EMÍDIO MARQUES DE MATOS NETO

TREINAMENTO FÍSICO: ESTRATÉGIA EFICAZ E SEGURA DE REDUÇÃO DA INFLAMAÇÃO EM PACIENTES COM CAQUEXIA ASSOCIADA AO CÂNCER

EMÍDIO MARQUES DE MATOS NETO

Treinamento físico: estratégia eficaz e segura de redução da inflamação em pacientes com caquexia associada ao câncer

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

São Paulo 2016

Treinamento físico: estratégia eficaz e segura de redução da inflamação em pacientes com caquexia associada ao câncer

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

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Marília Cerqueira Leite Seelaender

Versão original

São Paulo 2016

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Matos-Neto, Emídio Marques de Treinamento físico: estratégia eficaz e segura de redução da inflamação em pacientes com caquexia associada ao câncer / Emídio Marques de Matos-Neto; orientador Marília Cerqueira Leite Seelaender. --São Paulo, 2016. 190 p.

Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Caquexia associada ao câncer. 2. Tecido adiposo. 3. Inflamação. 4. Treinamento físico. I. Cerqueira Leite Seelaender, Marília, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato (a): Emídio Marques de Matos Neto

Título da Tese: Treinamento físico: estratégia eficaz e segura de redução da inflamação em pacientes com caquexia associada ao câncer.

Orientador (a): Marília Cerqueira Leite Seelaender

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

() Aprovado(a) () Reprovado(a)

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



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) 3091-8405 e-mail: cep@ icb.usp.br

São Paulo, 19 de abril de 2012.

PARECER 1046/CEP

A Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB, na sessão realizada no dia 18.04.2012, APROVOU o projeto intitulado: "Efeito do treinamento físico aeróbio sobre o infiltrante inflamatório no tecido adiposo de paciente caquético" dos autores Profa. MARILIA CERQUEIRA LEITE SEELAENDER e o aluno EMIDIO MARQUES DE MATOS NETO.

Informa ainda, que seu projeto será regularizado junto a Plataforma Brasil, assim que a CONEP liberar o acesso ao sistema.

Cabe aos Pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX. 2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em 18.04.2013.

Atenciosamente,

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

Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas / USP Aprovada

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

PROJETO DE PESQUISA

Título: Efeito do treinamento físico aeróbio sobre o infiltrante inflamatório no tecido adiposo de pacientes caquéticos

Área Temática:

Pesquisador: Marilia Cerqueira Leite Seelaender

Instituição: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo - ICB/USP Versão: 1 CAAE:02185912.6.0000.5467

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 70355

Data da Relatoria: 04/06/2012

Apresentação do Projeto:

A proposta é de interesse para o estudo da caquexia causada pelo câncer, utilizando pacientes do Hospital Universitário da USP

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar os níveis de adipocininas, TNFa, leptina e várias outras proteinas de tecido adiposo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Do ponto de vista ético os experimentos a serem realizados, não tem nenhuma objeção.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequado

Recomendações:

Aprovado

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não se aplicam

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

A CEPSH aprovou o projeto

09 de Agosto de 2012

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Antonio (*in memorian*) e Antonia, à minha irmã Leila e ao Marcelo.

AGRADECIMENTOS

Caro leitor, essa parte da escrita de uma tese é, normalmente, a última a ser feita. Até chegar aqui, foram alguns anos, várias aulas assistidas, alguns experimentos bem-sucedidos (outros tantos não o foram, creia-me), alguns relatórios elaborados, algumas participações em congressos e, com sorte, enfim, chega o momento da defesa. Este trabalho, portanto, não é uma obra solitária, é, ao contrário, o fruto de inúmeras mãos. Então, é tempo de agradecer o que já veio e o que está por vir.

São muitos os agradecimentos a serem feitos, mas, especialmente nesta tese, o maior agradecimento vai para os voluntários da pesquisa. Tantas vezes vi, com certo constrangimento, olhares de gratidão, quando, na verdade, a grandeza era inteira deles que, mesmo doentes, se dispunham a colaborar, a participar! Muito obrigado a cada um de vocês.

Se a participação dos voluntários foi essencial para a realização da pesquisa, ela não seria possível sem a colaboração de toda a equipe do Hospital Universitário da USP, em particular, a presteza do Dr. Paulo Sérgio Martins de Alcântara, a liderança e a capacidade de articulação do Dr. José Pinhata Otoch. Nenhuma palavra poderá traduzir a importância dos senhores para a viabilização deste projeto. Agradeço também à equipe da Santa Casa de São Paulo, que se somou ao projeto no último ano.

É preciso agradecer também a convivência diária e a contribuição em diversos momentos, de toda a equipe que compõe o Instituto de Ciências Biomédicas da USP, especialmente, aos professores, alunos e funcionários do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, com quem convivi mais frequentemente nesses últimos 4 anos. Foram, sem dúvidas, bons anos!

A convivência foi mais que diária com a equipe do laboratório a quem preciso agradecer nominalmente (e em ordem alfabética para não gerar reclamações!). Muito obrigado Ana Flávia, Anelisa Magalhães, Ariene Murari, Bruna Fernanda, Daniela Caetano, Daniela Riccardi, Diego Cavallaro, Edson Lima, Elizangela dos Anjos, Estefânia Simoes, Fábio Lira, Felipe Donatto, Fernando Rosa, Gabriela Froio, Gabriela Castro, Gabriel Macedo, Henrique Andrade, Henrique Ribeiro, José César Rosa Neto (Zeca), Joyce Lima, Katrin Radloff, Lucas Enjiu, Marcelo Carvalho (vulgo Dr. Cebola), Marcelo Semiatzh, Michele Alves, Miguel Batista, Nelson Inácio, Paula Leme, Reinado Bassit, Rodolfo Camargo e Sílvio Gomes. Quero agradecer especialmente à Joanna Carola, à Raquel Galvão Figuerêdo e ao Rodrigo das Neves pela contribuição em cada etapa do projeto e pela amizade em todos os momentos. Agradeço mais que especialmente à Emília Ribeiro por tudo (e é tudo mesmo) que ela proporciona a quem tem a dádiva de conviver com ela. Te adoro Emília!

Professora Marília (pausa para respirar), andei procurando adjetivos para descrevê-la, mas sinto informar que a língua portuguesa ainda não inventou um que fosse capaz de expressar tamanha intensidade! Na falta deles, me resta agradecer por todas as oportunidades dos últimos anos, pelos ensinamentos, pela crença na minha capacidade e, penso eu, pelo que é maior que tudo isso, pela amizade que não se encerra com essa tese. Gratidão eterna!

Se aqui se encerra um ciclo da minha vida, a história toda começou há alguns anos e preciso agradecer hoje e sempre pelo apoio e amor incondicional da minha mãe, Antonia e da minha irmã Leila. Tudo, cada dia, cada passo, cada intervalo de respiração é por vocês! Meu amor eterno para vocês. Obrigado a todos da minha família que se fizeram presentes nesse longo período de afastamento de casa!

Marcelo Melo, a sua companhia, a sua admiração, o seu respeito e o seu carinho transformaram e me impulsionaram todos os dias. O futuro será ainda melhor. Obrigado!

Obrigado Léo Torres pela amizade e entusiasmo com cada conquista dessa caminhada. Obrigado a todos os meus amigos piauienses que tornaram esses anos em São Paulo mais tranquilos. Obrigado meu amigo paulista Carlos Pino por me permitir fazer parte da sua vida.

Obrigado Ivanir Pires, professor Julio Tirapegui, professor Marcelo Rogero e Miriam Fonseca-Alaniz pelos ensinamentos e pela amizade!

Meus sinceros agradecimentos à Universidade de São Paulo e à FAPESP pelo apoio para a realização deste projeto de pesquisa.

"Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas Que já tem a forma do nosso corpo E esquecer os nossos caminhos que nos levam sempre aos mesmos lugares É o tempo da travessia E se não ousarmos fazê-la Teremos ficado para sempre À margem de nós mesmos" (Tempo de Travessia, Fernando Pessoa)

Resumo

MATOS-NETO, E. M. **Treinamento físico: estratégia eficaz e segura de redução da inflamação em pacientes com caquexia associada ao câncer.** 2016. 190 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual) Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A caquexia associada ao câncer é uma síndrome multifatorial e multiorgão de etiologia desconhecida caracterizada por profunda perda de massa corporal, precariamente diagnosticada e, raramente tratada. A perda de massa corporal é o principal sinal da caquexia e os mecanismos associados são múltiplos, destacando-se a ingestão inadequada de nutrientes, desbalanço entre anabolismo e catabolismo proteico, acentuada diminuição da aptidão física, disfunção metabólica, bem como uma indução de inflamação crônica e sistêmica. Postula-se que o tecido adiposo branco participe intensamente de todas as alterações observadas na caquexia, uma vez que o mesmo é um órgão com capacidade de ação autócrina, parácrina e endócrina e é marcadamente afetada pela síndrome. O tratamento da caquexia ainda representa um dos principais desafios de pesquisadores e médicos ao redor do mundo, posto que diversas estratégias terapêuticas têm sistematicamente falhado em reverter completamente seus sintomas. Neste sentido, o treinamento físico (TF) aeróbio, em particular, tem sido proposto como uma ferramenta adeguada, uma vez que exerce ação anti-inflamatória sistêmica. Assim, o presente estudo investigou o processo inflamatório sistêmico e no tecido adiposo subcutâneo (TASC) e testou a hipótese de atenuação da inflamação pelo TF crônico (6 semanas de caminhada em esteira) em pacientes com caquexia associada ao câncer e controles. Pacientes do Hospital Universitário e da Santa Casa de São Paulo foram distribuídos em seis grupos, após assinar o termo de consentimento: Controles (Control SED e TR), portadores de tumor gastrintestinal sem caquexia (WSC SED e TR) e portadores de tumor gastrintestinal com caguexia (CC SED e TR). A composição corporal, a qualidade de vida (QLQ-C30), a aptidão física e os marcadores de caquexia foram avaliados nos pacientes. O sangue, o tecido adiposo subcutâneo e o músculo esquelético reto abdominal dos pacientes foram analisados e perfil lipídico e as alterações inflamatórias (RT-qPCR e Luminex[®] xmap[®]) e morfológicos (HE) foram examinados. Observamos cessação da perda de massa corporal e ganho cardiorrespiratório (incremento de 209%) entres os pacientes caquéticos treinados e redução de colesterol total no CC TR, de LDL no CC SED e de HDL no CC SED e CC TR. O TF foi capaz de aumentar a concentração de HDL ao longo da intervenção (de 34,83 ± 4,74 mg/dL para 57,0 ± 3,42 mg/dL). Verificamos que a morfologia e a morfometria dos adipócitos do TASC foram preservadas pelo TF. Não encontramos diferenças entre as células imunitárias infiltradas no TASC dos pacientes avaliados (macrófagos e MDSC). Os mediadores inflamatórios que se mostraram alterados nos pacientes caquéticos sofreram modulação pelo TF. Esse é o primeiro estudo, de nosso conhecimento, que demonstra que o exercício físico realizado de forma crônica é capaz de reduzir a inflamação em pacientes com câncer caquéticos, atenuando os sintomas da síndrome.

Palavras-chave: Caquexia associada ao câncer. Tecido adiposo. Inflamação. Treinamento físico.

Abstract

MATOS-NETO, E.M. Exercise training: a safe and effective strategy for reducing inflammation in cachectic cancer patients. 2016. 190 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual) Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Cancer cachexia is a multifactorial and multiorgan systemic syndrome with unknown aetiology, and characterized by profound weight loss. Cancer cachexia is generally underdiagnosed, and rarely treated. Among various alterations induced by cachexia, inadequate food ingestion, increase in protein catabolism, decrease in functionality, metabolic dysfunction and chronic inflammation are the most important ones. It seems that the white adipose tissue play a central role in the all metabolic alterations in cancer cachexia, as it presents autocrine, endocrine and paracrine functions and is deeply affected by the syndrome. Treatment of cancer cachexia is still a challenge to researchers and physicians all over the world, as several therapeutic strategies have failed to reverse its symptoms. Considering that exercise training (ET) may be a useful tool to treat cachexia due to its chronic anti-inflammatory actions, the study aimed at investigating the inflammatory process in a systemic context and in the subcutaneous adipose tissue (SAT), and to evaluate the possible antiinflammatory effects of ET (6 weeks of walking on treadmill) in subjects with cancer cachexia. Patients from University Hospital and from Santa Casa de São Paulo Hospital were separated in six groups, after signature informed consent: Control (sedentary – SED and trained – TR), weight-stable patients with gastrointestinal cancer (WSC SED and TR) and patients with gastrointestinal cancer and cachexia (CC SED and TR). Body composition, quality of life questionnaire (QLQ-C30), physical function and markers of cancer cachexia were assessed. Blood, SAT, skeletal muscle (rectus abdominis), serum lipid profile, inflammatory changes (RT-qPCR and Luminex[®] xmap[®]) and adipose tissue morphology (H&E) were examined. Cessation of weight loss and cardiorespiratory gain were observed (increment of 209 % of VO2max) in the CCTR group and a reduction of total cholesterol in the CCTR group decreased in LDL in the CC SED group and HDL in the CC SED and CC TR groups. ET was able to increase serum HDL during the intervention (from 34.83 ± 4.74 mg/dL to 57.0 \pm 3.42 mg/dL). Adjpocyte morphology and morphometric parameter were preserved by ET. No differences were found in regard to the immune cells infiltrating patients' SAT (macrophages and MDSC). Inflammatory mediators changed by cachexia were modulated by ET. To our knowledge, this is the first study to demonstrate a reduction of inflammation and cachexia symptoms in cancer patients.

Keywords: Cancer cachexia. Adipose tissue. Inflammation. Exercise Training.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estágios da Caquexia (adaptado de FEARON et al., 2011)26
Figura 2 - Critérios para o Diagnóstico da Caquexia (adaptado de EVANS et al., 2008)
Figura 3 - Principais órgãos/tecidos afetados durante a progressão da caquexia (Adaptado de PORPORATO, 2016)28
Figura 4 - Representação esquemática das etapas de seleção dos voluntários já incluídos no projeto
Figura 5 - Desenho experimental do protocolo de treinamento físico 40
Figura 6 - Estratégias de análises específicas para macrófagos e subpopulações
Figura 7 - Estratégias de análises específicas para células supressoras de origem mielóide (MDSC)50
Figura 8 - Escore de qualidade de vida dos pacientes
Figura 9 - Parâmetros bioquímicos propostos para o diagnóstico da caquexia.
Figura 10 - Massa corporal antes, durante e após o protocolo de TF
Figura 11 - Composição corporal por DEXA dos pacientes treinados58
Figura 12 - Composição corporal avaliada por DEXA ao longo de 6 semanas. 59
Figura 13 - Parâmetros bioquímicos da caquexia ao longo de 6 semanas 60
Figura 14 - Efeitos do treinamento físico sobre os parâmetros de condicionamento físico avaliados
Figura 15 - Perfil lipídico e concentrações séricas de ALT, AST, glicose e lactato ao longo de 6 semanas
Figura 16 - Características morfológicas do tecido adiposo subcutâneo 64
Figura 17 - Análise morfométrica dos adipócitos do tecido adiposo subcutâneo.
Figura 18 - Conteúdo plasmático do fator de crescimento epidérmico (EGF). 66
Figura 19 - Conteúdo plasmático de eotaxina67
Figura 20 - Conteúdo plasmático e tecidual do fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF)
Figura 21 - Conteúdo plasmático e tecidual do fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos (GM-CSF)
Figura 22 - Conteúdo plasmático e tecidual de interferon (IFN)-α

Figura 23 - Conteúdo plasmático e tecidual de interferon (IFN)-γ
Figura 24 - Concentração plasmática e tecidual da proteína induzível por IFN-γ (IP-10)
Figura 25 - Concentração plasmática e tecidual de interleucina (IL)-12p4073
Figura 26 - Concentração plasmática e tecidual de interleucina (IL)-12p7074
Figura 27 - Concentração plasmática e tecidual da interleucina (IL)-6
Figura 28 - Concentração plasmática e tecidual da interleucina (IL)-7
Figura 29 - Concentração plasmática e tecidual da interleucina (IL)-8
Figura 30 - Concentração plasmática e tecidual da interleucina (IL)-13
Figura 31 - Concentração plasmática e tecidual da interleucina (IL)-1ra 79
Figura 32 - Concentração plasmática e tecidual da interleucina (IL)-1081
Figura 33 - Concentração plasmática e tecidual do fator de necrose tumoral alfa (TNF)-α
Figura 34 - Concentração plasmática e tecidual do fator de necrose tumoral (TNF)-β
Figura 35 - Concentração plasmática e tecidual do fator quimioatraente de monócitos 2 (CCL2)
Figura 36 - Concentração plasmática e tecidual do fator quimioatraente de monócitos 3 (CCL3)
Figura 37 - Concentração plasmática e tecidual do fator quimioatraente de monócitos 4 (CCL4)
Figura 38 - Concentração plasmática e tecidual do fator quimioatraente de monócitos 5 (CCL5)
Figura 39 - Subpopulações de macrófagos na fração vascular estromal do tecido adiposo subcutâneo
Figura 40 - Células supressoras de origem mielóide na fração vascular estromal do tecido adiposo subcutâneo

LISTA DE TABELAS

41
43
46
49
53
61
65

LISTA DE ABREVIATURAS

- APC-Cy7 Allophycocyanin 7
- apo-A1 Apoliproteina A-1
- BV421 Brilliant Violet[™] 421 Dye
- CC SED Cachectic cancer sedentário
- CC TR Cachectic cancer treinado
- CCL Proteína quimioatraente de monócitos
- CCR7 C-C chemokine receptor type 7
- CD Cluster of Differentiation
- CEP Comissão de Ética
- Control SED Controle sedentário
- Control TR Controle treinado
- DEXA Absorciometria de raios-X de dupla energia
- DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium
- DMSO Dimethyl sulfoxide
- DNA Deoxyribonucleic acid
- DPOC Doença pulmonar obstrutiva crônica
- EDTA Ethylenediamine tetraacetic acid
- EGF Fator de crescimento epitelial
- FACS Fluorescence-activated cell sorting
- FCF Faculdade de Ciências Farmacêuticas
- FITC Fluorescein isothiocyanate
- FVE Fração vascular estromal
- G-CSF Fator estimulante de colônias de granulócitos
- GE General electric
- GM-CSF Fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos

Hb	Hemoglobina
HDLc	Lipoproteína de alta densidade
HLA-DR	Human Leukocyte Antigen
HU	Hospital Universitário
ICAM1	Molécula de adesão intercelular 1
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
ICC	Insuficiência cardíaca crônica
IFN-α	Interferon Alfa
IFN-γ	Interferon Gama
IL	Interleucina
IL-1ra	Antagonista do receptor de interleucina 1
IMC	Índice de massa corporal
IP-10	Proteína 10 induzida por interferon
LDLc	Lipoproteína de baixa densidade
Lin1	Lineage Cocktail 1
M1	Macrófago do tipo 1
M2	Macrófago do tipo 2
MAC16	Murine adenocarcinoma 16
MC	Massa corporal
MDSC	Myeloid-Derived Suppressor Cells
Μφ	Macrofágos
PCR	Proteína C-reativa
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-chlorophyll proteins
PGE2	Prostaglandina E2
QLQ-C30	Questionário de qualidade de vida
ReBEC	Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos

RNA	Ribonucleic acid
RPL27	Ribosomal Protein L27
RT-qPCR	Real-Time Quantitative Reverse Transcription
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
SNC	Sistema nervoso central
SP	São Paulo
ТАВ	Tecido adiposo branco
TAG	Triacilglicerol
TASC	Tecido adiposo subcutâneo
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TF	Treinamento físico
TNF	Fator de necrose tumoral
U.A.	Unidades arbitrárias
USP	Universidade de São Paulo
VCAM1	Molécula de adesão celular-vascular 1
VO _{2máx}	Volume máximo de oxigênio
WSC SED	Weight-stable cancer sedentário
WSC TR	Weight-stable cancer treinado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DA LITERATURA	24
2.1	Caquexia: histórico, definição e epidemiologia	24
2.2	Fisiopatologia da caquexia associada ao câncer	27
2.3	Exercício físico como estratégia terapêutica na caquexia associada ao câncer	r32
3	OBJETIVOS	34
3.1	Objetivo Geral	34
3.2	Objetivos Específicos	34
4	MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1	Casuística	35
4.2	Diagnóstico de caquexia	37
4.3	Aprovação ética	37
4.4	Coleta de amostras durante o procedimento cirúrgico	38
4.5	Análise da composição corporal	38
4.6	Coleta de Sangue	39
4.7 reto	Biopsia e processamento de tecido adiposo subcutâneo e músculo esquelétic abdominal	;o . 39
4.8	Protocolo de Treinamento Físico (TF)	40
4.9	Análises	41
4.9.	1 Análise histológica	41
4.9.	2 Análises bioquímicas	42
4.9.	3 Análise da expressão gênica	42
4.9.	4 Determinação da expressão proteica por Luminex [®]	44
4.9.	4.1 Extração de proteínas teciduais e quantificação	44
4.9.	4.2 <u>Protocolo do ensaio Luminex[®]</u>	45
4.9.	4.3 Imunofenotipagem por citometria de fluxo	47
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
6	RESULTADOS	52
6.1	Características gerais dos pacientes (baseline)	52
6.2 da c	Análise dos parâmetros bioquímicos propostos para confirmação do diagnóst aquexia	<i>ico</i> .55
6.3	Efeitos do treinamento físico sobre a composição corporal	57
6.4 diag	Efeitos do treinamento físico sobre os parâmetros bioquímicos propostos para inóstico da caquexia	я о . 59

6.5 avalia	<i>Efeitos do treinamento físico sobre os parâmetros de condicionamento físico dos60</i>
6.6	Perfil lipídico e concentrações séricas de ALT, AST, glicose e lactato61
6.7 de AL	<i>Efeitos do treinamento físico sobre o perfil lipídico e as concentrações séricas</i> <i>T, AST, glicose e lactato</i> 62
6.8	Análise morfológica e morfométrica63
6.9	Expressão gênica65
6.10	Expressão Proteica65
6.10.1 <u>efeito</u> :	<u>Conteúdo plasmático e tecidual de fatores de crescimento e diferenciação e</u> 65 do treinamento físico
6.10.2 <u>efeito</u> :	<u>Conteúdo plasmático e tecidual das citocinas pró e anti-inflamatórias e os</u> <u>s do treinamento físico</u> 69
6.10.3 <u>os efe</u>	<u>Conteúdo plasmático e tecidual dos fatores quimioatraentes de monócitos e</u> <u>itos do treinamento físico</u> 83
6.11	Imunofenotipagem na fração vascular estromal do tecido adiposo subcutâneo87
7 D	ISCUSSÃO
7 D 8 C	ISCUSSÃO
7 D 8 C REFE	ISCUSSÃO
7 D 8 C REFE ANE)	ISCUSSÃO
7 D 8 C REFE ANE) A Feri	ISCUSSÃO
7 D 8 C REFE ANE) A Ferr B Que	ISCUSSÃO
7 D 8 C REFE ANE A Ferr B Que C Terr	ISCUSSÃO
7 D 8 C REFE ANE A Ferr B Que C Terr D Cru	ISCUSSÃO
7 D 8 C REFE ANE A Ferr B Que C Terr D Cru E Cad cance	ISCUSSÃO 89 ONSIDERAÇÕES FINAIS 99 RÊNCIAS* 100 XOS 100 ramenta para o diagnóstico dos pacientes 115 estionário de qualidade de vida (QLQ-C30) 116 mo de consentimento livre e esclarecido 118 vas-Padrão 121 chexia-Associated adipose tissue morphological rearragement in gastrintestinal r patients 126
7 D 8 C REFE ANE A Ferr B Que C Terr D Cru E Cae cance F Sys Culpri	ISCUSSÃO 89 ONSIDERAÇÕES FINAIS 99 RÊNCIAS* 100 XOS 100 ramenta para o diagnóstico dos pacientes 115 estionário de qualidade de vida (QLQ-C30) 116 no de consentimento livre e esclarecido 118 vas-Padrão 121 chexia-Associated adipose tissue morphological rearragement in gastrintestinal 126 temic Inflammation in Cachexia - Is Tumour Cytokine Expression Profile the 141

1 INTRODUÇÃO

A caquexia, cuja característica mais visível é a intensa perda de massa corporal, é uma síndrome presente, sobretudo no estágio final, em associação a doenças crônicas como a insuficiência cardíaca crônica (ICC), a doença renal crônica, a artrite reumatoide e o câncer (EVANS et al., 2008). A etiologia desta síndrome é ainda desconhecida e extremamente complexa, uma vez que não é possível identificar um mecanismo único capaz de promover o seu surgimento em condições tão diversas e com múltiplos sinais e sintomas. Por estas razões, a caquexia permanece sendo precariamente diagnosticada e, raramente tratada de forma eficaz (FEARON et al., 2011; SEELAENDER et al., 2012).

No câncer, a caquexia está presente em aproximadamente 50% dos pacientes e em até 80% dos casos avançados da doença, reduzindo a tolerância ao tratamento, a resposta terapêutica, a qualidade de vida e a sobrevida (KHAN; TISDALE, 1999), sendo a responsável direta pela morte de 20% a até 40% dos pacientes cancerosos (TODOROV et al., 1996). A incidência desta síndrome varia entre os diferentes tipos de câncer, sendo de aproximadamente 80% no câncer pancreático e gastrintestinal e de 60% em pacientes com câncer de pulmão (WATCHORN et al., 2001).

Os sintomas mais característicos da caquexia são a pronunciada e progressiva perda de massa corporal total, a inflamação sistêmica, a perda de massa muscular esquelética que resulta numa drástica redução da qualidade de vida dos pacientes e, frequentemente anorexia (JOHNS et al., 2013). Por essas características, uma definição clara das causas e dos sinais e sintomas precoces da caquexia permanece como um desafio para cientistas e clínicos ao redor do mundo. Neste sentido, um grupo de pesquisadores propôs, em 2011, em consenso internacional, uma definição da síndrome prevendo três estágios em sua progressão (pré-caquexia, caquexia e caquexia refratária). No mesmo consenso, as desordens metabólicas e a inflamação sistêmica (com concentração de proteína C-reativa elevada) foram propostas como características centrais da caquexia (FEARON et al., 2011), sugerindo-se a adoção de critérios publicados anteriormente para o diagnóstico da síndrome (EVANS et al., 2008).

A perda de massa corporal decorre de várias alterações metabólicas. Inicialmente, acreditava-se que a anorexia e o aumento no gasto energético eram os únicos fatores responsáveis pela condição catabólica verificada na caquexia, contudo, a utilização de suplementos nutricionais, por via enteral ou parenteral, tem sistematicamente falhado na tentativa de reversão do quadro. Mais recentemente, sólidas evidências científicas demonstraram que a caquexia está associada à inflamação sistêmica crônica (EVANS et al., 2008). Sob essa perspectiva, os estudos relatam que fatores produzidos pelo tumor e pelo hospedeiro estão intimamente associados à anorexia e às alterações metabólicas, características da síndrome (TISDALE, 2004).

A perda de gordura corporal tem, recentemente, sido relatada como um importante preditor de sobrevida em pacientes com câncer avançado, uma vez que pode preceder a perda de massa muscular (FOULADIUN et al., 2005; MURPHY et al., 2010). Além disso, as alterações ocorridas no tecido adiposo subcutâneo (TASC), incluindo maior infiltração monocitária, estão associadas com a inflamação sistêmica (BATISTA et al., 2013, 2016) e com o comprometimento de vias inflamatórias clássicas de pacientes caquéticos (CAMARGO et al., 2015), correlacionando-se positivamente com mediadores inflamatórios sintetizados pelo tumor destes pacientes (DE MATOS-NETO et al., 2015). Os estudos têm revelado ainda uma interação entre os fatores secretados pelos adipócitos e pelos miócitos, demonstrando uma interação sistêmica entre o tecido adiposo e o musculo esquelético de pacientes caquéticos (JOHNS et al., 2012), embora estes resultados permaneçam inconclusivos.

Em razão da complexidade da caquexia associada ao câncer, os estudos experimentais e ensaios clínicos propondo tratamentos são limitados, embora existam propostas em número crescente nos últimos anos (MOLFINO et al., 2016). Durante muitos anos, as propostas terapêuticas objetivavam tratar apenas o catabolismo proeminente da síndrome. Contudo, após o reconhecimento de que múltiplos componentes são responsáveis pelo desenvolvimento da caquexia e o reconhecimento de que a inflamação sistêmica representa um eixo central desta síndrome (SOLHEIM; LAIRD, 2012; SEELAENDER et al., 2015), emergiu a concepção de que as intervenções para um problema multifatorial devem, mandatoriamente, ter natureza multifatorial.

Neste cenário, o nosso grupo de pesquisa tem continuamente demonstrado, em modelo experimental, que o exercício físico consiste numa estratégia eficaz para redução da inflamação sistêmica e local, sobretudo no tecido adiposo branco (TAB), promovendo alterações de repercussão clínica, como o aumento da sobrevida de animais com tumor (BACURAU et al., 2000; DONATTO et al., 2013; LIRA et al., 2008, 2010, 2011, 2012), podendo representar uma importante ferramenta de baixo custo e ação sistêmica para o tratamento da caquexia associada ao câncer. Contudo, os ensaios clínicos ainda são raros, para que se possa adotar esta estratégia em pacientes caquéticos com segurança na clínica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Caquexia: histórico, definição e epidemiologia

Os relatos mais antigos acerca da perda significativa de massa corporal em doenças como a ICC remontam há mais de 2400 anos, na Grécia antiga, Faculdade de Medicina de Hipócrates (aproximadamente 460-377 a.c.), na ilha de Cós (DOEHNER; ANKER, 2002). Hipócrates teria descrito uma condição em que "a carne é consumida e se torna água...o abdômen se enche de água, os pés e as pernas incham, os ombros, as clavículas, o peito e as coxas derretem...A doença é fatal" (KATZ; KATZ, 1962). Mais tarde, a rainha da Inglaterra, Elizabeth I (1533-1603), descreveria a sua própria condição de saúde com relatos de depressão, alterações na imagem corporal e no paladar e anorexia que a atormentaram em seus últimos dias de vida (BECHER et al., 2007). Nos séculos que se seguiram, a síndrome foi vista como uma complicação séria, implacável e inespecífica de várias doenças como a tuberculose ou o câncer (DOEHNER; ANKER, 2002). No século XIX, por exemplo, descreveu-se uma condição entre os escravos africanos das Américas que se queixaram de fortes dores de estomago e dificuldade para respirar, náuseas, diarreia, depressão e apatia que findava em morte em 2 a 3 meses, como a caquexia Africana (RENÉ et al., 1992).

A origem do termo caquexia é grega, derivada das palavras *kakós* (má) e *hexis* (condição ou aparência), significando, literalmente, má condição (DOEHNER; ANKER, 2002). Não está muito claro, contudo, quem sugeriu a utilização do termo caquexia no contexto de doenças crônicas, tal como o conhecemos atualmente; mas a primeira documentação escrita a respeito da caquexia associada ao câncer é atribuída ao médico inglês John Zachariah Laurence, em 1858, que relatou que os pacientes apresentavam sudorese excessiva, desarranjos dos órgãos digestórios e palidez típicos da caquexia cancerosa (KATZ; KATZ, 1962). Ele, contudo, não foi o único a reconhecer a importância da perda de massa corporal para a vida. Herta Müller, ganhadora do prêmio Nobel de literatura em 2009, escreveu que "quando a carne desaparece do corpo, os ossos tornam-se uma carga que nos puxa para dentro da terra" (MÜLLER, 2011). Esses relatos se seguiram com o reconhecimento de que o surgimento da caquexia varia de acordo com a patologia e que, no câncer, é dependente do tipo e da localização do tumoral (KATZ; KATZ, 1962).

A caquexia é, portanto, frequentemente, o desfecho final do câncer e de muitas outras doenças crônicas e, apesar de descrita há tantos anos, permanece como um dos maiores desafios tanto na pesquisa experimental quanto na clínica, uma vez que persiste subdiagnosticada e, portanto, raramente tratada (LOK, 2015). Apenas no século atual surgiram as primeiras proposições que apontaram para uma interpretação mais consensual a respeito da síndrome, uma vez que a ausência de uma definição, aceita tanto por médicos quanto por pesquisadores, restringe a identificação e o tratamento de pacientes caquéticos, assim como o desenvolvimento e a aprovação de eventuais agentes terapêuticos (EVANS et al., 2008; FEARON et al., 2011).

Nestas proposições, a perda de massa corporal, o índice de massa corporal (IMC) e, especificamente, os níveis de massa muscular constituem a base da definição mais recente, acrescida de dados acerca de anorexia ou redução na ingestão alimentar, componente catabólico, força muscular assim como a condição física, social e psicológica (FEARON et al., 2011). Atualmente, considera-se que a caquexia é um processo contínuo, que pode ser classificado em estágios: pré-caquexia, caquexia e caquexia refratária, conforme proposto pelo Consenso Brasileiro de Caquexia/Anorexia (PALIATIVOS, 2011, **figura 1**). Assim, a caquexia é definida como uma síndrome multifatorial e multiorgão, caracterizada por uma perda contínua de massa muscular esquelética (com ou sem perda de massa gordurosa) que não pode ser completamente revertida pelas intervenções nutricionais convencionais, levando a um comprometimento funcional progressivo (ARGILÉS et al., 2015; FEARON et al., 2011).

Normal	Pré- caquexia	Caquexia	Caquexia Refratária	Morte
	 Perda de peso corporal <5%; Anorexia e alterações metabólicas. 	 Perda de peso corporal >5% ou IMC <20 e perda de peso >2% ou sarcopenia e perda de peso >2%; Redução da ingestão alimentar/inflama- ção sistêmica. 	 Catabolismo; Não responsivo ao tratamento anticâncer; Baixo escore de desempenho; Expectativa de vida <3 meses. 	

Figura 1 - Estágios da Caquexia (adaptado de Fearon et al., 2011). IMC: Índice de Massa Corporal.

Embora o Consenso Internacional de 2011 tenha enfatizado a perda de massa muscular associada à deterioração funcional, a definição de caquexia associada ao câncer é similar a uma designação genérica da síndrome, proposta anteriormente por Evans et al., (2008), na qual se estabelece critérios para o diagnóstico da condição em adultos, em que a perda de massa corporal é o sintoma indispensável para o diagnóstico e, pelo menos, a presença de mais 3 de 5 critérios (**Figura 2**).



Figura 2 - Critérios para o Diagnóstico da Caquexia (adaptado de Evans et al., 2008). IMC: Índice de Massa Corporal; PCR: Proteína C-Reativa; IL-6: Interleucina 6; Hb: Hemoglobina

Devido às dificuldades na definição e no diagnóstico da caquexia, é árduo avaliar precisamente a sua prevalência, mas estima-se que seja de aproximadamente 9 milhões de pessoas no mundo (ANKER; VON HAEHLING, 2014), afetando cerca de 5-15% em pacientes terminais com ICC, além de estar presente nas fases finais de doenças como a artrite reumatoide, a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), a doença renal crônica e, particularmente, em associação ao câncer (VON HAEHLING; ANKER, 2014). Arthur et al., (2014) estimaram uma prevalência de caquexia superior a 160.000 casos/ano de admissões hospitalares em hospitais comunitários os Estados Unidos da América. Segundo os autores, o tempo médio de internação foi o dobro dos pacientes não caquéticos, com um custo médio de mais de 10.000 dólares em relação aos pacientes sem caquexia, implicando maior sobrecarga nos sistemas de saúde. Nos países asiáticos a incidência de caquexia é menor, embora crescente (FARKAS et al., 2013). Já os dados referentes à prevalência de caquexia na África e na América do Sul são extremamente escassos, embora o período de transição epidemiológica por que passam essas regiões permitam inferir que a caquexia também seja um problema médico frequente (VON HAEHLING; ANKER, 2014).

Esta síndrome está presente em aproximadamente 50% dos pacientes com câncer e em até 80%, nos casos avançados da doença, estando associada com a redução na tolerância ao tratamento do câncer, prejuízo da qualidade de vida e redução da sobrevida, representando a causa imediata de morte dos pacientes quando a perda de peso excede 30% a 40% da massa corporal (ARGILES et al., 2014; ARTHUR et al., 2014; SEELAENDER et al., 2012), e sua incidência varia entre os diferentes tipos de câncer, sendo de cerca de 80% em pacientes com câncer pancreático e gastrointestinal e de 60% em pacientes com câncer de pulmão (WATCHORN et al., 2001).

2.2 Fisiopatologia da caquexia associada ao câncer

A perda de massa corporal é o principal sinal da caquexia e os mecanismos que levam a essa perda são múltiplos, destacando-se a ingestão inadequada de nutrientes (combinada com aumento do gasto energético), desbalanço entre anabolismo e catabolismo proteico, acentuada diminuição da aptidão física, disfunção metabólica relacionada à interação competitiva tumor/hospedeiro, bem como uma resposta inflamatória sistêmica patológica (CRAWFORD, 2016). Ambos, tumor e hospedeiro, cooperam por uma via

complexa e sofisticada com o microambiente tumoral para sustentar o crescimento tumoral e a caquexia (CAHLIN et al., 2000). Os dados científicos acumulados até aqui permitem inferir que a inflamação sistêmica persistente e de baixa intensidade observada em pacientes caquéticos é um componente central desta síndrome com interface para todas as outras alterações da caquexia (LAVIANO et al., 2015; SEELAENDER et al., 2015; WANG; YE, 2015). O aumento nas concentrações circulantes de citocinas, característica da condição inflamatória, induz alterações no sistema nervoso central (SNC), no intestino, no músculo, no fígado, no pâncreas, no tecido adiposo e no próprio tumor, estabelecendo um ciclo multiorgão vicioso e acentuando o catabolismo na caquexia (ARGILÉS et al., 2015; DE MATOS-NETO et al., 2015; LAVIANO et al., 2015; WANG; YE, 2015), conforme mostrado na **figura 3**.



Figura 3 - Principais órgãos/tecidos afetados durante a progressão da caquexia (adaptado de Porporato, 2016)

Estudo recente em modelo animal destaca este aspecto multifatorial da síndrome, mostrando que uma combinação de citocinas e mediadores prócaquéticos atuam em conjunto para provocar o fenótipo característico da caquexia (FRAJACOMO et al., 2016). Embora seja difícil estabelecer de maneira alterações simplista uma ligação entre as nas concentrações de citocinas/adipocinas e o desenvolvimento da caquexia, evidências científicas robustas, tanto em modelo animal quanto em humanos, sustentam o papel destes fatores inflamatórios na disfunção metabólica observada na síndrome (BATISTA et al., 2012; CAMARGO et al., 2015; FEARON et al., 2012; NEVES et al., 2016; ZIMMERS et al., 2016). Recentemente, nós verificamos uma correlação positiva entre os fatores secretados pelo tumor e pelo tecido adiposo branco (TAB) de pacientes caquéticos com marcada inflamação local e sistêmica (DE MATOS-NETO et al., 2015).

