RODOLFO GONZALEZ CAMARGO

**Papel da via de sinalização do NF- κ B na
inflamação do tecido adiposo subcutâneo de
pacientes com caquexia associada ao câncer**

Dissertação 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
Mestre em Ciências.

São Paulo
2012

RODOLFO GONZALEZ CAMARGO

**Papel da via de sinalização do NF- κ B na
inflamação do tecido adiposo subcutâneo de
pacientes com caquexia associada ao câncer**

Dissertação 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 Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Marília Cerqueira Leite Seelaender

Versão original

São Paulo
2012

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

© reprodução total

Camargo, Rodolfo Gonzalez.

Papel da via de sinalização do NF- κ B na inflamação do tecido adiposo subcutâneo de pacientes com caquexia associada ao câncer / Rodolfo Gonzalez Camargo. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Profa. Dra. Marília Cerqueira Leite Seelaender.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Caquexia associada ao câncer e metabolismo do tecido adiposo branco.

Versão do título para o inglês: The role of the NF- κ B signaling pathway in the adipose tissue inflammation in cachectic patients.

1. Neoplasias 2. Biologia celular 3. Bioquímica celular
4. Expressão gênica 5. Tecido adiposo 6. Inflamação I. Seelaender, Profa. Dra. Marília Cerqueira Leite II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento III. Título.

ICB/SBIB0178/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Rodolfo Gonzalez Camargo.

Título da Papel da via de sinalização do NF-kB na inflamação do
tecido adiposo subcutâneo de pacientes com caquexia
associada ao câncer.

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

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

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Barros Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05389-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (55) (11) 3061.7733 telefax: (55) (11) 3061.8406
e-mail: ccib@icb.usp.br

São Paulo, 30 de junho de 2011.

PARECER 1004/CEP

A Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB, na sessão realizada no dia 29.06.2011, **APROVOU** o projeto intitulado: "*Uso do treinamento sobre a via do NFkB no tecido adiposo de pacientes caquéticos*" sob responsabilidade de execução dos autores Profa. Dra. **MARILIA CERQUEIRA LEITE SEELAENDER** e o aluno **RODOLFO GONZALEZ CAMARCO**.

Cabe a pesquisadora executora elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou finais), 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 **29.06.2012**.

Atenciosamente,

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

São Paulo, 17 de setembro de 2007.

Il^{mo}(a). S^{ra}(a).

Profa. Dra. Marília Cerqueira Leite Seelaender

Grupo de Biologia Molecular da Célula

Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento

Instituto de Ciências Biomédicas I

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

REFERENTE: **Projeto de Pesquisa** "*Influência das citocinas pró e antiinflamatórias no tecido adiposo branco. Possível interação entre adipócito e infiltrado mononuclear*"
– **Co-Autor(es)**: Alex Shimura Yamashita; Paulo Sérgio Martins Alcântara - **Registro CEP-HU/USP: 752/07 – SISNEP CAAE: 0031.0.198.019-07**

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em reunião ordinária realizada no dia 14 de setembro de 2007, analisou o projeto de pesquisa acima citado, considerando-o como **APROVADO**, bem como, seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final, em função da duração da pesquisa), de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, item IX.2 letra c.

O primeiro relatório está previsto para 14 de setembro de 2008.

Atenciosamente,

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

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) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 13 de junho de 2007.

PARECER 788/CEP

Prezada Senhora,

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em sua 76ª reunião, realizada em 13.06.07, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: "*Influência das citocinas pró- e antiinflamatórias no tecido adiposo branco. Possível interação adipócito e infiltrado mononuclear*".

Informo a V.Sa. que, após análise e discussão, o referido projeto foi **aprovado por esta Comissão**, condicionada a reformulação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, para proteção do grupo controle. Modelo anexo.

Lembramos que cabe ao pesquisador 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 **13 de junho de 2008**.

Atenciosamente,

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

Ilma. Sra.
MARÍLIA CERQUEIRA L. SEELAENDER
Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

A minha família, razão de minha existência e ao ideal de mudarmos nosso país através da educação.

AGRADECIMENTOS

A todos os colegas de laboratório, em especial Henrique Ribeiro, Luiz Carnevalli, Waldecir Lima, Fábio Lira, Felipe Donatto, Renata Silvério, José César Rosa Neto, Fernando de Oliveira Rosa, Rodrigo Xavier, Felipe Capel, Lucas Enjiu e Emídio Matos, que ajudaram de alguma forma esta dissertação a ser concluída. A Emília Ribeiro, pelo excelente suporte técnico, aos profissionais da Biblioteca que sempre estiveram à disposição para ajudar no que fosse necessário, aos pacientes, que consentiram em participar do estudo e sem os quais esta dissertação não seria possível, aos médicos Dr. José Pinhata Otoch, Dra. Linda Ferreira Maximiano e em especial Dr. Paulo Sérgio Martins de Alcântara que se envolveram no projeto com competência e eficiência para que este fosse possível, ao laboratório RDO pelas análises bioquímicas, aos professores, que ministraram as disciplinas que me engrandeceram a ponto de eu me sentir maduro o suficiente para me tornar professor, em especial a minha orientadora professora Dra. Marília Cerqueira Leite Seelaender que depositou e deposita confiança em meu trabalho e acreditou no projeto desde o início, enriquecendo-me com conteúdos não somente científicos, mas também me preparando para a vida profissional.

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

A CAPES pelo auxílio financeiro.

A minha família e amigos, em especial meus pais Fábio Luis Prioli Camargo e Daisy Ligia Gonzalez Camargo e meu irmão Rafael Gonzalez Camargo que souberam aconselhar-me nos momentos mais difíceis e depositaram toda confiança para que este sonho se tornasse realidade. Este trabalho e título também são de vocês!

“A fé ri das impossibilidades”.

RESUMO

Camargo RG. Papel da via de sinalização do NF- κ B na inflamação do tecido adiposo subcutâneo de pacientes com caquexia associada ao câncer. [dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

A caquexia associada ao câncer, cujo mais notável sintoma é a rápida e severa perda de peso, afeta cerca de metade dos pacientes com câncer e está presente na grande maioria (mais de dois terços) dos pacientes com câncer em estágio avançado. Estudos recentes têm mostrado que mediadores inflamatórios desempenham um papel importante no desenvolvimento e manutenção da caquexia associada ao câncer, sendo esta hoje em dia definida como uma doença inflamatória crônica e sistêmica. O tecido adiposo branco é um dos primeiros compartimentos do organismo afetados, sofrendo uma elevada taxa de lipólise. Atualmente este tecido é considerado um órgão endócrino, secretando ativamente hormônios, proteínas e citocinas, capazes de regular diretamente o metabolismo. Um ponto comum na expressão das citocinas pró-inflamatórias pelo tecido adiposo e a lipólise é a ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B). A alta taxa de secreção de citocinas pró-inflamatórias e PGE₂ contribuem para a inflamação sistêmica característica da caquexia. O objetivo deste estudo foi examinar a via de sinalização clássica do NF- κ B: Expressão gênica (I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B α , I κ B β , p65/RelA e p50) e avaliar a ligação das proteínas p65/RelA e p50 à região promotora alvo do NF- κ B (5'-GGGACTTCC-3'). Além disso, estudamos o papel do TNF- α e da PGE₂ na ativação da via do NF- κ B. O estudo envolveu 35 pacientes: 10 no grupo Controle (C, pacientes em tratamento de hérnia) e 25 no grupo Tumor (câncer gástrico), subdivididos em peso estável e caquéticos. O grupo Caquéticos (TC) consistiu de pacientes com perda de peso não intencional declarada > 5% nos últimos 12 meses, fadiga e aumento da concentração sérica do marcador inflamatório proteína C-Reativa (Evans et al., 2008). O grupo de peso estável (T) consistiu de pacientes em tratamento de câncer, sem perda de peso não intencional declarada > 5% nos últimos 12 meses. Parâmetros bioquímicos foram analisados e correlacionados com os dados disponíveis. Os resultados de expressão gênica mostraram p65/RelA (p = 0,0101), I κ B α (p = 0,0287), I κ B α (p = 0,0306), e I κ B β (p = 0,0141), significativamente mais expressas no grupo Tumor e p65/RelA (p = 0,0101), também no grupo Caquético. TNF- α induziu maior ativação do NF- κ B em comparação com PGE₂ (p < 0,0001). Propomos que a expressão das proteínas da via clássica de sinalização do NF- κ B no tecido adiposo branco serviria como um marcador precoce da inflamação sistêmica característica da caquexia associada ao câncer.

Palavras-chave: Caquexia. Câncer. Inflamação. Fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B). Tecido adiposo branco.

ABSTRACT

Camargo RG. The role of the NF- κ B signaling pathway in the adipose tissue inflammation in cachectic patients. [Master's thesis (Cellular and Tissue Biology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Cancer Cachexia, whose most notable symptom is severe and rapid weight loss, affects about half of all cancer patients and is present in the vast majority (more than two thirds) of patients with advanced cancer. Recent studies have shown that inflammatory mediators play an important role in the development of cachexia, nowadays envisaged as a chronic inflammatory disease. The white adipose tissue is one of the first compartments of the organism affected in cancer cachexia, and suffers a high rate of lipolysis. This tissue is an endocrine organ, secreting several hormones, proteins and cytokines, capable of directly regulating intermediate metabolism. Adipose tissue up regulation of pro-inflammatory cytokines and PGE₂ secretion contribute to systemic inflammation. A common pathway in the regulation of the expression of pro-inflammatory cytokines and lipolysis in the white adipose tissue is the activation of the nuclear transcription factor kappa B (NF- κ B). The purpose of the study was to examine the NF- κ B classical signalling pathway proteins gene expression (Real time PCR - I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B α , I κ B β , p65/RelA and p50) and the evaluation of the binding of p65/RelA and p50 to the target promoter region of NF- κ B (5'-GGGACTTCC-3'). Additionally, we examined the TNF- α and PGE₂ role in activating the NF- κ B pathway by gene reporter assay. The study involved 35 patients: 10 in the Control group (C, hernia patients) and 25 in the Tumour group, further divided into cachectic and weight stable. The Cachectic group (TC) consisted of patients with a self-declared unintentional weight loss of > 5% in the previous 12 months, fatigue and increased inflammatory marker C-Reactive protein (Evans et al, 2008); the weight stable group (T) consisted of patients in treatment for cancer without declared weight loss > 5% in the past 12 months. Biochemical parameters were analysed and correlated with the available data. Gene expression results showed p65/RelA (p = 0.0101), I κ B α (p = 0.0287), I κ B α (p = 0.0306) and I κ B β (p = 0.0141) to be significantly more expressed in the Tumour group and p65/RelA (p = 0.0101), also in the cachectic group. TNF- α elicited higher NF- κ B activation as compared with PGE₂ (p < 0.0001). We propose that NF- κ B pathway related protein expression in White adipose tissue may serve as an early marker of cancer-related systemic inflammation.

Keywords: Cachexia. Cancer. Inflammation. Nuclear Transcription factor kappa B (NF- κ B).

White adipose Tissue.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - O valor prognóstico de Glasgow (<i>The Glasgow prognostic score</i>).....	21
Figura 2 - Tecido adiposo branco e adipocinas.....	23
Figura 3 - Via de sinalização do NF-κB.....	27
Figura 4 - Fluxograma de atividades.....	31
Quadro 1. Primers utilizados na amplificação dos genes de interesse.....	36
Figura 5 - Imunodeteção da proteína β-Actina.....	40
Figura 6 - Expressão gênica da proteína p65/RelA.....	50
Figura 7 - Expressão gênica da proteína p50.....	50
Figura 8 - Expressão gênica da proteína IκBAlfa.....	51
Figura 9 - Expressão gênica da proteína IκBBeta.....	51
Figura 10 - Expressão gênica da proteína IκκAlfa.....	52
Figura 11 - Expressão gênica da proteína IκκBeta.....	52
Figura 12 - Expressão gênica da proteína IκκGama.....	53
Figura 13 - Ligação da proteína p65/RelA à região promotora do NF-κB.....	53
Figura 14 - Ligação da proteína p50 à região promotora do NF-κB.....	54
Figura 15 - Proporção das proteínas p65/RelA, p50, p52, Rel-B e C-Rel.....	55
Figura 16 - Ligação da proteína p65/RelA à região promotora do NF-κB (pool de amostras por grupo).....	56
Figura 17 - Ligação da proteína p50 à região promotora do NF-κB (pool de amostras por grupo).....	56
Figura 18 - Ativação da via do NF-κB por TNF-alfa e PGE₂ em células HEK293.....	57
Figura 19 - Ativação da via do NF-κB por TNF-alfa e PGE₂ em células HEKEP4 superexpressando o receptor EP4.....	58
Figura 20 - Resumo dos resultados. Avaliação da via clássica de sinalização do NF-κB (Ativação por TNF-Alfa e PGE₂, expressão gênica, ligação ao DNA).....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características gerais dos pacientes de cada grupo.....	48
Tabela 2 - Proporção das subunidades p65/RelA, p50, p52, Rel-B e C-Rel.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PCR	Proteína C-Reativa
GPS	Valor prognóstico de <i>Glasgow</i> (<i>Glasgow prognostic Score</i>)
Mo	Macrófago
TNF- α	Fator de necrose Tumoral Alfa
TNFR1	Receptor de fator de necrose tumoral 1
TNFR2	Receptor de fator de necrose tumoral 2
NGF	Fator de crescimento neuronal
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos 1
IFN- γ	Interferon Gama
PGE ₂	Prostaglandina E2
IMC	Índice de massa corporal
IL-6	Interleucina 6
IL-1	Interleucina 1
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-1 β	Interleucina 1 Beta
NF- κ B	Fator de transcrição nuclear kappa B
COX-2	Ciclooxigenase 2
iNOS	Sintase do óxido nítrico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
NF- κ B1	Fator de transcrição nuclear kappa B 1
NF- κ B2	Fator de transcrição nuclear kappa B 2
I κ B α	Inibidor do fator de transcrição nuclear kappa B Alfa
I κ B β	Inibidor do fator de transcrição nuclear kappa B Beta
I κ κ α	Proteína fosforiladora Alfa inibidora da quinase IkappaB
I κ κ β	Proteína fosforiladora Beta inibidora da quinase IkappaB
I κ κ γ	Proteína fosforiladora Gama inibidora da quinase IkappaB
TRAF	Fator associado ao receptor do Fator de necrose tumoral
cDNA	Ácido desoxinucleico complementar
RIP	Proteína Serina-Treonina quinase de interação com receptores
TAK-1	TGF-Beta quinase ativada

SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
RNA	Ácido desoxirribonucleico
DNA	Ácido desoxinucleico
DEPC	Dietilpirocarbonato

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	A caquexia associada ao câncer.....	18
1.2	Definição clínica da caquexia.....	19
1.3	O tecido adiposo.....	22
1.4	Fator de transcrição kappa B (NF-κB).....	24
1.5	Via de sinalização do NF-κB.....	27
2	OBJETIVOS.....	29
2.1	Geral.....	29
2.2	Específicos.....	29
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1	Recrutamento de pacientes.....	30
3.2	Aprovação no comitê de ética.....	30
3.3	CrITÉRIOS de inclusão.....	32
3.4	Termo de consentimento e avaliação clínica.....	33
3.5	Coleta de sangue e análise de parâmetros bioquímicos.....	33
3.6	Obtenção de tecido adiposo.....	33
3.7	Reação em cadeia da polimerase (PCR tempo real).....	34
3.7.1	<i>Extração de RNA total</i>	34
3.7.2	<i>Quantificação do RNA total</i>	35
3.7.3	<i>Qualidade dos RNAs</i>	35
3.7.4	<i>Síntese de cDNA</i>	35
3.7.5	<i>Desenho de primers</i>	36
3.7.6	<i>Amplificação</i>	36
3.7.7	<i>Análise dos resultados de expressão gênica</i>	37
3.8	Ensaio de ligação (<i>Elisa Binding Assay</i>).....	37
3.8.1	<i>Extração nuclear</i>	38
3.8.2	<i>Quantificação proteica</i>	39
3.8.3	<i>Avaliação da eficiência do kit de extração nuclear (Western Blotting)</i>	39
3.8.3.1	<i>Eletroforese SDS-Page</i>	39
3.8.3.2	<i>Transferência</i>	39
3.8.3.3	<i>Bloqueio e incubação</i>	40

3.8.3.4	<i>Imunodeteção da proteína β-Actina</i>	40
3.8.4	<i>Ensaio de ligação</i>	40
3.8.5	<i>Análise dos resultados e estatística</i>	41
3.9	<i>Ensaio de gene repórter</i>	41
3.9.1	<i>Preparo de bactérias competentes XL1-blue</i>	42
3.9.2	<i>Obtenção dos plasmídeos de interesse</i>	42
3.9.3	<i>Transformação de bactérias XL1-blue</i>	42
3.9.4	<i>Isolamento dos plasmídeos em pequena escala</i>	43
3.9.5	<i>Crescimento da colônia de interesse</i>	43
3.9.6	<i>Isolamento dos plasmídeos em larga escala</i>	43
3.9.7	<i>Cultura de células</i>	44
3.9.8	<i>Transfecção</i>	44
3.9.9	<i>Ensaio da luciferase</i>	45
3.9.10	<i>Ensaio da β-galactosidase</i>	45
3.9.11	<i>Análise dos resultados e estatística (ensaio de gene repórter)</i>	46
4	RESULTADOS	47
4.1	Achados clínicos	47
4.2	Avaliação das expressões gênicas	49
4.3	Ligação das subunidades do NF-κB ao DNA	53
4.4	Avaliação da modulação da ativação da via de sinalização do NF-κB por TNF ALFA e PGE₂	57
5	DISCUSSÃO	60
6	CONCLUSÃO	66
	REFERÊNCIAS	67
	ANEXO – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)	73

1 INTRODUÇÃO

1.1 A caquexia associada ao câncer

A caquexia é uma síndrome descrita por Hipócrates há mais de dois mil anos como uma consequência comum do câncer e de outras doenças. O termo Caquexia deriva do grego, mais especificamente das palavras *kakos*, que significa má e *hexis*, que significa condição. A caquexia associada ao câncer foi historicamente definida somente por perda de peso, que é vislumbrada mesmo antes do diagnóstico. Agustsson et al., 2012, postulou que na caquexia, a perda de massa muscular e tecido adiposo precedem qualquer diminuição na ingestão de alimentos e frequentemente progride durante o curso da doença. Também, a perda de peso de mais de 10% em 38-45% dos mais de 1500 pacientes em tratamento de câncer, selecionados aleatoriamente para um estudo científico (Mariani et al., 2011) foi relatada, ilustrando a importância dessa síndrome.

A maioria dos pacientes com câncer em estágio avançado (mais de dois terços) apresenta tal perda involuntária de peso, e a caquexia é responsável direta por vinte a quarenta por cento de todas as mortes associadas ao câncer (revisto por Argilés et al., 2008).

A síndrome é de etiologia complexa, multifatorial, envolvendo redução na ingestão de alimentos, uma variedade de alterações metabólicas (incluindo hipermetabolismo) ou mais frequentemente uma combinação dos dois (Fearon et al., 2002).

Suas manifestações clínicas incluem, além de perda de peso, perda de tecido muscular e tecido adiposo branco (TAB), anemia, alterações em proteínas, lipídios e metabolismo de carboidratos (Argiles et al., 2003).

O grau de manifestação da síndrome varia entre pacientes com o mesmo tipo histológico e estágio de progressão tumoral e não apresenta correlação evidente com a massa do tumor, ou sua localização (Costa, 1977).

Apesar de descrições de indivíduos caquéticos remontarem a mais de dois mil anos, somente nas últimas décadas o estudo da síndrome tem recebido atenção crescente. Dessa forma, sua etiologia continua muito pouco conhecida, seu diagnóstico falho, e inexistem marcadores definitivos. Finalmente, não há terapia conhecida que a reverta (Argilés et al., 2008; von Haehling et al., 2002).

As mudanças metabólicas na caquexia parecem ser conduzidas por citocinas pró-inflamatórias, alterações do eixo neuro-endócrino e fatores tumorais catabólicos (Laviano et al., 2012).

A concepção da síndrome como um estado inflamatório crônico, no qual a reação do hospedeiro à presença do tumor aparece como o principal agente causal, tem tomado impulso (Fearon et al., 2002; Lundholm et al., 2004; McCarthy, 2003) e assim, é atualmente considerada uma doença degenerativa inflamatória crônica (revisto por Lira et al., 2009), sendo acompanhada por concentrações elevadas de citocinas pró inflamatórias e reduzidas de citocinas antiinflamatórias (Revisto por Pajak et al., 2008).

Estudos recentes demonstram que a inflamação sistêmica pode ser considerada o denominador comum das muitas conseqüências clínicas e metabólicas da caquexia. Consistentemente com essa visão, marcadores inflamatórios têm sido propostos e são atualmente utilizados para o diagnóstico e prognóstico desta síndrome. Além disso, existe uma evidência crescente de estudos em animais e humanos que, através da adoção de estratégias que neutralizam a inflamação, atenuam a caquexia (Seelaender et al., 2012). Todavia, os marcadores atualmente adotados não funcionam de forma completa e reprodutível.

1.2 Definição clínica da caquexia

A definição clínica da caquexia evoluiu com o tempo. A medida da perda de peso é a característica comum de todas as definições. No entanto, definições de perda de peso de 2% até 20% são encontradas na literatura, sem uma justificativa estatística. Logo após a perda de peso, a anorexia ou ingestão alimentar reduzida foram aspectos adicionados à definição. Em estudos mais amplos já de fase III do câncer, a caquexia foi geralmente definida como uma perda de peso involuntária de 2% em 2 meses ou 5% em 6 meses, anorexia maior que 3 (escala VAS onde 0 é o menor grau e 10 o maior), ou ingestão oral nutricional deficiente (<75% do normal ou <20 kcal/kg/dia) (Blum et al., 2011).

Fearon et al., 2006 propuseram a adição da inflamação sistêmica como um terceiro fator para a definição, com base em um estudo com 170 pacientes com diagnóstico de câncer pancreático que apresentaram perda de peso. A presença simultânea de três fatores: perda de peso, mais de 10%; ingestão de alimentos

inferior a 1500 kcal/dia, e inflamação sistêmica, além de proteína C-Reativa sérica maior que 10 mg/l foi consistentemente associada à presença da caquexia.

A definição genérica atualmente proposta para a caquexia inclui perda de peso, com ou sem perda de gordura, e como critérios adicionais (três necessários para o diagnóstico) diminuição da força muscular, redução da massa muscular, fadiga, anorexia, ou alterações bioquímicas (anemia, inflamação e baixa concentração de albumina) (Evans et al., 2008).

A base da resposta sistêmica em pacientes caquéticos ainda não é clara, tanto pode resultar de uma resposta não específica tecidual secundária à hipoxia tumor/necrose, quanto de danos locais. No entanto, as respostas sistêmicas a tal inflamação são inumeráveis. Estas incluem por exemplo alterações no metabolismo neuroendócrino, alterações hematopoiéticas, e na expressão e circulação de interleucinas, interferons, fatores de crescimento e proteínas de fase aguda (Gabay et al., 1999). O fígado é fundamental para a elaboração da resposta inflamatória sistêmica, à medida que os hepatócitos são estimulados a sintetizar e liberar para a circulação sistêmica uma variedade de proteínas de fase aguda, como proteína C-Reativa (PCR), que inicia ou mantém a resposta inflamatória sistêmica. A PCR, frente à sua sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade de análise em laboratórios hospitalares, é a mais comumente utilizada para avaliar a magnitude (quer aguda ou crônica) da resposta inflamatória sistêmica (McMillan, 2009). (Marsik et al., 2008) relataram a relação entre PCR e mortalidade geral em cerca de 270 000 pacientes. Com o aumento das concentrações de PCR, de normal (<5 mg/l) para altamente elevada (>80 mg/l), houve um aumento de 3,3 vezes no risco de mortalidade por qualquer causa. Como efeito, a magnitude do aumento na concentração de PCR foi associado com uma redução da sobrevida em pacientes com câncer, particularmente em pacientes em grau avançado, independente do estadio do tumor (McMillan, 2008). A resposta inflamatória sistêmica evidenciada por uma elevada concentração de PCR, em pacientes com tumores operáveis, tem valor prognóstico em cânceres gastroesofágicos, de bexiga, pâncreas, rins e pulmão, independente do estadio do tumor. Além disso, um certo número de estudos realizados em pacientes com câncer colorretal operável destaca o valor prognóstico da concentração da PCR (McMillan, 2008). Além do incremento de PCR em pacientes com caquexia associada ao câncer, a redução da concentração de albumina é outro sintoma observado. Essa relação é semelhante em pacientes com diferentes tipos de tumores. As concentrações de albumina refletem tanto a inflamação sistêmica quanto a quantidade de

massa magra. Portanto, o valor prognóstico da combinação de uma concentração de PCR elevada (> 10 mg/l) e hipoalbuminemia (< 35 g/l) foi examinado (Forrest et al., 2003) em 161 pacientes com diagnóstico de câncer de pulmão inoperável. Na análise de sobrevida multivariada, esta combinação ($P < 0,001$) mostrou-se favoravelmente comparável com o padrão clínico [taxa de risco 1,48, intervalo de confiança de 95% (CI) 1,12-1,95, $P \approx 0,006$]. Este trabalho resultou na combinação de PCR e albumina para uma pontuação de prognóstico (0, 1, 2). Esta pontuação, agora denominada como valor prognóstico de Glasgow (GPS), foi definido conforme figura abaixo:

Figura 1 - O valor prognóstico de Glasgow (*The Glasgow prognostic score*)

Características Bioquímicas	Pontuação
Proteína C-Reativa ≤ 10 mg/l e albumina ≥ 35 g/l	0
Proteína C-Reativa ≤ 10 mg/l e albumina < 35 g/l	1
Proteína C-Reativa > 10 mg/l	1
Proteína C-Reativa > 10 mg/l e albumina < 35 g/l	2

Fonte: Adaptado de McMillan, 2009

Pacientes com PCR elevada (> 10 mg/L) e hipoalbuminemia (< 35 g/L) foram classificados com pontuação 2. Aos pacientes para os quais apenas um destes parâmetros bioquímicos estava alterado foi atribuída pontuação 1. Aos pacientes nos quais nenhum destes parâmetros estava alterado foi atribuída pontuação 0.

Esta pontuação baseada no prognóstico (GPS - Figura 1), tem sido amplamente recomendada, pois tem relevância independente do estadiamento do tumor, é simples de medir, rotineiramente disponível e bem padronizada em todo o mundo.

O valor prognóstico GPS já foi avaliado em uma variedade de cânceres, incluindo câncer de pulmão, câncer de mama, câncer gastroesofágico, câncer pancreático, câncer renal e câncer colorretal. Estes estudos demonstraram consistentemente que o valor prognóstico de Glasgow (GPS) se mostrou eficaz independente do estágio do tumor, sistemas convencionais de pontuação e modalidades de tratamento (McMillan, 2009).

Estudos sobre caquexia na década de oitenta focavam as atenções somente sobre o tecido muscular, dada uma alta proteólise característica do quadro caquético, ao passo que nos anos 90 os estudos passaram suas atenções ao tecido adiposo branco, devido à perda de

massa gorda ser um evento prévio a perda de massa magra (Bing, 2011) e em decorrência do reconhecimento crescente do tecido adiposo como órgão multifuncional, com importante contribuição na inflamação sistêmica crônica (Trayhurn et al., 2004), podendo efetivamente contribuir na etiologia da caquexia.

1.3 O tecido adiposo

O tecido adiposo branco têm recentemente recebido muita atenção mediante a constatação de que se trata não de um tecido utilizado somente como um estoque energético, protetor mecânico e regulador da temperatura corporal, mas um órgão multifuncional, com importante contribuição em doenças inflamatórias crônicas (Trayhurn et al., 2004).

Este tecido secreta ativamente mais de 100 moléculas. Sua função secretora é precisamente controlada em condições fisiológicas; no entanto, em condições patofisiológicas como a obesidade, há um aumento na produção de citocinas e quimiocinas, seguida por uma pronunciada infiltração de macrófagos (Mo) (Batista et al., 2012).

