

**JOANNA DARCK CAROLA CORREIA LIMA**

**O papel do infiltrado inflamatório no tumor e sua contribuição para  
inflamação sistêmica e desenvolvimento da caquexia**

Dissertação apresentação 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 Mestre em Ciências.

São Paulo  
2016

**JOANNA DARCK CAROLA CORREIA LIMA**

**O papel do infiltrado inflamatório no tumor e sua contribuição para  
inflamação sistêmica e desenvolvimento da caquexia**

Dissertação apresentação 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 Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Marília Cerqueira Leite Seelaender

Versão original

São Paulo  
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

Lima, Joanna Darck Carola Correia.

O papel do infiltrado inflamatório no tumor e sua contribuição para inflamação sistêmica e desenvolvimento da caquexia / Joanna Darck Carola Correia Lima. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Profa. Dra. Marília Cerqueira Leite Seelaender.

Dissertação (Mestrado) – 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 de lípidos e câncer.

Versão do título para o inglês: Role of the tumour inflammatory infiltrate and its contribution to systemic inflammation and the development of cachexia.

1. Caquexia 2. Microambiente tumoral 3. Sistema imunológico 4. Inflamação 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/SBIB012/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Joanna Darck Carola Correia Lima.

Título da Dissertação: O papel do infiltrado inflamatório no tumor e sua contribuição para inflamação sistêmica e desenvolvimento da caquexia.

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

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,  
em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

**Aprovado(a)**

**Reprovado(a)**

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

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

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



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil  
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-6405  
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 08 de novembro de 2013.

PARECER 1151/CEP

A Comissão de *Ética em Pesquisas em Seres Humanos* do ICB, nesta data APROVOU o projeto intitulado: *"Papel dos infiltrantes-inflamatórios do tumor associado à inflamação sistêmica em pacientes caquéticos"* da pesquisadora MARÍLIA CERQUEIRA LEITE SEELAENDER e aluna JOANNA DARCK CAROLA CORREIA LIMA.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final), de acordo com a Resolução nº 466/12, item II, II.19 e II.20, do Conselho Nacional de Saúde conforme modelo constante no [site.icb.usp.br](http://site.icb.usp.br).

*Ao pesquisador cabe também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste.*

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em 08.11.2014.

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAOLO M.A. ZANOTTO  
Coordenador da Comissão de Ética em  
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP



São Paulo, 27 de agosto de 2014.

*Ilmo(a). Sr(a).*

**Profa. Dra. Marília Cerqueira Leite Seelaender**

Depto. de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas  
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

REFERENTE: **Projeto de Pesquisa** "Papel dos infiltrantes-inflamatórios do tumor associado à inflamação sistêmica em pacientes caquéticos"

**Pesquisador(a) responsável:** Profa. Dra. Marília Cerqueira Leite Seelaender

**Equipe de Pesquisa:** Joanna Darck Carola Correia Lima, Paulo Sergio Martins Alcântara, Angela Flávia Logullo Waitzberg

**CAAE:** 20643513.9.0000.5467

**Registro CEP-HU/USP:** 1390/14

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em reunião ordinária realizada no dia 22 de agosto de 2014, analisou o Projeto de Pesquisa acima citado, considerando-o como **APROVADO**, bem como o seu **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**.

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios parciais e final, de acordo com a Resolução nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, inciso XI.2, letra "d".

**O primeiro relatório está previsto para 22 de fevereiro de 2015.**

Atenciosamente,

  
**Dr. Maurício Seckler**  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital Universitário da USP

*“Pondus meum amor meus; eo feror quocumque feror”* (Santo Agostinho)

## AGRADECIMENTOS

À toda energia que rege o movimento do mundo e que me guiou até aqui. À minha força maior na Terra, minha inspiração diária, meu exemplo de superação, determinação e mais puro amor, minha querida Mãe, te dedico todos os meus passos e conquistas, pois nada seria possível sem o seu apoio, confiança e conselhos.

À professora Dra. Marília Cerqueira Leite Seelaender, pela oportunidade de fazer parte do seu grupo e por orientar o meu processo de formação científica. Tentarei retribuir todo seu apoio com a mais sincera dedicação no trabalho e produtividade. Obrigada chefe!

Aos meus colegas de laboratório, agradeço a dedicação, ensinamentos, discussões, brigas, choros, madrugadas, todas as pizzas compartilhadas, desabafos e principalmente todas as alegrias. Quero apenas agradecer por fazerem dos momentos difíceis, bons dias de glória! E ainda dentro desse ambiente de trabalho, construí amigos, irmãos, parceiros, companheiros de vida. A VOCÊS, agradeço por todo amor compartilhado! Aos meus amores de outras vidas, Mexerica e Fani, amo vocês mais que coca-cola!

Minha querida amiga Emília Ribeiro, sem a senhora todo caminho percorrido teria sido MUITO mais difícil. Obrigada por fazer a saudade de casa ser pequenina na imensidão do seu amor!

À toda equipe de colaborações, Dr. José Pinhata Otoch, Dra. Linda Ferreira Maximiano, Dra Angela Waitzberg, Dr Aloisio Souza, Dra Angelica Simões, Dr Niels Olsen, Dr Welbert Oliveira, Dra Rosana Prisco e, em especial, Dr. Paulo Sérgio Martins de Alcântara, pelo suporte durante todas as discussões do projeto contribuindo positivamente para que fosse possível a realização desse trabalho.

À todos do Instituto de Ciências Biomédicas, em especial a todo grupo de professores e alunos do departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Aos serviços da biblioteca e à secretaria, em especial à Regina, pela sua orientação durante todas as etapas do Mestrado.

À Capes pelo incentivo e apoio a pesquisa.

“Portanto, não se preocupem com o amanhã, pois o amanhã trará as suas próprias preocupações. Basta a cada dia o seu próprio mal” - cada dia com sua agonia (Mateus 6:34)

## RESUMO

Lima JDCC. O papel do infiltrado inflamatório no tumor e sua contribuição para inflamação sistêmica e desenvolvimento da caquexia. [dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

A caquexia associada ao câncer é uma síndrome multifatorial caracterizada principalmente pela perda de peso severa, acompanhada de grande desequilíbrio metabólico. Embora a etiologia seja desconhecida, acredita-se que resulta da interação entre o hospedeiro e tumor, induzindo inflamação sistêmica. Compreender a relação entre o microambiente tumoral e a inflamação é fundamental para a descoberta de marcadores efetivos para diagnóstico e reversão da síndrome. Desse modo, o objetivo do trabalho foi caracterizar as diferenças nas populações celulares de infiltrado inflamatório no tumor e analisar morfologia e aspectos moleculares ligados à inflamação local e sistêmica, a fim de avaliar se a presença da caquexia é determinada pelo perfil inflamatório do tumor. O estudo envolveu 53 pacientes diagnosticados com adenocarcinoma de cólon e reto, posteriormente distribuídos em dois grupos, seguindo os critérios de classificação da caquexia adotados pelo consenso internacional (Evans *et al*, 2008): Câncer sem caquexia (WSC n=22) e Câncer com caquexia (CC n=31). A análise histopatológica mostrou que o estadiamento tumoral independe da caquexia nos tumores de cólon e reto. A caracterização dos macrófagos infiltrantes demonstrou população com perfil anti-inflamatório (M2) inferior no grupo CC e a análise da expressão proteica de citocinas no microambiente tumoral indicou níveis de IL-13, uma citocina anti-inflamatória, reduzidos no grupo CC; já as citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias estavam aumentadas no grupo CC. A correlação entre macrófagos M1 e M2 com citocinas e quimiocinas inflamatórias demonstrou-se positiva para macrófagos M1, enquanto os macrófagos M2 mostram uma correlação negativa com as mesmas. O balanço da expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias analisado através da correlação entre citocinas IL-1 $\beta$ /IL-10 e IL-13/TNF- $\alpha$  demonstrou-se positiva. Esses resultados fornecem evidências de que o tumor de pacientes caquéticos e não caquéticos possui um perfil de secreção diferente no que diz respeito a fatores inflamatórios e diferentes percentuais de fenótipo de macrófagos.

**Palavras-chave:** Caquexia. Microambiente tumoral. Sistema imunológico. Inflamação.

## ABSTRACT

Lima JDCC Role of the tumour inflammatory infiltrate and its contribution to systemic inflammation and the development of cachexia. [Master's thesis (Cellular and Tissue Biology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016

Cancer cachexia is a multifactorial syndrome characterized by severe weight loss accompanied by large metabolic imbalance. Although the aetiology of cachexia is unknown, it is believed that it is a result of the interaction between the host's cells and the tumour, which induces systemic inflammation. Understanding the relationship between, inflammation and tumour microenvironment is required for the discovery of markers and treatment of the syndrome. The aim of the present study was to characterise differences in cell populations of the inflammatory tumour infiltrate and to analyse tumour morphology. Molecular aspects related to local and systemic inflammation were measured in order to assess whether the presence of cachexia is determined by the inflammatory tumour profile. The study involved 53 patients diagnosed with colorectal cancer and then distributed into two groups following the cachexia classification criteria adopted by international consensus (Evans et al, 2008): cancer without cachexia (WSC n = 22) and cancer cachexia (CC n = 31). Histopathological analysis showed that the presence of cachexia in patients with colorectal cancer was independent from tumour staging. Characterisation of infiltrating macrophages revealed a lower percentage of anti-inflammatory cells (M2) in CC. Corresponding results of protein expression of cytokines in tumour microenvironment demonstrated lower levels of anti-inflammatory IL-13 in CC, whereas the concentration of pro-inflammatory cytokines and chemokines higher in tumour tissue of cachectic patients. A positive correlation was found between inflammatory cytokines and M1 macrophages, while M2 macrophages exhibited a negative correlation with the same factors. There were also positive correlations between the pro-inflammatory IL-1 $\beta$  and anti-inflammatory IL-10 as well as between TNF- $\alpha$  and IL-13 of the tumour tissue in cachectic group. These results provide evidence that cachectic and non-cachectic patients present different secretion profiles of inflammatory factors and different patterns of macrophage phenotypes possibly related with different susceptibility to cachexia.

**Keywords:** Cachexia. Tumor microenvironment. Immune system. Inflammation

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Critérios para diagnóstico da Caquexia (adaptado de EVANS et al., 2008). .....	19
Figura 2: Estágios da caquexia associada ao câncer no consenso brasileiro (adaptado de FEARON et al., 2011).....	19
Figura 3: A composição do microambiente tumoral (adaptado de Markman e Shiao, 2015).....	21
Figura 4: Estratégias de análises específicas .....	32
Figura 5: Fluxograma da seleção dos pacientes .....	34
Figura 6: Frequência do estadiamento tumoral no câncer colorretal .....	37
Figura 7: Corte histológicos nos tumores colorretais.....	38
Figura 8: Representação gráfica da análise histopatológica nos tumores dos pacientes .....	39
Figura 9: Representação gráfica da porcentagem de macrófagos com perfil anti-inflamatório no microambiente tumoral .....	41
Figura 10: Expressão gênica de citocinas no tumor de pacientes (A-TNF- $\alpha$ ; B-CCL2).....	43
Figura 11: Expressão proteica de citocinas do tumor (A-IL-1 $\beta$ ; B-IL-13). .....	45
Figura 12: Representação gráfica da expressão proteica da quimiocina inflamatória de macrófagos (CCL3) .....	46
Figura 13: Correlação entre o infiltrado imunitário e a expressão proteica de citocinas inflamatórias.....	48

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista de Primers.....	29
Tabela 2: Lista de citocinas analisadas .....	30
Tabela 3: Painel de anticorpos conjugados para citometria de fluxo. ....	32
Tabela 4: Classificação geral dos pacientes .....	35
Tabela 5: Parâmetros bioquímicos .....	36
Tabela 6: Caracterização de células do infiltrado inflamatório no microambiente tumoral.....	40
Tabela 7: Expressão gênica de citocinas e fatores relacionados à caquexia no tumor dos pacientes..	42
Tabela 8: Expressão proteica de citocinas pro-anti- inflamatórias no tumor de pacientes.....	44
Tabela 9: Fatores de crescimento e diferenciação tumoral .....	45
Tabela 10: Expressão proteica de fatores quimioatraentes no tumor de pacientes .....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Δ	Delta
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
AMP	Adenosina monofosfato
CAP	Protocolo americano de patologia
CC	Câncer com caquexia
CCL	Proteínas quimioatraentes
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CEP	Comitê de ética e pesquisa
COX	Ciclo-oxigenase
Ct	Limiar de ciclagem
DMEN	Meio eagle modificado por dulbecco
DMSO	Sulfóxido de dimetilo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético (tipo de anticoagulante)
EGF	Fator de crescimento epidermal
G-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos
HBSS	Solução salina balanceada de Hank's
HPRT	Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase
HU/USP	Hospital Universitário da Universidade de São Paulo
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corporal
iNOS	Óxido nítrico-sintase induzida
IP-10	Interferon-gama induzido por proteína 10
LMF	Fator mobilizador de lipídeos
M1	Macrófagos do tipo 1
M2	Macrófagos do tipo 2
MDSCs	Células supressoras derivadas da medula
MMPs	Metaloproteinases de matriz
OMS	Organização mundial de saúde
PCR	Proteína C-reativa

PGE2	Prostaglandina E2
PIF	Fator indutor de proteólise
qRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
RT	Transcrição reversa
SAP	Serviço de anatomia patológica
SFB	Soro fetal bovino
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TNF	Fator de necrose tumoral
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
WSC	Câncer sem caquexia

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
1.1	A caquexia associada ao câncer .....	17
1.2	Definição clínica e fisiopatologia da caquexia.....	18
1.3	Inflamação sistêmica na caquexia: papel do tumor e do infiltrado inflamatório .....	21
1.4	Hipótese e Justificativa .....	23
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>
2.1	Geral.....	24
2.2	Específicos.....	24
<b>3</b>	<b>CAUSÍSTICA E MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>
3.1	Recrutamento dos pacientes.....	25
3.2	Aprovação no comitê de ética.....	25
3.3	CrITÉRIOS de Inclusão e Exclusão .....	25
3.4	Termo de consentimento e avaliação clínica.....	26
3.5	Coleta de sangue e análise de parâmetros bioquímicos .....	26
3.6	Diagnóstico de caquexia.....	26
3.7	Coleta do tumor.....	27
3.8	Análise histopatológica .....	27
3.9	Reação em cadeia da Polimerase (PCR em tempo Real) .....	28
3.10	Quantificação de citocinas por método Luminex® .....	29
3.11	Imunofenotipagem por citometria de fluxo .....	31
3.12	Análise estatística .....	33
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
4.3	Caracterização de células do infiltrado inflamatório no microambiente tumoral .....	40
4.4	Expressão gênica no tecido tumoral de citocinas e fatores de comunicação celular relacionados à caquexia .....	41
4.5	Expressão proteica no tecido tumoral de citocinas e fatores relacionados à caquexia.....	43
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>49</b>

<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>53</b>
<b>REFERÊNCIAS* .....</b>	<b>54</b>
<b>ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....</b>	<b>58</b>
<b>ANEXO B – Questionário de qualidade de vida - EORTC QLC-C30.....</b>	<b>60</b>
<b>ANEXO C – Questionário de anorexia – FAACT-ESPEN.....</b>	<b>62</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 A caquexia associada ao câncer

A caquexia é descrita como uma síndrome multifatorial, caracterizada inicialmente pela perda acentuada de tecido adiposo e de massa muscular esquelética (DONOHOE; RYAN; REYNOLDS, 2011). Trata-se de uma denominação derivada do grego *kakos*, que significa má e *hexis*, que significa condição. Esta síndrome já fora descrita há cerca de 2000 anos por Hipócrates e é uma característica comum de diversas doenças, tais como doença pulmonar obstrutiva crônica, insuficiência cardíaca crônica, infecção crônica, sepse, AIDS e câncer (FEARON et al., 2011). A síndrome é de etiologia complexa e multifatorial, que envolve principalmente a redução da ingestão de alimentos e uma acentuada alteração metabólica, central e sistêmica (FEARON; MOSES, 2002).