O nosso grupo de pesquisa em metabolismo e câncer, liderado pela Dra. Seelaender, tem continuamente investigado a biologia e fisiologia do TAB na vigência da caquexia associada ao câncer, tanto em modelos experimentais quanto em humanos, e proposto que o TAB é um órgão intensamente afetado, mas também um importante contribuinte para a inflamação tanto local quanto sistêmica, observadas na síndrome (BATISTA et al., 2013; BERTEVELLO; CAMARGO et al., 2015; DE MATOS-NETO et al., 2015; LIRA et al., 2012; MACHADO et al., 2004; NEVES et al., 2016; SEELAENDER, 2001). Estes estudos têm demonstrado que as alterações no TAB são heterogêneas em relação à localização anatômica do depósito e afetam precocemente as funções dos diversos tipos celulares do tecido (BATISTA et al., 2012; NEVES et al., 2016). A perda progressiva de tecido adiposo, que pode chegar a uma redução de até 85% em pacientes com câncer de pulmão, por exemplo, pode levar à hiperlipidemia e à resistência à ação da insulina, bem como dificultar a resposta terapêutica (BING et al., 2000). A descoberta de fatores secretados pelo TAB, as adipocinas, que detêm ação autócrina, parácrina e endócrina (FONSECA-ALANIZ et al., 2007) e constatação de que a biologia dos adipócitos afeta fortemente a composição corporal (ORCI et al., 2004), conferiram a este tecido uma grande relevância no controle metabólico, de forma que é considerado atualmente o maior órgão endócrino do organismo (BOOTH et al., 2016).

O TAB é caracterizado por uma distribuição descontínua no corpo, distribuindo-se em depósitos viscerais e subcutâneos que estão sob um refinado controle neural e hormonal anatômico-específico. Além desta heterogeneidade na localização anatômica, o TAB é composto por adipócitos maduros e por células da fração vascular estromal (FVE) que inclui pré-adipócitos, fibroblastos, células endoteliais e células-tronco multipotentes (SETHI; VIDAL-PUIG, 2007), além de células do sistema imunitário (TRINCHIERI, 2011). Nos estudos em que a FVE foi separada dos adipócitos maduros, foi possível demonstrar que as células da FVE também secretam adipocinas e que, portanto, os adipócitos não são os únicos responsáveis por esta secreção e, ainda, que existem diferenças tanto no tipo e na quantidade de moléculas secretadas por cada componente do tecido, bem como entre os depósitos visceral e subcutâneo (PEINADO et al., 2010).

Em condições patológicas, como a obesidade, está bem estabelecido que a função secretora do TAB é potencializada a partir da infiltração de macrófagos (Mφ) (ITOH et al., 2011). Estudos recentes demonstraram que o TAB de indivíduos obesos é caracterizado por hipertrofia dos adipócitos, seguido de aumento da angiogênese, infiltração de células imunitárias, superprodução da matriz extracelular e, portanto, aumento da produção de adipocinas próinflamatórias durante a progressão da inflamação crônica levando a um remodelamento deste tecido (SUGANAMI; OGAWA, 2010; SUGANAMI et al., 2012). Faber et al., (2009) verificaram alteração precoce na função imunitária de camundongos caquéticos, sugerindo que uma redução na imunocompetência poderia indicar um estado de pré-caquexia.

Evidências científicas sugerem ainda um papel das células supressoras de origem mielóide na imunossupressão (MDSC, do inglês Myeloid-Derived Suppressor Cells) observada em pacientes oncológicos (KUSMARTSEV et al., 2003; NAGARAj; GABRILOVICH, 2007). Winfield et al., (2008) propuseram que essas células também podem desempenhar um papel crítico na síntese desregulada de citocinas e outros mediadores inflamatórios que contribui para a caquexia. Cuenca et al., (2014) observaram uma expansão de MDSC no microambiente tumoral em camundongos caquéticos que apresentavam profunda perda de adiposidade, aumento no consumo de oxigênio, resposta de

30

fase aguda hepática aumentada e uma maior suscetibilidade a infecções. Nakamura et al., (2012) encontraram envolvimento de MDSC circulantes na inflamação sistêmica de pacientes com tumor no sistema digestório, indicando possível envolvimento na patogênese da caquexia. Entretanto, esses estudos não avaliaram a presença de MDSC em tecidos periféricos como o TAB, por exemplo.

Os estudos conduzidos no nosso laboratório têm constatado infiltração monocitária no TAB de ratos portadores de tumor, cujos componentes são capazes de secreção de fatores inflamatórios como a prostaglandina (PG)E2 e o fator de necrose tumoral (TNF)- α , potencialmente relacionados ao agravamento da caquexia e depleção dos depósitos de gordura (MACHADO et al., 2004). Os pacientes caquéticos também demonstram expressão extremamente aumentada de TNF- α e de interleucina (IL)-6 no TASC (CAMARGO et al., 2015), embora os dados a respeito do papel do TNF- α na perda de massa corporal na vigência da caquexia permaneçam controversos (EBADI; MAZURAK, 2014). Além disso, a mensuração das concentrações sanguíneas de TNF- α constitui um desafio técnico devido à meia-vida curta e à natureza transitória da proteína, somada à sensibilidade variável dos ensaios utilizados, limitando a comparação entre os diversos estudos (DAS; HOEFLER, 2013).

Os estudos mais recentes têm revelado que as alterações metabólicas associadas às mudanças na composição corporal, como aquelas presentes na obesidade, por exemplo, e a inatividade física, promovem distúrbios nos depósitos de tecido adiposo e muscular esquelético, causando resistência à ação da insulina e secreção anormal de adipocinas e citocinas (DALAMAGA et al., 2012; HOJMAN et al., 2011; QUINN et al., 2009). Portanto, a comunicação entre estes tecidos desempenha um papel crítico em condições patológicas caracterizadas por inflamação sistêmica crônica de baixa intensidade (DALAMAGA, 2013). Assim, a interação entre o TAB e o músculo esquelético que ocorre através das adipocinas, miocinas e ácidos graxos é um campo de investigação estimulante com possíveis implicações terapêuticas (FEARON, 2011; JOHNS et al., 2013; LELBACH et al., 2007), dado que a perda de massa muscular tem sido exaustivamente estudada como consequência da caquexia,

mas a síntese de moléculas biologicamente ativas por esse tecido e a sua interação como outros tecidos/órgãos permanece pouco elucidada (JOHNS et al., 2012).

2.3 Exercício físico como estratégia terapêutica na caquexia associada ao câncer

Paralelamente às dificuldades para o diagnóstico preciso, o tratamento efetivo da caquexia tem sido objeto de intensa investigação por pesquisadores e clínicos ao redor do mundo (LAVIANO et al., 2015). As propostas de intervenção farmacológica e/ou nutricional repetidamente frustram as expectativas nas intervenções clinicas (ARGILÉS et al., 2010), uma vez que o tratamento com drogas não reverte completamente o quadro (FEARON et al., 2013; PENNA et al., 2010) e as estratégias de suplementação alimentar revelam efeitos parciais (PETRUZZELLI; WAGNER, 2016) e, por vezes, contraditórios (MURPHY et al., 2016). Assim, até o momento, orientações práticas para a prevenção e tratamento da perda de massa corporal na caquexia associada ao câncer são escassas, principalmente em razão da patogênese multifatorial da síndrome (BODDAERT et al., 2006; TAZI; ERRIHANI, 2010).

Entre as abordagens não farmacológicas, o treinamento físico aeróbio, em particular, tem sido proposto como uma ferramenta adequada, uma vez que exerce ação anti-inflamatória sistêmica (AL-MAJID; WATERS, 2008; TRINCHIERI, 2011). Além disso, o TF aeróbio induz aumento na secreção de adipocinas anti-inflamatórias no TAB de ratos, exercendo importante modulação neste tecido que resulta numa ação anti-inflamatória sistêmica (LIRA et al., 2009). Contudo, apesar do enorme potencial do TF aeróbio para atenuar a caquexia e promover ganhos reais em termos de qualidade de vida e sobrevivência, poucos estudos examinaram os efeitos globais desta estratégia de baixo custo econômico sobre a síndrome (SILVERIO et al., 2012). Ao combinar os termos "exercise training" e "cachexia" encontramos 112 artigos na plataforma de dados PubMed. Quando limitamos a busca para "cancer caquexia", verificamos apenas 53 publicações, sendo que metade deles são revisões. Recentemente, Grande et al., (2014) realizaram uma extensa revisão

da literatura científica como o objetivo de determinar os efeitos do exercício físico sobre a massa corporal magra e concluíram que as evidências são insuficientes para determinar a segurança e efetividade deste em pacientes caquéticos adultos, indicando a necessidade de ensaios clínicos para testar a efetividade do TF em pacientes caquéticos.

Estudos realizados no laboratório da Dra Seelaender revelaram outro aspecto de grande relevância clínica: Os animais submetidos a um programa de TF aeróbio de intensidade moderada (60% VO_{2máx}) apresentaram redução no peso do tumor, além de redução de parâmetros inflamatórios sistêmicos e em tecidos específicos (BACURAU et al., 2000; LIRA et al., 2010, 2011), com nítida atenuação da caquexia. Mais recentemente, verificou-se que houve redução de Mφ infiltrados no TAB dos animais caquéticos submetidos ao TF (LIRA et al., 2012). Contudo, é importante ressaltar que, ao abordar os efeitos do TF sobre os sintomas da caquexia, os modelos animais podem não representar com exatidão o que ocorre em pacientes caquéticos, uma vez que a extensão desta síndrome difere entre roedores e humanos.

Portanto, pesquisas sobre os efeitos do TF na prevenção e reabilitação da caquexia associada ao câncer e da atividade física na função imunitária ainda estão em seu início. No entanto, acreditamos que esta constitui uma das áreas de pesquisa mais promissoras em medicina translacional nas próximas décadas. Neste sentido, apesar de alguns mecanismos intracelulares no TAB estarem relativamente bem estabelecidos em modelos experimentais de caquexia associada ao câncer, os estudos com seres humanos suscitam algumas questões: os pacientes caquéticos portadores de tumor gastrointestinal apresentam inflamação sistêmica e localizada com maior infiltração de células imunitárias no TAB? Se sim, há correlação entre estes fatores inflamatórios sintetizados pelas células imunitárias e os adipócitos com o musculo esquelético, contribuindo para um processo inflamatório ainda mais severo? O TF crônico é capaz de reduzir a inflamação sistêmica e tecidual, interferindo com o tipo e a quantidade do infiltrado imunitário e/ou com a regulação dos mesmos?

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente estudo investigou o processo inflamatório sistêmico e no tecido adiposo e testou a hipótese de atenuação da inflamação pelo TF crônico em pacientes com caquexia associada ao câncer e controles.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos da caquexia associada ao câncer sobre os fatores inflamatórios sistêmicos e teciduais;
- Caracterizar e quantificar as células inflamatórias infiltradas no TAB subcutâneo de pacientes caquéticos;
- Investigar a factibilidade da estratégia de treinamento físico em pacientes com câncer caquéticos;
- Testar a hipótese de que, assim como no modelo experimental, o TF reduz a infiltração de células imunitárias e recupera a morfologia e o grau de diferenciação de adipócitos, reduzindo a inflamação local e sistêmica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Casuística

Para a realização objetiva do diagnóstico dos pacientes, utilizamos uma planilha de Excel[®] (Office 2013) desenvolvida pelo colega de doutorado Rodolfo Gonzalez Camargo, a partir dos critérios descritos abaixo (**ANEXO A**). Para a aferição da força muscular, da fadiga e da anorexia, utilizamos escores funcionais e sintomáticos, avaliados a partir de um questionário de qualidade de vida (QLQ-C30, **ANEXO B**). Após a utilização desta ferramenta, os pacientes foram distribuídos nos seguintes grupos:

- a) Control SED (grupo de voluntários sedentários submetidos a procedimento cirúrgico de herniorrafia, n= 15);
- b) Control TR (grupo de voluntários submetidos ao protocolo de treinamento físico e a procedimento cirúrgico de herniorrafia, n= 12);
- c) WSC SED (grupo de voluntários sedentários portadores de tumor gastrintestinal sem caquexia, submetidos a procedimento cirúrgico para retirada do tumor, n = 15);
- d) WSC TR (grupo de voluntários portadores de tumor gastrintestinal sem caquexia, submetidos ao protocolo de treinamento físico e a procedimento cirúrgico para retirada do tumor, n = 12);
- e) CC SED (grupo de voluntários sedentários portadores de tumor gastrintestinal com caquexia submetidos a procedimento cirúrgico para retirada do tumor, n = 15);
- f) CC TR (grupo de voluntários sedentários portadores de tumor gastrintestinal com caquexia, submetidos ao protocolo de treinamento físico e a procedimento cirúrgico para retirada do tumor, n = 9).

Os voluntários foram convidados para participar da pesquisa por médicos especialistas da Clínica Médica Cirúrgica do Hospital Universitário (HU) da Universidade de São Paulo (USP) e Departamento de Coloproctologia da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de São Paulo. Para inclusão dos sujeitos na pesquisa utilizamos os seguintes critérios: a) ambos os sexos; b) idade entre 18 e 100 anos; c) diagnóstico de câncer no sistema gastrintestinal com indicação
cirúrgica, ou pacientes com indicação cirúrgica para hérnia umbilical ou inguinal; d) ausência de qualquer tratamento anticâncer ou anti-inflamatório contínuo.

Além disso, adotamos os seguintes critérios de exclusão: falência hepática ou renal, DPOC, síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), doenças inflamatórias do intestino ou doenças autoimunes.

O diagnóstico dos pacientes foi realizado pelo médico responsável através de exames clínicos, laboratoriais, endoscópicos e/ou de imagens. Durante o período de realização dos exames e após aceite do convite, um grupo de pacientes foi submetido ao protocolo de treinamento físico (sempre antes da realização do procedimento cirúrgico). Os tumores foram classificados após diagnóstico clínico-patológico, utilizando o sistema de estadiamento convencional (EDGE; COMPTON, 2010).

A partir destes critérios, foram convidados 497 pacientes para o estudo, dos quais utilizamos para este estudo 78, (**Figura 4**), de ambos os sexos, com idade entre 32 e 79 anos, que realizaram cirurgia no HU/USP ou na Santa Casa/SP durante o período de abril de 2012 a junho de 2016.



Figura 4 - Representação esquemática das etapas de seleção dos voluntários já incluídos no projeto.

4.2 Diagnóstico de caquexia

Para o diagnóstico de caquexia foram adotados os parâmetros propostos por Evans et al. (2008):

- ✓ Variação na massa corporal diminuição involuntária nos últimos 6 meses (maior ou igual a 5% da massa corporal inicial). A massa corporal foi determinada utilizando uma balança de precisão (Filizola Scale model PL 200) ou Índice de Massa Corporal (IMC) menor que 20 kg.m² para pacientes com menos de 65 anos e menor que 22 kg.m² para pacientes com idade maior ou igual a 65 anos e mais pelo menos três dos seguintes critérios:
 - Diminuição da força muscular;
 - Fadiga;
 - o Anorexia;
 - Baixo índice de massa corporal livre de gordura;
 - Parâmetros bioquímicos alterados:
 - Marcadores inflamatórios aumentados (proteína C-Reativa > 5 mg/L, IL-6 > 4 pg/mL);
 - Anemia (Hb < 12 g/dL);
 - Hipoalbuminemia (< 3,2 g/dL).

4.3 Aprovação ética

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (CEP-HU/USP: 70355/12), pela Comissão de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEP ICB/USP: 1046/12) e pela Comissão de Ética da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (CEP Santa Casa: 1.428.342/16), de acordo com os princípios da Declaração de Helsinki (2013) e registrado na plataforma virtual ReBEC (Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos, nº UTN: U1111-1140-7773). Todos os participantes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE – **ANEXO C**) antes de se envolver no estudo.

4.4 Coleta de amostras durante o procedimento cirúrgico

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Centro Cirúrgico do HU/SP e no Centro Cirúrgico da Irmandade Santa Casa de Misericórdia/SP. Os pacientes se mantiveram deitados em uma mesa cirúrgica, com monitoração cardíaca e ventilatória; após banho, com antisséptico tópico na enfermaria e após a anestesia, a pele foi submetida a assepsia e antissepsia cirúrgicas. O médico anestesiologista aplicou anestesia geral ou peridural, sempre individualizada para cada caso. A incisão na pele foi realizada com lâmina de bisturi estéril descartável e a retirada do tecido adiposo foi realizada com o auxílio de pinça e lamina cirúrgicas, pelo médico cirurgião responsável pelo procedimento cirúrgico.

Entre os procedimentos cirúrgicos utilizados na coleta das amostras, realizou-se: herniorrafia, videolaparoscopia, gastrectomia parcial ou total, colectomia parcial ou total, laparotomia exploratória.

4.5 Análise da composição corporal

A composição corporal foi analisada por absorciometria de raios-X de dupla energia (DEXA), que é considerado o padrão-ouro para avaliação da densitometria óssea (conteúdo mineral ósseo) e também é utilizada para analisar a composição corporal (massa gorda e massa magra). Essa técnica baseia-se no princípio da atenuação da radiação, por exemplo, quando uma fonte de raios X incide sobre um corpo/objeto, ela perde gradualmente sua intensidade (é absorvida ou dispersada). Essa perda está relacionada com a espessura, densidade e composição química do corpo/objeto em questão. A diferença de atenuação é específica para cada tipo de tecido e o DEXA estima o valor de R (razão entre os coeficientes de atenuação para dois níveis de energia diferentes – 40 e 70 KeV). Utilizamos o equipamento Lunar DPX GE (General Electric do Brasil Ltda) que foi sempre calibrado antes da medição, seguindo as especificações do fabricante. O scanner utiliza a tecnologia pencil-beam (feixe lápis), que realiza a varredura do corpo inteiro. O paciente é deitado sobre a

mesa em posição supina e o feixe realiza a varredura no sentido craniocaudal (ELLIS, 2000).

4.6 Coleta de Sangue

Foram coletados aproximadamente 10 mL de sangue, sempre antes da cirúrgia, por profissional habilitado, em dois tubos separados: um tubo cotendo anticoagulante (tubo BD Vacutainer[®] EDTA) para a separação de plasma sanguíneo; e um tubo seco (tubo BD Vacutainer[®] SST[®] II Advance[®]) para a obtenção de soro, conforme descrito a seguir:

- a) Pacientes sedentários a coleta foi realizada no dia anterior à cirurgia na Clínica Cirúrgica do HU/USP e da Irmandade Santa Casa de Misericórdia/SP;
- b) Pacientes treinados as coletas foram realizadas em sala apropriada do HU/SP em três momentos distintos: *baseline* (antes do início do protocolo de treino), semana 3 e semana 6. Nestes 3 momentos, realizou-se 2 coletas, uma com o paciente em repouso (pré sessão) e outra, logo após a sessão de exercício físico.

Após coletado, o sangue foi centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Logo após, o plasma e o soro foram acondicionados em microtubos plásticos e estocados a -80 °C para análise posterior.

4.7 Biopsia e processamento de tecido adiposo subcutâneo e músculo esquelético reto abdominal

Durante a cirurgia foi coletado aproximadamente 1 g de tecido adiposo branco subcutâneo (TASC), sempre em região superior ao umbigo e nunca adjacente ao tumor e aproximadamente 500 mg de musculo esquelético reto abdominal (apenas dos pacientes oncológicos), com tempo de coleta sempre inferior a 5 minutos. Imediatamente após a coleta, e ainda na sala de cirurgia, os tecidos foram fragmentados com pinça e tesoura estéreis e os fragmentos acondicionados em microtubos e rapidamente congelados em gelo seco e, posteriormente estocados a -80 °C ou em frascos contendo paraformoldeído 4%; fragmentos do TASC foram também acondicionados em tubo Falcon de 50mL contendo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), para posterior processamento.

Este procedimento gera um grau mínimo de risco para o paciente, não interferindo no procedimento cirúrgico padrão.

4.8 Protocolo de Treinamento Físico (TF)

Após aferição das condições gerais de saúde pela equipe médica do HU/USP e da Irmandade Santa Casa de Misericórdia/SP e constatada a capacidade para a realização do protocolo, os pacientes realizaram o TF, que consistiu de 6 semanas de caminhada em esteira ergométrica programável (Movement RT 350) com volume crescente e intensidade individualizada (70% a 80% da frequência cardíaca máxima), determinada a partir de um teste submáximo (*Rockport One Mile Walk*; KLINE et al., 1987) para estimar o VO_{2máx} dos voluntários; o teste foi realizado no *baselin*e, semana 3 e semana 6 e consistiu de uma caminhada de 1 milha, sem trote ou corrida, sempre sob a supervisão de um profissional habilitado e monitoramento da frequência cardíaca (**Figura 5**). O protocolo de TF foi adaptado a partir daquele adotado por (Dimeo et al., 1997) para pacientes com câncer (**Tabela 1**) e realizado sempre nas dependências do hospital, com acesso imediato às medidas de primeiros socorros.



Figura 5 - Desenho experimental do protocolo de treinamento físico.

Semanas	Tempos	Intervalos
Baseline	Adaptação Teste de esforço submáximo	
Semana 1	5 sessões de 3 minutos	1 minuto entre as sessões
Semana 2	4 sessões de 5 minutos	1 minuto entre as sessões
Semana 3	3 sessões de 8 minutos	1 minuto entre as sessões
Semana 4	3 sessões de 10 minutos	1 minuto entre as sessões
Semana 5	2 sessões de 15 minutos	1 minuto entre as sessões
Semana 6	1 sessão de 30 minutos	

Tabela 1 - Protocolo de treinamento físico.

4.9 Análises

4.9.1 Análise histológica

Os fragmentos de tecido adiposo subcutâneo (TASC) obtidos foram colocados em solução fixadora de paraformaldeído 4% (p/v) em tampão fosfato, pH 7.4, em que permaneceram submersos por 24 horas, e após, os fragmentos foram passados para o álcool 70%, e então submetidos ao processamento: primeiramente foram desidratados com concentração crescente de álcool, diafinizados com banhos de xilol e incluídos em paraplast (Paraplast X-TRA, Sigma-Aldrich do Brasil Ltda). Após a inclusão, os fragmentos foram colocados em *Tissue Cassete* (Fischer Scientific) e seccionados em micrótomo rotatório (R Jung AG Heidelberg). Os cortes de 5 µm foram estendidos sobre lâminas, previamente limpas em água e cobertas com polilisina.

Em seguida o material foi desparafinizado, hidratado e corado por aproximadamente 5 minutos com corante hematoxilina, seguido de lavagens com água destilada por 5 minutos e, 2,5 minutos, no corante eosina. Os cortes passaram rapidamente pelo álcool absoluto, e então, permaneceram por 5 minutos em solução de etanol a 95%, 70%, respectivamente, e por último, receberam banhos com xilol (3 x 5 minutos). E as lâminas montadas em *Permount* (Tuluene Solution, Fischer Scientific).

A análise preliminar da morfologia das células, a partir dos cortes histológicos foi realizada nas imagens digitalizadas em aumento de 10 x e 40 x, obtidas utilizando-se de um microscópio de luz (Leica, modelo DMLP) com câmera acoplada (Axio Cam HRC) e software Axio Vision Rel 4.8. O perímetro e a área seccional foram medidos em 100 adipócitos (3 cortes para cada amostra) e a análise de dados realizadas através do programa Image Pro[®] Plus (Media Cybernetics), para processamento de imagem digital.

4.9.2 Análises bioquímicas

A concentração sérica de glicose, lactato, triacilglicerol (TAG), lipoproteína de alta densidade (HDLc), de baixa densidade (LDLc), colesterol total, albumina, proteína C-Reativa, e a concentração no sangue total de hemoglobina foram quantificadas utilizando-se kits comerciais (Glicose HK liquiform, Triglicérides liquiform, HDL, LDL liquiform, Lactato, Albumina, PCR Ultra Turbiquest Plus, Hemoglobina – Labtest diagnóstica) no equipamento automatizado LabMax 240 (Labtest diagnóstica). Estes ensaios foram realizados no laboratório da Professora Dr. Sílvia Cozzolino, sob a supervisão dos técnicos José Alexandre Pimentel e Ivanir Santana de Oliveira Pires, no departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF/USP).

4.9.3 Análise da expressão gênica

Extração do RNA total - o RNA total do TASC foi extraído a partir de alíquotas de 300 mg de tecido, utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen™), seguindo recomendações do fabricante. As concentrações do RNA foram determinadas medindo-se a absorbância em comprimento de onda equivalente a 260nm/280nm em espectrofotômetro Synergy H1 Multi-Mode Reader (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). O RNA total extraído do TASC foi armazenado a -80 °C para posterior análise por RT-qPCR com Deoxiribonuclease I, DNAse altamente purificada, para a remoção de DNA genômico.

Reação de transcrição reversa (RT) e RT- qPCR - as amostras de RNA total foram transcritas para DNA complementar (cDNA) em termociclador (Veriti®). Para a síntese do cDNA foram utilizados na reação 2 µg de RNA total de cada amostra com *Randon primer*, utilizando *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* (Invitrogen no. 4375575) num volume final de 20 µl. A transcrição reversa foi efetuada em um ciclo único, cujas etapas foram: i) 10 minutos a 25 °C; ii) 120 minutos a 37 °C; iii) 5 segundos a 85 °C; e iv) termina a 4 °C. A amostra de cDNA obtida foi estocada a -20 °C, até a realização do experimento. Para a reação em cadeia de polimerase em tempo real (qPCR-RT), técnica usada para estimar as concentrações de RNA mensageiro nos genes de interesse, comparamos as amostras e o controle interno (Rpl19 e Rpl27) em duplicatas, baseando-os na detecção em tempo real de produtos do PCR medidos por fluorescência, quantificando-os com o detector de sequência ABI Prism 7300 (Applied Biosystems), como na metodologia previamente descrita por (BUSTIN, 2000).

A reação ocorreu em condições de ciclagem pré-determinadas, sendo duas etapas, primeira de 50 °C por 2 minutos e 95 °C por 10 minutos e segunda com a amplificação que ocorre em 40 ciclos: a desnaturação a 95 °C por 15 segundos e o anelamento a 63 °C por 60 segundos, com extensão a 72 °C por 2 minutos. Os *primers* foram desenhados com base no banco de dados Genbank (**Tabela 2**). As concentrações de *primers* (200-800 nM) e amostra (50 ng de cDNA) foram padronizadas previamente.

Gene (espécie)	Sequência (5'3')		
PPI 27 (homo sonions)	Fw: CCGAAATGGGCAAGTTCAT		
RPL2/ (nomo sapiens)	Rev: CCATCATCAATGTTCTTCACGA		
Leptina (homo sapiens)	Fw: GGC TTT GGC CCT ATC TTT TC		

|--|

	Rev: TTG TCT TGA TGA GGG TTT TGG
II 10 (homo conione)	Fw: AGC CAA TCT TCA TTG CTC AAG T
IL-IB (nomo sapiens)	Rev: AGT CAT CCT CAT TGC CAC TGT
II. 6 (home conione)	Fw: CAG CCC TGA GAA AGG AGA CAT
IL-6 (nomo sapiens)	Rev: AGC CAT CTT TGG AAG GTT CA
II 10 (home coniene)	Fw: TGT CAT CGA TTT CTT CCC TGT
IL-10 (nomo sapiens)	Rev: TGC CTT TCT CTT GGA GCT TAT T
CCI 2 (home conjone)	Fw: TCA GCC AGA TGC AAT CAA TG
CCLZ (IIUIIIU Sapieris)	Rev: ACA CTT GCT GGT GAT TCT

IL-1: interleucina; CCL2: proteína quimioatraente de monócitos; Fw: Forward; Rev: reverse

4.9.4 Determinação da expressão proteica por Luminex[®] 4.9.4.1 <u>Extração de proteínas teciduais e guantificação</u>

As amostras de TASC e de músculo esquelético reto abdominal foram mantidas em freezer -80 °C até o momento da extração de proteínas. Aproximadamente 300 mg de TASC e 150 de músculo foram homogeneizados em 1 mL de tampão para lise e extração de proteínas contendo TRIS BASE 50 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Triton x-100 1%. O tampão foi mantido sempre no gelo e no momento do uso acrescentamos inibidor de proteases (cOmplete™ ULTRA Tablets, Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich, 1 tablete para cada 10 mL de tampão). Para a homogeneização, utilizamos homogeneizador elétrico tipo *Polytron* (Uniscience do Brasil) na velocidade máxima, por cerca 90 segundos. A velocidade elevada foi utilizada para dissociar e romper as células. Entre a homogeneização de diferentes amostras, o homogeneizador foi lavado em álcool 70% e água ultrapura. Durante todo o processo de homogeneização, os tubos contendo as amostras foram mantidos no gelo, no intuito de reduzir a atividade de enzimas proteolíticas.

Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 14.000 rpm e temperatura de -4 °C. Após a centrifugação, a amostra apresentou três camadas distintas. A camada intermediária (proteínas extraídas) foi coletada

delicadamente, com o auxílio de seringa e agulha, transferida para outro microtubo (1,5 mL) e armazenada em freezer -80 °C. Quando a amostra de proteína extraída estava com aparência turva, o processo de centrifugação foi repetido.

A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford (Bradford Protein Assay, Bio-Rad Laboratories), que consiste na interação entre o corante *Coomassie brilliant blue* (G-250) e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm (BRADFORD, 1976). A leitura foi feita em placa de 96 poços no espectrofotômetro Synergy H1 Multi-Mode Reader (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

4.9.4.2 Protocolo do ensaio Luminex®

O protocolo consistiu da incubação das amostras de plasma e de proteínas extraídas do TASC e do músculo esquelético reto abdominal, com a mistura de microesferas MagPlex[®] revestidas com diferentes anticorpos (HCYTMAG-60K-PX30, tabela 3) por 2 horas; detecção dos antígenos-alvo ligados às microesferas com uma mistura de anticorpos de captura biotinilados e incubação por 1 hora; seguido de incubação com estreptavidina marcada com ficoeritrina por 30 minutos; todas as incubações ocorreram sob agitação constante a 600 rpm. As microesferas foram, então, identificadas por meio da ficoeritrina usando-se o equipamento Luminex® MAGPIX (Life Technologies); seguindo as orientações do fabricante, uma rotina de limpeza, qualibração (MAGPIX[®] Calibration Kit MPX-CAL-K25) e verificação (MAGPIX[®] Performance Verification Kit MPX-PVER-K25) precedeu-se o ensaio de expressão proteica e, o software do equipamento (xPONENT[®] 4.2) foi programado para considerar como leitura positiva apenas uma contagem superior a 35 para cada proteína analisada. Após a leitura do aparelho, os valores de cada citocina foram analisados no software Analyst 5.1 e, posteriormente, relativizados pela concentração de proteína tecidual total (Curvas-padrão, ANEXO C).

Tabela 3 - Anticorpos por detecção Luminex®.

Citocinas	Anticorpos	Região de detecção na microesfera
Fator de crescimento epitelial (EGF)	Anti-Humano EGF	12
Eotaxina	Anti-Humano Eotaxina	14
Fator estimulante de colônias de granulócitos	Anti-Humano G-CSF	18
Fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos	Anti-Humano GM-CSF	20
Interferon Alfa	Anti-Humano IFN-α	22
Interferon Gama	Anti-Humano IFN-γ	25
Interleucina 10	Anti-Humano IL-10	27
Interleucina 12p40	Anti-Humano IL-12p40	29
Interleucina 12p70	Anti-Humano IL-12p70	33
Interleucina 13	Anti-Humano IL-13	35
Interleucina 15	Anti-Humano IL-15	37
Interleucina 17A	Anti-Humano IL-17A	39
Antagonista do receptor de interleucina 1	Anti-Humano IL-1ra	42
Interleucina 1 Alfa	Anti-Humano IL-1α	44
Interleucina 1 Beta	Anti-Humano IL-1β	46
Interleucina 2	Anti-Humano IL-2	48

Interleucina 3	Anti-Humano IL-3	51
Interleucina 4	Anti-Humano IL-4	53
Interleucina 5	Anti-Humano IL-5	55
Interleucina 6	Anti-Human IL-6	57
Interleucina 7	Anti-Humano IL-7	61
Interleucina 8	Anti-Humano IL-8	63
Proteína 10 induzida por interferon	Anti-Humano IP-10	65
Proteína quimioatraente de monócitos 2	Anti-Humano CCL2	67
Proteína quimioatraente de monócitos 3	Anti-Humano CCL3	72
Proteína quimioatraente de monócitos 4	Anti-Humano CCL4	73
Proteína quimioatraente de monócitos 5	Anti-Humano CCL5	74
Fator de crescimento tumoral Alfa	Anti-Humano TNF-α	75
Fator de crescimento tumoral Beta	Anti-Humano TNF-β	78

4.9.4.3 Imunofenotipagem por citometria de fluxo

As amostras de TASC obtidas no momento da cirurgia foram acondicionadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium). Os fragmentos de tecido foram picotados numa placa de *Petri* com tesoura e pinça estéreis, em fluxo laminar (VECO, classe 2, tipo A1) e então digeridos durante 40 minutos a 37 °C, sob agitação orbital, em DMEM suplementado com

colagenase do tipo I (280 U/mL) (Sigma Aldrich do Brasil). Em seguida as amostras foram filtradas numa malha fina de plástico, para a retirada dos fragmentos não digeridos.

As células da fração vascular estromal foram separadas por centrifugação a 1200 rpm por 5 minutos; o sobrenadante contendo adipócitos foi recuperado e a fração vascular estromal, ressuspendida em DMEM e centrifugada novamente, conforme descrição anterior e; as células isoladas foram armazenadas em soro fetal bovino suplementado com DMSO a 10% com congelamento progressivo: freezer -20 °C, por 2 horas; freezer -80 °C, por 24 horas e; nitrogênio líquido até o processamento para citometria de fluxo conforme descrito por Brake e Smith (2008).

No dia das análises, as amostras foram rapidamente descongeladas em banho maria a 37 °C, lavadas em DMEM e centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos a 4 °C. O procedimento de compensação do citômetro de fluxo (FACSCanto II – BD Biosciences) foi realizada com *beads* de compensação.

Os anticorpos conjugados com fluorocromos do painel de macrófagos e do painel de células supressoras de origem mielóide (MDSC, do inglês *myeloid-derived suppressor cells*) (**Tabela 4**) foram adicionados às amostras que foram assim incubadas por 30 min a 4 °C, protegidas da luz. As células marcadas foram novamente lavadas com DMEM e centrifugadas por 5 minutos a 1000 rpm e ressuspensas em 500 µl do meio de cultura e, em seguida, detectadas no citômetro de fluxo, através da estratégia de análise descrita na **figura 6** e **7**, para macrófagos e MDSC, respectivamente.

Os ensaios de imunofenotipagem foram realizados no Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein e no Departamento de Imunologia do ICB/USP, sob a supervisão do Professor Dr. Welbert de Oliveira Pereira e do Professor Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara.

Painel	Anticorpo	fluorocromos	Nº Cat.
	CD45	FITC	555482
	CD206	PE	555954
Maarafágaa	CD14	PERCP-Cy5.5	562692
(M1 and M2)	CXCR4	PE-Cy7	560669
	CD86	APC	555660
	CD11b	APC-Cy7	557657
	CCR7	BV421	562555
	CD45	PERCP	347464
	Lin1	FITC	340546
MDSC	CD33	PE	555450
	CD11b	APC-Cy7	557657
	HLA-DR	APC	559866

Tabela 4 - Painel de anticorpos para imunofenotipagem.

CD: Grupo de diferenciação (do inglês, *Cluster of Differentiation*); FITC: Isotiocianato de fluoresceína (do inglês, *fluorescein isothiocyanate*); PE: Ficoeritrina (do inglês, phycoerythrin); PerCP-Cy5.5: proteína clorofila peridinina-R-ficoeritrina cianina (do inglês, Peridinin-chlorophyll proteins); CCR7: receptor de quimiocinas do tipo 7 (do inglês, C-C chemokine receptor type 7); BV421: Brilhante violeta 421 (do inglês, Brilliant Violet™ 421 Dye); Lin1: Coquetel de linhagem (do inglês, Lineage Cocktail 1); APC-Cy7: Aloficocianina 7 (do inglês, Allophycocyanin 7); HLA-DR: Antígeno Leucocitário Humano (do inglês, Human Leukocyte Antigen - antigen D Related). (MDSC, do inglês myeloid-derived suppressor cells).



Figura 6 - Estratégias de análises específicas para macrófagos e subpopulações.

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).



Figura 7 - Estratégias de análises específicas para células supressoras de origem mielóide (MDSC).

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: lin1 negativo e HLA-DR negativo. E: CD33 CD11b duplo positivo.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados estão expressos como média ± erro-padrão ou como mediana [1º quartil;2º quartil], utilizando-se o software estatístico GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, Inc). Os resultados foram primeiramente submetidos aos testes de normalidade e de homogeneidade das variâncias pelo teste de D'Agostino e Pearson. As comparações entre os grupos foram avaliadas pela análise de variância fatorial (ANOVA *one way*), seguida do teste de Tukey, para identificação dos contrastes significantes.

Para os grupos submetidos ao protocolo de TF, em que as análises se dão também em função do tempo, as comparações foram analisadas por ANOVA fatorial *two way* para medidas repetidas.

Para todas as análises, adotou-se valor de significância de 0,05. Todos os procedimentos estatísticos foram realizados com o auxílio do Setor de Estatística do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, sob a supervisão da Sra. Rosana Duarte Prisco.

6 RESULTADOS

6.1 Características gerais dos pacientes (baseline)

Setenta e oito pacientes participaram do estudo, sendo que 33 pacientes foram submetidos ao protocolo de TF. Do total de 32 sessões planejadas do programa de TF, a adesão foi de 94%, 83,9% e 78,5% para o grupo Control TR, WSC TR e CC TR, respectivamente. Ressaltamos que nenhum paciente recebeu durante o protocolo, qualquer tratamento anticâncer ou anti-inflamatório crônico.

A tabela 5 mostra as características gerais dos pacientes (baseline). Observamos que os pacientes dos seis grupos apresentavam média de idade, de massa corporal dos seis meses anteriores à entrevista e de altura, semelhantes. A análise estatística ANOVA two-way para o índice de massa corporal revelou diferença significativa, porém, o teste de Tukey para múltiplas comparações não foi capaz de identificar em guais grupos estavam estas diferenças. Ao avaliarmos a massa corporal atual, observamos que os dois grupos com caquexia, CC SED e CC TR, apresentavam valores significativamente menores quando comparados aos demais grupos. Quando avaliamos a diferença na massa corporal, absoluta e relativa, entres os valores informados e os valores aferidos no momento da entrevista, verificamos perda de massa corporal acentuada para CC SED e CC TR, quando comparados aos demais grupos (Control SED, Control TR, WSC SED e WSC TR), em concordância com os critérios propostos por Evans et al. (2008) (Perda de peso > 5% nos últimos 6 meses). Os dados do estadiamento tumoral mostraram que não houve diferença entre todos os grupos, revelando que a caquexia pode se manifestar também nos estágios iniciais da doença.

Avaliamos também a percepção da qualidade de vida global através da aplicação de questionário (QLQ-C30), tendo verificado que os pacientes caquéticos (CC SED e CC TR) apresentaram menor escore quando comparados com os demais grupos (**Figura 8**), refletindo redução nesse parâmetro.

	Control SED	Control TR	WSC SED	WSC TR	CC SED	CC TR	Two-Way ANOVA
n	15	12	15	12	15	9	
Masc/fem (n)	11/4	6/6	10/5	6/6	8/7	5/4	
Altura (m)	1,66 ± 0,02	1,66 ± 0,02	1,64 ± 0,02	1,67 ± 0,03	1,64 ± 0,02	1,61 ± 0,02	
Idade (anos)	51,71 ± 2,89	52,09 ± 3,85	65,00 ± 2,38	63,75 ± 2,08	58,25 ± 4,13	62,56 ± 4,56	
MC anterior informada (Kg)	76,68 [51,2;106]	79,96 [65;104]	72,2 [53;104]	80,80 [62,0;90,5]	70,0 [50,5;88,0]	68,60 [63,5;91,3]	
Massa corporal atual (Kg)	76,68 [51,2;106]	79,96 [65;104]	70,72 [53;104]	80,80 [62,0;90,5]	60,87[48,5;81]*	59,72 [50,8;83,0] [*]	Fator caquexia
Perda de peso (Kg)	0,00 [0,00;0,00]	0,00 [0,00;0,00]	0,00 [-30,5;0,00]	0,00 [0,00;0,00]	-9,13 [-10,15;-2]*	-7,85 [-10,0;-4,4]*	Fator caquexia
Perda de peso (%)	0,00 [0,00;0,00]	0,00 [0,00;0,00]	0,00 [-2,31;-32,10]	0,00 [0,00;0,00]	13,10 [-22,38;-5,0]*	11,51 [-16,12;-7,21]*	Fator caquexia
IMC (Kg/m²)	27,59 ± 1,24	26,36 ± 2,64	27,74 ± 2,54	29,85 ± 1,40	22,84 ± 1,068	23,10 ± 1,14	

Tabela 5 - Características gerais dos pacientes (na baseline).