A mobilização de lípidos na caquexia foi também investigada (Bing, 2011) e segundo a autora, há uma elevada lipólise no tecido adiposo de pacientes e esta perda de massa gorda ocorre antes mesmo da perda de massa magra. A autora ressalta também um aumento na expressão gênica de proteínas responsáveis pelo *turnover* energético e uma diminuição da expressão de genes estruturais como de proteínas do citoesqueleto e matriz extracelular evidenciando uma grande remodelação do tecido adiposo de pacientes na caquexia. Lira et al., 2009 e Seelaender, 1999 evidenciaram uma mudança na composição de ácidos graxos e aumento na dimensão dos adipócitos na caquexia.

Em adição às mudanças na composição lipídica e ultraestrutura, há um aumento na produção de proteínas relacionadas com a inflamação tais como o fator de necrose tumoral Alfa, (TNF- α) e seus receptores de membrana (TNFR1 e TNFR2). Este aumento da concentração de mediadores inflamatórios, resulta em uma inflamação local e sistêmica em roedores (Lira et al., 2009).

Entre as citocinas pró e anti-inflamatórias secretadas pelo tecido adiposo podemos ressaltar o TNF- α , interleucinas 1 Beta, 6, 8, 10, 17D, 18, além de hormônios (leptina, adiponectina e resistina, por exemplo), proteínas de fase aguda (haptoglobina, amiloide A do

soro, glicoproteína ácida alfa 1, 24p3), e fatores quimioatratantes (NGF, MCP-1) (revisão de Trayhurn et al., 2004).

Figura 2 - Tecido adiposo branco e adipocinas

Fonte: Adaptado de Lago et al., 2007

Nosso grupo mostrou que animais portadores do carcinossarcoma de Walker 256 apresentaram um aumento significativo na infiltração de macrófagos no tecido adiposo, devido principalmente a secreção de fatores quimioatratantes. Estes macrófagos infiltrados parecem ser a principal fonte de citocinas pró-inflamatórias no compartimento (Batista et al., 2012).

As citocinas têm um papel de grande importância na patogênese da caquexia (Argilés et al., 2005). O fator de necrose tumoral Alfa (TNF- α), as interleucinas, o interferon γ (IFN- γ) e ainda as prostaglandinas, fatores cuja concentração está alterada na caquexia, induzem diversos dos sintomas relacionados à síndrome (Argilés et al., 2003; Fearon et al., 2002).

Estudos realizados por Wang et al., 2005 sugerem que a PGE₂ está envolvida com o desenvolvimento da caquexia.

Em estudo de Rebeca et al., 2008 mostrou-se em roedores que a liberação de citocinas pró-inflamatórias e PGE₂ por células Walker 256 sugere que tais mediadores podem conduzir à síndrome da caquexia no hospedeiro, sendo o efeito dependente do tempo de desenvolvimento do tumor.

Estudo de Batista et al., 2012 confirmou em pacientes a liberação de citocinas pró-inflamatórias pelo tecido adiposo e sua concentração alterada no plasma, e Karayiannakis et al., 2001 mostraram que a concentração sérica de TNF- α em pacientes com câncer pancreático é maior em neoplasias em estágio avançado e inversamente proporcional a massa corporal, IMC e albumina sérica concluindo que esta citocina está diretamente relacionada ao baixo status nutricional característico da caquexia.

1.4 Fator de transcrição kappa B (NF- κ B)

Frente ao exposto, concomitante ao relevante papel das citocinas pró-inflamatórias na indução e promoção da caquexia associada ao câncer muito foco tem sido dado ao papel das citocinas (TNF- α), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 1 (IL-1) (Argiles et al., 2003).

Esses fatores respondem, pelo menos parcialmente, pela perda de peso, resposta de proteínas de fase aguda, quebra de proteínas do músculo esquelético, gordura e gasto energético elevado em animais e pacientes (Argiles et al., 2003).

Um ponto chave na expressão das citocinas pró-inflamatórias é a ativação, nas células, do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B), que controla a transcrição de genes da maioria dos fatores inflamatórios, incluindo o TNF- α (reconhecidamente uma das mais importantes citocinas envolvidas na etiologia da caquexia), a interleucina -6 (IL-6), a interleucina 1 beta (IL-1 β), a interleucina 8 (IL-8), a ciclooxygenase-2 (COX-2), quimiocinas, como a proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1), a sintase do óxido nítrico (iNOS) e moléculas de adesão (Barnes et al., 1997).

Embora a etiopatogenia da caquexia associada ao câncer seja mal compreendida, estudos propuseram que a via do NF- κ B está mais ativa no músculo de pacientes com câncer e caquexia (Kumar et al., 2010), além de um grande corpo de evidência indicar a ligação entre a inflamação promovida pela ativação desse fator de transcrição e o câncer, no que diz respeito à progressão tumoral (Garg et al., 2002).

Recentemente, têm-se demonstrado que a inibição da ativação do NF- κ B tem marcados efeitos sobre o quadro de caquexia (revisto por Fraser, 2006). A ativação do NF- κ B representa um ponto comum nas vias de produção das citocinas catabólicas (Wang et al., 2002), inclusive na caquexia associada ao câncer (Zhou et al., 2003). Kawamura et al., 1999 já haviam demonstrado que as citocinas cuja expressão é regulada pelo NF- κ B têm um papel fundamental na indução da caquexia associada ao modelo de carcinoma 26 de colo murino. Kuroda et al., 2005, por sua vez, relatam marcada redução da caquexia no modelo de câncer de próstata em camundongos após a inibição do NF- κ B. Sabe-se que durante a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos maduros há aumento na atividade constitutiva de NF- κ B, e concomitante incremento na produção de sinais inflamatórios, que, como sugerem os autores, devem estar envolvidos na inflamação sistêmica. A inibição do fator de transcrição, por outro lado, leva à supressão da liberação de citocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo humano (Lappas et al., 2005).

O NF- κ B é considerado, portanto, um alvo para o tratamento do câncer (Garg et al., 2002). A família de proteínas NF- κ B/Rel, originalmente descrita por Sem e Baltimore, 1986, é constituída por fatores de transcrição que medeiam a resposta celular frente a uma diversidade de estímulos ligados à inflamação, infecção e apoptose, tais como TNF- α , IL-1 β , espécies reativas do oxigênio (ROS), agentes anti-neoplásicos e radiação gama (revisto por Fraser, 2006; Schwartz et al., 1999). O estímulo promovido pelo TNF- α e IL-1 β induz, não apenas estimulação do fator de transcrição, como ainda *up regulation* da própria expressão dessas citocinas, pelo mesmo mecanismo (Schwartz et al., 1999).

A família de proteínas da via do NF- κ B é composta de cinco tipos: NF- κ B/Rel: p65/RelA, p50/p105 (NF- κ B1), p52/p100 (NF- κ B2), C-Rel e RelB. RelB, C-Rel e p65 são sintetizadas já na forma ativa, enquanto p105 e p100 devem ser modificadas às formas ativas p50 e p52, respectivamente. A forma funcional da molécula de NF- κ B é constituída por dímeros homo ou heterodímeros (Laurencikiene et al., 2001), sendo os mais estudados compostos por p65/RelA (NF- κ B1) e p50, e p52 (NF- κ B2) com RelB (Fraser, 2006). Na ausência de estímulo, o NF- κ B apresenta-se sequestrado no citoplasma pelas proteínas inibitórias kappaB (I κ B): I κ B- α mantém o complexo p50/RelA no citoplasma na forma inativa, mascarando o sinal de localização nuclear presente no dímero e impedindo sua translocação para o compartimento nuclear (revisões de Fraser, 2006; Schwartz et al., 1999). A forma de ativação do NF- κ B mais bem estudada é aquela promovida pelo TNF- α .

A molécula de TNF- α foi primeiramente descrita em 1975 e foi chamada de caquexina, devido ao seu forte efeito citotóxico sobre células tumorais. Trata-se de um polipeptídeo trimérico (17 kDa), produzido principalmente por monócitos e macrófagos ativados, assim como por outras células como linfócitos, fibroblastos, neutrófilos, musculares e mastócitos. Esta citocina pode atuar em quase todos os tipos de células nucleadas, através de dois tipos de receptores de membrana, tipo I (TNFR-1, p55) e tipo II (TNFR-2, p75) ou como uma molécula solúvel. A transmissão do sinal mediada por TNF- α ligado a seus receptores de membrana constitui um fenômeno altamente complexo e diverso, regulado por reações envolvendo fosforilação e ubiquitinação de proteínas alvo. Após a ligação ao seu receptor, há a ativação da proteína TRAF (Fator associado ao receptor de TNF, uma ubiquitina ligase) Esta ligação parece ser essencial para a ativação de seu intermediário de sinalização da proteína RIP através de poliubiquitinação. Por outro lado, a poliubiquitinação de RIP constitui um evento muito importante na interação da proteína quinase pró-inflamatória TAK 1 e do seu substrato, o complexo proteico I κ B (inibidor da quinase κ B). Assim, um passo fundamental na transmissão intracelular mediada pela interação entre TNF- α e do seu receptor é a ativação / fosforilação da proteína quinase I κ B (composta por 2 quinases de serina/treonina e diversas proteínas acessórias), mais especificamente, da sua subunidade β (Schwartz et al., 1999).

Quando ativado, o complexo I κ B fosforila o I κ B em resíduos serina específicos. Esse processo é insuficiente para induzir a ativação do NF- κ B, posto que apenas marca o I κ B para ubiquitinação e degradação no proteossoma. Após a degradação, há a exposição do sinal de localização nuclear, translocação do dímero para o núcleo e consequente ligação à região promotora de genes que contêm sítios κ B (revisão de Schwartz et al., 1999).

Figura 3 - Via de sinalização do NF- κ B

A ligação de citocinas ativa vários receptores que podem induzir o recrutamento de proteínas adaptadoras proximais, que sinalizam ao complexo I κ k através dos complexos proteicos TRAF/RIP, geralmente em conjunto com TAK-1, levando à via clássica de sinalização do NF- κ B. A Ativação do I κ k induz a fosforilação e degradação do inibidor I κ B na via clássica ou a proteína p100 processada à p52 na via não clássica. Além disso, I κ k ativado pode induzir também a fosforilação e degradação da proteína p105, liberando assim as subunidades do NF- κ B associadas. Seguindo a sua translocação nuclear, dímeros fosforilados do NF- κ B se ligam a elementos do DNA e induzem a transcrição de genes alvo.

Fonte: Adaptado de Mohamed et al., 2009

1.5 Via de sinalização do NF- κ B

Além do TNF-Alfa e receptores de outras citocinas, os receptores *Toll-like* de reconhecimento de agentes patogênicos, receptores de antígeno e outros receptores, que quando acionados induzem apoptose, regulam a ativação do NF- κ B (Fraser, 2006).

Em função da inequívoca importância do NF- κ B nas doenças inflamatórias crônicas, como a caquexia, há crescente interesse no estabelecimento de estratégias de inibição de sua ativação (Fraser, 2006), que é realmente efetiva em promover a redução na expressão

de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-6, como demonstrado, por exemplo, por Wu et al., 2007.

Pesquisas recentes revelam outro lado do NF- κ B e um papel no término da inflamação (Fong et al., 2008; Greten et al., 2007; Lawrence et al., 2001). Diferentes combinações de subunidades de NF- κ B detêm diferentes papéis na resposta imunitária. Homodímeros da subunidade p50, nos quais faltam os domínios de transativação, foram mostrados reprimindo a expressão de genes alvo do NF- κ B, incluindo o TNF- α (Kastenbauer et al., 1999).

Estudos sugerem que NF- κ B pode ter funções anti-inflamatórias pela inibição da expressão direta de genes e manipulando a expressão ou atividade de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 (Revisado por Lawrence et al., 2010).

Baseado no exposto acima, temos que a caquexia é caracterizada por ser uma síndrome inflamatória crônica, com elevadas concentrações de citocinas pró-inflamatórias tanto no tecido adiposo, quanto sistemicamente. O tecido adiposo é o primeiro afetado na síndrome e contribui para o quadro inflamatório secretando ativamente citocinas, além de sofrer consequências advindas das altas concentrações das mesmas, como infiltrado monocitário, inflamação e lipólise. A via clássica de sinalização do NF- κ B além de ser ativada pelas mesmas citocinas, tem um potencial relevante na indução da transcrição das mesmas, atuando como um ciclo, onde altas concentrações de citocinas induzem sua transcrição, mantendo assim um quadro de inflamação crônica, com secreção constante destes mediadores. Não há trabalhos na literatura investigando a expressão e ativação via clássica do NF- κ B no tecido adiposo de pacientes caquéticos, e dado o potencial desta via e do tecido adiposo na etiologia e manutenção do quadro de caquexia, são objetivos desta dissertação:

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Examinar o papel da via do NF- κ B na inflamação do tecido adiposo subcutâneo de pacientes com caquexia associada ao câncer.

2.2 Específicos

- Verificar se há alteração da expressão gênica das proteínas da via clássica do NF- κ B no tecido adiposo de pacientes com caquexia associada ao câncer em relação aos respectivos controles;
- verificar se há diferença na ativação da via clássica (ligação das subunidades p65 e p50 do NF- κ B à região promotora do DNA) no tecido adiposo de pacientes com caquexia associada ao câncer em relação aos respectivos controles;
- tendo em vista a alta concentração plasmática de PGE₂ e TNF α em pacientes com caquexia associada ao câncer, verificar se ambas as moléculas ativar a via do NF- κ B e se quando em conjunto, propiciam um aumento desta ativação.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Recrutamento de pacientes

Foram recrutados 35 pacientes no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU – USP). O recrutamento foi realizado pelos médicos envolvidos no projeto e consistiu na seleção de pacientes encaminhados para cirurgia eletiva de hérnia inguinal ou incisional (grupo controle, n = 10) e pacientes encaminhados para cirurgias eletivas de neoplasias gástricas (grupo peso estável, n = 12 e grupo caquexia, n = 13).

O critério para o diagnóstico de neoplasias gástricas adotado foi o do Instituto nacional do câncer, TNM – classificação de tumores, 2004 (Esôfago, estômago, intestino delgado, cólon e reto, canal anal, fígado, vesícula biliar, vias biliares extra hepáticas, ampola de Vater e pâncreas).