A caquexia associada ao câncer foi historicamente definida somente pela perda de peso, por ser essa a característica clínica mais marcante. No quadro de caquexia cancerosa, a síndrome está presente em aproximadamente 50% de todos os pacientes e em até 80% dos pacientes com estágio avançado da doença, associando-se à uma redução à tolerância ao tratamento, diminuição da resposta terapêutica, da qualidade de vida e a da sobrevivência (KHAN; TISDALE, 1999). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é a segunda maior causa de mortalidade em todo mundo, atrás apenas das doenças cardiovasculares. Já no Brasil, o câncer se apresenta como a segunda maior causa de morte (DUVAL et al., 2010). Dentro do percentual de pacientes com caquexia associada ao câncer, cerca de 22% a 40% das mortes por câncer são causadas diretamente pela caquexia (ARGILÉS et al., 2003). Entretanto, sua incidência varia entre os diferentes tipos de câncer, sendo a maior prevalência no câncer de pâncreas e gastrointestinal, atingindo cerca de 80% dos pacientes e, ainda, em pacientes com câncer de pulmão, nos quais acomete cerca de 60% (WATCHORN et al., 2001). Embora a caquexia esteja mais associada a alguns tipos de tumores, o tipo histológico e o estágio de progressão tumoral não são fatores determinantes na manifestação da síndrome (COSTA, 1977).

## 1.2 Definição clínica e fisiopatologia da caquexia

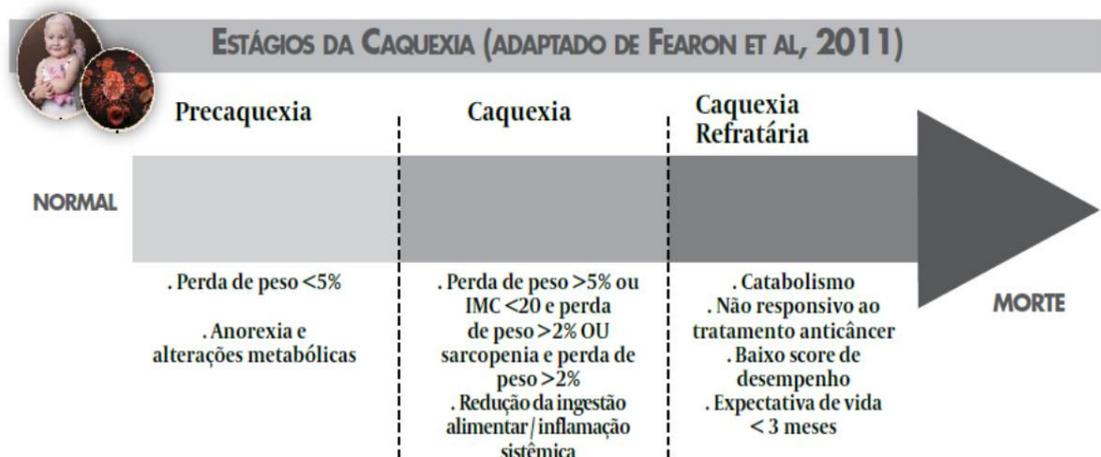
Embora a caquexia não seja até o momento, alvo de uma definição exata e precisa, as características básicas e clínicas que a compõe fazem parte de um crescente consenso. Definições prévias anteriores descreveram que a caquexia é "uma síndrome envolvendo a perda de músculo e gordura diretamente causada por fatores tumorais, ou indiretamente causada por uma resposta do hospedeiro à presença do tumor" (MACDONALD et al., 2003); Na tentativa de aprimorar a definição, posteriormente, além da perda de peso, outros parâmetros como anorexia (AREZZO DI TRIFILETTI et al., 2013) e ingestão alimentar foram acrescentados e com isso, definições mais amplas incluem mudanças na ingestão alimentar (BLUM; STRASSER, 2011). Já definições mais recentes propuseram acrescentar a inflamação sistêmica na definição da caquexia, pois estudos indicam consistentemente a presença desse sintoma (FEARON et al., 2006).

Na tentativa de melhor definir os critérios para diagnóstico da caquexia, um consenso internacional propôs critérios para diagnóstico da síndrome da perda de peso; Assim as relevantes alterações bioquímicas relacionadas com a presença marcante da inflamação sistêmica, anemia e hipoalbuminemia (EVANS et al., 2008) foram consideradas. Nesse consenso, alguns parâmetros foram estabelecidos como critérios, nos quais incluem-se a perda involuntária de peso corporal nos últimos 12 meses ( $\geq 5\%$  do peso corporal anterior relatado ou  $IMC < 20\text{kg/m}^2$ ), acrescidos de mais três das cinco alterações, a saber: diminuição da força muscular, fadiga, anorexia, diminuição da massa livre de gordura e alterações bioquímicas caracterizados pela anemia: hemoglobina  $<12\text{g/dL}$ ; níveis de albumina sérica diminuídos ( $<3,2\text{g/dL}$ ) e aumento de marcadores inflamatórios (proteína C-reativa e interleucina-6) como pode ser observado abaixo na figura 1.



**Figura 1:** Critérios para diagnóstico da Caquexia (adaptado de EVANS et al., 2008).

Posteriormente, um outro consenso internacional propôs que podem ser observadas três fases de relevância clínica: pré-caquexia, caquexia e caquexia refratária (Figura 2). De acordo com os autores, o pré-caquexia é caracterizada pela perda de peso corporal  $\leq 5\%$ , anorexia e alterações metabólicas; a segunda fase (caquexia) é caracterizada por perda de peso significativa ( $> 5\%$ ) nos últimos 6 meses, ou o índice de massa corporal (IMC)  $< 20 \text{ kg/m}^2$ ; na caquexia refratária, os pacientes não respondem mais à terapia anticâncer (FEARON et al., 2011).



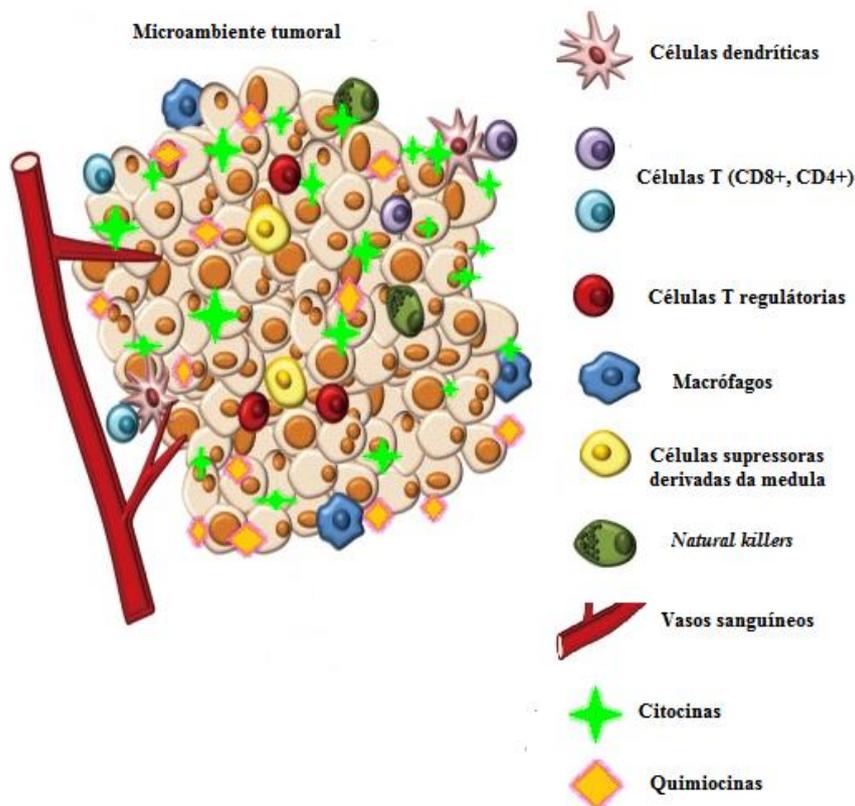
**Figura 2:** Estágios da caquexia associada ao câncer no Consenso Brasileiro de Caquexia (adaptado de FEARON et al., 2011).

Acredita-se, portanto, que as alterações metabólicas observadas na caquexia são resultados da interação de fatores tumorais, fatores do hospedeiro e também da interação entre eles (DONOHOE; RYAN; REYNOLDS, 2011). Nesse contexto, as células tumorais produzem fatores pró-inflamatórios e pró-caquéticos que estão relacionados diretamente com a resposta inflamatória do hospedeiro (TISDALE, 2009). Fisiopatologicamente, os fatores pró-caquéticos contribuem diretamente para depleção de massa muscular e adiposa. Na urina de pacientes com caquexia associada ao câncer já foi descrita a presença de uma glicoproteína com um peso molecular de 24 kDa, conhecido como fator indutor de proteólise, denominado de PIF (TODOROV et al., 1996; TODOROV et al., 1998) e atualmente, vários estudos descrevem a caracterização de um fator homólogo (MONITTO et al., 2004). A perda de massa adiposa é conduzida pelo fator de mobilização de lipídeos (LMF), comumente denominado de ZAG e caracterizado por possuir um efeito lipolítico direto (TISDALE, 2010). Pensa-se que o LMF sensibiliza os adipócitos aos principais estímulos lipolíticos, aumentando a produção de AMP cíclico (KHAN; TISDALE, 1999) e além desses fatores, há contundente produção de citocinas inflamatórias pelo microambiente tumoral. Estudos realizados em câncer esofagogástrico mostraram que as concentrações proteicas das citocinas interleucina (IL)-1 $\beta$ , IL-6 e TNF (fator de necrose tumoral)- $\alpha$  estavam significativamente elevadas no tecido tumoral (O'RIORDAIN et al., 1999) e outros estudos em modelos de roedores, relataram um acentuado aumento da produção de citocinas inflamatórias que se correlacionaram com a perda de peso (STRASSMANN et al., 1992). Sabe-se que as citocinas são proteínas que medeiam a comunicação célula-a-célula e dependendo do microambiente tumoral, as citocinas podem modular uma resposta antitumoral; todavia durante a inflamação crônica, elas podem induzir a transformação celular e malignidade (ZAMARRON; CHEN, 2011). A produção de citocinas realizadas pelas células do tumor é acompanhada de secreção humoral por células do infiltrado inflamatório (DONOHOE; RYAN; REYNOLDS, 2011).

A inflamação constitui, portanto, parte importante do microambiente tumoral. Embora existam descrições de indivíduos caquéticos há muito tempo atrás, somente nos últimos anos os estudos científicos sobre a síndrome têm recebido atenção. Devido à etiologia desconhecida e a inexistência de marcadores definitivos para diagnóstico (SEELAENDER et al., 2012), não há terapia descrita que a reverta (VON HAEHLING et al., 2010), porém, crescentes evidências a partir de estudos em animais e seres humanos demonstram que o uso de estratégias que diminuam a inflamação sistêmica crônica atenuam a caquexia (ARGILÉS; BUSQUETS; LÓPEZ-SORIANO, 2011).

### 1.3 Inflamação sistêmica na caquexia: papel do tumor e do infiltrado inflamatório

O microambiente tumoral é composto por células tumorais, células do tecido de origem, fibroblastos, células que formam os vasos sanguíneos, componentes estruturais da matriz extracelular, fatores de crescimento e células do sistema imune que se infiltram no tumor (BARACOS, 2000). O sistema imunológico tem um papel complexo e multifacetado no microambiente tumoral, no qual as células imunológicas podem atuar tanto como supressores de progressão do tumor, como promotores de proliferação e metástase (TRINCHIERI, 2012). Várias células do sistema imune tais como macrófagos, células dendríticas, células supressoras mieloides, *natural killers* e linfócitos B e T infiltram-se no microambiente do tumor mantendo franca comunicação com as células neoplásicas por meio de citocinas e quimiocinas, como podem ser visto na figura 3 (MARKMAN; SHIAO, 2015).



**Figura 3:** A composição do microambiente tumoral (adaptado de Markman e Shiao, 2015)

Em meados do século XIX, Rudolf Virchow já especulava a associação entre o tumor e o processo inflamatório crônico, através da constatação da presença de grande quantidade de infiltrado leucocitário no microambiente tumoral (BALKWILL; MANTOVANI, 2001). As células do sistema imune infiltradas no tumor secretam uma série de substâncias (enzimas proteolíticas e fatores angiogênicos, mitogênicos e quimiotáticos) com a finalidade de recrutar e atrair mais células imunitárias para o sítio neoplásico (HANAHAN; COUSSENS, 2012). Desse modo, ao contrário do que se pensava, a inflamação crônica associada ao tumor é vista como um processo capaz de facilitar o processo de progressão tumoral, malignidade e potencial metastático do tumor, auxiliando o processo evolutivo da doença e não necessariamente a destruição (TRINCHIERI, 2012). Esse fato se dá, principalmente, pela capacidade que as células tumorais têm de evitar o reconhecimento imunológico, suprimir a imunidade anti-tumoral ou polarizar células do sistema imunológico em sub-séries protumorigênicas imuno reguladoras. As células tumorais efetivamente modulam o seu microambiente, comunicando-se com células imunitárias (macrófagos, células supressoras derivadas da medula, linfócitos e etc.) e modificando sua natureza plástica (RABINOVICH; GABRILOVICH; SOTOMAYOR, 2007).

A inflamação crônica tem sido consistentemente relacionada com o crescimento, progressão do tumor e mau prognóstico (BALKWILL; MANTOVANI, 2001) e isso pode ser evidenciado pela grande probabilidade e alto risco do desenvolvimento do câncer em pacientes com doenças inflamatórias crônicas. Dentro dessa relação entre ambiente inflamatório e consequente evolução do tumor e metástase, há uma grande participação de citocinas pró- e anti-inflamatórias com potencial para induzir inflamação no próprio microambiente tumoral (TRINCHIERI, 2012). Estudos demonstram que o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias (principalmente a IL-1 $\beta$ , o TNF- $\alpha$  e a IL-6) e prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) favorecem um microambiente inflamatório (WINFIELD et al., 2008), fatores postulados como de grande relevância na etiologia da caquexia associada ao câncer. Além de serem iniciadores inflamatórios, esses fatores também induzem a expressão de outros genes pró-inflamatórios, tais como COX-2, iNOS, quimiocinas, citocinas e MMPs (APTE; VORONOV, 2008). Todo esse conjunto de metabólitos extracelulares e intracelulares pode servir como sinal que influencia o destino celular e contribuem para a desregulação da função imunológica (WANG; LIU; WANG, 2014). A estreita correlação entre câncer e inflamação é sustentada por estudos de base populacional que demonstram que a

administração de anti-inflamatórios não esteroidais está associada à reduzida incidência de câncer colorretal, de mama, gástrico e pancreático; e parece proteger contra o surgimento e a progressão do tumor em animais experimentais, podendo ter importância terapêutica impar no tratamento antitumoral (RÜEGG; DORMOND, 2001).

#### **1.4 Hipótese e Justificativa**

Pelo descrito, torna-se claro que o microambiente tumoral pode potencialmente ser determinante de uma reação sistêmica, induzindo a inflamação crônica, principal característica da caquexia. Uma vez que pacientes com idêntico diagnóstico (sítio e tipo de tumor e estadiamento tumoral) podem ou não apresentar a caquexia, o presente estudo teve como hipótese que diferenças no microambiente tumoral pudessem estar relacionadas à presença do quadro de inflamação sistêmica característica à síndrome.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Caracterizar as diferenças existentes nas populações de células dos infiltrados inflamatórios no microambiente tumoral e analisar aspectos ligados à inflamação, no nível morfológico e molecular (gênico e proteico), a fim de avaliar se a presença da caquexia é determinada pelo perfil inflamatório do tumor.

### **2.2 Específicos**

- 1 Analisar os aspectos morfológicos dos tumores de cólon e reto de pacientes caquéticos e não caquéticos.
- 2 Caracterizar e quantificar as células infiltrantes nos tumores de cólon e reto de pacientes caquéticos e não caquéticos.
- 3 Avaliar a expressão gênica e proteica de fatores relacionados à inflamação nos tumores de cólon e reto de pacientes caquéticos e não caquéticos.
- 4 Correlacionar as populações de células infiltrantes imunitárias com a expressão de citocinas inflamatórias no tumor.

