). It is possible that the higher values observed for IL-10 gene expression in T14 in RPa (Figure 2C) are a consequence of the increase of TNF- $\alpha$  gene expression in these cells. IL-1 $\beta$  content was found to be increased in whole RPAT, but not in RPa, and therefore, we postulate a possible contribution of the stromal vascular fraction, comprised by the non-adipocyte cellular components of the tissue. The high IL-6 and TNF- $\alpha$  (Figure 2D,E) protein content in adipocytes obtained from animals with terminal cachexia was not reflected in the whole tissue, even though gene expression was increased in T14, as compared with T0.

#### Epididymal adipocytes

In the cells isolated from this pad (Ea), we observed an increase in gene expression of TNF- $\alpha$  in T7, in relation to T0

**Figure 2** Cytokine gene and protein expression in isolated adipocytes along cachexia progression. (A–C) gene expression and (D–G) protein expression. Results are expressed as mean ± standard error of the mean (n = 4). Adipocytes were isolated from adipose tissue obtained from animals 0, 7, and 14 days after inoculation of tumour cells: mesenteric adipose tissue (MEAT), retroperitoneal adipose tissue (RPAT), and epididymal adipose tissue (EAT) cells. \*P < 0.05 vs. all the groups for the same tissue; \*\*P < 0.05 vs. Day 7. (A) gene expression of *IL-6*, (B) gene expression of *Tnf- $\alpha$* , (C) gene expression of *IL-10*, (D) protein expression of *IL-6*, (E) protein expression of *Tnf- $\alpha$* , (F) protein expression of *IL-10*, and (G) protein expression of *IL-1 $\beta$* .



(Figure 2B). This might be the cause for the higher expression of all analysed cytokines we report in the adipocytes in terminal cachexia (T14) (Figure 2D–G) and bears correspondence with the enhanced content of *TNF- $\alpha$*  and *IL-1 $\beta$*  in the whole EAT. This tissue showed a progressive increase of *IL-10* gene expression levels between T7 and T14, maybe in an attempt to counterbalance increasing inflammation.

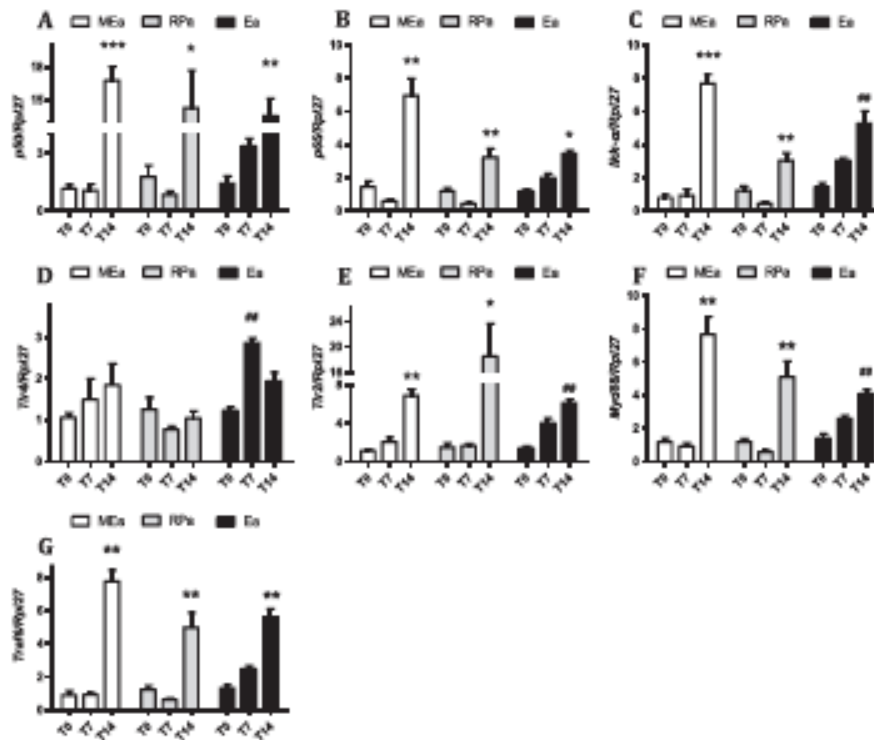
#### Pathways related with the induction of pro-inflammatory cytokines in adipocytes

In MEa, all genes related with the studied transcription factors were increased in T14: nuclear factor kappa B subunits p50 (NF- $\kappa$ B p50) and p65 (NF- $\kappa$ B p65) and Chuk conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase (*Ikki*) (P < 0.05) (Figure 3A–C).

Toll-like receptor 2 (*Tlr2*) gene expression was up-regulated in the same group (Figure 3E), as well as myeloid differentiation primary response 88 (*Myd88*) and TNF receptor-associated factor 6 (*Traf6*) (Figure 3F,G). All genes of the *Tlr/NF- $\kappa$ B* pathway were thus shown to be regulated by cachexia. With regard to protein expression, the results of NF- $\kappa$ B p65 and *Myd88* paralleled the gene expression data, being increased only in terminal cachexia (T14) (P < 0.05) (Figure 5B,C).

Similarly to what was observed in MEa, the changes regarding TLRs/NF- $\kappa$ B pathway in RPa occurred solely at the final stage of cachexia when p50, p65, *Ikki*, *Tlr2*, *Myd88*, and *Traf6* gene expression was enhanced (P < 0.05) (Figure 3A–D, F,G). However, in contrast with the protein expression results reported for MEa, p50 protein content increased, p65 protein content decreased, and *Myd88* protein expression was unchanged in RPa in T14 (Figure 5A–C).

**Figure 3** Gene expression of transcription factors involved in pro-inflammatory pathways in isolated adipocytes along cachexia progression. Results are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean ( $n=4$ ). Adipocytes isolated from adipose tissue were obtained from animals 0, 7, and 14 days after inoculation of tumour cells: \* $P < 0.05$  vs. all the groups for the same tissue;  $^{\#}P < 0.05$  vs. T0; \*\* $P < 0.01$  vs. all the groups for the same tissue;  $^{***}P < 0.01$  vs. T0. Mesenteric adipocytes (MEa), retroperitoneal adipocytes (RPa), and epididymal adipocytes (Ea). (A) gene expression of p50, (B) gene expression of p65, (C) gene expression of Ikk- $\alpha$ , (D) gene expression of TLR4, (E) gene expression of TLR2, (F) gene expression of Myd88, and (G) gene expression of Tnf $\beta$ .



Epididymal adipocytes once again showed similarity with the results found for MEa: p50, p65, Ikk- $\alpha$ , TLR2, Myd88, and Tnf $\beta$  gene expression increased in T14 ( $P < 0.05$ ) (Figure 3A–D,F,G). TLR4 gene levels were increased already in T7 (Figure 3E), while in T14, the levels were similar to T0. p50, p65, and Myd88 protein expression increased in terminal cachexia (T14) (Figure 5B–D), in epididymal adipocytes.

#### Inflammasome pathway

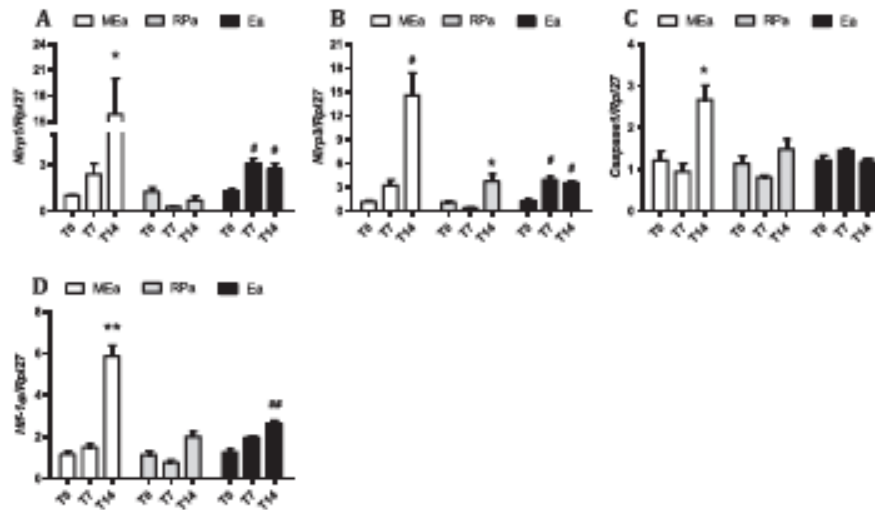
In MEa, the expression of genes related with the activity of the inflammasome pathway was increased for the NLR family pyrin domain containing 1 and 3 (NLRP1 and NLRP3), and Caspase 1 on Day 14 (Figure 4A–C). These results were accompanied by an increased cleavage of IL-1 $\beta$  to its active form (Figure 5F).

In RPa, only NLRP3 gene expression was higher in T14 (Figure 4B). In Ea, NLRP1, and NLRP3 gene expression increased in T14, as compared with T7 (Figure 4A,B); however, we observed no changes in the content of cleaved IL-1 $\beta$  (Figure 5F).

#### Discussion

Cachexia is characterised by progressive loss of lean and adipose tissue,<sup>5,8</sup> accompanied by disruption of the biochemical profile in association with pathological increase of pro-inflammatory cytokines in cancer patients and experimental models.<sup>13,14</sup> Cancer cachexia-associated chronic systemic inflammation presents a relevant contribution from the WAT, as we and others have previously shown.<sup>14,16–18</sup>

**Figure 4** Inflammation pathway gene expression in isolated adipocytes along cachexia progression. Results are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean ( $n=4$ ). Adipocytes were isolated from the adipose tissue obtained from animals 0, 7, and 14 days after inoculation of tumour cells: \* $P < 0.05$  vs. all the groups for the same tissue; # $P < 0.05$  vs. T0; ## $P < 0.01$  vs. T0. Mesenteric adipocytes (MEa), retroperitoneal adipocytes (RPa), and epididymal adipocytes (Ea). (A) gene expression of Nalp1, (B) gene expression of Nalp3, (C) gene expression of Caspase 1, and (D) gene expression of HM-1 $\alpha$ .