Estadiamento tumoral (n)						
1-11	 	9ª	4ª	5ª	3	
III-IV	 	4 ^a	5ª	5ª	6	

Dados expressos como média ± erro padrão ou como mediana [1º quartil;3º quartil]. *Diferença significativa CC SED, CC TR vs WSC SED, WSC TR, Control SED, Control TR. MC: massa corporal; a: o n difere do total porque os dados anatomopatológicos foram insuficientes para o correto estadiamento tumoral de todos os pacientes; IMC: índice de massa corporal.



Figura 8 - Escore de qualidade de vida dos pacientes.

Dados expressos como média ± erro-padrão. * Diferença significativa CC SED, CC TR vs Control SED, Control TR, WSC SED e WSC TR. Control SED (n=15), Control TR (n=12), WSC SED (n=15), WSC TR (n=12), CC SED (n=15) e CC TR (n=9).

6.2 Análise dos parâmetros bioquímicos propostos para confirmação do diagnóstico da caquexia

Ao analisarmos os parâmetros bioquímicos propostos na literatura para o diagnóstico da caquexia, observamos que as concentrações séricas de hemoglobina do CC SED e CC TR foram significativamente menores em relação ao WSC SED, WSC TR, Control SED e Control TR (**Figura 9A**, *p*<0,0001), sendo inferiores aos valores de referência descritos na literatura cientifica (12 g/dL), que visam diagnosticar a síndrome (EVANS et al., 2008).

As concentrações séricas de albumina foram estatisticamente menores no CC SED, quando comparadas com o Control SED, WSC SED e Control TR (p= 0,0318), entretanto, o WSC TR e o CC TR não diferiram estatisticamente dos demais grupos (**Figura 9B**). Quando nós avaliamos os conteúdos individuais de albumina sérica, encontramos que de 27 pacientes com câncer não-caquéticos (WSC), cerca de 15% apresentaram concentrações diminuídas (2,89 ± 0,43 mg/dL), apesar de não apresentarem perda de massa corporal significantemente detectável.

A análise do conteúdo sérico de proteína C-reativa – o marcador mais amplamente utilizado para inflamação sistêmica – revelou que os pacientes caquéticos apresentaram concentrações superiores às dos outros grupos, enquanto que para WSC SED, as concentrações foram maiores em comparação com o Control SED (**Figura 9C**). Entretanto, quando os valores individuais são analisados, observamos uma variação muito grande entre os pacientes do mesmo grupo (WSC: 0,2 – 13,8 mg/L e; CC: 0,4 – 12,6 mg/L), indicando diferentes graus de inflamação, talvez associados a diferentes graus de caquexia (pré-caquexia, caquexia e caquexia refratária).

Observamos ainda que a concentração sérica de IL-6, outro marcador clássico de inflamação, foi significativamente maior apenas nos pacientes com caquexia (CC SED e CC TR), quando comparado com os demais grupos (**Figura 9D**, p < 0,0001).



Figura 9 - Parâmetros bioquímicos propostos para o diagnóstico da caquexia. Dados expressos como mediana [1º quartil; 3º quartil]. Figura 3A: concentrações séricas de hemoglobina – Control SED (n=14), Control TR (n=9), WSC SED (n=14), WSC TR (n=8), CC SED (n=14) e CC TR (n=8); Figura 3B: concentrações séricas de albumina – Control SED (n=15), Control TR (n=12), WSC SED (n=15), WSC TR (n=10), CC SED (n=14) e CC TR (n=9); Figura 3C: concentrações séricas de PCR – Control SED (n=15), Control TR (n=9), WSC SED (n=15), WSC TR (n=9), CC SED (n=15) e CC TR (n=9), Figura 3D: concentrações plasmáticas de IL-6 – Control SED (n=6), Control TR (n=9), WSC SED (n=11), WSC TR (n=8), CC SED (n=7) e CC TR (n=6). # diferença significativa CC SED CC TR *vs* Control SED, Control TR, WSC SED, WSC TR. [®] Diferença significativa CC SED *vs* Control TR. ** diferença significativa WSC SED *vs* Control SED. * diferença significativa CC SED, CC TR *vs* Control TR, WSC SED e WSC TR.

6.3 Efeitos do treinamento físico sobre a composição corporal

Apesar de não encontrarmos diferenças estatisticamente significativas, o TF foi capaz interromper a perda de massa corporal – a característica clínica mais marcante da caquexia, promovendo ainda um discreto ganho entre a semana 3 e o *baseline* (10,01 % em média) e, ainda, manutenção do ganho até a sexta semana de protocolo (**Figura 10**). Ressaltamos que nenhum dos pacientes recebeu qualquer outro tipo de intervenção, quer farmacológica, quer não farmacológica. Além disso, todos os pacientes foram encorajados a manter as suas dietas habituais. É, portanto, possível supor que os resultados representam os efeitos diretos do TF.



Figura 10 - Massa corporal antes, durante e após o protocolo de TF. Dados expressos como mediana [1º quartil; 3º quartil]. * Diferença significativa entre CC TR (n=9) *vs* Control TR (n=12), WSC TR (n=12).

Adicionalmente, realizamos a avaliação da composição corporal por DEXA de sete pacientes oncológicos submetidos ao protocolo de TF. Quando realizamos a análise estatística sem distinção de grupos, não verificamos diferenças significativas ao longo das 6 semanas de TF para massa corporal óssea, gordura corporal e total e do tronco e massa corporal magra total e (**Figura 11A, 11B, 11C, 11D** e **11E**, respectivamente). Contudo, observamos um ganho percentual médio de 2% para a massa corporal magra total (média inicial de 45,68 kg e média final de 46,98 Kg) e de 5% para a massa magra do tronco (média inicial de 22,77 kg e média final de 23,99 Kg) em todos os pacientes avaliados.



Figura 11 - Composição corporal por DEXA dos pacientes treinados. Dados expressos como média ± erro-padrão. n total=7

Apesar da amostra reduzida, realizamos o tratamento estatístico ANOVA-Two Way para avaliar o efeito crônico do TF entre o WSC TR (n=4) e o CC TR (n=3). Para a massa corporal magra total e do tronco, não observamos diferenças significativas entre os grupos ou ao longo das seis semanas de protocolo (**Figura 12A-B**, respectivamente), contudo, observamos um ganho percentual de 4% e 3% na massa magra total para o WSC TR e CC TR, respectivamente; quando avaliamos a massa magra apenas do tronco, encontramos um ganho percentual ainda maior ao longo do período de intervenção (8% e 5% para o WSC TR e o CC TR, respectivamente). Já quando avaliamos a gordura corporal total e no tronco dos pacientes, observamos que o WSC TR apresentava valores absolutos significativamente maiores que o CC TR no *baseline* (*p*= 0,0236 e *p*= 0,0119, respectivamente) e na sexta semana de TF (*p*= 0,0377, *p*= 0,0206, respectivamente) (**Figura 12C-D**); percentualmente, podemos verificar que ambos os grupos perderam gordura corporal total (WSC TR: -7%; CC TR: -4%) e no tronco (WSC TR: - 8%; CC TR: -



6%), ao longo do período de intervenção; contudo, observamos que a magnitude de perda foi menor entre os pacientes caquéticos submetidos ao protocolo de TF.

Figura 12 - Composição corporal avaliada por DEXA ao longo de 6 semanas. Dados expressos como média ± erro-padrão. * diferença significativa WSC TR (n=4) vs CC TR (n=3).

Em conjunto, os dados da composição corporal avaliada por DEXA nos permitem inferir que a manutenção da massa corporal total observada ao longo das semanas de intervenção nos pacientes caquéticos se deu a partir do ganho na massa corporal magra, sobretudo no tronco dos pacientes treinados.

6.4 Efeitos do treinamento físico sobre os parâmetros bioquímicos propostos para o diagnóstico da caquexia

A inflamação sistêmica, avaliada pelo conteúdo sérico de PCR, foi incialmente maior no CC TR (*p*=0,0007), quando comparada com os demais grupos. No final da sexta semana de protocolo, a concentração sérica de PCR foi significantemente reduzida no CC TR, quando não encontramos mais diferenças significativas em relação ao Control TR e WSC TR (**Figura 13A**, p=0,0480). A concentração sérica de albumina aumentou continuamente até a terceira semana de TF, quando os valores circulantes de albumina do CC TR foram similares aos demais grupos submetidos ao protocolo de TF (**Figura 13B**).



Figura 13 - Parâmetros bioquímicos da caquexia ao longo de 6 semanas. Dados expressos como média ± erro-padrão. * diferença significativa CC TR vs Control TR, WSC TR. # diferença significativa semana 6 vs semana 3 para o CC TR em relação ao PCR e semana 3 vs baseline para o CC TR em relação à albumina.

6.5 Efeitos do treinamento físico sobre os parâmetros de condicionamento físico avaliados

Todos os pacientes apresentaram VO_{2max} inicial baixo, confirmando a condição sedentária anterior. Ao longo das seis semanas de TF, a curva de VO_{2max} aumentou e, ambos os grupos exercitados (caquéticos e não caquéticos), mostraram diferença significativa ao final do protocolo (**Figura 14A**, p<0,0001), revelando que além de viável, o TF promove melhoria significativa da capacidade física destes pacientes (incremento de 209% do VO2max). A frequência cardíaca (FC) de repouso foi semelhante em todos os grupos no *baseline* e reduziu progressivamente durante as seis semanas (**Figura 14B**, p<0,0001). No final do protocolo de exercício, a FC do CC TR foi menor (14%) que nos demais grupos avaliados. Além disso, a distância percorrida/semana aumentou gradualmente ao longo das seis semanas, com diferença significativa quando comparada com a primeira semana para todos os grupos (**Figura 14C**, p<0,0001), revelando que o desempenho físico melhorou após protocolo de TF.





Figura 14 - Efeitos do treinamento físico sobre os parâmetros de condicionamento físico avaliados.

Dados expressos como media ± erro-padrão. Control TR (n=12); WSC TR (n=12); CC TR (n=9). * indica diferença significativa entre a semana 6 e o *baseline*.

6.6 Perfil lipídico e concentrações séricas de ALT, AST, glicose e lactato

Na **tabela 6** observamos que não houve diferença significativa entre os grupos referente às concentrações séricas de triacilglicerol (TAG), do conteúdo de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), de glicose e de lactato. Contudo, o conteúdo de colesterol total foi significativamente menor no grupo CC TR em relação ao grupo Control SED e não apresentou diferença para os demais grupos. As concentrações séricas de LDLc (em inglês, *low density lipoprotein*) do grupo CC SED foram significativamente inferiores em relação ao grupo WSC TR, mas não foi detectada diferença para os demais grupos. Já as concentrações de HDLc (em inglês, *high density lipoprotein*) no grupo CC SED foram significantemente inferiores às do grupo WSC SED. Entretanto, quando comparadas aos demais grupos, não foram verificadas diferenças significativas. Interessantemente, observamos que os dois grupos de pacientes caquéticos apresentaram valores médios de HDLc inferiores de riscos à saúde (<40 mg/dL), sobretudo, os riscos cardiovasculares.

					<u>, </u>		
	Control SED	Control TR	WSC SED	WSC TR	CC SED	CC TR	p
Ν	15	12	15	12	15	9	
TAG (mg/dL)	151 ± 9,56	147 ± 14,4	130 ± 11,0	140 ± 18,8	117 ± 11,2	105 ± 10,6	0,1191
Colesterol total (mg/dL)	214 ± 6,07	188 ± 10,8	190 ± 8,77	191 ± 9,75	178 ± 11,1	138 ± 15,8 [*]	0,0008
LDLc (mg/dL)	108 ± 4,26	106 ± 3,49	105 ± 7,68	137 ± 4,46	88,8 ± 5,88 [#]	123 ± 12,6	0,0010

HDLc (mg/dL)	42,3 ± 2,21	40,7 ± 2,60	43,3 ± 2,65	41,2 ± 2,73	33,3 ± 2,08 [#]	34,8 ± 4,74 [#]	0,0237
ALT (U/L)	20,8 ± 2,05	16,5 ± 3,61	17,3 ± 1,97	16,6 ± 4,36	18,0 ± 1,90	17,1 ± 2,93	0,7595
AST (U/L)	28,9 ± 2,12	29,6 ± 2,34	30,8 ± 2,10	20,2 ± 1,85	28,6 ± 2,58	24,5 ± 2,57	0,1295
Glicose (mg/dL)	115 ± 6,04	104 ± 4,15	105 ± 3,60	112 ± 9,39	114 ± 5,37	107 ± 8,73	0,6892
Lactato (mmol/L)	1,38 ± 0,097	1,69 ± 0,20	1,50 ± 0,18	1,89 ± 0,21	1,47 ± 0,13	1,35 ± 0,089	0,4332

Dados expressos como media ± erro-padrão. TAG: triacilglicerol; HDLc: lipoproteína de alta densidade; LDLc: lipoproteína de baixa densidade; ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase.

6.7 Efeitos do treinamento físico sobre o perfil lipídico e as concentrações séricas de ALT, AST, glicose e lactato

A avaliação das concentrações séricas de TAG, colesterol total, e LDLc não verificou diferenças significativas entre os grupos ou entre as semanas de intervenção (**Figuras 15A, 15B** e **15C**). Contudo, o conteúdo sérico de HDLc que era de apenas 34,83 \pm 4,74 mg/dL no *baseline*, aumentou significantemente ao longo da intervenção clínica (atigindo 57,0 \pm 3,42 mg/dL), quando comparamos a semana 6 em relação à de *baseline*, em CC TR (**Figura 15D**). Por outro lado, o TF não foi capaz de alterar as concentrações séricas de glicose e lactato ao longo das 6 semanas de intervenção para ambos os grupos de pesquisa (**Figuras 15E-F**).





Figura 15 - Perfil lipídico e concentrações séricas de ALT, AST, glicose e lactato ao longo de 6 semanas.

Dados expressos como media ± erro-padrão. Control TR (n=12); WSC TR (n=12); CC TR (n=9). * indica diferença estatística entre o grupo CC TR e os grupos Control TR e WSC TR; & indica diferença significativa entre a semana 6 e o *baseline*.

6.8 Análise morfológica e morfométrica

A figura 16 ilustra a morfologia do TASC dos pacientes avaliados nesse estudo, sob microscopia de luz. De uma maneira geral, observamos um desarranjo na morfologia típica do tecido no Control SED (Figura 16A), com algumas regiões de fibrose; já a morfologia do Control TR (Figura 16B) apresenta-se preservada, com adipócitos característicos e esféricos, com uma camada delgada de citoplasma, o núcleo afastado para a região periférica da célula e com a presença de um espaço vazio arredondado, representando uma grande gotícula lipídica, removida com o processamento com xilol. Na figura 16C (WSC SED), observamos que a característica esférica da célula adiposa está modificada e, na figura 16D (WSC TR), observamos novamente arranjo morfológico preservado. Já no grupo CC SED, os adipócitos mostram-se mais poligonais. Observou-se também um maior número de células infiltradas (Figura 16E). Além disso, podemos observar que a matriz extracelular foi modificada, com maior espaço intersticial entre as células, e a presença de fibrose. A figura 16F, permite observar que a morfologia do CC TR está preservada e que a área de fibrose (à esquerda), é bastante reduzida. As análises morfométricas realizadas posteriormente, revelaram que o tamanho do adipócito, determinado como área seccional, diâmetro e perímetro, estava preservado no CC TR em

relação ao CC SED (**Figura 17A-C**, *p*= 0,0429, *p*= 0,0773 e *p*= 0,0148, respectivamente); ainda, o perímetro do CC TR foi significativamente maior quando comparado ao WSC SED (**Figura 17C**, *p*= 0,0384).



Figura 16 - Características morfológicas do tecido adiposo subcutâneo. Ad: adipócitos; à esquerda das imagens um aumento de 10 X e à direita, de 40 X. Setas fechadas indicam células infiltradas imunitárias no tecido adiposo; setas vazias indicam áreas de fribrose; círculo representa vasos sanguíneos.



Figura 17 - Análise morfométrica dos adipócitos do tecido adiposo subcutâneo. Dados apresentados como mediana [1º quartil;3º quartil]. Control SED (n=4); Control TR (n=4); WSC SED (n=4); WSC TR (n=4); CC SED (n=4); CC TR (n=4). * diferença significativa CC TR vs CC SED. # diferença significativa CC TR vs WSC SED.

A análise da expressão gênica das proteínas estudadas no TASC é mostrada na **tabela 7**. Verificamos que o conteúdo de RNAm de IL-1β foi maior no CC SED, quando comparado com o Control SED, Control TR, WSC TR e CC TR, mas sem diferença significativa para WSC SED. Observamos ainda que a expressão do gene da leptina foi significativamente menor em CC SED em relação a WSC SED, mas não foi detectada diferença estatística para os demais grupos analisados. Para o RNAm de CCL2, IL-6 e IL-10, tampouco foi encontrou-se diferença significativa entre qualquer dos grupos estudados; contudo, observamos que a expressão gênica de IL-10 apresentou forte tendência para atingir nível de significância no CC TR.

	Control SED	Control TR	WSC SED	WSC TR	CC SED	CC TR	p
CCL2	0,93	0,56	0,30	0,45	3,34	1,70	0,253
(U.A.)	[0,26;3,33]	[0,260;4,76]	[0,17; 0,93]	[0,874;2,3]	[0,16; 7,47]	[0,233;0,1,78]	
IL-1β	0,993	0,454	1,95	0,411	6,41 [#]	0,638	0,039
(U.A.)	± 0,431	± 0,141	± 1,29	± 0,229	± 2,13	± 0,364	
IL-6	0,72	0,54	0,74	0,61	2,64	1,04	0,654
(U.A.)	[0,38; 3,11]	[0,455;5,13]	[0,28; 1,82]	[0,216;1,45]	[0,18; 8,09]	[0,117;4,09]	
IL-10	1,19	1,98	1,10	1,73	0,43	3,71	0,068
(U.A.)	[0,37; 1,70]	[0,781;4,90]	[0,42; 3,03]	[0,367;3,08]	[0,27; 0,71]	[0,876;1,59]	
Leptina	2,85	0,866	4,91	1,07	0,719 ^{&}	0,800	0,049
(U.A.)	± 0,775	± 0,473	± 0,779	± 0,822	± 0,632	± 0,373	

Tabela 7 - Expressão gênica de fatores inflamatórios no tecido adiposo subcutâneo.

Dados expressos como média ± erro padrão ou como mediana [1º quartil;3º quartil). Control SED (n=12), Control TR (n=12), WSC SED (n=12), WSC TR (n=10), CC SED (n=11) e CC TR (n=8). # diferença significativa CC SED vs Control SED, Control TR, WSC SED, WSC TR e CC TR. [&] Diferença significativa CC SED vs Control SED e WSC SED. CCL2: proteína quimioatraente de monócitos; IL: Interleucina; U.A.: Unidades arbitrárias.

6.10 Expressão Proteica

6.10.1 <u>Conteúdo plasmático e tecidual de fatores de crescimento e diferenciação e efeitos</u> do treinamento físico

No baseline, o CC TR apresentou diferenças significativas no conteúdo plasmático do fator de crescimento epidérmico (EGF, do inglês *plasma epidermal growth fator*, *p*=0,0004), quando comparados com os outros grupos (**Figura 18A**). O mesmo fator foi reduzido significativamente ao longo das 6 semanas de intervenção, quando os valores médios foram similares ao Control TR e WSC TR (**Figura 18B**). O efeito agudo do exercício

físico (pré e pós sessão) foi avaliado em 3 momentos diferentes (no *baseline*, semana 3 e semana 6). Não encontramos diferenças significativas nas concentrações de EGF entre os valores de repouso e pós sessão aguda do TF nos três momentos avaliados (Figura 18C-E). O conteúdo proteico de EGF no TASC não foi detectável.



Figura 18 - Conteúdo plasmático do fator de crescimento epidérmico (EGF). Dados expressos como mediana [1º quartil;3º quartil]. Control SED (n=15), Control TR (n=9), WSC SED (n=15), WSC TR (n=9), CC SED (n=15), Control TR (n=6). Figura 14A: * diferença significativa CC TR vs Control SED, Control TR, WSC SED, WSC TR e CC SED. Figura 14B: * diferença significativa CC TR vs Control TR e WSC TR; # diferença significativa semana 6 vs semana 3 e no baseline.

O conteúdo de eotaxina, uma proteína quimioatraente para eosinófilos, foi analisado no plasma e no TASC. Nós não encontramos diferenças significativas em nenhum dos compartimentos avaliados (**Figura 19A-G**), exceto em relação ao efeito agudo do TF na terceira semana no CC TR (**Figura 19D**). O conteúdo proteico de eotaxina no TASC também não foi detectável.





Dados expressos como mediana [1º quartil;3º quartil]. Control SED (n=6), Control TR (n=9), WSC SED (n=11), WSC TR (n=8), CC SED (n=6), CC TR (n=6). Figura 15D: * diferença significativa pós sessão *vs* repouso para o CC TR na semana 3.

Quando avaliamos o conteúdo plasmático e tecidual do fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF, em inglês *Granulocyte Colony-Stimulating Factor*), observamos que o TF crônico foi capaz de aumentar a concentração de G-CSF na terceira semana somente para CC TR (p=0,0037) e agudamente, na sexta semana, para o grupo Control TR (**Figura 20B** e **20E**, p=0,0127, respectivamente). Para os outros tempos e para o TASC analisado, não foram encontradas diferenças significativas (**Figura 20A, 20C, 20D, 20F**).



Figura 20 - Conteúdo plasmático e tecidual do fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF).

Dados expressos como mediana [1º quartil;3º quartil]. Control SED (n=6), Control TR (n=9), WSC SED (n=11), WSC TR (n=8), CC SED (n=7), CC TR (n=6). Figura 16B: * diferença significativa CC TR vs Control TR, WSC TR na semana 3. Figura 16D: * diferença significativa pós sessão vs repouso para o Control TR na semana 3.

Para o conteúdo do fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos (GM-CSF, em inglês *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*), encontramos diferença significativa referente ao efeito agudo do exercício físico na terceira semana apenas, para o CC TR (**Figura 21D**, *p*=0,0461). Para os outros tempos e para o TASC analisado, não observamos diferenças significativas entre os grupos estudados (**Figura 21A, 21C-F**), apesar do mesmo padrão observado para o efeito crônico do TF na terceira semana (**Figura 21B**).



Figura 21 - Conteúdo plasmático e tecidual do fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos (GM-CSF).

Dados expressos como mediana [1º quartil;3º quartil]. Control SED (n=6), Control TR (n=9), WSC SED (n=11), WSC TR (n=8), CC SED (n=7), CC TR (n=6). Figura 17D: * diferença significativa pós sessão *vs* repouso para o CC TR na semana 3.

6.10.2 <u>Conteúdo plasmático e tecidual das citocinas pró e anti-inflamatórias e os efeitos do</u> <u>treinamento físico</u>

Similarmente ao GM-CSF, observamos o mesmo efeito agudo do exercício físico na terceira semana no CC TR, quando avaliamos o interferon (IFN)- α (**Figura 22D**, *p*=0,0156). As **figuras 22A-C**, **22E-F** ilustram a ausência de diferenças significativas para os demais tempos e para o TASC. Mais uma vez, verificamos o mesmo padrão na curva que mostra o efeito crônico do TF para os pacientes caquéticos na terceira semana (**Figura 22B**).



Figura 22 - Conteúdo plasmático e tecidual de interferon (IFN)-α. Dados expressos como mediana [1º quartil;3º quartil]. Control SED (n=6), Control TR (n=9), WSC SED (n=11), WSC TR (n=8), CC SED (n=7), CC TR (n=6). Figura 18D: * diferença significativa pós sessão *vs* repouso para o CC TR na semana 3.

Nós observamos um efeito agudo oposto do exercício físico para o Control TR no *baseline* (**Figura 23C**) a na terceira semana (**Figura 23D**) (p=0,0029 e p=0,0490, respectivamente), quando encontramos uma redução e um aumento nas concentrações de IFN- γ no pré e pós-sessão de exercício físico, respectivamente. Encontramos também, um menor conteúdo de IFN- γ no CC TR, em relação ao CC SED (**Figura 23G**, p= 0,0435), revelando um efeito anti-inflamatório local do TF no músculo esquelético. Na sexta semana não se observa diferenças significativas no plasma em relação ao efeito agudo e crônico do TF; assim como não se encontrou diferenças significantes no TASC entre todos os grupos avaliados (**Figura 23A, 23B, 23E e 23F**).





Dados expressos como mediana [1º quartil]: Control SED (n=6), Control TR (n=9), WSC SED (n=10), WSC TR (n=8), CC SED (n=7), CC TR (n=6). Figura 19C: * diferença significativa pós sessão vs repouso para o Control TR no *baseline*; Figura 19G: * diferença significativa pós sessão vs repouso para o Control TR na semana 3; # diferença significativa CC SED vs CC TR para o conteúdo muscular.

Apesar das diferenças mencionadas anteriormente, as concentrações plasmáticas da proteína induzível por IFN-γ (IP-10, em inglês *interferon gamma inducible protein*) foram
significantemente diferentes apenas para o efeito agudo do exercício físico na terceira semana (**Figura 24D**, *p*=0,0431). Não observamos diferenças para os demais tempos e para o TASC analisado (**Figura 24A-C** e **24E-F**).



Figura 24 - Concentração plasmática e tecidual da proteína induzível por IFN-γ (IP-10). Dados expressos como mediana [1º quartil;3º quartil]. Control SED (n=15), Control TR (n=9), WSC SED (n=15), WSC TR (n=8), CC SED (n=15), CC TR (n=6). Figura 20D: * diferença significativa pós sessão vs repouso para o CC TR na semana 3.

Nós analisamos duas subunidades da interleucina (IL)-12, p40 e p70, nos mesmos tempos, condições e no TASC e não encontramos diferenças significativas (**Figura 25A-F** e **26A** e **26C-F**, respectivamente), exceto em relação ao efeito crônico do TF na terceira semana para o CC TR (**Figura 26B**, *p*=0,0293), em que podemos verificar o mesmo padrão apresentado nos resultados anteriores.



Figura 25 - Concentração plasmática e tecidual de interleucina (IL)-12p40. Dados expressos como mediana [1º quartil;3º quartil]. Control SED (n=6), Control TR (n=9), WSC SED (n=11), WSC TR (n=8), CC SED (n=7), CC TR (n=7).





Figura 26 - Concentração plasmática e tecidual de interleucina (IL)-12p70. Dados expressos como mediana [1º quartil;3º quartil]. Control SED (n=6), Control TR (n=9), WSC SED (n=11), WSC TR (n=8), CC SED (n=7), CC TR (n=7). Figura 22B: * diferença significativa CC TR *vs* Control TR e WSC TR na semana 3.

Como descrevemos anteriormente, os pacientes caquéticos apresentavam concentração plasmática de IL-6 maior que os demais grupos no *baseline*; e não foram encontradas diferenças entre os pontos analisados após as sessões de exercício físico para qualquer dos grupos treinados (**Figura 27B**). Após três semanas de TF, não encontramos diferenças significativas entre os grupos Control TR, WSC TR e CC TR (**Figura 27A**). Contudo, mostrou-se um aumento significativo na concentração plasmática de IL-6 após a sessão de exercício físico na terceira semana no Control TR (**Figura 27C**, *p*=0,0035). Já na sexta semana, não houve diferenças significantes provindas da sessão aguda de exercício físico entre todos os grupos (**Figura 27D**). A análise dos resultados no TASC não revelou diferenças significativas entres os grupos avaliados (**Figura 27E**). Entretanto, os pacientes caquéticos e não caquéticos treinados apresentaram conteúdo de IL-6 muscular maior que seus controles não treinados (**Figura 27F**, *p*=0,0017).



Figura 27 - Concentração plasmática e tecidual da interleucina (IL)-6. Dados expressos como mediana [1º quartil;3º quartil]. Control SED (n=11), Control TR (n=9), WSC SED (n=12), WSC TR (n=9), CC SED (n=12), CC TR (n=7). Figura 23C: * diferença significativa pós sessão vs repouso na semana 3; figura 23G: # diferença significativa WSC TR, CC TR vs WSC SED, CC SED.

A figura 28 mostra os resultados referentes à IL-7. Não observamos diferenças significativas para quaisquer dos grupos no *baseline* (Figura 28A), mas os pacientes caquéticos apresentaram um aumento significativo no conteúdo desta citocina na terceira semana de intervenção, em relação a todos os demais grupos treinados (Figura 28C, p=0,0002); este aumento foi atenuado até a sexta semana de TF (Figura 28D), quando não verificamos mais distinções em relação ao Control TR e WSC TR. No *baseline*, Control TR e WSC TR foram agudamente responsivos à sessão de exercício físico (p=0,0015 e p=0,0058, respectivamente, Figura 28B), enquanto o CC TR não respondeu ao estresse promovido pela sessão do exercício físico. Entretanto, este grupo também foi responsivo na sexta semana de TF (Figura 28E, p=0,0043). Além disso, o conteúdo de IL-7 no TASC e



Figura 28 - Concentração plasmática e tecidual da interleucina (IL)-7.

Dados expressos como mediana [1º quartil;3º quartil]. Control SED (n=6), Control TR (n=9), WSC SED (n=11), WSC TR (n=8), CC SED (n=11), CC TR (n=6). Figura 24B: * diferença significativa na terceira semana de TF CC TR vs Control TR, WSC TR; figura 24C: * diferença significativa pós sessão vs repouso para Control TR e WSC TR no *baseline*; figura 24E: * diferença significativa pós sessão vs repouso para Control TR, WSC TR e CC TR na semana 6; figura 24F: # diferença significativa Control TR, WSC TR, CC TR vs Control SED, WSC SED, CC SED; figura 24G: # diferença significativa Control TR, WSC TR, CC TR vs Control SED, WSC SED, CC SED; figura 24G: # diferença significativa Control TR, WSC TR, CC TR vs Control SED, WSC SED, CC SED; figura 24G: # diferença significativa Control TR, WSC TR, CC TR vs Control SED, WSC SED, CC SED; figura 24G: # diferença significativa Control TR, WSC TR, CC TR vs Control SED, WSC SED, CC SED; figura 24G: # diferença significativa Control TR, WSC TR, CC TR vs Control SED, WSC SED, CC SED; figura 24G: # diferença significativa Control TR, WSC TR, CC TR vs Control SED, WSC SED, CC SED; figura 24G: # diferença significativa Control TR, WSC TR, CC TR vs Control SED, WSC SED, CC SED; figura 24G: # diferença significativa Control TR, WSC TR, CC TR vs Control SED, WSC SED, CC SED.

O conteúdo plasmático da citocina IL-8 foi maior para o CC SED no *baseline*, quando comparado com o Control SED, WSC SED, Control TR e WSC TR (p=0,0176), mas não em relação ao CC TR (**Figura 29A**). O conteúdo desta citocina aumentou continuamente ao longo de 6 semanas, quando observamos diferenças significativas entre o CC TR e o Control TR, WSC TR (**Figura 29B**, p=0,0159). O exercício físico foi capaz de aumentar a concentração plasmática de IL-8 agudamente, no *baseline* e na sexta semana de TF (**Figura 29C** e **29E**, p=0,0318, e p=0,0260, respectivamente); o mesmo efeito foi observado na terceira semana apenas em relação ao WSC TR (**Figura 29D**, p=0,0494). Não encontramos diferenças significativas no TASC de todos os grupos avaliados (**Figura 29F**).



Figura 29 - Concentração plasmática e tecidual da interleucina (IL)-8. Dados expressos como mediana [1º quartil;3º quartil]. Control SED (n=6), Control TR (n=9), WSC SED (n=11), WSC TR (n=7), CC SED (n=7), CC TR (n=6). Figura 25A: * diferença significativa CC SED vs Control SED, WSC SED, Control TR

e WSC TR; figura 25B: * diferença significativa semana 3 vs baseline para CCI TR e WSC; ** diferença significativa CC TR vs Control TR, WSC TR na semana 6; figura 25C: * diferença significativa pós sessão vs repouso para CC TR no *baseline*; figura 25D: # diferença significativa pós sessão vs repouso para CC TR na semana 3; figura 25E: * diferença significativa pós sessão vs repouso para CC TR na semana 6.

Nós encontramos diferenças significativas no TASC dos pacientes treinados em relação aos não treinados para a citocina IL-13 (**Figura 30F**, *p*=0,0015), revelando uma ação anti-inflamatória local do TF, independente do grupo que sofreu intervenção. Para os demais tempos e compartimentos estudados, não se detectou diferenças significativas (**Figura 30A-E**).



Figura 30 - Concentração plasmática e tecidual da interleucina (IL)-13.

Dados expressos como mediana [1º quartil;3º quartil]. Control SED (n=6), Control TR (n=9), WSC SED (n=11), WSC TR (n=8), CC SED (n=7), CC TR (n=7). Figura 26F: # diferença significativa Control TR, WSC TR, CC TR vs Control SED, WSC SED, CC SED.

Seguindo o mesmo padrão observado na terceira semana para maioria da citocinas avaliadas, a concentração plasmática da citocina anti-inflamatória IL-1ra aumentou significativamente no CC TR (*p*=0,0248), quando, então, diminuiu na sexta semana, não apresentando mais diferença significativa para o Control TR e o WSC TR (**Figura 31B**). A avaliação dos demais tempos, condições e compartimentos avaliados não logrou demonstrar diferenças significativas (**Figura 31A, 31C-F**).



Figura 31- Concentração plasmática e tecidual da interleucina (IL)-1ra. Dados expressos como mediana [1º quartil;3º quartil]. Control SED (n=6), Control TR (n=12), WSC SED (n=11), WSC TR (n=11), CC SED (n=7), CC TR (n=9). Figura 27B: * diferença significativa CC TR vs Control TR, WSC TR na semana 3.

A concentração plasmática de IL-10 – citocina classicamente descrita como antiinflamatória, não diferiu estatisticamente entre todos os grupos estudados na condição *baseline* (**Figura 32A**), mas aumentou agudamente apenas nos pacientes treinados do grupo controle e tumor sem caquexia na primeira sessão do protocolo de TF (**Figura 32C**, p=0,0078 e p=0,0007, respectivamente); já na terceira semana de intervenção, a concentração desta citocina aumentou agudamente apenas no Control TR (**Figura 32D**, p=0,0034). O feito crônico do exercício físico induziu o mesmo padrão da curva ao longo de 6 semanas, mas sem diferenças entre os grupos (**Figura 32B**). Na sexta semana de TF, todos os grupos foram responsivos ao estímulo agudo do exercício físico, mostrando diferenças significativas entre a pré e o pós sessão (**Figura 32E**, (p=0,0147, p=0,0141 e p=0,0156, respectivamente). O conteúdo de IL-10 no TASC foi maior no Control TR em relação aos demais grupos (**Figura 32F**, p=0,0177) e menor no músculo esquelético do WSC TR quando comparado ao WSC SED (**Figura 32G**, p=0,0003).





Figura 32 - Concentração plasmática e tecidual da interleucina (IL)-10.

Dados expressos como mediana [1º quartil;3º quartil]. Control SED (n=6), Control TR (n=9), WSC SED (n=11), WSC TR (n=8), CC SED (n=7), CC TR (n=7). Figura 28C: * diferença significativa pós sessão vs repouso para o Control TR e o WSC TR no *baseline*; figura 28D: * diferença significativa pós sessão vs repouso para o Control TR na semana 3; figura 28E: * diferença significativa pós sessão vs repouso para o Control TR na semana 3; figura 28E: * diferença significativa control TR vs Control SED, WSC SED, CC SED, WSC TR e CC TR; figura 28G: # diferença significativa WSC TR vs WSC SED.

A concentração sérica da citocina pró-inflamatória TNF- α (em inglês, *tumoral necrosis fator* α), não se mostrou significativamente diferente entre os grupos estudados no *baseline* (**Figura 33A**). Não observamos diferenças significativas entre os grupos avaliados, embora o padrão do CC TR tenha sido repetido na terceira semana para o efeito crônico do TF (**Figura 33B**). Entretanto, o WSC TR e o CC TR foram responsivos ao efeito agudo do exercício físico na primeira sessão de treino (**Figura 33C**, *p*=0,0055 e *p*=0,0041, respectivamente). Então, todos os grupos aumentaram significativamente a concentração plasmática de TNF- α entre a pré e o pós sessão, na terceira semana (**Figura 33E**, *p*=0,0017, *p*=0,0007 e *p*=0,0014 para Control TR, WSC TR and CC TR, respectivamente), mas apenas o Control TR apresentou a mesma resposta na sexta semana (**Figura 33D**, *p*= 0,0175). O conteúdo de TNF- α tecidual foi menor no TASC do WSC SED em relação ao Control SED (**Figura 33F**, *p*=0,004).





Figura 33 - Concentração plasmática e tecidual do fator de necrose tumoral alfa (TNF)-α. Dados expressos como mediana [1º quartil;3º quartil]. Control SED (n=6), Control TR (n=12), WSC SED (n=11), WSC TR (n=10), CC SED (n=7), CC TR (n=5). Figura 29D: * diferença significativa pós sessão vs repouso para WSC TR e CC TR no baseline; figura 29C: * diferença significativa pós sessão vs repouso para Control TR, WSC TR e CC TR na semana 3; figura 29D: * diferença significativa pós sessão vs repouso para Control TR na semana 6; figura 29F: * diferença significativa WSC SED vs Control SED.

Já o conteúdo da citocina pró-inflamatória TNF- β foi maior no CC TR em relação ao Control SED no *baseline* (**Figura 34A**, *p*=0,0099) e, quando avaliamos o efeito crônico do TF, verificamos uma diminuição contínua até a sexta semana, quando não foram observadas diferenças em relação ao Control TR e WSC TR (**Figura 34B**). Nenhum dos grupos apresentou diferenças significativas para o estímulo agudo do exercício físico em qualquer um dos tempos avaliados (**Figura 34C, 34D** e **34E**). Por sua vez, o conteúdo de desta mesma citocina no TASC foi menor apenas para o WSC TR, quando comparado ao Control TR (**Figura 34F**, *p*=0,0018).





Figura 34 - Concentração plasmática e tecidual do fator de necrose tumoral (TNF)-β. Dados expressos como mediana [1º quartil;3º quartil]. Control SED (n=5), Control TR (n=11), WSC SED (n=11), WSC TR (n=9), CC SED (n=7), CC TR (n=5). Figura 30A: diferença significativa CC TR *vs* Control SED; figura 30B: * diferença significativa CC TR *vs* Control TR e WSC TR na primeira e terceira semana de TF; figura 30F: * diferença significativa WSC TR *vs* Control TR.

6.10.3 Conteúdo plasmático e tecidual dos fatores quimioatraentes de monócitos e os efeitos do treinamento físico

Entre os fatores quimioatraentes de monócitos, não verificamos diferenças no *baseline* entre todos os grupos avaliados para CCL2 (em inglês, Chemotactic Chemokine C-C-motif ligand 2, **Figura 35A**), tampouco o TF foi capaz de alterar as suas concentrações plasmáticas ao longo de seis semanas (**Figura 35B**). Apenas os pacientes com tumor sem caquexia foram responsivos ao exercício físico agudo no *baseline* e na sexta semana de treino (**Figura 35C** e **35E**, p=0,0134 e p=0,0287, respectivamente). Já na terceira semana, não encontramos diferenças significativas entre quaisquer dos grupos estudados para o efeito agudo do exercício físico, assim como no TASC (**Figura 35D** e **35F**, respectivamente). Para CCL3, não observamos diferenças entres todos os grupos, todas as condições e o TASC avaliados (**Figura 36A-F**).