### **3 CAUSÍSTICA E MÉTODOS**

#### **3.1 Recrutamento dos pacientes**

Foram recrutados 53 voluntários de ambos os sexos, todos adultos (> 18 anos), sem discernimento da classe social e raça. Os pacientes foram diagnosticados como portadores de adenocarcinoma com localização primária no colon ou reto e que subsequentemente, foram submetidos à cirurgia no Centro Cirúrgico do Hospital Universitário (HU-USP) para retirada do tumor, em colaboração com os envolvidos no projeto (Dr. José Pinhata Otoch, Dr. Paulo Sérgio Martins Alcântara, Dra. Linda Ferreira Maximiano, Dr. Aloisio Souza Felipe da Silva, Dra Angélica Bras Simões e Dra Angela Flávia Logullo Waitzberg). O recrutamento dos voluntários foi realizado na Clínica Cirúrgica do Hospital Universitário após a obtenção da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

#### **3.2 Aprovação no comitê de ética**

A Comissão de ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas/Universidade de São Paulo aprovou o projeto através do parecer (1151/13CEP), e pelo Comitê de Ética Humana do Hospital Universitário/Universidade de São Paulo através do parecer (CEP 1390/14) e o estudo está devidamente cadastrado na Plataforma Brasil, sob o número CAEE: 20643513.9.000.5467.

#### **3.3 Critérios de Inclusão e Exclusão**

A inclusão dos voluntários na pesquisa ocorreu com base nos seguintes critérios: não ter recebido tratamento anti-câncer ou anti-inflamatório continuado e o consentimento em participar da pesquisa. Os critérios de exclusão da pesquisa foram: realizar tratamento quimioterápico no momento; utilizar anti-inflamatórios continuamente; apresentar falência renal ou hepática, AIDS, doenças inflamatórias intestinais ou processos inflamatórios crônicos não relacionados à caquexia, como distúrbios autoimunes, todos diagnosticados pelo médico responsável.

O grupo experimental foi dividido e classificado da seguinte forma: Grupo Câncer sem Caquexia – (WSC) grupo de voluntários portadores de tumor colorretal submetidos a

procedimento cirúrgico para retirada do tumor; Grupo Câncer com Caquexia (CC) – grupo de voluntários caquéticos portadores de tumor colorretal submetidos a procedimento cirúrgico para retirada do tumor.

### **3.4 Termo de consentimento e avaliação clínica**

Após o recrutamento dos pacientes na Clínica Cirúrgica do Hospital Universitário os voluntários assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo A) concordando em participar da pesquisa, logo em seguida todos foram submetidos a análise das medidas antropométricas (idade, peso, altura) e os mesmos foram entrevistados através dos seguintes questionários: QLQ-C30 (avaliando a qualidade de vida – validado em Português – Anexo B); Pontuação Anoréxica (escala FAACT-ESPEN - parte de uma colaboração internacional e em fase de validação – Anexo C) (AREZZO DI TRIFILETTI et al., 2013); Todos esses questionários encontram-se em anexo.

### **3.5 Coleta de sangue e análise de parâmetros bioquímicos**

Aproximadamente 20 mL de sangue foram coletados previamente ao procedimento cirúrgico por profissional de saúde capacitado. O sangue foi colocado em tubo com anti-coagulante (EDTA) e sem anti-coagulante e em seguida foi centrifugado a 3000 rpm, durante 15 minutos a 4 °C, para a obtenção de plasma e soro, respectivamente. A seguir, o plasma e o soro foram armazenados em microtubos plásticos e estocados em freezer à -80 °C para análise posterior. A análise dos parâmetros bioquímicos foram quantificadas por meio do analisador bioquímico automático para análises clínicas LabMax 240, versão 2.00, Tóquio, Japão) utilizando *kits* comerciais (Labtest®).

### **3.6 Diagnóstico de caquexia**

O diagnóstico da caquexia foi realizado seguindo os critérios de Evans et al. (2008): perda involuntária no peso corporal nos últimos 12 meses (maior ou igual a 5 % da massa corporal informada); índice de massa corporal (IMC) – menor que 20 kg/m<sup>2</sup>; concentração plasmática de albumina menor que 3,2 g/dL; concentração plasmática elevada de proteína C-reativa > 5mg/L, caracterizando a presença de inflamação sistêmica; análise da qualidade de vida dos pacientes através do questionário QLQ-C30 [este questionário inclui três escalas:

Funcional (aspectos físicos, cognitivos, emocionais e sociais); Sintomática (fadiga, dor, náuseas e vômitos) e Saúde global;].

O voluntário foi considerado caquético quando apresentou perda involuntária de massa corporal nos últimos 12 meses (maior ou igual a 5 % da massa corporal informada) e atendeu a no mínimo três dos cinco critérios descritos acima. Durante o desenvolvimento do projeto não houve modificações na condução do procedimento cirúrgico, portanto, não houve influência no tratamento e nos procedimentos anestésico e cirúrgico dos voluntários não havendo nenhum incômodo doloroso adicional para os mesmos.

### **3.7 Coleta do tumor**

Após o procedimento cirúrgico, um fragmento de tumor de aproximadamente 1,0 g foi retirado pelo patologista de plantão do Serviço de Anatomia Patológica (SAP) e imediatamente seccionado e colocado em dois tubos:

1 – Uma fração foi imersa em 5ml de Solução balanceada de HANK's (HBSS), para posterior processamento e análise de citometria de fluxo.

2 – Uma segunda fração foi colocada em um microtubo e congelada imediatamente em nitrogênio líquido, para posterior extração de RNA total, análise PCR Tempo real e extração protéica para análise do Multiplex.

### **3.8 Análise histopatológica**

Todos os relatórios e as lâminas dos voluntários participantes da pesquisa armazenados no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Universitário (SAP-HU) foram revistos pelo patologista, seguindo um protocolo adaptado do Colégio Americano de Patologistas (CAP) que visa a análise histopatológica de amostras de pacientes com adenocarcinoma de cólon e reto, abordando as seguintes variáveis: presença de linfócitos infiltrantes no tumor (leve, moderada 0-2; intensa > 3), presença de resposta linfocítica peritumoral (*score* subjetivo definido como leve, moderada ou intensa), presença de invasão linfovascular e invasão perineural (presença de células tumorais dentro de estruturas vasculares e nervosas, respectivamente); presença de brotamento tumoral (presença de cinco ou mais células em diferenciação); evidência de necrose do tumor (leve <10% da área de superfície do tumor;

moderada/intensa > 10% de área de superfície do tumor. Os tumores foram classificados após diagnóstico clínico-patológico, utilizando o sistema de estadiamento convencional (EDGE; COMPTON, 2010).

### 3.9 Reação em cadeia da Polimerase (PCR em tempo Real)

O RNA total das amostras foi extraído utilizando o reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA), seguindo recomendações do fabricante. As concentrações do RNA foram determinadas mensurando a absorvância de 260 nm/ 280 nm. O RNA isolado foi armazenado a -80 °C para posterior análise. As amostras de RNA total foram transcritas para cDNA em termociclador (Veriti®, ThermoFisher, USA) através da RT. Para a síntese do cDNA foram utilizados na reação 2 µg de RNA total de cada amostra com *Random primer*, utilizando *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* (Invitrogen no. 4375575) em um 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; IV- termina a 4 °C. As amostra de cDNA obtidas foram estocadas a -20 °C até a realização do experimento.

A expressão dos genes (TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-10, CCL-2, IL-1 $\beta$ , VEGF, PIF, ZAG, HPRT1) foi quantificada por RT-PCR (KUBISTA et al., 2006) utilizando o aparelho QuantStudio™ 12K Flex System com Array Card Block (Life Technologies, Carlsbad, CA) e SYBER Green 2x como marcador de fluorescência (Invitrogen, USA). Para a reação foi utilizado 2 µl de cDNA da amostra para um volume final de reação de 10 µl. A reação ocorreu do seguinte modo: primeiramente, dois ciclos 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 60 °C por 60 segundos e III- extensão a 72 °C por 2 minutos.

Os dados obtidos foram expressos como um limiar de ciclagem (Ct) que representa uma linha de base de detecção de fluorescência, correspondente a fase exponencial. Baseando-se no Ct obtido, foi estimado a quantidade inicial de cDNA aplicado nas diferentes amostras. Assim o valor do Ct está correlacionado com a concentração de RNAm usada na reação. A expressão gênica foi determinada através da fórmula:  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK;SCHMITTGEN, 2001), no Manual do usuário do Biosystem Sequence Detector Bulletin 2, onde  $\Delta\Delta Ct = [Ct \text{ alvo (amostra Tumor)} - Ct \text{ constitutivo (mesma amostra)}] - [Ct \text{ alvo (amostra controle)} - Ct \text{ constitutivo (mesma amostra)}]$ . Os resultados foram expressos com base na relação do RNAm de cada gene de interesse relativizado com o conteúdo de RNAm do gene HPRT1 que foi descrito como o melhor gene constitutivo para tumor

(KHEIRELSEID et al., 2010). Os primers foram desenhados com base no banco de dados Genbank (tabela 1).

**Tabela 1:** Lista de Primers

Gene	Sequência 5' →3'	NM
VEGF ( <i>Homo sapiens</i> )	Fw: CCC ACT GAG GAG TCC AAC AT Rev: TGC ATT CAC ATT TGT TGT GC	000194.2
IL-6 ( <i>Homo sapiens</i> )	Fw: CAG CCC TGA GAA AGG AGA CAT Rev: AGC CAT CTT TGG AAG GTT CA	000600.3
IL-1 $\beta$ ( <i>Homo sapiens</i> )	Fw: AGC CAA TCT TCA TTG CTC AAG T Rev: AGT CAT CCT CAT TGC CAC TGT	000576.2
TNF- $\alpha$ ( <i>Homo sapiens</i> )	Fw: CTC TCT CCC CTG GAA AGG AC Rev: ATC ACT CCA AAG TGC AGC AG	000594.3
IFN- $\gamma$ ( <i>Homo sapiens</i> )	Fw: TGG AAA GAG GAG AGT GAC AGA A Rev: TTG GAT GCT CTG GTC ATC TTT A	000619.2
CCL-2 ( <i>Homo sapiens</i> )	Fw: TCA GCC AGA TGC AAT CAA TG Rev: ACA CTT GCT GCT GGT GAT TCT	002982.3
IL-10 ( <i>Homo sapiens</i> )	Fw: TTA CCT GGA GGA GGT GAT GC Rev: GAT GCC TTT CTC TTG GAG CTT	000572.2
PIF ( <i>Homo sapiens</i> )	Fw: AGG AAG CAG AGA TCC AGC CT Rev: GGC TCC TTT ACC CAC GCT TT	005268627.1
ZAG ( <i>Homo sapiens</i> )	Fw: CCA GGA GAA CCA AGA TGG TC Rev: CTG CTT CCA ATC CTC CAT TC	001185.3
HPRT1( <i>Homo sapiens</i> )	Fw: TGG CGT CGT GAT TAG TGA TG Rev: CTT GAG CAC ACA GAG GGC TA	000194.2

### 3.10 Quantificação de citocinas por método Luminex®

As amostras utilizadas foram provenientes dos diferentes grupos experimentais e o protocolo consiste da incubação da amostra com a mistura de microesferas Magplex® (Grand Island, NY, USA cobertas com anticorpos diferentes por 2 horas; Detecção dos antígenos-alvo ligados às microesferas com uma mistura de anticorpos de captura biotinizados e incubação por 1 hora; seguido de incubação com estreptavidina marcada com ficoeritrina por 30 minutos. As microesferas foram, então, identificadas por meio da ficoeritrina utilizando-se o instrumento Magpix® (Life Technologies, Grand Island, NY, USA). Após a leitura, os

valores de cada citocina analisada foram relativizados pela concentração de proteína total. A tabela 2 abaixo descreve todas as citocinas analisadas:

**Tabela 2:** Lista de citocinas analisadas

<b>Citocinas</b>	<b>Abreviação</b>
<b>Citocinas pro-anti-inflamatórias</b>	
<b>Fator de necrose tumoral alfa</b>	TNF $\alpha$
<b>Fator de necrose tumoral beta</b>	TNF- $\beta$
<b>Interleucina-1 beta</b>	IL-1 $\beta$
<b>Receptor antagonista de interleucina 1</b>	IL-1RA
<b>Interleucina-1 alfa</b>	IL-1 $\alpha$
<b>Interleucina -2</b>	IL-2
<b>Interleucina -3</b>	IL-3
<b>Interleucina -4</b>	IL-4
<b>Interleucina -5</b>	IL-5
<b>Interleucina -6</b>	IL-6
<b>Interleucina -7</b>	IL-7
<b>Interleucina- 8</b>	IL-8
<b>Interleucina -10</b>	IL-10
<b>Interleucina -12 (IL-12p40, IL-12p70)</b>	IL-12
<b>Interleucina- 13</b>	IL-13
<b>Interleucina- 15</b>	IL-15
<b>Interleucina -17</b>	IL-17
<b>Interferon alfa</b>	IFN- $\alpha$
<b>Interferon gama</b>	IFN- $\gamma$
<b>Proteína indutora de interferon gama- 10</b>	IP-10
<b>Fatores quimioatraentes</b>	
<b>Proteína quimioatraente de monocitos 1</b>	MCP1/CCL2
<b>Proteína inflamatória de macrófagos -1<math>\alpha</math></b>	MIP-1 $\alpha$ /CCL3
<b>Proteína inflamatória de macrófagos -1<math>\beta</math></b>	MIP-1 $\beta$ /CCL4
<b>Quimiocina ligante 5(C-C motif)</b>	RANTES/CCL5
<b>Fatores de crescimento e diferenciação</b>	
<b>Fator de estimulação de colónias de granulócitos-macrófagos</b>	GM-CSF/G-CSF

<b>Eotaxina</b>	Eotaxina
<b>Fator de crescimento epitérmico</b>	EGF
<b>Fator de crescimento endotelial vascular</b>	VEGF

### 3.11 Imunofenotipagem por citometria de fluxo

As frações de tumor foram isoladas, os nódulos linfáticos foram cuidadosamente removidos e os tecidos foram colocados em HBSS (Solução Salina Equilibrada de Hank). Os fragmentos de tecido foram então digeridos durante 40 min a 37 °C em meio de cultura que continham colagenase do tipo I (280U/ml) (Sigma Aldrich), sob agitação orbital. Em seguida, as amostras foram filtradas através de uma malha fina de plástico e lavadas com meio esterilizado.