Two main questions were addressed in the present study: (1) Is there heterogeneity regarding anatomical localization of WAT in concern to inflammation capacity during the progression of cachexia? and (2) What is the contribution of adipocytes *per se* to adipose tissue inflammation? To elucidate these aspects, we studied cachexia progression in the rodent Walker 256 carcinosarcoma model.

All the examined (mesenteric, retroperitoneal, and epididymal) fat pads showed increased gene expression of inflammatory cytokines in advanced cachexia (T14). Yet, only IL-1 $\beta$  protein content was consistently augmented in all the depots. TNF- $\alpha$  protein levels were shown to be higher solely in EAT of T14 animals. Adipose tissue depots from different anatomical regions show marked heterogeneity in microanatomical organization, metabolism, and physiological and molecular aspects.<sup>16,20</sup> One such heterogeneity can also be noticed during cachexia, as we (Batista et al.)<sup>20</sup> have demonstrated that the subcutaneous adipose tissue of cancer patients responds in a precocious manner to the onset of the disease, with enhanced inflammatory cytokine secretion, as compared with the mesenteric depot.

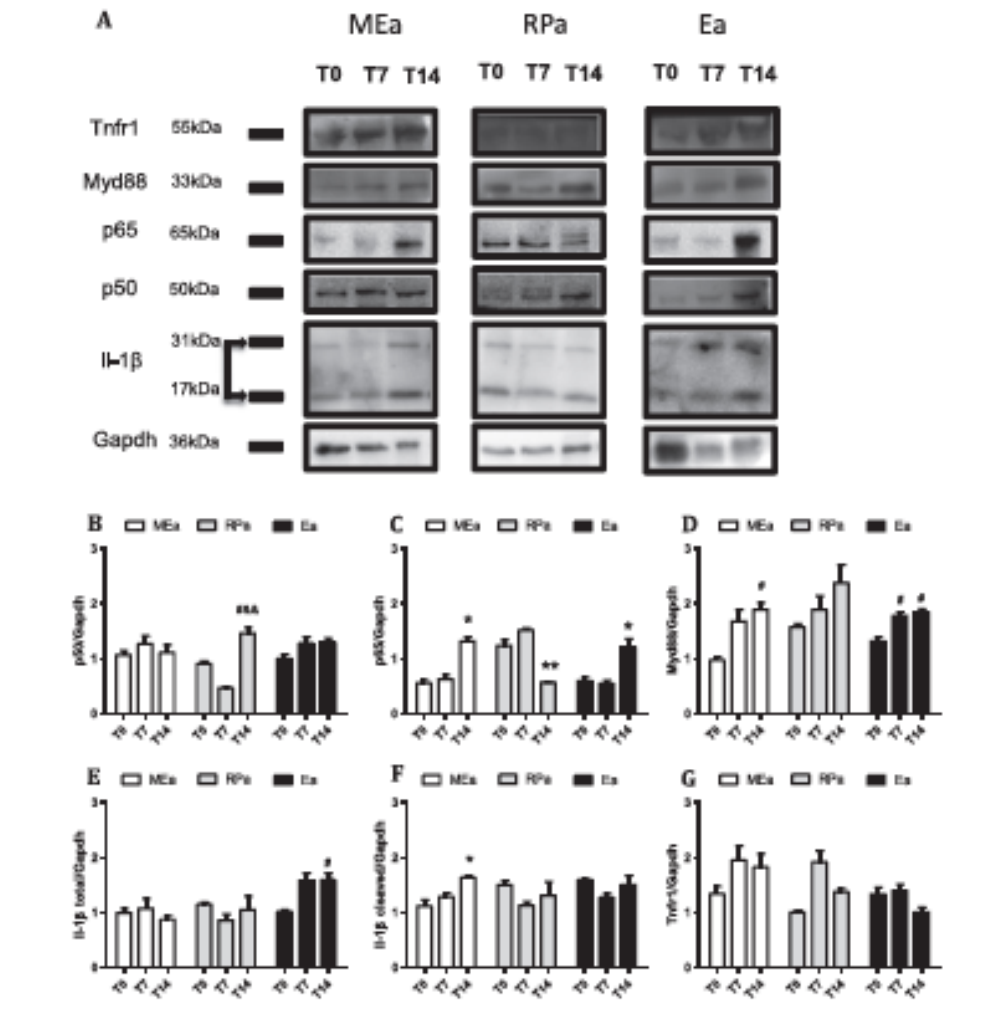
Among rodent visceral depots, EAT is the one that responds more rapidly to cachexia by becoming inflamed. Therefore, it is clear that the different visceral adipose pads present distinct dynamics in response to the syndrome. Nevertheless, what is the contribution of the adipose cell

*per se* in this scenario? WAT comprises several cell types, and studies carried out with obese patients report a great participation of infiltrating immune cells in triggering tissue inflammation.<sup>12,13,17</sup>

Adipocytes isolated from RPAT displayed an anti-inflammatory profile, with a high protein content of IL-10, and unaltered protein content of IL-1 $\beta$  in terminal cachexia. Thus, it appears that RPa attempts to counterbalance local inflammation caused by the high concentration of IL-1 $\beta$  protein, possibly synthesized by the stromal vascular fraction, as suggested by the high total tissue concentration of this cytokine in the depot. In contrast, isolated adipocytes from the mesenteric and epididymal pads showed a clear pro-inflammatory profile. Ea secretes cytokines already at an early stage, while MEa inflammation was found in advanced cachexia. However, adipocytes from both of these depots contribute consistently to local inflammation at the terminal phase of cachexia and may be relevant to the onset of systemic inflammation. Such differences confirm the heterogeneity of adipocytes obtained from particular depots; while MEa and Ea exhibited a progressive pro-inflammatory pattern, RPa increased the protein expression of IL-10. A recent study showed that different adipose pads derive from distinct embryonic origins.<sup>40</sup> We may thus suggest that perhaps, the heterogeneous response displayed by the isolated cells from the depots may be related with intrinsic diversity of these cells.



**Figure 5** Protein expression in isolated adipocytes along cachexia progression. Results are expressed as mean ( $n=3$ )  $\pm$  standard error of the mean. Adipocytes were isolated from a adipose tissue obtained from animals 0, 7, and 14 days after inoculation of tumour cells: mesenteric adipose tissue (MEa), retroperitoneal adipose tissue (RPa), and epididymal adipose tissue (Ea) cells. (A) Blots were rearranged, and representative images were selected for p50, p65, Myd88, I- $\beta$  (total and cleaved form), and GAPDH (normalized protein); (B–F) band intensity detection with software Image J. \* $P < 0.05$  vs. all the groups for the same tissue;  $^{\#}P < 0.01$  vs. T0;  $^{\#\#}P < 0.05$  vs. T7.



After examining inflammatory cytokine production by cells from the different pads, we investigated the intracellular pathways that could be associated with the modulation of adipocyte inflammation. Firstly, we analysed the classic pathway in chronic inflammatory processes involving NF- $\kappa$ B.<sup>41,42</sup> The literature provides detailed evidence that the NF- $\kappa$ B pathway in

adipose tissue is modulated in obesity,<sup>26,43,44</sup> and the same signal route is suggested to be augmented in the adipose tissue of cachectic patients and animals.<sup>14,44</sup> Our results confirm that increased pro-inflammatory cytokine content in the adipose tissue was accompanied by higher expression of transcription factors key proteins, such as NF- $\kappa$ B p65. Myd88 protein content

was increased both in MEa and Ea and, in both cell populations, associated with increased NF- $\kappa$ B protein expression. These findings indicate that the adipocyte NF- $\kappa$ B pathway is modulated during the progression of the syndrome, especially at its end point. In obesity, increased NF- $\kappa$ B activity has been attributed to infiltrating immune cells, rather than to adipocytes.<sup>45–47</sup> To our best knowledge, this is the first report of adipocyte NF- $\kappa$ B involvement in WAT inflammation in cachexia.

We report increased IL-1 $\beta$  protein content in all WAT pads and in two different isolated adipocyte populations. An increase of the cleaved, bioactive IL-1 $\beta$  form was found to be present only in MEa, while IL-1 $\beta$  content was high as a consequence of cachexia, in the whole adipose pads studied. IL-1 $\beta$  is one of the main targets of the inflammasome pathway.<sup>41</sup> Therefore, in addition to showing that the NF- $\kappa$ B pathway is modulated in the adipocytes of WAT during cachexia, the results indicate that cachexia was able to modulate the inflammasome pathway in the cells. In obesity, increased inflammasome activity is related with disease progress. The proteins NLRP 3 and Caspase 1 play an important role in this pathway.<sup>42,48</sup> A study with a knockout model for NLRP 3 and Caspase 1 found the animals to be resistant to obesity after being submitted to a high-fat diet. These animals also showed improved insulin sensitivity after the high-fat diet protocol, as compared with controls.<sup>49,50</sup> We believe we are the first to show a modulation of the inflammasome pathways in adipocytes during cachexia.

In summary, our results indicate a heterogeneous response of the different white adipocytes to cachexia and a role in the modulation of adipose tissue inflammation. While MEa and Ea show a clear pro-inflammatory response during the

development of the syndrome, the inflammatory factors we found to be increased in cachexia in the retroperitoneal tissue are probably produced by the stromal vascular fraction. Additionally, we demonstrate, for the first time, that the inflammasome pathway may be involved in adipose inflammation in cancer cachexia. Taken together, the results suggest that the inflammasome pathway could be a target for pharmacological treatment in cachexia.

## Acknowledgements

The authors thank Emília Ribeiro and Rosana Prisco for the technical assistance. The contents of this work are solely the responsibility of the authors and do not necessarily represent the official views of FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo). The authors of this paper certify that they comply with the ethical guidelines for authorship and publishing in the *Journal of Cachexia, Sarcopenia, and Muscle* 2010;1:7–8 (von Haehling S., Morley J. E., Coats A. J., and Anker S. D.).

## Funding

FAPESP grants numbers 2010/51078-1 (M.L.B.Jr.) and 2012/50079-0 (M.S.) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior).

## Conflict of interest

None declared.

## References

- Tisdale MJ, McDevitt TM, Todorov PT, Cariak P. Catabolic factors in cancer cachexia. *In Vivo* 1996;10:131–136.
- Todorov P, Cariak P, McDevitt T, Coles B, Fearon K, Tisdale M. Characterization of a cancer cachectic factor. *Nature* 1996; 379:733–742.
- Tisdale MJ. Cancer cachexia: metabolic alterations and clinical manifestations. *Nutrition* 1997;13:1–7.
- Argüés JM, Moore-Camargo R, Fuster G, Busquets S, López-Soriano FL. Cancer cachexia: the molecular mechanisms. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35:405–409.
- Argüés JM, Anker SD, Evans WJ, Morley JE, Fearon KC, Strasser F, Muscaritoli M, Baracos VE. Consensus on cachexia definitions. *J Am Med Assoc* 2010;303:229–230.
- Zeyda M, Stüning TM. Adipose tissue macrophages. *Immunol Lett* 2007;112:61–67.
- Inui A. Cancer anorexia-cachexia syndrome: current issues in research and management. *CA Cancer J Clin* 2002;52:729.
- Topkan E, Yavuz AA, Ozyilkan G. Cancer cachexia: pathophysiologic aspects and treatment options. *Asian Pac J Cancer Prev* 2007;8:445–451.
- Evans WJ, Morley JE, Argüés J, Bates C, Baracos V, Guttridge D, Jatoi A, Kalant-Zadeh K, Lachs H, Mantovani G, Merks D, Mitch WE, Muscaritoli M, Najed A, Pankowski P, Rossi Fanelli F, Schenkel M, Schols A, Schuster M, Thomas D, Wolfe R, Anker SD. Cachexia: a new definition. *Clin Nutr* 2008;27:733–739.
- Fearon K, Strasser F, Anker SD, Bosses I, Bruera E, Fainsinger RL, Jatoi A, Loprinzi C, MacDonald N, Mantovani G, Davis M, Muscaritoli M, Ottavio F, Radbruch L, Ravasi P, Walsh D, Wilcock A, Kaasa S, Baracos VE. Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. *Lancet Oncol* 2011;12:489–495.
- Bing C, Russell S, Bodet E, Pope M, Tisdale MJ, Trayhurn P, Jenkins JR. Adipose atrophy in cancer cachexia: morphologic and molecular analysis of adipose tissue in tumour-bearing mice. *Br J Cancer* 2006; 95:1028–1037.
- Bing C, Bao Y, Jenkins J, Sanders P, Manieri M, Gritti S, Tisdale MJ, Trayhurn P. Znn-alpha2-glycoprotein, a lipid mobilizing factor, is expressed in adipocytes and is up-regulated in mice with cancer cachexia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:2500–2505.
- Fouladiun M, Körner U, Bosses I, Dierwryd P, Hyltander A, Lundholm KG. Body composition and time course changes in regional distribution of fat and lean tissue in unselected cancer patients on palliative care—correlations with food intake, metabolism, exercise capacity and hormones. *Cancer* 2005;109:2189–2198.
- Beirão ML Jr, Olivan M, Alcântara PS, Sandoval R, Peres SB, Neves RX, Silveira R, Maximiano UF, Otach JP, Senelarnder M. Adipose tissue-derived factors as potential biomarkers in cachectic cancer patients. *Cytokine* 2013;61:532–539.

15. Machado AP, Costa Rosa U, Seelander MC. Adipose tissue in Walker 256 tumour-induced cachexia: possible association between decreased leptin concentration and mononuclear cell infiltration. *Cell Tissue Res* 2004;318:503–514.
16. DiGirolamo M, Fine JB, Tagra K, Rosamonth R. Qualitative regional differences in adipose tissue growth and cellularity in male Walker rats fed *ad libitum*. *Am J Physiol* 1998;274:R1460–1467.
17. Neuman DB, Fine JB, Tagra K, Fleming SS, Martin RJ, DiGirolamo M. Regional fat pad growth and cellularity in obese Zucker ratc modulation by caloric restriction. *Obes Res* 2003;11:674–682.
18. Rodheffer MS, Binsay K, Friedman JM. Identification of white adipocyte progenitor cells *in vivo*. *Cell* 2008;135:240–249.
19. Tran KV, Geseleman O, Frontini A, Zingarini MC, Morrioni M, Giordano A, Smorlesi A, Perugini J, De Matteis R, Sgarbiati A, Corvetti S, Cristini S. The vascular endothelium of the adipose tissue gives rise to both white and brown fat cells. *Cell Metab* 2012;15:222–223.
20. Batista ML Jr, Neves RX, Pires SB, Yamashita AS, Shida CS, Farmer SR, Seelander M. Heterogeneous time-dependent response of adipose tissue during the development of cancer cachexia. *J Endocrinol* 2012;215:363–373.
21. Bertavello PS, Seelander MC. Heterogeneous response of adipose tissue to cancer cachexia. *Braz J Med Biol Res* 2003;34:161–167.
22. Esser N, Lhomme I, De Raover A, Kohlen I, Schein AJ, Moutschen M, Piette J, Legendre-Paels S, Paquet N. Obesity phenotype is related to NLRP3 inflammasome activity and immunological profile of visceral adipose tissue. *Diabetologia* 2013;56:2482–2497.
23. Seelander MC, Nascimento OM, Curil W, Williams JF. Studies on the lipid metabolism of Walker 256 tumour-bearing rats during the development of cancer cachexia. *Biochem Mol Biol Int* 1996;39:1037–1047.
24. Rus J, Guma M, Schachtrup C, Alosoglu K, Zinkmeyer AS, Nisat V, Johnson RB, Haddad GG, Karin M. NF- $\kappa$ B links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1 $\alpha$ . *Nature* 2008;453:807–811.
25. Guilherme A, Urbaniak JV, Puri V, Czech MP. Adipocyte dysfunction linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:367–377.
26. Yin J, Peng Y, Wu J, Wang Y, Yao J. Toll-like receptor 2/4 links to free fatty acid-induced inflammation and  $\beta$ -cell dysfunction. *J AutoImmunol* 2014;35:47–52.
27. Latz E. The inflammasomes: mechanisms of activation and function. *Curr Opin Immunol* 2010;22:28–33.
28. Stienstra R, Tack CJ, Kennegans TD, Joosten LA, Netea MG. The inflammasome puts obesity in the danger zone. *Cell Metab* 2012;15:10–18.
29. Lappas M. Activation of inflammasomes in adipose tissue of women with gestational diabetes. *Mol Cell Endocrinol* 2014;382:74–83.
30. Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol* 2013;13:397–411.
31. Schröder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell* 2010;140:621–632.
32. Benetti E, Chiazza F, Patel NS, Collino M. The NLRP3 inflammasome as a novel player of the intercellular crosstalk in metabolic disorders. *Mitochondrion Inflamm* 2013;2013:679627.
33. Seelander MC, Curil R, Colquhoun A, Williams JF, Zemmitt VA. Carnitine palmitoyltransferase II activity is decreased in liver mitochondria of cachectic rats bearing the Walker 256 carcinosarcoma: effect of indomethacin treatment. *Biochem Mol Biol Int* 1998;34:125–133.
34. Donato FF, Neves RX, Rosa FC, Gemargo RG, Ribeiro H, Metas-Neto EM, Seelander M. Resistance exercise modulates lipid plasma profile and cytokine content in the adipose tissue of tumour-bearing rats. *Cytokine* 2013;61:426–432.
35. Lira FS, Rosa JC, Zanchi NE, Yamashita AS, Lopes RD, Lopes AC, Batista ML Jr, Seelander M. Regulation of inflammation in the adipose tissue in cancer cachexia: effect of exercise. *Cell Biochem Funct* 2009;27:71–75.
36. Lira FS, Yamashita AS, Rosa JC, Tavares FL, Capenato E, Carnevali LC Jr, Pimental GD, Santos RV, Batista ML Jr, Laviano A, Rossi-Famelli F, Seelander M. Hypothalamic inflammation is reversed by endurance training in anorectic-cachectic rats. *Nutr Metab (Lond)* 2011;8:60.
37. Lira FS, Carnevali LC Jr, Zanchi NE, Santos RV, Laviao JM, Seelander M. Exercise intensity modulation of hepatic lipid metabolism. *J Nutr Metab* 2012;2012:809576.
38. Lira FS, Yamashita AS, Rosa JC, Koyama CH, Capenato EC, Batista ML, Seelander MC. Exercise training decreases adipose tissue inflammation in cachectic rats. *Horm Metab Res* 2012;44:91–98.
39. Pond CM. Physiological specialisation of adipose tissue. *Prog Lipid Res* 1999;38:225–248.
40. Chau YY, Bandiera R, Serrats A, Martinez-Estrada OM, Qing W, Lee M, Slight J, Thornburn A, Berry R, McHaffie S, Stimson RH, Walker BR, Chapuli RM, Schedl A, Hastie N. Visceral and subcutaneous fat have different origins and evidence supports a mesothelial source. *Nat Cell Biol* 2014;16:367–375.
41. Tamai M, Shimada T, Hirabayashi N, Hayakawa K, Okamura M, Tagawa Y, Takahashi S, Nakajima S, Yao J, Kikuchi M. Selective deletion of adipocytes, but not preadipocytes, by TNF- $\alpha$  through C/EBP- $\beta$  and PPAR $\gamma$ -mediated suppression of NF- $\kappa$ B. *Lab Invest* 2010;90:1385–1395.
42. Kim S, Joe Y, Jeong SO, Zheng M, Back SH, Park SW, Ryter SW, Chung HT. Endoplasmic reticulum stress is sufficient for the induction of IL-1 $\beta$  production via activation of the NF- $\kappa$ B and inflammasome pathways. *Innate Immun* 2013;799–805.
43. Nov O, Shapiro H, Ovedia H, Tamondji T, Dvir I, Shemesh E, Kowen J, Shalef I, Gemi Y, Vrananov E, Apter RN, Lewis E, Haim Y, Konrad D, Bashan N, Rudich A. Interleukin-1 $\beta$  regulates fat-liver crosstalk in obesity by auto-pancreatic modulation of adipose tissue inflammation and expandability. *PLoS One* 2013;8:e53626.
44. Yin J, Lee JH, Zhang J, Gao Z, Polotsky VY, Ye J. Regulation of hepatocyte growth factor expression by NF- $\kappa$ B and PPAR $\gamma$  in adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2014;306:E929–936.
45. Lee YH, Thacker RJ, Hall BE, Kong R, Grossman JG. Exploring the activated adipogenic niche: interactions of macrophages and adipocyte progenitors. *Cell Cycle* 2014;13:184–190.
46. Lee BC, Lee J. Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. *Biochim Biophys Acta* 2014;1842:446–462.
47. Rahman SM, Jansen RC, Choudhury M, Bequero JC, Akens RM, de la Hoz-Sayre BA, Friedman JE. CCAAT/enhancer-binding protein  $\beta$  (C/EBP $\beta$ ) expression regulates dietary-induced inflammation in macrophages and adipose tissue in mice. *J Biol Chem* 2012;287:34349–34360.
48. Reynolds CM, McGillicuddy FC, Harford KA, Finucane OM, Mills KH, Roche HM. Dietary saturated fatty acids prime the NLRP3 inflammasome via TLR4 in dendritic cells: implications for diet-induced insulin resistance. *Mol Nutr Food Res* 2012;56:1212–1222.
49. Stienstra R, van Diepen JA, Tack CJ, Zaki MH, van de Vliedrand FL, Perera D, Neale GA, Hoivik GJ, Hijnen A, Vroegrijk I, van den Berg S, Romijn JA, Reenen PC, Joosten LA, Netea MG, Kennegans TD. Inflammasome is a central player in the induction of obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:15324–15329.
50. Vandenmuguer B, Youm YH, Ravussin A, Galgani JE, Stedler K, Myrseth RL, Ravussin E, Stephens JM, Dietz MD. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Med* 2011;17:179–188.

**ANEXO 2 – Artigo enviado a publicação**

## **Cachexia causes time-dependent activation of the inflammasome in the liver**

<sup>1</sup>Rodrigo X. Neves, <sup>2</sup>José Cesar Rosa-Neto, <sup>3</sup>Alex S. Yamashita, <sup>1</sup>Daniela M. R. Riccardi, <sup>1</sup>Rodolfo G. Camoargo. <sup>4</sup>Nelson I. Neto, <sup>5</sup>Felipe H. Santos, <sup>5</sup>Miguel L. Batista jr, <sup>6</sup>Janina E. E. Tirnitz-Parker <sup>1</sup>Marília Seelaender

<sup>1</sup>Cancer Metabolism Research Group. Department of Cell and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil. <sup>2</sup>Immunometabolism Research Group. Department of Cell and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil. <sup>3</sup>Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, São Paulo, Brazil. <sup>4</sup>Department of Physiology, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil. <sup>5</sup>Laboratory of Adipose Tissue Biology, Center for Integrated Biotechnology, University of Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, São Paulo, Brazil. <sup>6</sup>Liver Disease and Regeneration Laboratory, School of Biomedical Sciences and Curtin Health Innovation Research Institute, Curtin University, Bentley WA, Australia

**Running Head:** Liver, inflammasome pathway and cachexia progression.

**Correspondence to:** Marília Cerqueira Leite Seelaender

Department of Cell and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Brazil.

Address: Av. Professor Lineu Prestes, 1524, CEP 05508-900, Butantã, São Paulo, SP, Brazil.

Phone / Fax-number: 55-011-3091 7225

E-mail: [seelaend@icb.usp.br](mailto:seelaend@icb.usp.br)

**Key words:** Cancer cachexia, liver, macrophage, inflammasome, and inflammation.

## Abstract

**Background:** Cachexia is a systemic syndrome leading to body wasting, systemic inflammation and metabolic chaos. It is a progressive condition and little is known about its dynamics. Detection of the early signs of the disease may contribute to the effective attenuation of associated symptoms. **Aim:** To investigate the activation of inflammasome-regulating inflammatory pathways in rat livers during the development of cachexia induced by Walker 256 carcinosarcoma. **Methods:** Eight-week old, male rats were subcutaneously inoculated with a Walker 256 carcinosarcoma cell suspension ( $2 \times 10^7$  cells in 1.0 mL; tumour-bearing, T; or PBS control, C). The liver was excised on days 0, 7 and 14 after tumor cell injection. **Results:** Macrophage numbers were progressively increased in the liver of cachectic animals. In terminal cachexia, NF $\kappa$ Bp65, Jnk and inflammasome pathways were also increased and accompanied by enhanced IL-1 $\beta$  cleavage. **Conclusion:** Our data show that cancer cachexia causes an increase in macrophage numbers and modulates the hepatic inflammasome pathway to augment IL-1 $\beta$  cleavage.

## Background

Cancer cachexia is a devastating syndrome, which severely reduces the quality of the life and overall survival in cancer patients (2, 27). It affects around 80% of cancer patients and approximately 20% of those do not survive (1, 10, 26). In general, cancer cachexia has been characterized as total weight loss and both adipose tissue depletion and muscle wasting.

Cachectic patients present systemic chronic inflammation, however is not clear who starts release pro-inflammatory cytokines if is tumor or host organs (4). Many studies have shown that visceral organs are able to maintain and increase pro-inflammatory cytokine levels (3, 25).

The liver is the central organ in the control of nutrient supply to the organism and governs the systemic metabolic rate as transport, storage, breakdown and utilization of glucose, fat and protein (11, 16). Cancer cachexia is speculated to contribute to disease progression through energy imbalance, possibly caused by reduction of oxidative phosphorylation levels in liver mitochondria (9, 11). The main liver cell types are represented by hepatocytes, biliary epithelial cells and immune cells such as liver-resident macrophages or Kupffer cells, the latter representing about 10% of total liver cells (21). In accord Martignoni et al. 2009 (15) CD68 protein increased in the liver of cachectic patients compared non cachectic and it was correlated with more aggressive tumor in those patients.

The systemic chronic inflammatory state in cachectic patients has been well-discussed, and several studies have shown the contribution of some organs to inflammatory cytokine levels (meu e (13), but it is not totally clear. Further, the liver is also known to synthesize some inflammatory proteins, such as acute phase proteins (APPs) (17). In this study, we investigated the role of the inflammasome pathway in

the liver of cachectic rats.

Inflammasomes are multiprotein complexes that have a major role in activating the pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and IL-18. These are produced as immature cytokines and require inflammasome-regulated cleavage of pro-IL-1 $\beta$  in the cytoplasm into mature IL-1 $\beta$  prior to its release (12, 20). Several proteins constitute the inflammasome pathway, such as the NOD-like receptor (NLR) family (NLRP1, NLRP2, NLRP3, NLRP6, NLRC4, and NLRP12), and the pyrin and HIN200 (hematopoietic interferon-inducible nuclear antigens) domain-containing protein (PYHIN) family (5). The NLRP3 inflammasome pathway is a key player since studies have shown that mice with a genetic knockout of NLRP3 and Caspase 1 were demonstrated to be resistant to obesity development when submitted to a high fat diet, compared to wildtype mice (23, 28).

Therefore, the main aim of the present study was to investigate the inflammasome pathway associated with the increase of macrophage numbers in the liver and their activation with aggravation of the syndrome.



## **Materials and Methods**

### **Animals**

Male adult Wistar rats (270–300 g), obtained from the Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, were maintained in metabolic cages, under a 12h light/12h dark cycle and controlled temperature conditions ( $23\pm 1^\circ\text{C}$ ), receiving water and food (commercial chow; Nuvilab, Nuvital, Brazil) *ad libitum*. The Biomedical Sciences Institute/USP Ethical Committee for Animal Research approved all the adopted procedures (050/102 ECAR), which were carried out in accordance with the ethical principles stated by the Brazilian College of Animal Experimentation. Walker 256 tumor cells ( $2\times 10^7$  cells) were injected subcutaneously into the right flank of the animals (40). Control rats received saline injections on the same day of tumor inoculation. The experiments were carried out as a time course study, and the rats were sacrificed by decapitation on days 0, 7 and 14 post-inoculation (n = 5/group) after 12h fasting.

### **Liver collection**

The livers were removed, weighed, snap-frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^\circ\text{C}$ .

### **Immunohistochemistry**

The livers were placed into plastic cassettes, and mounted with OCT compound medium (Sakura Finetek Japan Co., Ltd., Tokyo, Japan) and frozen by liquid nitrogen. Frozen sections were cut at  $7\mu\text{m}$  and used for hematoxylin and eosin evaluation of liver histology as well as further immunohistochemical analyses. Liver

sections were fixed with methanol/acetone (1:1), permeabilized with 0.02% Tween 20 in PBS (PBS-T) and blocked with 5% goat serum in PBS-T. Tissue sections were incubated with anti-CD68 (Abcam, ab 31630, rabbit) to detect liver macrophages at 1:200 overnight at 4°C. Antibody detection was performed using a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (goat anti-rabbit IgG H&L (Biotin) ab97049, 1/500) and the Vecta stain ABC Kit (Vector Laboratories) and Sigma Fast 3,3-diaminobenzidine as substrate (Sigma, St. Louis, MO). Sections were counter-stained with hematoxylin.

### **Real-time PCR**

Total RNA was isolated from the tissues and cells with Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA), following the manufacturer's recommendations. The first strand of cDNA was generated from 2 µg of total RNA, using a commercially available kit (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits, Invitrogen, Foster City, CA, United State America). Polymerase chain reaction (PCR) amplification was performed in duplicates with SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) in the QuantStudio 12K Flex Real Time PCR (Applied Biosystems), using the primers listed in Table 1. Gene expression was normalized to Rpl27 reference genes. Data were calculated using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method, and are presented as fold changes in gene expression relative to control samples.

### **Liver cytokine levels**

Rat livers (0.05–0.08 g) were homogenized in RIPA buffer (0.625% Nonidet P-40, 0.625% Sodium Deoxycholate, 6.25 mM Sodium Phosphate, and 1 mM Ethylenediaminetetraacetic acid, at pH 7.4), containing a protease inhibitor-cocktail

(proteinase and phosphatase inhibitors, Roche). Homogenates were centrifuged at  $15.000 \times g$  for 30 min at 4 °C. The supernatant was collected, and protein concentration was determined with a BCA protein quantification kit (Pierce, Rockford, IL, USA), with bovine serum albumin as a reference. Liver samples were quantitatively assessed for interleukin 6, IL-6 (DuoSet, DY506), tumor necrosis factor, TNF- $\alpha$  (DuoSet, DY510), interleukin -10, IL-10 (DuoSet, DY522), and interleukin 1 $\beta$ , IL-1 $\beta$  (DuoSet, DY501). Protein concentrations were measured by ELISA (DuoSet ELISA, R&D Systems, Minneapolis, MN). Assay sensitivities were determined to be 8.000 pg/ml in the range of 125–8000 pg/ml for IL-6, and 4.000 pg/ml in the range of 62.5–4000 pg/ml for TNF- $\alpha$ , IL-10, and IL-1 $\beta$ . All samples were run as duplicates and the mean value was reported. The results were normalized to total protein.

### **Western blotting**

Frozen livers were homogenized in RIPA buffer (0.625% Nonidet P-40, 0.625% Sodium Deoxycholate, 6.25 mM Sodium Phosphate, and 1 mM Ethylenediaminetetracetic acid at, pH 7.4 with proteinase and phosphatase inhibitors, Roche). Homogenates were centrifuged at  $15.000 \times g$  for 30 min at 4°C; the supernatant was collected, and protein concentrations were determined with a BCA protein quantification kit (Pierce, Rockford, IL), with BSA as a reference. Samples containing 50 mg protein were separated by electrophoresis in 10% Tricine SDS–PAGE. Proteins were then transferred to PVDF membranes at 25 V for 40 min (Trans-Blot Turbo Blotting System, Bio-Rad) in transfer buffer, consisting of 20 mM Tris, 150 mM Glycine and 10% Methanol. PVDF membranes were then blocked in TBS containing 0.1% Tween 20 and skimmed 5% milk for 1 h. After three washes with TBS 0.1%

Tween, the PVDF membranes were incubated with primary antibodies against p-JNK (Santa Cruz, SC-6254 mouse), TLR4 (Santa Cruz, SC-30002 rabbit), p-NFkBp65 (Cell Signaling 93h1 rabbit), IL-1 $\beta$  (Santa Cruz, SC-1251 goat) and Gapdh (Santa Cruz, SC-25778 rabbit). HRP-conjugated secondary antibody (anti-rabbit and anti-mouse Cell Signaling and anti-goat Abcam ab 6885-1 UK) for 2 h at room temperature and bands were detected by ECL (Amersham, Little Chalfont, UK). The blots were stripped and incubated with anti-Gapdh (Santa Cruz, SC-25778 rabbit) as a loading control. Quantification of antigen–antibody complexes was performed using Image J Analysis Software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Optical density units were given in pixels for fold target protein/control protein.

### **Statistical analysis**

Data are expressed as mean values and S.E.M. Differences concerning the studied groups (T0, T7 and T14) were analyzed with *GraphPad5 software* (GraphPad, San Diego, CA, USA) and statistical significance was determined performing One-Way ANOVA with post-hoc *Tukey's* test for comparison among groups. Body and tissue mass in cachectic rats on day 14 for control (C14) and tumor (T14) were analysed using Student's t-test. A value of  $p < 0.05$  was considered significant.

## Results

After 14 days tumor cell injection, experimental cancer cachexia induced a reduction in body weight gain (10.6%;  $p < 0.05$ ) compared with control animals of the same age. In addition, a higher level of IL-1 $\beta$  was found in the liver ( $p < 0.05$ ) also the concentration of macrophage-marker protein and mRNA profile that characterize the presence of macrophage increased in the end of cachexia stage ( $p < 0.01$ ).

In liver, gene expression of *Tlr4*, *Tlr2*, and *Ccl2* increased on day 14 ( $p < 0.01$ ) (Figure 1 A, E and F) and *Il-1 $\beta$*  gene expression increased on T7 until T14 day ( $p < 0.01$ ) (Figure 1 G). On the other hand, gene expression of *NF $\kappa$ Bp65*, *Myd88*, and *Traf6* did not change.

Next, we sought to determine the increase of macrophages in the liver, and whether it is time-dependent during development of cachexia. We found that macrophage cells infiltrated increased on T7 and increased more in terminal cachexia (Figure 2 D-F), so these infiltrated are time-dependent during the development cachexia and their contributed to cytokines gene expression release in the liver with positive correlation (Supplementary fig. 1, 2 and 3)

To explore the role of the liver physiological system, we evaluated some cytokines, yet only Il-1b protein content augmented on 14 day ( $p < 0.01$ ) (Figure 3 A), but other cytokines such as Tnf- $\alpha$ , Il-6 and Il-10 did not change. Then we analysed the Il-1 $\beta$  cleavage protein content and it also increased on T14 ( $p < 0.05$ ) (Figure 4 C). We analysed the possible pathways that transcript Il-1 $\beta$  gene. We found increased p-NF- $\kappa$ Bp65 and p-Jnk protein content ( $p < 0.05$ ) (Figure 4 A and B) in the end of cachexia, but these transcription factors seems won't be activated by Tlr4, because it did not change the protein content.

Despite of, we were look at genes of inflammasome pathway could is being changed, once we found Il-1 $\beta$  protein cleavage content increased. *NLRP1* and 3 genes levels increased on T7 day until on T14 day ( $p < 0.01$ ) (Figure 5 A and B), *Caspase 1* gene expression increased in terminal cachexia ( $p < 0.001$ ) (Figure 5 F), and *Nod2* gene expression increased only on T7 day and returned basal levels on T14 day ( $p < 0.01$ ) (Figure 5 E), whereas *Hif-1 $\alpha$*  gene expression did not change during the development of the cachexia.

Finally, we found increased Il-1 $\beta$  protein in the serum on day 14 ( $p < 0.01$ ) (Figure 6), and all the results suggested that the liver is contributing to inflammation state during the development of the cachexia.

## Discussion

For decades, cancer cachexia has been considered a multifactorial syndrome with the poor prognostic of life. Many studies have described the behavior of tumour and host in the cachexia progression such as chronic systemic inflammation (1, 26). We determined that the liver contributes to chronic systemic inflammation during the development cancer cachexia in rats with Walker 256 carcinosarcoma.

In the liver there are many different cells, like hepatocyte and leukocyte cells, which the last is represent for bigger amount of Kupffer cells, well-known like macrophages (24). These cells can alter their concentration in the liver from some diseases such as obesity and diabetes (6, 22). In the present study, we found a linear increase of macrophages amount during the cachexia progress and also mRNA related macrophage presence. It seems be clear that cancer cachexia regulated liver tissue to immune cells presence (15).

The liver plays an important role in the government metabolic pathways (11), and in some diseases, as well as cachexia, it maybe present an imbalance in metabolic pathway, suggesting that the motivator to metabolic chaos (19, 21). In our study, we verified that IL-1 $\beta$  gene expression increased in the cachexia progression, and also important inflammatory proteins, such as NF-kBp65 and JNK. Cancer cachexia managed to change the macrophage and inflammatory profile in the liver.

Cachexia patients have reported inflammatory chronic systemic response (3), and infiltrated immune cells in the adipose tissue as well as adipocytes have been suggested as responsible for maintaining the systemic inflammatory state (14) in print). Further, we showed that the increase of macrophages infiltrated in the liver during the cachexia progress might be responsible for increase of IL-1 $\beta$  cleavage and as a consequence provoke the local inflammation. We verified also cancer cachexia has modulated the inflammasome pathway.

The inflammasome pathway has been studied in different diseases (5, 18), and it has been shown to be extremely important for local or systemic inflammation, mainly in its activity during the cleavage of IL-1 $\beta$ , which has been described as a potent pro-inflammatory cytokine (8, 30). In the liver, we found higher gene expression of any important proteins related to the inflammasome complex, supporting the evidence of the IL-1 $\beta$  cleavage higher.

The contribution to systemic inflammation by host in cancer cachexia has been seen in many studies (3, 7, 29), and our findings show that the liver may contribute to systemic inflammation in the end cancer cachexia state, when we found higher concentrations of IL-1 $\beta$  in the serum in those animals.

In conclusion, our results suggest that the liver is deeply affected by cancer cachexia during of the disease's development, and it is tightly suggested by

macrophages infiltrated in the liver that produce a higher amount of Il-1 $\beta$  resulting in the both local and systemic inflammation.

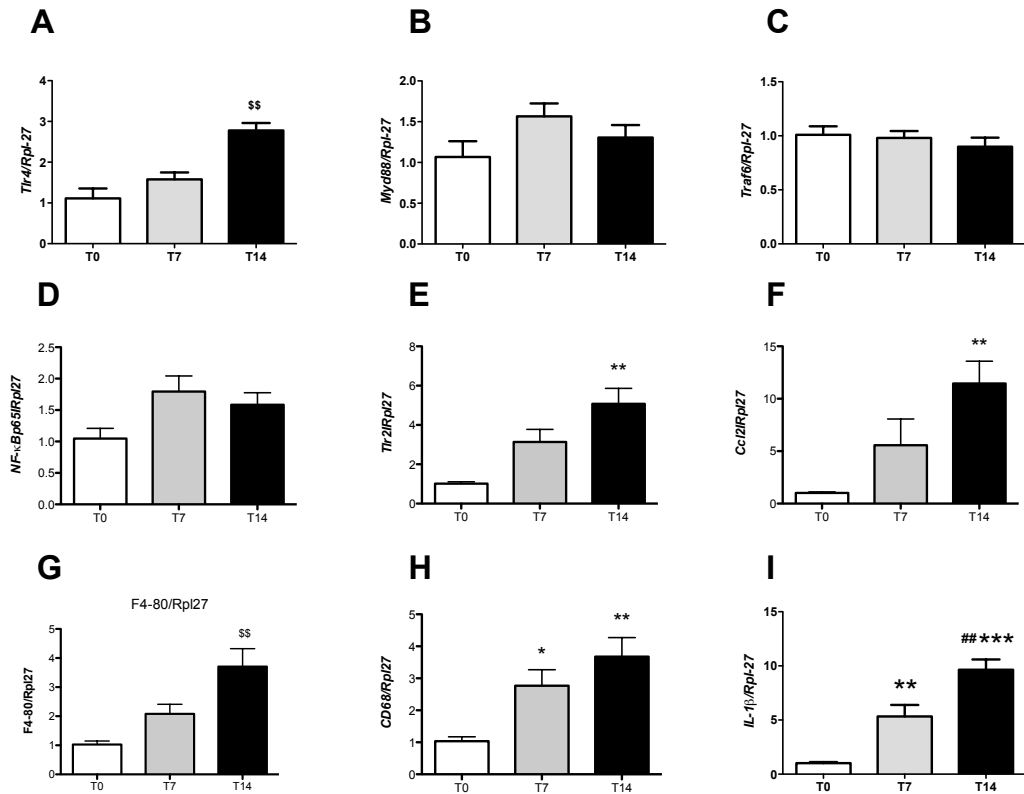
## Reference

1. **Argilés JM, Anker SD, Evans WJ, Morley JE, Fearon KC, Strasser F, Muscaritoli M, and Baracos VE.** Consensus on cachexia definitions. *J Am Med Dir Assoc* 11: 229-230, 2010.
2. **Argilés JM, Busquets S, Stemmler B, and López-Soriano FJ.** Cancer cachexia: understanding the molecular basis. *Nat Rev Cancer* 14: 754-762, 2014.
3. **Batista ML, Jr., Oliván M, Alcantara PS, Sandoval R, Peres SB, Neves RX, Silverio R, Maximiano LF, Otoch JP, and Seelaender M.** Adipose tissue-derived factors as potential biomarkers in cachectic cancer patients. *Cytokine* 61: 532-539, 2013.
4. **Beluzi M, Peres SB, Henriques FS, Sertié RA, Franco FO, Santos KB, Knobl P, Andreotti S, Shida CS, Neves RX, Farmer SR, Seelaender M, Lima FB, and Batista ML.** Pioglitazone treatment increases survival and prevents body weight loss in tumor-bearing animals: possible anti-cachectic effect. *PLoS One* 10: e0122660, 2015.
5. **Benetti E, Chiazza F, Patel NS, and Collino M.** The NLRP3 Inflammasome as a novel player of the intercellular crosstalk in metabolic disorders. *Mediators Inflamm* 2013: 678627, 2013.
6. **Bertola A, Bonnafous S, Anty R, Patouraux S, Saint-Paul MC, Iannelli A, Gugenheim J, Barr J, Mato JM, Le Marchand-Brustel Y, Tran A, and Gual P.** Hepatic expression patterns of inflammatory and immune response genes associated with obesity and NASH in morbidly obese patients. *PLoS One* 5: e13577, 2010.
7. **Bilir C, Engin H, Can M, Temi YB, and Demirtas D.** The prognostic role of inflammation and hormones in patients with metastatic cancer with cachexia. *Med Oncol* 32: 56, 2015.
8. **Drexler SK and Yazdi AS.** Complex roles of inflammasomes in carcinogenesis. *Cancer J* 19: 468-472, 2013.
9. **Dumas JF, Goupille C, Julienne CM, Pinault M, Chevalier S, Bougnoux P, Servais S, and Couet C.** Efficiency of oxidative phosphorylation in liver mitochondria is decreased in a rat model of peritoneal carcinosis. *J Hepatol* 54: 320-327, 2011.
10. **Inui A.** Cancer anorexia-cachexia syndrome: current issues in research and management. *CA Cancer J Clin* 52: 72-91, 2002.
11. **Kazantzis M and Seelaender MC.** Cancer cachexia modifies the zonal distribution of lipid metabolism-related proteins in rat liver. *Cell Tissue Res* 321: 419-427, 2005.
12. **Latz E, Xiao TS, and Stutz A.** Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol* 13: 397-411, 2013.
13. **Lira FS, Yamashita AS, Rosa JC, Tavares FL, Caperuto E, Carnevali LC, Jr., Pimentel GD, Santos RV, Batista ML, Jr., Laviano A, Rossi-Fanelli F, and Seelaender M.** Hypothalamic inflammation is reversed by endurance training in anorectic-cachectic rats. *Nutr Metab (Lond)* 8: 60, 2011.

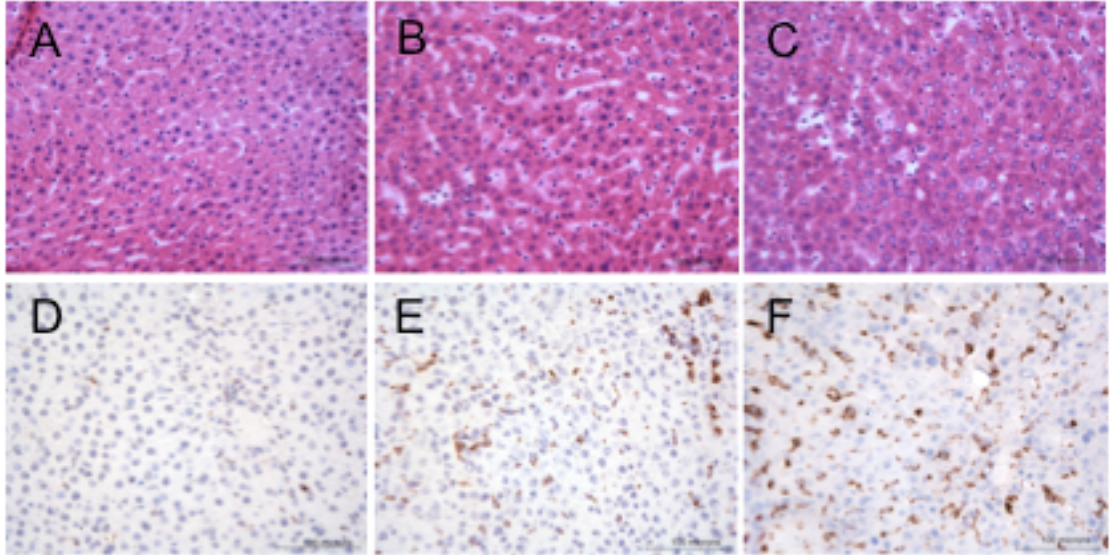


14. **Machado AP, Costa Rosa LF, and Seelaender MC.** Adipose tissue in Walker 256 tumour-induced cachexia: possible association between decreased leptin concentration and mononuclear cell infiltration. *Cell Tissue Res* 318: 503-514, 2004.
15. **Martignoni ME, Dimitriu C, Bachmann J, Krakowski-Rosen H, Ketterer K, Kinscherf R, and Friess H.** Liver macrophages contribute to pancreatic cancer-related cachexia. *Oncol Rep* 21: 363-369, 2009.
16. **Narsale AA, Enos RT, Puppa MJ, Chatterjee S, Murphy EA, Fayad R, Pena MO, Durstine JL, and Carson JA.** Liver Inflammation and Metabolic Signaling in ApcMin/+ Mice: The Role of Cachexia Progression. *PLoS One* 10: e0119888, 2015.
17. **Preston T, Slater C, McMillan DC, Falconer JS, Shenkin A, and Fearon KC.** Fibrinogen synthesis is elevated in fasting cancer patients with an acute phase response. *J Nutr* 128: 1355-1360, 1998.
18. **Reynolds CM, McGillicuddy FC, Harford KA, Finucane OM, Mills KH, and Roche HM.** Dietary saturated fatty acids prime the NLRP3 inflammasome via TLR4 in dendritic cells-implications for diet-induced insulin resistance. *Mol Nutr Food Res* 56: 1212-1222, 2012.
19. **Rosa LF, Kazantzis M, and Seelaender MC.** The effect of Walker-256 tumour development upon Kupffer cell metabolism. *Cell Biochem Funct* 16: 195-202, 1998.
20. **Schroder K and Tschopp J.** The inflammasomes. *Cell* 140: 821-832, 2010.
21. **Seelaender MC, Kazantzis M, and Costa Rosa LF.** The effect of adrenaline and Walker-256 tumour-induced cachexia upon Kupffer cell metabolism. *Cell Biochem Funct* 17: 151-156, 1999.
22. **Sica A, Invernizzi P, and Mantovani A.** Macrophage plasticity and polarization in liver homeostasis and pathology. *Hepatology* 59: 2034-2042, 2014.
23. **Stienstra R, van Diepen JA, Tack CJ, Zaki MH, van de Veerdonk FL, Perera D, Neale GA, Hooiveld GJ, Hijmans A, Vroegrijk I, van den Berg S, Romijn J, Rensen PC, Joosten LA, Netea MG, and Kanneganti TD.** Inflammasome is a central player in the induction of obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 15324-15329, 2011.
24. **Takezawa R, Watanabe Y, and Akaike T.** Direct evidence of macrophage differentiation from bone marrow cells in the liver: a possible origin of Kupffer cells. *J Biochem* 118: 1175-1183, 1995.
25. **Tisdale MJ.** Mechanisms of cancer cachexia. *Physiol Rev* 89: 381-410, 2009.
26. **Topkan E, Yavuz AA, and Ozyilkan O.** Cancer cachexia: pathophysiologic aspects and treatment options. *Asian Pac J Cancer Prev* 8: 445-451, 2007.
27. **Tsoli M and Robertson G.** Cancer cachexia: malignant inflammation, tumorkines, and metabolic mayhem. *Trends Endocrinol Metab* 24: 174-183, 2013.
28. **Vandanmagsar B, Youm YH, Ravussin A, Galgani JE, Stadler K, Mynatt RL, Ravussin E, Stephens JM, and Dixit VD.** The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Med* 17: 179-188, 2011.
29. **Watanabe T, Shibata M, Nishiyama H, Soeda S, Furukawa S, Gonda K, Takenoshita S, and Fujimori K.** Serum levels of rapid turnover proteins are decreased and related to systemic inflammation in patients with ovarian cancer. *Oncol Lett* 7: 373-377, 2014.
30. **Zitvogel L, Kepp O, Galluzzi L, and Kroemer G.** Inflammasomes in carcinogenesis and anticancer immune responses. *Nat Immunol* 13: 343-351, 2012.

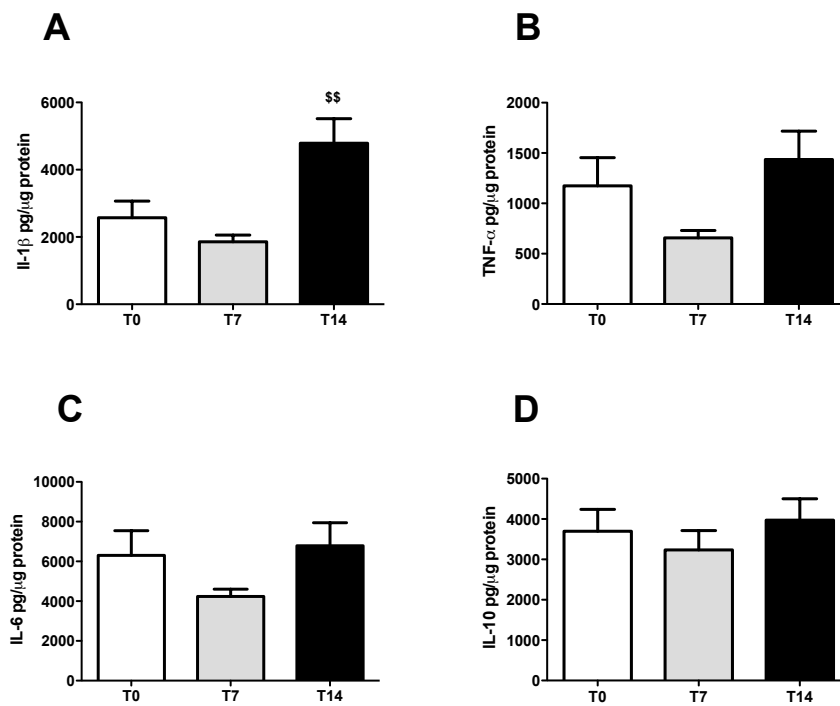
## Figures 1.



**Figure 1.** Gene expression from inflammatory pathway in the liver along cachexia progression. Results are expressed as mean (n=5) ± S.E.M. The liver was collected at time points (0, 7th and 14th day after inoculation of tumour cells). \*p<0,05 vs T0; \*\*p<0,001 vs T0; \*\*\*p<0,0001 vs T0; ##p<0,001 vs T7; \$\$\$p<0,001 vs all the times points. A- gene expression of Tlr4. B- gene expression of Myd88. C- gene expression Traf6. D- gene expression of NF- κBp65. E- gene expression of Tlr2. F- gene expression of Ccl2. G- gene expression of CD68. H- gene expression of F4/80. I- gene expression of Il-1β.

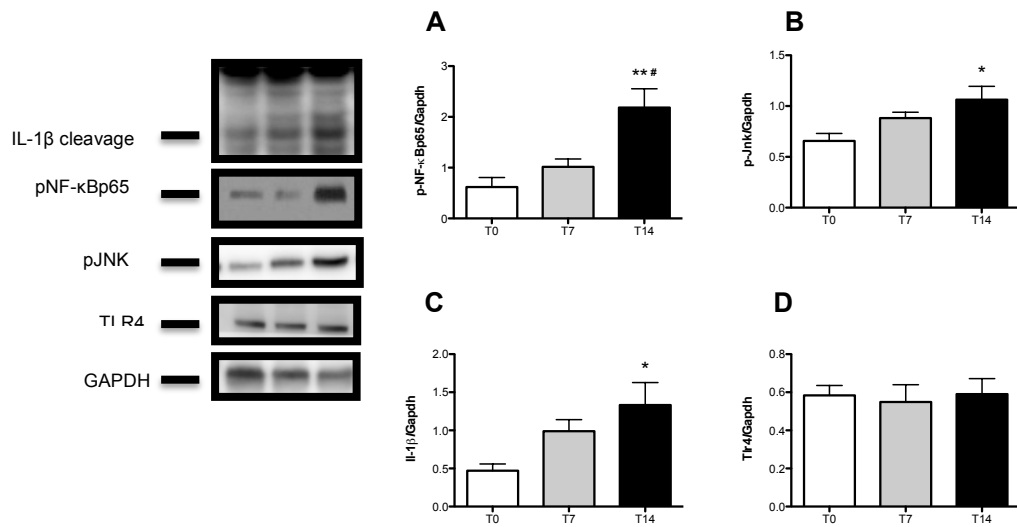
**Figure 2.**

**Figure 2.** H&E staining and immunohistochemistry to CD68. A- T0 stained with H&E. B- T7 stained with H&E. C- T14 stained with H&E. D- T0 immunostaining to CD68 antibody. E- T7 immunostaining to CD68 antibody. F- T14 immunostaining to CD68 antibody.

**Figure 3.**

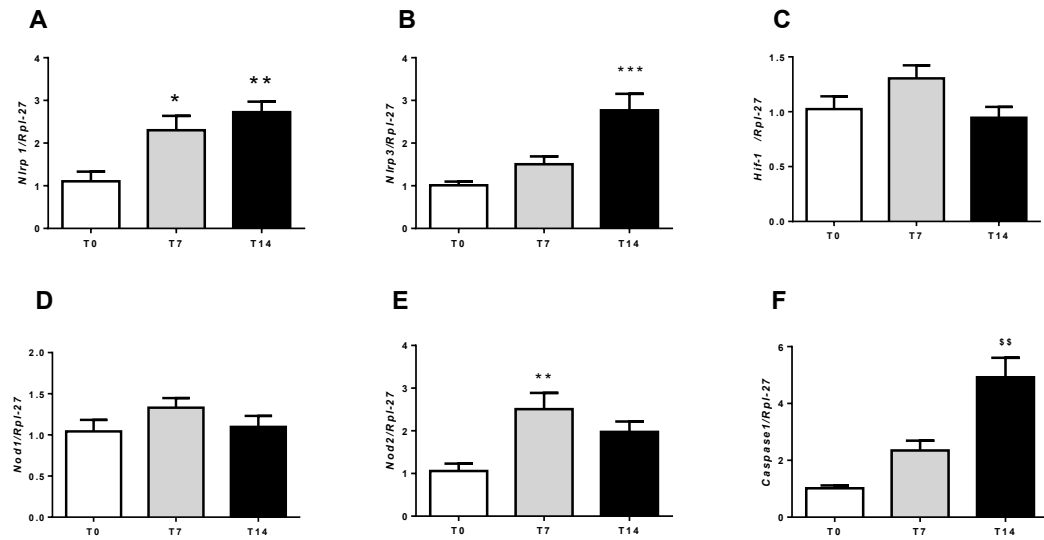
**Figure 3.** Protein expression from inflammatory cytokine in the liver along cachexia progression. Results are expressed as mean (n=5) ± S.E.M. The liver was collected at time points (0, 7th and 14th day after inoculation of tumour cells). \$\$p<0,001 vs all the times points. A- protein expression of total IL-1β. B- protein expression TNF-α. C- protein expression of IL-6. D- protein expression of IL-10.

Figure 4.



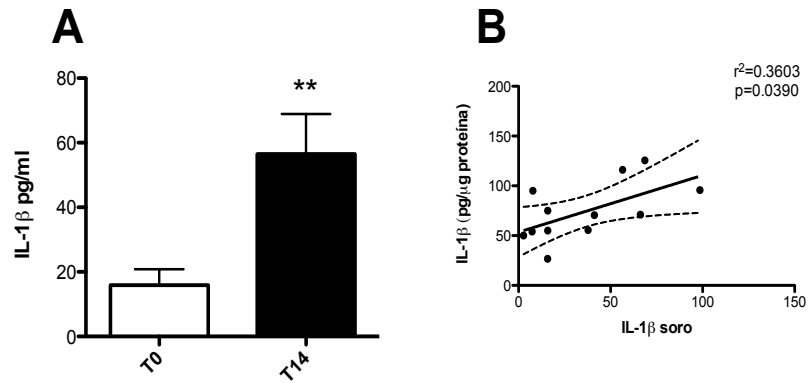
**Figure 4.** Protein expression from transcription factor in the liver along cachexia progression. Results are expressed as mean ( $n=4$ )  $\pm$  S.E.M. The liver was collected at time points (0, 7th and 14th day after inoculation of tumour cells). \* $p<0,05$  vs T0; \*\* $p<0,001$  vs T0; # $p<0,05$  vs T7. A- protein expression of p-NFκp65. B- protein expression of p-Jnk. C- protein expression of cleavage IL-1β. D- protein expression of Tlr4.

Figure 5.



**Figure 5.** Gene expression from inflammasome pathway in the liver along cachexia progression. Results are expressed as mean (n=5)  $\pm$  S.E.M. The liver was collected at time points (0, 7th and 14th day after inoculation of tumour cells). \* $p < 0,05$  vs T0; \*\* $p < 0,001$  vs T0; \*\*\* $p < 0,0001$  vs T0; \$\$\$ $p < 0,001$  vs all the times points. A- gene expression of Nlrp1. B- gene expression of Nlrp3. C- gene expression Hif-1 $\alpha$ . D- gene expression of Nod1. E- gene expression of Nod2. F- gene expression of Caspase 1.

Figure 6.



**Figure 6.** IL-1 $\beta$  protein in the serum along cachexia progression. A- Results are expressed as mean (n=5)  $\pm$  S.E.M. The serum was collected at time points (0 and 14th day after inoculation of tumour cells). \*\*p<0,01 vs T0. B- Correlation between IL-1 $\beta$  protein from serum and liver.

**Table 1.** Primer list

Gene (Species)	Sequence 5' → 3'
<i>p65</i> (Rattus norvegicus) (NM 199267.2)	Fw: ATG CAT CCA CAG CTT CCA G Rev: TGC TCC TCT ATG GGA ACT TGA
<i>Tlr4</i> (Rattus norvegicus) (NM 019178.1)	Fw: TCT AAA TGC CAA CTG GAA CAG A Rev: ATG GGA TGG ATC CAG AAA CA
<i>Myd88</i> (Rattus norvegicus) (NM 198130.1)	Fw: GCG AGC TCA TTG AGA AAA GG Rev: ACA CCT GGA GAC AGG CTG A
<i>Traf6</i> (Rattus norvegicus) (NM 001107754.2)	Fw: AAG TCC ATA AGG GAT GCA GGT Rev: TCG CTT TGC AAA ATT GTC AG
<i>Nlrp1</i> (Rattus norvegicus) (NM 001145755.2)	Fw: GCT TCA GCC CCC AAA GAT Rev: TTG TCC AAG AGA GGG TCC AC
<i>Nlrp3</i> (Rattus norvegicus) (NM 001191642.1)	Fw: GCT GAA CTT GAG CAA CAA CG Rev: CAC CCA ACT GTA GGC TCT GC
<i>Tlr2</i> (Rattus norvegicus) (NM 198769.2)	Fw: TTT GAT CAC TGC ACC CTC AA Rev: ATG TGC AGG CTC CGT ATT GT
<i>Hif1a</i> (Rattus norvegicus) (NM 024359.1 )	Fw: CAA CTG CCA CCA CTG ATG A Rev: GGG TAG AAG GTG GAG ATG C
<i>Caspase1</i> (Rattus norvegicus) (NM 012762.2)	Fw: ACA TCT TTC TCC GAG GGT TG Rev: CAC CTC TTT CAC CAT CTC CAG
<i>Nod1</i> (Rattus norvegicus) (NM 001109236.1)	Fw: TGC ATT CAA TGG CAT CTC G Rev: TGG TCA GCC AGA TTA TTG TGA
<i>Nod2</i> (Rattus norvegicus) (NM 001106172.1)	Fw: CAT CCC AGA GGG CAA GAA AA Rev: GCC TCG TAA GGC AGA GAC AGT
<i>Il-1β</i> (Rattus norvegicus) (NM 031512.2)	Fw: GCA GCT TTC GAC AGT GAG G Rev: TCA AGG GCT TGG AAG CAA
<i>Rpl27</i> (Rattus norvegicus) (NM 022514.1)	Fw: CCT CAT GCC CAC AAG GTA CT Rev: CTG TCT TGT ATC GCT CCT CAA A

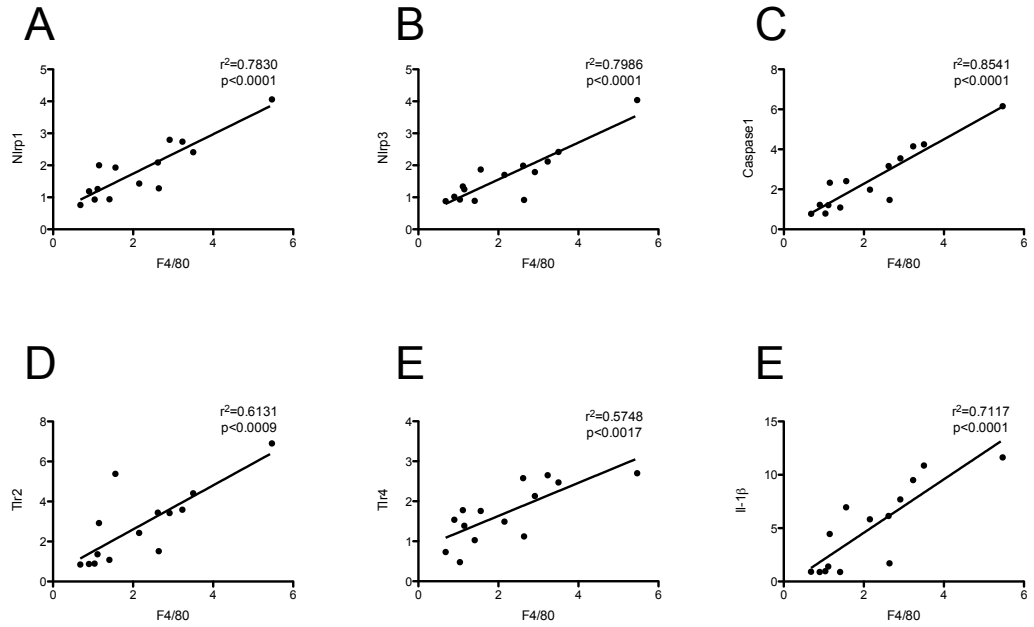


**Table 2.** Body and tissue mass in Control (C) and Cachectic (T) animals

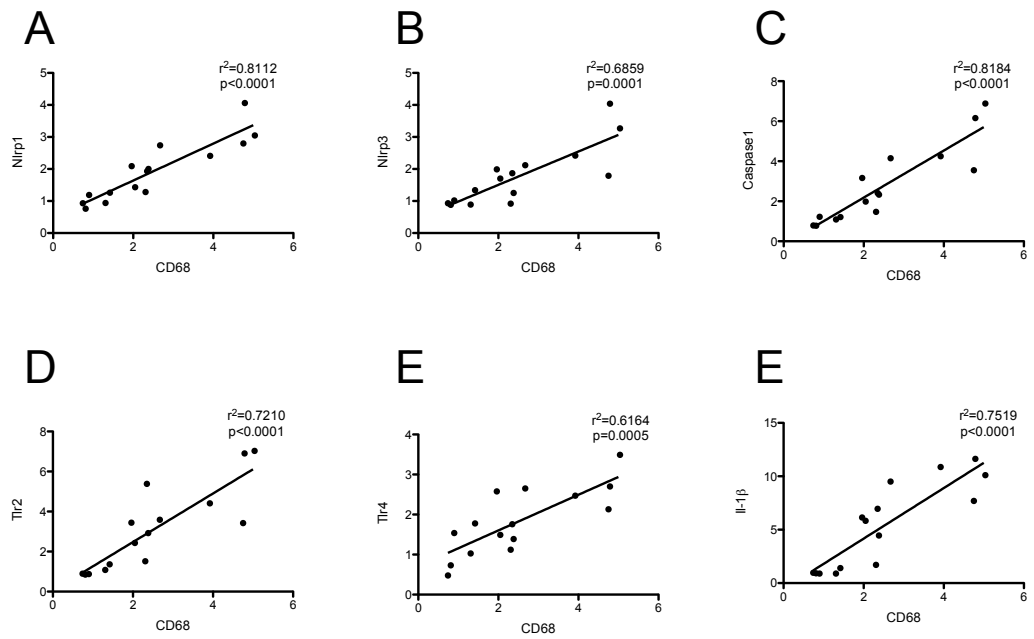
	<b>T0</b>		<b>T7</b>		<b>C14</b>		<b>T14</b>	
<b>BM-TM (g)</b>	266,3	± 17,1	278,97	± 8,79	328,20	± 9,12	296,61	± 10,56*
<b>TM (g)</b>			5,23	± 2,35			19,19	± 4,70
<b>Liver (g)</b>	6.32	± 0.72	8,60	± 0,71	11,03	± 1,13	11,17	± 1,56
<b>MEAT (g)</b>	1,10	± 0,56	1,47	± 0,22	1,60	± 0,23	1,24	± 0,34
<b>RPAT (g)</b>	0,97	± 0,4	2,11	± 0,75	2,79	± 1,30	2,17	± 0,75
<b>EAT (g)</b>	1,74	± 0,54	3,06	± 0,78	3,39	± 0,85	3,26	± 0,82

Note: C (Control), T (Cancer-cachexia), BM – TM (Body Mass – Tumour mass), TM (Tumour Mass), MEAT (Mesenteric adipose tissue), RPAT (Retroperitoneal adipose tissue) and EAT (Epididymal adipose tissue). Values are expressed as mean ± S.E.M. n=5. \*p<0.05.

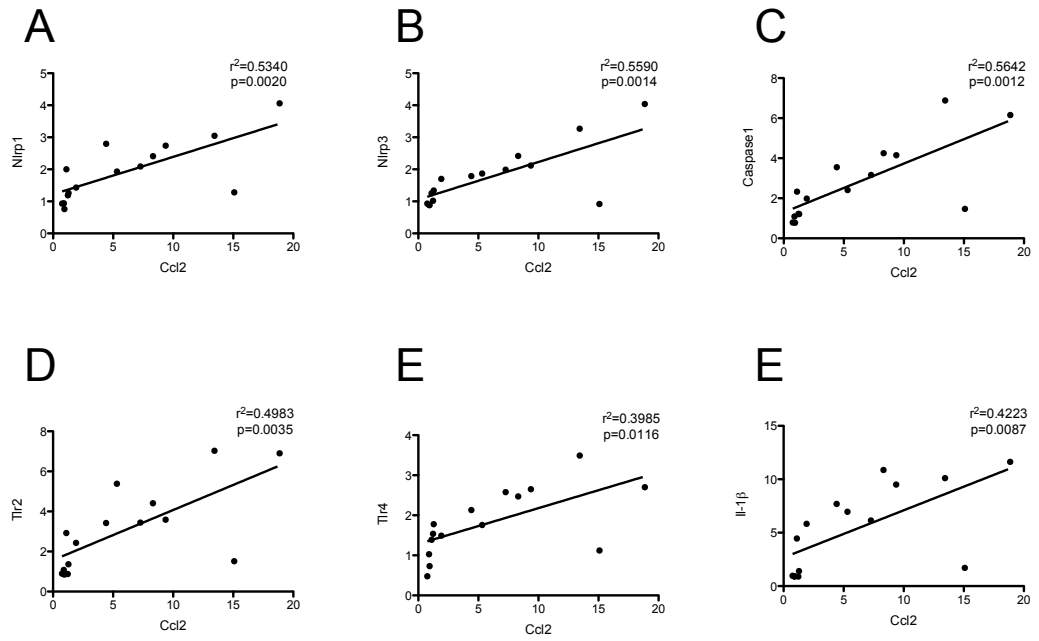
## Supplementary figures



**Supplementary Figure 1.** Correlation with gene expression of F4/80 in the liver. A- Nlrp1. B-Nlrp3. C- Caspase1. D- Tlr2. E- Tlr4. F- Il-1 $\beta$ .



**Supplementary Figure 2.** Correlation with gene expression of CD68 in the liver. A- Nlrp1. B-Nlrp3. C- Caspase1. D- Tlr2. E- Tlr4. F- Il-1 $\beta$ .



**Supplementary Figure 3.** Correlation with gene expression of Ccl2 in the liver. A- Nlrp1. B-Nlrp3. C- Caspase1. D- Tlr2. E- Tlr4. F- Il-1 $\beta$ .