Figura 35 - Concentração plasmática e tecidual do fator quimioatraente de monócitos 2 (CCL2).

Dados expressos como mediana [1º quartil;3º quartil]. Control SED (n=6), Control TR (n=9), WSC SED (n=11), WSC TR (n=8), CC SED (n=7), CC TR (n=6). Figura 31C: * diferença significativa pós sessão vs repouso para o WSC TR no baseline; figura 21C: * diferença significativa pós sessão vs repouso para o WSC TR na semana 6.





Figura 36 - Concentração plasmática e tecidual do fator quimioatraente de monócitos 3 (CCL3). Dados expressos como mediana [1º quartil;3º quartil]. Control SED (n=6), Control TR (n=9), WSC SED (n=11), WSC TR



Investigamos ainda o conteúdo de CCL4 e CCL5 e não encontramos diferenças significativas no plasma dos grupos estudados na *baseline* e ao longo do protocolo de TF (Figura 37A, 37B, 38A e 38B, respectivamente). Quando avaliamos o efeito agudo do exercício físico, verificamos que o CC TR foi responsivo no *baseline* para CCL4 e CCL5 (Figuras 37C e 38C, *p*=0,0279 e *p*=0,0099, respectivamente); já para o Control TR, observamos efeito agudo do exercício físico para CCL4 na terceira e sexta semanas (Figura 37D-E, *p*=0,0215 e *p*=0,0236, respectivamente). Não se observou diferença significativa para o conteúdo de CCL5 na terceira e sexta semanas (Figura 38D-E). A análise estatística ANOVA *two-way* para o conteúdo de CCL4 no TASC revelou diferença significativa, porém, o teste de *Bonferroni* para múltiplas comparações não foi capaz de identificar em quais grupos estavam estas diferenças (Figura 37F); para o conteúdo de CCL5 no TASC, não verificamos diferenças significativas (Figura 38F).



Figura 37 - Concentração plasmática e tecidual do fator quimioatraente de monócitos 4 (CCL4).

Dados expressos como mediana [1º quartil;3º quartil]. Control SED (n=6), Control TR (n=12), WSC SED (n=11), WSC TR (n=10), CC SED (n=7), CC TR (n=6). Figura 33C: * diferença significativa pós sessão *vs* repouso para o CC TR no *baseline*; figura 33D: * diferença significativa pós sessão *vs* repouso para o COntrol TR na semana 3; figura 33E: * diferença significativa pós sessão *vs* repouso para o Control TR na semana 3; figura 33E: * diferença significativa pós sessão *vs* repouso para o Control TR na semana 6.





Figura 38 - Concentração plasmática e tecidual do fator quimioatraente de monócitos 5 (CCL5).

Dados expressos como mediana [1º quartil;3º quartil]. Control SED (n=6), Control TR (n=12), WSC SED (n=10), WSC TR (n=10), CC SED (n=7), CC TR (n=6). Figura 33C: * diferença significativa pós sessão vs repouso para o CC TR no baseline.

6.11 Imunofenotipagem na fração vascular estromal do tecido adiposo subcutâneo

Objetivando investigar os tipos celulares presentes no TASC dos pacientes estudados, avaliamos as subpopulações de macrófagos e MDSC na fração vascular estromal (**Figura 39A, 39C** e **40**, respectivamente), tendo encontrado diferença significativa somente em relação aos macrófagos do tipo M1; todavia, o teste de *Bonferroni* para múltiplas comparações não foi capaz de identificar em quais grupos estavam estas diferenças (**Figura 39B**, p=0,0325).





Figura 39 - Subpopulações de macrófagos na fração vascular estromal do tecido adiposo subcutâneo.

Dados expressos como mediana [1º quartil;3º quartil]. Control SED (n=5), Control TR (n=7), WSC SED (n=5), WSC TR (n=5), CC SED (n=6), CC TR (n=6).



Figura 40 - Células supressoras de origem mielóide na fração vascular estromal do tecido adiposo subcutâneo.

Dados expressos como mediana [1º quartil;3º quartil]. Control SED (n=5), Control TR (n=7), WSC SED (n=5), WSC TR (n=5), CC SED (n=6), CC TR (n=6).

7 DISCUSSÃO

Em geral, a pesquisa sobre câncer se concentra nos agentes, eventos e alterações genéticas responsáveis pela iniciação, progressão e metástase tumoral. No entanto, um percentual considerável de pacientes é acometido pela caquexia (PETRUZZELLI; WAGNER, 2016). Apesar de descrita há séculos, esta síndrome permanece como um problema de saúde pública mundial que, embora frequente, segue sendo mal compreendida, imprecisamente diagnosticada e, portanto, raramente tratada (SEELAENDER et al., 2012). A perda de massa corporal é a característica mais visível da caquexia, contudo, algumas alterações metabólicas e inflamatórias precedem o surgimento dos sinais e sintomas mais evidentes (PORPORATO, 2016).

Foi nosso propósito analisar as alterações promovidas pela caquexia associada ao câncer na composição corporal, nos marcadores bioquímicos e, sobretudo, na inflamação sistêmica e no TASC, em face aos resultados prévios do grupo, que demonstram que o TAB é um importante contribuinte para a inflamação sistêmica característica da caquexia e testar a viabilidade do TF, como estratégia anti-inflamatória em pacientes com tumor caquéticos.

Nossos resultados mostram que os pacientes caquéticos apresentaram acentuada perda involuntária de massa corporal total (absoluta e relativa) nos seis meses anteriores à entrevista para inclusão no estudo, corroborando os parâmetros propostos por Evans et al., (2008) para o diagnóstico da caquexia. Convém, entretanto, ressaltar a grande variação percentual desta perda (5% a 22%), o que pode revelar diferentes graus de caquexia dentro do mesmo grupo de pacientes. Ainda nesta perspectiva, faz-se forçoso salientar a inclusão de pacientes com perda de massa corporal superior aos 5% preconizados para o diagnóstico da caquexia entre os pacientes não caquéticos, uma vez que os mesmos não apresentaram as demais alterações necessárias para serem considerados caquéticos. Estes dados aparentemente incongruentes, desnudam, a nosso ver, as propostas para o diagnóstico preciso de uma síndrome multifatorial e revelam a necessidade da busca e inclusão de marcadores precoces da caquexia. Neste cenário, Farkas et al., (2013) descreveram que a perda de massa corporal em decorrência de doenças crônicas vem atingindo proporções epidêmicas sendo, contudo, sistematicamente ignorada, uma vez que a percepção do tamanho e composição corporais saudáveis sofre variações consideráveis ao redor do mundo, a depender de grupos étnicos e fatores, sobretudo, culturais e até mesmo dentro da comunidade médica.

A ausência de diferenças para os resultados encontrados na avaliação do IMC e do estadiamento tumoral demonstra as dificuldades encontradas para o diagnóstico da caquexia. O IMC figura entre os diversos marcadores propostos para o diagnóstico da caquexia (EVANS et al., 2008; FEARON et al., 2011), porém, como podemos verificar, apesar de numericamente inferior, o IMC dos pacientes caquéticos não diferiu estatisticamente dos demais grupos. Vale ressaltar, contudo, que a adoção do IMC como um fator de diagnóstico desta síndrome requer uma discussão bastante cuidadosa, sobretudo nos tempos atuais em que se vive uma pandemia de obesidade na qual as perdas severas de massa corporal involuntárias não seriam detectadas pelo IMC. A este respeito, o grupo de pesquisa liderado pela Dr. Vickie Baracos propôs um sistema de classificação de perda de massa corporal ajustada pelo IMC para avaliar o risco de redução da sobrevida que leva em consideração combinações de diferentes categorias de IMC e de perda de massa corporal, gerando uma matriz de 25 possibilidades; os autores sugerem que este sistema permite estratificar corretamente e prever de maneira mais efetiva a sobrevivência, uma vez que tal estratégia independe do sitio anatômico, do estadiamento tumoral ou do estado funcional dos indivíduos (MARTIN et al., 2015). Contudo, estudo anterior do mesmo grupo de pesquisa concluiu que apenas a perda de massa corporal e o IMC são insuficientes para identificar pacientes em estágio de pré-caquexia, sugerindo que seriam necessários fatores adicionais, como a medida da concentração de PCR e presença de perda de apetite, por exemplo, para uma classificação mais exata dos diferentes graus de caguexia (BLUM et al., 2014).

A respeito do estadiamento tumoral, os dados da literatura indicam claramente que a severidade da caquexia não se relaciona com o tamanho ou o estadio do tumor, mesmo aqueles tumores pequenos, como os pancreáticos e os de pulmão, podem levar a um rápido definhamento e à morte dos pacientes, embora as razões para esta paradoxal ausência de correlação permaneça pouco compreendida (PETRUZZELLI; WAGNER, 2016). Conforme podemos observar na tabela 5, os pacientes caquéticos apresentavam diferentes estadios tumorais corroborando dados anteriores do nosso grupo em que a análise histopatológica mostrou, através do teste de variância para analisar a frequência das diferentes fases do tumor e a incidência de caquexia, ocorrência da síndrome de forma independente do estadiamento tumoral (LIMA, 2016).

Nossos resultados indicam ainda uma clara redução na qualidade de vida global em pacientes caquéticos, com aumento dos sinais e sintomas relacionados à síndrome aferidos através do questionário de qualidade de vida (QLQ-C30) no momento da entrevista de

recrutamento dos sujeitos da pesquisa, conforme ilustrado na figura 8. Recentemente, Escamilla e Jarrett (2016) revisaram os dados científicos acerca do impacto da perda de peso em pacientes com câncer e verificaram, entre outras coisas, que a profunda mudança na aparência corporal e a fraqueza física levam, muitas vezes, a um constrangimento que reduz a capacidade física e vontade de socialização dos pacientes. Os estudos de Stamataki et al., (2011), Reid et al., (2009), Mcclement e Harlos (2008) e Hopkinson et al., (2006) identificaram que os pacientes tendem a evitar situações sociais quando experimentaram perda de massa corporal, resultando, portanto, em importante perda de qualidade de vida. Além de corroborarem diversas publicações que investigaram a qualidade de vida de pacientes com caquexia associada ao câncer (KANAT et al., 2013; RUGGERI et al., 2013), estes resultados detêm relevância clínica, pois, segundo Liedman et al., (2001), a identificação correta e consequente controle dos sintomas pode melhorar a qualidade de vida, a composição corporal e a ingestão de alimentos em pacientes com câncer gástrico.

Além da perda de massa corporal e de qualidade de vida, nossos resultados demonstraram que os pacientes caquéticos apresentam concentração sérica de hemoglobina e de albumina diminuída e a de PCR aumentada em relação aos demais grupos estudados, corroborando vasta literatura científica (DOUGLAS; MCMILLAN, 2014; WALLENGREN et al., 2013). O desenvolvimento de anemia associada à caquexia tem sido sugerido como marcador da síndrome (EVANS et al., 2008). A anemia afeta a capacidade dos eritrócitos em entregar oxigênio de forma eficiente para os tecidos periféricos podendo, portando, agravar a perda de massa corporal ao alterar a capacidade tecidual para oxidar substratos energéticos, refletindo em pior prognóstico (DI SEBASTIANO et al., 2013). Contudo, quando avaliamos o conteúdo individual de hemoglobina, verificamos que do total de pacientes com perda significativa de massa corporal, 26,66% apresentaram valores superiores àquele preconizado para que o paciente possa ser considerado caquético, possivelmente refletindo a inflamação crônica também encontrada em alguns pacientes não caquéticos, uma vez que esta leva à anemia secundária através da utilização de ferro na eritropoiese (NAIRZ et al., 2016).

Similarmente, verificamos que apesar da diferença significativa no conteúdo de albumina, por exemplo, estas concentrações $(3,66 \pm 0,15 \text{ g/dL} = 3,8 \pm 0,24 \text{ g/dL} \text{ nos grupos}$ CC SED e CC TR, respectivamente) são superiores àquelas indicadas pelo Consenso Internacional de caquexia para que uma pessoa seja considerada caquética (<3,2 g/dL). Quando avaliamos o conteúdo individual de albumina entre os pacientes não caquéticos,

observamos, no WSC SED, que 20% dos indivíduos apresentavam valores inferiores àquele proposto para o diagnóstico da caquexia. Assim, nossos dados demonstram que a concentração sérica de albumina isoladamente revela inconsistências para a precisa caracterização individual da caquexia. Diversos processos fisiológicos regulam a concentração plasmática de albumina, incluindo a sua síntese, a distribuição entre os compartimentos vascular e extravascular e a perda exógena desta proteína; todos esses processos podem ser afetados pela ingestão dietética de proteínas e pela inflamação, uma vez que a albumina é uma proteína de fase aguda negativa (DON; KAYSEN, 2004; YAMADA et al., 2016). Assim, novos marcadores objetivos ou uma equação que leve em consideração oscilações destes fatores devem ser considerados. Neste sentido, o grupo do Dr. Donald McMillan (Universidade de Glasgow) tem sugerido que marcadores objetivos de inflamação sistêmica devam ter maior relevância no diagnóstico da caquexia (DOUGLAS; MCMILLAN, 2014).

A proteína hepática de fase aguda – PCR tem sido utilizada classicamente como marcador clínico para a avaliação de inflamação sistêmica, embora também seja sensível às infecções casuais (FEARON et al., 2011). Os estudos têm demonstrado uma relação clara entre altas concentrações de PCR, perda de massa corporal e redução da sobrevida (KRZYSTEK-KORPACKA et al., 2008; WALLENGREN et al., 2015). Contudo, observamos novamente incongruências nos pacientes avaliados, quando analisamos as concentrações individuais de PCR, com uma variação de grande magnitude entres os voluntários do mesmo grupo (WSC SED: 0,2 – 12,4 mg/L; WSC TR: 0,7 – 3,0 mg/L; CC SED: 0,5 – 13,8 mg/L e; CC TR: 0,5 – 12,6 mg/L), indicando diferentes graus de inflamação o que, talvez, possa indicar diferentes graus de caquexia (pré-caquexia, caquexia e caquexia refratária). Todavia, seria necessário o acompanhamento individual dos voluntários por maior espaço temporal para que pudéssemos obter resultados mais assertivos.

Embora a adoção de critérios objetivos para o diagnóstico da caquexia permaneça como um desafio internacional, os pesquisadores têm realizado esforço no sentido de padronizar parâmetros que permitam uma estratificação mais precisa dos pacientes. Não obstante, uma triagem individualizada ainda revela inadequações que carecem de maiores estudos para que sejam equacionadas. Recentemente, nosso grupo de pesquisa sugeriu a adoção de alterações no TASC como possíveis marcadores precoces de caquexia, posto que estas alterações estão associadas com mudanças plasmáticas em pacientes caquéticos, refletindo o papel do TAB na inflamação sistêmica, característica da síndrome (BATISTA et al., 2013). Por outro lado, os ensaios clínicos com propostas terapêuticas para

os pacientes caquéticos permanecem distante de qualquer desfecho consensual. Acreditamos que o aspecto multifatorial e multiorgão da síndrome prejudica a obtenção de resultados plenamente satisfatórios para o reestabelecimento da saúde dos pacientes.

Certamente, o tratamento exitoso do tumor primário pode promover melhorias no apetite, na perda de massa muscular e massa corporal total em pacientes com caquexia associada ao câncer (BEHL; JATOI, 2007). Todavia, em diversos casos a caquexia dificulta a tolerância ao tratamento anticâncer (BARRETO et al., 2016; SHIONO et al., 2016). Assim, estratégias alternativas para o tratamento concomitante da síndrome são necessárias para reduzir os sinais e sintomas clínicos e melhorar a gualidade de vida dos pacientes oncológicos (DODSON et al., 2011). Muitos ensaios clínicos têm sido direcionados para a estimulação do apetite dos pacientes, uma vez que a caquexia pode estar associada à anorexia (ARGILÉS et al., 2013; GREIG et al., 2014; WEN et al., 2012) ou para intervenções que promovam anabolismo, visto que uma das características da síndrome é o profundo processo catabólico (DOBS et al., 2013; EBNER et al., 2012). Frequentemente, contudo, essas estratégias têm efeitos momentâneos e com pouca repercussão na qualidade de vida dos pacientes (BEHL; JATOI, 2007; VON HAEHLING; ANKER, 2014). Nos últimos anos, porém, o reconhecimento de que uma das características centrais da caquexia é a inflamação sistêmica crônica tem instigado um número maior de pesquisadores e clínicos para o desenvolvimento de agentes anti-inflamatórios capazes de contra-atacar os sinais e sintomas da síndrome. Entretanto, os efeitos encontrados têm, reiteradamente, ação localizada e, não raras vezes, efeitos colaterais (DAVIS et al., 2012; YENNURAJALINGAM et al., 2012).

Neste cenário, propusemos o TF como estratégia terapêutica para pacientes caquéticos, uma vez que vasta literatura científica vem documentando que o TF possui ação anti-inflamatória sistêmica em diversas condições patofisiológicas (GLEESON et al., 2011), embora não existam, pelo nosso conhecimento, publicações científicas em que estejam inclusos pacientes com caquexia associada ao câncer. Solheim e Laird (2012), propuseram, em revisão, que intervenções com TF poderiam postergar a perda da função física, assim como teriam um potencial para neutralizar diretamente os efeitos patogênicos da caquexia, como a inflamação, por exemplo. O descondicionamento físico, por sua vez, é frequentemente apontado como um efeito da síndrome, promovendo uma maior perda de massa muscular e dessensibilização do tecido muscular para os sinais anabólicos (FEARON, 2011, 2012). Os resultados apresentados na figura 7 corroboram estas proposições, dado que os pacientes caquéticos interromperam a perda de massa corporal

e tiveram ganhos significativos no VO_{2max} e na distância percorrida. Estes dados são consistentes com outras publicações em que o TF foi praticado por pacientes oncológicos (NEWTON et al., 2009; SCHNEIDER et al., 2007), embora estes estudos não mencionem a presença de caquexia entre os voluntários. Schneider et al., (2007) sugeriram que o TF de intensidade moderada é capaz de induzir a manutenção ou melhorar as funções cardiopulmonares com concomitante redução da fadiga em sobreviventes de câncer sem caquexia, durante e após o tratamento.

A este respeito, Drott et al., (1989) avaliaram se pacientes que apresentavam perda de massa corporal, com e sem caquexia, aumentariam as suas concentrações plasmáticas de catecolaminas após a infusão intravenosa de adrenalina, em comparação com os pacientes de peso estável; os autores descobriram que os pacientes com perda de massa corporal tinham maior sensibilidade para adrenalina em relação aos seus respectivos controles, sugerindo que estes pacientes aumentaram tantos as respostas metabólicas quanto as cardiovasculares. Hyltander et al., (1991) relataram que o alto gasto energético é um componente importante para o desenvolvimento de caquexia e correlacionaram este sintoma à maior frequência cardíaca observada em pacientes com câncer. Nossos resultados indicam que os pacientes caquéticos apresentaram uma diminuição significativa (14%) na frequência cardíaca de repouso após a intervenção com TF, corroborando estudo anterior com pacientes com câncer (REPKA et al., 2014).

Adicionalmente, dois dos principais marcadores para o diagnóstico da caquexia (albumina e PCR) foram revertidos a valores normais durante as 6 semanas de execução do protocolo, como verificado nas figuras 13A e 13B. Estes resultados, em humanos, têm corroborado os repetidos achados do nosso grupo de pesquisa em modelo animal (DONATTO et al., 2013; LIRA et al., 2008, 2012), demonstrando a viabilidade e efetividade de uma estratégia anti-inflamatória de baixo custo como adjuvante no tratamento dos pacientes, além de melhorar a capacidade funcional, severamente comprometida pela caquexia.

Nossos resultados mostram ainda que os pacientes dos grupos com caquexia apresentaram concentrações séricas de HDL inferiores àquelas utilizadas classicamente como referência clínica (HELMERSSON-KARLQVIST et al., 2016) e que o exercício físico aeróbio é capaz de reverter este resultado. Estes achados revelam uma outra possibilidade de investigação sobre marcadores para o diagnóstico preciso e precoce da caquexia. Mais recentemente, a literatura científica tem sugerido que a HDL desempenha um papel importante nas doenças crônicas caracterizadas por inflamação sistêmica através da principal fração proteica constituinte desta lipoproteína, a apoliproteina A-1 (apo-A1) (NAVAB et al., 2005; VUILLEUMIER et al., 2013). Por exemplo, em células endoteliais, a HDL inibe a expressão das moléculas de adesão celular VCAM (molécula de adesão celular-vascular)-1, ICAM (molécula de adesão intercelular)-1 e E-selectina (NOFER ET AL., 2003; WADHAM et al., 2004) e o aumento nas concentrações de HDL têm sidos associados com uma diminuição na concentração de moléculas pró-inflamatórias tanto em modelos experimentais quanto em humanos (PURANIK et al., 2008; YAMAGISHI et al., 2009). Contudo, os mecanismos exatos ainda são obscuros.

Em relação à composição corporal, a avaliação através do uso de DEXA pode ser particularmente importante no diagnóstico da caquexia associada ao câncer e na quantificação da perda de massa muscular e gordura corporal (DODSON et al., 2011). Nossos resultados indicaram um ganho de massa muscular, especialmente no tronco dos pacientes com câncer ao longo das seis semanas de TF, contudo, sem diferença significativa entre os grupos. Ao contrário, a gordura corporal foi menor nos pacientes caquéticos e reduziu ligeiramente ao longo de seis semanas, tanto para WSC TR quanto para CC TR, embora a magnitude de perda tenha sido menor entre os pacientes com câquexia. Nilsen et al., (2015) observaram efeitos positivos do TF de força apenas na massa muscular de pacientes com câncer de próstata, sem relatos de caquexia, submetidos à terapia de privação androgênica. Wallengren et al. (2015) também verificaram redução da massa muscular ao longo de 2 anos de acompanhamento dos pacientes com PCR mais elevada; contudo, neste estudo, os autores suprimiram os dados referentes à gordura corporal.

Resultados iniciais já publicados mostram modificação na morfologia do TASC de pacientes caquéticos com tumor gastrintestinal, consistente com aumento de áreas de fibrose e redução do perímetro e da área seccional dos adipócitos (BATISTA Jr. et al., 2015, **ANEXO E**). Bing e Trayhurn (2009) relataram remodelamento, com redução dramática no tamanho dos adipócitos, e alterações ultraestruturais no tecido adiposo de camundongos portadores do tumor MAC16. De maneira similar, Tsoli et al., (2014) revelaram redução drástica do tecido adiposo de camundongos caquéticos que apresentaram adipócitos mais poligionais. Os nossos dados atuais confirmam os achados do estudo anterior e demonstram ainda que a morfologia do TASC dos pacientes submetidos ao TF não sofreu as modificações verificadas entre os pacientes sedentários, revelando um efeito protetor do TF. Kawanishi et al., (2013) verificaram que a morfologia do tecido adiposo visceral de

95

camundongos obesos submetidos ao TF aeróbio por 16 semanas foi preservada em comparação com a do tecido de animais obesos sedentários; e, adicionalmente, apresentava uma menor infiltração de macrófagos. Dados anteriores do nosso laboratório também mostram menor infiltração monocitária com preservação morfológica no tecido adiposo epididimal e retroperitoneal de ratos com tumor submetidos ao TF aeróbio (LIRA et al., 2012). Embora fenotipicamente opostos, em ambos os casos, a manutenção da morfologia e a menor infiltração imunitária estava associada à redução da inflamação no tecido adiposo dos animais treinados.

Na caquexia associada ao câncer, havíamos previamente mostrado que o tecido adiposo branco é um potencial coadjutor para a inflamação sistêmica, uma vez que, além do rearranjo morfológico, tem aumento significativo na infiltração de células imunitárias em associação com incremento robusto na síntese de fatores inflamatórios (BATISTA et al., 2012, 2015; MACHADO et al., 2004; NEVES et al., 2016), além de correlação positiva com os mediadores inflamatórios do tumor (DE MATOS-NETO et al., 2015, **ANEXO F**). No estudo atual, encontramos uma população de macrófagos e MDSC infiltrados nos TASC dos pacientes caquéticos, apesar da ausência de diferença estatística entre os grupos avaliados no que diz respeito à predominância de diferentes tipos de macrófagos (M1M2, M1 e M2) e de MDSC.

Ademais, havíamos relatado previamente que a expressão gênica do fator de transcrição envolvido na resposta celular a estímulos inflamatórios, o NF_KBp65, está aumentada no TASC de pacientes caquéticos, concomitantemente à regulação dos seus genes-alvo inflamatórios IL-1 β , TNF- α , CCL2 e IKB- α (CAMARGO et al., 2015, **ANEXO G**). Haugen et al., (2011) também encontraram alterações na expressão gênica, incluindo o TNF- α e o CCL2, no tecido adiposo intra-abdominal, o que foi associado à redução da massa gorda em pacientes com câncer pancreático. Nossos dados corroboram os estudos anteriores e ainda evidenciam um efeito positivo do TF, visto que a expressão gênica de IL-1 β não estava aumentada no TASC dos pacientes caquéticos treinados e a expressão gênica de IL-1 β não estava aumentada no TASC dos pacientes caquéticos treinados e a expressão gênica de IL-1 β não estava aumentada no TASC dos pacientes caquéticos treinados e a expressão gênica de IL-1 β não estava aumentada no TASC dos pacientes caquéticos treinados e a expressão gênica de IL-1 β não estava aumentada no TASC dos pacientes caquéticos treinados e a expressão gênica de IL-1 β , TNF- α e IL-10 no tecido adiposo de camundongos obesos.

Em adição, verificamos que a citocinas que detêm ação anti-inflamatória local estavam aumentadas no TASC e no músculo esquelético entre todos os grupos que foram submetidos ao protocolo de TF, confirmando os resultados prévios do nosso grupo de

pesquisa em que o TF aeróbio induziu aumento na secreção de adipocinas antiinflamatórias no TAB de ratos, exercendo importante modulação neste tecido, que resulta numa ação anti-inflamatória sistêmica (LIRA et al., 2009, 2012).

O resultado da expressão proteica de IL-6 no plasma dos pacientes caquéticos e no musculo esquelético de todos os pacientes treinados inicialmente parece paradoxal, visto que esta molécula é frequentemente descrita como uma adipocina pró-inflamatória envolvida em diversas patologias caracterizadas por inflamação sistêmica (CAREY et al., 2004: SIMONS et al., 2007) e, sob condições patológicas, a IL-6 promove atrofia muscular (BALTGALVIS et al., 2008). Contudo, diversas evidências científicas indicam que, durante a realização do exercício físico, a síntese de IL-6 no musculo esquelético (aqui denominada miocina) aumenta exponencialmente (PEDERSEN, 2009; STEENSBERG et al., 2002). Os estudos indicam que IL-6 participa do reparo tecidual após lesão do musculo esquelético provocada pelo exercício físico (BENATTI; PEDERSEN, 2014), promovendo a proliferação de células satélites, assim como IL-7, e sua incorporação como novos mionúcleos dentro do sincício de fibras já existentes (BELIZÁRIO et al., 2016; HAUGEN et al., 2010). Assim, acreditamos que estas moléculas possam exercer efeitos locais contrários àqueles promovidos cronicamente pela caquexia, subsidiando o ganho de massa muscular observados a partir avaliação por DEXA, resultando, enfim, na cessação da perda de massa corporal do CC TR observada na figura 10. Contudo, os possíveis mecanismos através dos quais se dá essa mediação, permanecem obscuros.

O TF consiste de repetições frequentes de sessões agudas de exercício físico ao longo do tempo, seguidas por períodos mais longos de recuperação. Desta forma, o TF e o exercício agudo representam duas situações distintas com diferentes impactos sobre o organismo dos praticantes (DETHLEFSEN et al., 2016). Cronicamente, o TF promove melhoria no nível de condicionamento físico, na adequação da composição corporal, na regulação cronobiológica, na redução de fatores inflamatórios, entre outros benefícios (GLEESON et al., 2011; WATERHOUSE, 2010). Durante a realização do exercício físico agudo, ocorrem profundas elevações, embora transientes, nos hormônios circulantes, nas adipocitocinas e alterações no perfil das células imunitárias (KRZYWKOWSKI et al., 2001; PEDERSEN; HOFFMAN-GOETZ, 2000; ZOUHAL et al., 2008), criando um ambiente inflamatório responsável por promover as adaptações necessárias à sessão aguda de exercício físico (ALLEN et al., 2015).

De uma maneira geral, observamos uma incapacidade, sobretudo dos pacientes caquéticos, para responder adequadamente ao estímulo agudo do exercício físico no

baseline e na terceira semana do protocolo de treinamento, como mostrado nas figuras 28C-D e 32C-D, em que as concentrações de IL-7 e IL-10, respectivamente não aumentaram após o exercício físico agudo. Entretanto, após seis semanas de repetidos estímulos agudos, o CC TR foi responsivo ao exercício físico, demonstrando uma capacidade de adaptação com o TF crônico, que acreditamos ser um achado de grande relevância. Dethlefsen et al., (2016) constataram que uma única sessão de 2h de exercício físico é capaz de elevar a inflamação aguda, reduzindo a viabilidade de adenocarcinoma de mama de mulheres sem caquexia.

Quando avaliamos o efeito sistêmico crônico do TF, verificamos uma acentuada redução nas concentrações das citocinas descritas como pró-inflamatórias guando circulantes, como EGF, G-CSF, IL-6, IL-7 e TNF-β, sobretudo, a partir da terceira semana de intervenção e aumento consistente na citocina IL-8, um mediador inflamatório importante (DONG; ZHENG, 2015), após o estimulo do TF, permitindo inferir que as alterações locais repercutem sistemicamente em pacientes caquéticos submetidos ao protocolo de TF. Curiosamente, observamos um padrão similar de elevação nas concentrações circulantes da maioria dos mediadores inflamatórios entre o baseline e a terceira semana para, enfim, reduzir até o final do protocolo. Tipicamente, as adipocitocinas pró-inflamatórias são as primeiras a serem liberadas na circulação durante o exercício físico e, em contrapartida, aquelas de ação anti-inflamatória são liberadas em seguida, promovendo, cronicamente, o efeito anti-inflamatório do exercício físico (PEDERSEN, 2009). Os resultados deste estudo corroboram os diversos experimentos em modelo de caquexia animal do nosso laboratório que têm revelado consistentemente uma ação anti-inflamatória sistêmica e local do TF (DONATTO et al., 2013; LIRA et al., 2010, 2012). Contudo, pelo nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a mostrar esta ação anti-inflamatória do TF em pacientes com caquexia associada ao câncer.

Além das dificuldades típicas de estudos com humanos, uma limitação do nosso estudo é que o VO_{2max} foi estimado pelo teste submáximo, conforme descrito anteriormente, sem avaliação direta no consumo de oxigênio e isso precisa ser levado em consideração para a avaliação dos dados. No entanto, a redução significativa da frequência cardíaca de repouso e o aumento na quilometragem percorrida ao longo das seis semanas de intervenção indicam melhoria cardiovascular e funcional inequívocas.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Observados em conjunto, estes resultados mostram que o TAB contribui para a inflamação característica da caquexia e que o TF exerce efeitos benéficos, apresentando mudança de *status* em pacientes com caquexia associada ao câncer. Estes efeitos compreendem modulação anti-inflamatória local e sistêmica, notáveis ganhos cardiorrespiratórios e recuperação dos biomarcadores utilizados para o diagnóstico caquexia, com cessação da perda de massa corporal.

Demonstramos pela primeira vez que, além de reduzir a incidência de tumor e contribuir na recuperação de sobreviventes de câncer, como amplamente discutido na literatura, o treinamento físico, de intensidade moderada é útil também para pacientes no pré-operatório.

Assim, a estratégia adotada induz, mesmo na ausência de qualquer tratamento farmacológico, marcadas melhorias no quadro sintomático dos pacientes, de forma segura e com baixo custo.

REFERÊNCIAS*

AL-MAJID, S.; WATERS, H. The biological mechanisms of cancer-related skeletal muscle wasting: The role of progressive resistance exercise. **Biol. Res. For Nurs.** v. 10, n. 1, p. 7-20, JUL 2008.

ALLEN, J.; SUN, Y.; WOODS, J. A. Exercise and the Regulation of Inflammatory Responses. **Prog Mol Biol Transl Sci**, v. 135, p. 337-354, 2015.

ANKER, S. D.; VON HAEHLING, S. Efforts begin to sprout: publications in JCSM on cachexia, sarcopenia and muscle wasting receive attention. **J. Cac. Sarc. Mus.,** v. 5, n. 3, p. 171-176, Sep 2014.

ARGILES, J. et al. Cancer cachexia: understanding the molecular basis. **Nat. Rev. Cancer**, v. 14, n. 11, p. 754-762, NOV 2014.

ARGILÉS, J. M.; ANGUERA, A.; STEMMLER, B. A new look at an old drug for the treatment of cancer cachexia: megestrol acetate. **Clin. Nutr.,** v. 32, n. 3, p. 319-324, Jun 2013.

ARGILÉS, J. M. et al. Optimal management of cancer anorexia-cachexia syndrome. **Cancer Manag. Res.,** v. 2, p. 27-38, 2010.

_____. Nonmuscle Tissues Contribution to Cancer Cachexia. **Mediators Inflamm.,** v. 2015, p. 182872, 2015.

ARTHUR, S. T. et al. One-year prevalence, comorbidities and cost of cachexia-related inpatient admissions in the USA. **Drugs Context**, v. 3, p. 212265, 2014.

BACURAU, R. et al. Effect of a moderate intensity exercise training protocol on the metabolism of macrophages and lymphocytes of tumour-bearing rats. **Cell Bioc. and Func.,** v. 18, n. 4, p. 249-258, DEC 2000.

BALTGALVIS, K. A. et al. Interleukin-6 and cachexia in ApcMin/+ mice. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 294, n. 2, p. R393-401, Feb 2008.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002. BARRETO, R. et al. Chemotherapy-related cachexia is associated with mitochondrial depletion and the activation of ERK1/2 and p38 MAPKs. **Oncotarget**, Jun 2016.

BATISTA JR., M. L. et al. Cachexia-associated adipose tissue morphological rearrangement in gastrointestinal cancer patients **Journal of Cachexia**, **Sarcopenia and Muscle**, v. 7, p 37-47. 2016.

BATISTA, M. L. et al. Cachexia-associated adipose tissue morphological rearrangement in gastrointestinal cancer patients. **J Cachexia Sarcopenia Muscle**, v. 7, n. 1, p. 37-47, Mar 2016.

_____. Heterogeneous time-dependent response of adipose tissue during the development of cancer cachexia. **J Endocrinol,** v. 215, n. 3, p. 363-373, Dec 2012.

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

_____. Adipose tissue inflammation and cancer cachexia: possible role of nuclear transcription factors. **Cytokine**, v. 57, n. 1, p. 9-16, Jan 2012.

BECHER, P. et al. [Intraabdominal dermoid cyst in the differential diagnosis of ascites]. **Dtsch Med Wochenschr,** v. 132, n. 45, p. 2375-2387, Nov 2007.

BEHL, D.; JATOI, A. Pharmacological options for advanced cancer patients with loss of appetite and weight. **Expert Opin Pharmacother,** v. 8, n. 8, p. 1085-1090, Jun 2007.

BELIZÁRIO, J. E. et al. Skeletal muscle wasting and renewal: a pivotal role of myokine IL-6. **Springerplus,** v. 5, p. 619, 2016.

BENATTI, F.; PEDERSEN, B. Exercise as an anti-inflammatory therapy for rheumatic diseases—myokine regulation **Nat. Rev. Rheumatol**, v. 11, n.9, p 86-97, 2014.

BERTEVELLO, P. S.; SEELAENDER, M. C. Heterogeneous response of adipose tissue to cancer cachexia. **Braz J Med Biol Res**, v. 34, n. 9, p. 1161-1167, Sep 2001.

BING, C. et al. Increased gene expression of brown fat uncoupling protein (UCP)1 and skeletal muscle UCP2 and UCP3 in MAC16-induced cancer cachexia. **Cancer Res**, v. 60, n. 9, p. 2405-2410, May 2000.

BING, C.; TRAYHURN, P. New insights into adipose tissue atrophy in cancer cachexia. **Proc Nutr Soc,** v. 68, n. 4, p. 385-392, Nov 2009.

BLUM, D. et al. Validation of the Consensus-Definition for Cancer Cachexia and evaluation of a classification model--a study based on data from an international multicentre project (EPCRC-CSA). **Ann Oncol,** v. 25, n. 8, p. 1635-1642, Aug 2014.

BODDAERT, M. S.; GERRITSEN, W. R.; PINEDO, H. M. On our way to targeted therapy for cachexia in cancer? **Curr Opin Oncol**, v. 18, n. 4, p. 335-340, Jul 2006.

BOOTH, A. et al. Adipose tissue: an endocrine organ playing a role in metabolic regulation. **Horm Mol Biol Clin Investig,** v. 26, n. 1, p. 25-42, Apr 2016.

BRAKE, D. K.; SMITH, C. W. Flow cytometry on the stromal-vascular fraction of white adipose tissue. **Methods Mol Biol**, v. 456, p. 221-229, 2008.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **J Mol Endocrinol,** v. 25, n. 2, p. 169-193, Oct 2000.

CAHLIN, C. et al. Experimental cancer cachexia: the role of host-derived cytokines interleukin (IL)-6, IL-12, interferon-gamma, and tumor necrosis factor alpha evaluated in gene knockout, tumor-bearing mice on C57 BI background and eicosanoid-dependent cachexia. **Cancer Res**, v. 60, n. 19, p. 5488-5493, Oct 2000.

CAMARGO, R. G. et al. NF-kBp65 and Expression of Its Pro-Inflammatory Target Genes Are Upregulated in the Subcutaneous Adipose Tissue of Cachectic Cancer Patients. **Nutr.**, v. 7, n. 6, p. 4465-4479, Jun 2015.

CAREY, A. L. et al. Interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha are not increased in patients with Type 2 diabetes: evidence that plasma interleukin-6 is related to fat mass and not insulin responsiveness. **Diabetol**, v. 47, n. 6, p. 1029-1037, Jun 2004.

CRAWFORD, J. Clinical results in cachexia therapeutics. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care,** v. 19, n. 3, p. 199-204, May 2016.

CUENCA AG, et al. Novel role for tumor-induced expansion of myeloid-derived cells in cancer cachexia. **J Immunol**. 192(12):6111-6119, 2014.

DALAMAGA, M. Interplay of adipokines and myokines in cancer pathophysiology: Emerging therapeutic implications. **World J Exp Med,** v. 3, n. 3, p. 26-33, Aug 2013.

DALAMAGA, M.; DIAKOPOULOS, K. N.; MANTZOROS, C. S. The role of adiponectin in cancer: a review of current evidence. **Endocr Rev**, v. 33, n. 4, p. 547-594, 2012.

DAS, S. K.; HOEFLER, G. The role of triglyceride lipases in cancer associated cachexia. **Trends Mol Med,** v. 19, n. 5, p. 292-301, May 2013.

DAVIS, M. et al. A Phase II dose titration study of thalidomide for cancer-associated anorexia. **J Pain Symptom Manage**, v. 43, n. 1, p. 78-86, Jan 2012.

DE MATOS-NETO, E. M. et al. Systemic Inflammation in Cachexia - Is Tumor Cytokine Expression Profile the Culprit? **Front Immunol**, v. 6, p. 629-240, 2015.