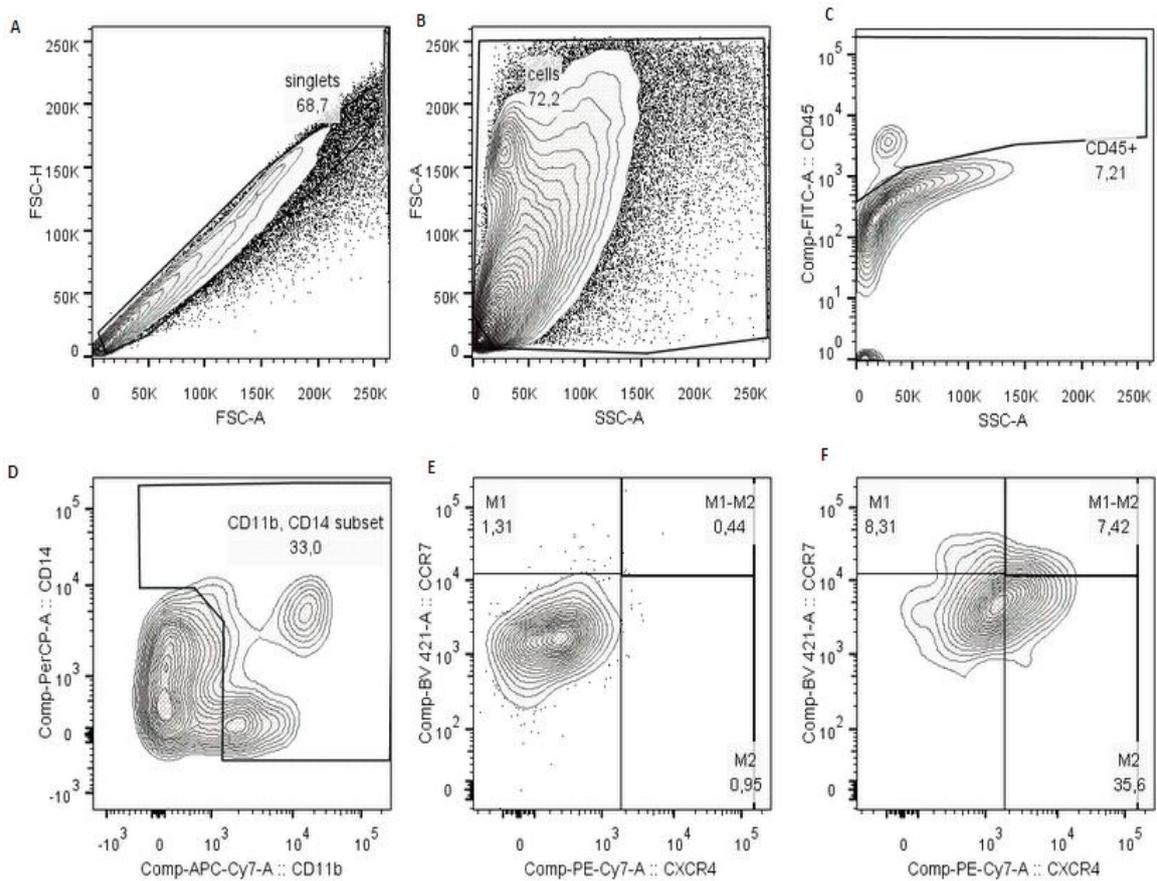
Posteriormente, as células de interesse foram separadas por centrifugação a 500rcf, durante 5 minutos. As células isoladas do tumor foram novamente suspensas e lavadas duas vezes com meio de cultura e centrifugou-se novamente em 500rcf durante 5 minutos. As células foram ressuspensas em 500 ul de soro fetal bovino (SFB) e sulfóxido de dimetilo (DMSO) e armazenados em nitrogênio líquido até ao processamento por citometria de fluxo. Essa fase de preparo das amostras ocorreu a partir da adaptação dos métodos em biologia molecular propostos no protocolo de citometria de fluxo (WATKINS et al., 2012).

Para o processo de marcação celular as amostras foram rapidamente descongeladas em banho de água a 37 °C, lavadas com meio de cultura e centrifugadas a 600 rcf durante 10 minutos a 4 °C. A compensação do citômetro de fluxo (FACSCanto II - BD Biosciences) foi realizada com esferas de compensação e, em seguida, ocorreu a análise das populações de células de interesse.

Os anticorpos conjugados com fluorocromos (listados na Tabela 3) dos painéis de macrófagos foram adicionados às amostras, e estas foram incubadas durante 30 minutos a 4 °C, no escuro. As células marcadas foram lavadas e centrifugadas 400rcf durante 5 minutos e ressuspensas em 500 ul de DMEM (Meio Eagle Modificado por Dulbecco) e detectadas através da estratégia de análise descrita na figura 4 abaixo, por citometria de fluxo pelo FACSCanto II BD.

**Tabela 3:** Pannel de anticorpos conjugados para citometria de fluxo.

Painel	Anticorpos	Fluorocromos	Catálogo BD Biosciences n:
Macrofágos (M1 e M2)	CD45	FITC	555482
	CD206	PE	555954
	CD14	PERCP-Cy5.5	562692
	CXCR4	PE-Cy7	560669
	CD86	APC	555660
	CD11b	APC-Cy7	557657
	CCR7	BV421	562555

**Figura 4:** Estratégias de análises específicas

A: FSC-H vs FSC-A para a exclusão de *doublets*. B: FSC vs SSC para excluir os detritos C: CD45+ para incluir todos os leucócitos. D: CD14+ ou CD11+ marcam macrófagos gerais. E: amostra não marcada. F: CCR7 amostra marcada (subpopulação M1), CXCR4+ (subpopulação M2) e população dupla positiva CCR7+CXCR4+ (subpopulação M1-M2).

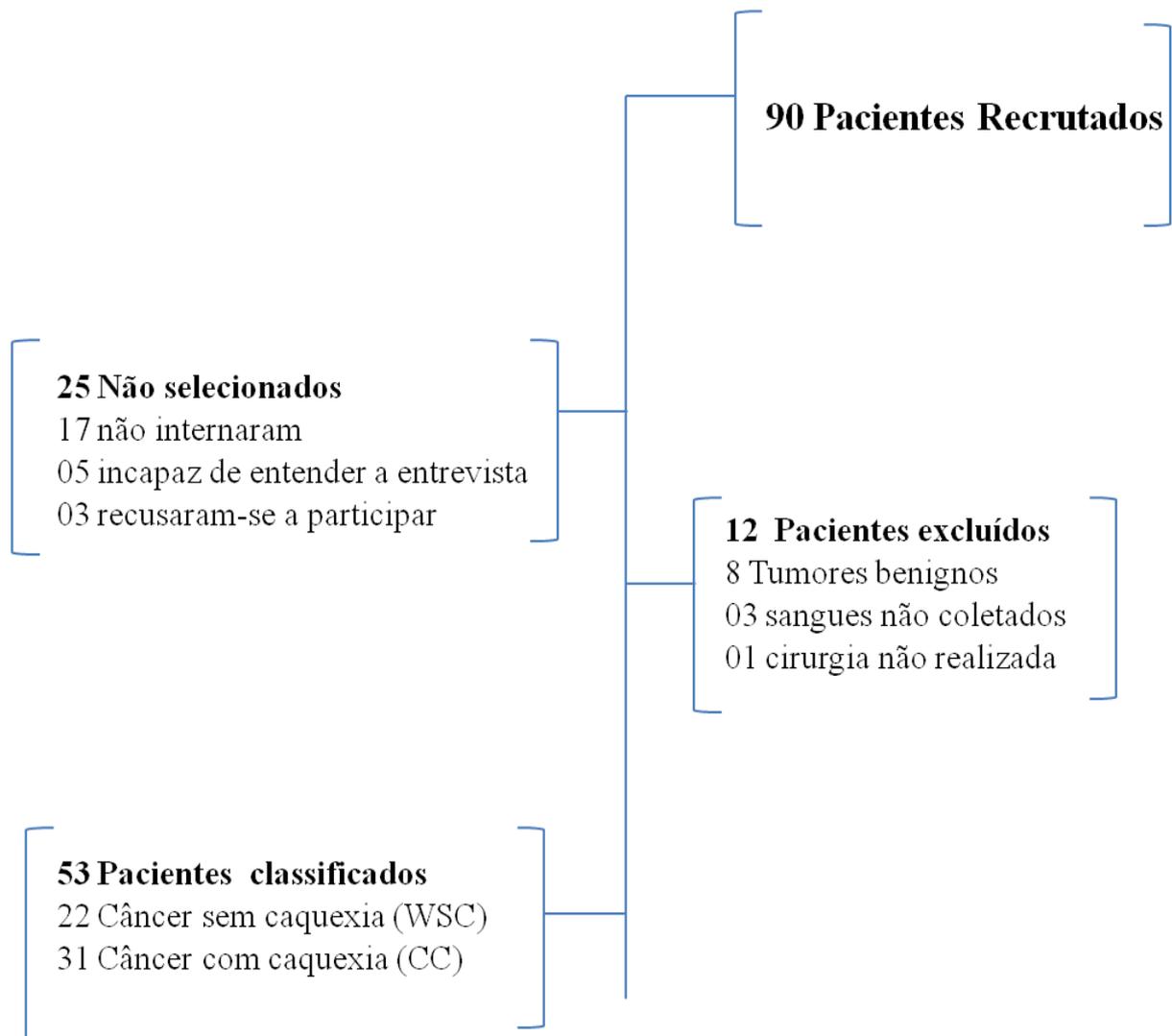
### 3.12 Análise estatística

Os dados foram expressos em média  $\pm$  erro-padrão ou mediana [1°. quartil; 3°. quartil]. Primeiro, foi empregado um teste de distribuição de Gauss para todas as amostras (teste de D'Agostino-Pearson omnibus, teste Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov). Os grupos foram comparados empregando-se teste t de Student e, se necessário, o teste de Mann-Whitney, com comparação múltipla. O coeficiente de correlação de Spearman foi realizado para avaliar a relação linear entre as variáveis de interesse. Para análise dos parâmetros qualitativos, localização e estadiamento do tumor, utilizou-se o teste qui-quadrado com correção de Yates. O nível de significância estabelecido foi de  $p < 0,05$ . Os dados foram analisados pelo departamento de estatísticas ICB-USP sob a supervisão da Sra Rosana Prisco, utilizando software estatístico Statgraphics® Centurion XVI versão 16.2.04, Statpoint Technologies, Inc. Warrenton, Virginia e o GraphPad Prism versão 6.0.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Achados clínicos

Após concordarem em participar do estudo, 90 pacientes foram recrutados e encaminhados para aplicação dos questionários, coleta de sangue e posterior acompanhamento cirúrgico para possível coleta de amostras. A figura 5 apresenta o fluxograma das etapas envolvidas na primeira fase de seleção dos pacientes e ao final os 53 pacientes recrutados e classificados nos grupos de interesse (WSC n=22; CC n=31).



**Figura 5:** Fluxograma da seleção dos pacientes

A tabela 4 apresenta as características gerais dos pacientes. Inicialmente pode-se perceber que os grupos apresentaram uma homogeneidade referente à média de altura e idade. A análise da massa corporal anterior, ou seja, a massa corporal informada pelo paciente no tempo de 12 meses antes da inclusão no estudo, não mostrou diferença estatística entre os grupos ( $p=0,5081$ ); porém a análise tanto da massa corporal atual aferida quanto o índice de massa corporal (IMC,  $\text{kg}/\text{m}^2$ ) estavam significativamente menores no grupo CC quando comparados com o grupo WSC ( $p=0,0074$ ;  $p=0,0101$ ; respectivamente), demonstrando a presença de acentuada perda de peso no grupo com caquexia. Com a análise dos questionários foi possível identificar que o grupo CC apresentava uma diminuição acentuada da qualidade de vida global, aferida através do QLQ-C30 (valores mais baixos = menor qualidade de vida), em comparação com o grupo WSC ( $p < 0,0001$ ). A presença de anorexia nos grupos foi aferida pelo questionários FAACT-ESPEN que indicou que os pacientes caquéticos também encontravam-se anoréxicos ( $p=0,012$ ). Ainda, foi possível verificar que não houve diferença no percentual de distribuição do estadiamento dos tumores em ambos os grupos, ou seja, a caquexia também se manifesta nos estágios iniciais da doença, portanto, constitui um fator independente.

**Tabela 4:** Classificação geral dos pacientes

	WSC	CC	P
<b>n</b>	22	31	
<b>Gênero (F/M)</b>	08/12	15/14	
<b>Altura (m)<sup>1</sup></b>	1,65 ± 0,02	1,63 ± 0,01	0,3842
<b>Idade (anos)<sup>1</sup></b>	63,45 ± 2,91	61,23 ± 2,31	0,5481
<b>Massa corporal anterior informada (Kg)<sup>1</sup></b>	72,34 ± 2,53	69,94 ± 2,44	0,5081
<b>Massa corporal atual (Kg)<sup>1</sup></b>	70,18 ± 2,32	60,98 ± 2,23*	<b>0,0074</b>
<b>Δ Massa corporal (%)<sup>1</sup></b>	2,68 ± 1,20	12,74 ± 1,06*	<b>&lt; 0,0001</b>
<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)<sup>1</sup></b>	25,88 ± 0,8975	22,91 ± 0,6867 *	<b>0,0101</b>
<b>Estadiamento do tumor Inicial (I - II)</b>			
<b>Avançado (III - IV)</b>	3 (13,63%) - 6(27,27%)	2 (6,45%) - 10 (32,25%)	

	10 (45,45) - 3 (13,63%)	16 (51,61%) - 3 (9,67%)	
<b>QLQ-C30<sup>2</sup></b>	61,46 [54,70; 64,86] n=20	40,38 [38,15; 44,69]* n=30	<b>&lt; 0,0001</b>
<b>FAACT-ESPEN<sup>2</sup></b>	37,00 [34,25; 38,00] n=22	33,00 [25,75; 37,00]* n=30	<b>0,012</b>

<sup>1</sup>Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão, p=nível de significância. <sup>2</sup> Dados expressos em mediana [1º quartil; 3º quartil],  $\Delta$ : diferença entre a massa corporal anterior informada e a massa corporal atual. QLQ-C30: questionário de qualidade de vida. FAACT-ESPEN: questionário para avaliar anorexia. p=nível de significância do teste Mann-Whitney. n:número de amostras; \*Diferença estatística entre os grupos WSC vs CC (p<0,05)

A análise dos parâmetros bioquímicos utilizados com base na literatura para diagnóstico de caquexia (Evans, 2008; Fearon, 2011) confirmou que os níveis de hemoglobina sérica no grupo CC eram significativamente inferiores, quando comparado com o grupo WSC (p=0,0002). As concentrações séricas de proteína C-reativa estavam significativamente maiores no grupo CC em relação ao WSC (p=0,0262), caracterizando a presença da inflamação sistêmica no grupo caquético. O conteúdo de albumina sérica foi significativamente menor no grupo CC quando comparado com o grupo WSC (p=0,0298), como pode ser observado na tabela 5. Entretanto, essas concentrações ( $3,521 \pm 0,208$  g/dL) são maiores que as concentrações indicadas pelo consenso internacional (Evans *et al.*, 2008) para o diagnóstico de caquexia (figura 1). A análise individual da concentração plasmática de albumina no grupo com caquexia mostrou que entre os 31 pacientes, 19 apresentaram concentrações de albumina superiores a 3,2 g / dL, desse modo, a análise da razão PCR/albumina estava significativamente superior no grupo CC (p=0,0096), sugerindo portanto, que a análise do conjunto de fatores corrobora os critérios que vêm sendo utilizados para diagnóstico de caquexia.

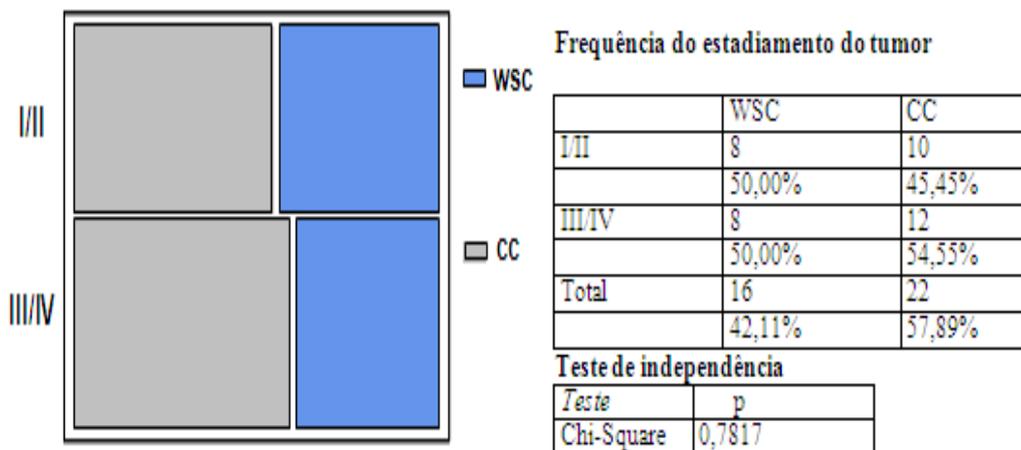
**Tabela 5:** Parâmetros bioquímicos

	WSC	CC	p
<b>Hemoglobina (g/dL)<sup>1</sup></b>	13,69 $\pm$ 0,484 n=20	11,00 $\pm$ 0,449 * n=27	<b>0,0002</b>
<b>Proteína C-reativa (mg/L)<sup>1</sup></b>	6,552 $\pm$ 0,971 n=21	9,470 $\pm$ 0,819 * n=30	<b>0,0262</b>
<b>Albumina (g/dL)<sup>1</sup></b>	4,182 $\pm$ 0,192 n=22	3,521 $\pm$ 0,208 * n=31	<b>0,0298</b>
<b>PCR/albumina (mg/g)</b>	0,120 [0,007; 0,267] n=22	0,310 [0,137; 0,450]* n=30	<b>0,0096</b>

<sup>1</sup>Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão, p=nível de significância. <sup>2</sup> Dados expressos em mediana [1º quartil; 3º quartil], p=nível de significância do teste Mann-Whitney. n: número de amostras \* Diferença estatística vs WSC (p<0,05).