3.2 Aprovação no comitê de ética

A comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB aprovou o projeto através do PARECER 1004/CEP. Este projeto é ainda parte de um projeto de colaboração ICB-HU aprovado no comite de ética local do Hospital Universitário (CEP-HU/USP: 752/07), SISNEP CAAE (0031.0.198.019-07) e do ICB (PARECER 788/CEP).

Figura 4 - Fluxograma de atividades

3.3 Critérios de inclusão

Os critérios de inclusão utilizados para todos os pacientes foram: Não ter recebido tratamento anticâncer ou anti-inflamatório e o consentimento de participar. Os critérios de exclusão foram: insuficiência hepática, insuficiência renal, SIDA, doenças inflamatórias do intestino e desordens auto-imunes, todos diagnosticados pelos médicos. Pacientes submetidos à cirurgia de hérnia que apresentaram o parâmetro sérico proteína C-Reativa > 10 mg/l foram excluídos do estudo por apresentarem-se “inflamados” (McMillan, 2009), e portanto não constituírem controle adequado.

Os pacientes de câncer encaminhados à cirurgia que obedeceram aos critérios de inclusão e não obedeceram aos critérios de exclusão foram colocados no grupo Controle.

Os pacientes em tratamento de neoplasias que obedeceram aos critérios de inclusão e não obedeceram aos critérios de exclusão foram divididos em dois grupos com base nas respostas dadas nos questionários, nas medidas antropométricas aferidas e nos parâmetros bioquímicos avaliados. O grupo caquexia (TC) consistiu de pacientes com perda de peso não-intencional declarada > 5% nos últimos 12 meses, fadiga e aumento da concentração do

marcador inflamatório proteína C-Reativa acima de 5 mg/L de soro (Evans et al., 2008). O grupo peso estável (T) foi composto por pacientes em tratamento de neoplasias, sem perda de peso declarada > 5% nos últimos 12 meses.

3.4 Termo de consentimento e avaliação clínica

Após a seleção, primeiramente os pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE, anexo), concordando em participar da pesquisa. Após a assinatura, medidas antropométricas foram aferidas (peso, altura) e os pacientes foram entrevistados com dois questionários (Qualidade de vida - EORTC QLC-C30 e Caquexia - CASCO).

3.5 Coleta de sangue e análise de parâmetros bioquímicos

Cerca de 10 mL de sangue foram colhidos após jejum por uma noite no âmbito do processo de acesso venoso para anestesia durante a cirurgia. O sangue coletado foi dividido em dois tubos e as amostras foram então centrifugadas, o soro e plasma recolhidos e congelados à -80 °C para posteriores análises. As dosagens de hemoglobina e dosagens séricas (uréia, creatinina, proteína C-Reativa e albumina) foram realizadas tanto pelo laboratório RDO quanto pelo laboratório do (HU – USP) através de kits específicos de acordo com as instruções do fabricante. A dosagem plasmática (glicose) foi realizada pelo laboratório de biologia do tecido adiposo (Universidade de Mogi das Cruzes) também com kit específico, seguindo instruções do fabricante.

3.6 Obtenção de tecido adiposo

Durante o procedimento cirúrgico, uma fração de tecido adiposo subcutâneo de aproximadamente 1 g foi retirada pelo médico (biópsia), através de uma incisão a 1 cm a direita e acima da linha média do abdôme do paciente. Imediatamente após a biópsia, a amostra de tecido adiposo foi rapidamente dividida em dois tubos:

- 1- uma fração foi imersa em 1 ml do reagente (TRIzol®) e imediatamente imersa em nitrogênio líquido para subsequente extração de RNA total e análises de PCR Tempo Real;

- 2- uma segunda fração foi colocada em um tubo com 2 ml do tampão PBS com 5% *cocktail* inibidor de fosfatases e imediatamente imersa em nitrogênio líquido para posterior extração protéica e experimentos de ELISA *Binding*.

Este procedimento apresentou um grau mínimo de risco, e não interferiu com o procedimento cirúrgico padrão. Os tubos foram posteriormente transportados ao laboratório, retirados do nitrogênio líquido e imediatamente condicionados à -80 °C.

3.7 Reação em cadeia da polimerase (PCR tempo real)

3.7.1 Extração de RNA total

As amostras dos pacientes dos três grupos foram retiradas do freezer -80 °C e descongeladas em gelo. Previamente a homogeneização (**Politron PT3100**), a haste do homogeneizador foi tratada com água DEPC ativa, a fim de inativar quaisquer RNAses que pudessem interferir com a qualidade do experimento.

O tecido foi homogeneizado a uma velocidade de 12000 rpm até se obter um líquido viscoso. Após a homogeneização de todas as amostras, transferiu-se as mesmas a tubos eppendorfs e incubou-se por 5 minutos à temperatura ambiente. Adicionou-se 0,2 ml de clorofórmio a cada tubo, agitaram-se os tubos por inversão por 15 segundos e incubou-se por 2-3 minutos à temperatura ambiente. Realizou-se então uma centrifugação a 10600 rpm a 4 °C por 15 minutos e transferiu-se a fração do meio (clorofórmio) contendo o RNA (molécula de interesse) a tubos eppendorfs. Adicionou-se 0,5 ml de isopropanol e agitou-se os tubos por 15 segundos por inversão. Incubou-se então à temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugou-se novamente a 10600 rpm a 4 °C por 10 minutos com posterior descarte do sobrenadante. Adicionou-se por fim 1 ml de etanol 95% (ou álcool etílico absoluto), agitaram-se os tubos por inversão e centrifugou-se a 7500 rpm a 4 °C por 5 minutos. Após novo descarte do sobrenadante o RNA isolado foi ressuspenso em 20 µl de água DEPC inativa.

As amostras foram então congeladas no freezer (- 80 °C).

3.7.2 Quantificação do RNA total

Para a quantificação, utilizou-se o equipamento **Biomate 3 (ThermoScientific, Austin, Texas, EUA)** para a leitura em 260nm e 280nm (OD_{260} ; OD_{280}). Como valor de referência (Branco), utilizou-se água DEPC inativa.

Transferiu-se 1 µl de cada amostra de RNA total diluída à cubeta leitora do aparelho e procedeu-se com a leitura. A quantidade de RNA total foi calculada pelo aparelho conforme fórmula abaixo:

$$\text{RNA Total } (\mu\text{g}) = OD_{260} \times 40 \mu\text{g}/(1 OD_{260} \times 1 \text{ ml}) \times (\text{fator de diluição}) \times \text{volume total da amostra (ml)}$$

3.7.3 Qualidade dos RNAs

Para síntese de cDNA (etapa posterior) Foram utilizadas somente as amostras que apresentaram a razão $OD_{260}/OD_{280} > 1,8$. Isso nos indicou uma extração de RNA total com menos contaminantes como proteínas e cromóforos UV.

3.7.4 Síntese de cDNA

A síntese do DNA complementar foi realizada combinando o RNA total extraído de cada amostra (7 µl) com um mix de reação (13 µl) e para isso utilizou-se 3 µg de RNA total por amostra em um volume de 7 µl. Às amostras que atingiram a quantidade de 3 µg de RNA total em menos de 7 µl, foi adicionado água Milli-q para completar o volume total de 7 µl.

Um mix de reação foi preparado (13 µl) para cada amostra contendo 10U inibidor de RNase (1 µl), *random primers* (2 µl), 10 nmol de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs), (2 µl), ditiotreitol (2 µl), 10 U de transcriptase reversa M-MLV (2 µl) e tampão de reação 10X (4 µl), (100 mM de TRIS-HCl, 500 mM de KCl, 150 mM de $MgCl_2$ em água Milli-q autoclavada).

Procedeu-se colocando os tubos eppendorfs devidamente identificados no termociclador **GeneAmp® PCR System 9700 (Life Technologies, Carlsbad, California, EUA)** em um único ciclo à temperaturas de 25 °C por 5 minutos, 42 °C por 60 minutos, 70 °C por 15 minutos e 4 °C por 5 minutos.

3.7.5 Desenho de primers

Os primers foram desenhados a partir de sequências disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) e com o auxílio dos sites Spidey (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/spidey/spideyweb.cgi>) e Primer3 (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_web.cgi). A especificidade de cada primer foi verificada através do site BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e os mesmos foram sintetizados pela empresa Invitrogen. As sequências de cada primer estão descritas no quadro 1.

Quadro 1 - Primers utilizados na amplificação dos genes de interesse

Gene	Sense (5' – 3')	Antisense (5' – 3')
18S	CCTGCGGCTTAATTTGACTC	ATGCCAGAGTCTCGTTCGTT
p65/RelA	CCTGGAGCAGGCTATCAGTC	ATGGGATGAGAAAGGACAGG
p50	CATCCCATGGTGGACTACCT	TGGGTCCAGCAGTTACAGTG
I κ B- α	CTCCGAGACTTTCGAGGAAATAC	GCCATTGTAGTTGGTAGCCTTCA
I κ B- β	AGATGAATGGTGCACAGC	CAGGAAGGGTTCATGCTGAT
I κ α	CAGCCATTTACCTGGCATGAG	GAGGGTCCCAATTCAACATCAA
I κ β	ATCCCGATAAGCCTGCCA	CTTGGGCTCTTGAAGGATACAG
I κ γ /NEMO	ACAGCTATGACACCGGAAGC	GCACCATCTCACACAGTTGG

3.7.6 Amplificação

Procedeu-se com a reação em cadeia da polimerase no equipamento **ABI 7300 Realtime PCR system (Life Technologies)** primeiro para um *pool* de cDNA das amostras em várias concentrações de primers, a fim determinar a diluição ideal das amostras e a concentração ideal dos primers. A diluição da amostra e concentração do primer ideais foram determinadas de acordo com Nascimento, 2010, e consistiu na escolha da concentração do primer que provocou o aumento de um ciclo de amplificação (Ct) a cada diluição da amostra.

Após a determinação das concentrações e diluições ideais, procedemos com a amplificação amostra à amostra utilizando por reação 12,5 µl do reagente Syber Green, 5 µl dos primers diluídos, 2,5 µl de água Milli-q e 5 µl de cDNA de cada amostra, totalizando um volume de reação de 25 µl. Os ciclos de amplificação foram realizados em um Termociclador ABI 7300 (Life Technologies). Todas as amostras foram amplificadas em duplicata.

3.7.7 *Análise dos resultados de expressão gênica*

Os níveis de mRNA foram determinados pelo método comparativo Ct, conforme descrito por Livak et al., 2001. Para cada amostra, um valor ΔCt foi obtido subtraindo os valores do gene controle 18S do gene de interesse. O valor ΔCt médio do grupo controle foi então subtraído a partir da amostra para derivar um valor de $\Delta\Delta Ct$. A expressão de cada gene foi avaliada por $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e a significância foi avaliada por ANOVA não paramétrico (Kruskal Wallis, com pós teste de Dunn). Os valores foram expressos em $\log \pm$ Erro.

3.8 Ensaio de ligação (*ELISA Binding Assay*)

Para avaliar a ligação das subunidades p65 e p50 à região promotora do DNA (5'-GGGACTTTCC-3') foram realizados ensaios de ligação das cinco proteínas que compõem a família do NF- κ B (p65, p50, p52, REL-B e C-Rel). Foi utilizado o kit **NF- κ B Family Transcription factor assay kit (Transam, Carlsbad, California, EUA)**, que consiste de placas de 96 wells onde a sequência alvo do NF- κ B (5'-GGGACTTTCC-3') está imobilizada. O ensaio consistiria na incubação da fração protéica nuclear ou total das amostras na placa. As moléculas do NF- κ B presentes no extrato reconhecem a sequência alvo imobilizada e se ligam. Anticorpos específicos marcam as proteínas ligadas e através da adição de anticorpos secundários conjugados a HRP (*Horseadish Peroxidase*), e um ensaio colorimétrico torna possível a quantificação da absorbância e da ligação. Segundo o kit, tanto a fração nuclear como total poderiam ser utilizadas no ensaio, sendo a fração nuclear muito mais sensível e por isso segundo o kit, utilizada em uma quantidade menor em relação a fração proteica total, devido à maior concentração das proteínas de interesse no núcleo das células. Decidiu-se utilizar a fração nuclear e realizou-se a extração proteica nuclear das amostras de tecido

adiposo subcutâneo (n=21, 7 por grupo), utilizando o kit **Motif Active® Nuclear extract kit (Transam)**.

3.8.1 Extração nuclear

Descongelou-se em gelo o tecido adiposo coletado e pesou-se (600 mg), o material foi colocado em um béquer com tampão PBS 1X suficiente para cobrir o tecido e o mesmo foi cortado em pedaços muito pequenos. Recolheu-se então os pedaços em um microtubo pré-refrigerado. No gelo, adicionou-se 3 ml de tampão hipotônico 1X suplementado com DTT e detergente por grama de tecido (1,8 ml), homogeneizou-se e transferiu-se o material para um microtubo. O material foi então incubado em gelo por 15 minutos.

Centrifugou-se por 10 min a 850 g e 4 °C (Formação de *pellet* e 2 sobrenadantes), transferiu-se o sobrenadante {fase do meio (aquosa) – fração citoplasmática} para um microtubo pré-refrigerado e guardou-se este sobrenadante para avaliação posterior da eficiência do kit.

Descartou-se o sobrenadante restante (resto de tecido adiposo), ressuspendeu-se o pellet em 500 µl de tampão hipotônico 1X pipetando para cima e para baixo várias vezes e incubou-se em gelo por 15 minutos. Adicionou-se então 25 µl de detergente e colocou-se no vórtex por 10 segundos na velocidade mais alta (etapa de lavagem).

Centrifugou-se a suspensão por 30 segundos a 14.000 g em microcentrífuga pré-resfriada a 4 °C, transferiu-se o sobrenadante (resto de fração citoplasmática) e combinou-se o mesmo com o produto fração citoplasmática separada previamente.

Ressuspendeu-se o pellet nuclear em 50 µl de tampão de lise completa, colocou-se por 10 segundos no vórtex na velocidade mais alta e incubou-se a suspensão por 30 minutos no gelo em uma plataforma de balanço fixado em 150 rpm.

Finalmente colocou-se o material no vórtex por 30 segundos na velocidade mais alta, centrifugou-se novamente por 10 minutos a 14.000 g em microcentrífuga pré-resfriada a 4 °C e transferiu-se o sobrenadante final (fração nuclear proteica) para um tubo de microcentrífuga pré-refrigerado e armazenou-se a -80 °C.