DETHLEFSEN, C. et al. Exercise regulates breast cancer cell viability: systemic training adaptations versus acute exercise responses. **Breast Cancer Res Treat**, v. 159, n. 3, p. 469-479, Oct 2016.

DI SEBASTIANO, K. M. et al. Accelerated muscle and adipose tissue loss may predict survival in pancreatic cancer patients: the relationship with diabetes and anaemia. **Br J Nutr,** v. 109, n. 2, p. 302-312, Jan 2013.

DIMEO, F. et al. Effects of aerobic exercise on the physical performance and incidence of treatment-related complications after high-dose chemotherapy. **Blood**, v. 90, n. 9, p. 3390-3394, NOV 1 1997.

DOBS, A. S. et al. Effects of enobosarm on muscle wasting and physical function in patients with cancer: a double-blind, randomised controlled phase 2 trial. **Lancet Oncol**, v. 14, n. 4, p. 335-345, Apr 2013.

DODSON, S. et al. Muscle wasting in cancer cachexia: clinical implications, diagnosis, and emerging treatment strategies. **Annu Rev Med**, v. 62, p. 265-279, 2011.

DOEHNER, W.; ANKER, S. D. Cardiac cachexia in early literature: a review of research prior to Medline. **Int J Cardiol,** v. 85, n. 1, p. 7-14, Sep 2002.

DON, B. R.; KAYSEN, G. Serum albumin: relationship to inflammation and nutrition. **Semin Dial**, v. 17, n. 6, p. 432-437, Nov-Dec 2004.

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

DONG, R.; ZHENG, S. Interleukin-8: A critical chemokine in biliary atresia. **J Gastroenterol Hepatol,** v. 30, n. 6, p. 970-976, Jun 2015.

DOUGLAS, E.; MCMILLAN, D. Towards a simple objective framework for the investigation and treatment of cancer cachexia: The Glasgow Prognostic Score. **Cancer Treat. Reviews,** v. 40, n. 6, p. 685-691, JUL 2014.

DROTT, C.; PERSSON, H.; LUNDHOLM, K. Cardiovascular and metabolic response to adrenaline infusion in weight-losing patients with and without cancer. **Clin Physiol**, v. 9, n. 5, p. 427-39, Oct 1989.

EBADI, M.; MAZURAK, V. C. Evidence and mechanisms of fat depletion in cancer. **Nutr.,** v. 6, n. 11, p. 5280-5297, Nov 2014.

EBNER, N. et al. Recent developments in the treatment of cachexia: highlights from the 6th Cachexia Conference. **J Cac. Sarc. Muscle**, v. 3, n. 1, p. 45-50, Mar 2012.

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. 1471-1484, Jun 2010.

ELLIS, K. J. Human body composition: in vivo methods. **Physiol Rev,** v. 80, n. 2, p. 649-680, Apr 2000.

ESCAMILLA, D. M.; JARRETT, P. The impact of weight loss on patients with cancer. **Nurs Times,** v. 112, n. 11, p. 20-32, 2016.

EVANS, W. et al. Cachexia: A new definition. **Clinical Nutrition,** v. 27, n. 6, p. 793-799, DEC 2008.

FABER, J. et al. Impaired immune function: an early marker for cancer cachexia. **Oncol Rep,** v. 22, n. 6, p. 1403-1416, Dec 2009.

FARKAS, J. et al. Cachexia as a major public health problem: frequent, costly, and deadly. **J Cac. Sarc. Musc.**, v. 4, n. 3, p. 173-178, Sep 2013.

FEARON, K.; ARENDS, J.; BARACOS, V. Understanding the mechanisms and treatment options in cancer cachexia. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 10, n. 2, p. 90-99, Feb 2013.

FEARON, K. et al. Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. **Lancet Oncol**, v. 12, n. 5, p. 489-495, May 2011.

FEARON, K. C. Cancer cachexia and fat-muscle physiology. **N Engl J Med**, v. 365, n. 6, p. 565-577, Aug 2011.

FEARON, K. C.; GLASS, D. J.; GUTTRIDGE, D. C. Cancer cachexia: mediators, signaling, and metabolic pathways. **Cell Metab**, v. 16, n. 2, p. 153-166, Aug 2012.

FONSECA-ALANIZ, M. H. et al. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. **J Pediatr (Rio J)**, v. 83, n. 5 Suppl, p. S192-203, Nov 2007.

FOULADIUN, M. et al. Body composition and time course changes in regional distribution of fat and lean tissue in unselected cancer patients on palliative care--correlations with food intake, metabolism, exercise capacity, and hormones. **Cancer**, v. 103, n. 10, p. 2189-2198, May 2005.

FRAJACOMO, F. T. et al. Solid Ehrlich carcinoma reproduces functional and biological characteristics of cancer cachexia. **Life Sci**, v. 16, p 30471-30484, Aug 2016.

GLEESON, M. et al. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. **Nat Rev Immunol,** v. 11, n. 9, p. 607-615, Sep 2011.

GRANDE, A. J. et al. Exercise for cancer cachexia in adults. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 11, p. CD010804, 2014.

GREIG, C. A. et al. Phase I/II trial of formoterol fumarate combined with megestrol acetate in cachectic patients with advanced malignancy. **Sup. Care Cancer,** v. 22, n. 5, p. 1269-1275, May 2014.

HAUGEN, F. et al. Altered expression of genes in adipose tissues associated with reduced fat mass in patients with pancreatic cancer. **Arch Physiol Biochem**, v. 117, n. 2, p. 78-87, May 2011.

_____. IL-7 is expressed and secreted by human skeletal muscle cells. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 298, n. 4, p. C807-816, Apr 2010.

HELMERSSON-KARLQVIST, J. et al. Reference values for 34 frequently used laboratory tests in 80-year-old men and women. **Maturitas**, v. 92, p. 97-101, Oct 2016.

HOJMAN, P. et al. Exercise-induced muscle-derived cytokines inhibit mammary cancer cell growth. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 301, n. 3, p. E504-510, Sep 2011.

HOPKINSON, J. B. et al. The prevalence of concern about weight loss and change in eating habits in people with advanced cancer. **J Pain Symptom Manage**, v. 32, n. 4, p. 322-331, Oct 2006.

HYLTANDER, A. et al. The effect on body composition and exercise performance of home parenteral nutrition when given as adjunct to chemotherapy of testicular carcinoma. **Eur J Clin Invest,** v. 21, n. 4, p. 413-420, Aug 1991.

ITOH, M. et al. Adipose tissue remodeling as homeostatic inflammation. **Int J Inflam,** v. 2011, p. 720926, 2011.

JOHNS, N.; GREIG, C.; FEARON, K. C. Is tissue cross-talk important in cancer cachexia? **Crit Rev Oncog,** v. 17, n. 3, p. 263-276, 2012.

JOHNS, N.; STEPHENS, N. A.; FEARON, K. C. Muscle wasting in cancer. Int J Biochem Cell Biol, v. 45, n. 10, p. 2215-2229, Oct 2013.

KANAT, O. et al. Comparison of three different treatment modalities in the management of cancer cachexia. **Tumori,** v. 99, n. 2, p. 229-233, 2013.

KATZ AM; PB, K. Diseases of the heart in the works of Hippokrates **Br Heart J,** v. 24, p. 257–264, 1962.

KATZ, A. M.; KATZ, P. B. Diseases of the heart in the works of Hippocrates. **Br Heart J,** v. 24, p. 257-264, May 1962.

KAWANISHI, N. et al. Exercise attenuates M1 macrophages and CD8+ T cells in the adipose tissue of obese mice. **Med Sci Sports Exerc,** v. 45, n. 9, p. 1684-1693, Sep 2013.

KHAN, S.; TISDALE, M. J. Catabolism of adipose tissue by a tumour-produced lipidmobilising factor. **Int J Cancer**, v. 80, n. 3, p. 444-447, Jan 1999.

KLINE, G. et al. ESTIMATION OF VO2MAX FROM A ONE-MILE TRACK WALK, GENDER, AGE, AND BODY-WEIGHT. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 19, n. 3, p. 253-259, JUN 1987.

KRZYSTEK-KORPACKA, M. et al. Acute-phase response proteins are related to cachexia and accelerated angiogenesis in gastroesophageal cancers. **Clin Chem Lab Med**, v. 46, n. 3, p. 359-364, 2008.

KRZYWKOWSKI, K. et al. Effect of glutamine supplementation on exercise-induced changes in lymphocyte function. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 281, n. 4, p. C1259-1265, Oct 2001.

KUSMARTSEV, S. et al. All-trans-retinoic acid eliminates immature myeloid cells from tumor-bearing mice and improves the effect of vaccination. **Cancer Res,** v. 63, n. 15, p. 4441-4449, Aug 2003.

LAVIANO, A.; KOVERECH, A.; MARI, A. Cachexia: clinical features when inflammation drives malnutrition. **Proc Nutr Soc,** v. 74, n. 4, p. 348-354, Nov 2015.

LELBACH, A.; MUZES, G.; FEHER, J. Current perspectives of catabolic mediators of cancer cachexia. **Med Sci Monit,** v. 13, n. 9, p. RA168-173, Sep 2007.

LIEDMAN, B. et al. Symptom control may improve food intake, body composition, and aspects of quality of life after gastrectomy in cancer patients. **Dig Dis Sci**, v. 46, n. 12, p. 2673-2680, Dec 2001.

LIMA, J. D. C. C. **O papel do infiltrado inflamatório no tumor e sua contribuição para inflamação sistêmica e desenvolvimento da caquexia.** 2016. 96 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

LINDEN, M. A. et al. Moderate exercise training provides modest protection against adipose tissue inflammatory gene expression in response to high-fat feeding. **Physiol Rep**, v. 2, n. 7, e12071,2014.

LIRA, F. et al. Effect of endurance training upon lipid metabolism in the liver of cachectic tumour-bearing rats. **Cell Biochemistry and Function**, v. 26, n. 6, p. 701-708, AUG 2008.

_____. Exercise Training Reduces PGE(2) Levels and Induces Recovery from Steatosis in Tumor-bearing Rats. **Hormone and Metabolic Research,** v. 42, n. 13, p. 944-949, DEC 2010.

LIRA, F. S. et al. Endurance training induces depot-specific changes in IL-10/TNF-alpha ratio in rat adipose tissue. **Cytokine**, v. 45, n. 2, p. 80-95, Feb 2009.

_____. Exercise training decreases adipose tissue inflammation in cachectic rats. **Horm Metab Res,** v. 44, n. 2, p. 91-108, Feb 2012.

_____. Hypothalamic inflammation is reversed by endurance training in anorectic-cachectic rats. **Nutr Metab (Lond),** v. 8, n. 1, p. 60-71, 2011.

LOK, C. Cachexia: The last illness. Nature, v. 528, n. 7581, p. 182-193, Dec 2015.

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

MARTIN, L. et al. Diagnostic criteria for the classification of cancer-associated weight loss. **J Clin Oncol**, v. 33, n. 1, p. 90-109, Jan 2015.

MCCLEMENT, S. E.; CHOCHINOV, H. M. Hope in advanced cancer patients. **Eur J Cancer**, v. 44, n. 8, p. 1169-1174, May 2008.

MCCLEMENT, S. E.; HARLOS, M. When advanced cancer patients won't eat: family responses. Int J Palliat Nurs, v. 14, n. 4, p. 182-198, Apr 2008.

MOLFINO, A. et al. Novel therapeutic options for cachexia and sarcopenia. **Expert Opin Biol Ther,** v. 16, n. 10, p. 1239-1254, Oct 2016.

MURPHY, A. J. et al. IL-18 Production from the NLRP1 Inflammasome Prevents Obesity and Metabolic Syndrome. **Cell Metab,** v. 23, n. 1, p. 155-164, Jan 2016.

MURPHY, R. A. et al. Loss of adipose tissue and plasma phospholipids: relationship to survival in advanced cancer patients. **Clin Nutr,** v. 29, n. 4, p. 482-497, Aug 2010.
MÜLLER, H. **TUDO O QUE TENHO LEVO COMIGO**. São Paulo: Companhia das Letras, 298 p.,2009.

NAGARAJ, S.; GABRILOVICH, D. I. Myeloid-derived suppressor cells. **Adv Exp Med Biol**, v. 601, p. 213-223, 2007.

NAIRZ, M. et al. Iron deficiency or anemia of inflammation? : Differential diagnosis and mechanisms of anemia of inflammation. **Wien Med Wochenschr**, Aug 2016.

NAKAMURA, Y. et al. [Case of the multiple liver metastases from colon cancer obtained long-term disease-free survival with multimodality therapy]. **Gan To Kagaku Ryoho**, v. 39, n. 12, p. 2228-2230, Nov 2012.

NAVAB, M.; ANANTHARAMAIAH, G. M.; FOGELMAN, A. M. An apolipoprotein A-I mimetic works best in the presence of apolipoprotein A-I. **Circ Res**, v. 97, n. 11, p. 1085-1096, Nov 2005.

NEVES, R. X. et al. White adipose tissue cells and the progression of cachexia: inflammatory pathways. **J Cachexia Sarcopenia Muscle,** v. 7, n. 2, p. 193-203, May 2016.

NEWTON, R. U. et al. A phase III clinical trial of exercise modalities on treatment sideeffects in men receiving therapy for prostate cancer. **BMC Cancer**, v. 9, p. 210-219, 2009.

NILSEN, T. S. et al. Effects of strength training on body composition, physical functioning, and quality of life in prostate cancer patients during androgen deprivation therapy. **Acta Oncol**, v. 54, n. 10, p. 1805-1813, Nov 2015.

NOFER, J. R. et al. High density lipoprotein-associated lysosphingolipids reduce E-selectin expression in human endothelial cells. **Biochem Biophys Res Commun,** v. 310, n. 1, p. 98-103, Oct 2003.

ORCI, L. et al. Rapid transformation of white adipocytes into fat-oxidizing machines. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 101, n. 7, p. 2058-2063, Feb 2004.

PALIATIVOS, A. B. D. C. **Consenso brasileiro de caquexia/anorexia em cuidados paliativos**: Rev Bras Cuid Paliativos. 3: 3-42 p. 2011.

PEDERSEN, B. K. The diseasome of physical inactivity--and the role of myokines in muscle--fat cross talk. **J Physiol**, v. 587, n. Pt 23, p. 5559-5668, Dec 2009.

PEDERSEN, B. K.; HOFFMAN-GOETZ, L. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. **Physiol Rev**, v. 80, n. 3, p. 1055-1081, Jul 2000.

PEINADO, J. R. et al. The stromal-vascular fraction of adipose tissue contributes to major differences between subcutaneous and visceral fat depots. **Proteomics**, v. 10, n. 18, p. 3356-3366, Sep 2010.

PENNA, F. et al. Anti-cytokine strategies for the treatment of cancer-related anorexia and cachexia. **Expert Opin Biol Ther**, v. 10, n. 8, p. 1241-1250, Aug 2010.

PETRUZZELLI, M.; WAGNER, E. F. Mechanisms of metabolic dysfunction in cancerassociated cachexia. **Genes Dev,** v. 30, n. 5, p. 489-501, Mar 2016.

PORPORATO, P. E. Understanding cachexia as a cancer metabolism syndrome. **Oncog.**, v. 5, p. e200, 2016.

PURANIK, R. et al. Low dose apolipoprotein A-I rescues carotid arteries from inflammation in vivo. **Atheroscl.**, v. 196, n. 1, p. 240-257, Jan 2008.

QUINN, L. S. et al. Oversecretion of interleukin-15 from skeletal muscle reduces adiposity. **Am J Physiol Endocrinol Metab,** v. 296, n. 1, p. E191-202, Jan 2009.

REID, G. S. et al. Interferon-gamma-dependent infiltration of human T cells into neuroblastoma tumors in vivo. **Clin Cancer Res,** v. 15, n. 21, p. 6602-6618, Nov 2009.

RENÉ, A. A. et al. Mortality in the slave and white populations of Natchitoches Parish, Louisiana, 1850. **J Natl Med Assoc,** v. 84, n. 9, p. 805-811, Sep 1992.

REPKA, C. P. et al. Cancer type does not affect exercise-mediated improvements in cardiorespiratory function and fatigue. **Integr Cancer Ther,** v. 13, n. 6, p. 473-481, Nov 2014.

RUGGERI, E. et al. Home artificial nutrition in advanced cancer patients. **Tumori,** v. 99, n. 2, p. 218-224, 2013 Mar-Apr 2013.

SCHNEIDER, C. M. et al. Exercise training manages cardiopulmonary function and fatigue during and following cancer treatment in male cancer survivors. **Integr Cancer Ther,** v. 6, n. 3, p. 235-241, Sep 2007.

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. 562-576, Aug 2012.

_____. Inflammation in Cachexia. **Mediators Inflamm,** v. 2015, p. 536954, 2015.

SETHI, J. K.; VIDAL-PUIG, A. J. Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. **J Lipid Res**, v. 48, n. 6, p. 1253-1262, Jun 2007.

SHIONO, M. et al. An analysis of the relationship between metastases and cachexia in lung cancer patients. **Cancer Med**, v. 29, n.4, 482-497, Aug 2016.

SILVERIO, R. et al. L-Carnitine induces recovery of liver lipid metabolism in cancer cachexia. **Amino Acids**, v. 42, n. 5, p. 1783-1792, MAY 2012.

SIMONS, P. J. et al. Pro-inflammatory delipidizing cytokines reduce adiponectin secretion from human adipocytes without affecting adiponectin oligomerization. **J Endocrinol**, v. 192, n. 2, p. 289-299, Feb 2007.

SOLHEIM, T. S.; LAIRD, B. J. Evidence base for multimodal therapy in cachexia. **Curr Opin Support Palliat Care,** v. 6, n. 4, p. 424-431, Dec 2012.

STAMATAKI, Z.; BURDEN, S.; MOLASSIOTIS, A. Weight changes in oncology patients during the first year after diagnosis: a qualitative investigation of the patients' experiences. **Cancer Nurs**, v. 34, n. 5, p. 401-419, 2011 Sep-Oct 2011.

STEENSBERG, A. et al. IL-6 and TNF-alpha expression in, and release from, contracting human skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab,** v. 283, n. 6, p. E1272-1288, Dec 2002.

SUGANAMI, T.; OGAWA, Y. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. **J Leukoc Biol**, v. 88, n. 1, p. 33-49, Jul 2010.

SUGANAMI, T.; TANAKA, M.; OGAWA, Y. Adipose tissue inflammation and ectopic lipid accumulation. **Endocr J,** v. 59, n. 10, p. 849-857, 2012.

TAZI, E.; ERRIHANI, H. Treatment of cachexia in oncology. **Indian J Palliat Care,** v. 16, n. 3, p. 129-137, Sep 2010.

TISDALE, M. J. Tumor-host interactions. **J Cell Biochem**, v. 93, n. 5, p. 871-887, Nov 2004.

TODOROV, P. et al. Characterization of a cancer cachectic factor. **Nature**, v. 379, n. 6567, p. 739-742, Feb 1996.

TRINCHIERI, G. Inflammation in cancer: a therapeutic target? **Oncology (Williston Park)**, v. 25, n. 5, p. 418-420, Apr 2011.

TSOLI, M. et al. Depletion of White Adipose Tissue in Cancer Cachexia Syndrome Is Associated with Inflammatory Signaling and Disrupted Circadian Regulation. **Plos One**, v. 9, n. 3, e92966, 2014. VON HAEHLING, S.; ANKER, S. D. Prevalence, incidence and clinical impact of cachexia: facts and numbers-update 2014. **J Cachexia Sarcopenia Muscle**, v. 5, n. 4, p. 261-273, Dec 2014.

VUILLEUMIER, N. et al. Pro- or anti-inflammatory role of apolipoprotein A-1 in highdensity lipoproteins? **Swiss Med Wkly**, v. 143, p. w13781, 2013.

WADHAM, C. et al. High-density lipoproteins neutralize C-reactive protein proinflammatory activity. **Circulation**, v. 109, n. 17, p. 2116-3122, May 2004.

WALLENGREN, O. et al. Loss of muscle mass in the end of life in patients with advanced cancer. **Support Care Cancer**, v. 23, n. 1, p. 79-86, Jan 2015.

WALLENGREN, O.; LUNDHOLM, K.; BOSAEUS, I. Diagnostic criteria of cancer cachexia: relation to quality of life, exercise capacity and survival in unselected palliative care patients. **Supportive Care in Cancer**, v. 21, n. 6, p. 1569-1577, JUN 2013.

WANG, H.; YE, J. Regulation of energy balance by inflammation: common theme in physiology and pathology. **Rev Endocr Metab Disord,** v. 16, n. 1, p. 47-54, Mar 2015.

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. 562-574, Mar 2001.

WATERHOUSE, J. Effects of Ramadan on physical performance: chronobiological considerations. **Br J Sports Med**, v. 44, n. 7, p. 509-515, Jun 2010.

WEN, H. S. et al. Clinical studies on the treatment of cancer cachexia with megestrol acetate plus thalidomide. **Chemotherapy**, v. 58, n. 6, p. 461-467, 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. 651-665, Nov-Dec 2008.

YAMADA, S. et al. Very low protein diet enhances inflammation, malnutrition, and vascular calcification in uremic rats. Life Sci, v. 146, p. 117-123, Feb 2016.

YAMAGISHI, S. et al. Decreased high-density lipoprotein cholesterol level is an independent correlate of circulating tumor necrosis factor-alpha in a general population. **Clin Cardiol**, v. 32, n. 9, p. E29-32, Sep 2009.

YENNURAJALINGAM, S. et al. The role of thalidomide and placebo for the treatment of cancer-related anorexia-cachexia symptoms: results of a double-blind placebo-controlled randomized study. **J Palliat Med**, v. 15, n. 10, p. 1059-1064, Oct 2012.

ZIMMERS, T. A.; FISHEL, M. L.; BONETTO, A. STAT3 in the systemic inflammation of cancer cachexia. **Semin Cell Dev Biol**, v. 54, p. 28-41, Jun 2016.

ZOUHAL, H. et al. Catecholamines and the effects of exercise, training and gender. **Sports Med,** v. 38, n. 5, p. 401-423, 2008.

ANEXOS

- Anexo A Ferramenta para o diagnóstico dos pacientes.
- **Anexo B** Questionário de qualidade de vida (QLQ-C30).
- Anexo C Termo de consentimento livre e esclarecido.
- Anexo D Curvas-Padrão.
- Anexo E Cachexia-associated adipose tissue morphological rearrangement in gastrointestinal cancer patients.
- **Anexo F** Systemic Inflammation in Cachexia Is Tumour Cytokine Expression Profile the Culprit?
- **Anexo G** NF-κBp65 and Expression of Its Pro-Inflammatory Target Genes Are Upregulated in the Subcutaneous Adipose Tissue of Cachectic Cancer Patients.

ANEXO A

PATIEN	T'S INFORMAT	TION	FIRST CRITER	ION - WEIG	HT LOSS	
Identification	Gender	Age (Years)	Weight variation	BMI (kg/m ²)	Result	
				1 		
Height (m)	Prev. weight (kg)	Current weight (kg)	Treatment		Q	
			·			
SECOND CRITE	RION - WEIGHT	STRENGTH	THIRD CRIT	ERION - FA	TIGUE	
Method	Score	Result	Method	Score	Result	
Handgrip Test			Questionnaire (QLC-C30)			
Handgrip Score (kg)			Question 10			
			Question 12			
		Question 18				
		5.000 B.0				
FOURTH C	RITERION - AN	OREXIA	FIFTH CRITERION	FAT FREE	MASS INDEX	
Method	Score	Result	Method	Score	Result	
Questionnaire (QLC-C30)			DEXA Scan			
Question 13			Lean mass (kg)			
	1	2		· /·		
SIXTH CRITERION	- BIOCHEMICA	L PARAMETERS	GROUP CI	ASSIFICAT	ION	
Parameters	Concentration	Result				
C-Reactive protein (mg/l)						
IL-6 (pg/ml)		1000				
Anemia - Hb (g/dl)			LEVEL OF EXC	LUSION CRI	TERIA	
Albumin (g/dl)				N	ONE	
Adapted from Evan et al., 2008				N	UNE	
				SAVE	TO THE	
				DAT	ABASE	
				DAI	ADAJE	

ANEXO B

EORTC QLQ-C30 (version3)

Gostaríamos de conhecer alguns pormenores sobre si e sua saúde. Responda você mesmo/a, por favor, a todas as perguntas fazendo um círculo à volta do número que melhor se aplica ao seu caso. Não há respostas certas ou erradas. A informação fornecida é estritamente confidencial.

Escreva as iniciais do seu nome: _____

A data de nascimento (dia/mês/ano): ___/___/___

A data de hoje (dia/mês/ano):	_//
-------------------------------	-----

		Não	Um pouco	Bastante	Muito
1.	Custa-lhe fazer esforços mais violentos, por exemplo, carregar um saco de compras pesado ou uma mala?	1	2	3	4
2.	Custa-lhe percorrer uma grande distância a pé?	1	2	3	4
3.	Custa-lhe dar um pequeno passeio a pé, fora de casa?	1	2	3	4
4.	Precisa de ficar na cama ou numa cadeira durante o dia?	1	2	3	4
5.	Precisa que o ajudem a comer, a vestir-se, a lavar-se ou a ir à casa de banho?	1	2	3	4

Dura	inte a última semana:	Não	Um	Bastante	Muito
			pouco		
6.	Sentiu-se limitado/a no seu emprego ou no desempenho de suas atividades diárias?	1	2	3	4
7.	Sentiu-se limitado/a na ocupação habitual dos seus tempos livres ou noutras atividades de lazer	1	2	3	4
8.	Teve falta de ar?	1	2	3	4
9.	Teve dores?	1	2	3	4
10.	Precisou descansar?	1	2	3	4
11.	Teve dificuldade em dormir?	1	2	3	4
12.	Sentiu-se fraco?	1	2	3	4
13.	Teve falta de apetite?	1	2	3	4
14.	Teve enjoos?	1	2	3	4
15.	Vomitou?	1	2	3	4

Dura	inte a última semana:	Não	Um pouco	Bastante	Muito
16.	Teve prisão de ventre?	1	2	3	4
17.	Teve diarréia?	1	2	3	4
18.	Sentiu-se cansado?	1	2	3	4
19.	As dores perturbaram suas atividades diárias?	1	2	3	4
20.	Teve dificuldade em concentrar-se, por exemplo, para ler o	1	2	3	4
	jornal ou ver televisão?				
21.	Sentiu-se tenso(a)?	1	2	3	4
22.	Teve preocupações?	1	2	3	4
23.	Sentiu-se irritável?	1	2	3	4
24.	Sentiu-se deprimido?	1	2	3	4
25.	Teve dificuldade em lembrar-se das coisas?	1	2	3	4
26.	O seu estado físico ou tratamento médico interferiram na sua	1	2	3	4

27.	O seu estado físico ou tratamento médico interferiram na sua atividade social?	1	2	3	4
28.	O seu estado físico ou tratamento médico causaram-lhe problemas de ordem finaceira?	1	2	3	4

Nas perguntas que se seguem faça um círculo à volta do número, entre 1 e 7, que melhor se aplica ao seu caso

29. Como classificaria a sua saúde em geral durante a última semana?						
1	2	3	4	5	6	7
péssima						ótima
30. Como classificaria a sua qualidade de vida global durante a última semana?						
1	2	3	4	5	6	7
péssima						ótima

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ESTUDO: Efeito do treinamento físico aeróbio sobre o infiltrante inflamatório no tecido adiposo de 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, mas se desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você.

Eu,	(inserir	0	nome,	profissão,	residente	e	domiciliado	na,	telefone)
				-					
			, portado	r da Cédula d	le identidade	, RG		, e	inscrito no
CPF/I	MF		na	scido(a) em	//		, abaixo ass	inado(a)), concordo
de liv	re e espont	ânea	vontade er	n participar co	omo voluntár	io(a)	do estudo " <i>Efei</i>	to do tr	einamento
físico	aeróbio so	bre o	infiltrante	<i>inflamatório</i>	no tecido adi	poso	de pacientes cad	quéticos	s". Declaro
que o	btive todas	as inf	ormações i	necessárias, be	m como todo	s os e	ventuais esclared	- cimento	s quanto às
dúvid	as por mim	apres	entadas.						-

Estou ciente que:

- I) O estudo se faz necessário para que se possam descobrir as possíveis causas da síndrome denominada caquexia (caracterizada pela grande perda de peso, força muscular e diminuição do apetite). Será utilizado o sangue e o tecido adiposo branco para as análises. Esses materiais coletados são importantes para o entendimento da etiologia do processo de caquexia. De acordo com os resultados dos Exames Laboratoriais e Clínicos do paciente, e após consentimento médico, o paciente poderá ser convidado a participar do Protocolo de Exercícios Físicos, com duração de seis semanas, e no momento do ato cirúrgico, doando um pequeno fragmento (um grama) de tecido adiposo (localizado subcutaneamente);
- II) Serão realizadas coletas de 20 mL de sangue, na primeira, terceira e sexta semanas de treinamentos, para que os parâmetros plasmáticos e séricos possam ser aferidos e possam servir de parâmetros para o Protocolo de Exercícios Físicos. A coleta será realizada por um profissional da saúde devidamente habilitado e ocorrerá durante a sessão do treino. Previamente à cirurgia uma nova coleta de sangue será realizada, sem interferir no procedimento cirúrgico;
- III) Essas coletas serão realizadas apenas para este estudo, em nada influenciará o tratamento e não modificará o procedimento anestésico e cirúrgico;

- IV) Durante o procedimento cirúrgico será retirado fragmentos de aproximadamente um grama por tecido (Músculo e tecido adiposo branco subcutâneo, ou seja, tecido adiposo localizado subcutaneamente), com tempo total de coleta de aproximadamente 5 minutos. Esse procedimento possui um grau de risco mínimo, não interferindo 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;
- V) Essa coleta será feita apenas para este estudo e em nada influenciará o tratamento; não vai me curar; não vai me causar nenhum problema, não haverá nenhum incômodo de dor no momento da coleta;
- 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 ensaio serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados;
- **X**) Caso eu desejar, poderei pessoalmente tomar conhecimento dos resultados, ao final desta pesquisa:
 - () Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
 - () Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

XI) Concordo que o material poderá ser utilizado em outros Projetos desde que autorizado pela Comissão de Ética deste Instituto e pelo responsável por esta pesquisa.
() Sim ou () Não

"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 201____

() Paciente / () Responsável

Testemunha 1:

Nome / RG / Telefone

Testemunha 2:

Nome / RG / Telefone

Responsável pelo Projeto: _____

M

Telefone para contato:	Prof^a Dra. Marília Cerqueira Leite Seelaender Instituto de Ciências Biomédicas I 3091-7225
Identificação do CEP-HU:	Endereço: Av. Prof. Lineu Preste, 2565 – Cidade Universitária CEP: 05508-000 - São Paulo – SP Telefones: 3091-9457 – Fax: 3091-9479 - E-mail: <u>cep@hu.usp.br</u>













Y = Cubic({-0.45, 2.6}, {9.21, 8.93}) DC=(+∞, +∞) Chi = 0.0%











Y = Cubic({-0.45, 3.2}, {9.21, 9.61}) DC=(+∞, +∞) Chi = 0.0%



Y = Cubic({-0.45, 2.35}, {9.21, 9.85}) DC=(+ ∞ , + ∞) Chi = 0.0%







Y = Cubic({-0.45, 2.2}, {9.21, 10.17}) DC=(+∞, +∞) Chi = 0.0%









Y = Cubic({-0.45, 2.6}, {9.21, 10.67}) DC=(+∞, +∞) Chi = 0.0%















Y = Cubic({-0.45, 2.53}, {9.21, 9.88}) DC=(+∞, +∞) Chi = 0.0%



Y = Cubic({-0.45, 2.97}, {9.21, 10.71}) DC=(+ ∞ , + ∞) Chi = 0.0%







Y = Cubic({-0.45, 3.5}, {9.21, 10.25}) DC=(+ ∞ , + ∞) Chi = 0.0%





Notes:

CV-The Coefficient of Variation of standard curve replicates at each dilution level. Chi-The Chi-Square test statistic of the distance between observed concentrations with expected concentrations.

ANEXO E

O R I G I N A L A R T I C L E Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle (2015) Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/jcsm.12037

Cachexia-associated adipose tissue morphological rearrangement in gastrointestinal cancer patients

Miguel L. Batista Jr.^{1,2}*, Felipe S. Henriques¹, Rodrigo X. Neves^{1,2}, Mireia R. Olivan², Emídio M. Matos-Neto², Paulo S. M. Alcântara³, Linda F. Maximiano³, José P. Otoch³, Michele J. Alves² & Marília Seelaender²

¹Laboratory of Adipose Tissue Biology, Integrated Group of Biotechnology, University of Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, Brazil; ²Cancer Metabolism Research Group, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; ³Department of Clinical Surgery, University Hospital, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Abstract

Background and aims Cachexia is a syndrome characterized by marked involuntary loss of body weight. Recently, adipose tissue (AT) wasting has been shown to occur before the appearance of other classical cachexia markers. We investigated the composition and rearrangement of the extracellular matrix, adipocyte morphology and inflammation in the subcutaneous AT (scAT) pad of gastrointestinal cancer patients.

Methods Surgical biopsies for scAT were obtained from gastrointestinal cancer patients, who were signed up into the following groups: cancer cachexia (CC, n = 11), weight-stable cancer (WSC, n = 9) and weight-stable control (non-cancer) (control, n = 7). The stable weight groups were considered as those with no important weight change during the last year and body mass index <25 kg/m². Subcutaneous AT fibrosis was quantified and characterized by quantitative PCR, histological analysis and immunohistochemistry.

Results The degree of fibrosis and the distribution and collagen types (I and III) were different in WSC and CC patients. CC patients showed more pronounced fibrosis in comparison with WSC. Infiltrating macrophages surrounding adipocytes and CD3 Ly were found in the fibrotic areas of scAT. Subcutaneous AT fibrotic areas demonstrated increased monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) and Cluster of Differentiation (CD)68 gene expression in cancer patients.

Conclusions Our data indicate architectural modification consisting of fibrosis and inflammatory cell infiltration in scAT as induced by cachexia in gastrointestinal cancer patients. The latter was characterized by the presence of macrophages and lymphocytes, more evident in the fibrotic areas. In addition, increased MCP-1 and CD68 gene expression in scAT from cancer patients may indicate an important role of these markers in the early phases of cancer.

Keywords Adipose tissue; Extracellular matrix; Fibrosis, Inflammation, Cachexia

Received: 19 December 2014; Revised: 11 March 2015; Accepted: 30 March 2015

*Correspondence to: M. L. Batista, Jr, Laboratory of Adipose Tissue Biology, University of Mogi das Cruzes, SP, Av. Dr Cândido Xavier de Almeida Souza, 200, Vila Partênio, Mogi das Cruzes, São Paulo CEP: 08780-911, Brazil: Tel: +55 11 4798 7087, Fax: +55 11 4798 7167, Email: migueljr4@me.com

Introduction

Cachexia is a wasting condition, directly associated with 22–40% of all cancer deaths.^{1,2} It has been defined as 'a multifactor syndrome', characterized by ongoing loss of skeletal muscle mass (with or without loss of fat mass) that cannot be fully reversed by conventional nutritional support and leads to progressive functional impairment.^{3,4} Although muscle wasting has been the main focus of cachexia-related research,^{5,6} studies show that fat loss occurs more rapidly and more precociously than the reduction of lean mass in cancer cachexia (CC)^{7–9} and may extend up to 80% within a very short interval, especially

in the immediate period preceding death. Still, more recently, we have shown that the adipose tissue (AT) of cachectic cancer patients, in particular the subcutaneous AT (scAT) depot, is a possible relevant systemic source of inflammatory molecules during the development of the disease.¹⁰

Several factors have been demonstrated to contribute to cachexiarelated loss of AT, such as (i) increased lipid mobiliza-tion due to enhanced adipocyte triglyceride lipolysis,^{8,11} (ii) re-duced lipogenesis and fatty acid esterification due to decrease of both fatty acid synthase and lipoprotein lipase activity¹² and (iii) impairment of fat cell turnover (pre-adipocyte/mature adipocyte), resulting in a disruption in the organization and © 2015 The Authors. Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of the Society of Sarcopenia, Cachexia and Wasting Disorders This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

development of AT.¹³ In addition to that, several morphological and molecular changes in AT depots of rats during the progression course of CC have been described.^{9,14–16} Most of the alterations, nevertheless, are perceived before any detectable morphological disruption, notably the down-regulation of genes related with adipogenesis, metabolism and mature adipocyte function. Furthermore, AT inflammation is a wellcharacterized aspect of the syndrome.^{9,17,18} Such condition seems to be most apparent at the final stages of cachexia (cachexia to refractory cachexia).

AT has been described as a heterogeneous tissue that possesses marked anatomically-related depot specialization in regard to many parameters, including cellularity, form of growth and expansion, metabolism, production of and response to cytokines, hormones, density and distribution of innervation, as well as to fatty acid composition (reviewed by Pond¹⁹). Several chronic diseases, such as obesity,²⁰ metabolic syndrome and lipodystrophy,²¹ induce AT remodelling, involv-ing two major processes: adipose cell morphometric changes (hypertrophy or atrophy) and immune cells accumulation. Inflammation, endoplasmatic reticulum stress and hypoxia are also part of the general biologic alterations subsidizing the attraction and retention of inflammatory cells in AT.²² AT extracellular matrix (ECM) remodelling has been found to play an essential role in adipogenesis²² and tissue structure estab-lishment.²³ In obesity, these alterations were demonstrated to be crucial to accommodate cellular alterations.²⁴ In db/db obese mice, epididymal AT morphological changes occur con-comitantly to up-regulation of various types of collagens, such as I, IV and VI.²⁵ The former is related with increased adipocyte size.²⁶ This feature is generally followed by persistent inflam-matory stimulus in AT that may underline excessive synthesis of ECM components. Consequently, subsequent interstitial deposition of fibrotic material (fibrosis) and enhanced expres-sion of ECM proteins seem to be a result of a pervasive tissue response to unresolved chronic inflammation.²⁰ Divoux et al.²⁰ have reported increases in ECM components secretion induced by products synthesized by macrophages infiltrated in the AT (ATM\$\overline\$s), suggesting a possible interaction between inflammatory cells and AT remodelling. In the same study, other inflammatory cells, including T-lymphocytes and mast cells, were shown to participate in one such process. However, despite AT remodelling being well described in obesity, few studies have addressed this topic in CC.

Thus, to obtain broader insight into AT remodelling in the setting of CC, we have analysed the scAT depot of cancer patients. The choice of scAT, rather than visceral AT, relies on the fact that we have previously shown¹⁰ that this pad responds more precociously to the presence of the tumour in the organism, acting as a source of inflammatory markers. Additionally, it is an ideal tissue for the obtainment of biopsies. Firstly, we evaluated fibrosis in a qualitative and quantita-tive manner and in particular, collagen density in scAT of

weight-stable and cachectic cancer patients. Secondly, we characterized the inflammatory cells surrounding fibrotic depots. Finally, we determined scAT inflammatory gene expression in cancer patients. The analysis shows discrete early morphological modifications in scAT, followed by increased inflammatory cell infiltration and fibrosis, which are more evident in the cachectic cancer patients.