## 4.2 Análise histopatológica

A análise histopatológica mostrou que o teste de variância para analisar a frequência das diferentes fases do tumor e a incidência de caquexia indica confirmação de que a caquexia ocorre de forma independente ( $p = 0,7817$ ) do estágio do tumor.

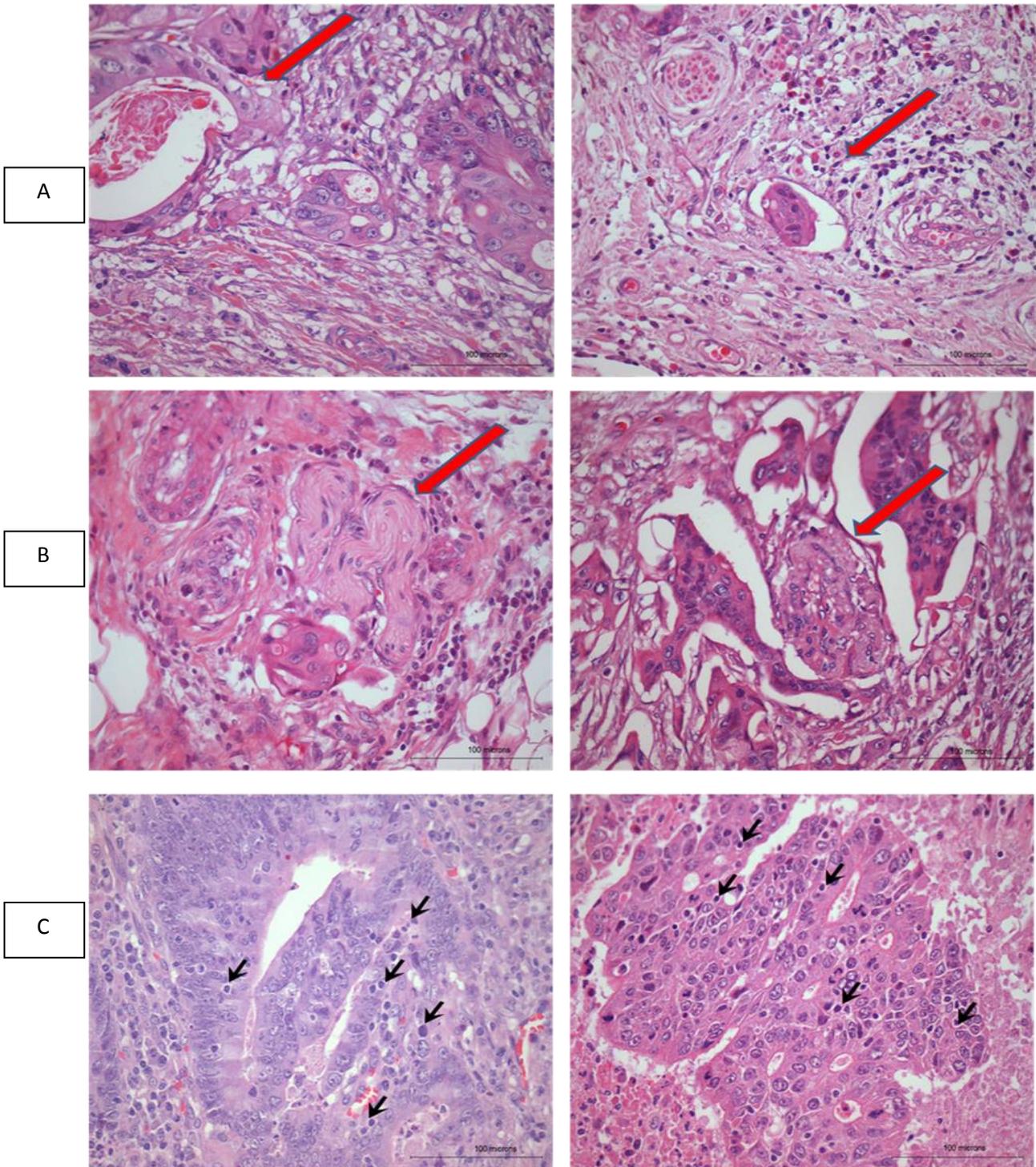


**Figura 6:** Frequência do estadiamento tumoral no câncer colorretal

Nos cortes histológicos realizados nos tumores colorretais e, posteriormente corados com HE, pode-se perceber a presença de aspectos histopatológicos utilizados no diagnóstico clínico do câncer, tanto no grupo sem caquexia, quanto no grupo com caquexia. As imagens a seguir representam esses aspectos, no qual na figura 7A pode-se observar a presença de invasão linfovascular (indicada pela seta vermelha) que é definida pela presença de ninhos de células tumorais no interior do espaço vascular. Já a figura 7B retrata a invasão perineural (indicada pela seta vermelha), caracterizada pela presença de ninhos de células tumorais no espaço perineural e a relação tumor/hospedeiro e figura 7C retrata a presença de linfócitos intratumorais (indicadas pelas setas pretas).

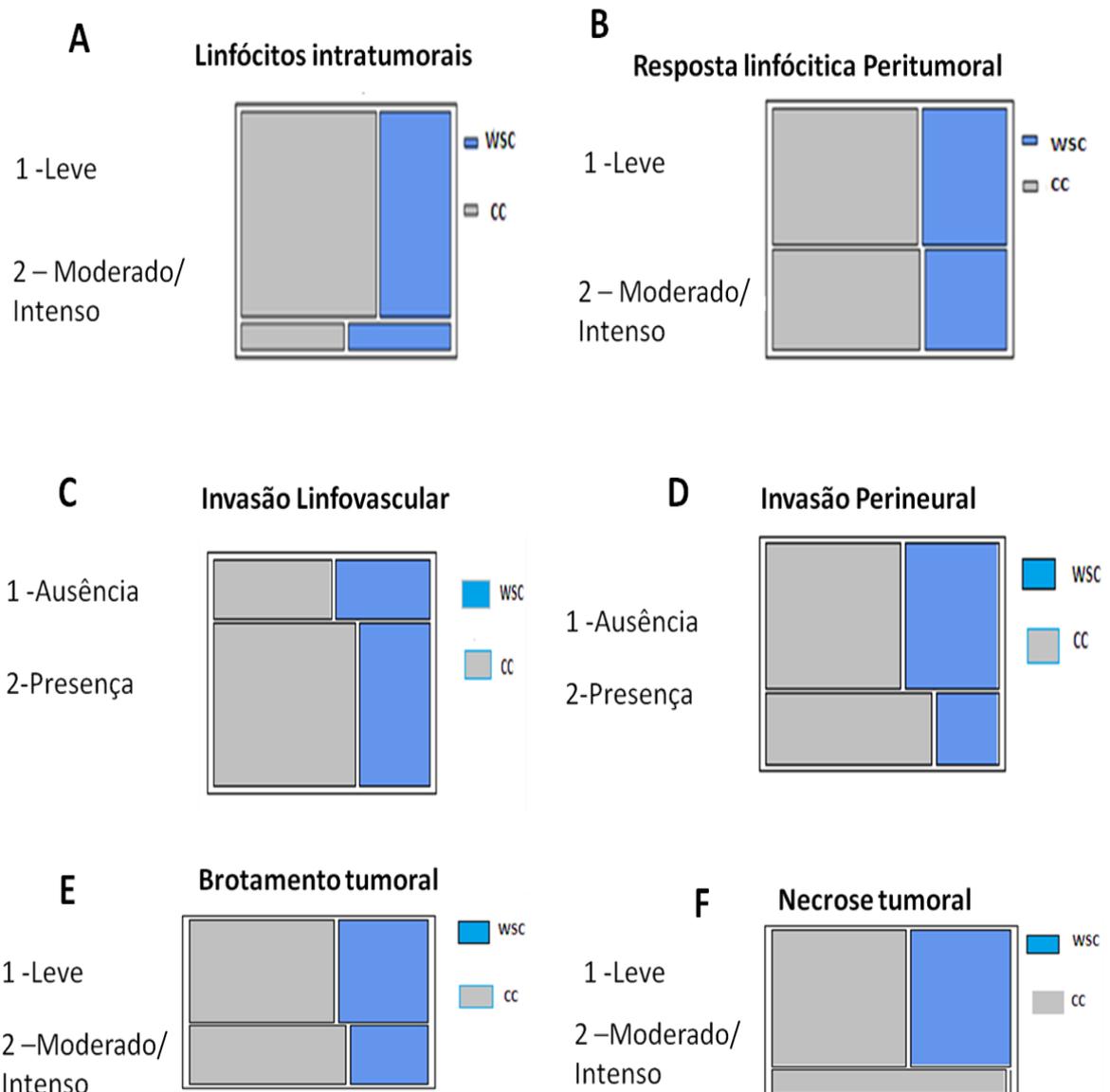
Câncer sem caquexia (WSC)

Câncer com caquexia (CC)

**Figura 7:** Corte histológicos nos tumores colorretais.

A: Invasão linfovascular (seta vermelha); B Invasão perineural (seta vermelha); C: Linfócitos intratumorais (seta preta); Coloração HE, aumento original 400X.

Na figura 8 pode-se observar a análise morfológica baseada através do protocolo CAP, que indica que a incidência de caquexia é independente da presença de linfócitos intratumorais ( $p=0,960$ , figura A), resposta linfocitária peritumoral ( $p = 1,000$ , figura B), presença de invasão linfovascular ( $p = 0,854$ , figura C), invasão perineural ( $p = 0,701$ , figura D), ou da presença de brotamento tumoral ( $p= 0,784$ , figura E): bem como do grau de necrose do tumor ( $p = 0,183$ , figura F).



**Figura 8:** Representação gráfica da análise histopatológica nos tumores dos pacientes. Dados expressos em frequência (percentual) e teste qui-quadrado com correção de Yates;  $p$ =nível de significância ( $p<0,05$ ).

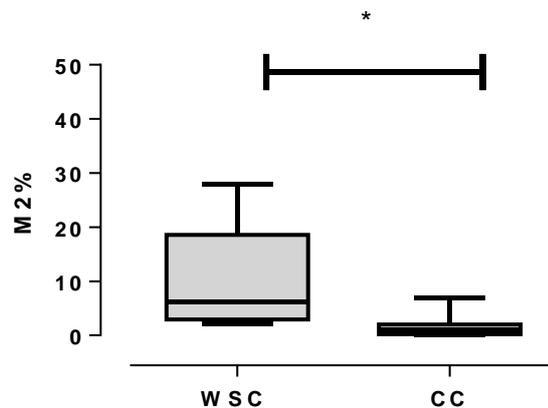
### 4.3 Caracterização de células do infiltrado inflamatório no microambiente tumoral

A caracterização dos fenótipos das células do sistema imunológico que se infiltram no microambiente do tumor encontra-se na tabela 6. A análise da população de células supressoras mielóides (MDSCs) não apresentou diferença estatística entre os grupos. No entanto, a análise dos tipos de macrófagos infiltrantes no tumor mostrou que a população de macrófagos com perfil anti-inflamatório (M2) estava significativamente menor no grupo CC em comparação com WSC ( $p = 0,018$ ) (Figura 9); A análise da população com perfil pro-inflamatório não apresentou diferença estatística entre os grupos ( $p = 0,190$ ).

**Tabela 6:** Caracterização de células do infiltrado inflamatório no microambiente tumoral

%	WSC	CC	p
<b>MDSC</b>	0.52 [0.15; 36.43] (n=5)	4,68 [2.39; 23.40] (n=7)	0.197
<b>M1</b>	0.0 [0.0; 9.91] (n=5)	4.51 [1.47; 23.50] (n=7)	0.190
<b>M1/M2</b>	17.03 ± 12.71 (n=5)	2.90 ± 1,32 (n=7)	0.213
<b>M2</b>	6.14 [2.91; 18.55] (n=5)	0.99 [0.22; 2.01] (n=7)	<b>0.018</b>

Dados expressos em mediana [1º quartil; 3º quartil], p=nível de significância do teste Mann-Whitney. \*diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ). n: número de amostras; MDSC: Células supressoras derivadas da medula; M1: macrófagos M1; M2: Macrófagos M2; M1M2: Macrófagos com duplo fenótipo.



**Figura 9:** Representação gráfica da porcentagem de macrófagos com perfil anti-inflamatório no microambiente tumoral

Dados expressos em: mínimo, 1° quartil, mediana, 3° quartil e máximo. \*diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ); n:número de amostras.

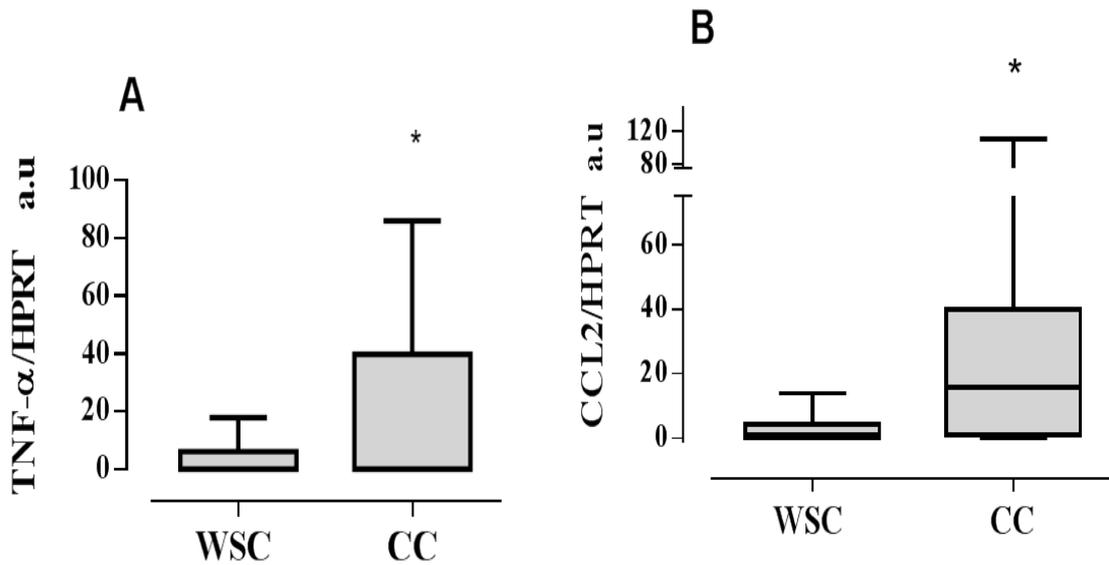
#### 4.4 Expressão gênica de citocinas e fatores de comunicação celular no tecido tumoral relacionados à caquexia

A análise da expressão gênica de fatores no tumor encontra-se representada na tabela 7 e figura 10. As concentrações de mRNA da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  estavam significativamente aumentadas no grupo CC, em comparação ao grupo WSC ( $p=0,020$ ); enquanto que a expressão gênica de outras citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$  e IL-6 não apresentou diferenças entre os grupos ( $p=0,524$ ,  $p=0,683$ , respectivamente). Os níveis de mRNA da proteína quimioatraente de monócitos encontraram-se aumentados no grupo CC, quando comparado com o grupo WSC ( $p=0,035$ ). A análise da expressão gênica de outras citocinas e fatores relacionados a caquexia, como: IFN- $\gamma$  ( $p=0,151$ ), IL-10 ( $p=0,398$ ), PIF ( $p=0,571$ ), ZAG ( $p=0,497$ ) e VEGF ( $p=0,410$ ) não demonstrou diferença significativa entre os grupos.