3.8.2 Quantificação protéica

Para a quantificação proteica, utilizamos o kit comercial **BCA (Bio-Rad, Hercules, Califónia, EUA)**. Uma curva padrão de proteína foi utilizada como referência (de 2000 µg até 0 µg divididos em nove pontos) de acordo com o protocolo do fabricante.

3.8.3 Avaliação da eficiência do kit de extração nuclear (Western Blotting)

Procedeu-se com a realização do experimento de Western Blotting para verificar a eficiência do kit de extração nuclear. Para isso, as frações nucleares e citoplasmáticas foram utilizadas para a imunodeteção da proteína β -Actina (proteína constitutiva expressa somente no citoplasma). Caso a proteína fosse detectada somente na fração citoplasmática, a extração nuclear teria sido realizada de forma correta, e caso a proteína fosse detectada na fração nuclear, uma contaminação ou má eficiência do kit seria detectada. O procedimento seguiu os passos abaixo:

3.8.3.1 Eletroforese SDS-Page

Um volume equivalente a 50 µg de proteínas das amostras e 5 µL de padrão de peso molecular (**Fermentas Life Science, Burlington, Ontario , Canada**) foi aplicado a um gel de poliacrilamida (5% para retenção e 10% para separação das proteínas) e as proteínas foram separadas por eletroforese por 2 horas e 30 minutos, a 80 V.

3.8.3.2 Transferência

As proteínas das amostras separadas no gel de eletroforese foram transferidas para membranas de nitrocelulose. Para tanto, cada gel foi colocado sobre uma membrana de nitrocelulose **Hybond X-tra® (Amersham, Piscataway, New Jersey, EUA)**, e imerso em uma cuba contendo tampão de transferência (Tris-HCl 25 mM, pH 8,4, glicina 192 mM e metanol 20%). A corrente foi regulada para 250 mA durante 3,5 horas. Ao final da eletrotransferência, cada membrana foi lavada em TBS T, rapidamente corada com vermelho de Ponceau, marcada e descorada com água destilada.

3.8.3.3 Bloqueio e incubação

As membranas foram incubadas por 1 hora com 7,5% de leite em pó desnatado em TBS T para bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos. Decorrido este período, as membranas foram lavadas com TBS T e incubadas (*overnight*) sob agitação (**agitador orbital, Red Rotor, Hoefer, Holliston, Massachussets, EUA**) em solução de anticorpos (anti- β -Actina diluição 1:1000 (Amersham e THERMO) a 4 °C. Após este período, as membranas foram lavadas com TBS T, e incubadas com o anticorpo secundário diluído 1:10000 (goat anti-rabbit IgG – THERMO) conjugado com uma peroxidase por 1 hora e após a incubação do secundário seguida por mais um lavagem com TBS T e incubação por 3 minutos com ECL (Amersham).

3.8.3.4 Imunodeteccção da proteína β -Actina

No ensaio de Western Blotting verificou-se a contaminação das proteínas nucleares com proteínas citosólicas. Foi detectada a presença da proteína β -Actina nas cinco frações nucleares utilizadas no experimento, conforme figura abaixo:

Figura 5 – Imunodeteccção da proteína B-Actina

Ptn = Proteína

Após, procedeu-se com o ensaio de ligação, porém utilizando a fração protéica total e não somente a nuclear, para isso, uniu-se as frações citoplasmáticas e nucleares obtidas no ensaio de extração nuclear.

3.8.4 Ensaio de ligação

Utilizou-se uma placa de ELISA, na qual sequências da região promotora região alvo do NF- κ B (5'-GGGACTTTCC-3') foram imobilizadas. Foram realizados ensaios com um *pool* de

amostras isoladas (20 µg de proteína) e amostras por grupo (40 µg de proteína) diluídas em tampão de lise (*DTT; Cocktail inibidor de protease e Lysis Buffer AM2*) totalizando 20 µl. 30 µl de tampão de ligação (*DTT, Herring sperm DNA e Binding Buffer AM3*) foi pipetado em cada pocinho juntamente com a amostra diluída em tampão de lise e a placa foi mantida por uma hora sob agitação moderada à temperatura ambiente. Após, procedeu-se com 3 lavagens com o tampão de lavagem fornecido pelo kit e o 100 µl de anticorpo primário diluído 1000 vezes foi adicionado a cada pocinho. A placa foi novamente incubada à temperatura ambiente por uma hora e após este período mais 3 lavagens foram realizadas com o mesmo tampão de lavagem. Após, 100 µl do anticorpo secundário (*HRP Horseadish peroxidase* conjugado) foi adicionado e a placa novamente incubada à temperatura ambiente por mais uma hora.

Para finalizar, 4 lavagens foram realizadas com o tampão de lavagem e 100 µl de uma solução reveladora foi adicionado em cada pocinho. Após 5 minutos, uma solução *STOP* foi adicionada e a absorbância aferida a 450 nm.

3.8.5 Análise dos resultados e estatística

As médias das absorbâncias de cada grupo foram comparadas e os resultados calculados por ANOVA one way, com pós teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

3.9 Ensaio de gene repórter

Todos os experimentos foram realizados na Universidade de Potsdam, Alemanha, no Instituto de pesquisa dos alimentos (D.I.F.E. – Deutsches Institut für Ernährungswissenschaft), laboratório de bioquímica dos alimentos (Labor für Biochemie der Ernährung).

O ensaio de gene reporter possibilitou a avaliação da ativação da região promotora da via do NF-κB pelas moléculas TNF- α e PGE₂. e consistiu das etapas abaixo:

3.9.1 Preparo de bactérias competentes XL1-blue

Meio LB Agar foi plaqueado em placas de cultivo e uma alíquota da bactéria XL1-Blue foi plaqueada e incubada por uma noite à 37 °C. No dia seguinte, realizou-se a coleta de colônias isoladas, que foram colocadas em Erlenmeyers de 25 ml com meio LB. Este foi mantido durante uma noite no agitador (shaker) a 37 °C (pré cultura). No próximo dia, todo o conteúdo foi colocado em 250 ml de meio LB em um Erlenmeyer de 500 ml sob agitação a 37 °C e adensidade óptica foi aferida a cada meia hora até atingir o crescimento exponencial entre 0,6 e 1,0. Depois, o Erlenmeyer foi colocado em gelo por 10 minutos para interromper o crescimento e o conteúdo centrifugado por 10 minutos a 4000 rpm à 4 °C. Foram então realizadas lavagens com glicerina a 10% e centrifugações até reduzirmos o volume à alíquotas de 50 µl, congeladas a -80 °C.

3.9.2 Obtenção dos plasmídeos de interesse

Utilizamos dois plasmídeos no experimento de gene repórter {NF-κB Luciferase reporter vector e pCMV-LacZ (β-Galactosidase)}. Ambos obtidos da empresa PROMEGA (Madison, Wyoming, EUA).

3.9.3 Transformação de bactérias xl1-blue

Procedeu-se com a transformação (eletroporação) dos plasmídeos em bactérias XL1-Blue competentes preparadas anteriormente a fim de multiplicar os plasmídeos e obter quantidade suficiente para a transfecção.

Para a eletroporação, foram utilizados os meios SOB (Tryptona, Extrato de levedura NaCl, KCl 250 mM autoclavado + MgCl₂ 2 M) e meio SOC (Meio SOB + Glicose 20% estéril), além das bactérias competentes. Foram colocados cada plasmídeo com as bactérias em um eppendorf, transferiu-se então para uma cubeta e uma corrente elétrica de 2500 V foi aplicada (**eletroporador da empresa BioRad, Hercules, California, EUA**). Imediatamente após foi colocado meio SOC pré-aquecido à 37 °C para a recuperação das bactérias, que foram transferidas a um tubo *Falcon* e foram incubadas por uma hora a 37 °C sob agitação. Após, as bactérias foram plaqueadas novamente em meio LB-Agar + Ampicilina e incubadas

por uma noite à 37 °C. No dia seguinte, colônias isoladas foram coletadas e colocadas para crescer em Erlenmeyers (12) de 25 ml com 5 ml de meio LB + ampicilina por uma noite à 37 °C.

3.9.4 Isolamento dos plasmídeos em pequena escala

O isolamento foi realizado com o kit *PureYield™ Plasmid Miniprep System* (PROMEGA). 600 µl do conteúdo dos erlenmeyers foi pipetado em um tubo eppendorf de 1,5 ml. Foi então adicionado 100 µl de tampão de lise fornecido pelo kit e os tubos foram agitados 6 vezes por inversão. Após, adicionou-se 350 µl de solução de neutralização e os tubos foram centrifugados a máxima velocidade por 2 minutos. O sobrenadante foi então transferido a uma coluna fornecida pelo kit e novamente centrifugou-se a velocidade máxima por 1 minuto. Descartou-se o conteúdo que passou pela coluna e solução de lavagem foi adicionada à coluna seguida de outra centrifugação. A eluição foi realizada com 30 µl de água *Nuclease Free*.

3.9.5 Crescimento da colônia de interesse

Após a mini preparação, colocou-se uma alíquota do material isolado e digeriu-se o mesmo com enzimas de restrição, correu-se um gel de agarose e assim verificou-se qual ou quais colônias continham o plasmídeo de interesse. Após a identificação, procedeu-se com o crescimento exponencial das mesmas, colocando o conteúdo restante dos Erlenmeyers de 25 ml em um Erlenmeyer de 500 ml com 150 ml de meio LB + ampicilina por uma noite a 37 °C sob agitação. O plasmídeo eletroporado contém uma sequência (origin) que os faz crescer a uma taxa elevada (high copy plasmids).

3.9.6 Isolamento dos plasmídeos em larga escala

O isolamento em larga escala foi realizado seguindo instruções do kit *PureYield™ Plasmid Maxiprep System* (PROMEGA). Primeiramente as células foram centrifugadas para a obtenção do pellet a 5000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 12 ml de solução de ressuspensão. Adicionou-se então 12 ml de solução de

lise celular e incubou-se à temperatura ambiente por 3 minutos. Adicionou-se então 12 ml de solução de neutralização e agitou-se. Centrifugou-se o lisado a 14000 g por 20 minutos à temperatura ambiente e transferiu-se o conteúdo à uma coluna fornecida pelo kit e aplicou-se um vácuo para “puxar” o conteúdo pela coluna. Adicionou-se então soluções de lavagem (5 ml e 20 ml) e secou-se a coluna. Colocou-se então a coluna em um tubo de 50 ml. Colocou-se então 1 ml de água nuclease *free* e centrifugou-se por 5 minutos à 2000 g. Coletou-se então o conteúdo com o plasmídeo de interesse.

3.9.7 Cultura de células

Células HEK293 foram cultivadas em meio (DMEM + 10% FCS + Penicilina /Streptomomicina + G148) e incubadas a 5% CO₂ a 37 °C.

O meio de cultura foi trocado a cada dois dias aspirando o mesmo (as células estavam “fixadas” na parede da garrafa, portanto não houve risco de serem aspiradas com o meio). Realizou-se a tripsinização com uma solução de Tripsina e EDTA. Após, procedeu-se com a lavagem com PBS 1X e a troca do meio de cultura para a pré transfecção.

A pré-transfecção iniciou-se com a contagem das células no equipamento CASY 1 e após, uma solução de PLL (Poli-L-Lisina) foi colocada para facilitar a aderência das células (pré- coating).

O plaqueamento das células (0,5 ml/pocinho – 20000 a 30000 células/pocinho) foi realizado em uma placa de 24 pocinhos utilizando o meio (DMEM + 10% FCS + Penicilina/Streptomomicina) e incubação a 5% CO₂ por uma noite.

A transfecção das células foi realizada aspirando primeiramente o meio, depois lavando as células com meio puro para retirar qualquer FCS remanescente e adicionou-se meio fresco, porém sem antibióticos (os antibióticos poderiam dificultar a transfecção e por esta razão, nesta etapa, retiramos os mesmos). Incubou-se a 5% CO₂ até a colocação do *cocktail* de transfecção.

3.9.8 Transfecção

Utilizou-se para transfectar as células o método do fosfato de cálcio, amplamente utilizado para este modelo (células HEK293). O *cocktail* de transfecção foi preparado com os

plasmídeos do NF κ B, β -Galactosidase, H₂O, 2,5 M CaCl₂ e 2X BBS. Colocou-se 50 μ l do mesmo em cada pocinho transfectado e incubou-se por 3 horas em uma estufa a 3% CO₂ (para que o plasmídeo chegue ao núcleo das células, é necessário que este “vença” os lisossomos que podem digeri-lo. Os lisossomos digerem em um pH mais baixo e com apenas 3% CO₂, evitou-se que o pH viesse muito para baixo). Após as 3 horas, aspirou-se o meio e voltou-se o meio padrão para as células com antibióticos. Incubou-se a 5% CO₂ *overnight*.

A estimulação de células HEK293 foi realizada com os estímulos (Controle, TNF α , PGE₂ e TNF α + PGE₂). As concentrações utilizadas foram: TNF α : 50 ng/ml (1 nM) e PGE₂: 1 μ M e incubadas a 37 °C e 5% CO₂ por uma noite.

3.9.9 Ensaio da luciferase

Primeiro, aspirou-se o meio no qual as células estavam sendo estimuladas e colocou-se o tampão de lise. Incubou-se por 30 minutos, transferiu-se o conteúdo para tubos eppendorfs e centrifugou-se para retirar o que não estava solúvel, visto que a proteína de interesse (luciferase) é solúvel no tampão de lise. Transferiu-se então o sobrenadante para microtubos e adicionou-se 25 μ l de cada amostral em um pocinho da placa de leitura.

A leitura procedeu-se no fluorímetro com o software **FluoStar Optima (BMG Labtech, Ortenberg, Hesse, Alemanha)**:

O equipamento é responsável por colocar o substrato da luciferase (luciferina em excesso) em cada pocinho e faz 100 medições de quantidade de luz emitida, assim como quantifica e plota em um gráfico para posterior análise.

3.9.10 Ensaio da β -galactosidase

Pipetou-se o tampão 100 nM NaH₂PO₄ na placa de leitura e colocou-se uma alíquota do lisado de células. A solução teste (ONPG) foi então adicionada e incubou-se a 37 °C e 5% CO₂ por 3 horas. Procedeu-se então com a leitura da absorbância a 450 nm.