Materials and methods

Patients and sample collection

Patients were recruited between November 2008 and July 2010 at University Hospital of the University of São Paulo (n = 26). The inclusion criteria were as follows: 1, not having received prior anticancer treatment and 2, willingness to par-ticipate. The exclusion criteria were as follows: chemotherapy at the time of the study; continuous anti-inflammatory ther-apy; and kidney or liver failure, acquired immunodeficiency syndrome, inflammatory bowel disease or chronic inflamma-tory processes not related with cachexia, such as autoim-mune disorders. Patients with body mass index (BMI) greater than 29.9 were also excluded from the study. The study was approved by the Ethics Committee from the Institute of Biomedical Sciences and by the Human Ethics Committee of the University of São Paulo Hospital (CEP-ICB/ USP 1117/13, CEP-HU/USP 752/07 and 1117/13, CAAE 0031.0.198.019-07). The investigation was explained in detail to each patient, and written informed consent was obtained. They were separated into three groups, based on diagnosis

after surgery. The subjects were subdivided into CC (CC, n = 12) and weight-stable cancer (WSC, n = 7) and weightstable control (non-cancer) (control, n = 7). Patients were considered cachectic based on criteria from the international consensus.² Cachexia is recognized in patients with weight loss >5% in the past 6 months or any degree of weight loss >2% in the last 6 months + BMI <20 kg/m². The stable weight groups were considered as those with no important weight change during the previous year and BMI $<25 \text{ kg/m}^2$. In the cancer groups (CC and WSC), the tumour primary location was colon (n = 8), stomach (n = 5), pancreas (n = 2) and other (n = 4). The control group included patients undergoing surgery for incisional hernia (n = 5) and chronic cholecystitis (n = 2). The study was designed as 'intention to compare'; therefore, all subjects were kept in the analyses despite a few missing values of the measurements. Table 1 presents the general characteristics of patients in each group.

Clinical parameters assessment

Height and weight were determined, and approximately 10 mL of blood was collected after overnight fast, within the

Table 1 (Characteristics	of study	groups
-----------	-----------------	----------	--------

Measure	Control	WSC	CC	Р
n	7	7	12	
Gender (male/female)	3–4	3–4	8–4	
Age (years)	59.0± 12.7	68.2± 13.3	61.5± 16.9	0.722
Weight (kg)	59.9± 8.5	63.4± 10.6	69.5± 9.2	0.105
Height (m)	1.62 ± 0.04	1.56 ± 0.07	1.63 ± 0.06	0.053
BMI (kg/m²)	21.9± 1.2	24.2± 1.7	21.1± 3.6	0.073
Weight loss (kg)	1.4 ± 1.8	2.7 ± 0.7	13.6± 4.1	<0.01
Weight loss (%)	2.8 ± 0.3	4.3 ± 0.7	19.9± 6.6	<0.01
Tumour stage				
IA–B		1 (14%)	1 (8%)	
IIA–B		3 (43%)	3 (25%)	
IIIA–B		2 (29%)	5 (42%)	
IV		1 (14%)	3 (25%)	
S-Hg (g/dL)	12.6± 1.2	10.8± 1.9	11.4± 1.8	0.147
P-urea (mg/dL)	35.2± 11	34.3± 14	30.2± 15	0.622
P-creatinine (mg/dL)	0.88± 0.2	0.90 ± 0.3	0.84 ± 0.3	0.892
S-TAG (mg/dL)	148± 19	133± 15	101± 13	<0.01
S-cholesterol (mg/dL)	205± 14	203± 16	173± 18	<0.01
S-LDL (mg/dL)	105± 12	102± 13	83± 15	<0.01
P-IL-6 (pg/mL)	9.2 ± 8.2	36.6±20	96.4± 99	0.034
P-CRP (pg/mL)	2.1 ± 2.2	4.4 ± 3.5	28.2±20	<0.01

BMI, body mass index; CC, cancer cachexia; CRP, C-reactive protein; Hg, haemoglobin; IL, interleukin; LDL, low-density lipoprotein levels; n, number of patients; P, plasma; S, serum; TAG, triglyceride serum levels; WSC, weight-stable cancer.

Values are mean \pm standard deviation.

Statistical analysis, P vs. control subjects.

venous access procedure for anaesthesia during the surgery, allowing the measurement of plasma C-reactive protein, serum urea, creatinine and haemoglobin. Plasma and serum samples were then immediately frozen at 80°C, until further analysis. Tumour staging was determined post-operatively, according to the guidelines of the Union for International Cancer Control TNM.²⁷

Adipose tissue biopsies

Approximately 1 g of subcutaneous white AT (by approximate anatomical site) was collected in within a 5 min interval, similarly to that described by Agustsson et al.¹¹ A portion of AT biopsy was immediately transferred into liquid nitrogen and kept at 80 °C before RNA analysis. The other part was fixed overnight at 4 °C in 4% paraformaldehyde and processed for standard paraffin embedding.¹⁰ This procedure presents a minimal degree of risk and does not interfere with the standard surgery procedure.

Morphological analysis

The sequential 5 μ m sections obtained were first stained with haematoxylin and eosin and then, with picro sirius red. The sections were analysed with a Leica microscope (DM 750), equipped with filters to provide circularly polar-ized light. For the analysis of morphometric aspects, the area, average diameter, perimeter and shape were measured by Imagen Pro-Plus 6.0 (100 adipocytes per stained section). Picro sirius red staining sections allowed collagen fibres detection with different colours.²⁸ Type I col-lagen fibres appear orange to red, whereas the thinner type III collagen fibres are stained with a yellow to green hue. Tissue images were obtained with a \times 40 objective lens, re-corded on a digital camera (DFC 295, Leica), displayed on a high-resolution monitor (LG, Flatron, E1941) and analysed with SigmaScan Pro image analysis (Chicago, IL, USA). For the different morphological analysis, different histological slices (non serial sections) from the same group were employed.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry of AT was carried out with sections fixed in buffered formalin and embedded in paraffin. Depara-ffinized sections (5 µm) were stained with haematoxylin and eosin. After quenching of endogenous peroxidase activity with 0.3% H2O2 in methanol and blocking of free protein-binding sites with 5% normal goat serum, sections were im-munostained for immune cells: macrophages with CD68 anti-mouse KP-1 monoclonal antibody (DAKO, Denmark— Ref m 0814), neutrophils with CD15 (DAKO, Denmark— Ref 103A-76) antibodies. Specific secondary antibodies were peroxidase (horseradish peroxidase) conjugated. Histochemi-cal reactions were performed employing Vecta stain ABC Kit

3

DOI: 10.1002/jcsm.12037

(Vector Laboratories) and Sigma Fast 3,3-diaminobenzidine as substrate (Sigma, St. Louis, MO). Sections were counter-stained with haematoxylin.

Gene expression analysis

Total RNA of the samples was isolated with TriPure Isolation Reagent (Roche®), following the recommendations of manufacturer,²⁹ and total RNA concentration, quantified by spectrophotometry (Nanodrop ND-1000). Complementary DNA synthesis was carried out employing 13 µL assay mix contain-ing 3 µg total RNA, 10U RNAse inhibitor, 2 µL random primers, 2 µL dNTP (10 nmol), 2 µL dithiothreitol, 10U Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) reverse transcriptase and 4 μ L of $\times 10$ reaction buffer (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl; 150 nM MgCl2 in nuclear free water) (Invitrogen). Gene expression of CD68 (NM_001040059.1, forward 5'ACT GAA CCC CAA CAA AAC CA3', reverse 5'TTG TAC TCC ACC GCC ATG TA) and MCP-1 (CCL2) (NM_002982.3, forward 5' CCC CAG TCA CCT GCT GTT AT 3' and reverse 5'TGG AAT CCT GAA CCC ACT TC 3'). Five microlitres of cDNA (25 ng) were mixed with 2x SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems) and primers (Invitrogen). Quantitative real-time PCR was performed with an ABI 7300 real-time systems (Applied Biosystems). The mRNA levels were determined by comparative Ct method for each sample. A Ct value was obtained by subtracting 18 S values from those of the gene of interest. The average

Ct value of the control group was then subtracted from the sample to derive a Ct value. The expression of each gene was evaluated by 2 $^{(Ct)}$.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed with the commercially available statistical package from SigmaStat (version 3.1, Sigma Stat, SYSTAT, Point Richmond, CA). Data are expressed as mean \pm standard error and analysed by one-way analysis of variance. When a significant F-value was found by one-way analysis of variance, a Bonferroni's post hoc test was performed to demonstrate all pairwise multiple comparisons between the means. All calculated P-values were two sided, and a P < 0.05 was considered significant.

Results

Clinical findings

Baseline characteristics of the patients are shown in Table 1. The subjects in the three groups were of similar age and BMI. The body mass 6-12 months before inclusion in the study, as reported by patients, showed difference among the groups.

CC mass was significantly lower, as compared with WSC and control, considering weight loss, both as absolute values (13.6 kg, P < 0.01, compared with control) as relative values (19.9%, P < 0.01, compared with control). Plasma lipid profile was affected by CC, with decreased level of triglyceride se-

rum levels (31.8%, P < 0.01), total cholesterol (15.6%, P < 0.01) and low-density lipoprotein levels (14.3%, P < 0.01) when compared with the control patients. There was no difference with respect to other biochemical parameters (i.e. plasma creatinine and urea and serum haemoglobin values).

We did not evaluate lean body mass, although groups were matched by BMI. CC patients showed values ranging from 8.9% to 30.8% of body weight loss during the previous 6 months and C-reactive protein higher than 5 μ g/mL, as well as increased levels of interleukin (IL)-6 (12.6-fold and 9.4-fold, respectively, P < 0.001) compared with control, in-dicating that the studied cachectic patients demonstrated weight loss and increased plasma inflammatory markers. WSC patients showed values ranging from 3.2% to 5.4% of body weight loss during the previous 6 months and C-reactive protein values ranging from 1.2 to 10.7 5 μ g/mL. However, there was no statistical difference when compared with the control group.

Morphological analysis and collagen diversity in scAT

Cancer cachexia patients showed body weight loss and BMI reduction, suggesting the possibility that modification of AT cell morphology may be a response to CC. In order to address this question, we determined cell perimeter and the cross-sectional area in samples of the subcutaneous depot (Figure 1). Light microscopy examination indicates that mor-phometric alteration of scAT is only evident in the CC group (Figure 1A–C). In scAT from CC, adipocyte size, determined as sectional area (Figure 1D), and cell perimeter (Figure 1E) showed a decrease of 32.9% (P < 0.05) and 18.5% (P < 0.05), respectively, compared with the control samples.

When examined under polarized light microscopy, the same samples from CC patients demonstrated that types I (red label) and III (green label) collagen fibres were present around the adipocytes, in organized bundles of various thick-nesses (Figure 2A–F). As compared with control patients, CC samples showed an increase of 1.7-fold (P < 0.01) of total type I collagen, no changes in type III collagen (P = 0.10) and an increase in collagen I–III ratio (P = 0.0159) (Figure 2G–H).

Inflammatory profile and cell infiltration

Taking into account the scope of data regarding AT remodelling induced by cachexia, notably the modification in total collagen density (fibrosis), we also examined the presence

Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle (2015) DOI: 10.1002/jcsm.12037 Figure 1 Morphological characteristics of subcutaneous adipose tissue depot in cachexia and control patients. Haematoxylin and eosin stained sec-tions of subcutaneous tissue from (A) weight-stable subjects and control, (B) weight-stable cancer (WSC) patients and (C) cancer cachexia (CC) pa-tients. Morphometric analysis of sectional area (D) and (E) perimeter of adipocytes from different experimental groups. Photomicrographs (A–C) illustrate the most representative images considering data related to morphological analysis (D, E). Values are mean \pm SEM. * P < 0.05 vs. control subjects.



of inflammation and infiltrated cells in scAT from the patients. Immunostaining for macrophages (CD68), T-lymphocytes (CD3) and neutrophils (CD15) and analysis of gene expression of MCP-1 and CD68 were carried out (Figures 3–5).

Although the presence of CD15 neutrophils was minimal in CC, we observed an abundant number of macrophages stained with CD68 surface markers in the groups (CC and WSC) (Figure 3). Additionally, in tissue sections stained for CD68 positive cells, we found higher intensity that was more pronounced in the surrounding of adipocytes [crown-like structures (CLS)] in CC (Figure 4A, C). However, crown aggre-gates were not extensive, and there was no signal of syncytial giant cells. Less frequently, sections for CD3 positive cells showed irregular distribution more often observed in the scAT fibrotic areas from CC (Figure 4B, D).

CD68 mRNA expression increased in scAT obtained from CC patients (109-fold, P = 0.029, respectively), when

compared with the control group (control vs. CC). In scAT of WSC, an increase of 48-fold in MCP-1 mRNA levels was detected, when compared with the control group (P = 0.010) (Figure 5).

Discussion

The present study documents, for the first time, increased number of ATM ϕ s in scAT obtained from gastrointestinal cachectic cancer patients. One such change was accompanied by ECM remodelling and associated with adipocyte size reduction and AT atrophy. Fibrosis was detected, as well as the presence of distinct patterns of fibrous material surrounding adipocytes, while collagen fibre organization was altered in scAT samples obtained from cancer patients.

5

Figure 2 Picro sirius red staining sections of subcutaneous adipose tissue in cachexia and control patients. Collagen fibres are presented in different colours. Type I collagen fibres are orange to red, whereas the thinner type III collagen fibres appear yellow to green from (A, B) weight-stable sub-jects and control, (C, D) weight-stable cancer (WSC) patients and (E, F) cancer cachexia (CC) patients. Total collagen quantification in cachexia and control patients of (G) type I collagen and (H) types I–III ratio. Values are mean \pm SEM. * P < 0.05 vs. control subjects.



In this aspect, markedly increased total collagen amounts were found in the cachectic patients while being already mildly increased in the cancer (weight stable) patients. Inter-estingly, such structural modification of scAT was accompa-nied by increased inflammatory cells subset presence, which was more conspicuous in the cachectic patients. CD68-labelled ATM\$ localized to crowns surrounding adipo-cytes and expressed higher mRNA levels of scavenger recep-tor (CD68), as well as chemokine attractant for macrophages (MCP-1). Additionally, CD3 Ly was more abundant in the fibrotic areas in scAT samples from cachectic patients, in a

different fashion compared with infiltrated ATM\$\$.

The hallmark of CC is body weight loss.^{30,31} Loss of muscle and AT mass, anorexia, anaemia and alterations in metabo-lism are also evident during the development of the disease. In particular, AT catabolism followed by tissue mass depletion

(atrophy) and metabolic dysregulation are consistent and prominent findings in CC patients.^{1,9,10,31,32} In this aspect, the present study shows adipocyte size reduction in scAT of cachectic cancer patients. This aspect was not evident in the WSC patients. AT atrophy induced by cachexia has been consistently demonstrated in both patients^{7,33} and animal models.^{9,34} In CC, longitudinal investigation has suggested that fat loss is not only due to loss of adipocyte volume (lipolysis)^{29,34,35} but also may be attributed to a decrease in

lipid accretion in these cells,³⁶ both resulting in a smaller cell.³⁷ Recently, a well-designed investigation⁸ showed consistent evidence that lipases in AT breakdown stored fat, contributing to cancer-associated cachexia. However, despite several studies having consistently shown AT atrophy as a result of cachexia, the associated mechanisms are still not fully elucidated.

Another aspect addressed was ECM fibrosis, in order to as-sess whether there was AT remodelling in this scenario. CC patients showed ECM increased fibrosis in AT, with evident collagen-fibril staining. Simultaneously, an increase in both types I and III collagen content was observed in these pa-tients, whereas in WSC, only a discrete change detected in type I collagen was found. A recent microarray data analysis from scAT of cachectic patients demonstrated a possible con-nection between regulation of energy turnover, cytoskeleton and ECM, with loss of AT.³⁸ In an animal model of cachexia, AT fibrosis was demonstrated by ultrastructural analysis showing severe delipidation and alterations in cell membrane conformation, irregular cytoplasmic projections and increased electron-dense mitochondria. An enhanced level of collagen-fibril staining was also evident in the tumour-bearing group.39

In fact, the ECM is one of the most important regulators of cellular and tissue function in the body.⁴⁰ Disruption in ECM leads to marked metabolic dysregulation and failure to

133

DOI: 10.1002/jcsm.12037

Figure 3 Identification of different immune cell types present in subcutaneous adipose tissue obtained from cancer cachexia patients. Serial sections of weight-stable subjects and control, weight-stable cancer (WSC) patients and cancer cachexia (CC) patients were stained with markers of macrophages (CD68), T-lymphocytes (CD3) and for neutrophils (CD15). Nuclei were stained with haematoxylin (blue staining). HE, haematoxylin and eosin staining.



expand AT in both obese patients and experimental obesity (high fat diet and ob/ob knockout).⁴¹ In the same way, AT reduction as induced by a body weight reduction programme was shown to result from modified ECM gene expression profile.⁴² In obese patients, body fat loss as a consequence of gastric bypass was associated with increased fibrosis in fat depots after a 3 month to 1 year post-surgery period.⁴³ How-ever, even considering the important role of ECM to AT homeostasis, there is limited information regarding quantitative EMC analysis in cachectic cancer patients. The few studies that have addressed this question propose that AT solely adjusts its extracellular environment to adapt to the shrinking volume of the fat cells.^{11,38} Contrary to this view, we show a robust increase in total collagen content and additionally, that, even before any morphofunctional disruption in AT occurs, as reported for WSC patients, AT is already affected by the syndrome. Indeed, it seems that the process of AT remodelling induced by cachexia is triggered before any of the clinical signs of the disease. Additional studies should take place to fully confirm this hypothesis.

As described above, several researchers have shown that AT ECM remodelling is a crucial event to accommodate obesityinduced cellular alterations. One such process has also been described to be the end point of a persisting inflammatory stimulus (unresolved chronic inflammation) in AT, which may be responsible for the excessive synthesis of ECM components and subsequent interstitial deposition of

fibrotic material.^{44,45} There are, however, no studies, to our knowledge, that describe the nature of the inflammatory infiltrate in the AT of cachectic patients.

One previous study by our group demonstrated that AT, in particular, scAT, contributes in a significant manner to systemic inflammation, as a potent source of inflammatory factors.¹⁰ We presently show an accentuated modification in gene expression, as well as in plasma concentration of adipokines and pro-inflammatory molecules in cachectic gastrointestinal cancer patients, in relation to their noncachectic counterparts. These include adiponectin, leptin, tumour necrosis factor- α , IL-6 and IL-10. Furthermore, in the present study, we provide new information in regard to the inflammatory cells found in the AT of CC patients. Tissue sections stained for CD68 ATM \$\phi\$ positive cells show a higher intensity for the macrophage marker, especially in the surrounding surface of adipocytes (CLS) in CC. However, crown aggregates were not as cell dense as those normally described in obesity, and there was no signal of occasional

7

Figure 4 Immunohistochemistry for immune cells from weight-stable subjects and control, weight-stable cancer (WSC) patients and cancer cachexia (CC) patients. Subcutaneous adipose tissue (scAT) macrophages localize to crown-like structures (CLS) around individual adipocytes, which increase in frequency with cancer cachexia. Light microscopy of scAT of CC patients showing CD68 immunoreactive macrophages (brown colour) aggregated to numerous (C, CC patients) CLS among unilocular adipocytes. Note that almost all CD68 immunoreactive macrophages are organized to form CLS. CD3 immunoreactive T-lymphocyte shows positive cells in fibrotic areas, stained with DAB (brown colour) (arrow). Nuclei were stained with haematoxylin (blue labelling). Bar (µm): 50 µm for A and B; 25 µm for C and D.



coalescence to form syncytial giant cells. In a different way, CD3 Ly positive cells were the main immune cells found in the fibrotic areas. We previously hypothesized that infiltrating ATM ϕ s may play an important role(s) in cachexia-associated AT remodelling, based on our observation that ATM ϕ s in cachectic rats and humans are placed surrounding or in close proximity to the adipocytes.⁴⁶ In addition, we

demonstrated that ATM ϕ s aggregates display a CLS pattern. This may be a consequence of an increased lipid scavenging function of ATM ϕ s, induced by CC. In obesity, a positive relationship between infiltrating ATM ϕ s and AT remodelling has been demonstrated.^{41,47–49} In particular, CLS are described at sites of adipocyte death. Such structures are related with envelopes and ingest the moribund adipocyte and its

Figure 5 Expression levels of genes involved in the inflammation of subcutaneous adipose tissue depots in subjects from different experimental groups. Real-time PCR analysis of RNA isolated from weight-stable subjects and control, weight-stable cancer (WSC) patients and cancer cachexia (CC) patients. mRNA levels of target genes were normalized to 18 S. Values are mean \pm SEM for five to nine samples per group. * P < 0.05 vs. control subjects.



9

potentially cytotoxic remnant lipid droplet.47 Consequently, CLS become lipid-laden 'foam cells'⁴⁷ frequently observed in AT in obesity. In an animal model of cachexia, we have shown⁴⁶ that foam-cell resembling macrophages are present in the AT. During CC, increased lipolysis has been consistently demonstrated in both patients^{7,11} and animal models^{9,32} and that might be an important source of lipids to $ATM\phi s$. In tumour-bearing animals, lipid profile was modulated by the cachectic state in an anatomical region-related pattern. Visceral AT composition is changed and presents increased storage of monounsaturated fatty acids (16:1), as well as decreased percentage of stearic acid, a saturated fatty acid.⁵⁰ In the same animal model, abundant lipid inclusions were found in infiltrated ATM ϕ s in the mesenteric depots obtained from cachectic rats. Those cells also exhibited increased tumour necrosis factor- α secretion when stimulated with lipopolysaccharide.⁴⁵ However, this aspect was not assessed in the present study.

Infiltrating inflammatory cells secrete pro-inflammatory mediators that are enhanced in the scAT of CC patients.¹⁰ Upregulation of IL-6 has been a consistent finding in several studies, notably in cachectic patients, independent of the aetiology of the syndrome.⁵¹ We previously demonstrated that plasma IL-6 is markedly increased during cachexia, a re-sult that may represent an interesting tool for diagnostic pur-poses. Although our previous study reported increased inflammatory cytokine profile gene expression in scAT sam-ples from CC patients, we herein show that CD68 gene ex-pression was also increased in scAT from these patients, corroborating the observation that CD68 ATM \$\phi\$ positive cells were more abundant in the same situation. Interestingly, MCP-1 gene expression was solely augmented in WSC sam-ples, with no changes in CC patients. ATM \$\phis infiltrate to AT as circulating monocytes in response to AT secretion of MCP-1, which recruits monocytes expressing the C-C chemo-kine receptor type 2. This is one of the initial steps to trigger inflammatory response and consequently increase $M\phi$ s subset in AT. In CC, high MCP-1 levels found in WSC might be suggestive of a precachexia stage, once increased gene expression of CD68, IL-6 and IL-10 was already demonstrated in such CC patients¹¹. However, the relationship between MCP-1-associated ATM ϕ s augment and the initial signals of cachexia, as well as the importance of this process for the development and progression of cachexia complications, remains unclear.

Limitations of this study should be acknowledged. Our investigation was carried out with relatively small study groups. The Brazilian patients enrolled may not be representative of a typical cancer patient population from Europe or North America and some differences concerning total fat mass of patient in the cancer groups, and overweight and obesity prevalence should be considered. Cachectic groups showed values ranging from 9% to 31% of body weight loss in the previous 6 months and C-reactive protein ranging from

4.9 to 77 μ g/mL, indicating that we studied patients staging between cachexia and refractory cachexia. Regarding the WSC patients, some of them could be perhaps considered precachectic, once they showed values ranging from 3.2% to 5.4% of body weight loss in the previous 6 months and C-reactive protein values ranging from 1.2 to 10.7 5 μ g/mL. However, there was no difference when compared with controls, and we have not attempted to adopt this staging system to classify CC, due to the relatively small sample. The current study was addressed to assess the effect of cachexia and tumour per se but was not empowered to detect differences between different tumour types. However, the study was powered to detect the observed differences in fibrosis and inflammation in scAT.

Conclusion

We report consistent modification consisting of fibrosis and inflammatory cell presence in scAT induced by cachexia in gastrointestinal cancer patients. The latter was characterized by the presence of CLS composed of CD68 positive ATM ϕ s surrounding adipocytes, and increased CD3 Ly, more evident in the fibrotic areas. In addition, some of these changes were already present in the cancer group, suggesting that AT disruption may occur at a precocious stage of cachexia, even before the detection of pre-cachexia clinical features. In this particular, increased MCP-1 and CD68 gene expression in scAT of cancer patients may indicate an important role of these inflammatory mediators as early biomarkers of cancer.

Acknowledgements

We thank Emilia Ribeiro for technical assistance. We also would like to thank Alex Y. Shimura for initial conception of this study. The contents of this work are solely the responsibility of the authors and do not necessarily represent the official views of FAPESP. Grant sponsor: FAPESP; Grant numbers: 2010/51078-1 (Miguel L. Batista, Jr) and 2008/ 54091-9 and 2012/50079–0 (Marília Seelaender). The authors of this manuscript certify that they comply with the ethical guidelines for authorship and publishing in the Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle 2010;1:7–8 (von Haehling S, Morley JE, Coats AJ and Anker SD).

Conflict of interest

None declared.

References

- Argiles JM, Anker SD, Evans WJ, Morley JE, Fearon KC, Strasser F, et al. Consensus on cachexia definitions. J Am Med Dir Assoc 2010; 11: 229–230.
- Fearon K, Strasser F, Anker SD, Bosaeus I, Bruera E, Fainsinger RL, et al. Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. Lancet Oncol 2011; 12: 489–495.
- Tisdale MJ. Cachexia in cancer patients. Nat Rev Cancer 2002; 2: 862–871.
- Fearon K, Arends J, Baracos V. Understand-ing the mechanisms and treatment options in cancer cachexia. Nat Rev Clin Oncol 2013; 10: 90–99.
- Dodson S, Baracos VE, Jatoi A, Evans WJ, Cella D, Dalton JT, et al. Muscle wasting in cancer cachexia: clinical implications, diagnosis, and emerging treatment strategies. Annu Rev Med 2011; 62: 265–279.
- Argiles JM, Orpi M, Busquets S, Lopez-Soriano FJ. Myostatin: more than just a regulator of muscle mass. Drug Discov Today 2012; 17: 702–709.
- Arner P. Medicine. Lipases in cachexia. Science 2011; 333: 163–164.
- Das SK, Hoefler G. The role of triglyceride li-pases in cancer associated cachexia. Trends Mol Med 2013; 19: 292–301.
- Batista ML Jr, Neves RX, Peres SB, Yamashita AS, Shida CS, Farmer SR, Seelaender M. Heterogeneous time-dependent response of adipose tissue during the development of cancer cachexia. J Endocrinol 2012; 215: 363–373.
- Batista ML Jr, Olivan M, Alcantara PS, Sandoval R, Peres SB, Neves RX, Silverio R, Maximiano LF, Otoch JP, Seelaender M. Ad-ipose tissue-derived factors as potential biomarkers in cachectic cancer patients. Cytokine 2013; 61: 532–539.

11. Agustsson T, Ryden M, Hoffstedt J, van Harmelen V, Dicker A, Laurencikiene J, et al. Mechanism of increased lipolysis in cancer

- cachexia. Cancer Res 2007; 67: 5531–5537.
 12. Tisdale MJ. Mechanisms of cancer cachexia. Physiol Rev 2009; 89: 381–410.
- Ryden M, Andersson DP, Bernard S, Spalding K, Arner P. Adipocyte triglyceride turnover and lipolysis in lean and over-weight subjects. J Lipid Res 2013; 54: 2909–2913.
- Das SK, Eder S, Schauer S, Diwoky C, Temmel H, Guertl B, et al. Adipose triglyceride lipase contributes to cancerassociated cachexia. Science 2011; 333: 233–238.
- Petruzzelli M, Schweiger M, Schreiber R, Campos-Olivas R, Tsoli M, Allen J, et al. A switch from white to brown fat increases energy expenditure in cancer-associated cachexia. Cell Metab 2014; 20: 433–447.
- Beluzi M, Peres SB, Henriques FS, Sertie RA, Franco FO, Santos KB, et al. Pioglita-zone treatment increases survival and prevents body weight loss in tumor-bearing

animals: possible anti-cachectic effect. PLoS One 2015; 10: e0122660.

- Tsoli M, Robertson G. Cancer cachexia: malignant inflammation, tumorkines, and metabolic mayhem. Trends Endocrinol Metab 2013; 24: 174–183.
- Seelaender M, Batista M Jr, Lira F, Silverio R, Rossi-Fanelli F. Inflammation in cancer

cachexia: to resolve or not to resolve (is that the question?). Clin Nutr 2012; 31: 562–566.

- Pond CM Adipose tissue and the immune system. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 2005; 73: 17–30.
- Divoux A, Tordjiman J, Lacasa D, Veyrie N, Hugol D, Aissat A, et al. Fibrosis in human adipose tissue: composition, distribution, and link with lipid metabolism and fat mass loss. Diabetes 2010; 59: 2817–2825.
- Sun K, Kusminski CM, Scherer PE. Adipose tissue remodeling and obesity. J Clin Invest 2011; 121: 2094–2101.
- Hotamisligil GS Inflammation and endoplasmic reticulum stress in obesity and diabetes. Int J Obes (Lond) 2008; 32: S52– 54.
- Pierleoni C, Verdenelli F, Castellucci M, Cinti S. Fibronectins and basal lamina molecules expression in human subcutaneous white adipose tissue. Eur J Histochem 1998; 42: 183–188.
- Wynn TA Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. J Clin Invest 2007; 117: 524–529.
- Khan T, Muise ES, Iyengar P, Wang ZV, Chandalia M, Abate N, et al. Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role of collagen VI. Mol Cell Biol 2009; 29: 1575–1591.
- Liu J, Divoux A, Sun J, Zhang J, Clement K, Glickman JN, et al. Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice. Nat Med 2009; 15: 940–945.
- Kwon SJ. Evaluation of the 7th UICC TNM staging system of gastric cancer. J Gastric Cancer 2011; 11: 78–85.
- Bohle A. Change of paradigms in nephrology--a view back and a look forward. Nephrol Dial Transplant 1998; 13: 556–563.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocy-anatephenol-chloroform extraction. Anal Biochem 1987; 162: 156–159.
- Evans WJ, Morley JE, Argiles J, Bales C, Baracos V, Guttridge D, et al. Cachexia: a new definition. Clin Nutr 2008; 27: 793– 799.
- Fearon KC, Voss AC, Hustead DS. Cancer cachexia study G: definition of cancer cachexia: effect of weight loss, reduced food intake, and systemic inflammation on functional status and prognosis. Am J Clin Nutr 2006; 83: 1345–1350.
- 32. Batista ML Jr, Peres SB, McDonald ME, Alcantara PS, Olivan M, Otoch JP, et al.

Adipose tissue inflammation and cancer cachexia: possible role of nuclear transcription factors. Cytokine 2012; 57: 9–16.

- Arner P. Introduction: the inflammation orchestra in adipose tissue. J Intern Med 2007; 262: 404–407.
- Bing C, Trayhurn P. Regulation of adipose tissue metabolism in cancer cachexia. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2008; 11: 201– 207.
- Bing C. Lipid mobilization in cachexia: mechanisms and mediators. Curr Opin Support Palliat Care 2011; 5: 356–360.
- Ryden M, Agustsson T, Laurencikiene J, Britton T, Sjolin E, Isaksson B, et al. Lipoly-sis--not inflammation, cell death, or lipogenesis--is involved in adipose tissue loss in cancer cachexia. Cancer 2008; 113: 1695–1704.
- 37. Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, Hauner H. Relationship between adipocyte size and
- adipokine expression and secretion.
- J Clin Endocrinol Metab 2007; 92: 1023–1033. 38. Dahlman I, Arner P. Genetics of adipose
- tissue biology. Prog Mol Biol Transl Sci 2010; 94: 39–74.
- Bing C, Russell S, Becket E, Pope M, Tisdale MJ, Trayhurn P, et al. Adipose atrophy in cancer cachexia: morphologic and molecular analysis of adipose tissue in tumour-bearing mice. Br J Cancer 2006; 95: 1028–1037.
- Cox TR, Erler JT Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. Dis Model Mech 2011; 4: 165–178.
- Moraes-Vieira PM, Yore MM, Dwyer PM, Syed I, Aryal P, Kahn BB. RBP4 activates antigen-presenting cells, leading to adipose tissue inflammation and systemic insulin resistance. Cell Metab 2014; 19: 512– 526.

42. Kolehmainen M, Salopuro T, Schwab US, Kekalainen J, Kallio P, Laaksonen DE, et al. Weight reduction modulates expres-sion of genes involved in extracellular matrix and cell death: the GENOBIN study.

- Int J Obes (Lond) 2008; 32: 292-303.
- 43. Ciangura C, Bouillot JL, Lloret-Linares C, Poitou C, Veyrie N, Basdevant A, et al. Dynamics of change in total and regional body composition after gastric bypass in obese patients. Obesity (Silver Spring)
- 2010; 18: 760-765.
- 44. Henegar C, Tordjman J, Achard V, Lacasa D, Cremer I, Guerre-Millo M, et al. Adipose tissue transcriptomic signature highlights the pathological relevance of extracellular matrix in human obesity. Genome Biol 2008; 9: R14.
- 45. Mutch DM, Tordjman J, Pelloux V, Hanczar B, Henegar C, Poitou C, et al. Needle and surgical biopsy techniques differentially affect adipose tissue gene expression profiles. Am J Clin Nutr 2009; 89: 51–57.

- 46. Machado AP, Costa Rosa LF, Seelaender MC. Adipose tissue in Walker 256 tumourinduced cachexia: possible association between decreased leptin concentration and mononuclear cell infiltration. Cell Tissue Res 2004; 318: 503–514.
- Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. J Lipid Res 2005; 46: 2347–2355.

48. Elgazar-Carmon V, Rudich A, Hadad N, Levy R. Neutrophils transiently infiltrate intraabdominal fat early in the course of high-fat feeding. J Lipid Res 2008; 49: 1894–1903.

- 49. van Eijk M, Aten J, Bijl N, Ottenhoff R, van Roomen CP, Dubbelhuis PF, et al. Reducing glycosphingolipid content in adipose tissue of obese mice restores insulin sensitivity, adipogenesis and reduces inflammation. PLoS One 2009; 4: e4723.
- Bertevello PS, Seelaender MC. Heterogeneous response of adipose tissue to cancer cachexia. Braz J Med Biol Res 2001; 34: 1161–1167.
- 51. Kemik O, Kemik AS, Begenik H, Erdur FM, Emre H, Sumer A, et al. The relationship among acute-phase response proteins, cytokines, and hormones in various gastrointestinal cancer types patients with cachectic. Hum Exp Toxicol 2012; 31: 117–125

Original Research published: 24 December 2015 doi: 10.3389/fimmu.2015.00629





Emidio M. de Matos-Neto emidiomatos @gmail.com

[†]Emidio M. de Matos-Neto and Joanna D. C. C. Lima have contributed equally to this work.

Specialty section:

This article was submitted to Molecular Innate Immunity, a section of the journal Frontiers in Immunology

Received: 31 July 2015

Accepted: 30 November 2015

Published: 24 December 2015

Citation:

de Matos-Neto EM, Lima JDCC, de Pereira WO, Figuerêdo RG, Riccardi DMdR, Radloff K, das Neves RX, Camargo RG,

Maximiano LF, Tokeshi F, Otoch JP, Goldszmid R, Câmara NOS, Trinchieri G, de Alcântara PSM and Seelaender M (2015) Systemic Inflammation in Cachexia – Is Tumor Cytokine Expression Profile the Culprit?

Front. Immunol. 6:629. doi: 10.3389/fimmu.2015.00629

OPEN ACCESS Edited by:

Timothy B. Niewold,

Mayo Clinic, USA

Reviewed by:

Carlo Pucillo,

University of Udine, Italy

Annapurna Nayak,

Brunel University, UK

Tumor cytokine expression Profile the culprit?

Emidio M. de Matos-Neto¹*[†], Joanna D. C. C. Lima^{1†}, Welbert O. de Pereira², Raquel G. Figuerêdo¹, Daniela M. dos R. Riccardi¹, Katrin Radloff¹,

Rodrigo X. das Neves¹, Rodolfo G. Camargo¹, Linda F. Maximiano³, Flávio Tokeshi³, José P. Otoch³, Romina Goldszmid⁴, Niels O. S. Câmara⁵, Giorgio Trinchieri⁴, Paulo S. M. de Alcântara³ and Marília Seelaender¹

¹ Cancer Metabolism Research Group, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil, ² Israelite Albert Einstein Institute, Israelite Albert Einstein Hospital, São Paulo, São Paulo, Brazil, ³ Department of Clinical Surgery, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil, ⁴ Center for Cancer Research, NIH, Bethesda, MD, USA, ⁵ Department of Immunology, Universidade de São Paulo, São Pa

Cachexia affects about 80% of gastrointestinal cancer patients. This multifactorial syndrome resulting in involuntary and continuous weight loss is accompanied by sys-temic inflammation and immune cell infiltration in various tissues. Understanding the interactions among tumor, immune cells, and peripheral tissues could help attenuating systemic inflammation. Therefore, we investigated inflammation in the subcutaneous adipose tissue and in the tumor, in weight stable and cachectic cancer patients with same diagnosis, in order to establish correlations between tumor microenvironment and secretory pattern with adipose tissue and systemic inflammation. Infiltrating monocyte phenotypes of subcutaneous and tumor vascular-stromal fraction were identified by flow cytometry. Gene and protein expression of inflammatory and chemotactic factors was measured with qRT-PCR and Multiplex Magpix[®] system, respectively. Subcutaneous vascular-stromal fraction exhibited no differences in regard to macrophage subtypes, while in the tumor, the percentage of M2 macrophages was decreased in the cachec-tic patients, in comparison to weight-stable counterparts. CCL3, CCL4, and IL-1 β expression was higher in the adipose tissue and tumor tissue in the cachectic group. In both tissues, chemotactic factors were positively correlated with IL-1β. Furthermore, positive correlations were found for the content of chemoattractants and cytokines in the tumor and adipose tissue. The results strongly suggest that the crosstalk between the tumor and peripheral tissues is more pronounced in cachectic patients, compared to weight-stable patients with the same tumor diagnosis.

Keywords: cancer cachexia, inflammatory cells, tumor-adipose tissue crosstalk macrophages

1

December 2015 | Volume 6 | Article 629

INTRODUCTION

Cachexia is a multifactorial and multi-organ syndrome characterized by continuous and involuntary weight loss and by systemic inflammation (1, 2). This syndrome was described about 2000 years ago by Hippocrates and is a common feature of several diseases, such as chronic obstructive pulmonary disease, chronic heart failure, chronic infection, and cancer (3).

In cancer, cachexia is present in approximately 50% of all patients and in up to 80% of patients with advanced disease, reducing tolerance to treatment, therapeutic response, and quality of life and survival (4). Among 22–40% of all cancer deaths are directly caused by cachexia (5), and its incidence varies among the different types of cancer, being of around 80% in pancreas and gastrointestinal cancer patients, and of 60% in lung cancer patients (6).

An important feature of cachexia is chronic systemic inflammation and, paradoxically, immunosuppression (7). Mediators produced by both the tumor and the host induce intracellular changes directly associated with persistent inflammation (8). The sources of the inflammatory factors in cachexia are plenty, including tumor cells, tumor infiltrating cells along with peripheral tissue parenchymal cells and associated infiltrating cells (9). Thus, an intricate tumor–host interaction is established, promoting an imbalance that favors the pro-inflammatory over the anti-inflammatory status (10, 11).

Solid tumors often present infiltrating immune cells and release cytokines into surrounding tissues and into the bloodstream (12). The immune cells within tumor microenvironment consist of various phenotypes, among which myeloid-derived suppressor cells, dendritic cells, natural killers, T cells, and macrophages (13). The infiltrate contributes to tumor growth and also to micro-environment remodeling; while the release of cytokines into the bloodstream promotes tissue and organ functional impairment as a result of systemic inflammation (12). Studies with models have shown that the host's tissues play a key role in sustaining systemic inflammation and inducting cachexia (14–17).

However, as far as we know, there are no reports in the literature comparing the cytokine secretory profile of tumors of cachectic and non-cachectic cancer patients matched for tumor type and stage. It is very possible that inflammatory factors secreted by the tumor are the culprit, eliciting secondary tissue inflammation, will as a consequence, fuel systemic inflammation. Argilés et al. review the large number of cytokines that might be responsible for the metabolic changes associated with cancer wasting (18). We have consistently found that WAT (white adipose tissue) is a contributor to systemic inflammation, as both adipocytes and infiltrating immune cells are capable of releasing cytokines in animal models of cachexia. Nevertheless, the mechanisms that trigger adipose inflammation in cancer

cachexia are not fully elucidated. We hypothesize that differences in tumor microenvironment and secretion pat-tern in patients with the same diagnosis and tumor stage could be associated with the presence or absence of cachexia-related peripheral tissue inflammation.

The aim of the present study was therefore, to examine the secretory profile of tumors of cachectic and non-cachectic

patients with matched tumor diagnosis and relate to the results with local white adipose tissue and systemic inflammation.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

Twenty-three cancer patients $(60.53 \pm 13.08 \text{ years old})$ par-ticipated in the study. The study was approved by the University of São Paulo Biomedical Sciences Institute Ethics Committee (1004/CEP) and by the University Hospital Ethics Committee (CEP-HU/USP: 752/07) in accordance to the *Declaration of Helsinki* (2013). All participants signed an informed consent prior to engaging in the study. The inclusion criteria were: not having received anticancer or continuous anti-inflammatory treatment and willingness to participate. The exclusion criteria were: liver failure, renal failure, AIDS, inflammatory diseases of the bowel, and autoimmune disorders. Patient group division was based on the criteria proposed by Evans et al. (19). Characteristics of the subjects are summarized in **Table 4**.

Realtime PCR

Total RNA was isolated from samples, with Trizol[®] reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's recommendations, and then homogenized. RNA concentrations were determined by measuring the absorbance in 260/280 nm in Synergy H1 Multi-Mode Reader (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Complementary DNA synthesis was carried out using the high capacity cDNA reverse transcription kit (Life Technologies, Grand Island, NY, USA), which consisted of an assay mix containing 1 µg total RNA, 2 µL 10× RT Buffer, 0.8 µL 25× dNTP mix (100 mM), 2 µL 10× Random primers, 1 µL MultiScribeTM Reverse Transcriptase, and 4.2 µL of nuclease-free water in a final volume of 20 µL. The thermal cycler conditions were: 25°C for 10 min, then 37°C for 120 min followed by 85°C for 5 min. Then, 20 ng of cDNA was mixed with 2× SYBR Green fast PCR master mix – and primers (**Table 1**) (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) – in a final volume of 10 µL for qPCR, performed in the Quantstudio 12K Real Time Systems (Life Technologies, Grand Island, NY, USA). The mRNA levels were determined by the comparative Ct method. For each sample, a

Ct value was obtained by subtracting RPL-27 or HPRT1 gene values from those of the gene of interest. The average Ct value of the control group was then subtracted from the sample to derive a - Ct value. The expression of each gene was evaluated by 2- Ct, according to Livak and Schmittgen (20).

Multiplex Analysis of Sample Protein

Content

Samples of the tumor and subcutaneous adipose tissue from the experimental groups were incubated with the mixture of Magplex microspheres and covered with the specific antibodies for 2 h. The detection of target antigens bound to the microspheres was performed with a mixture of biotinylated capture antibodies after incubation for 1 h followed by incubation with streptavidin labeled with phycoerithrin for 30 min. The microspheres were then analyzed with the phycoerithrin Magpix[®] instrument (Life Technologies, Grand Island, NY, USA). Each cytokine value

December 2015 | Volume 6 | Article 629
000194.2)

Chemokine(C-C motif) ligand 5

Rev: CTT GAG CAC ACA GAG GGC TA

144

was corrected to total protein concentration. The table below describes all analyzed cytokines (Table 2).

Immunophenotyping by Flow Cytometry

Preparation of Adipose Tissue and Tumor Cells for Flow Cytometry

Fractions of subcutaneous adipose tissue and tumor were obtained, any lymph nodes were carefully removed, and the tissues were placed in either DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) or HBSS (Hank's Balanced Salt Solution). The tissue fragments were then digested for 40 min at 37°C in these culture media containing collagenase type I (280 U/ml) (Sigma Aldrich) under agitation. The samples were filtered through fine plastic mesh and washed with respective media.

TABLE 1 | List of primers.

Gene (species)	Sequence 5′→3′
CCL-2 (Homo sapiens) (NM	Fw: TCA GCC AGA TGC AAT CAA TG
002982.3)	Rev: ACA CTT GCT GCT GGT GAT TCT
IL-1 $β$ (Homo sapiens) (NM	Fw: AGC CAA TCT TCA TTG CTC AAG T
000576.2)	Rev: AGT CAT CCT CAT TGC CAC TGT
IL-6 (Homo sapiens) (NM	Fw: CAG CCC TGA GAA AGG AGA CAT
000600.3)	Rev: AGC CAT CTT TGG AAG GTT CA
IFN-γ (Homo sapiens) (NM	Fw: TGG AAA GAG GAG AGT GAC AGA A
000619.2)	Rev: TTG GAT GCT CTG GTC ATC TTT A
TNF- α (Homo sapiens) (NM	Fw: CTC TCT CCC CTG GAA AGG AC
000594.3)	Rev: ATC ACT CCA AAG TGC AGC AG
IL- 10 (Homo sapiens) (NM	Fw: TGTCATCGATTTCTTCCCTGT
000572.2)	Rev: TGC CTT TCT CTT GGA GCT TAT T
RPL-27(Homo sapiens) (NM	Fw: CCG AAA TGG GCA AGT TCA T
000988.3)	Rev: CCA TCA TCA ATG TTC TTC ACG A
IL-8 (Homo sapiens) (NM	Fw: AGC TCT GTG TGA AGG TGA T
000584.3)	Rev: TTT GGG GTG GAA AGG TTT G
ZAG (Homo sapiens) (NM	Fw: CCA GGA GAA CCA AGA TGG TC
001185.3)	Rev: CTG CTT CCA ATC CTC CAT TC
PIF (Homo sapiens) (NM	Fw: AGG AAG CAG AGA TCC AGC CT
005268627.1)	Rev: GGC TCC TTT ACC CAC GCT TT
HPRT1(Homo sapiens) (NM	Fw: TGG CGT CGT GAT TAG TGA TG

Cytokine Abbreviation Tumor necrosis factor alpha TNF-α Tumor necrosis factor beta TNF-β Interleukin 6 IL-6 Interleukin 7 IL-7 Interleukin 10 IL-10 Interleukin 13 IL-13 Interferon alpha IFN-α Ir

Interferon gamma	IFN-γ
Interferon gamma-induced protein 10	IP-10
Monocyte chemotactic protein1	MCP1/CCL2
Macrophage inflammatory protein-1 α	MIP-1a/CCL3
Macrophage inflammatory protein-1 β	MIP-1β/CCL4

RANTES/CCL5

TABLE 2 | Cytokine analysis.

Finally, cells of vascular-stromal fraction were separated by centrifugation at 500 g for 5 min. The cells of the stromal-vascular fraction of adipose tissue were resuspended and washed twice with culture medium and centrifuged again at 500 g, for 5 min. The cells were resuspended in 500 μ L of FBS and dimethyl sul-foxide (DMSO) and stored in liquid nitrogen until processing for flow cytometry.

Cell Surface Antigens for Flow Cytometry

The samples were rapidly thawed in a water bath at 37° C, washed with culture medium, and pelleted at 600 g for 10 min at 4°C. Compensation of the flow cytometer (FACSCanto II – BD Biosciences) was performed with compensating beads and then the gates were determined for the analysis of cell populations of interest (Figure S1 in Supplementary Material).

The fluorochrome conjugated antibodies (listed in **Table 3**) of the macrophage panels were added to the samples, and these were incubated for 30 min at 4°C, in the dark. The labeled cells were washed, centrifuged 400 g for 5 min, resuspended in 500 μ L of DMEM, and detected by BD FACSCantoTM II cytometer.

Statistical Methods

Data are expressed as mean \pm SE or median [first quartile; third quartile]. First, a Gaussian distributions test was employed for all samples (D'Agostino-pearson omnibus test, Shapiro–Wilk test, Kolmogorov–Smirnov Test). Student's *t*-test or Mann–Whitney test with multiple comparisons was employed for parametric and non-parametric data, respectively. The significance level was set at p < 0.05. Graphpad Prism 5.0 was adopted for the analysis. All statistical procedures were performed with the assistance of the Institute of

Biomedical Sciences/University of Sao Paulo, under the supervision of Ms. Rosana Duarte Prisco.

RESULTS

3

General Characteristics of Patients

The general characteristics of patients are illustrated in **Table 4**. No statistical differences were found in regard to age and height between the groups. Body mass in the 12 months before engagement in the study, as informed by the patients at moment of the recruitment interview, showed no statistical differences between groups, while baseline body mass of the cachectic can-cer group was lower (in average 11%), when compared with the weight-stable cancer group, although not statistically significant (p = 0.07). When comparing the difference between previously

TABLE 3 | Panels of fluorochrome-conjugated antibodies for flow cytometry.

Panel	Antibody	Fluorochrome	Catalog no.
Macrophages (M1 and 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

146

informed body mass and current body mass, marked weight loss (both in terms of absolute and relative weight) was found for CC, in relation to the weight-stable cancer (WSC) group, in accordance with the proposed by Evans et al. (19) (weight loss >5% over past 6 months – in absence of simple starvation). The body mass index (kg/m²) of CC, although greater than 20 kg/m² (considered the cutoff point for cachexia), was significantly lower than that of WSC. C-reactive protein, albumin, hemoglobin, and IL-6, biochemical markers of cachexia, were also evaluated. CRP plasma content – the most widely accepted index of systemic inflammation – was higher in CC than in WSC (p = 0.0026). Similarly, plasma IL-6 levels were significantly higher in cachectic cancer patients (CC) (p = 0.0119). Additionally, serum hemo-globin levels of CC were consistently lower when compared with WSC (p = 0.0064). Serum albumin levels were not significantly different between groups (p = 0.316).

TABLE 4 | General characteristic of patients.

	WSC (weight-stable	CC (cachectic	p
	cancer)	cancer)	
N	17	19	
Male/female (n)	10/7	12/7	
Age (years)	59.2 ± 3.69	61.7 ± 2.55	0.582
Height (m)	1.65 ± 0.024	1.65 ± 0.018	0.936
Previous body mass	74.1 ± 3.13	$\textbf{72.3} \pm \textbf{3.21}$	0.695
as informed (kg)			
Current body	$\textbf{70.5} \pm \textbf{3.17}$	$\textbf{62.5} \pm \textbf{2.86}$	0.07
mass (kg)			
Weight loss (kg)	0.00 [0.00; 6.50]	10.00 [5.00; 13.00] ^a	0.0009
Weight loss (%)	0.00 [0.00; 9.00]	12.0 [8.00; 16.0] ^a	0.0006
BMI (kg/m ²)	$\textbf{25.9} \pm \textbf{1.04}$	22.8 ± 0.76^a	0.0195
Tumor stage (n)			
1-11	4	7	
III-IV	13	12	
CRP (mg/L)	3.95 [0.90; 8.03]	11.7 [7.15; 13.5] ^a	0.0026
Albumin (g/dL)	4.32 ± 0.18	4.04 ± 0.21	0.316
Hemoglobin (g/dL)	13.4 ± 0.50	11.2 ± 0.57^a	0.0064
IL-6 (pg/mL)	$\textbf{2.67} \pm \textbf{0.65}$	9.84 ± 2.02^{a}	0.0119

Data expressed as mean \pm SE or as median [first quartile; third quartile]. ^aSignificant difference CC vs. WSC group.

Tumor Gene Expression Analysis

Gene expression of the pro-inflammatory cytokines TNF- α and CCL2 in the tumor were increased in CC compared to WSC, p = 0.020 and p = 0.0354, respectively (**Figures 1A–B**). No statistically significant difference in mRNA concentration of VEGF (angiogenesis factor), IL-6, IL-1 β , IFN- γ , PIF, ZAG, IL-10, between WSC and CC could be detected, as shown in

Table 5.

Subcutaneous Adipose Tissue Gene

Expression Analysis

As previously described, we found that gene expression of TNF- α , IL-1 β , and MCP-1/CCL2 were significantly higher in cachectic cancer patients when compared with WSC. IL-6 and IFN- γ gene expression showed no differences among the groups.

Tumor Protein Expression Analysis

Protein expression of chemoattractant factors in tumor tissue CCL [(chemokine (C–C motif) ligand)]-2, CCL4, CCL5 was not significantly different between the groups as shown in **Table 6**. However, CCL3, also known as macrophage inflammatory protein 1 alpha, was higher in CC in relation to WSC (p = 0.043) (**Figure 2A**).

The protein concentrations of different pro- and anti-inflammatory cytokines and cachexia-related factors in cachectic and non-cachectic cancer are shown in **Table 6**. Among the proinflammatory cytokines, IL-1 β was increased in CC compared to WSC (p = 0.041) (**Figure 2B**). Protein concentration of IP-10, a chemokine secreted by interferon stimulated cells was not significantly different but showed a tendency to be significantly higher in CC (p = 0.092). Other inflammatory cytokines such as IFN- γ and IL-6 were not significantly different between the groups. Members of the tumor necrosis factor family TNF- α and TNF- β were also not statistically different in CC compared to WSC. The protein concentration of anti-inflammatory interleukins IL-10 was not different (p = 0.9652) between groups, yet that IL-13 (p = 0.007) was lower in CC in compared WSC (**Figure 2C**).



FIGURE 1 | Gene expression in tumor tissue. Data expressed as mean \pm SE or as median [first quartile; third quartile]. *Significant difference between WSC vs. CC. Expression of target genes was normalized to the reference HPRT1. TNF- α , tumor necrosis factor α (A); CCL2, chemokine (C–C motif) ligand 2 (B); Arbitrary units, AU. WSC (n = 10) and CC (n = 14).

TABLE 5 | Tumor gene expression of cytokines and cachexiarelated factors (AU).

qRT-PCR	WSC (weight-stable	CC (cachectic cancer)	p
(A.U)	cancer)		
VEGF	1.275 [0.446; 8.270]	0.557 [0.069; 3.28]	0.410
IL-6	1.395 [0.368; 2.509]	1.163 [0.537; 8.330]	0.683
IL1-β	2.545 [0.430; 16.07]	0.791 [0.185; 7.893]	0.524
IFN-γ	1.317 [0.313; 5.095]	27.65 [0.420; 80.16]	0.151
PIF	0.711 [0.154; 9.012]	9.706 [0.023; 101.1]	0.571
ZAG	2.029 [0.374; 3.501]	0.716 [0.369; 2.766]	0.497
IL-10	0.728 [0.152; 10.93]	34.12 [0.141; 54.02]	0.398

Data expressed as median [first quartile; third quartile]. Target gene expression was normalized to the housekeeping gene hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT-1).

Arbitrary units (AU). WSC (n = 10); CC (n = 14).

TABLE 6 | Inflammatory factors in tumor samples.

Pico gram per	WSC (weight-stable	СС	р
milligram of	cancer)	(cachectic cancer)	
total protein			
CCL2	230.5[96.08; 373.1]	261.89 [124.1; 546.4]	0.431
CCL4	9.32[3.92; 13.41]	16.62 [6.77; 55.84]	0.060
CCL5	649 ± 99.69	977.8 ± 272.2	0.306
IFN-α	20.34 [5.65; 51.66]	10.95 [7.76; 52.70]	0.791
IL-10	0.363 [0.22; 1.58]	0.441 [0.16; 2.42]	0.725
IL-6	1.034 [0.245; 1.92]	2.097 [0.724; 8.33]	0.194
IP-10	243.7[151.0; 352.2]	1263 [179.8; 2822]	0.092
TNF-α	0.352[0.202; 0.908]	<u>} 0.724 [0.339; 1.55</u>]	0.169
TNF-β	2.306 0.567	2.435 ± 0.601	0.878
Data expressed as	mean ± SE gras median [fi 50=	irst quartile; third quartile,	Ĩ
p = significance of total protein. WSC	Mann–Whitney test. Cytok (n = 11); CC (n = 12).	ri ne concentra tion was <u>porm</u>	alized
		WSG CL	ž

Subcutaneous Adipose Tissue Protein

Expression Analysis

Data of protein expression of chemoattraction factors are shown in **Table 7**. We found no statistical difference for CCL2, CCL3 and CCL5 in subcutaneous adipose tissue (**Table 7**). CCL4 protein expression was higher in CC, when compared with WSC (**Figure 3A**).

Anti- as well as pro-inflammatory cytokines (IFN- α , IL-10, IL-13, IL-6, IP-10, and TNF- α) did not exhibit differences between the two studied groups (**Table 7**). The pro-inflammatory IL-1 β and TNF- β cytokines protein expression presented higher levels in CC in relation to WSC (**Figures 3B,C**, respectively).

Immunophenotyping by Cytometry

The characterization of the different phenotypes within the total population of infiltrating macrophages in the tumor microenvironment is shown in **Figure 4**. The incidence of macrophages with anti-inflammatory profile (M2 macrophages – CD11b CD14++ CXCR4+) was significantly lower in CC, compared to WSC (p = 0.007). Macrophages with inflammatory profile (M1 macrophages – CD11b+ CD14++ CCR7+) were found in similar numbers in the tumors of both groups.

The analysis of the stromal-vascular fraction of the subcutaneous adipose tissue yielded no statistic difference in concern to M1M2 macrophage (CD11b CD14⁺⁺ CCR7⁺ CXCR4⁺), M1 macrophage (CD11b⁺ CD14⁺⁺ CCR7⁺) and M2 macrophage (CD11b CD14⁺⁺CXCR4⁺) population percentage (**Figures 5A**– **C**, respectively).

Correlations Analysis

Non-parametric correlation (Spearman) analysis between chemokine (C–C motif) ligand (CCL)-3 and CCL-4 with the

B * *

FIGURE 2 | CCL3, IL-1β, and IL-13 protein expression in tumor samples. Data expressed as median [first quartile; third quartile]. *Significant difference between WSC vs. CC. CCL3, chemokine (C–C motif) ligand 3 (A); IL-1β, interleukin 1β (B); IL-13, interleukin 13 (C). WSC (*n* = 11) and CC (*n* = 12).

5

Frontiers in Immunology | www.frontiersin.org

protein expression of the cytokine anti-inflammatory cytokine IL-13 in the tumor of cachectic patients was found to be significant (p = 0.0089); while the relationship between CCL4 and IL-13 (p = 0.147) was not (**Figures 6D,H**). Analysis of correlation of CCL3 with the protein expression of the inflammatory cytokine IL-1B showed positive relationship (CCL3/IL-1 β) (p = 0.0059) (**Figure 6E**). Whether the CCL4/IL-1 β correlation (p = 0.0897) (**Figure 6F**) nor of CCL3 with %macrophages were found to be significant (**Figures 6A–C**).

When non-parametric correlation (Spearman) analysis was carried out in regard to macrophages and CCL4 in the subcutaneous adipose tissue, no statistical correlations were observed for M1M2 macrophages not for M1 macrophages, or M2 macrophages (**Figures 7A–C**, respectively). Furthermore, non-parametric correlation for CCL4 and IL-1β was found not

TABLE 7 Inflammatory factors in the subcutaneous adipose tissue.			
Pico gram per	WSC (weight-stable	CC (cachectic	р
milligram of total	cancer)	cancer)	
protein			
CCL2	38.0 ± 7.20	20.3 ± 5.26	0.0646
CCL3	13.0[4.06; 59.4]	3.38[0.010; 68.6]	0.3725
CCL5	157 ± 31.0	121 ± 30.6	0.4219
IFN-α	0.210[0.135; 3.68]	2.12[0.228; 4.73]	0.2883
IL-10	0.070 [0.060; 0.123]	0.100 [0.060; 0.330]	0.2275
IL-13	0.190[0.110; 1.63]	0.500 [0.170; 0.680]	0.6480
IL-6	0.0711 ± 0.004	0.101 ± 0.024	0.2668
IP-10	$\textbf{9.19} \pm \textbf{2.42}$	$\textbf{3.63} \pm \textbf{0.919}$	0.0522
TNF-α	0.050 [0.040; 0.0525]	0.055 [0.030; 0.103]	0.5140

to be significant, whereas that between CCL4 and TNF- β was significant (**Figures 7D,E**, respectively).

150

Finally, we performed non-parametric correlation (Spearman) analysis for CCL4 in the subcutaneous adipose tissue and for CCL3 in the tumor, having found a statistically significant positive correlation (p = 0.0448) only for the cachec-tic patients (**Figure 8A**). When the relationship of TNF- α in the subcutaneous adipose tissue and TNF- β in the tumor was analyzed, no statistical significance was found for CC (p = 0.0892) (**Figure 8B**). A tendency for positive correlation between IL-10 in subcutaneous adipose tissue and in the tumor (p = 0.0978) (**Figure 8C**).

DISCUSSION

Cancer cachexia remains a major health problem worldwide as prevalence of cancer is on the rise. This syndrome is frequently undiagnosed and rarely treated, resulting in compromising of treatment and shortened survival (1, 10). Weight loss is the most visible feature of cachexia, yet some early metabolic and inflammatory changes precede the establishment of the most evident symptoms. The cachectic patients in the study, beyond presenting severe weight loss in the previous 6 months, exhibited systemic inflammation and anemia (CRP >5.0 mg/L, IL-6 >4 pg/mL, Hb <12 g/dL), in accordance to that proposed by Evans et al. (19), but no alterations of circulating albumin levels.

Cachexia-associated inflammation is the result of many alterations acting in concert, among which, the secretion of inflammation-promoting factors by the tumor itself. This, on the other hand, may elicit tissue and organ local sustained inflammation, in a vicious cycle. One such mechanism has been proposed to exist in cancer patients (2, 21).



FIGURE 3 | CCL4, IL-1 β , and TNF- β protein expression in subcutaneous adipose tissue. Data expressed as mean ± SE. *Significant difference CC vs. WSC group. CCL4, chemokine (C–C motif) ligand 4 (A); IL-1 β , interleukin 1 β (B); TNF- β , tumor necrosis factor β (C). WSC (n = 11) and CC (n = 12).

6



FIGURE 4 | **Percentage of the phenotypes of macrophage populations in the tumor microenvironment**. Data expressed as median [first quartile; third quartile] or median \pm SE. *Significant difference between WSC and CC. Tumor samples WSC and CC (n = 5). M1M2 macrophage **(A)**; M1 macrophage **(B)**; M2 macrophage **(C)**.



FIGURE 5 | Percentage of the phenotypes of macrophage in subcutaneous adipose tissue. Data expressed as median [first quartile; third quartile]. Stromal-vascular fraction of subcutaneous adipose tissue: WSC (*n* = 4) and CC (*n* = 5). M1M2 macrophage (**A**); M1 macrophage (**B**); M2 macrophage (**C**).

Obesity research has provided solid evidence that the adipose tissue is an important player in the onset and main-tenance of systemic inflammation (22). Indeed, the adipose tissue produces numerous bioactive molecules as TNF- α , IL -1 β , IL-6, CCL2, to cite a few; all of which are able to act in an autocrine, paracrine, and endocrine manner, hence

reaching the blood stream and promoting the crosstalk with other tissues (23).

In cancer cachexia, we have previously shown evidence that the white adipose tissue is a potential contributor for systemic inflammation, as it suffers comprehensive rearrangement and immune cell infiltration, in association with robustly increased

7



FIGURE 6 | Correlation of cytokine protein expression and % of infiltrating immune cells in tumor. (A) CCL3/M1 macrophage (%) p = 0.938; (B) CCL3/ M1M2 macrophage (%) p = 0.956; (C) CCL3/M2 macrophage (%) p = 0.342; (D) CCL3/IL-13 p = 0.0089; (E) CCL3/IL-13 p = 0.0059; (F) CCL4/IL-13 p = 0.089;

(G) IP10/IL-13 *p* = 0.057; (H) CCL4/IL-13 *p* = 0.147.

secretion of inflammatory factors (15, 24–26). Furthermore, the white adipose tissue of Walker 256 tumor-bearing rats was found to be infiltrated with monocytes (24), and we recently reported immune infiltration in cachectic cancer patients (25).

In another recent study employing the animal model of cachexia, we found up-regulation of IL-1 β expression and activa-tion of NF- κ B and of the inflammasome pathways in adipocytes, and evidence of a major contribution of the vascular-stromal frac-tion of the retroperitoneal adipose tissue to tissue inflammation (26). In the current study, we have similarly found a population

of infiltrated macrophages in the subcutaneous adipose tissue of cachectic patients, despite lack of statistical difference between the cachectic and non-cachectic groups in regard to the predomi-nance of different macrophage phenotypes (M1M2, M1, and M2).

We also previously reported that NF- κ Bp65 gene expression is increased in the subcutaneous white adipose tissue of cachectic cancer patients, concomitantly to up-regulation of its inflam-matory target genes IL-1 β , TNF- α , CCL2/MCP-1, and I κ B- α . Haugen et al. also found alterations in gene expression, including of TNF- α and CCL2, in the intra-abdominal adipose tissue, which

8



(A) M1M2/CCL4, p = 0.787; (B) M1/CCL4, p = 0.321; (C) M2/CCL4, p = 0.790 and correlations between CCL4 protein and IL-1 β , TNF- β (D) CCL4/IL-1 β , p = 0.955; (E) CCL4/TNF- β , p = 0.041.



FIGURE 8 | Correlation between protein expression of inflammatory factors in subcutaneous adipose tissue and tumor. (A) CCL4 tumor/CCL3 adipose tissue; (B) TNF- α adipose tissue/TNF- β tumor; (C) IL-10 adipose tissue/IL-10 tumor.

was associated with reduced fat mass in patients with pancreatic cancer (27, 28).

To our knowledge, we are the first to show that the subcutaneous adipose tissue of cachectic patients presents higher CCL4 protein content in relation to WSC with matched tumor diagnosis. Increased CCL4 gene expression was found by Wu et al. (29) in the adipose tissue of obese mice, with concomitant augment of the number infiltrating leukocytes. In the present study, increased IL-1 β and TNF- β protein expression was also detected, corroborating our previous findings (27).

However, what are the stimuli inducing adipose inflammation? The group of Michael Tisdale has approached, in several

Frontiers in Immunology | www.frontiersin.org

9

studies (10, 30-32), the role of tumor-derived factors in the onset of cachexia. Therefore, the main aim of the present study was to address the eventual differences in tumor microenvironment in cachectic and weight-stable cancer patients that could be possibly linked to the presence of cachexia. For that purpose, we evaluated gene and protein expression of inflammatory markers in tumor tissue, along with the profile of infiltrating macrophages in the tumor microenvironment. The first aspect examined was the expression of the tumor-derived factors described to take part in cachexia. Much to our surprise, it was actually the weight-stable group who presented higher values for lipid mobilizing factor (ZAG), while proteolysis inducing factor (PIF) was higher in cachectic patients. The literature provides evidence that these factors are present in cachexia, but no study, has to our knowl-edge, compared patients with matched tumor diagnosis with and without cachexia. Therefore, it is not impossible to speculate that tumor-derived factors actually have a role in inducing a better immune and metabolic regulatory response to the presence of the tumor. More studies are, nevertheless, required to further elucidate the importance of specific tumor-originated factors.

The microenvironment of solid tumors consists of tumor cells, infiltrating immune cells and matrix components (33, 34). In whole tumor tissue samples, we found higher TNF- α and CCL2 gene expression, along with higher CCL3 protein expression in cachectic patients, as compared to WSC. Billingsley et al. have reported similar results with *in vitro* studies in regard to TNF- α , IL-6, and leukemia inhibitory factor (LIF), in which co-culture of TNF- α with tumor cells augmented significantly cytokine production (35).

We have presently analyzed inflammation-related factors in whole tumor samples, having found that the pro-inflammatory cytokine IL-1 β and the anti-inflammatory cytokine IL-1 β and the anti-inflammatory cytokine IL-1 β expression was altered (higher and lower, respectively) in cachectic cancer patients, as compared to WSC. The classical studies regarding tumor progression were initially driven to understand intrinsic changes in malignant cells (23). In the recent years, aspects related with the tumor microenvironment and to the host's response to tumor progression have received more attention, and specially, the infiltrating immune cells, as their presence is associated with persistent inflammatory states (36, 37).

In order to establish whether tumors from cachectic patients and from WSC were different in terms of infiltration mac-rophage populations, we employed specific markers to identify macrophage sub-phenotypes. The results show fewer M2 mac-rophages in tumors of cachectic cancer patients, as compared with the weight stable group. Weber et al. demonstrated in patients with oral squamous cell carcinoma that increased polarization of macrophages toward a M2 phenotype is potentially correlated with a negative influence on tumor biology, resulting in more 12. Fearon K, Strasser F, Anker SD, Bosaeus I, Bruera E, Fainsinger RL, et al.

Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. *Lancet Oncol* (2011) **12**:489–95. doi:10.1016/S1470-2045(10)70218-7

 Argilés JM, Busquets S, Stemmler B, López-Soriano FJ. Cachexia and sarcope-nia: mechanisms and potential targets for intervention. *Curr Opin Pharmacol* (2015) 22:100–6. doi:10.1016/j.coph.2015.04.003

REFERENCES

aggressive tumors (38). We failed to encounter studies in the literature that associate tumor infiltrating macrophage population with the presence of cachexia.

Considering that several inflammatory signaling pathways work in concert in promotion of inflammation, we performed Spearman's correlation tests for tumor and subcutaneous adipose tissue data. The results show that CCL3 protein levels present a positive correlation with the expression of pro-inflammatory IL-1 β protein in the patients' tumors. In the subcutaneous adi-pose tissue, we report a positive correlation between CCL4 and TNF- β . These data corroborate the idea of complex and active interaction between the tumor and peripheral tissues, with major involvement of infiltrating immune cells.

The limitations of the study should be acknowledged. The previous body mass was informed by patients, and thus inaccuracies regarding this parameter are possible. Owing to human tissue sample implicit variation, some of the analyses were not performed with the total number of patients formerly enrolled, as some samples fell out of the detection range of the assays. The relative contribution of infiltrating monocytes for tissue inflammation was not assessed. Experiments with isolated cell populations are now being conducted.

CONCLUSION

The results provide evidence that tumors from cachectic and weight stable cancer patients with same diagnosis show different secretory profile in regard to inflammatory factors and different macrophage phenotype percentage. An association between tumor-originated factors and adipose tissue inflammatory changes is proposed, as a

Frontiers in Immunology | www.frontiersin.org

positive correlation was found between tumor and adipose tissuederived cytokines and inflammatory factors.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Emilia Ribeiro and hospital staff for technical support. This work was supported by FAPESP (2012/50079-0; 2012/10129-8) and CAPES.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2015.00629

Figure S1 | Gating strategy for determination of macrophage-infiltrating subpopulations in tumor and adipose. Specific gating strategies: (A) FSC-H vs FSC-A to exclude doublets. (B) FSC vs SSC to gate out the debris.

(C) CD45+ to include all leukocytes. (D) CD14+ or CD11+ macrophages can be identified by markers such as CD14+ or CD11b+. (E) Unlabeled sample.

(F) Labeled sample CCR7 (subpopulation M1), CXCR4+ (subpopulation M2), and double positive CCR7+ CXCR4+ (subpopulation M1–M2).

- Fearon K, Arends J, Baracos V. Understanding the mechanisms and treatment options in cancer cachexia. *Nat Rev Clin Oncol* (2013) 10:90–9. doi:10.1038/ nrclinonc.2012.209
- 18. Khan S, Tisdale MJ. Catabolism of adipose tissue by a tumour-produced lipid-mobilising factor. Int J Cancer (1999) 80:444–7. doi:10.1002/ (SICI)1097-0215(19990129)80:3<444::AID-IJC18>3.0.CO;2-U
- Todorov P, Cariuk P, Mcdevitt T, Coles B, Fearon K, Tisdale M. Characterization of a cancer cachectic factor. *Nature* (1996) 379:739–42. doi:10.1038/379739a0

- Watchorn TM, Waddell I, Dowidar N, Ross JA. Proteolysis-inducing factor regulates hepatic gene expression via the transcription factors NF-(kappa)B and STAT3. FASEB J (2001) 15:562–4. doi:10.1096/fj.00-0534fje
- 20.Faber J, Uitdehaag MJ, Spaander M, Van Steenbergen-Langeveld S, Vos P, Berkhout M, et al. Improved body weight and performance status and reduced serum PGE2 levels after nutritional intervention with a specific medical food in newly diagnosed patients with esophageal cancer or adenocarcinoma of the gastro-esophageal junction. J Cachexia Sarcopenia Muscle (2015) 6:32–44. doi:10.1002/jcsm.12009
- 21.Baracos VE. Regulation of skeletal-muscle-protein turnover in can-cerassociated cachexia. *Nutrition* (2000) 16:1015–8. doi:10.1016/ S0899-9007(00)00407-X
- 22.Landskron G, De La Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J Immunol Res* (2014) 2014:149185. doi:10.1155/2014/149185
- Tisdale MJ. Tumor-host interactions. J Cell Biochem (2004) 93:871–7. doi:10.1002/jcb.20246
- Bennani-Baiti N, Davis MP. Cytokines and cancer anorexia cachexia syndrome. *Am J Hosp Palliat Care* (2008) 25:407–11. doi:10.1177/1049909108315518
- Al-Zoughbi W, Al-Zhoughbi W, Huang J, Paramasivan GS, Till H, Pichler M, et al. Tumor macroenvironment and metabolism. *Semin Oncol* (2014) 41:281–95. doi:10.1053/j.seminoncol.2014.02.005
- 26. Edin S, Wikberg ML, Dahlin AM, Rutegård J, Öberg Å, Oldenborg PA, 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* (2012) **7**:e47045. doi:10.1371/journal.pone.0047045
- 27. Kanzaki M, Soda K, Gin PT, Kai T, Konishi F, Kawakami M. Erythropoietin

attenuates cachectic events and decreases production of interleukin-6, a cachexia-inducing cytokine. *Cytokine* (2005) **32**:234–9. doi:10.1016/j. cyto.2005.10.002

- Batista ML, Neves RX, Peres SB, Yamashita AS, Shida CS, Farmer SR, et al. Heterogeneous time-dependent response of adipose tissue during the devel-opment of cancer cachexia. *J Endocrinol* (2012) 215:363–73. doi:10.1530/ JOE-12-0307
- Donatto FF, Neves RX, Rosa FO, Camargo RG, Ribeiro H, Matos-Neto EM, et al. Resistance exercise modulates lipid plasma profile and cytokine content in the adipose tissue of tumour-bearing rats. *Cytokine* (2013) 61:426–32. doi:10.1016/j.cyto.2012.10.021
- White JP, Puppa MJ, Narsale A, Carson JA. Characterization of the male ApcMin/+ mouse as a hypogonadism model related to cancer cachexia. *Biol Open* (2013) 2:1346–53. doi:10.1242/bio.20136544
- Argilés JM, Busquets S, Toledo M, López-Soriano FJ. The role of cytokines in cancer cachexia. *Curr Opin Support Palliat Care* (2009) 3:263–8. doi:10.1097/SPC.0b013e3283311d09
- Evans WJ, Morley JE, Argilés J, Bales C, Baracos V, Guttridge D, et al. Cachexia: a new definition. *Clin Nutr* (2008) 27:793–9. doi:10.1016/j. clnu.2008.06.013
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method. *Methods* (2001) 25:402–8. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Yazawa T, Shibata M, Gonda K, Machida T, Suzuki S, Kenjo A, et al. Increased IL-17 production correlates with immunosuppression involving myeloid-derived suppressor cells and nutritional impairment in patients with various gastrointestinal cancers. *Mol Clin Oncol* (2013) 1:675–9. doi:10.3892/

mco.2013.134

 Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. Annu Rev Immunol (2011) 29:415–45. doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101322 Trinchieri G. Cancer and inflammation: an old intuition with rapidly evolving new concepts. *Annu Rev Immunol* (2012) 30:677–706. doi:10.1146/ annurevimmunol-020711-075008

160

 Machado AP, Costa Rosa LF, Seelaender MC. Adipose tissue in walker 256 tumour-induced cachexia: possible association between decreased leptin concentration and mononuclear cell infiltration. *Cell Tissue Res* (2004) **318**:503–14. doi:10.1007/s00441-004-0987-2

- Batista ML Jr, Henriques FS, Neves RX, Olivan MR, Matos-Neto EM, Alcântara PSM, et al. Cachexia-associated adipose tissue morphological rearrangement in gastrointestinal cancer patients. J Cachexia Sarcopenia Muscle (2015). doi:10.1002/jcsm.12037
- Neves RX, Rosa-Neto JC, Yamashita AS, Matos-Neto EM, Riccardi DMR, Lira FS, et al. White adipose tissue cells and the progression of cachexia: inflammatory pathways. J Cachexia Sarcopenia Muscle (2015). doi:10.1002/jcsm.12041
- 45. Camargo RG, Riccardi DM, Ribeiro HQ, Carnevali LC, De Matos-Neto EM, Enjiu L, et al. NF-κBp65 and expression of its pro-inflammatory target genes are upregulated in the subcutaneous adipose tissue of cachectic cancer patients. *Nutrients* (2015) 7:4465–79. doi:10.3390/nu7064465
- 46. Haugen F, Labori KJ, Noreng HJ, Buanes T, Iversen PO, Drevon CA. Altered expression of genes in adipose tissues associated with reduced fat mass in patients with pancreatic cancer. *Arch Physiol Biochem* (2011) **117**:78–87. doi:10.3109/13813455.2011.560609
- Wu CH, Yang MY, Chan KC, Chung PJ, Ou TT, Wang CJ. Improvement in high-fat diet-induced obesity and body fat accumulation by a *Nelumbo nucifera* leaf flavonoid-rich extract in mice. *J Agric Food Chem* (2010) 58:7075– 81. doi:10.1021/jf101415v
- Sullivan-Gunn MJ, Campbell-O'sullivan SP, Tisdale MJ, Lewandowski PA. Decreased NADPH oxidase expression and antioxidant activity in cachectic skeletal muscle. J Cachexia Sarcopenia Muscle (2011) 2:181–8. doi:10.1007/ s13539-011-0037-3
- Mirza KA, Tisdale MJ. Role of Ca2+ in proteolysis-inducing factor (PIF)induced atrophy of skeletal muscle. *Cell Signal* (2012) 24:2118–22. doi:10.1016/j.cellsig.2012.07.016
- Mirza KA, Pereira SL, Voss AC, Tisdale MJ. Comparison of the anticatabolic effects of leucine and Ca-β-hydroxy-β-methylbutyrate in experimental models of cancer cachexia. *Nutrition* (2014) 30:807–13. doi:10.1016/j.nut.2013.11.012
- Iijima J, Konno K, Itano N. Inflammatory alterations of the extracellular matrix in the tumor microenvironment. *Cancers* (2011) 3:3189–205. doi:10.3390/ cancers3033189
- Trinchieri G. Innate inflammation and cancer: is it time for cancer prevention? F1000 Med Rep (2011) 3:11. doi:10.3410/M3-11
- Billingsley KG, Fraker DL, Strassmann G, Loeser C, Fliot HM, Alexander HR. Macrophage-derived tumor necrosis factor and tumor-derived of leukemia inhibitory factor and interleukin-6: possible cellular mechanisms of cancer cachexia. Ann Surg Oncol (1996) 3:29–35. doi:10.1007/BF02409048
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* (2011) 144:646–74. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Proctor MJ, Mcmillan DC, Horgan PG, Fletcher CD, Talwar D, Morrison DS. Systemic inflammation predicts all-cause mortality: a glasgow inflam-mation outcome study. *PLoS One* (2015) **10**:e0116206. doi:10.1371/journal. pone.0116206
- Weber M, Moebius P, Büttner-Herold M, Amann K, Preidl R, Neukam FW, et al. Macrophage polarisation changes within the time between diagnostic biopsy and tumour resection in oral squamous cell carcinomas-an immuno-histochemical study. *Br J Cancer* (2015) **113**:510–9. doi:10.1038/bjc.2015.212

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2015 de Matos-Neto, Lima, de Pereira, Figuerêdo, Riccardi, Radloff, das Neves, Camargo, Maximiano, Tokeshi, Otoch, Goldszmid, Câmara, Trinchieri, de Alcântara and Seelaender. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

ANEXO G

Nutrients 2015, 7, 4465-4479; doi:10.3390/nu7064465





ISSN 2072-6643

www.mdpi.com/journal/nutrients

Article

NF-kBp65 and Expression of Its Pro-Inflammatory Target Genes Are Upregulated in the Subcutaneous Adipose Tissue of Cachectic Cancer Patients

Rodolfo Gonzalez Camargo ^{1,†,*}, Daniela Mendes dos Reis Riccardi ^{1,†},

Henrique Quintas Teixeira Ribeiro¹, Luiz Carlos Carnevali Jr.¹, Emidio Marques de Matos-Neto¹, Lucas Enjiu¹, Rodrigo Xavier Neves¹, Joanna Darck Carola Correia Lima¹,

Raquel Galvão Figuerêdo¹, Paulo Sérgio Martins de Alcântara², Linda Maximiano²,

José Otoch², Miguel Luiz Batista Jr.³, Gerhard Püschel⁴ and Marilia Seelaender¹

^{14.} Cancer Metabolism Research Group, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1524—Cidade Universitária, Sao Paulo, 05508-000, Brazil;

E-Mails: dariccardi@hotmail.com (D.M.R.R.); henriqueribeiro@hotmail.com (H.Q.T.R.); lucarjr78@hotmail.com (L.C.C.); emidiomatos@gmail.com (E.M.M.-N.); enjiu84@gmail.com (L.E.); digo_e.d@hotmail.com (R.X.N.); joana.carola14@gmail.com (J.D.C.C.L.); raquel.galfig@gmail.com (R.G.F.); seelaend@icb.usp.br (M.S.)

^{15.} Department of Clinical Surgery, University of Sao Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 2565—Cidade Universitária, São Paulo, 05508-000, Brazil;

E-Mails: palcantara@usp.br (P.S.M.A.); linda@usp.br (L.M.); pinhata@usp.br (J.O.)

- ^{16.} Biotechnology Group, Laboratory of Adipose Tissue Biology, University of Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, Sao Paulo, 05508-100, Brazil; E-Mail: migueljr4@me.com
- ^{17.} Department of Nutritional Biochemistry, University of Potsdam, Potsdam, 14558, Germany, E-Mail: gpuesche@uni-potsdam.de

[†] These authors contributed equally to the work.

20. Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: rodolfogcamargo@usp.br; Tel./Fax: +55-11-3091-7225.

Received: 9 April 2015 / Accepted: 25 May 2015 / Published: 4 June 2015

Abstract: Cancer cachexia, of which the most notable symptom is severe and rapid weight loss, is present in the majority of patients with advanced cancer. Inflammatory mediators play an important role in the development of cachexia, envisaged as a chronic inflammatory syndrome. The white adipose tissue (WAT) is one of the first compartments affected in cancer cachexia and suffers a high rate of lipolysis. It secretes several cytokines

4466

capable of directly regulating intermediate metabolism. A common pathway in the regulation of the expression of pro-inflammatory cytokines in WAT is the activation of the nuclear transcription factor kappa-B (NF- κ B). We have examined the gene expression of the subunits NF- κ Bp65 and NF- κ Bp50, as well as NF- κ Bp65 and NF- κ Bp50 binding, the gene expression of pro-inflammatory mediators under NF- κ B control (IL-1 β , IL-6, INF- γ , TNF- α , MCP-1), and its inhibitory protein, nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha (I κ B- α). The observational study involved 35 patients

(control group, n = 12 and cancer group, n = 23, further divided into cachectic and noncachectic). NF- κ Bp65 and its target genes expression (TNF- α , IL-1 β , MCP-1 and I κ B- α) were significantly higher in cachectic cancer patients. Moreover, NF- κ Bp65 gene expression correlated positively with the expression of its target genes. The results strongly suggest that the NF- κ B pathway plays a role in the promotion of WAT inflammation during cachexia.

Keywords: cancer cachexia; inflammation; white adipose tissue; NF-KB; IKB

1. Introduction

Cancer cachexia is mainly characterized by involuntary weight loss. This syndrome is present in around fifty percent of all cancer patients and may be found in more than two thirds of those in the advanced stage of the disease [1]. It represents the direct cause of at least twenty to forty percent of all deaths associated with cancer [2]. The etiology of cachexia is extremely complex and the syndrome compromises survival and quality of life [3]. It is currently accepted that systemic inflammation plays a major role in the plethora of alterations that characterize cachexia [4]. Indeed, high concentration of inflammatory cytokines is reported in the plasma and tissues of both animal models and patients [5]. Yet, one question remains unclear: What elements trigger and maintain cachexia-related systemic inflammation? We have previously provided evidence that the white adipose tissue is a potential contributor to the maintenance of systemic inflammation in cachexia, as it secretes several inflammatory cytokines and adipokines [4,6,7]. These factors directly regulate several functions related with metabolism, body composition, activity of the complement system and vascular homeostasis [8]. Among these adipose-derived factors, several pro-inflammatory and anti-inflammatory mediators are described, including tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin 1 beta (IL- β), interleukin-6 (IL-6) and monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) [9]. Therefore, besides being profoundly affected by cachexia [10], the adipose tissue may play an important role in its etiology.

A central step in the control of the cellular expression of pro-inflammatory cytokines is the activation in cells of the nuclear transcription factor kappa B (NF- κ B), which induces the transcription of most genes related with inflammation, including the so called 'classic cachectic cytokines' TNF- α , IL-6, IL-1 β ,

interferon gamma (INF- γ) and of chemokines such as MCP-1. This pathway also induces nitric oxide synthase (iNOS), as well as the expression of adhesion molecules [11]. A large body of evidence indicates a link between inflammation promoted by the activation of this transcription factor and cancer (with regard to tumor progression) and it has been shown that inhibition of NF- κ B activation

markedly affects cachexia [12]. Thus, NF- κ B is considered a target for cancer treatment [13]. Furthermore, extensive lipolysis in white adipose tissue seems to be related with TNF- α action through the activation of the NF- κ B signaling pathway, as demonstrated in cultured adipocytes [14].

The functional form of the molecule of NF- κ B consists of dimers (homo-or heterodimers) [14], Different combinations of NF- κ B subunits present different functions in the regulation of the immune response. The transcription of pro-inflammatory genes in the NF- κ B classical signaling pathway is regulated by the heterodimer NF- κ Bp65-p50, while the homodimer NF- κ Bp50-p50 has been described as anti-inflammatory, repressing the expression of several pro-inflammatory molecules due to the absence of its COOH-terminal transactivation domain [15]. The most studied heterodimers are NF- κ Bp65/NF- κ Bp50 (NF- κ Bp65-p50), and NF- κ Bp52/RelB (NF- κ Bp52-RelB) [12]. The vast majority of the studies on inflammation focus on the heterodimer NF- κ Bp65-p50, due to its unequivocal inflammatory function. Given the potential role of the white adipose tissue to maintain systemic inflammation in cancer cachexia, and the high circulating levels of cytokines that are characteristic of the syndrome, we performed an observational study in which we examined, for the first time, the correlation of the dimer NF- κ Bp65-p50 with the induction of gene expression of pro-inflammatory cytokines and chemokines in the subcutaneous adipose tissue of cachectic cancer patients, as compared with non-cachectic.

2. Experimental Section

2.1. Patient Recruitment

Patients (n = 35) were recruited between July 2011 and January 2013 at the University Hospital of the University of São Paulo. The recruitment was conducted by the hospital personnel and consisted in selecting patients engaged in the treatment of hernia (control group (N), n = 12) and cancer, further divided in non-cachectic (T), n = 11 and cachectic [16], n = 12. The project was approved by the University of São Paulo Biomedical Sciences Institute Ethics Committee (1004/CEP), and by the University Hospital Ethics Committee (CEP-HU/USP: 752/07). The inclusion criteria were: not having received prior anticancer or anti-inflammatory treatment, and willingness to participate. The exclusion criteria were: liver failure, renal failure, AIDS, inflammatory diseases of the bowel and autoimmune disorders. After the selection, anthropometric measurements were obtained (height, weight) and the patients were interviewed with a quality of life questionnaire validated for Portuguese (EORTC QLQ-C30) [17,18], which addresses three clusters that compose quality of life: Functionality (physical, cognitive, emotional and social), Symptomatic (fatigue, pain, nausea and vomiting) and Global health. The cancer patients with involuntary weight loss of at least 5% in the past 12 months or BMI <20 kg/m², plus at least three of the five following criteria: decreased muscle strength, fatigue, anorexia, low

fat-free mass index and abnormal biochemistry (increased circulated inflammatory markers as IL-6>4.0 pg/mL or C-Reactive Protein (CRP) >5.0 mg/L, anemia (Hb < 12 g/dL) or low serum albumin (<3.2 g/dL). The non-cachectic cancer group was composed of patients under cancer treatment that did not fulfill the mentioned criteria. A full written consent form was obtained from each patient.

2.2. Clinical and Biochemical Parameters Assessment

Height and weight were determined and approximately 10mL of blood collected on the interview day previous to surgery. The samples were then centrifuged and serum was collected and frozen at -80 °C for further analysis. The serum measurements (CRP, Albumin) were performed with the commercial kit (Turbiquest plus (Cat# 331) ultrasensitive CRP and Albumin (Cat#19)) from Labstest, Lagoa Santa, MG, Brazil. Haemoglobin measurements were performed by the University Hospital laboratory (Cidade universitária, São Paulo, Brazil).

2.3. Adipose Tissue Biopsies

Approximately one gram of subcutaneous white adipose tissue was collected during surgery. Tissue samples were rapidly divided in two tubes: The first with 1 mL of Trizol[®] for subsequent total RNA extraction and Quantitative real-time PCR (qPCR) experiments, and the second with 20 mL of PBS 1 X with 5% of phosphatase inhibitor for subsequent ELISA binding assay experiments. This procedure presented a minimal degree of risk, and did not interfere with the standard surgery procedure or with anesthesia.

2.4. Gene Expression

Total RNA was isolated using the Trizol[®] Reagent according to the manufacturer's instructions. Total RNA concentrations were quantified using the Biomate 3 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Complementary DNA synthesis was carried out using the high capacity cDNA reverse transcription kit (Life Technologies, Grand Island, NY, USA), which consisted of an assay mix containing 1 µg total RNA, 2 µL 10× RT Buffer, 0.8 µL 25× dNTP mix (100 mM), 2 µL 10× Random primers, 1 µL MultiScribeTM Reverse Transcriptase and 4.2 µL of nuclease-free water in a final volume of 20 µL. The thermal cycler conditions were: 25 °C for 10 min, then 37 °C for 120 min followed by 85 °C for 5 min. Then, 20 ng of cDNA were mixed with 2× SYBR Green fast PCR master mix—and primers (Table 1) (Life Technologies, Grand Island, NY, USA)—in a final volume of 10 µL for qPCR, performed in the Quantstudio 12K Real Time Systems (Life Technologies, Grand Island, NY, USA).The mRNA levels were determined by the comparative Ct method. For each sample, a Ct value was obtained by subtracting RPL-27 values from those of the gene of interest. The average Δ Ct value of the control group was then, subtracted from the sample to derive a $-\Delta\Delta$ Ct value. The expression of each gene was evaluated by $2^{-\Delta\Delta Ct}$, according to Livak *et al.* 2001 [19].

Table 1. Primer sequences used in the qPCR experiments.

Gene	Sense (5'-3')	Antisense (5'-3')
DDI 27 (NM 000088 3)	CCGAAATGGGCAAGTTCAT	
$\mathbf{KF L} = 27 (\mathbf{INM} = 000900.5)$		
NF-кВр65 (NM_021975.3)	CCIGGAGCAGGCIAICAGIC	ATGGGATGAGAAAGGACAGG
NF-кВр50 (NM_003998.3)	CATCCCATGGTGGACTACCT	TGGGTCCAGCAGTTACAGTG
	CTCCGAGACTTTCGAGGAAATA	
ΙκΒ-α (ΝΜ_020529.2)	С	GCCATTGTAGTTGGTAGCCTTCA
IL-1β (NM_000576.2)	AGCCAATCTTCATTGCTCAAGT	AGTCATCCTCATTGCCACTGT
IL-6 (NM_000600.3)	CAGCCCTGAGAAAGGAGACAT	AGCCATCTTTGGAAGGTTCA
TNF-α (NM_000594.3)	CTCTCTCCCCTGGAAAGGAC	ATCACTCCAAAGTGCAGCAG
INF-γ (NM_000619.2)	TGGAAAGAGGAGAGTGACAGAA	TGGAAAGAGGAGAGTGACAGAA
MCP-1 (NM_002982.3)	TCAGCCAGATGCAATCAATG	ACACTTGCTGCTGGTGATTCT

2.5. NF-KB Binding Assay

4469

Subcutaneous adipose tissue protein extraction was carried out employing the Active Motif[®] Nuclear extract kit (Active Motif[®], Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. Total protein was assessed with the commercial Pierce BCA protein assay kit (Life Technologies, Grand Island, NY, USA), according to the manufacturer's protocol. Western blot was performed to verify the efficacy of nuclear protein extraction as described below:

Samples were boiled at 95 °C for 5 min in SDS-mercaptoethanol sample buffer. Then, were centrifuged for 5 min at 12,000× g. Equal amounts of protein (20 µg per sample) were separated in the NuPAGE[®] Novex[®] 4%–12% Bis-Tris protein gel (Catalog # NP00336BOX) (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) and then transferred to a PVDF membrane. After blocking with 5% non-fat milk in Tris buffered saline Tween 20 (TBS-Tween 0.1%) for 1 h at room temperature, membranes were washed three times with TBS-Tween 0.1% for 10 min and then incubated overnight with primary antibodies at 4 °C. The Primary antibodies against Lamin A 1:500 (Catalog # sc-20680; Lamin A antibody H-102) and β-Tubulin 1:1000 (Catalog # sc-9104 β-Tubulin antibody H-235) were obtained from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA). After three washes on the next day, the membranes were then incubated with anti-rabbit IgG secondary antibody (1:5000) for two hours. The membranes were then incubated with ECL-Plus chemiluminescent detection HRP reagents (Bio-rad, Hercules, California, USA). Immunoreactive bands were visualized using the ImageQuant LAS 4000 (GE, Fairfield, CT, USA).

The binding assay was performed employing the NF- κ B Family Transam transcription factor assay kit[®] (Active Motif[®], Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's protocol which consisted of a NF- κ B binding sequence (5'-GGGACTTTCC-3') immobilized in each of the 96-well plate used in the assay. The protein extract (20 µg) was then pipetted in each well and the binding process occurred. After binding, antibodies against NF- κ Bp65 and NF- κ Bp50 were pipetted, followed by the secondary antibodies and a developing solution. Absorbance was then measured and compared between the groups.

2.6. Statistical Analysis

General characteristics (Table 2), Biochemical parameters results are expressed as means \pm SD (Figure 1), Quality of life Score (Figure 2) and gene expression (Table 3 and Figure 3) data are expressed as means \pm SE.. Binding assay results are expressed as means \pm SE of percentage of the control group value (Figure A2). Statistical significance was determined either by ANOVA non-parametric analysis (Kruskal-Wallis test with Dunn's post-test), for those parameters that did not present equal variances, or ANOVA one-way with Tukey's post-test, for the parameters that showed equal variance, as assessed by the Bartlett's test. *p* < 0.05 was considered statistically significant. Spearman's correlation analysis was

then performed between paired samples. All statistics analyses were performed with the Graphpad Prism software (version 5.0).

	N	Т	ТС	р
n	12	11	12	
Male/Female (n)	9/3	7/4	6/6	
Age (years)	62.00 ± 2.51	58.64 ± 4.04	60.42 ± 2.93	0.7609
Height (m)	1.65 ± 0.03	1.64 ± 0.02	1.64 ± 0.02	0.9909
Previous body mass (Kg)	75.48 ± 4.86	75.64 ± 4.532	74.44 ± 2.665	0.9728
Current body mass (Kg)	75.48 ± 4.86	67.83 ± 3.87	64.45 ± 2.98	0.1432
Body mass (%)	0.00 ± 0.00	9.36 ± 3.27 *	13.58 ± 1.75 *	0.0005
BMI (kg/m ²)	27.76 ± 1.40	25.31 ± 1.58	23.89 ± 1.16	0.1573
Tumor stage				
I	-	18.2%	0%	-
IIA/IIB/IIC	-	27.3%	25%	-
IIIA/IIIB/IIIC	-	45.4%	33.3%	-
IVA/IVB	-	9.1%	41.7%	-
Primary tumour site				
Colon and rectum	-	72.7%	58.3%	-
Stomach	-	18.2%	41.7%	-
Other	-	9.1%	0%	-

Table 2. General characteristics of patients in each group.

Data expressed as mean \pm standard error. Δ : Difference between self-declared previous body mass and current body mass. *: Significant difference *versus* N.

Table 3. Subcutaneous adipose tissue NF- κ B signaling pathway proteins and proinflammatory mediators under NF- κ B control gene expression.

Gene Expression	Statistical Analysis	Significance
(A) NF-кBр65	p = 0.0147	TC vs. T; TC vs. N
(B) NF-кВр50	p = 0.1719	
(C) IL-6	p = 0.1458	
(D) IL-1β	p = 0.0049	TC vs. T
(E) TNF-a	p = 0.0201	TC vs. N

(F) INF-γ	p = 0.2255	
(G) MCP-1	p = 0.0033	TC vs. T; TC vs. N
(H) IkB-α	p = 0.0019	TC vs. T; TC vs. N

(A) Gene expression analysis of NF- κ Bp65 showed higher values (p = 0.0147) in cachectic cancer patients compared to controls; (**B**) Gene expression of NF- κ Bp50 protein showed no differences among the patients (p = 0.1719); (**C**) IL-6 gene expression showed no differences among the patients (p = 0.1458); (**D**) IL-1 β gene expression was higher in cachectic cancer patients (p = 0.049) compared to non-cachectic patients; (**E**) TNF- α gene expression was higher in cachectic cancer patients (p = 0.0201) compared to the control group; (**F**) INF- γ gene expression showed no differences among the groups (p = 0.2255); (**G**) MCP-1 gene expression was higher in cachectic cancer patients (p = 0.0033), compared to controls; (**H**) The inhibitory protein I κ B- α gene expression was higher in cachectic cancer patients (p = 0.0019), compared to controls.



Figure 1. Serum Hemoglobin (**A**) C-Reactive Protein (**B**) and Albumin (**C**) concentration. Data expressed as mean \pm standard error; *: p < 0.05; ***: p < 0.001.



Figure 2. Quality of life Score. Data expressed as mean \pm standard error; **: p < 0.01; ***: p < 0.001.



4471



175

Figure 3. Subcutaneous adipose tissue NF- κ Bp65 and NF- κ Bp50gene expression.(A) NF- κ Bp65/RPL-27 gene expression; (B) NF- κ Bp50/RPL-27gene expression.Data expressed as mean \pm standard error; *: p < 0.05.gene expression.

3. Results

3.1. Clinical Findings

Baseline characteristics of the patients are shown in Table 2. The subjects in the three groups were of similar height, weight and body mass index (BMI). Non-cachectic and cachectic cancer patients showed a significant difference in serum hemoglobin (p < 0.001), compared with the control group. TCC also presented significantly higher CRP serum levels (p < 0.001) compared with the other groups. We did not evaluate lean body mass among the groups, although groups were matched by BMI.

3.2. Quality of Life Analysis

The three parameters that compose the criteria for global quality of life analysis showed cachexia to negatively influence these parameters (p < 0.001). Non-cachectic cancer patients also demonstrated a reduction in quality of life compared with the control group (p < 0.001), as shown in Figure 2.



4472



4 VCP-1

mRNA

ру 10 На

mRNA







Figure 4. Subcutaneous adipose tissue gene expression and Spearman's correlation with NF- κ Bp65. (**A**) IL-6; (**B**) IL1- β ; (**C**) TNF- α ; (**D**) INF- γ ; (**E**) MCP-1; (**F**) I κ B- α . Data expressed as mean \pm standard error. *: p < 0.05; **: p < 0.01.

3.3. Gene Expression

Groups: Control (N), non-cachectic cancer patients (T) and cachectic cancer patients [16].

4. Discussion

Systemic inflammation is a central feature of cancer cachexia [16,20–22]. Circulating pro-inflammatory mediators such as II-6, TNF-α and acute phase proteins (CRP) are upregulated in cachectic patients and correlate positively with weight loss and poor prognosis. In this study, CRP concentration was significantly higher in cachectic cancer patients. This acute-phase protein has been described as a marker of systemic inflammation and is also considered as part of cachexia diagnostic criteria [16]. Our results reinforce the importance of circulatory pro-inflammatory mediators as cachectic markers and corroborate previous studies with cancer patients [23]. The search for non-invasive cachexia markers is mandatory, and would warrant earlier intervention, thus preventing the onset of the symptoms and adverse prognosis. In this study, quality of life was evaluated by the application of the QLQ-C30 questionnaire. Patients reported diminished quality of life, which compromises the treatment adherence and survival. The three clusters analyzed in this questionnaire: Functionality (physical, cognitive, emotional and social), Symptomatic (fatigue, pain, nausea and vomiting) and Global health were all impaired in the cachectic cancer patients. Amongst the symptomatic cluster, fatigue is the main declared symptom and is usually present in more than 75% of cachectic patients [24]. It is accepted that systemic inflammation markedly contributes to the worsening of cachexia prognosis. Several peripheral organs suffer the consequences of inflammation triggered by the high circulatory level of pro-inflammatory mediators, that, in turn, induce in peripheral and central organs the activation of the inflammatory signaling pathways, such as the NF-kB pathway [25]. The NF-kB/Rel family of proteins, described first by Sen and Baltimore in 1986 [26] consists of transcription factors intensely studied due to the major implication as key mediators of a wide variety of cellular responses associated mainly with inflammation, infection and apoptosis. These include the stimulation of the expression of pro-inflammatory mediators such as TNF-α, IL-6, INF-δ, IL-1β, of chemokines such as MCP-1, and of reactive oxygen species (ROS) [12,13,27]. The relationship of the NF- κ B signaling pathway with poor prognosis of cancer cachexia has already been extensively studied in the muscle, where increased NF- κ B signaling has been described in patients [28]. Similarly, in patients under treatment for lung cancer, circulating pro-inflammatory mediators were associated with the activation of the NF-kB signaling pathway in the muscle [29]. Moreover, the importance of this transcription factor was confirmed by pharmacological inhibition, which was demonstrated to be an effective tool to reduce muscle proteolysis and consequently, atrophy [30,31]. Besides the muscle, other organs such as the liver, the brain, the gut and the adipose tissue are affected by cachexia. Adipose tissue metabolism is impaired and extensive lipolysis is observed [32]. WAT actively contributes to the inflammatory state in cachexia by actively secreting pro-inflammatory mediators [4,6,33]. Despite being recognized as an active player in cachexia, no information is available in the literature about the role of NF- κ B in the development and maintenance of local inflammation of the adipose tissue. In the present study we
demonstrate for the first time, that gene expression of NF- κ Bp65, which is a subunit of the one of the most important transcription factors that induce pro-inflammatory mediator gene expression, is upregulated

in the subcutaneous adipose tissue of cachectic cancer patients, compared with controls. This is a strong indication of the role of NF- κ Bp65 in the promotion of inflammation in the subcutaneous adipose tissue in cachectic cancer patients. To confirm such participation of NF- κ Bp65 in the regulation of the adipose tissue inflammation, an assay was performed to evaluate NF- κ Bp65 and

NF- κ Bp50 binding capacity to its promoter region of the DNA. This assay may be envisaged as a 'snapshot' of the cellular nucleus subunits NF-kBp65 and NF-kBp50 capacity of action, at the moment of tissue collection. Previous experiments of our group showed that the NF-kBp65 binding to its promoter region is higher, but not statistically significant among groups, while NF-kBp50 did not differ among groups (Figure A1). This assay, nevertheless, does not provide optimal evidence of total binding rate, as NF-KB dimer activity presents a fast up-regulation in the nucleus and then decays rapidly, migrating back to the cytoplasm, where it is again sequestered by its inhibitory protein, $I\kappa B - \alpha$. This is described as a rapid and dose-dependent response, that involves phosphorylation and subsequently proteasome degradation of the NF- κ B inhibitory protein, $I\kappa B - \alpha$, which leaves the transactivation domain of the NF- κB dimer free to translocate to the nucleus and exert its functions as a transcription factor [34]. This rapid and transient stimulus, however, is sufficient to alter gene expression and cause prolonged changes in the NF- κ B target proteins mRNA levels [35]. This led us to hypothesize that actually the best experiment to examine NF-κBp65 activity would rather consist of sequential evaluation of binding at different collection times; what is, unfortunately not possible in a human study due to ethical limitations. An alternative, however, would be the analysis of the expression of its target genes. Thus, we proceeded with the gene expression analysis of the NF-kBp65 pro-inflammatory target genes by qPCR, having found that IL-1 β , TNF- α and MCP-1 expression were upregulated in cachectic cancer patients compared with controls. This is a strong indication that the local subcutaneous adipose tissue inflammation described in cachectic cancer patients may be mediated by the increased expression and activity of NF-kBp65. Considering that several inflammatory signaling pathways work in concert in promoting inflammation and, in order to verify the specific relationship between NF-kBp65 and the induction of proinflammatory genes expression, we performed Spearman's correlation tests. The results show that all genes described as NF-kBp65 targets present a positive correlation with the expression of NF-kBp65 in the patients' subcutaneous adipose tissue, including its inhibitor I κ B- α , which is significantly more expressed in cachectic cancer patients, as compared with controls (Figure 4). These data strongly corroborate the NF-κB target gene expression results obtained in the study. Furthermore, NF-κBp65 is the most active protein able to induce IkB- α expression [36] and the accumulation of newly synthesized IkB- α is described as a pivotal factor in the termination of NF-kB activity and shuttling NF-kB complexes from the nucleus back to the cytoplasm [36]. Therefore, parallelism between NF- κ Bp65 and I κ B- α , in a feedback mechanism was expected. This result was a confirmation of previous studies that pointed out a role of the NF-kB signaling pathway in the promotion of an inflammatory state related with cachexia. Despite these very encouraging results, other signaling pathways such as the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), the c-Jun Nterminal kinase (JNK), p38 and AP-1 are also of interest in WAT inflammation. While in this study we focused solely on the NF-kB signaling pathway, these other pro-inflammatory pathways may not be disregarded, as they are known to participate actively as co-players of the worsened prognosis in cachexia [37–39]. The limitations of the study should be acknowledged. There was no measurement of the patient's lean body mass, although the patients and groups presented similar BMI. Owing to human

tissue sample implicit variation, some of the analyses were not performed with the total number of patients formerly enrolled as some samples fell out of the detection range of assays.

5. Conclusions

NF-κB classical signaling pathway protein NF-κBp65 gene expression is increased in the subcutaneous white adipose tissue of cachectic cancer patients. Its target genes IL-1 β , TNF- α , MCP-1 and IκB- α are also up-regulated. NF-κBp65 gene expression was positively correlated with all the targets genes analysed in this study. We strongly suggest a role for the NF-κB classical pathway in the inflammation of WAT in cachectic cancer patients.

Acknowledgments

We would like to thank Emilia Ribeiro for excellent technical support and FAPESP (12/50079-0) for the financial support.

Author Contributions

Rodolfo Gonzalez Camargo together with Marilia Seelaender and Miguel Batista conceptualized the study and drafted the initial manuscript; Daniela Mendes dos Reis Riccardi, Henrique Ribeiro and Luiz Carnevali together with Rodolfo Gonzalez Camargo carried out the quantitative real-time PCR experiments and data analyses; Lucas Enjiu, Emidio Marques de Matos-Neto and Rodrigo Xavier da Neves together with Rodolfo Gonzalez Camargo carried out the NF-κB binding assay and also data analysis; Paulo Sérgio Martins de Alcântara, Linda Maximiano and José Otoch, Raquel Galvão Figuerêdo, Joanna Darck Carola Correia Lima and Daniela Mendes dos Reis Riccardi together with Rodolfo Gonzalez Camargo carried out the patients recruitment, interview, tissue collection, serum and data analysis. Gerhard Püschel participated in the supervision of the project.

Appendix

NF-KB Binding Assay

Groups: Control (N), non-cachectic cancer patients (T) and cachectic cancer patients [16].

In order to assure that only nuclear proteins were used in the assay, first a Western blot assay with antibodies against a specific nuclear protein (Lamin A) cytoplasmic protein (β -Tubulin) in two different samples (sample 1 and 2) was performed. The cytoplasmic fraction was contaminated with nuclear proteins, but the nuclear fraction, which was employed in the assay, was free from cytoplasmic protein. The binding assay revealed no difference between the groups in the two NF- κ B subunits: NF- κ Bp65 (p = 0.2874) and NF- κ Bp50 (p = 0.1469).



Figure A1. Western blot for nuclear and cytoplasmic protein extraction purity confirmation: β -Tubulin—51kd (**A**) and Lamin A—69 kd (**B**).



4476

Figure A2. NF- κ Bp65 binding to the DNA NF- κ B promoter region (**A**) and NF- κ Bp50 binding to the DNA NF- κ B promoter region (**B**).

Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

- 40. Fearon, K.C.; Moses, A.G. Cancer cachexia. Int. J. Cardiol. 2002, 85, 73-81.
- 41. Clay, W.D. Balancing the scales: A common-sense look at global nutrition problems and what can be done about them. *World Rev. Nutr. Diet.* **2008**, *98*, 179–197.
- 42. Barber, M.D.; Ross, J.A.; Fearon, K.C. Cancer cachexia. Surg. Oncol. 1999, 8, 133–141.
- Lira, F.S.; Rosa, J.C.; Zanchi, N.E.; Yamashita, A.S.; Lopes, R.D.; Lopes, A.C.; Batista, M.L., Jr.; Seelaender, M. Regulation of inflammation in the adipose tissue in cancer cachexia: Effect of exercise. *Cell Biochem. Funct.* 2009, 27, 71–75.
- Pajak, B.; Orzechowska, S.; Pijet, B.; Pijet, M.; Pogorzelska, A.; Gajkowska, B.; Orzechowski, A. Crossroads of cytokine signaling—The chase to stop muscle cachexia. *J. Physiol. Pharmacol.* 2008, 59 (Suppl. 9), 251–264.
- 45. Machado, A.P.; Costa Rosa, L.F.; Seelaender, M.C. Adipose tissue in Walker 256 tumour-induced cachexia: Possible association between decreased leptin concentration and mononuclear cell infiltration. *Cell Tissue Res.* **2004**, *318*, 503–514.
- Batista, M.L., Jr.; Peres, S.B.; McDonald, M.E.; Alcantara, P.S.; Olivan, M.; Otoch, J.P.; Farmer, S.R.; Seelaender, M. Adipose tissue inflammation and cancer cachexia: Possible role of nuclear transcription factors. *Cytokine* 2012, *57*, 9–16.

```
Nutrients 2015, 7
```

- 4477
- 57. Booth, A.; Magnuson, A.; Fouts, J.; Foster, M. Adipose tissue, obesity and adipokines: Role in cancer promotion. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* **2015**, *21*, 57–74.
- 58. Trayhurn, P.; Wood, I.S. Adipokines: Inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br. J. Nutr.* **2004**, *92*, 347–355.
- 59. Arner, P. Medicine. Lipases in cachexia. Science 2011, 333, 163-164.
- 60. Barnes, P.J.; Karin, M. Nuclear factor-kappaB: A pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N. Engl. J. Med.* **1997**, *336*, 1066–1071.

- 61. Fraser, C.C. Exploring the positive and negative consequences of NF-kappaB inhibition for the treatment of human disease. *Cell Cycle* **2006**, *5*, 1160–1163.
- 62. Garg, A.; Aggarwal, B.B. Nuclear transcription factor-kappaB as a target for cancer drug development. *Leukemia* **2002**, *16*, 1053–1068.
- Laurencikiene, J.; van Harmelen, V.; Arvidsson Nordstrom, E.; Dicker, A.; Blomqvist, L.; Naslund, E.; Langin, D.; Arner, P.; Ryden, M. NF-kappaB is important for TNF-alpha-induced lipolysis in human adipocytes. *J. Lipid Res.* 2007, *48*, 1069–1077.
- Saccani, A.; Schioppa, T.; Porta, C.; Biswas, S.K.; Nebuloni, M.; Vago, L.; Bottazzi, B.; Sica, A.; Colombo, M.P.; Mantovani, A. p50 nuclear factor-kappaB overexpression in tumor-associated macrophages inhibits M1 inflammatory responses and antitumor resistance. *Cancer Res.* 2006, 66, 11432–11440.
- Evans, W.J.; Morley, J.E.; Argiles, J.; Bales, C.; Baracos, V.; Guttridge, D.; Jatoi, A.; Lochs, H.; Kalantar-Zadeh, K.; Mantovani, G.; *et al.* Cachexia: A new definition. *Clin. Nutr.* 2008, 27, 793– 799.
- Aaronson, N.K.; Ahmedzai, S.; Bergman, B.; Bullinger, M.; Cull, A.; Duez, N.J.; Filiberti, A.; Flechtner, H.; Fleishman, S.B.; Haes, J.C.J.M.; *et al.* The European Organization for Research and Treatment of Cancer QLQ-C30: A Quality-of-Life Instrument for Use in International Clinical Trials in Oncology. *J. Natl. Inst.* **1986**, *85*, 365–376.
- Pais-Ribeiro, J.; Pinto, C.; Santos, C. Validation studyof the portuguese version of the QLC-C30-V.3.
 Psicol. Saúde Doenças 2008, 9, 89–102.
- 68. 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* **2001**, *25*, 402–408.
- Richards, C.H.; Roxburgh, C.S.D.; McMillan, M.T.; Isswiasi, S.; Robertson, E.G.; Guthrie, G.K.; Horgan, P.G.; McMillan, D.C. The Relationships between Body Composition and the Systemic Inflammatory Response in Patients with Primary Operable Colorectal Cancer. *PLoS ONE* 2012, 7, e41883.
- Fearon, K.; Strasser, F.; Anker, S.D.; Bosaeus, I.; Bruera, E.; Fainsinger, R.L.; Jatoi, A.; Loprinzi, C.; MacDonald, N.; Mantovani, G.; *et al.* Definition and classification of cancer cachexia: An international consensus. *Lancet Oncol.* 2011, *12*, 489–495.
- 71. Argiles, J.M.; Moore-Carrasco, R.; Fuster, G.; Busquets, S.; Lopez-Soriano, F.J. Cancer cachexia: The molecular mechanisms. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2003**, *35*, 405–409.
- 72. McMillan, D.C. Systemic inflammation, nutritional status and survival in patients with cancer. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab.Care* **2009**, *12*, 223–226.

187

- 46. Gupta, S.C.; Kim, J.H.; Kannappan, R.; Reuter, S.; Dougherty, P.M.; Aggarwal, B.B. Role of nuclear factor kappaB-mediated inflammatory pathways in cancer-related symptoms and their regulation by nutritional agents. *Exp. Biol. Med.* **2011**, *236*, 658–671.
- Deans, C.; Wigmore, S.J. Systemic inflammation, cachexia and prognosis in patients with cancer. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab.Care* 2005, *8*, 265–269.
- 48. Sen, R.; Baltimore, D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* **1986**, *47*, 921–928.
- 49. Schwartz, S.A.; Hernandez, A.; Mark Evers, B. The role of NF-kappaB/IkappaB proteins in cancer: Implications for novel treatment strategies. *Surg. Oncol.* **1999**, *8*, 143–153.
- 50. Rhoads, M.G.; Kandarian, S.C.; Pacelli, F.; Doglietto, G.B.; Bossola, M. Expression of NF-kappaB and IkappaB proteins in skeletal muscle of gastric cancer patients. *Eur. J. Cancer* **2010**, *46*, 191–197.
- 51. Op den Kamp, C.M.; Langen, R.C.; Snepvangers, F.J.; de Theije, C.C.; Schellekens, J.M.; Laugs, F.; Dingemans, A.M.; Schols, A.M. Nuclear transcription factor kappa B activation and protein turnover adaptations in skeletal muscle of patients with progressive stages of lung cancer cachexia.

Am. J. Clin. Nutr. 2013, 98, 738–748.

- 52. Cai, D.; Frantz, J.D.; Tawa, N.E., Jr.; Melendez, P.A.; Oh, B.C.; Lidov, H.G.; Hasselgren, P.O.; Frontera, W.R.; Lee, J.; Glass, D.J.; *et al.* IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell* **2004**, *119*, 285–298.
- 53. Zhou, W.; Jiang, Z.W.; Tian, J.; Jiang, J.; Li, N.; Li, J.S. Role of NF-κB and cytokine in experimental cancer cachexia. *World J. Gastroenterol.* **2003**, *9*, 1567–1570.
- 54. Arner, P.; Langin, D. Lipolysis in lipid turnover, cancer cachexia, and obesity-induced insulin resistance. *Trends Endocrinol. Metab.* **2014**, *25*, 255–262.
- Batista, M.L., Jr.; Olivan, M.; Alcantara, P.S.; Sandoval, R.; Peres, S.B.; Neves, R.X.; Silverio, R.; Maximiano, L.F.; Otoch, J.P.; Seelaender, M. Adipose tissue-derived factors as potential biomarkers in Cachectic cancer patients. *Cytokine* 2013, *61*, 532–539.
- Han, Y.; Meng, T.; Murray, N.R.; Fields, A.P.; Brasier, A.R. Interleukin-1-induced nuclear factorkappaB-IkappaBalpha autoregulatory feedback loop in hepatocytes. A role for protein kinase calpha in post-transcriptional regulation of ikappabalpha resynthesis. J. Biol. Chem. 1999, 274, 939–947.
- Argiles, J.M.; Busquets, S.; Lopez-Soriano, F.J. Anti-inflammatory therapies in cancer cachexia. *Eur. J. Pharmacol.* 2011, 668 (Suppl. 1), S81–S86.

- 58. Le Bail, O.; Schmidt-Ullrich, R.; Israel, A. Promoter analysis of the gene encoding the I kappa Balpha/MAD3 inhibitor of NF-kappa B: Positive regulation by members of the rel/NF-kappa B family. *EMBO J.* **1993**, *12*, 5043–5049.
- Narsale, A.A.; Enos, R.T.; Puppa, M.J.; Chatterjee, S.; Murphy, E.A.; Fayad, R.; Pena, M.O.; Durstine, J.L.; Carson, J.A. Liver Inflammation and Metabolic Signaling in ApcMin/+ Mice: The Role of Cachexia Progression. *PLoS ONE* 2015, *10*, e0119888.
- 60. McClung, J.M.; Judge, A.R.; Powers, S.K.; Yan, Z. p38 MAPK links oxidative stress to autophagyrelated gene expression in Cachectic muscle wasting. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2010**, *298*, C542–C549.

 Moore-Carrasco, R.; Garcia-Martinez, C.; Busquets, S.; Ametller, E.; Barreiro, E.; Lopez-Soriano, F.J.; Argiles, J.M. The AP-1/CJUN signaling cascade is involved in muscle differentiation: Implications in muscle wasting during cancer cachexia. *FEBS Lett.* 2006, 580, 691–696.

© 2015 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).