**Tabela 7:** Expressão gênica de citocinas e fatores relacionados à caquexia no tumor dos pacientes

qRT-PCR	WSC	CC	<i>p</i>
VEGF (U.A) <sup>2</sup>	1,275 [0,446; 8,270] (n=6)	0,557 [0,069; 3,28] (n=8)	0,410
IL-6 (U.A) <sup>2</sup>	1,395 [0,368; 2,509] (n=9)	1,163 [0,537; 8,330] (n=12)	0,683
IL1-β (U.A) <sup>2</sup>	2,545 [0,430; 16,07] (n=6)	0,791 [0,185; 7,893] (n=9)	0,524
TNF-α (U.A) <sup>1</sup>	6,238 ± 3,672 (n=10)	39,75 ± 12,34* (n=14)	<b>0,020</b>
IFN-γ (U.A) <sup>2</sup>	1,317 [0,313; 5,095] (n=10)	27,65 [0,420; 80,16] (n=14)	0,151
CCL-2 (U.A) <sup>2</sup>	0,847 [0,252; 4,25] (n=10)	15,73 [0,940; 39,84] * (n=14)	<b>0,035</b>
PIF (U.A) <sup>2</sup>	0,711 [0,154; 9,012] (n=10)	9,706 [0,023; 101,1] (n=14)	0,571
ZAG (U.A) <sup>2</sup>	2,029 [0,374; 3,501] (n=8)	0,716 [0,369; 2,76] (n=13)	0,497
IL-10 (U.A) <sup>2</sup>	0,728 [0,152; 10,93] (n=6)	34,12 [0,141; 54,02] (n=8)	0,398

<sup>1</sup>Dados expressos em média ± erro padrão, p=nível de significância. <sup>2</sup>Dados expressos em mediana [1º quartil; 3ºquartil], p=nível de significância do teste Mann-Whitney. A expressão dos genes alvos foi normalizada para o gene de referencia HPRT1. (U.A): Unidade arbitraria. \*Diferença estatística vs WSC (p<0,05); n:número de amostras; IL: Interleucina; VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular; TNF-α: Fator de necrose tumoral; INF-γ: Interferon gama; CCL-2: Proteína quimioatraente de monócitos; PIF: Fator indutor de proteólise; ZAG: Fator de mobilização lipídica.



**Figura 10:** Expressão gênica de citocinas no tumor de pacientes (A-TNF- $\alpha$ ; B-CCL2)

Dados expressos em: média  $\pm$  erro padrão; mínimo, 1<sup>o</sup> quartil, mediana, 3<sup>o</sup> quartil e máximo. \*diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ). A expressão dos genes alvo foi normalizada para o gene de referência HPRT1. TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral-alpha; CCL2: Proteína quimioatraente de monócitos; (U.A): unidade arbitrária. TNF- $\alpha$  WSC n=10 e CC n=14; CCL2 WSC n=10 e CC n=14

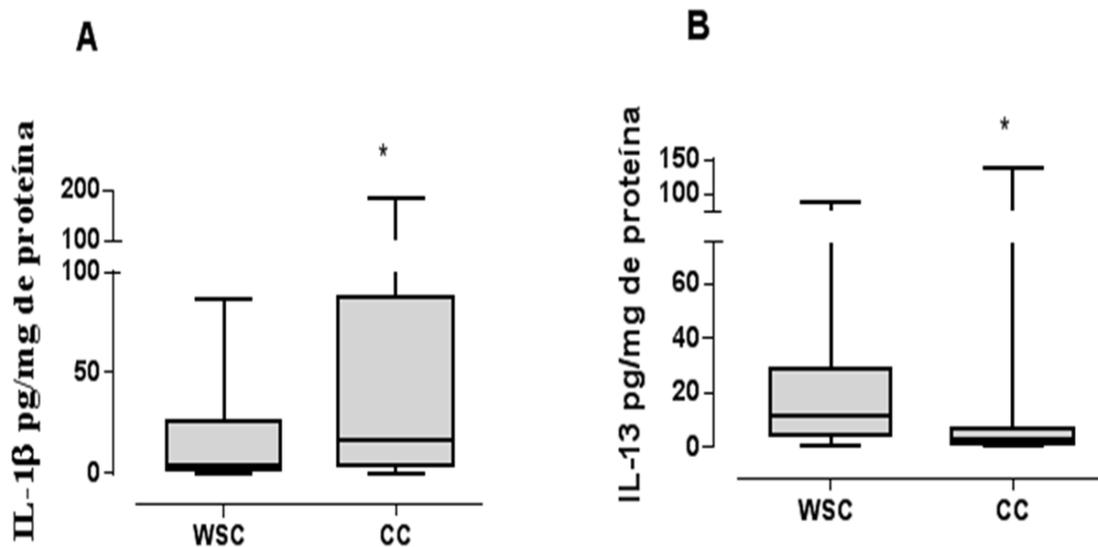
#### 4.5 Expressão proteica no tecido tumoral de citocinas e fatores relacionados à caquexia

As concentrações proteicas de diferentes citocinas pró-anti-inflamatórias e fatores relacionados com caquexia são mostrados na Tabela 8, 9 e 10. A citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$  mostrou-se aumentada em CC, quando comparou-se a WSC ( $p = 0,041$ ) (Figura 11A). Outras citocinas inflamatórias, tais como IFN- $\gamma$  e IL-6 não estavam significativamente diferentes entre os grupos ( $p=0,942$ ;  $p=0,217$ , respectivamente). A concentração de proteína IP-10, uma quimiocina secretada pelas células induzidas por interferon, embora não tenha diferido significativamente, mostrou tendência a aumento em CC ( $p = 0,060$ ). Os membros da família de fator de necrose tumoral, TNF- $\alpha$  e TNF- $\beta$  não mostraram diferença estatística entre os grupos, mas TNF- $\alpha$  mostrou uma tendência significativa a aumento ( $p = 0,062$ ) em CC. A análise de citocinas anti-inflamatórias mostrou que a concentração proteica de IL-10 não estava significativamente diferente entre os grupos ( $p = 0,9652$ ), porém a concentração proteica de IL-13 (figura 11B) foi significativamente menor no grupo CC, em comparação grupo WSC ( $p = 0,0133$ ).

**Tabela 8:** Expressão proteica de citocinas pro-anti-inflamatórias no tumor de pacientes

pg/mg	WSC	N	CC	n	p
<b>IFN-<math>\alpha</math></b>	35,52 [5,181; 84,39]	17	16,54 [7,842; 65,81]	19	0,992
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	0,4250 [0,085; 1,34]	17	0,3030 [0,050; 2,77]	19	0,942
<b>IL-10</b>	0,6060 [0,209; 1,49]	17	0,427 [0,107; 2,82]	19	0,965
<b>IL-12p40</b>	4,013 [1,956; 8,29]	16	5,371 [3,818; 8,56]	18	0,263
<b>IL-12p70</b>	0,9730 [0,508; 3,20]	17	0,847 [0,436; 3,54]	19	0,844
<b>IL-13</b>	11,49 [4,761; 28,55]	17	3,139 [1,582; 7,06]*	19	<b>0,013</b>
<b>IL-15</b>	3,531 [1,201; 5,75]	17	4,310 [3,075; 6,69]	19	0,167
<b>IL-17a</b>	0,3260 [0,080; 2,06]	17	0,221 [0,111; 2,22]	19	0,447
<b>IL-1a</b>	5,989 [1,82; 31,03]	17	14,08 [3,57; 65,76]	18	0,086
<b>IL-1ra</b>	409,3 [83,69; 1393]	17	168,7 [101,8; 396,5]	17	0,169
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	3,723 [1,68; 25,59]	17	16,08 [3,61; 87,37]*	19	<b>0,041</b>
<b>IL-5</b>	0,120 [0,053; 0,19]	17	0,123 [0,085; 0,19]	19	0,358
<b>IL-6</b>	1,428 [0,600; 4,19]	17	2,514 [0,724; 10,26]	19	0,217
<b>IL-7</b>	1,212 [0,641; 4,39]	17	1,425 [0,151; 9,25]	19	0,724
<b>IL-8</b>	375,8 [83,71; 1175]	17	1926 [160,6; 2886]	17	0,084
<b>IP-10</b>	233,7 [151,8; 413,3]	17	1023 [171,8; 2077]	19	0,060
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	0,4190 [0,206; 1,309]	17	1,296[0,443; 2,56]	19	0,062
<b>TNF-<math>\beta</math></b>	1,824 [ 0,832;3,763]	17	2,959[ 1,091; 5,859]	19	0,229

Dados expressos em mediana [1º quartil; 3ºquartil], p=nível de significância do teste Mann-Whitney. \*diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ). n:número de amostras;A expressão proteica de citocinas foi normalizada pelo conteúdo de proteína total. IL: Interleucina; IFN- $\gamma$ : Interferon gama; IFN- $\alpha$ : Interferon alfa; IP-10: Proteína induzida por interferon 10; TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral alfa; TNF- $\beta$ : Fator de necrose tumoral beta.



**Figura 11:** Expressão proteica de citocinas do tumor (A-IL-1 $\beta$ ; B-IL-13).

Dados expressos em: mínimo, 1<sup>o</sup> quartil, mediana, 3<sup>o</sup> quartil e máximo. \*diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ). A expressão proteica de citocinas foi normalizada pelo conteúdo de proteína total. IL-1 $\beta$ : Interleucina 1  $\beta$ -beta; IL-13: Interleucina 13. IL-1 $\beta$  WSC n=17 e CC n=19; IL-13 WSC n=17 e CC n=19.

As concentrações de proteínas dos diferentes fatores de diferenciação, crescimento e progressão não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos WSC vs CC, como mostra a tabela 9.

**Tabela 9:** Fatores de crescimento e diferenciação tumoral

pg/mg	WSC	CC	<i>p</i>
<b>EGF</b>	2,798 [1,761; 19,56] (n=17)	7,569 [3,313; 13,07] (n=19)	0,136
<b>G-CSF</b>	9,607 [2,004; 27,73] (n=17)	5,074 [3,706; 12,11] (n=19)	0,611
<b>GM-CSF</b>	3,106 [1,705; 16,12] (n=17)	6,444 [2,362; 22,63] (n=19)	0,311
<b>VEGF</b>	11,36 [3,89; 136,0] (n=17)	7,850 [4,37; 231,5] (n=19)	0,392

Dados expressos em mediana [1<sup>o</sup> quartil; 3<sup>o</sup>quartil],  $p$ =nível de significância do teste Mann-Whitney. \*diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ). n:número de amostras; A expressão proteica de citocinas foi normalizada pelo conteúdo de proteína total. EGF: Fator epidermal de crescimento; G-CSF: Fator estimulador de colônias; GM-CSF: Fator estimulador de colônia granulócitos macrófagos; VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular.

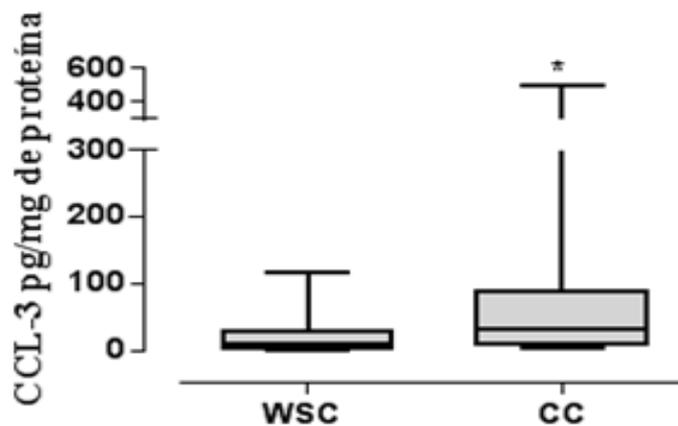
As concentrações proteicas das quimiocinas CCL2, Eotaxina, CCL4, CCL5 (Tabela 10) não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos ( $p=0,151$ ,  $p=0,305$ ,  $p=0,113$ ,

p=0,631, respectivamente). No entanto, a concentração da quimiocina inflamatória de macrófagos (CCL3 / MIP1-A – Figura 12) estava significativamente aumentada em CC (p=0,038).

**Tabela 10:** Expressão proteica de fatores quimioatraentes no tumor de pacientes

pg/mg	WSC	CC	p
<b>Eotaxin</b>	36,11 [12,18; 71,20] (n=15)	20,17 [9,178; 38,71] (n=18)	0,305
<b>CCL2</b>	230,5 [99,75; 516,4] (n=17)	317,1 [146,4; 660,9] (n=18)	0,151
<b>CCL3</b>	<b>8,688 [3,789; 27,03]</b> (n=17)	<b>30,95 [9,589; 88,58]*</b> (n=19)	<b>0,038</b>
<b>CCL4</b>	11,32 [4,488; 21,96] (n=17)	31,08 [6,776; 88,33] (n=19)	0,113
<b>CCL5</b>	516,3 [212,6; 924,6] (n=17)	720,5 [206,9; 1189] (n=19)	0,631

Dados expressos em mediana [1º quartil; 3ºquartil], p=nível de significância do teste Mann-Whitney. \*diferença significativa entre os grupos (p<0,05). n:número de amostras; A expressão proteica de citocinas foi normalizada pelo conteúdo de proteína total. Eotaxin: Proteína quimioatraente de eosinófilos; CCL: Proteína quimioatraente