O ensaio da β -Galactosidase serviu de controle, visto que a região promotora do mesmo é de uma proteína constitutiva (Fosfoglicerase humana), e por isso está sempre ativo independente do estímulo. Este ensaio serviu para validar a técnica da Luciferase.

3.9.11 Análise dos resultados e estatística (ensaio de gene repórter)

Foram consideradas as últimas 20 leituras fornecidas pelo fluorímetro (média da fluorescência). Após, procedeu-se com o cálculo da média e do desvio padrão da fluorescência de cada grupo e a porcentagem de cada amostra em relação à média do grupo controle. Depois, a média das porcentagens de cada grupo foi calculada, assim como o desvio padrão. Então, os resultados da fluorescência do ensaio da Luciferase foram divididos (linearizados) com as absorbâncias obtidas no ensaio da β -Galactosidase.

Por fim, calculou-se a média e desvio padrão dos resultados de cada grupo e relativizaram-se as porcentagens ao grupo controle. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Achados clínicos

As características dos pacientes são mostradas na Tabela 1. Os indivíduos dos três grupos mostravam altura, peso e índice de massa corporal (IMC) semelhantes. Os pacientes em tratamento de neoplasias com peso estável e caquéticos apresentaram diferenças significativas nas concentrações séricas de proteína C-Reativa ($p = 0,002$) e albumina ($p < 0,0001$). Não houve diferença nos parâmetros bioquímicos (glicose plasmática, uréia sérica e hemoglobina).

Não avaliamos o parâmetro “massa magra” entre os grupos, embora os grupos tenham sido pareados por IMC. O grupo caquético apresentou valores de PCR maior que 5 mg/L, o que indica que os pacientes estudados podem ser classificados como caquéticos em grau refratário, de acordo com os critérios de diagnóstico propostos por Fearon et al. (2002).

Tabela 1 - Características gerais dos pacientes de cada grupo

	Peso estável (Controle)	<5% perda de peso declarada (últimos 12 meses – Tumor peso estável)	>5% perda de peso declarada (últimos 12 meses – Tumor com caquexia)	Análise estatística (ANOVA one way e não paramétrico)
n	10	12	13	
Masculino / Feminino (n)	7/3	8/4	9/4	
Idade (Anos)	49,7±18,2	61,75±17,64	64,69±12,29	p=0,0839
Peso (kg)	72,81±12,81	64,90±13,23	66,80±12,91	p=0,3515
Altura (m)	1,69±0,07	1,61±0,1	1,64±0,07	p=0,0862
IMC (kg/m ²)	25,9±4,33	24,85±3,56	24,55±4,18	p=0,7155
Hemoglobina (g/dl)	13,57±1,88	11,88±2,81	11,53±1,96	p=0,0976
Ureia (mg/dl)	35,20±12,32	35,5±12,18	25,89±15,85	p=0,1584
Glicose (mg/dl)	102,20±30,20	132,78±57,50	124,4±34,61	p=0,2491
Creatinina (mg/dl)	0,95±0,23	0,85±0,36	1,05±0,60	p=0,5328
Proteína C- Reativa (mg/L)	1,96±2,52	95,28±41,49	148,7±78,35	*C x T, C x TC; p=0,002
Albumina (mg/L)	37,57±5,25	34,42±3,69	26,33±5,03	*C x T, C x TC p<0,0001

Fonte: adaptado de Batista et al., 2012

4.2 Avaliação da expressão gênica das proteínas do NF- κ B

O ensaio de avaliação da expressão gênica do dímero responsável pela indução da transcrição de citocinas pró-inflamatórias (p65/RelA e p50) mostrou que o gene da proteína p65/RelA está superexpresso no tecido adiposo subcutâneo de pacientes em tratamento de neoplasias gástricas quando comparado com pacientes controle ($p= 0,0101$, ANOVA não paramétrico com pós teste de Dunn), o que não foi constatado para o gene da proteína p50, que apresentou expressão semelhante entre os grupos ($p= 0,2713$, ANOVA não paramétrico com pós teste de Dunn).

Foram avaliadas também as proteínas responsáveis pela formação do complexo inibitório no NF- κ B, I κ B (I κ BAlfa e I κ BBeta). O ensaio de expressão gênica da proteína I κ BAlfa mostrou que este gene está significativamente mais expresso em pacientes em tratamento de neoplasias com peso estável ($p= 0,0287$, ANOVA não paramétrico com pós teste de Dunn), em relação a pacientes controle, ao passo que em relação a pacientes em tratamento de neoplasias com caquexia não houve diferença significativa. A expressão do gene da proteína I κ BBeta não apresentou diferença entre os grupos de pacientes estudados ($p= 0,3436$, ANOVA não paramétrico com pós teste de Dunn).

Por fim, avaliou-se a expressão dos genes das proteínas que compõem o complexo fosforilador do inibidor I κ B, as I κ Ks (I κ KAlfa, I κ KBeta, I κ KGama). A expressão gênica da proteína I κ KAlfa mostrou que este gene está significativamente mais expresso em pacientes em tratamento de neoplasias gástricas com peso estável quando comparado a pacientes controle ($p= 0,0306$, ANOVA não paramétrico com pós teste de Dunn), mas não em relação a paciente em tratamento de neoplasias com caquexia. O gene da proteína I κ KBeta está também mais expresso em pacientes em tratamento de neoplasias gástricas com peso estável em relação a pacientes controle ($p= 0,0141$, ANOVA não paramétrico com pós teste de Dunn), mas também não houve diferença significativa em relação a pacientes em tratamento de neoplasias gástricas com caquexia. O gene I κ KGama não apresentou expressão diferenciada entre os grupos ($p= 0,0667$, ANOVA não paramétrico com pós teste de Dunn).

Abaixo as figuras 6-12 ilustram o ensaio de expressão gênica (C, grupo Controle; T, grupo Tumor peso estável; TC, grupo Tumor caquético):

Figura 6 - Expressão gênica da proteína p65/RelA

(* significância T x C, TC x C; $p = 0,0101$)

Figura 7 - Expressão gênica da proteína p50

$p = 0,2713$

Figura 8 - Expressão gênica da proteína I κ BAlfa

(* significância T x C, $p = 0,0306$)

Figura 9 - Expressão gênica da proteína I κ BBeta

$p = 0,3436$

Figura 10 - Expressão gênica da proteína I κ κ Alfa

(* significância T x C; p= 0,0306)

Figura 11 - Expressão gênica da proteína I κ κ Beta

(*significância T x C; p= 0,0141)

Figura 12 - Expressão gênica da proteína I κ B

$p = 0,0667$

4.3 Ligação das subunidades do NF- κ B ao DNA

No ensaio de ligação das proteínas p65 e p50 realizados com extrações protéicas totais e amostras dos três grupos plaqueadas separadamente (20 μ g, C, grupo controle, $n=7$; T, grupo tumor peso estável, $n=7$ e TC, grupo tumor caquético, $n=7$), não houve diferença significativa na ligação das proteínas à região promotora nas subunidades p65/RelA (Figura 13, $p = 0,182$, ANOVA one way) e p50 (Figura 14, $p = 0,6810$, ANOVA one way).

Figura 13 - Ligação da proteína p65/RelA à região promotora do NF- κ B

$p = 0,182$

Figura 14 - Ligação da proteína p50 à região promotora do NF-κB

p=0,6810

Após, procedeu-se com um novo ensaio de ligação, porém avaliando as cinco subunidades do NF-κB (p65/RelA, p50, p52, Rel-B e C-Rel), com três *pools* de amostras, e com uma quantidade maior de proteína (40 µg - C, grupo controle; T, grupo Tumor peso estável e TC, grupo Tumor caquético) para detectar se alguma das proteínas da família do NF-κB apresentava maior ligação em relação às outras, por consequência da ativação de alguma via alternativa. Não foi detectada diferença significativa entre a ligação das cinco proteínas nos três grupos (p=0,999, ANOVA one way), conforme a tabela 2 e Figura 15 (C, grupo controle; T, grupo Tumor peso estável e TC, grupo Tumor caquético):

Tabela 2 - Proporção das subunidades p65/RelA, p50, p52, Rel-B e C-Rel

Grupo/Subunidade	p65/RelA	p50	p52	Rel-B	C-Rel
C	19%	20%	12%	32%	17%
T	19%	24%	10%	33%	14%
TC	25%	24%	8%	26%	18%

Figura 15 - Proporção das proteínas p65/RelA, p50, p52, Rel-B e C-Rel

p=0,999

Neste ensaio, porém, a ligação ao DNA da proteína p65/RelA apresentou-se significativamente aumentada no grupo de pacientes em tratamento de neoplasias gástricas e com caquexia em relação a pacientes controle (Figura 16, $p=0,0292$, ANOVA one way com pós teste de Tukey). Já a ligação ao DNA da proteína p50 apresentou-se significativamente aumentada nos pacientes em tratamento de neoplasias gástricas em relação a pacientes controle e também em pacientes em tratamento de neoplasias gástricas e caquéticos em relação ao grupo peso estável (Figura 17, $p<0,0001$, ANOVA one way com pós teste de Tukey).

Figura 16 - Ligação da proteína p65/RelA à região promotora do NF-κB (pool de amostras por grupo)

(* significância C x TC; $p=0,0292$)

Figura 17 - Ligação da proteína p50 à região promotora do NF-κB (pool de amostras por grupo)

(*significância C x T; ** significância T x TC; *** significância C x TC; $p<0,0001$)

4.4 Avaliação da modulação da ativação da via de sinalização do NF- κ B por TNF-Alfa e PGE₂

O ensaio de gene repórter da Luciferase mostrou que a ativação da via de sinalização do NF- κ B em células HEK293 foi aumentada em resposta ao estímulo dado por TNF-Alfa ($p < 0,0001$, ANOVA ONE WAY) mas não por PGE₂. Quando estimuladas com ambas as moléculas, a ativação da via do NF- κ B foi semelhante à encontrada apenas sob o estímulo de TNF-Alfa, confirmando que a ativação da via foi devido ao estímulo de TNF-Alfa e não de PGE₂ (figura 18)

A fim de confirmar o resultado, outra linhagem celular que superexpressa o receptor EP4 de membrana para PGE₂ (células HEK EP4) foi utilizada e mesmo nestas células, o estímulo de PGE₂ não foi capaz de aumentar a ativação da via do NF- κ B quando comparado com células controle ($p < 0,0001$, ANOVA ONE WAY). O estímulo de TNF-Alfa foi capaz de aumentar a ativação da via em até 10 vezes (figura 19).

Figura 18 - Ativação da via do NF- κ B por TNF-alfa e PGE₂ em células HEK 293

(* significância, Controle x TNF-Alfa; ** significância, Controle x PGE₂ + TNF-Alfa; *** significância, PGE₂ x TNF-Alfa; **** significância, PGE₂ x PGE₂ x TNF-Alfa; $p < 0,0001$)

Figura 19 - Ativação da via do NF- κ B por TNF-alfa e PGE₂ em células HEK EP4 superexpressando o receptor EP4

(* significância, Controle x TNF- α ; ** significância, Controle x PGE₂ + TNF- α ; *** significância, PGE₂ x TNF- α ; **** significância, PGE₂ x PGE₂ x TNF- α ; p < 0,0001)

Figura 20 - Resumo dos resultados. Avaliação da via clássica de sinalização do NF- κ B (Ativação por TNF- α e PGE₂, expressão gênica, ligação ao DNA)

5 DISCUSSÃO

Estudos recentes demonstram que a inflamação sistêmica pode ser considerada o denominador comum das muitas consequências clínicas e metabólicas da caquexia (Seelaender et al., 2012). Altas concentrações de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF- α são descritas e foram confirmadas nos pacientes selecionados para este estudo por trabalho publicado por nosso laboratório (Batista et al., 2012). Apesar destas citocinas estarem em altas concentrações no plasma dos pacientes portadores da síndrome, uma metodologia mais prognóstica é necessária para avaliar o grau de inflamação dos pacientes em tratamento de câncer. Consistentemente com essa visão, marcadores inflamatórios vêm sendo propostos (Seelaender et al., 2012) e no ano de 2009, o valor prognóstico de Glasgow (McMillan, 2009) propôs uma nova metodologia para a análise do grau de inflamação em pacientes em tratamento de neoplasias. De acordo com o McMillan, 2009, a concentração sérica de proteína C-Reativa e albumina poderiam ser utilizadas como uma ferramenta de custo baixo e alta eficiência para avaliar o grau de inflamação em pacientes com câncer.

Os pacientes em tratamento de neoplasias gástricas estudados neste trabalho apresentavam uma alta concentração sérica de proteína C-Reativa (>10 mg/L) e baixa concentração de albumina (< 35 mg/L), descritas por McMillan, 2009, como características de inflamação de pontuação 2, em uma escala de 0 a 2, onde 0 é o menor grau e 2 o maior.

Apesar da inflamação ser característica do quadro caquético e de os pacientes do grupo caquexia apresentarem características de inflamados, levanta-se a hipótese da utilização da Proteína C-Reativa como um possível marcador de caquexia. Quanto a isso, algumas considerações devem ser ponderadas: Por se tratar de um marcador sérico, as concentrações do mesmo elevam-se de maneira tardia, quando já há a presença de uma inflamação em tecidos (ex: adiposo), dificultando assim o diagnóstico precoce da caquexia. Fearon et al., 2011 propõem a classificação da caquexia em três estágios: **Pré-caquexia**, onde fatores tais como alterações metabólicas podem estar presentes antes mesmo da perda de peso; **Caquexia**, onde há a presença de inflamação sistêmica e perda de peso; e **caquexia refratária**, onde não há resposta a terapia anti-câncer e a expectativa de vida usualmente não ultrapassa três meses. Um diagnóstico na fase de pré-caquexia poderia ser

determinante no aumento da sobrevida dos pacientes. A inflamação sistêmica detectada pela Proteína C-Reativa nos daria um diagnóstico de caquexia e não de pré-caquexia.

Durante a progressão da doença, verifica-se que a concentração de sérica de proteína C-Reativa varia consideravelmente, e o fato de não se manter constante, pode ocasionar um diagnóstico errôneo, ocultando assim uma inflamação presente e somente não detectada por este marcador sérico.

Agustsson et al., 2012, postularam que na caquexia, a perda de massa muscular e tecido adiposo precedem qualquer diminuição na ingestão de alimentos e que progridem durante o curso da doença. Estudos longitudinais em seres humanos sugerem que a perda de massa gorda é ainda um evento anterior a perda de massa magra na patogênese da caquexia (Arner, 2011; Bing, 2011).

O tecido adiposo é reconhecido atualmente como um órgão endócrino, secretando ativamente mais de 100 moléculas, entre elas citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Nosso grupo se dedica ao estudo do tecido adiposo a mais de dez anos e têm publicado importantes estudos que colocam o mesmo não somente como vítima da caquexia, mas como um possível contribuinte em sua etiologia e manutenção, sofrendo uma alta taxa de infiltração de macrófagos (Machado et al., 2004) e secretando ativamente citocinas pró-inflamatórias, contribuindo para a elevada concentração plasmática das mesmas, sendo o infiltrado mononuclear a grande fonte de citocinas oriundas do tecido adiposo (Batista et al., 2012).

Um ponto chave na indução da expressão de citocinas pró-inflamatórias é a via clássica de sinalização do NF- κ B.

A família de proteínas NF- κ B/Rel, originalmente descrita por Sen et al., 1986, consiste de fatores de transcrição que têm sido objeto de intenso estudo baseado nas implicações de sua função como um importante mediador de uma ampla variedade de respostas celulares contra uma grande variedade de estímulos associados com infecções, inflamação e apoptose, tais como TNF- α , IL-1 β , espécies reativas de oxigênio (ROS), agentes anti-neoplásicos e radiação gama (revisto por Fraser, 2006; Garg et al., 2002; Schwartz et al., 1999 e).

A via clássica de sinalização do NF- κ B está diretamente envolvida na transcrição de genes pró-inflamatórios e regula muitos genes envolvidos na promoção do câncer. Um

grande corpo de evidência indica uma ligação entre a inflamação promovida pela ativação deste factor de transcrição e o desenvolvimento de câncer (revisto por Fraser, 2006).

A forma funcional da molécula de NF- κ B é constituída por dímeros de (homo ou heterodímeros) (Laurencikiene et al., 2001). Diferentes combinações de subunidades de NF- κ B apresentam diferentes papéis na resposta imunológica. A transcrição de genes pró inflamatórios na via de sinalização clássica do NF- κ B é regulada pelo heterodímero p65/RelA-p50, enquanto que o dímero p50-p50 foi descrito por Sacconi et al., 2006 como anti-inflamatório, reprimindo a expressão de várias moléculas pró-inflamatórias. Neste estudo foi demonstrado que a expressão do gene da subunidade NF- κ B p65/RelA foi significativamente mais elevada em pacientes em tratamento de neoplasias, tanto os pacientes com pesos estável quanto caquéticos, em comparação com os controles, enquanto que a expressão do gene p50 foi semelhante em todos os grupos.

Estes resultados fornecem um indício prévio da presença de inflamação local aumentada, marcada pela transcrição de moléculas pró inflamatórias mediadas pelo heterodímero p65/RelA-p50, tais como PGE₂ e TNF- α .

O complexo de proteínas I κ k tem função primordial na ativação da via e é composto por três subunidades: I κ kAlfa, I κ kBeta e I κ kGama. I κ k é a proteína-quinase responsável pela fosforilação (marcação) do inibidor I κ B, e sua ativação se dá em resposta a diversos estímulos. Há forte evidência bioquímica e genética de que o complexo I κ k serve como o ponto focal para as vias de sinalização que são ativadas por TNF- α , vias que levam à ativação do NF- κ B (Karin, 2000).

Os resultados deste estudo mostram que os genes de I κ kAlfa e I κ kBeta estão significativamente mais expressos no grupo T, sugerindo que estes pacientes estão com a via de sinalização do NF- κ B ativada a um maior grau do que os outros grupos. O gene de I κ BAlfa (inibidora do NF- κ B) está também significativamente mais expresso nos mesmos pacientes (grupo T) e isto pode ser explicado, pelo menos em parte, pelo mecanismo através do qual a ativação de NF- κ B é encerrada. I κ BAlfa livre recém sintetizado pode se acumular em células nas quais as proteínas do complexo I κ k ainda estão ativas. O acúmulo de I κ BAlfa recém sintetizado, cuja transcrição está sob o controle de NF- κ B, é importante para o término da ativação do NF- κ B e o sequestro dos complexos de NF- κ B a partir do núcleo de volta para o citoplasma. (Le Bail et al., 1993). A proteína mais ativa na indução da expressão do inibidor I κ BAlfa é a subunidade p65/RelA (Le Bail et al., 1993). Sessenta minutos após a ativação da

via do NF- κ B pelo fator de necrose tumoral (TNF- α), a proteína I κ B α é ressintetizada a níveis aproximadamente duas vezes maiores do que os níveis em células controle e inibe completamente a ligação do NF- κ B à região promotora (Han et al., 1999). Isto representa um indicativo de que a via de sinalização do NF- κ B no momento da coleta do tecido na média das amostras dos pacientes do grupo T se encontrava no último passo de ativação, que é caracterizado por uma expressão elevada da proteína inibidora I κ B α , enquanto que a média das amostras do grupo caquético no momento da coleta do tecido se encontrava um passo a frente, caracterizado por uma expressão reduzida das moléculas da via em relação ao passo anterior, mas ainda uma expressão alta das moléculas de p65/RelA, última molécula a ter sua expressão reduzida.

A molécula de TNF- α desempenha um papel crucial no desenvolvimento e manutenção da caquexia (Argilés et al., 2003; Fearon et al., 2002). Seus níveis circulantes estão marcadamente alterados no plasma pacientes em até 6,5 vezes (Batista et al., 2012) e as fontes desta citocina são muitos tecidos e tipos de células (Argiles et al., 2011), incluindo o tecido adiposo branco (Lira et al., 2009).

O ensaio de gene reporter confirmou que o TNF- α altamente ativa a via de sinalização clássica do NF- κ B, tal como esperado (Nagasaki et al., 2012). A ativação promovida pela molécula de TNF- α foi de até 10 vezes maior quando comparado com as células controle e o estímulo de PGE₂, sugerindo que o TNF- α é de fato uma molécula essencial à manutenção do estado caquético, aumentando a ativação da via clássica de sinalização do NF- κ B, o que leva a um aumento da expressão de várias moléculas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α em si (Barnes et al., 1997). Por outro lado, a PGE₂, outro fator pró-inflamatório, cuja concentração está aumentada na caquexia (Argiles et al., 2003), não foi capaz de induzir a mesma resposta no modelo estudado. Considerando-se que o TNF- α altamente ativa a via de sinalização do NF- κ B e a subunidade principal na indução da expressão de moléculas pró-inflamatórias (p65/RelA) apresentou expressão gênica alterada em pacientes em tratamento de neoplasias, prosseguimos com o ensaio de ligação *ELISA Binding*, a fim de verificar a ligação das subunidades p50 e p65/RelA à região promotora (5'-GGGACTTCC-3').

Os resultados do ensaio realizado com amostras individualmente plaqueadas (20 μ g, C, grupo Controle; T, grupo Tumor peso estável e TC, grupo Tumor e caquéticos), e não como um *pool* de amostras, não apontam diferença significativa na ligação das subunidades

p50 e p65/RelA à região promotora (5'-GGGACTTTCC-3') do NF- κ B, porém, ao utilizarmos um *pool* de amostras por grupo (40 μ g, C, grupo Controle; T, grupo Tumor peso estável e TC, grupo Tumor e caquéticos), os resultados apontam para uma diferença significativa na ligação das proteínas p65/RelA e p50 (subunidades do NF- κ B que compõem o dímero responsável pela transcrição de citocinas pró-inflamatórias) à região promotora do DNA nos pacientes caquéticos, ressaltando um papel fundamental desta via de sinalização na indução do processo inflamatório nestes pacientes.

Essa diferença nos resultados dos ensaios de ligação das proteínas p65/RelA e p50 (amostras separadas e *pool* de amostras) pode ser explicada por três hipóteses:

A primeira, analisando o mecanismo pelo qual o TNF- α ativa a via de sinalização do NF- κ B. De acordo com Han et al., 1999, pelo menos três vias principais medeiam a resposta celular ao estímulo de TNF- α com a ativação da via de sinalização do NF- κ B, incluindo a via clássica de sinalização do NF- κ B. Trata-se de uma resposta rápida, dose dependente, que envolve a fosforilação e degradação proteossômica da proteína inibidora do NF- κ B, I κ B. A atividade do NF- κ B no núcleo celular atinge um pico dentro de 30 minutos após estímulo da molécula de TNF- α e, em seguida, cai rapidamente. No entanto, este estímulo transiente é suficiente para alterar a expressão gênica e causar alterações prolongadas nos níveis de RNAs mensageiros os quais genes são regulados pelo NF- κ B (Argiles et al., 2011).

Considerando-se que a atividade do NF- κ B tem uma rápida regulação positiva e depois decai rapidamente, é possível que, no momento da coleta dos tecidos, o pico de atividade nuclear do dímero p65/RelA e p50 tenha passado na maioria dos pacientes, enquanto no *pool* de amostras, um ou dois pacientes poderiam no momento da coleta apresentar-se no pico de ligação das subunidades p65/RelA e p50, aumentando assim a média do *pool*, a ponto de obtermos significância nos resultados.

A segunda hipótese seria o fato de apesar de o kit utilizado para o ensaio sugerir a utilização de 4 a 40 μ g de proteína por amostra, o mesmo teria sido sensível somente quando utilizou-se 40 μ g (*pool* de amostras por grupo), e quando utilizado 20 μ g (amostras separadas), a sensibilidade do mesmo teria sido afetada devido a baixa concentração das proteínas de interesse, influenciando assim o resultado obtido e mostrando a necessidade de aumentar a concentração proteica e rever a recomendação feita pelo kit.

A terceira hipótese seria o fato das cinco subunidades do NF- κ B competirem pelo mesmo sítio de ligação, e sendo assim, caso uma via alternativa do NF- κ B estivesse ativada

por um outro estímulo, as proteínas p52, Rel-B e C-Rel poderiam competir com p65/RelA e p50 pelo mesmo sítio de ligação ao DNA. Esta terceira hipótese foi testada ao ser analisada a proporção das proteínas que se ligaram à região promotora do DNA em um mesmo ensaio. Constatou-se que não houve diferença significativa na proporção das proteínas ligadas ao DNA entre os grupos, descartando assim esta hipótese.

Após a análise da literatura e dos resultados obtidos neste estudo, sabendo que na caquexia a alta taxa de lipólise descrita em vários estudos (Bing, 2011; Rydén, 2008) ocasiona um aumento da liberação de ácidos graxos livres (Bing, 2011) por este tecido, hipotetizamos que estes ácidos graxos, por sua vez, induzem a ativação de vias de sinalização inflamatórias tanto localmente como sistemicamente através da ligação à receptores de membrana (ex. *Toll like receptor 4*), assim como o recrutamento de células imunitárias para o tecido adiposo. As células recrutadas (infiltração de células imunitárias) secretariam citocinas pró-inflamatórias e seriam a principal fonte destas a partir do tecido adiposo, e sua liberação dessas moléculas se daria principalmente devido à indução da transcrição e tradução das mesmas mediada pela ativação da via clássica de sinalização do NF-κB, contribuindo deste modo com a elevada concentração sistêmica destas moléculas no quadro de caquexia.

As limitações deste estudo devem ser descritas. Não foram aferidas medidas de massa corporal magra dos pacientes, apesar de os mesmos apresentarem IMC similar. A Caquexia tem diferentes definições na literatura. A definição adotada neste estudo não inclui alguns dos efeitos específicos de tumores, anorexia e desnutrição. A perda de peso declarado foi o critério principal envolvido na classificação dos pacientes, seguido por cansaço e da concentração elevada do marcador inflamatório proteína C-Reativa no soro dos pacientes.

Outra limitação seria que alguns dos pacientes com câncer poderiam ser classificados como em estado de pré- caquexia, descrito por Argiles et al., 2011 e revisto por Fearon et al., 2011, onde algumas características, tais como alterações metabólicas podem ser observadas antes da perda de peso.

6 CONCLUSÃO

A expressão dos genes da via de sinalização clássica do NF- κ B está aumentada no tecido adiposo subcutâneo branco de pacientes em tratamento de neoplasias e serviria como um marcador precoce no diagnóstico da caquexia associada ao câncer, visto que alterações metabólicas no tecido adiposo são um evento prévio a caquexia. Biópsias de tecido adiposo subcutâneos proporcionariam uma ferramenta de diagnóstico mais confiável em comparação com os marcadores plasmáticos, que são detectados de forma tardia na progressão da doença como um reflexo do aumento da inflamação local.

REFERÊNCIAS¹

- Agustsson T, Wikrantz P, Rydén M, Brismar T, Isaksson B. Adipose tissue volume is decreased in recently diagnosed cancer patients with cachexia. *Nutrition*. 2012 Sep;28(9):851-5.
- Argilés JM, López-Soriano FJ, Busquets S. Novel approaches to the treatment of cachexia. *Drug Discov Today*. 2008 Jan;13(1-2):73-8.
- Argilés JM, Moore-Carrasco R, Fuster G, Busquets S, López-Soriano FJ. Cancer cachexia: the molecular mechanisms. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003 Apr;35(4):405-9.
- Argilés JM, Busquets S, García-Martínez C, López-Soriano FJ. Mediators involved in the cancer anorexia-cachexia syndrome: past, present, and future. *Nutrition*. 2005 Sep;21(9):977-85.
- Argilés JM, López-Soriano FJ, Toledo M, Betancourt A, Serpe R, Busquets S. The cachexia score (CASCO): a new tool for staging cachectic cancer patients. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2011 Jun;2(2):87-93.
- Argilés JM, Busquets S, López-Soriano FJ. Anti-inflammatory therapies in cancer cachexia. *Eur J Pharmacol*. 2011 Sep;668 (Suppl 1):S81-6.
- Arner P. Medicine. Lipases in cachexia. *Science*. 2011 Jul 8;333(6039):163-4.
- Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med*. 1997 Apr 10;336(15):1066-71.
- Batista ML Jr, Peres SB, McDonald ME, Alcantara PS, Olivan M, Otoch JP, Farmer SR, Seelaender M. Adipose tissue inflammation and cancer cachexia: possible role of nuclear transcription factors. *Cytokine*. 2012 Jan;57(1):9-16.
- Bing C. Lipid mobilization in cachexia: mechanisms and mediators. *Curr Opin Support Palliat Care*. 2011 Dec;5(4):356-60.
- Blum D, Strasser F. Cachexia assessment tools. *Curr Opin Support Palliat Care*. 2011 Dec;5(4):350-5.
- Costa G. Cachexia, the metabolic component of neoplastic diseases. *Cancer Res*. 1977 Jul;37(7 Pt 2):2327-35.

¹ De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>.

Evans WJ, Morley JE, Argilés J, Bales C, Baracos V, Guttridge D, Jatoi A, Kalantar-Zadeh K, Lochs H, Mantovani G, Marks D, Mitch WE, Muscaritoli M, Najand A, Ponikowski P, Rossi Fanelli F, Schambelan M, Schols A, Schuster M, Thomas D, Wolfe R, Anker SD. Cachexia: A new definition. *Clin Nutr*. 2008 Dec;27(6):793-9.

Fearon KC, Moses AG. Cancer cachexia. *Int J Cardiol*. 2002 Sep;85(1):73-81.

Fearon KC, Voss AC, Hustead DS. Definition of cancer cachexia: effect of weight loss, reduced food intake, and systemic inflammation on functional status and prognosis. *Am J Clin Nutr* 2006; 83:1345–50.

Fearon K, Strasser F, Anker SD, Bosaeus I, Bruera E, Fainsinger RL, Jatoi A, Loprinzi C, MacDonald N, Mantovani G, Davis M, Muscaritoli M, Ottery F, Radbruch L, Ravasco P, Walsh D, Wilcock A, Kaasa S, Baracos VE. Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. *Lancet Oncol*. 2011 May;12(5):489-95.

Fong YC, Maa MC, Tsai FJ, Chen WC, Lin JG, Jeng LB, Yang RS, Fu WM, Tang CH. Osteoblast-derived TGF-beta1 stimulates IL-8 release through AP-1 and NF-kappaB in human cancer cells. *J Bone Miner Res*. 2008 Jun;23(6):961-70.

Forrest LM, McMillan DC, McArdle CS, et al. Evaluation of cumulative prognostic scores based on the systemic inflammatory response in patients with inoperable nonsmall-cell lung cancer. *Br J Cancer* 2003; 89:1028–30.

Fraser CC. Exploring the positive and negative consequences of NF-kappaB inhibition for the treatment of human disease. *Cell Cycle*. 2006 Jun;5(11):1160-3.

Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 1999; 340:448–54.

Garg A, Aggarwal, BB. Nuclear transcription factor-κB as a target for cancer drug development. *Leukemia* 2002 16: 1053–68.

Greten FR, Arkan MC, Bollrath J, Hsu LC, Goode J, Miething C, Göktuna SI, Neuenhahn M, Fierer J, Paxian S, Van Rooijen N, Xu Y, O'Cain T, Jaffee BB, Busch DH, Duyster J, Schmid RM, Eckmann L, Karin M. NF-kappaB is a negative regulator of IL-1beta secretion as revealed by genetic and pharmacological inhibition of IKKbeta. *Cell*. 2007 Sep 7;130(5):918-31.

Han Y, Meng T, Murray NR, Fields AP, Brasier AR. Interleukin-1-induced nuclear factor-kappaB-IkappaBalpha autoregulatory feedback loop in hepatocytes. A role for protein kinase calpha in post-transcriptional regulation of ikappabalpha resynthesis. *J Biol Chem*. 1999 Jan 8;274(2):939-47.

Instituto Nacional do Câncer. TNM: classificação de tumores malignos. 6. ed. Rio de Janeiro, 2004. 254 p. Traduzido por. Ana Lúcia Amaral Eisenberg.

Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Polychronidis A, Pitiakoudis M, Bounovas A, Simopoulos K. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha and nutritional status in pancreatic cancer patients. *Anticancer Res.* 2001 Mar-Apr;21(2B):1355-8

Karin M, Delhase M. The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signalling. *Semin Immunol.* 2000 Feb;12(1):85-98.

Kastenbauer S, Ziegler-Heitbrock HW. NF-kappaB1 (p50) is upregulated in lipopolysaccharide tolerance and can block tumor necrosis factor gene expression. *Infect Immun.* 1999 Apr;67(4):1553-9.

Kawamura I, Morishita R, Tomita N, Lacey E, Aketa M, Tsujimoto S, Manda T, Tomoi M, Kida I, Higaki J, Kaneda Y, Shimomura K, Ogihara T. Intratumoral injection of oligonucleotides to the NF kappa B binding site inhibits cachexia in a mouse tumor model. *Gene Ther.* 1999 Jan;6(1):91-7.

Kumar NB, Kazi A, Smith T, Crocker T, Yu D, Reich RR, Reddy K, Hastings S, Exterman M, Balducci L, Dalton K, Bepler G. Cancer cachexia: traditional therapies and novel molecular mechanism-based approaches to treatment. *Curr Treat Options Oncol.* 2010 Dec;11(3-4):107-17.

Kuroda K, Horiguchi Y, Nakashima J, Kikuchi E, Kanao K, Miyajima A, Ohigashi T, Umezawa K, Murai M. Prevention of cancer cachexia by a novel nuclear factor {kappa}B inhibitor in prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2005 Aug 1;11(15):5590-4.

Lago F, Dieguez C, Gómez-Reino J, Gualillo O. Adipokines as emerging mediators of immune response and inflammation. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2007 Dec;3(12):716-24.

Langin D, Arner P, Rydén M. NF-kappaB is important for TNF-alpha-induced lipolysis in human adipocytes. *J Lipid Res.* 2007 May;48(5):1069-77.

Lappas M, Yee K, Permezel M, Rice GE. Sulfasalazine and BAY 11-7082 interfere with the nuclear factor-kappa B and I kappa B kinase pathway to regulate the release of proinflammatory cytokines from human adipose tissue and skeletal muscle in vitro. *Endocrinology.* 2005 Mar;146(3):1491-7.

Laviano A, Seelaender M, Rianda S, Silverio R, Rossi Fanelli F. Neuroinflammation: a contributing factor to the pathogenesis of cancer cachexia. *Crit Rev Oncog.* 2012;17(3):247-52.

Laurencikiene J, van Harmelen V, Arvidsson Nordström E, Dicker A, Blomqvist L, Näslund E, Lawrence T, Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willoughby DA. Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation. *Nat Med.* 2001 Dec;7(12):1291-7.

Lawrence T, Fong C. The resolution of inflammation: anti-inflammatory roles for NF-kappaB. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010 Apr;42(4):519-23.

Le Bail O, Schmidt-Ullrich R, Israël A. Promoter analysis of the gene encoding the I kappa B-alpha/MAD3 inhibitor of NF-kappa B: positive regulation by members of the rel/NF-kappa B family. *EMBO J*. 1993 Dec 15;12(13):5043-9.

Lira FS, Rosa JC, Zanchi NE, Yamashita AS, Lopes RD, Lopes AC, Batista ML, Seelaender M. Regulation of inflammation in the adipose tissue in cancer cachexia: effect of exercise. *Cell Biochem Funct*. 2009; 27: 71–5.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8.

Lundholm K, Daneryd P, Körner U, Hyltander A, Bosaeus I. Evidence that long-term COX-treatment improves energy homeostasis and body composition in cancer patients with progressive cachexia. *Int J Oncol*. 2004 Mar;24(3):505-12.

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 Dec;318(3):503-14. Epub 2004 Oct 15.

McCarthy DO. Rethinking nutritional support for persons with cancer cachexia. *Biol Res Nurs*. 2003 Jul;5(1):3-17.

McMillan DC. An inflammation-based prognostic score and its role in the nutrition-based management of patients with cancer. *Proc Nutr Soc* 2008; 67:257–62.

McMillan DC. Systemic inflammation, nutritional status and survival in patients with cancer. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2009 May;12(3):223-6.

Mariani L, Lo Vullo S, Bozzetti F; SCRINIO Working Group. Weight loss in cancer patients: a plea for a better awareness of the issue. *Support Care Cancer*. 2012 Feb;20(2):301-9.

Marsik C, Kazemi-Shirazi L, Schickbauer T, et al. C-reactive protein and allcause mortality in a large hospital-based cohort. *Clin Chem* 2008; 54:343–49.

Mohamed MR, McFadden G. NFkB inhibitors: strategies from poxviruses. *Cell Cycle*. 2009 Oct 1;8(19):3125-32.

Nagasaki H, Yoshimura T, Aoki N. Real-time monitoring of inflammation status in 3T3-L1 adipocytes possessing a secretory Gaussia luciferase gene under the control of nuclear factor-kappa B response element. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Apr 13;420(3):623-7.

Nascimento, S. Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica Real time PCR and RT-PCR technology and its applications in the medicine Field. *RBM*. 2010 Nov;7-19.

Pajak B, Orzechowska S, Pijet B, Pijet M, Pogorzelska A, Gajkowska B, Orzechowski A. Crossroads of cytokine signaling – the chase to stop muscle cachexia. *Journal Of Physiology and Pharmacology*. 2008;59 Suppl 9:251-64.

Rebeca R, Bracht L, Noleto GR, Martinez GR, Cadena SM, Carnieri EG, Rocha ME, de Oliveira MB. Production of cachexia mediators by Walker 256 cells from ascitic tumors. *Cell Biochem Funct*. 2008 Aug;26(6):731-8.

Rydén M, Agustsson T, Laurencikiene J, Britton T, Sjölin E, Isaksson B, Permert J, Arner P. Lipolysis--not inflammation, cell death, or lipogenesis--is involved in adipose tissue loss in cancer cachexia. *Cancer*. 2008 Oct 1;113(7):1695-704.

Saccani A, Schioppa T, Porta C, Biswas SK, Nebuloni M, Vago L, Bottazzi B, Colombo MP, Mantovani A, Sica A. p50 nuclear factor-kappaB overexpression in tumor-associated macrophages inhibits M1 inflammatory responses and antitumor resistance. *Cancer Res*. 2006 Dec 1;66(23):11432-40.

Schwartz SA, Hernandez A, Mark Evers B. The role of NF-kappaB/IkappaB proteins in cancer: implications for novel treatment strategies. *Surg Oncol*. 1999 Nov;8(3):143-53.

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 Aug;31(4):562-6.

Seelaender MC, Kazantzis M, Costa Rosa LF. The effect of adrenaline and Walker-256 tumour-induced cachexia upon Kupffer cell metabolism. *Cell Biochem Funct*. 1999 Sep;17(3):151-6.

Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell*. 1986 Dec 26;47(6):921-8

Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr*. 2004 Sep;92(3):347-55.

von Haehling S, Genth-Zotz S, Anker SD, Volk HD. Cachexia: a therapeutic approach beyond cytokine antagonism. *Int J Cardiol*. 2002 Sep;85(1):173-83.

Wang T, Zhang X, Li JJ. The role of NF-kappaB in the regulation of cell stress responses. *Int Immunopharmacol*. 2002 Oct;2(11):1509-20.

Wang W, Andersson M, Lönnroth C, Svanberg E, Lundholm K. Anorexia and cachexia in prostaglandin EP1 and EP3 subtype receptor knockout mice bearing a tumor with high intrinsic PGE2 production and prostaglandin related cachexia. *J Exp Clin Cancer Res*. 2005 Mar;24(1):99-107.

Wu D, Ren Z, Pae M, Guo W, Cui X, Merrill AH, Meydani SN. Aging up-regulates expression of inflammatory mediators in mouse adipose tissue. *J Immunol*. 2007 Oct 1;179(7):4829-39.

Zhou W, Jiang ZW, Tian J, Jiang J, Li N, Li JS. Role of NF-kappaB and cytokine in experimental cancer cachexia. *World J Gastroenterol*. 2003 Jul;9(7):1567-70.

ANEXO – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

TCLE versão Final 17.02.2012

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ESTUDO: Influência das citocinas pró- e antiinflamatórias no tecido adiposo branco. Possível interação adipócito e infiltrado mononuclear.

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 o nome, profissão, residente e domiciliado na, telefone)

.....

....., portador da Cédula de identidade, RG , e inscrito no CPF/MF..... nascido(a) em ____ / ____ / ____ , abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade em participar como voluntário(a) do estudo “**Influência das citocinas pró- e anti-inflamatórias no tecido adiposo branco. Possível interação entre o adipócito e o infiltrado mononuclear**”. Declaro que obtive todas as informações necessárias, bem como todos os eventuais esclarecimentos quanto às dúvidas por mim apresentadas.

Estou ciente que:

I) O estudo se faz necessário para que se possam descobrir as possíveis causas da síndrome denominada caquexia (síndrome caracterizada pela grande perda de peso, força muscular e diminuição do apetite). Será utilizado o sangue e o tecido adiposo branco (localizado subcutaneamente e no omento) para as análises. Esses materiais coletados demonstram-se importantes para o entendimento da etiologia do processo de caquexia. A pesquisa terá duração total de quatro anos, sendo sua participação pontual, ou seja, apenas no ato cirúrgico;

II) Será feita **uma** coleta de **20 mL** de **sangue**, no momento do ato cirúrgico, dentro do procedimento de acesso venoso do ato anestésico;

III) Essa coleta será feita apenas para este estudo, em nada influenciará o tratamento e não modificará o procedimento anestésico e cirúrgico;

IV) No dia da internação hospitalar do paciente será realizada coleta de fezes; e durante o procedimento cirúrgico será retirado fragmentos de aproximadamente **um grama** por tecido (**tecido adiposo branco de subcutâneo e de omento**, ou seja, tecido adiposo localizado subcutaneamente e no omento, respectivamente; **fígado e músculo reto do abdome**), com tempo total de coleta de aproximadamente 5 minutos. Esse procedimento possui um grau de risco mínimo, não interferindo nos procedimentos padrões da cirurgia;

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____ Rubrica do pesquisador _____

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 pecuniária com relação aos procedimentos médico-clínico-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 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.

IX. 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: _____

Profª Dra. Marília Cerqueira Leite Seelaender

Instituto de Ciências Biomédicas I

Telefone para contato: 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: cep@hu.usp.br