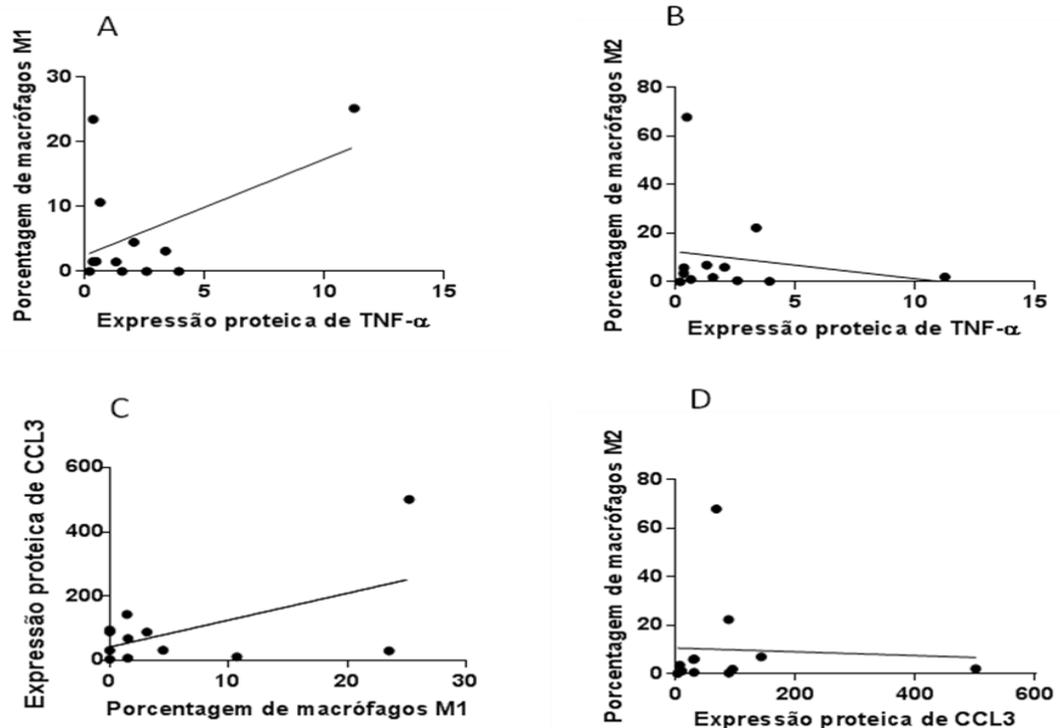


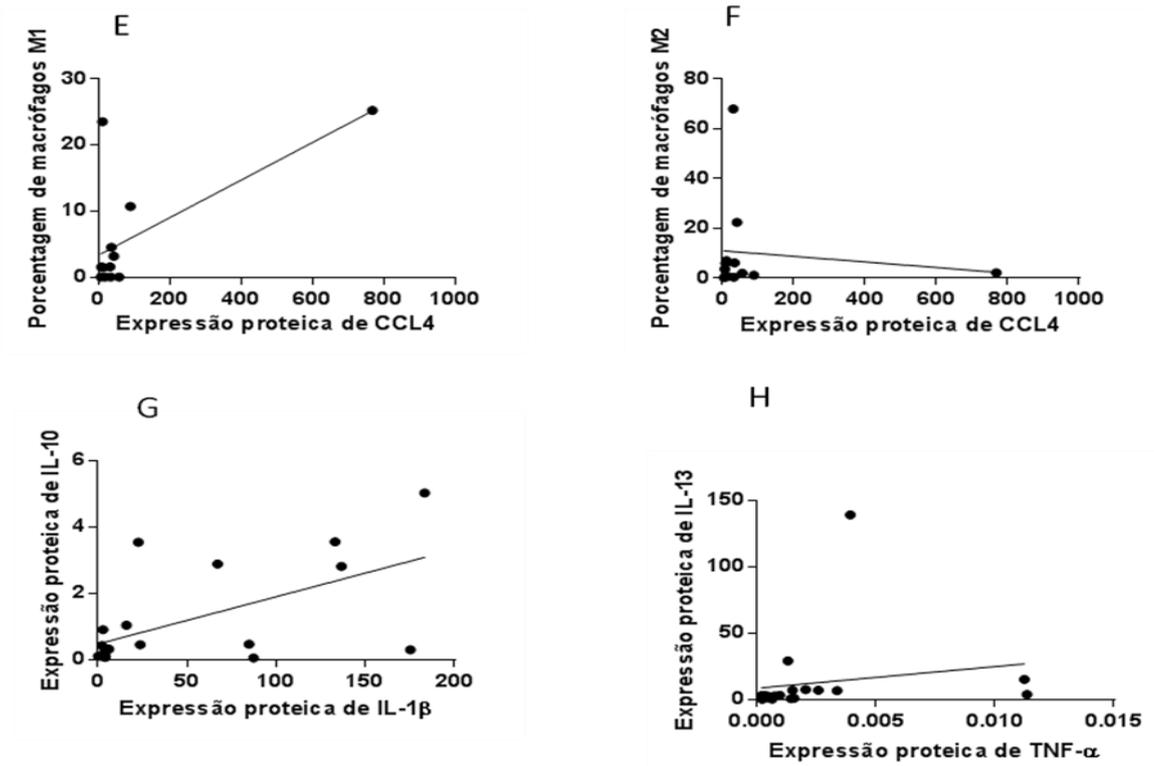
**Figura 12:** Representação gráfica da expressão proteica da quimiocina inflamatória de macrófagos (CCL3)

Dados expressos em: mínimo, 1º quartil, mediana, 3º quartil e máximo. \*diferença significativa entre os grupos (p<0,05). A expressão proteica de citocinas foi normalizada pelo conteúdo de proteína total. CCL2 WSC n=17 e CC n=19.

#### 4.6 Correlação das populações de células infiltrantes imunitárias com a expressão de citocinas inflamatórias e com o balanço proteico pro e anti-inflamatório no tumor de pacientes caquéticos

A correlação não paramétrica (Spearman) entre as populações de macrófagos infiltrados M1 (pró-inflamatórios) e M2 (anti-inflamatórios) e as citocinas e quimiocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$ , CCL3 e CCL4) mostrou-se clara: os macrófagos de perfil pro-inflamatório possuem uma correlação positiva com fatores inflamatórios, enquanto os macrófagos de perfil anti-inflamatório demonstram uma correlação negativa. Ao analisar o balanço da expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias no microambiente tumoral através da correlação entre citocinas IL-1 $\beta$ /IL-10 e IL-13/TNF- $\alpha$  encontramos correlação positiva, como pode ser observado abaixo, na figura 11.





**Figura 13:** Correlação entre infiltrado imunitário e expressão proteica de citocinas inflamatórias  
 A M1%/TNF- $\alpha$   $p=0,667$ ; B: M2 %/TNF-  $p=0,973$ ; C: CCL3/M1%  $p=0,938$ ; D: CCL3/M2 %  $p=0,342$ ; CCL4/  
 M1%  $p=0,256$ ; CCL4/ M2% $p=0,8349$ ; IL-10/IL-1 $\beta$ ;  $p=0,041$ ; IL-13/TNF- $\alpha$   $p= 0,04$

## 5 DISCUSSÃO

A caquexia é uma síndrome metabólica e multifatorial, descrita como uma síndrome inflamatória sistêmica, de etiologia desconhecida (FEARON et al., 2011), e associada diversas doenças como, doença pulmonar obstrutiva crônica, doença renal crônica, insuficiência cardíaca crônica, AIDS e câncer (ARGILÉS et al., 2009; EVANS et al., 2008). No câncer, a caquexia ocorre em cerca de 50% de todos os pacientes, reduzindo a tolerância ao tratamento, a resposta terapêutica, a qualidade de vida e a sobrevida desses pacientes (KHAN; TISDALE, 1999). Dessa forma, a literatura atesta que, aproximadamente 20% a 40% de todas as mortes por câncer são causadas diretamente pela caquexia (TODOROV et al., 1996). Acredita-se que todas as alterações metabólicas descritas no surgimento e desenvolvimento da caquexia são resultados da interação de fatores tumorais, fatores do hospedeiro e da interação entre os dois (DONOHOE; RYAN; REYNOLDS, 2011). Sabe-se que o microambiente tumoral define a malignidade, progressão do câncer e o potencial metastático (TRINCHIERI, 2012) e que nele são encontrados fatores de comunicação celular, tais como, citocinas inflamatórias, fatores de crescimento e quimiocinas, que medeiam as alterações fenotípicas das células tumorais. Esses mediadores produzidos tanto pelo tumor, quanto pelo hospedeiro, induzem alterações intracelulares diretamente associadas com a inflamação (BARACOS, 2000). Desse modo, o presente estudo visou caracterizar o perfil inflamatório no microambiente tumoral e sua influência e contribuição na indução da caquexia.

Embora não haja uma definição clara e concisa da etiologia e desenvolvimento da caquexia, uma definição do consenso internacional mais recente incluiu alguns fatores e manifestações clínicas que auxiliam no diagnóstico, tais como: presença de anorexia, alterações bioquímicas, dentre elas, hipoalbuminemia, anemia, e níveis elevados de proteína C-reativa, caracterizando a presença da inflamação sistêmica, além da perda de peso involuntária, diminuição da massa muscular, baixa qualidade de vida e outros (FEARON et al., 2011). Dentro dessa perspectiva, a análise dos nossos resultados nos permite observar que o grupo com caquexia (CC) estava plenamente dentro dos critérios propostos pelo consenso: o grupo apresentou uma acentuada perda de peso, como mostra a redução da massa corporal e do índice de massa corporal apresentados na tabela 4. A análise dos parâmetros bioquímicos indicou que o grupo CC apresentou também que a concentração média de hemoglobina dos foi de  $11,00 \pm 0,449$  g/dL, inferior ao valor de referência (12 g/dL) estabelecido pelo consenso e, tais valores são significativamente inferiores quando comparado com o grupo sem

caquexia (WSC). Outra manifestação clínica descrita pelo Consenso é a hipoalbuminemia: no grupo CC as médias de concentração de albumina foram significativamente inferiores quando comparada com os do grupo sem caquexia. A inflamação desempenha um papel central no desenvolvimento da caquexia tanto na resposta local do tumor quanto na resposta sistêmica do hospedeiro; alguns estudos que retratam que a resposta sistêmica do hospedeiro em até 50% dos pacientes com carcinomas epiteliais sólidos relaciona-se ao aumento de circulação de proteínas de fase aguda (DEJONG et al., 2005). Outros estudos longitudinais têm encontrado um pior prognóstico em pacientes com alterações inflamatórias, independente da perda de peso (MCMILLAN, 2009). Podemos observar no presente estudo que a inflamação estava instalada, tendo detectado médias significativamente elevadas de proteína C-reativa no soro dos pacientes caquéticos quando comparado com as médias do grupo sem caquexia. Já a percepção da qualidade de vida global, aferida com questionário (QLQ-C30) foi significativamente reduzida (valores mais baixos = menor qualidade de vida) entre os pacientes caquéticos, em comparação com os pacientes nos outros grupos. Além disso, a pontuação final do questionário aplicado (FAACT-ESPEN) para avaliar o grau de anorexia, revelou que pacientes caquéticos mostraram reduzida pontuação (o que significa mais anorexia) comparado com o grupo sem caquexia.

Por ser uma síndrome associada ao câncer, a literatura postula que a incidência da caquexia estava possivelmente relacionada com o estágio do tumor, porém, estudos recentes relataram que o tipo de tumor, estágio ou localização anatômica não era relacionado com o grau de caquexia (TISDALE, 2010). Nesse estudo ora apresentado a análise histopatológica dos tumores de pacientes caquéticos e não caquéticos corrobora esse achado, pois não encontramos nenhuma diferença entre os grupos quanto à presença de necrose, presença de linfócitos intratumorais, a resposta linfocítica peritumoral, invasão vascular e perineural e outros. Mostrou-se também, que o a caquexia independe do estadiamento tumoral no câncer colorretal.

O microambiente de tumores sólidos é constituído por células tumorais, células infiltrantes imunitárias e componentes da matriz (IJIMA; KONNO; ITANO, 2011; TRINCHIERI, 2012). Estudos retratam que o caos metabólico gerado pela caquexia cancerosa ocorre em resposta à células tumorais, tendo em vista que as mesmas induzem alterações no metabolismo energético (revisto por GUPTA et al., 2014) e são capazes de secretar inúmeros fatores inflamatórios (ARGILÉS et al., 2015). A resposta local do tumor é caracterizada pela capacidade das células tumorais em produzir os fatores pró-inflamatórios e pro caquéticos, os quais estimulam uma resposta inflamatória do hospedeiro. Esses fatores produzidos pelo

tumor, tanto o PIF (TODOROV et al., 1996) quanto o LMF (BING et al., 2004; TODOROV et al., 1998), tem sido descritos por atuar diretamente na perda de massa muscular e adiposo, respectivamente (KHAN; TISDALE, 1999). Contudo, não foi detectada diferença significativa na análise da expressão gênica desses fatores nos tumores dos pacientes em ambos os grupos. Muitos estudos abordam o papel das células imunes infiltradas e a contribuição no câncer (TRINCHIERI, 2011, 2012), pois se sabe que as células imunitárias residentes dentro do microambiente do tumor aparecem sob vários fenótipos, entre eles: células supressoras mielóides, células dendríticas, células *Natural Killer*, células T e macrófagos (EDIN et al., 2012). Para muitos tipos de tumores o processo de invasão por células do sistema imune é evidenciado pelo acúmulo de células supressoras derivadas da medula (MDSC) e células T regulatórias tumor-específicas (Treg) no ambiente tumoral e linfonodos ou sangue, cuja presença se correlaciona com a sua progressão avançada; quanto maior for o acúmulo de leucócitos presente no ambiente tumoral, pior será o prognóstico do paciente afetado. (DE VISSER; KORETS; COUSSENS, 2005; HANAHAN; COUSSENS, 2012). Os resultados desse presente estudo, a fim de determinar se os tumores de pacientes com caquexia e sem caquexia diferiam em termos de populações de macrófagos infiltrados e também nas sub-populações desse fenótipo, indicaram porcentagens inferiores de macrófagos M2 em tumores de pacientes caquéticos, em comparação com o grupo de pacientes sem caquexia (6,14 [2,91; 18,55]; 0,99 [0,22; 2,01], respectivamente). A capacidade do infiltrante imunitário de liberar citocinas para os tecidos circundantes e para a corrente sanguínea (AL-ZOUGHBI et al., 2014), já havia sido descrita. Encontramos algumas diferenças na expressão proteica de quimiocinas que são capazes de atrair algumas populações de células do sistema imune, entre elas, a quimiocina inflamatória de macrófagos que está aumentada significativamente nos pacientes com caquexia quando comparado com os pacientes sem caquexia. O infiltrado também contribui para o crescimento do tumor e também para remodelação do microambiente (HAO et al., 2012); porém em nosso estudo não foi detectada diferença entre os grupos ao analisar a expressão proteica de VEGF, um fator relacionado ao crescimento e progressão tumoral. A liberação de citocinas na corrente sanguínea promove a deterioração funcional dos órgãos como um resultado de inflamação sistêmica (AL-ZOUGHBI et al., 2014). Vários modelos experimentais têm mostrado que os tecidos do hospedeiro desempenham um papel fundamental na manutenção da inflamação sistêmica e indução da caquexia (BATISTA et al., 2012; DONATTO et al., 2013; KAZANTZIS; SEELAENDER, 2005). Alguns estudos em modelos animais abordam o aumento da produção de citocinas inflamatórias (IL-1 $\beta$  e Il-6) dentro do microambiente do tumor (MATTHYS et

al., 1991). Outros estudos mostram que a produção de citocinas inflamatórias inclui TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 (TISDALE, 2009), porém não indicam ao certo se a produção de citocinas é principalmente a partir do tumor ou das células do hospedeiro (DONOHOE; RYAN; REYNOLDS, 2011) e recentemente, um estudo dos cânceres esofagogástrico apresentou que as concentrações das citocinas de IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  são significativamente elevadas no tecido tumoral (FEARON et al., 2006). Estudo recente abordou a interação entre tumor e hospedeiro, por exemplo, a expressão do gene NF- $\kappa$ Bp65 é aumentada no tecido adiposo branco subcutâneo de pacientes com caquexia associada ao câncer, concomitantemente com a sua regulação positiva de genes inflamatórios IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , CCL2 / MCP-1 e I $\kappa$ B-  $\alpha$  (CAMARGO et al., 2015). Nesse presente estudo, a análise da expressão gênica no microambiente tumoral mostrou que a citocina inflamatória TNF- $\alpha$  estava significativamente aumentada no grupo CC quando comparada com o grupo WSC, assim como a expressão do gene da quimiocina atraente de monócitos (CCL-2) que estava aumentada no grupo com caquexia em comparação ao grupo sem caquexia. Dentro dessa perspectiva, foi-nos possível detectar um aumento nos níveis de expressão proteica de citocinas inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL-8, IP-10, TNF- $\alpha$  no grupo CC e uma diminuição de citocinas anti-inflamatórias, como IL-13, no mesmo grupo. Esses resultados se relacionam com dados recentemente publicados pelo nosso grupo, realizados em modelo animal de caquexia, no qual foram encontrados *up*-regulação da expressão de IL-1 $\beta$  e ativação de NF- $\kappa$ B em adipócitos e essas evidências mostram uma possível contribuição da fração vascular-estromal do tecido adiposo retroperitoneal para a inflamação dos outros tecidos (NEVES et al., 2015).

Quais possíveis estímulos que induzem essa inflamação nos tecidos periféricos? Postulamos, com base nos resultados apresentados, que a inflamação no microambiente tumoral pode correlacionar-se ao desenvolvimento da caquexia. A contribuição do microambiente tumoral na inflamação local e sistêmica corroboram a ideia de interação complexa e ativa entre o tumor e tecidos periféricos; e de participação do sistema imunológico na mediação dessa interação.

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo mostram que os pacientes do grupo caquético são caracterizados por contundente inflamação sistêmica. As análises histopatológicas do microambiente tumoral fornecem evidências de que a caquexia independe do estadiamento tumoral no câncer colorretal e os tumores dos pacientes não caquéticos (peso estável) e de pacientes caquéticos, ambos com mesmo diagnóstico (tipo e localização tumoral), possuem um perfil de secreção distinto em relação aos fatores inflamatórios e aos percentuais dos fenótipos de macrófagos infiltrantes. Esses achados podem contribuir potencialmente para diagnóstico precoce da síndrome da caquexia e consequente tratamento a partir da análise do tumor

## REFERÊNCIAS\*

- AL-ZOUGHBI, W. et al. Tumor macroenvironment and metabolism. **Semin. Oncol.**, v. 41, n. 2, p. 281-295, Apr 2014.
- APTE, R. N.; VORONOV, E. Is interleukin-1 a good or bad 'guy' in tumor immunobiology and immunotherapy? **Immunol. Rev.**, v. 222, p. 222-241, Apr 2008.
- AREZZO DI TRIFILETTI, A. et al. Comparison of the performance of four different tools in diagnosing disease-associated anorexia and their relationship with nutritional, functional and clinical outcome measures in hospitalized patients. **Clin. Nutr.**, v. 32, n. 4, p. 527-532, Aug 2013.
- ARGILÉS, J. M.; BUSQUETS, S.; LÓPEZ-SORIANO, F. J. Anti-inflammatory therapies in cancer cachexia. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 66, p. S81-6, Sep 2011. Suppl 1.
- ARGILÉS, J. M. et al. Cachexia and sarcopenia: mechanisms and potential targets for intervention. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v. 22, p. 100-106, Jun 2015.
- \_\_\_\_\_. The role of cytokines in cancer cachexia. **Curr. Opin. Support Palliat Care**, v. 3, n. 4, p. 263-268, Dec 2009.
- \_\_\_\_\_. Cancer cachexia: the molecular mechanisms. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 35, n. 4, p. 405-409, Apr 2003.
- BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **Lancet**, v. 357, n. 9255, p. 539-545, Feb 2001.
- BARACOS, V. E. Regulation of skeletal-muscle-protein turnover in cancer-associated cachexia. **Nutrition**, v. 16, n. 10, p. 1015-1018, Oct 2000.
- 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.
- 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. 2500-5, Feb 2004.
- BLUM, D.; STRASSER, F. Cachexia assessment tools. **Curr. Opin. Support. Palliat. Care**, v. 5, n. 4, p. 350-5, Dec 2011.
- CAMARGO, R. G. et al. NF-κBp65 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. 4465-79, Jun 2015.
- COSTA, G. Cachexia, the metabolic component of neoplastic diseases. **Cancer. Res**, v. 37, n. 7 Pt 2, p. 2327-35, Jul 1977.

\*De acordo com:

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

DE VISSER, K. E.; KORETS, L. V.; COUSSENS, L. M. De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent. **Cancer. Cell**, v. 7, n. 5, p. 411-23, May 2005.

DEJONG, C. H. et al. Systemic inflammation correlates with increased expression of skeletal muscle ubiquitin but not uncoupling proteins in cancer cachexia. **Oncol. Rep**, v. 14, n. 1, p. 257-63, Jul 2005.

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. 426-32, Feb 2013.

DONOHUE, C. L.; RYAN, A. M.; REYNOLDS, J. V. Cancer cachexia: mechanisms and clinical implications. **Gastroenterol. Res. Pract**, v. 2011, p. 601434, 2011.

DUVAL PA, V. B. (2010). Caquexia em pacientes oncológicos internados em um programa de internação domiciliar interdisciplinar. *Revista Brasileira de Cancerologia*.

EDGE, S. B.; COMPTON, C. C. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. **Ann. Surg. Oncol**, v. 17, n. 6, p. 1471-4, Jun 2010.

EDIN, S. et al. The distribution of macrophages with a M1 or M2 phenotype in relation to prognosis and the molecular characteristics of colorectal cancer. **PLoS. One**, v. 7, n. 10, p. e47045, 2012..

EVANS, W. J. et al. Cachexia: a new definition. **Clin. Nutr.**, v. 27, n. 6, p. 793-9, Dec 2008.

FEARON, K. et al. Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. **Lancet. Oncol.**, v. 12, n. 5, p. 489-95, May 2011.

FEARON, K. C.; MOSES, A. G. Cancer cachexia. **Int. J. Cardiol.**, v. 85, n. 1, p. 73-81, Sep 2002.

FEARON, K. C. et al. Definition of cancer cachexia: effect of weight loss, reduced food intake, and systemic inflammation on functional status and prognosis. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 83, n. 6, p. 1345-50, Jun 2006.

GUPTA, V. et al. Interplay between epigenetics & cancer metabolism. **Curr. Pharm. Des.**, v. 20, n. 11, p. 1706-14, 2014.

HANAHAN, D.; COUSSENS, L. M. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. **Cancer. Cell**, v. 21, n. 3, p. 309-22, Mar 2012.

HAO, N. B. et al. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. **Clin. Dev. Immunol.**, v. 2012, p. 948098, 2012.

\*De acordo com:

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

- IJIMA, J.; KONNO, K.; ITANO, N. Inflammatory alterations of the extracellular matrix in the tumor microenvironment. **Cancers. (Basel)**, v. 3, n. 3, p. 3189-205,
- 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. 419-27, Sep 2005.
- KHAN, S.; TISDALE, M. J. Catabolism of adipose tissue by a tumour-produced lipid-mobilising factor. **Int. J. Cancer.**, v. 80, n. 3, p. 444-7, Jan 1999.
- KHEIRELSEID, E. A. et al. Identification of endogenous control genes for normalisation of real-time quantitative PCR data in colorectal cancer. **BMC. Mol. Biol.**, v. 11, p. 12, 2010.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001.
- MACDONALD, N. et al. Understanding and managing cancer cachexia. **J. Am. Coll. Surg**, v. 197, n. 1, p. 143-61, Jul 2003.
- MARKMAN, J. L.; SHIAO, S. L. Impact of the immune system and immunotherapy in colorectal cancer. **J. Gastrointest. Oncol.**, v. 6, n. 2, p. 208-23, Apr 2015.
- MATTHYS, P. et al. Anti-interferon-gamma antibody treatment, growth of Lewis lung tumours in mice and tumour-associated cachexia. **Eur. J. Cancer.**, v. 27, n. 2, p. 182-7, 1991.
- MCMILLAN, D. C. Systemic inflammation, nutritional status and survival in patients with cancer. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.**, v. 12, n. 3, p. 223-6, May 2009.
- MONITTO, C. L. et al. Characterization of a human homologue of proteolysis-inducing factor and its role in cancer cachexia. **Clin. Cancer. Res.**, v. 10, n. 17, p. 5862-9, Sep 2004.
- Neves RX, Rosa JC, Yamashita AS, Matos Neto EM, Riccardi DMR, Santos FL, Batista Jr ML, Seelaender MCL. White adipose tissue cells and the progression of cachexia: inflammatory pathways. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*, 2015
- O'RIORDAIN, M. G. et al. Peripheral blood cells from weight-losing cancer patients control the hepatic acute phase response by a primarily interleukin-6 dependent mechanism. **Int. J. Oncol**, v. 15, n. 4, p. 823-7, Oct 1999.
- RABINOVICH, G. A.; GABRILOVICH, D.; SOTOMAYOR, E. M. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 25, p. 267-96, 2007.
- RÜEGG, C.; DORMOND, O. Suppression of tumor angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: a new function for old drugs. **Scientific.World.Journal**, v. 1, p. 808-11, Dec 2001.

\*De acordo com:

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

SEELAENDER, M. et al. Inflammation in cancer cachexia: to resolve or not to resolve (is that the question?). **Clin. Nutr**, v. 31, n. 4, p. 562-6, Aug 2012.

STRASSMANN, G. et al. Evidence for the involvement of interleukin 6 in experimental cancer cachexia. **J. Clin. Invest**, v. 89, n. 5, p. 1681-4, May 1992.

TISDALE, M. J. Mechanisms of cancer cachexia. **Physiol. Rev**, v. 89, n. 2, p. 381-410, Apr 2009.

\_\_\_\_\_. Are tumoral factors responsible for host tissue wasting in cancer cachexia? **Future. Oncol**, v. 6, n. 4, p. 503-13, Apr 2010.

TODOROV, P. et al. Characterization of a cancer cachectic factor. **Nature**, v. 379, n. 6567, p. 739-42, Feb 1996.

TODOROV, P. T. et al. Purification and characterization of a tumor lipid-mobilizing factor. **Cancer. Res**, v. 58, n. 11, p. 2353-8, Jun 1998.

TRINCHIERI, G. Innate inflammation and cancer: Is it time for cancer prevention? **F1000 Med. Rep**, v. 3, p. 11, 2011.

\_\_\_\_\_. Cancer and inflammation: an old intuition with rapidly evolving new concepts. **Annu. Rev. Immunol**, v. 30, p. 677-706, 2012.

VON HAEHLING, S. et al. Ethical guidelines for authorship and publishing in the Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle. **J. Cachexia. Sarcopenia. Muscle**, v. 1, n. 1, p. 7-8, Sep 2010.

WANG, T.; LIU, G.; WANG, R. The Intercellular Metabolic Interplay between Tumor and Immune Cells. **Front. Immunol**, v. 5, p. 358, 2014.

WATCHORN, T. M. et al. Proteolysis-inducing factor regulates hepatic gene expression via the transcription factors NF-(kappa)B and STAT3. **FASEB. J**, v. 15, n. 3, p. 562-4, Mar 2001.

WATKINS, S. K. et al. Isolation of immune cells from primary tumors. **J. Vis. Exp**, n. 64, p. e3952, 2012.

WINFIELD, R. D. et al. Myeloid-derived suppressor cells in cancer cachexia syndrome: a new explanation for an old problem. **JPEN J. Parenter. Enteral. Nutr**, v. 32, n. 6, p. 651-5, 2008 Nov-Dec 2008.

ZAMARRON, B. F.; CHEN, W. Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression. **Int. J. Biol. Sci**, v. 7, n. 5, p. 651-8, 2011.

\*De acordo com:

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

## ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### ESTUDO: **Papel dos infiltrantes-inflamatórios do tumor associado à inflamação sistêmica em pacientes caquéticos**

*Você está sendo convidado (a) a participar do Projeto de Pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós, e caso queira desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você. Este termo de consentimento tem duração máxima prevista de 5 minutos.*

Eu, (inserir o nome, sexo, profissão, residente e domiciliado na, telefone)

---



---

portador da Cédula de identidade, RG \_\_\_\_\_, e inscrito no CPF/MF \_\_\_\_\_ nascido (a) em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_\_, abaixo assinado (a), concordo de livre e espontânea vontade em participar como voluntário (a) do estudo “**Papel dos infiltrantes-inflamatórios do tumor associado à inflamação sistêmica em pacientes caquéticos**”. Declaro que obtive todas as informações necessárias, bem como todos os eventuais esclarecimentos quanto às dúvidas por mim apresentadas e que irei receber uma via idêntica deste Termo de Consentimento Live e Esclarecido (TCLE).

#### **Estou ciente que:**

- I) O estudo se faz necessário para que possamos investigar as possíveis causas da caquexia, caracterizada pela grande perda de peso, atrofia muscular, fadiga, fraqueza e diminuição do apetite; temos como objetivo verificar se a caquexia afeta as microestruturas do fígado e também a verificação do metabolismo hepático;
- II) Caso o paciente aceite participar desta pesquisa e **dependendo de cada procedimento cirúrgico** efetuado, poderá ser retirado fragmentos de aproximadamente um grama por tecido (sendo ele: **TUMOR**), com tempo total de coleta de aproximadamente 5 minutos. Esse procedimento possui grau de risco mínimo e não interfere nos procedimentos padrões da cirurgia. Mas se houver intercorrência com o (a) participante da pesquisa, decorrente da pesquisa, este será atendido no HU/USP, segundo o critério do mesmo (Hospital de atendimento secundário). Esse material coletado será importante para o entendimento da etiologia do processo da caquexia;
- III) Concordo que serão realizadas coletas de **20 mL de sangue** em pacientes com câncer (exceto hepático), mas sem caquexia e pacientes com câncer (exceto hepático) e caquexia, para que os parâmetros plasmáticos e séricos possam ser aferidos. A coleta será realizada por um profissional da saúde devidamente habilitado e ocorrerá durante a sessão do treino. Nos pacientes controles será realizada previamente à cirurgia uma coleta de sangue (**20 ml**), sem interferir no procedimento cirúrgico, por um profissional da saúde devidamente habilitado. Os exames previstos serão realizados pelo Grupo de Pesquisa de Metabolismo do Câncer, Coordenado pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marília Cerqueira Leite Seelaender, situado no Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo;
- ( ) Sim                      ou                      ( ) Não
- IV) Essas coletas (sangue e tecido) serão realizadas apenas para este estudo e ou em outros projetos (pesquisas futuras) desde que autorizada por mim (participante da pesquisa), em nada influenciando o tratamento e não modificando o procedimento anestésico e cirúrgico;

- V)** Não vai me curar, não vai me causar nenhum problema, não haverá nenhum incômodo de dor no momento da coleta da amostra do fragmento (TUMOR). E na coleta de sangue, este procedimento, poderá causar dor local e um pequeno desconforto, e raramente, um hematoma no local da punção venosa.
- VI)** A participação neste projeto não tem objetivo de me submeter a um tratamento, bem como não me acarretará qualquer despesa financeira com relação aos procedimentos médicos, clínicos e terapêuticos efetuados com o estudo;
- VII)** Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;
- VIII)** A desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem estar físico. Não virá a interferir no atendimento ou tratamento médico;
- IX)** Os resultados obtidos durante este estudo serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados;
- X)** Concordo que o material e os dados coletados, por mim autorizados, e os resultados de análises obtidos pelos pesquisadores poderão ser utilizados em outros projetos (pesquisas futuras) desde que autorizado pela Comissão de Ética deste Instituto;  
 Sim                    ou                     Não
- XI)** Concordo que após os materiais serem coletados e armazenados em soluções específicas para cada técnica, serão acondicionados em freezer -80° para manter a integridade do tecido, e posteriormente serem utilizados;  
 Sim                    ou                     Não
- XII)** Concordo que após os materiais serem utilizados para fins de pesquisa e os objetivos serem alcançados, o restante será incinerado em local para descarte de material biológico humano, conforme preconizado nas resoluções do Conselho Nacional de Saúde (CNS);  
 Sim                    ou                     Não
- XIII)** Caso eu desejar, poderei pessoalmente tomar conhecimento dos resultados ao final desta pesquisa que terá uma duração prevista de 12 a 18 meses;  
 Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.  
 Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

“DECLARO QUE, APÓS CONVENIENTEMENTE ESCLARECIDO PELO PESQUISADOR E TER ENTENDIDO O QUE ME FOI EXPLICADO, CONSINTO EM PARTICIPAR DA PRESENTE PESQUISA”.

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_\_





## ANEXO C – Questionário de anorexia – FAACT-ESPEN

Nome e sobrenome:

Sexo:      Data de nascimento:

Tipo de neoplasia:

Estadiamento:

Terapia precedente:

Comorbidade:

Primeira visita:

Perda de peso(S/N):

Tamanho da perda de peso (% nos últimos 3 meses):

Peso (na hospitalização):

Altura:

IMC:

Como está seu apetite no último mês?    Aumentado    Normal    Diminuído

Quantidade ingerida no almoço do dia anterior?    100%    75%    50%    25%    0%

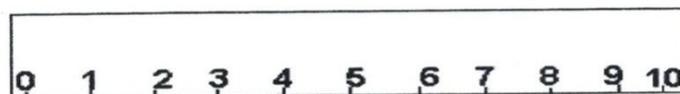
### Pontuação anoréxica

	Nada	Um pouco	Moderadamente	Bastante	Muito
Meu apetite é bom?	0	1	2	3	4
A quantidade que eu como me satisfaz?	0	1	2	3	4
Me preocupo com meu peso?	0	1	2	3	4
Os alimentos têm gosto ruim?	4	3	2	1	0
Estou preocupado por parecer magro?	4	3	2	1	0
Meu apetite acaba no início das refeições?	4	3	2	1	0
Há dificuldade de comer alimentos pesados ou elaborados?	4	3	2	1	0
Minha família me induz a comer?	4	3	2	1	0
Vômitos?	4	3	2	1	0
Me sinto satisfeito após algumas mordidas?	4	3	2	1	0
Dores no estômago?	4	3	2	1	0
Minha saúde está melhorando?	0	1	2	3	4

### Questionário anorexia

Saciedade precoce?      Carnofobia?      Alterações de gosto/odor?      Náusea/vômito?

### Escala analógica visual



**Faminto**

**Saciado**

Cm:

Visita de controle (3 meses):      Peso:      IMC:

Terapia realizada (cirurgia/ radio/ quimio):

Complicações: