Daniela Mendes dos Reis Riccardi

**PERFIL LIPÍDICO E INFLAMAÇÃO SISTÊMICA
NA 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

2015

Daniela Mendes dos Reis Riccardi

**PERFIL LIPÍDICO E INFLAMAÇÃO SISTÊMICA
NA CAQUEXIA ASSOCIADA AO CÂNCER**

Dissertação apresentada ao Departamento de
Biologia Celular e do Desenvolvimento 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

2015

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

© reprodução total

Riccardi, Daniela Mendes dos Reis.

Perfil lipídico e inflamação sistêmica na caquexia associada ao
câncer / Daniela Mendes dos Reis Riccardi. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Marília Cerqueira Leite Seelaender.

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

Versão do título para o inglês: Lipid profile and systemic inflammation
in cancer cachexia.

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

ICB/SBIB0109/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Daniela Mendes dos Reis Riccardi.

Título da Dissertação: Perfil lipídico e inflamação sistêmica na 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 Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 05 de junho de 2013.

PARECER 1117/CEP

A Comissão de *Ética em Pesquisas em Seres Humanos* do ICB, nesta data **APROVOU** o projeto intitulado: "*Heterogeneidade do tecido adiposo na caquexia: perfil Lipídico dos depósitos subcutâneo e visceral em Pacientes com câncer*" da pesquisadora **MARÍLIA CERQUEIRA LEITE SEELAENDER** e aluno **DANIELA MENDES DOS REIS RICCARDI**.

Cabe os Pesquisadores executante 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. conforme modelo constante no *site.icb.usp.br*.

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

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **05.06.2014**.

Atenciosamente,

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

São Paulo, 28 de julho de 2014.

Ilmo(a). Sr(a).

Profa. Dra. Marília Cerqueira Leite Seelaender

Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento

Instituto de Ciências Biomédicas I

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

REFERENTE: **Projeto de Pesquisa** "Heterogeneidade do tecido adiposo na caquexia: perfil lipídico dos depósitos subcutâneo e visceral em pacientes com câncer"

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

Equipe de Pesquisa: Daniela Riccardi, Paulo Sergio Martins de Alcântara

CAAE: 14197413.9.0000.5467

Registro CEP-HU/USP: 1388/14

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em reunião ordinária realizada no dia 25 de julho de 2014, analisou o Projeto de Pesquisa acima citado, considerando-o como **APROVADO**, bem como o seu **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**.

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

O primeiro relatório está previsto para 26 de janeiro de 2015.

Atenciosamente,

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

Se você quer ir rápido, vá sozinho.
Se você quer ir longe, vá em grupo.

AGRADECIMENTOS

A todos os colegas de laboratório, em especial Rodrigo Xavier das Neves, Emídio Matos, Raquel Galvão, Katrin Radloff, Michele Alves, Rodolfo Camargo e Joanna Carola, que ajudaram de alguma forma para a conclusão desta dissertação. À 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 iniciais, aos professores, que ministraram as disciplinas que me engrandeceram a ponto de eu me sentir madura o suficiente para me tornar professora, à Sra. Rosana Duarte Prisco, que fez de seu conhecimento em estatística a ferramenta certa para analisar com segurança e eficiência os resultados desse trabalho, em especial à minha co-orientadora, professora Dra. Alison Colquhoun e à minha orientadora, professora Dra. Marília Cerqueira Leite Seelaender, que depositaram e depositam confiança em meu trabalho e acreditaram no projeto desde o início, enriquecendo-me com conteúdo não somente científicos, mas também me preparando para a vida profissional.

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

À FAPESP (Proc. Nº 2013/17178-7) e ao CNPq (Proc. 134524/2013-6) pelo auxílio financeiro.

À minha família e amigos, em especial à minha filha Fernanda Riccardi Pereira, aos meus pais Hélio Riccardi e Maria Luiza Mendes dos Reis, meus irmãos Andrea, Fernando, Fabio e Júlia Riccardi, ao meu padrasto Odilon Basílio e minha madrastra Cristina Hutado e ao meu noivo Rodrigo Xavier das Neves, que souberam aconselhar-me nos momentos mais difíceis e depositaram toda confiança para que este sonho se tornasse realidade. Essa dissertação e título também são de vocês!

“Meu limite não é definido pelo que eu sei, ou pelo que eu posso, mas pelo que quero e pelos meus sonhos" (Autor desconhecido).

RESUMO

Riccardi DMR. Perfil lipídico e inflamação sistêmica na caquexia associada ao câncer[dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

A caquexia associada ao câncer, cujo o sintoma mais notável é a severa e rápida perda de peso, afeta cerca de 80% dos pacientes com câncer avançado e constitui causa direta de morte em 22 a 40% dos casos. Estudos recentes mostraram que os mediadores inflamatórios têm um papel importante no desenvolvimento de caquexia, considerada uma doença inflamatória crônica. Um possível contribuinte é o tecido adiposo branco (TAB), que sofre alterações, como reorganização morfológica e aumento da lipólise, liberando ácidos graxos livres (AGL), que por sua vez, potencialmente acentuam a produção de citocinas pró-inflamatórias. O objetivo do presente estudo foi conhecer o perfil de lipídico plasmático dos pacientes, correlacionar a composição de AGL com marcadores inflamatórios e estabelecer se os AGL liberados pelos adipócitos na caquexia deflagram e/ou contribuem para a inflamação local e sistêmica. O estudo envolveu 113 pacientes divididos em 3 grupos: controle (N), câncer sem caquexia (WSC) e câncer com caquexia (CC). O grupo CC foi composto por pacientes com perda de peso não intencional superior a 5% nos últimos 6 meses e no mínimo, três dos cinco critérios utilizados para a classificação da caquexia; o grupo WSC foi composto por pacientes em tratamento para câncer, sem perda de peso > 5% nos últimos 6 meses. A composição do perfil plasmático de AGL apresentou diferença significativa entre os grupos e correlacionou-se positivamente com a expressão proteica de citocinas pró-inflamatórias no plasma, em CC. As alterações encontradas no plasma de CC caracterizam inflamação sistêmica e áquelas na porcentagem relativa de diferentes AGL sugerem que o perfil lipídico tem papel na manutenção e desenvolvimento de processos inflamatórios que culminam no processo crônico da caquexia.

Palavras-chave: Caquexia. Tecido adiposo. Ácidos graxos. Inflamação.

ABSTRACT

Riccardi DMR. Lipid profile and systemic inflammation in cancer cachexia [Master's thesis (Cellular and Tissue Biology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

Cancer cachexia, whose most notable symptom is severe and fast weight loss, affects about 80% of patients with advanced cancer and is the direct cause of death in 22 to 40% of the cases. Recent studies have shown that inflammatory mediators play an important role in the development of cachexia, which is considered a chronic inflammatory disease. The white adipose tissue (TAB) is a contributor to inflammation as it undergoes morphological reorganization and increased lipolysis, releasing free fatty acids (AGL), which, in turn, accentuate the production of pro-inflammatory cytokines. The aim of this study was to characterize the plasma lipid profile of patients and correlate the composition of AGL with inflammatory markers; finally we sought to establish whether the fatty acids released by adipocytes trigger and/ or contribute to local and systemic inflammation in cachexia. This study included 122 patients divided into 3 groups: control (N); weight stable cancer (WSC); and cancer cachexia (CC). CC was composed of patients with unintentional weight loss greater than 5% in the last six months and at least three of the five criteria employed to classify cachexia; WSC was composed of patients undergoing cancer treatment without weight loss greater than 5% in the last six months. The plasma AGL profile was significantly different between the groups and was positively correlated with protein expression of pro-inflammatory cytokines of CC. The changes in CC plasma characterize systemic inflammation and changes in the AGL percentage suggest that the lipid profile plays role in maintaining the inflammatory processes that culminate in chronic cachexia.

Keywords: Cachexia. Adipose tissue. Fatty acids. Inflammation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 –Estágios da Caquexia associada ao câncer	19
FIGURA 2 –Fluxograma da seleção dos pacientes	30
FIGURA 3 –Critérios para diagnóstico da Caquexia	33
FIGURA 4 –Expressão gênica das citocinas IL-1 β (A) e TNF- α (B) do tecido adiposo subcutâneo	37
FIGURA 5 – Expressão proteica de citocinas do plasma.....	40
FIGURA 6 –Expressão proteica de citocinas do tecido adiposo subcutâneo.....	41
FIGURA 7 –Expressão proteica de citocinas do tecido adiposo visceral	42
FIGURA 8 –Expressão proteica de citocinas do tecido adiposo visceral	46

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Lista de <i>Primers</i> utilizados	28
TABELA 2 – Característica dos pacientes	31
TABELA 3 – Dados bioquímicos dos pacientes	33
TABELA 4 – Perfil lipídico sanguíneo dos pacientes	34
TABELA 5 – Perfil (porcentagem relativa) de ácidos graxos do plasma dos pacientes	35
TABELA 6 – Perfil (porcentagem relativa) dos diferentes grupos de ácidos graxos do plasma.....	36
TABELA 7 – Expressão gênica de citocinas do tecido adiposo subcutâneo.....	37
TABELA 8 – Expressão gênica de citocinas do tecido adiposo visceral	38
TABELA 9 – Expressão proteica de citocinas do plasma dos pacientes.....	39
TABELA 10 – Expressão proteica de citocinas do tecido adiposo subcutâneo	40
TABELA 11 – Expressão proteica de citocinas do tecido adiposo visceral.....	41
TABELA 12 – Corelação da porcentagem de ácidos graxos no plasma, agrupados conforme sua classificação, e expressão proteica de marcadores inflamatórios de pacientes no grupo controle (N).	64
TABELA 13 – Corelação da porcentagem de ácidos graxos no plasma, agrupados conforme sua classificação, e expressão proteica de marcadores inflamatórios de pacientes no grupo câncer sem caquexia (WSC).	65
TABELA 14 – Corelação da porcentagem de ácidos graxos no plasma, agrupados conforme sua classificação, e expressão proteica de marcadores inflamatórios de pacientes no grupo câncer com caquexia (CC).	66
TABELA 15 – Corelação da porcentagem de ácidos graxos no plasma, individualmente, e expressão proteica de marcadores inflamatórios de pacientes no grupo controle (N).....	67
TABELA 16 – Corelação da porcentagem de ácidos graxos no plasma, individualmente, e expressão proteica de marcadores inflamatórios de pacientes no grupo câncer sem caquexia (WSC).....	68

TABELA 17 – Corelação da porcentagem de ácidos graxos no plasma, individualmente, e expressão proteica de marcadores inflamatórios de pacientes no grupo câncer com caquexia (CC).	69
TABELA 18 – Corelação da expressão proteica de marcadores inflamatórios no plasma de pacientes no grupo controle (N).	70
TABELA 19 – Corelação da expressão proteica de marcadores inflamatórios no plasma de pacientes no grupo câncer sem caquexia (WSC).....	71
TABELA 20 – Corelação da expressão proteica de marcadores inflamatórios no plasma de pacientes no grupo câncer com caquexia (CC).	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Δ	Delta
AA	Ácido araquidônico
AGL	Ácidos graxos livres
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ALA	Ácido alfa-linoleico
ATGL	Lipase de triacilglicerol do tecido adiposo
CC	Câncer com caquexia
CCL2	Proteínas quimioatraentes de monócitos 1
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CEP	Comitê de ética e pesquisa
Ct	Limiar de ciclagem
DGLA	Ácido dihomogama linoleico
DNA	Ácido desoxinucleico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético (tipo de anticoagulante)
EPA	Ácido eicosapentanoico
GC	Cromatografia a gás
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HU/USP	Hospital Universitário da Universidade de São Paulo
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IL-1ra	Receptor antagonista de interleucina 1
IMC	Índice de massa corporal
LA	Ácido linoleico
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LHS	Lipase hormôniosensível
MØ	Macrófagos
MS	Espectrometria de massa
MUFA	Ácido graxo monoinsaturado
N	Controle
n-3	Ômega-3
n-6	Ômega-6
OMS	Organização mundial de saúde

PCR	Proteína C-reativa
PUFA	Ácidos graxos poliinsaturados
qRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
RPL-27	Proteína ribossomal L27
RT	Transcrição reversa
SFA	Ácidos graxos saturados
sIL-6R	Receptor solúvel de Interleucina 6
sTNFR	Receptor solúvel de fator de necrose tumoral alfa
TAB	Tecido adiposo branco
TAG	Triacilglicerol
TASC	Tecido adiposo subcutâneo
TAVC	Tecido adiposo visceral
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TLR	Receptor <i>Toll-like</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
U.A.	Unidade arbitrária
WSC	Câncer sem caquexia
ZAG	Glicoproteína Zinc- α_2

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	A caquexia associada ao câncer	18
1.2	O tecido adiposo branco e a inflamação	19
1.3	Hipótese e justificativa	22
2	OBJETIVOS	23
2.1	Geral	23
2.2	Específicos	23
3	CAUSUÍSTICA E MÉTODOS	24
3.1	Recrutamento de pacientes	24
3.2	Aprovação no comitê de ética	24
3.3	Crítérios de inclusão	24
3.4	Crítérios de diagnóstico de caquexia	25
3.5	Termo de consentimento e avaliação clínica	25
3.6	Coleta de sangue e análise de parâmetros bioquímicos	25
3.7	Obtenção de tecido adiposo	26
3.8	Experimentos	26
3.8.1	Análises bioquímicas	26
3.8.2	Identificação dos ácidos graxos por Cromatografia a Gás (GC) e análise por Espectrometria de Massa (MS)	26
3.8.3	Quantificação do RNAm.	27
3.8.4	Aferição do conteúdo proteico tecidual e plasmático de citocinas pró e anti-inflamatórias.	28
3.9	Análise estatística	29
4	RESULTADOS	30
4.1	Achados clínicos	30
4.2	Perfil lipídico sanguíneo dos pacientes	33
4.3	Perfil de ácidos graxos no plasma dos pacientes	34
4.4	Expressão gênica no tecido adiposo	36
4.5	Expressão proteica de citocinas no plasma e no tecido adiposo	38
4.5.1	Expressão proteica no plasma	38
4.5.2	Expressão proteica no TASC	38
4.5.3	Expressão proteica no TAVC	38
4.6	Correlação do perfil de ácidos graxos e expressão proteica de marcadores inflamatórios no plasma dos pacientes	42

4.6.1 Correlação entre o perfil de ácido graxo e marcadores inflamatórios	42
4.6.2 Correlação entre os marcadores inflamatórios	42
5 DISCUSSÃO	44
6 CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS*	51
ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	59
ANEXO B – Questionário de qualidade de vida - EORTC QLC-C30	61
ANEXO C – Questionário de anorexia – FAACT-ESPEN.....	63
ANEXO D – Tabelas de correlação entre perfil de ácidos graxos e marcadores inflamatórios...	64
ANEXO E – Artigo Publicado.....	73

1 INTRODUÇÃO

1.1 A caquexia associada ao câncer

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é a segunda maior causa de mortalidade em todo mundo, atrás apenas das doenças cardiovasculares. No Brasil, os dados epidemiológicos também indicam que o câncer representa a segunda maior causa de morte (Duval et al., 2010).

Aproximadamente 80% dos pacientes com câncer em estágio avançado sofrem da síndrome da caquexia, responsável direta pela morte de cerca de 22 a 40% destes (Evans et al., 2008; Fearon et al., 2006). O termo “caquexia” se origina da expressão grega “*kakos*” e “*hexis*”, significando, etimologicamente, “mau estado”. Trata-se de uma condição que, embora seja mais estudada no câncer, atinge também pacientes com falência cardíaca congestiva, com moléstias digestivas, defeitos tubulares renais, queimaduras, sepse e AIDS (do inglês – *acquired immunodeficiency syndrome*) (Argilés et al., 2010). A caquexia é uma síndrome multifatorial, na qual há perda progressiva e involuntária de massa corporal (acompanhada frequentemente de perda de massa gorda), que não pode ser totalmente revertida pela terapia nutricional convencional, levando à deterioração progressiva do organismo (Muscaritoli et al., 2010). Em detrimento de sua importância clínica, a síndrome é subdiagnosticada e, consequentemente, raramente tratada (Evans et al., 2008; Fox et al., 2009; Springer et al., 2006).

Na tentativa de melhor definir critérios de diagnóstico para a caquexia, o Consenso Brasileiro de Caquexia e Anorexia (2011) apresenta, seguindo as recomendações do Consenso Internacional (Fearon et al., 2011), como características principais da síndrome: perda involuntária de peso superior a 5%, ou de 2% em indivíduos com o índice de massa corporal (IMC) $< 20 \text{ kg/m}^2$, ou presença de sarcopenia. A caquexia pode ainda ser classificada quanto à gravidade em: pré-caquexia, caquexia e caquexia refratária (Figura 1). O primeiro estágio é concebido como aquele no qual o paciente apresenta perda de peso igual ou superior a 5%, anorexia e alterações metabólicas; no segundo estágio, considera-se a perda de peso igual ou superior a 5%, ou de 2%, com IMC $< 20 \text{ kg/m}^2$, ou sarcopenia acompanhada de perda de peso corporal equivalente ou superior a 2%. Os consensos, nacional e internacional, reforçam ainda a presença frequente de anorexia e de inflamação sistêmica. Finalmente, o terceiro estágio (caquexia refratária) inclui os pacientes com diferentes graus de caquexia, mas nos quais há intenso catabolismo e ineficácia do tratamento contra o câncer. Ainda nesse estágio, pacientes

com baixo escore de desempenho funcional e sobrevida esperada inferior a três meses, devem ser incluídos (Fearon et al., 2011).

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

Entre as manifestações clínicas relacionadas à síndrome, a perda de peso e, frequentemente, de apetite são normalmente os primeiros sintomas percebidos pelo paciente. Inclui-se ainda alterações no paladar, astenia, fadiga, perda da competência imunitária, perda de habilidades motoras e físicas, apatia, desequilíbrio iônico, anemia, náuseas e grandes alterações no metabolismo de proteínas, carboidratos e lipídios (Tan, Fearon, 2008).

Embora hajam descrições de indivíduos caquéticos há 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 para diagnosticar a caquexia (Seelaender et al., 2012) e, finalmente, não há terapia conhecida que a reverta completamente (Argilés et al., 2008; von Haehling et al., 2002). Um crescente campo de evidências científicas, compilado a partir dos estudos em modelos experimentais de caquexia e em seres humanos, demonstra que a adoção de estratégias para combater a inflamação sistêmica crônica atenuam a caquexia (Argilés et al., 2011). Portanto a inflamação sistêmica pode ser considerada o denominador comum das muitas consequências clínicas e metabólicas do quadro.

1.2 O tecido adiposo branco e a inflamação

Em 1994, com a descoberta da leptina, o tecido adiposo branco (TAB) passou a ser considerado não somente um compartimento de armazenamento de energia, sob forma de triacilglicerol (TAG), protetor mecânico e isolante térmico, mas também um órgão

multifuncional, com importante contribuição no desenvolvimento de doenças inflamatórias sistêmicas crônicas (Trayhurn, Wood, 2004).

Hoje, sabe-se que o TAB secreta mais de 100 citocinas pró-inflamatórias (Batista Jr et al., 2012), como o fator de necrose tumoral (TNF)- α , a interleucina (IL)-6, a IL-1 β , o interferon (IFN)- γ e, ainda citocinas anti-inflamatórias, como o receptor solúvel de TNF- α (sTNFR), o receptor solúvel de IL-6 (sIL-6R), o receptor antagonista de IL-1 (IL-1ra), a IL-4, a IL-10 e a IL-15 (Argilés et al., 2009). Estudos do nosso grupo de pesquisa (Batista Jr et al., 2013; Bertevello, Seelaender, 2001; Kazantzis, Seelaender, 2005; Lira et al. 2010; Machado et al., 2004) mostraram que realmente, tanto em animais como em seres humanos, o TAB é uma importante fonte de fatores de inflamação na caquexia e, portanto, possível contribuinte para a deflagração e manutenção da inflamação sistêmica associada à síndrome.

Atualmente, o TAB é considerado um participante ativo na regulação dos processos fisiológicos e patológicos, incluindo a regulação da imunidade e inflamação (Fantuzzi, 2005). Já está bem estabelecido que na obesidade, uma condição de inflamação sistêmica crônica, fatores secretados pelos adipócitos, como a proteína quimioatraente de monócitos (CCL2), aumentam o recrutamento de monócitos, que irão se diferenciar para macrófagos (M ϕ), e que a função secretora do TAB é potencializada a partir desta maior infiltração (Itoh et al., 2011; Kanda et al., 2006). Corroborando esses estudos, Machado et al. (2004), demonstraram que o TAB de ratos portadores de tumor Walker 256 apresenta maior infiltração de macrófagos. Além disso, outro estudo encontrou diferenças tanto no tipo, como na quantidade de moléculas secretadas por células infiltrantes nos diferentes depósitos do TAB de humanos saudáveis (Peinado et al., 2010).

Paralelamente à inflamação, há exacerbada lipólise, regulada pela lipase hormônio sensível (LHS) e pela lipase de triacilglicerol do tecido adiposo (ATGL) (Bing, 2011), enzimas sob o controle de citocinas pró-inflamatórias tais como IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ (Argilés et al., 2009). O resultado da ação catalítica dessas enzimas é a liberação de ácidos graxos livre (AGL). Estudos do nosso grupo (Seelaender, 1995; Silvério, 2012) constataram que a atividade das enzimas LHS e ATGL está aumentada na caquexia humana.

Enquanto certos fatores estimulam a via lipolítica, produtos da lipólise medeiam a inflamação no tecido adiposo (Suganami et al., 2005). A partir de experimentos de co-cultura de adipócitos e macrófagos, Suganami et al., (2007) mostraram que os AGL liberados pela lipólise ativam macrófagos e as vias inflamatórias. Outros estudos têm mostrado que os AGL são ligantes de receptores relacionados ao sistema imune inato, como o receptor do tipo *Toll-like* (TRL)-4, acarretando em uma maior produção de citocinas pró inflamatórias (Lee et al.,

2003; Vitseva et al., 2008). Recentemente, o nosso grupo (Ribeiro, 2012) observou aumento da expressão dos genes de proteínas relacionadas a esta via em TAB de pacientes com caquexia associada ao câncer.

Embora a quantidade desses AGL provenientes da lipólise aumentada seja capaz de modular vários processos metabólicos e de regulação molecular, o tipo específico de ácido graxo desempenha um papel significativo na ativação de mediadores inflamatórios (Costa et al., 2011). Assim, os ácidos graxos saturados (SFA - do inglês, *saturated fatty acids*) e os poliinsaturados (PUFA – do inglês, *polyunsaturated fatty acids*) da classe omega 6 (n-6) parecem estar mais relacionados com a expressão de fatores pró-inflamatórios (Kremmyda et al., 2011). Em modelos de roedores com inibição de desaturase $\Delta 5/\Delta 6$, houve uma diminuição acentuada da inflamação correlacionada com a diminuição de ácido araquidônico (AA, 20:4n6) no fígado, no plasma e nas células peritoneais (Obukowicz et al., 1998), redução da síntese de eicosanóides mediados por AA, bem como das vias de sinalização que regulam respostas inflamatórias (Dwyer et al., 2004; Obukowicz et al., 1998).

Em contrapartida, os PUFA da classe omega 3 (n-3) têm sido amplamente relacionados a efeitos anti-inflamatórios em uma gama de doenças e condições inflamatórias crônicas, incluindo a artrite reumatóide e a doença de Crohn (Moreno-Aliaga et al., 2010). O aumento de ingestão desses ácidos graxos em indivíduos obesos foi responsável pela redução dos níveis circulantes de citocinas pró-inflamatórias e de proteínas de fase aguda (revisão de White, Marette, 2006), podendo esta ser mediada por uma diminuição na produção de mediadores inflamatórios clássicos, como os eicosanóides (Calder et al., 2006).

Além disso, estudos realizados por Serhan et al., (2008) e Gonzalez-Periz et al. (2009) demonstraram em modelos animais (camundongos ob/ob suplementados com PUFA n-3) inibição da formação de eicosanóides derivados do PUFA n-6, e aumento da geração de mediadores lipídicos protetores derivados de PUFA n-3, resolvinas e protectinas, autacóides que participam da resolução da inflamação.

As alterações no tecido adiposo branco relacionadas ao quadro de caquexia associada ao câncer, como o processo de liberação de ácidos graxos livres sugerido pelo aumento da lipólise, são bem conhecidas. No entanto, pouco ou nada se sabe a respeito dos tipos específicos de ácidos graxos, liberados e armazenados nos adipócitos humanos e, se o perfil de ácidos graxos estaria contribuindo para o aumento e manutenção da inflamação sistêmica.

1.3 Hipótese e justificativa

Frente às diferenças na capacidade de diferentes tipos de ácidos graxos em intervir/promover a inflamação, propomo-nos a investigar a proporção relativa de ácidos graxos saturados e insaturados de pacientes com câncer caquéticos e compará-los à de pacientes portadores de tumor não caquéticos. Adicionalmente, foi nossa intenção correlacionar estes dados com marcadores de inflamação.

A heterogeneidade diante da localização anatômica do tecido adiposo determina a existência de depósitos viscerais e subcutâneos, que estão sob um refinado controle neural e hormonal bastante específico, demonstrando diferentes respostas sob o efeito da caquexia em relação a parâmetros bioquímicos e morfológicos (Bertevello, Seelaender, 2001). Há, portanto, especialização em relação aos depósitos, incidindo sobre a celularidade, crescimento, metabolismo, inervação, produção e resposta de citocinas, bem como na síntese de hormônios e composição de ácidos graxos (Batista Jr et al., 2012). Dessa forma, buscamos estudar diferentes coxins adiposos dos pacientes.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Conhecer o perfil de ácidos graxos plasmáticos dos pacientes frente a síndrome da caquexia e sua correlação com a inflamação sistêmica.

2.2 Específicos

1. Avaliar a expressão gênica e proteica de marcadores inflamatórios do plasma e do tecido adiposo branco em diferentes depósitos (subcutâneo e visceral);
2. Avaliar o perfil lipídico e a composição de ácidos graxos circulante no plasma;
3. Correlacionar o perfil de ácidos graxos aos marcadores inflamatórios na caquexia.

3 CAUSUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Recrutamento de pacientes

Foram recrutados 226 voluntários de ambos os sexos, maiores de idade, sem discernimento da classe social e raça, portadores de tumor gastrointestinal e submetidos à cirurgia na Clínica Cirúrgica do Hospital Universitário (Universidade de São Paulo) para retirada do tumor, em colaboração com o Dr. José Pinhata Otoch, Dr. Paulo Sérgio Martins Alcântara, Dra. Linda Ferreira Maximiano e Dr. Oscar Eduardo Hidetoshi Fugita (HU/USP). O recrutamento dos voluntários foi realizado na Clínica Cirúrgica do Hospital Universitário e as amostras foram coletadas após a obtenção da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

3.2 Aprovação no comitê de ética

Este projeto encontra-se aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas/Universidade de São Paulo (1117/CEP), pelo comitê de Ética Humana do Hospital Universitário/Universidade de São Paulo (CEP 1388/14) e devidamente cadastrado na Plataforma Brasil sob o número CAEE: 14197413.9.0000.5467.

3.3 Critérios de inclusão

Os critérios de inclusão utilizados para todos os pacientes foram: Não ter recebido tratamento anticâncer ou anti-inflamatório contínuo e a assinatura do consentimento de participação. Os critérios de exclusão foram: realizar tratamento quimioterápico no momento; utilizar anti-inflamatórios continuamente; apresentar falência renal ou hepática, AIDS, doenças inflamatórias intestinais ou processos inflamatórios crônicos não relacionados à caquexia, como distúrbios autoimunes, todos diagnosticados pelo médico. Pacientes em tratamento de hérnia que apresentassem o parâmetro sérico proteína C-Reativa (PCR) > 5 mg/L foram excluídos do estudo por apresentarem-se “inflamados” (McMillan, 2009) e, portanto não constituírem bons controles, posto que a caquexia é uma doença inflamatória crônica. O grupo experimental foi dividido e classificado da seguinte forma: Grupo Controle (N) – grupo de voluntários controles não portadores de tumor, submetidos a procedimento cirúrgico de outra natureza (herniografia

ou colecistectomia); Grupo Câncer sem Caquexia (WSC) – grupo de voluntários portadores de tumor gastrointestinal submetidos a procedimento cirúrgico para retirada do tumor; Grupo Câncer com Caquexia (CC) – grupo de voluntários caquéticos portadores de tumor gastrointestinal submetidos a procedimento cirúrgico para retirada do tumor.

3.4 Critérios de diagnóstico de caquexia

Para diagnóstico da caquexia foram utilizados os seguintes critérios (Evans et al., 2008): variação involuntária no peso corporal nos últimos 6 meses (maior ou igual a 5% da massa corporal informada); índice de massa corporal (IMC) – menor que 20 kg/m² para pacientes com menos de 65 anos e menor que 22 kg/m² para pacientes com idade maior ou igual a 65 anos; concentração plasmática de albumina menor que 3,2 g/dL; evidência de inflamação (concentração plasmática elevada de proteína C reativa > 5 mg/L); análise do questionário QLQ-C30 (este questionário inclui três temas: anorexia, fadiga e qualidade de vida; Pais-ribeiro et al., 2008). O sujeito foi considerado caquético quando apresentou perda involuntária de massa corporal nos últimos 6 meses (maior ou igual a 5% da massa corporal informada) e atendeu a no mínimo três dos cinco critérios descritos acima.

Não houve modificações na condução do procedimento cirúrgico, portanto, não houve influência no tratamento e nos procedimentos anestésico e cirúrgico dos voluntários e não havendo nenhum incômodo doloroso adicional para os mesmos.

3.5 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 através de dois questionários (Qualidade de vida - EORTC QLC-C30 e anorexia - FAACT-ESPEN, anexo B e C respectivamente), os quais fornecem informações quanto a qualidade de vida, fadiga e anorexia dos pacientes.

3.6 Coleta de sangue e análise de parâmetros bioquímicos

Aproximadamente 20 mL de sangue foram coletados previamente ao procedimento cirúrgico, por profissional de saúde capacitado. O sangue foi colocado em tubos com e sem

anti-coagulante (EDTA) e em seguida, foi centrifugado a 3000 rpm, durante 15 minutos a 4 °C, para a obtenção de plasma e soro, respectivamente. A seguir, o plasma e o soro foram armazenados em microtubos plásticos e estocados em freezer à -80 °C para análise posterior.

3.7 Obtenção de tecido adiposo

Durante o procedimento cirúrgico foi retirado uma amostra de aproximadamente 1g de tecido adiposo subcutâneo (TASC) e visceral (TAVC), com tempo total entre a coleta e o armazenamento de aproximadamente 5 minutos. Os tubos foram posteriormente transportados ao laboratório, retirados do nitrogênio líquido e imediatamente condicionados à -80 °C. Este procedimento apresentou um grau mínimo de risco ao paciente, e não interferiu com o procedimento cirúrgico padrão.

3.8 Experimentos

3.8.1 Análises bioquímicas – as concentrações séricas de hemoglobina, proteína C-reativa, albumina, glicose, colesterol total, lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteínas de alta densidade (HDL) e triacilglicerol foram quantificadas, utilizando-se kits comerciais (Glicose liquiform ref. 133, Triglicérides Liquiform ref. 87, HDL LE ref. 98, LDL Liquiform ref. 111, Albumina ref. 19, PCR Ultra Turbiquet Plus ref. 335 – Labtest diagnóstica). Para as análises do conteúdo plasmático de AGL e glicerol foi utilizado o kit NEFA HR (Wako Chemicals USA) e o kit glicerol reagente livre (Sigma-Aldrich Brasil Ltda.), respectivamente.

3.8.2 Identificação dos ácidos graxos por Cromatografia a Gás (GC) e análise por Espectrometria de Massa (MS) – Para realizarmos a análise dos ácidos graxos dos lipídios do plasma, contamos com a colaboração da Professora Dra. Alison Colquhoun. Primeiramente, esses foram extraídos de amostras individuais pelo método de Folch et al., (1957) e previamente à análise no GCMS, os ésteres metílicos dos ácidos graxos sofreram o processo anidro metanol /ácido sulfúrico. Os ésteres metílicos dos ácidos graxos foram separados numa coluna DB-23 [(50% cianopropilo) metil polisiloxano, filme de 0,25 µm de espessura, 0,250 mm; 60 m], abertura de injeção de 220 °C, 250 °C na interface entre coluna e espectrômetro de massa e transportador em gás hélio (99,999%), em um GCMS (modelo Shimadzu QP5050). O programa para GC foi o seguinte: 150 °C mantido durante 2 min pós-injeção (nos 9 minutos iniciais não foram medidos os valores por se tratar de solvente, podendo saturar o espectrômetro de massa),

em seguida, 150-200 °C a uma taxa de 10 °C/min; 200-230 °C a 1,3 °C /min; 230-250 °C a 10 °C /min. Os ácidos graxos foram identificados por comparação com padrões autênticos de tempos de retenção e espectros de massa conforme descrito por Ramos e Colquhoun, (2003).

3.8.3 Quantificação do RNAm – para realizar a quantificação do RNAm o RNA total foi extraído e a reação de transcrição reversa (RT) realizada. O RNA total foi isolado das amostras, empregando-se o reagente Trizol® (Invitrogen, Carlsbad, CA), seguindo as recomendações do fabricante e, então, homogeneizado. As Concentrações de RNA foram determinadas medindo-se a absorbância sob 260nm/280nm. O RNA isolado foi armazenado a -80°C para posterior análise por qRT-PCR. O RNA total extraído do TAB foi armazenado em presença de Deoxiribonuclease I, DNase altamente purificada, para a remoção de DNA genômico.

As amostras de RNA foram transcritas para cDNA em termociclador (Veriti®). Para a síntese do cDNA foram utilizados na reação 1 µg de RNA total de cada amostra com *Random primer*, utilizando *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* (Invitrogen no. 4375575) num volume final de 20 µl. A transcrição reversa foi efetuada em um ciclo único, cujas etapas foram: i) 10 minutos a 25 °C; ii) 120 minutos a 37 °C; iii) 5 segundos a 85 °C; e iv) termina a 4 °C. A amostra de cDNA obtida foi estocada a -20 °C até a realização do experimento.

A expressão dos genes (TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-10, CCL2, IL-1 β IL-8 e IL-15) foi quantificada por RT-PCR (Kubista; et al., 2006), utilizando o aparelho QuantStudio™ 12K Flex System with Array Card Block (Life Technologies) e SYBER Green 2 x como marcador de fluorescência (Invitrogen, USA). Para a reação foi utilizado 1 µl de cDNA da amostra para um volume final de reação de 10 µl. As seguintes concentrações de cDNA por amostra foram utilizadas: 50 ng de cDNA do TASC e 12,9 ng de cDNA do TAVC e 100-800 nM de primer, 5 µl do mix SYBER Green 2 x (código 4309155, Applied Biosystems), que contem dNTP, tampão de reação, Taq DNA polimerase SYBER green 2 x. A reação ocorreu do seguinte modo: primeiramente, dois ciclos de 50 °C por 2 minutos e 95 °C por 10 minutos; seguido de 40 ciclos de amplificação: i – desnaturação a 95 °C por 15 segundos, ii – anelamento a 60 °C por 60 segundos e iii – extensão a 72 °C por 2 minutos.

Os dados obtidos foram expressos como um limiar de ciclagem (Ct) que representa uma linha de base de detecção de fluorescência, correspondente à fase exponencial. Baseando-se no Ct obtido, foi estimado a quantidade inicial de cDNA aplicado nas diferentes amostras. Assim o valor do Ct está correlacionado com a concentração de RNAm usada na reação. A expressão gênica foi determinada através da fórmula: $2^{-\Delta\Delta Ct}$, descrita por K. Livak no Manual do usuário do Biosystem Sequence Detector Bulletin 2, na qual $\Delta\Delta Ct = [Ct \text{ alvo (amostra} - Ct \text{ amostra de referência)}]$.

Tumor) – Ct RPL-27 (mesma amostra)] – [Ct alvo (amostra controle) – RPL-27 (mesma amostra)]. Os resultados foram expressos com base na relação do RNAm de cada gene de interesse relativizado com o conteúdo de RNAm do gene RPL-27. Os primers foram desenhados com base no banco de dados Genbank (tabela 1).

Tabela 1 – Lista de *Primers* utilizados

Gene (Espécie)	Sequência 5'→ 3'
<i>CCL-2 (Homo sapiens)</i> (NM 002982.3)	Fw: TCA GCC AGA TGC AAT CAA TG Rev: ACA CTT GCT GCT GGT GAT TCT
<i>IL-1β (Homo sapiens)</i> (NM 000576.2)	Fw: AGC CAA TCT TCA TTG CTC AAG T Rev: AGT CAT CCT CAT TGC CAC TGT
<i>IL-6 (Homo sapiens)</i> (NM 000600.3)	Fw: CAG CCC TGA GAA AGG AGA CAT Rev: AGC CAT CTT TGG AAG GTT CA
<i>IFN-γ (Homo sapiens)</i> (NM 000619.2)	Fw: TGG AAA GAG GAG AGT GAC AGA A Rev: TTG GAT GCT CTG GTC ATC TTT A
<i>TNF-α (Homo sapiens)</i> (NM 000594.3)	Fw: CTC TCT CCC CTG GAA AGG AC Rev: ATC ACT CCA AAG TGC AGC AG
<i>IL- 10 (Homo sapiens)</i> (NM 000572.2)	Fw: TGTCATCGATTTCTTCCCTGT Rev: TGC CTT TCT CTT GGA GCT TAT T
<i>RPL-27 (Homo sapiens)</i> (NM 000988.3)	Fw: CCG AAA TGG GCA AGT TCA T Rev: CCA TCA TCA ATG TTC TTC ACG A
<i>IL-8 (Homo sapiens)</i> (NM 000584.3)	Fw: AGC TCT GTG TGA AGG TGA T Rev: TTT GGG GTG GAA AGG TTT G
<i>ZAG (Homo sapiens)</i> (NM 001185.3)	Fw: CCA GGA GAA CCA AGA TGG TC Rev: CTG CTT CCA ATC CTC CAT TC
<i>TRL-4 (Homo sapiens)</i> (NM 0032663)	Fw: TAA GGT TGC CGC TTT CAC TT Rev: ATC ATC CTG GCA TCA TCC TC

3.8.4 Aferição do conteúdo proteico tecidual e plasmático de citocinas pró e anti-inflamatórias (CCL2, IL-1 β , IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-8, IL-4, IL-15 e IL-1ra) - O protocolo consistiu da incubação da amostra com a mistura de microesferas MagPlex[®] cobertas com diferentes anticorpos por 2 horas; detecção dos antígenos-alvo ligados às microesferas com uma mistura de anticorpos de captura biotinilados e incubação por 1 hora; seguido de incubação com

streptavidina marcada com *phycoerithrin* por 30 minutos. As microesferas foram, então, identificadas por meio da *phycoerithrin* usando-se o instrumento Luminex® MAGPIX (Life Technologies). Após a leitura do aparelho, os valores de cada citocina foram analisados no software *Analyst* 5.1 e, posteriormente, foram relativizados pela concentração de proteína total.

3.9 Análise estatística

Os dados foram expressos em média $\pm$ erro-padrão ou mediana [1º. quartil; 3º. quartil]. Os grupos foram comparados empregando-se ANOVA com um fator seguido, quando necessário, por comparações múltiplas pelo método de Tukey e Kruskal -Wallis, seguido, quando necessário, por comparações múltiplas não-paramétricas. O coeficiente de correlação de Spearman foi obtido para avaliar a relação linear entre as variáveis de interesse. O nível de significância estabelecido foi de $p < 0,05$. Para a análise dos parâmetros qualitativos, localização e estadiamento do tumor, empregou-se o teste qui-quadrado.

Todos os procedimentos estatísticos foram realizados com o auxílio do Setor de Estatística do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, sob a supervisão da Sra. Rosana Duarte Prisco. Utilizou-se o software estatístico Statgraphics® Centurion XVI versão 16.2.04, Statpoint Technologies, Inc. Warrenton, Virginia.

4 RESULTADOS

4.1 Achados clínicos

Após aceitarem participar da pesquisa e assinarem o TCLE, 226 pacientes foram recrutados. A figura 2 mostra o fluxograma contendo as etapas envolvidas na primeira fase de seleção da amostra e ao final os 113 pacientes recrutados e classificados nos grupos analisados (N n=53; WSC n=23; CC n=37).

Figura 2 – Fluxograma da seleção dos pacientes

As características gerais dos pacientes estão ilustradas na tabela 2. Ambos os grupos portadores de tumor (WSC e CC), apresentaram uma média de idade mais elevada do que o grupo N. A massa corporal 6 meses antes da inclusão no estudo, conforme informado pelos pacientes, não mostrou diferença estatística entre os grupos mas, a massa corporal atual do grupo CC foi significativamente menor, quando comparada com a dos grupos N e WSC ($p < 0,05$). A diferença entre a massa corporal inicial e a massa corporal atual foi de aproximadamente 15% no grupo CC, em relação ao N e ao WSC. Além disso, o índice de massa corporal (kg/m^2) de CC, embora maior do que 20 kg/m^2 , foi significativamente menor do que o grupo controle.

Tabela 2 – Característica dos pacientes

	N	WSC	CC	p
n	53	23	37	
Homens/mulheres (n)	34/19 (64%/36%)	16/07 (70%/30%)	20/17 (54%/46%)	
Altura (m)¹	1,64 ± 0,01	1,65 ± 0,02	1,64 ± 0,01	0,920
Idade (anos)¹	54,2 ± 1,7	63,9 ± 2,2*	61,3 ± 2,0*	0,002
Massa corporal anterior informada (Kg)¹	71,7 ± 1,8	72,6 ± 2,7	71,4 ± 2,1	0,926
Massa corporal atual (Kg)¹	71,4 ± 1,6	68,8 ± 2,2	60,6 ± 1,9*#	<0,001
Δ massa corporal (Kg)²	0 [0; 0]	0 [-8; 0]	-10,0 [-13,0; -7] *#	<0,001
Δ massa corporal (%)²	0 [0; 0]	0 [0; 9,1]	14,8 [9,4; 18,4] *#	<0,001
IMC (Kg/m²)¹	26,6 ± 0,54	25,5 ± 0,80	22,5 ± 0,53*#	<0,001
QLQ-C30²	60,5 [56,4; 62,7] (n=45)	58,9 [52,2; 62,2] (n=20)	41,5 [37,6; 44,4]*# (n=36)	<0,001
FAACT-ESPEN²	39,0 [37,0; 40,0] (n=45)	36,0 [32,0; 37,5]* (n=20)	31,0 [24,0; 35,0]* (n=37)	<0,001
Estadiamento do tumor				
I	-	8 (38,1%)	2 (05,4%)	0,012^s
IIA/IIIB/IIC	-	6 (28,6%)	10 (27,0%)	
		14 (66,7%)	12 (32,4%)	
IIIA/IIIB/IIIC	-	4 (19,0%)	14 (37,8%)	
IVA/IVB	-	3 (14,3%)	11 (29,7%)	
		7 (33,3%)	25 (67,6%)	
Localização do tumor				
Cólon e reto	-	14 (60,87%)	25 (67,57%)	0,538 ^{&}
Estômago	-	8 (34,78%)	10 (27,03%)	
Outros	-	1 (4,35%)	2 (5,41%)	

¹Dados expressos em média ± erro padrão, p=nível de significância da ANOVA. ²Dados expressos em mediana [1º quartil; 3º quartil], p=nível de significância do teste de Kruskal-Wallis. Δ: diferença entre a massa corporal anterior informada e massa corporal atual; QLQ-C30: questionário de qualidade de vida; FAACT-ESPEN: questionário para avaliar o grau de anorexia. * diferença significativa vs N (p<0,05); # diferença significativa vs WSC (p<0,05); \$ nível de significância do teste de qui-quadrado agrupando estadiamento I com II e III com IV. & nível de significância do teste de qui-quadrado sem considerar a localização do tumor “Outros”.

A percepção da qualidade de vida global, aferida com questionário (QLQ-C30) foi significativamente reduzida (valores mais baixos = menor qualidade de vida) entre os pacientes caquéticos, em comparação com os pacientes nos outros grupos. Além disso, a pontuação final

do questionário aplicado (FAACT-ESPEN) para avaliar o grau de anorexia, revelou que pacientes caquéticos mostraram reduzida pontuação (o que significa mais anorexia) comparado com o controle. Esse resultado é coerente com a definição de caquexia utilizada para classificação dos grupos (Evans et al., 2008). O grupo com câncer (WSC) também apresentou aumento de anorexia (avaliada pela pontuação do questionário mais baixa), em comparação ao mesmo grupo ($p < 0,05$), porém, apesar da anorexia, não apresentaram perda de peso maior que 5% nos últimos 6 meses (tabela 2).

Utilizando o teste qui-quadrado foi possível identificar diferença significativa ($p = 0,012$) nos parâmetros de estadiamento do tumor quando agrupamos o estágio I com o II e III com o IV, mostrando uma maior porcentagem dos estágios III e IV no grupo CC (67,6%) enquanto que os estágios I e II, a porcentagem (66,7%) foi maior no grupo WSC. Entretanto, a caquexia independe da localização do tumor ($p = 0,538$; tabela 2).

Considerando os parâmetros bioquímicos (tabela 3) atualmente sugeridos na literatura (Evans, 2008; Muscaritoli, 2010) para o diagnóstico de caquexia, confirmamos que a concentração de hemoglobina sérica nos grupos CC e WSC era realmente inferior quando comparada à do N, assim como, a do grupo CC, em relação ao WSC. O conteúdo sérico de proteína C-reativa, um importante marcador de inflamação sistêmica, foi maior no grupo CC em relação ao N e WSC, mas WSC também apresentou conteúdo de PCR no soro maior do que o grupo N, apesar de não apresentar perda de peso significativa detectável. O conteúdo de albumina sérica foi significativamente menor no grupo CC, quando comparado com os outros grupos, no entanto, essas concentrações (3,83 [2,91; 4,56] g/dL) foram superiores às aquelas indicadas pelo consenso internacional de caquexia para o diagnóstico de caquexia (figura 3). Quando a concentração plasmática individual de albumina foi analisada, verificou-se que de 36 pacientes do grupo caquético, 26 apresentaram concentrações de albumina superiores a 3,2 g/dL. Assim, optamos por avaliar adicionalmente a razão PCR/albumina, tendo encontrado valores maiores para o grupo CC, sugerindo então, que essa razão corrobora a validade dos critérios que vêm sendo utilizados pelo Consenso Brasileiro de Caquexia (2011), para identificação da síndrome da caquexia na população estudada.

Tabela 3 – Dados bioquímicos dos pacientes

	N	WSC	CC	<i>p</i>
Glicose (mg/dL)	108,0 [92; 122,0] (n=49)	106,0 [92,0; 112,0] (n=21)	115,0 [97,0; 134,0] (n=36)	0,399
Hemoglobina (g/dL)	14,8 [13,9; 15,8] (n=45)	13,3 [11,9; 14,6]* (n=22)	11,2 [8,3; 12,1]*# (n=31)	<0,001
Proteína C-reativa (mg/L)	1,6 [0,5; 3,15] (n=52)	3,95 [0,7; 5,5]* (n=22)	11,5 [6,3; 12,7]*# (n=35)	<0,001
Albumina (g/dL)	4,58 [4,25; 5,05] (n=53)	4,53 [4,05; 4,82] (n=23)	3,83 [2,91; 4,56] *# (n=36)	<0,001
PCR/Albumina (mg/g)	0,032 [0,013; 0,065] (n=52)	0,093 [0,015; 0,116] (n=22)	0,289 [0,163; 0,432]*# (n=35)	<0,001

Dados expressos em mediana [1º quartil; 3º quartil], p=nível de significância do teste de Kruskal-Wallis. PCR: Proteína C-reativa. * diferença significativa vs N (p<0,05); # diferença significativa vs WSC (p<0,05).

Figura 3 – Critérios para diagnóstico da Caquexia (adaptado de EVANS et al., 2008).

4.2 Perfil lipídico sanguíneo dos pacientes

O perfil lipídico dos pacientes com caquexia foi avaliado para verificar modificações relacionadas com a síndrome (tabela 4). Observamos uma redução significativa dos conteúdos de colesterol total, LDL, TAG e glicerol no grupo CC em relação ao N. O conteúdo de HDL mostrou diferença entre os grupos, mas o pós teste de Dunn não detectou qual grupo provocou essa diferença. O conteúdo de AGL não apresentou diferença entre os grupos. Porém, ao analisar a razão entre os conteúdos de AGL pelo conteúdo de TAG, assim como pelo conteúdo de glicerol, estes apresentaram uma porcentagem significativamente maior exclusivamente no grupo CC quando comparado ao N.

Tabela 4 – Perfil lipídico sanguíneo dos pacientes

	N	WSC	CC	p
Colesterol total (mg/dL)	211,0 [183,0; 241,0] (n=51)	197,5 [167,0; 235,0] (n=22)	157,0 [123,5; 226,5]* (n=36)	0,010
LDL (mg/dL)	110,5 [92,0; 133,0] (n=38)	118,0 [81,0; 138,0] (n=13)	82,0 [60,0; 110,5]* (n=28)	0,034
HDL (mg/dL)	40,0 [33,0; 48,0] (n=37)	45,0 [31,0; 56,0] (n=15)	33,0 [26,0; 42,0] (n=30)	0,029
TAG (mg/dL)	137,0 [98,0; 195,0] (n=51)	127,0 [78,0; 160,0] (n=21)	95,0 [73,0; 130,0]* (n=35)	0,037
Glicerol (mg/ml)	0,014 [0,007; 0,023] (n=34)	0,006 [0,003; 0,021] (n=12)	0,006 [0,003; 0,009]* (n=25)	0,001
AGL (mg/dL)	0,98 [0,80; 1,14] (n=38)	0,95 [0,69; 1,27] (n=15)	1,03 [0,78; 1,29] (n=30)	0,704
AGL/TAG (%)	0,61 [0,46; 1,11] (n=37)	0,78 [0,58; 1,01] (n=15)	1,04 [0,70; 1,45]* (n=29)	0,040
AGL/Glicerol (%)	69,2 [42,2; 131,5] (n= 34)	179,5 [41,4; 312,5] (n= 12)	201,4 [129,9; 263,1]* (n= 25)	0,003
Colesterol/TAG (%)	157,5 [109,7; 233,9] (n= 51)	161,6 [139,6; 243,8] (n= 21)	150,6 [116,9; 239,8] (n= 35)	0,884

Dados expressos em mediana [1º quartil; 3º quartil], p=nível de significância do teste de Kruskal-Wallis. TAG: triacilglicerol; LDL: lipoproteína de baixa densidade; HDL: lipoproteína de alta densidade; AGL: ácido graxo livre. * diferença significativa vs N (p<0,05).

4.3 Perfil de ácidos graxos no plasma dos pacientes

Entre os tipos de ácidos graxos identificados no plasma dos pacientes (tabela 5) foi observada uma porcentagem diferente entre os grupos estudados para o perfil de ácidos graxos saturados. Para o SFA, o ácido palmítico (16:0), a porcentagem encontrada foi maior (p=0,006) nos grupos WSC e CC (27,83% e 27,98%), quando comparado ao N (24,1%), o SFA ácido esteárico (18:0) mostrou diferença apenas (p=0,025) no grupo CC (15,37%), comparado ao N (13,25%) e em contrapartida, o SFA ácido mirístico (14:0) apresentou-se inferior (p=0,019) no CC (0%) comparado ao N (1,74%). No que concerne aos ácidos graxos insaturados, a presença do monoinsaturado (MUFA – do inglês, *monounsaturated fatty acid*) ácido oleico (18:1c9) foi maior (p<0,001) nos grupos WSC e CC (27,39% e 28,55%) comparado com o N (20,56%). Contrariamente, a porcentagem de PUFA's apresentou-se reduzida nos mesmos grupos. A porcentagem do ácido linoleico (LA; 18:2n6) foi menor (p<0,001) nos grupos WSC e CC

(15,63% e 12,19%), comparado ao N (21,59%) e o ácido alfa-linoleico (ALA; 18:3n3) não foi detectado (0%; $p<0,001$) nos grupos WSC e CC comparado ao mesmo grupo. (N=0,10%). A porcentagem dos PUFA's ácido dihomô gama linoleico (DGLA; 20:3n6) e ácido eicosapentanoico (EPA; 22:5n3) é inferior ($p<0,05$), apenas na comparação entre os grupos CC e WSC. Em geral, os nossos resultados indicam uma diminuição dos PUFA's e um aumento dos MUFA's e SFA's no plasma de CC, que pode estar relacionada com a liberação ou retenção desses ácidos graxos pelos diversos tecidos (tabela 6).

Tabela 5 – Perfil (porcentagem relativa) de ácidos graxos do plasma dos pacientes.

%	N (n=14)	WSC (n=14)	CC (n=14)	<i>p</i>
14:0	1,74 [0,48; 2,8]	1,00 [0; 1,52]	0 [0; 1,21]*	0,019
16:0	24,10 [21,43; 26,41]	27,83 [26,98; 28,63]*	27,98 [26,02; 30,89]*	0,006
16:1	0,70 [0,35; 1,09]	1,08 [0,59; 1,43]	1,20 [0,79; 1,77]	0,065
17:0	0,08 [0; 0,22]	0,16 [0; 0,28]	0 [0; 0,12]	0,533
18:0	13,25 [11,9; 15,29]	13,93 [12,97; 17,0]	15,37 [14,01; 18,8]*	0,025
18:1c9	20,56 [19,4; 21,4]	27,39 [26,71; 29,90]*	28,55 [25,66; 29,83]*	<0,001
18:2n6	21,59 [21,24; 25,61]	15,63 [13,73; 16,50]*	12,19 [10,40; 13,67]*	<0,001
18:3n3	0,10 [0,06; 0,21]	0 [0; 0]*	0 [0; 0]*	<0,001
20:3n6	0,15 [0; 0,41]	0,35 [0; 1,78]	0 [0; 0,12] [#]	0,034
20:4n6	8,62 [7,92; 9,01]	8,50 [8,01; 8,88]	7,73 [6,99; 8,42]	0,146
22:5n3	0,04 [0; 0,09]	0,06 [0; 0,27]	0 [0; 0] [#]	0,005

Dados expressos em mediana [1º quartil; 3º quartil], *p*=nível de significância do teste de Kruskal-Wallis. *diferença significativa vs N ($p<0,05$); [#] diferença significativa vs WSC ($p<0,05$).

Tabela 6 – Perfil (porcentagem relativa) dos diferentes grupos de ácidos graxos do plasma dos pacientes.

%	N (n=14)	WSC (n=14)	CC (n=14)	p
SFA	39,67 [36,2; 42,59]	43,56 [40,71; 46,61]	44,2 [42,64; 47,46]*	0,005
MUFA	21,13 [20,13; 23,09]	28,44 [27,79; 30,68]*	29,85 [27,41; 30,88]*	<0,001
PUFA n-3 + n-6	32,14 [28,81; 34,89]	24,64 [22,37; 25,83]*	20,8 [17,29; 21,60]*	<0,001
PUFA n-3	0,13 [0,09; 0,28]	0,06 [0; 0,27]	0 [0; 0]*#	<0,001
PUFA n-6	32,04 [28,78; 34,62]	24,52 [21,84; 25,83]*	20,8 [17,29; 21,60]*	<0,001

Dados expressos em mediana [1° quartil; 3° quartil], p=nível de significância do teste de Kruskal-Wallis. SFA: ácidos graxos saturados (agrupamentos dos ácidos graxos 14:0, 16:0, 17:0 e 18:0); MUFA: ácidos graxos monoinsaturados (agrupamentos dos ácidos graxos 16:1, 18:1c9); PUFA: ácidos graxos poliinsaturados (agrupamentos dos ácidos graxos 18:2n6, 18:3n3, 20:n6, 20:4n6 e 22:5n3); n-3: PUFA ômega-3 (agrupamentos dos ácidos graxos 18:3n3 e 22:5n3); n-6: PUFA ômega-6 (agrupamentos dos ácidos graxos 18:2n6, 20:n6 e 20:4n6)* diferença significativa vs N (p<0,05); # diferença significativa vs WSC (p<0,05).

4.4 Expressão gênica no tecido adiposo

A análise da expressão gênica de citocinas no tecido adiposo subcutâneo é mostrada na tabela 7. O conteúdo de RNAm da citocina pró-inflamatória IL-1 β (figura 4A) foi maior em CC, em comparação com o grupo WSC (p<0,05). Para a expressão gênica do TNF- α (figura 4B) mostrou-se diferença entre os grupos (p=0,043), mas o pós teste de Dunn não detectou o fator associado à diferença. No tecido adiposo visceral (tabela 8), a expressão dos genes de citocinas CCL2 (p=0,454), IL-1 β (p=0,122), IL-6 (p=0,654), IFN- γ (p=0,803), TNF- α (p=0,895), IL-10 (p=0,196), IL-8 (p=0,289), TRL-4 (p=0,953) e ZAG (p=0,382) não apresentou diferença significativa entre os grupos.

Tabela 7 – Expressão gênica de citocinas do tecido adiposo subcutâneo dos pacientes.

qRT-PCR	N	WSC	CC	<i>p</i>
CCL2 (U.A.)	0,93 [0,26; 3,33] (n=28)	0,30 [0,17; 0,93] (n=9)	3,34 [0,16; 7,47] (n=22)	0,253
IL-1β (U.A.)	0,72 [0,44; 1,85] (n=22)	0,13 [0,08; 0,33] (n=5)	1,29 [0,85; 7,72] [#] (n=14)	0,015
IL-6 (U.A.)	0,72 [0,38; 3,11] (n=23)	0,74 [0,28; 1,82] (n=7)	2,64 [0,18; 8,09] (n=17)	0,654
IFN-γ(U.A.)	1,34 [0,10; 10,72] (n=28)	1,90 [0,12; 15,56] (n=9)	6,25 [0,23; 17,68] (n=22)	0,345
TNF-α (U.A.)	1,29 [0,12; 6,30] (n=23)	10,34 [0,92; 14,32] (n=5)	8,71 [8,06; 9,69] (n=9)	0,043
IL-10 (U.A.)	1,19 [0,37; 1,70] (n=16)	1,10 [0,42; 3,03] (n=7)	0,43 [0,27; 0,71] (n=10)	0,293
IL-8 (U.A.)	1,13 [0,25; 3,24] (n=26)	0,77 [0,18; 2,06] (n=8)	0,98 [0,30; 8,21] (n=19)	0,924
TRL-4 (U.A.)	0,95 [0,11; 4,54] (n=26)	0,68 [0,16; 8,51] (n=9)	6,09 [0,22; 10,36] (n=21)	0,296

Dados expressos em mediana [1° quartil; 3° quartil], *p*=nível de significância do teste de Kruskal-Wallis. A expressão dos genes alvos foi normalizada para o gene de referência RPL-27. CCL2: proteína quimioatraente de monócito; IL-1 β : interleucina-1 beta; IL-6: interleucina-6; IFN- γ : interferon gamma; TNF- α : fator de necrose tumoral-alfa; IL-10: interleucina-10; IL-8: interleucina-8; TRL-4: receptor *toll-like-4*; (U.A.): unidades arbitrárias. * diferença significativa vs N (*p*<0,05).

Figura 4 – Expressão gênica das citocinas IL-1 β (A) e TNF- α (B) do tecido adiposo subcutâneo. Dados expressos em: mínimo, 1° quartil, mediana, 3° quartil e máximo. *diferença significativa entre os grupos (*p*<0,05). A expressão dos genes alvos foi normalizada para o gene de referência RPL-27. IL-1 β : interleucina-1 beta; TNF- α : fator de necrose tumoral-alfa; (U.A.): unidades arbitrárias.

Tabela 8 – Expressão gênica de citocinas do tecido adiposo visceral dos pacientes.

qRT-PCR	N	WSC	CC	<i>p</i>
CCL2 (U.A.)	1,80 [0,37; 2,11] (n=9)	1,61 [0,65; 2,25] (n=10)	0,79 [0,37; 2,44] (n=26)	0,454
IL-1β (U.A.)	0,92 [0,69; 4,45] (n=7)	2,41 [1,31; 3,74] (n=9)	0,95 [0,48; 1,27] (n=21)	0,122
IL-6 (U.A.)	1,56 [0,36; 2,74] (n=8)	2,81 [0,36; 7,71] (n=10)	1,86 [0,62; 3,62] (n=23)	0,654
IFN-γ(U.A.)	2,78 [0,09; 8,22] (n=8)	0,94 [0,07; 4,84] (n=10)	0,82 [0,12; 6,22] (n=25)	0,803
TNF-α (U.A.)	5,22 [0,05; 9,85] (n=7)	0,89 [0,05; 6,01] (n=8)	0,62 [0,11; 8,41] (n=20)	0,895
IL-10 (U.A.)	0,67 [0,48; 3,27] (n=4)	5,02 [2,23; 9,63] (n=4)	2,08 [1,47; 3,31] (n=16)	0,196
IL-8 (U.A.)	1,56 [0,38; 2,16] (n=8)	2,96 [0,58; 24,99] (n=10)	1,77 [0,58; 4,66] (n=23)	0,289
TRL-4 (U.A.)	0,23 [0,21; 4,76] (n=9)	0,48 [0,23; 4,24] (n=10)	0,43 [0,10; 6,59] (n=25)	0,953
ZAG (U.A.)	0,99 [0,56; 1,76] (n=9)	1,08 [0,75; 3,51] (n=9)	0,83 [0,35; 2,03] (n=23)	0,382

Dados expressos em mediana [1° quartil; 3° quartil], *p*=nível de significância do teste de Kruskal-Wallis. A expressão dos genes alvos foi normalizada para o gene de referência RPL-27. CCL2: proteína quimioatraente de monócito; IL-1 β : interleucina-1 beta; IL-6: interleucina-6; IFN- γ : interferon gamma; TNF- α : fator de necrose tumoral-alfa; IL-10: interleucina-10; IL-8: interleucina-8; TRL-4: receptor *toll-like* 4; ZAG: glicoproteína Zinc- α_2 ; (U.A.): unidades arbitrárias.

4.5 Expressão proteica de citocinas no plasma e no tecido adiposo

4.5.1 Expressão proteica no plasma (tabela 9) – As citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF- α e IL-8 (figura 5A, 5B e 5C, respectivamente) mostra-se elevada no grupo CC em relação ao N (*p*<0,05), enquanto que a IL-8 foi diferente entre WSC e N (*p*<0,05).

4.5.2 Expressão proteica no TASC (tabela 10) – O conteúdo proteico das citocinas pró-inflamatória IL-1 β e TNF- α (figura 6A e 6B) e da anti-inflamatória IL-10 (figura 6C) mostrou um comportamento diferente em relação ao plasmático e ao do depósito visceral. Este foi significativamente menor apenas no grupo WSC em relação ao controle (*p*<0,05).

4.5.3 Expressão proteica no TAVC (tabela 11) – Nesse depósito, duas citocinas pró-inflamatórias foram estatisticamente diferentes. O conteúdo proteico de IFN- γ (figura 7A)

mostrou diferença entre os grupos ($p=0,044$) mas o pós teste de Dunn não detectou o fator associado à diferença. Para IL-8 (figura 7B) o conteúdo proteico se apresentou maior no grupo caquético em relação ao controle ($p<0,05$).

As demais citocinas analisadas nesses mesmos compartimentos não apresentaram diferenças significativas como mostradas nas tabelas.

Tabela 9 – Expressão proteica de citocinas do plasma dos pacientes.

pg/ml	N	WSC	CC	<i>p</i>
CCL2	277,0 [240,1;343,6] (n= 22)	266,9 [220,3; 392,9] (n= 16)	318,1 [265,6; 447,6] (n= 21)	0,238
IL-1β	ND (n=22)	ND (n=16)	ND (n=21)	
IL-6	0 [0; 0,62] (n=22)	1,18 [0,01; 2,44] (n=16)	2,49 [0,87; 8,97]* (n=21)	<0,001
IFN-γ	1,28 [0,58; 1,91] (n= 20)	1,70 [0,73; 2,98] (n= 16)	1,48 [0,43; 3,37] (n= 20)	0,418
TNF-α	5,04 [4,11; 6,15] (n= 22)	6,80 [4,85; 9,45] (n= 16)	7,52 [6,85; 9,92]* (n= 21)	0,018
IL-10	0,02 [0,01; 0,06] (n=22)	0,05 [0,02; 0,40] (n= 16)	0,07 [0,04; 0,21] (n=21)	0,091
IL-8	0,6 [0,4; 3,04] (n= 22)	5,8 [3,6; 7,1]* (n=16)	21,1 [5,6; 31,6]* (n= 21)	<0,001
IL-4	ND (n=22)	ND (n=16)	ND (n=21)	
IL-15	ND (n= 22)	ND (n= 16)	ND (n= 21)	
IL-1ra	0,22 [0,15; 0,25] (n= 22)	0,25 [0,18; 0,46] (n=16)	0,31 [0,23; 0,41] (n= 21)	0,120

Dados expressos em mediana [1° quartil; 3° quartil], p =nível de significância do teste de Kruskal-Wallis. CCL2: proteína quimioatraente de monócito; IL-1 β : interleucina-1 beta; IL-6: interleucina-6; IFN- γ : interferon gamma; TNF- α : fator de necrose tumoral-alfa; IL-10: interleucina-10; IL-8: interleucina-8; IL-4: interleucina-4; IL-15: interleucina-15; IL-1ra: receptor antagonista da interleucina-1. * diferença significativa vs N ($p<0,05$); ND: não detectado através do protocolo utilizado.

Figura 5 – Expressão proteica de citocinas do plasma (A-IL-6; B-TNF- α C-IL-8). Dados expressos em: mínimo, 1º quartil, mediana, 3º quartil e máximo. *diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). IL-6: interleucina-6; TNF- α : fator de necrose tumoral-alfa; IL-8: interleucina-8.

Tabela 10 – Expressão proteica de citocinas do tecido adiposo subcutâneo dos pacientes.

pg/mg de proteína	N	WSC	CC	<i>p</i>
CCL2	37,66 [15,55; 82,79] (n= 26)	34,91 [13,6; 102,90] (n= 16)	39,94 [12,70; 77,98] (n= 20)	0,993
IL-1β	0,17 [0,12; 0,46] (n= 27)	0,09 [0,07; 0,13]* (n= 16)	0,11 [0,07; 0,32] (n= 21)	0,004
IL-6	0,18 [0,09; 0,31] (n= 27)	0,09 [0,07; 0,11] (n= 16)	0,09 [0,05; 0,24] (n= 21)	0,111
IFN-γ	0,19 [0,15; 0,39] (n=9)	0,11 [0,04; 0,18] (n=2)	0,17 [0,17; 0,34] (n= 9)	ND
TNF-α	0,100 [0,05; 0,20] (n= 27)	0,055 [0,04; 0,06]* (n= 16)	0,060 [0,04; 0,14] (n= 21)	0,032
IL-10	0,20 [0,10; 0,46] (n= 27)	0,10 [0,06; 0,16]* (n= 16)	0,16 [0,06; 0,38] (n= 21)	0,034
IL-8	0,15 [0,04; 2,12] (n= 27)	0,03 [0,03; 3,76] (n= 16)	0,22 [0,07; 5,31] (n= 21)	0,260
IL-4	ND (n=27)	ND (n=16)	ND (n=21)	
IL-15	0,13 [0,08; 0,36] (n= 27)	0,09 [0,07; 0,15] (n= 16)	0,10 [0,06; 0,28] (n= 21)	0,269
IL-1ra	1,66 [0,89; 4,36] (n= 27)	0,56 [0,22; 1,75] (n= 16)	1,14 [0,45; 3,46] (n= 21)	0,078

Dados expressos em mediana [1º quartil; 3º quartil], p =nível de significância do teste de Kruskal-Wallis. A expressão proteica de citocinas normalizada pelo conteúdo de proteína total. CCL2: proteína quimioatraente de monócito; IL-1 β : interleucina-1 beta; IL-6: interleucina-6; IFN- γ : interferon gamma; TNF- α : fator de necrose tumoral-alfa; IL-10: interleucina-10; IL-8: interleucina-8; IL-4: interleucina-4; IL-15: interleucina-15; IL-1ra: receptor antagonista da interleucina-1. * diferença significativa vs N ($p < 0,05$); ND: não detectado através do protocolo utilizado.

Figura 6 – Expressão proteica de citocinas do tecido adiposo subcutâneo (A- IL-1 β ; B-TNF- α ; C-IL-10). Dados expressos em: mínimo, 1° quartil, mediana, 3° quartil e máximo. *diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). A expressão proteica de citocinas foi normalizada pelo conteúdo de proteína total para os tecidos subcutâneo. IL-1 β : interleucina-1 beta; TNF- α : fator de necrose tumoral-alfa; IL-10: interleucina-10.

Tabela 11 – Expressão proteica de citocinas do tecido adiposo visceral dos pacientes.

pg/mg de proteína	N	WSC	CC	<i>p</i>
CCL2	150,0 [37,7; 470,4] (n= 12)	194,8 [113,4; 304,1] (n= 10)	166,6 [81,8; 222,8] (n= 24)	0,724
IL-1β	1,276 [0,167; 3,079] (n= 12)	0,958 [0,638; 2,358] (n= 10)	0,386 [0,126; 1,060] (n= 24)	0,241
IL-6	14,13 [10,99; 69,30] (n=12)	64,70 [35,42; 83,55] (n= 10)	23,80 [8,02; 67,92] (n= 24)	0,103
IFN-γ	77,95 [13,47; 120,38] (n= 10)	69,22 [14,97; 101, 33] (n=10)	13,42 [8,86; 41,60] (n= 22)	0,044
TNF-α	3, 14 [0,45; 6,95] (n= 12)	43,73 [1,86; 4,40] (n= 10)	1,26 [0,56; 3,93] (n= 24)	0,173
IL-10	14,85 [2,81; 434,1] (n= 12)	23,01 [12,20; 266,7] (n= 10)	41,01 [4,76; 238,4] (n= 24)	0,071
IL-8	1,49 [0,54; 5,84] (n= 12)	4,26 [1,66; 19,15] (n= 10)	7,60 [2,21; 23,91]* (n= 24)	0,022
IL-4	ND (n=12)	ND (n=10)	ND (n=24)	
IL-15	2,29 [1,17; 3,78] (n= 12)	1,44 [0,42; 1,63] (n= 10)	5,72 [1,12; 26,16] (n= 24)	0,059
IL-1ra	0,064 [0; 0,204] (n= 12)	0,012 [0,005; 0,034] (n= 10)	0,213 [0,012; 0,830] (n= 24)	0,093

Dados expressos em mediana [1° quartil; 3° quartil], p =nível de significância do teste de Kruskal-Wallis. A expressão proteica de citocinas normalizada pelo conteúdo de proteína total. CCL2: proteína quimioatratante de monócito; IL-1 β : interleucina-1 beta; IL-6: interleucina-6; IFN- γ : interferon gamma; TNF- α : fator de necrose tumoral-alfa; IL-10: interleucina-10; IL-8: interleucina-8; IL-4: interleucina-4; IL-15: interleucina-15; IL-1ra: receptor antagonista da interleucina-1. * diferença significativa vs N ($p < 0,05$); ND: não detectado através do protocolo utilizado.

Figura 7 – Expressão proteica de citocinas do tecido adiposo visceral (A-IFN- γ ; B-IL-8). Dados expressos em: mínimo, 1º quartil, mediana, 3º quartil e máximo. *diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). A expressão proteica de citocinas foi normalizada pelo conteúdo de proteína total para o tecido visceral. IFN- γ : interferon gamma; IL-8: interleucina-8.

4.6 Correlação do perfil de ácidos graxos e expressão proteica de marcadores inflamatórios no plasma dos pacientes

4.6.1 Correlação entre o perfil de ácido graxo e marcadores inflamatórios

Ao avaliar a correlação do perfil de ácidos graxos, agrupados de acordo com a sua classificação química, e a expressão proteica de citocinas pró e anti-inflamatórias no plasma, foi possível observar no grupo CC (anexo D, tabela 14) uma correlação positiva significativa entre os SFA vs IL-1ra ($r=0,653$ / $p=0,039$), e uma correlação negativa significativa entre PUFA-n3 vs TNF- α ($r=-0,800$ / $p=0,024$) no grupo controle (anexo D, tabela 12). A análise de correlação entre ácidos graxos, individualmente, e a expressão proteica de citocinas de interesse resultou em: no grupo CC (anexo D, tabela 17), correlação positiva significativa entre o ácido graxo 18:0 vs IL-8 ($r=0,764$ / $p=0,016$) e vs CCL2 ($r=0,664$ / $p=0,036$) e do ácido graxo 20:3n6 vs IFN- γ ($r=0,687$ / $p=0,039$) e vs IL-1ra ($r=0,648$ / $p=0,041$); no grupo N (anexo D, tabela 15) a correlação foi significativamente negativa para o ácido graxo 17:0 vs IL-6 ($r=-0,890$ / $p=0,012$) e vs IL-1ra ($r=-0,930$ / $p=0,009$), para o ácido graxo 20:3n6 vs TNF- α ($r=-0,831$ / $p=0,019$) e vs IL-10 ($r=-0,738$ / $p=0,037$), e para o ácido graxo 25:5n3 vs TNF- α ($r=0,730$ / $p=0,039$). No grupo WSC não foi observada nenhuma correlação significativa entre as citocinas e os ácidos graxos individuais ou agrupados (anexo D, tabelas 13 e 16).

4.6.2 Correlação entre os marcadores inflamatórios

A correlação entre a expressão proteica de citocinas anti e pró-inflamatórias avaliadas foi positiva em todos os grupos. Para o grupo CC (anexo D, tabela 20) a correlação foi significativa entre a citocina anti-inflamatória IL-1ra vs IFN- γ ($r=0,825$ / $p=0,013$), vs IL-6

($r=0,631$ / $p=0,046$) e vs IL-8 ($r=0,713$ / $p=0,024$). No grupo WSC (anexo D, tabela 19) a correlação significativa foi entre IL-1ra vs INF- γ ($r=0,623$ / $p=0,039$) e vs CCL2 ($r=0,722$ / $p=0,017$), e entre IL-10 vs IL-6 ($r=0,666$ / $p=0,027$). No grupo N (anexo D, tabela 18) houve correlação significativa entre IL-1ra vs IL-6 ($r=0,921$ / $p=0,009$).

No que se refere a correlação da expressão proteica plasmática entre citocinas pró-inflamatória, observamos também correlações significativamente positiva (anexo D, tabelas 18, 19 e 20). O grupo CC a correlação foi entre IL-6 vs IL-8 ($r=0,844$ / $p=0,008$) e vs CCL2 ($r=0,8349$ / $p=0,008$), e entre IL-8 vs CCL2 ($r=0,700$ / $p=0,027$). Para o grupo WSC foi entre TNF- α vs IL-6 ($r=0,595$ / $p=0,048$) e vs IL-8 ($r=0,762$ / $p=0,012$), e entre CCL2 vs IL-6 ($r=0,718$ / $p=0,017$) e vs IFN- γ ($r=0,756$ / $p=0,012$). E finalmente no grupo N observamos correlação entre IL-8 vs TNF- α ($r=0,733$ / $p=0,0381$).

5 DISCUSSÃO

A caquexia associada ao câncer é uma síndrome paraneoplásica de difícil diagnóstico e tratamento. É amplamente descrita e reconhecida como uma síndrome inflamatória sistêmica crônica, promotora de um profundo caos metabólico; todavia, apesar de todos os esforços de pesquisas básicas e clínicas, a origem precisa deste processo permanece desconhecida (Fearon et al., 2011). Embora a presença do tumor pareça ser uma explicação razoável para tais alterações, uma vez que o mesmo induz alterações no metabolismo energético (Gupta et al., 2014; Revisto por Kishton, Rathmell, 2015) e é capaz de secretar inúmeros fatores inflamatórios (Revisto por Argilés et al., 2014; Revisto por Ben-Baruch, 2012; Revisto por Iijima et al., 2011;), a caquexia não está restrita ao câncer, sendo também observada na doença renal crônica, insuficiência cardíaca crônica, doença pulmonar obstrutiva crônica, entre outras (Argilés et al., 2010; Evans et al., 2008). Além disso, pacientes com tumor no mesmo sítio anatômico ao diagnóstico primário podem ser ou não acometidos por esta síndrome, como podemos observar nos resultados apresentados na tabela 2, revelando que, possivelmente, a resposta do hospedeiro possa ser uma explicação mais plausível para a instalação e manutenção desta síndrome.

Neste cenário, o conhecimento dos mecanismos moleculares subjacentes à síndrome pode permitir a concepção de abordagens terapêuticas precoces e/ou que permitam reverter as diversas manifestações clínicas da caquexia que, além de reduzirem drasticamente a qualidade de vida dos pacientes, frequentemente, levam à morte (Argilés et al., 2014; Barber et al., 1999). Em condições de inflamação sistêmica crônica, como na obesidade que, embora apresente fenótipo oposto ao de pacientes caquéticos, comunga de mecanismos similares, o metabolismo lipídico é visto como um ponto de intersecção entre as diversas manifestações clínicas observadas (Glass, Olefsky, 2012; Martínez-Fernandez et al., 2015). Dessa forma, o presente trabalho pretendeu estabelecer o perfil lipídico de pacientes caquéticos, uma vez que o mesmo pode ser utilizado como ferramenta de diagnóstico para a síndrome, além de correlacionar tal perfil com os marcadores de inflamação sistêmica. Estes aspectos amplos podem ajudar a esclarecer o papel do tecido adiposo na caquexia, como causador da inflamação ou como alvo da mesma ou, ainda, e mais provavelmente, como ambos.

Os diferentes tipos de ácidos graxos e seus metabolitos têm sido descritos como importantes mediadores da inflamação sistêmica crônica, tanto como promotores, assim como ativos na resolução do processo inflamatório (Masoodi et al., 2015; Serhan, 2015). No contexto das neoplasias e caquexia, o perfil lipídico foi alvo de estudo em diversas publicações (Baró et al., 1998; Berstad et al., 2012; Long et al., 2014). Estudo realizado em 1998, por um grupo

espanhol (Baró et al., 1998), mostrou que a porcentagem dos ácidos graxos do tipo ômega 9 e ômega 6 (ácido graxo oleico e linoleico, respectivamente) encontrava-se alterada no plasma de pacientes com câncer de cólon/retal. Em nosso estudo, o mesmo resultado foi encontrado, apontando um aumento na porcentagem relativa da concentração do ácido graxo oleico (18:1c9) circulante e uma redução da de linoleico (18:2n6) nos grupos WSC e CC. Ademais, pudemos observar também uma alteração no perfil lipídico, envolvendo outros ácidos graxos como o aumento de SAF, especificamente dos ácidos esteárico (18:0) e palmítico (16:0).

Sabidamente, os PUFAs modulam o perfil inflamatório de acordo com a razão de ácidos graxos n-6/n-3 consumidos na dieta e discute-se a importância desta razão na prevenção de doenças crônicas não transmissíveis (Gómez Candela et al., 2011; Kang et al., 2011; Noori et al., 2011). Em nossos resultados, observamos uma porcentagem relativa de PUFAs n-6 circulantes reduzida no grupo CC em relação ao N, enquanto que, a de PUFAs n-3 circulante está ausente no grupo CC, aumentando a razão n-6/n-3, indicando uma relação positiva com o aumento do perfil pró inflamatório encontrado.

Evidências científicas têm revelado que os ácidos graxos livres são potentes ativadores de uma cascata de sinalização pró-inflamatória, ativando uma família de receptores do tipo *Toll-like* (TLRs), levando ao aumento na produção de citocinas via NFκB (Batista et al., 2012; Calder, 2013; Huang et al., 2012; Shi et al., 2006). Recentemente, verificamos aumento da expressão gênica da subunidade p65 do NFκB e dos seus genes alvos pró-inflamatórios (TNF-α, IL-1β e CCL2), além da expressão gênica da proteína reguladora do complexo NFκB, a IκB-α, em pacientes caquéticos, como parte deste trabalho de mestrado (Camargo et al., 2015). A ligação dos ácidos graxos com receptores de membrana do tipo TLR-4 culmina na ativação do complexo IKK e posterior fosforilação do inibidor da via NF-κB. Uma vez fosforilado, o inibidor é ubiquitinado e degradado, liberando o NF-κB para exercer sua função nuclear de indução de genes alvos como CCL2, IL-6, IL-8 entre outros (Ortis et al., 2006; figura 8). Devido ao fato de em nosso estudo os pacientes do grupo caquético apresentarem uma correlação positiva entre os SFA e a concentração de mediadores inflamatórios alvos da via do NF-κB, hipotetizamos um papel para esta via na síndrome, atuando como contribuinte da manutenção da indução de mediadores pró-inflamatórios.

Adicionalmente, os AGLs têm sido implicados como supostos gatilhos do complexo inflamassoma NLRP3 (família de receptores do tipo NOD – do inglês *Nod like receptors*), necessários para a maturação da citocinas pró-inflamatórias IL-1β e IL-18 (Vandanmagsar et al., 2011; Wen et al., 2011). Verificamos, em ratos com o tumor Walker 256 (modelo

experimental de caquexia), maior expressão dos genes relacionados à via do inflamassoma (NLRP1, NLRP3 e caspase 1), acompanhados de maior clivagem da IL-1 β no adipócito do tecido mesentérico dos animais (Neves et al., 2015). Juntos, esses dados indicam a participação dos AGLs na ativação dessas vias inflamatórias. Contudo, mais estudos são necessários para comprovar definitivamente esta hipótese.

Figura 8 – A ligação de citocinas a receptores que podem induzir o recrutamento de proteínas adaptadoras proximais, que sinalizam ao complexo I κ B 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 B induz a fosforilação e degradação do inibidor I κ B na via clássica, 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 Shostak e Chariot, 2011.

A perda de tecido adiposo na caquexia pode ocorrer tanto devido a um aumento na lipólise (Agustsson et al., 2007), quanto por uma diminuição na lipogênese (Argiles et al., 1997). Laurencikiene et al. (2007) mostram que o TNF- α é capaz de regular proteínas fundamentais para a lipólise (HSL e perilipina) e ativar a via inflamatória do fator nuclear kappa B (NF- κ B) em patologias diferentes, como obesidade. E, Catalan et al. (2012) esclarecem que o aumento da liberação de AGL ocorre em decorrência de aumento da lipólise, induzido por citocinas pró-inflamatórias, provenientes tanto do sangue quanto do próprio tecido. Além do tecido adiposo, os demais tecidos periféricos também apresentam um déficit em captar AGL e TAG do sangue, o que contribui para alterações no perfil lipídico circulante dos pacientes caquéticos, em relação a pacientes saudáveis (Argiles et al., 1997; Baró et al., 1998). Evans e

Williamson (1988) sugeriram que este quadro ocorre, paralelamente devido a uma redução da atividade da enzima lipase lipoproteica (LPL), responsável pela remoção de TAG circulante para os tecidos periféricos, e Mulligan e Tisdale (1991), discutem que a maior lipogênese hepática estaria relacionada a um maior conteúdo de lipídios no sangue.

Em conjunto, nossos resultados mostram uma redução de TAG, colesterol total e LDL colesterol, revelando uma hipolipidemia nos pacientes caquéticos. Em alguns modelos experimentais a perda de massa adiposa é associada à hiperlipidemia (Busquets et al., 2001; López-Soriano et al., 1996; Puppa et al., 2011), porém, em outros estudos com animais não foram encontrados aumentos significativos (Beck e Tisdale, 2004; Tsoli et al., 2014), permitindo inferir que a localização e as características das células malignas são determinantes para as alterações das lipoproteínas. Como podemos observar na tabela 2, do total de pacientes no presente estudo, 67,57% tinham localização do tumor no cólon/reto. Tsoli et al. (2014), verificaram redução significativa no conteúdo total de TAG em modelo experimental de caquexia associada ao câncer de cólon, mas com concomitante aumento nas concentrações de AGL; cabe ressaltar que estes animais apresentam também redução significativa de massa adiposa. Verificamos ainda uma redução significativa no conteúdo de glicerol circulante, sem alteração na concentração de AGL no CC; porém quando analisamos o conteúdo de AGL/TAG, assim como, o de AGL/Glicerol observamos razão maior de AGL no mesmo grupo. Embora não tenhamos estudado as vias de geração de glicose a partir de precursores não-glicídicos, como o glicerol, é possível supor que este esteja contribuindo para a gliconeogênese, uma vez que a o substrato energético preferencial do tumor é a glicose (Mathupala et al., 1995; Tijerina, 2004).

Relacionando-se, então, este perfil lipídico com o processo inflamatório, observamos em nosso estudo, que o grupo de pacientes caquéticos apresentou conteúdo circulante de mediadores pró-inflamatórios, como IL-6, IL-8 e TNF- α , aumentados. Além desses, a porcentagem de SFA, principalmente do tipo 18:0 está alterada e positivamente correlacionada com a expressão de mediadores pró-inflamatórios característicos da síndrome. Em outro estudo realizado pelo nosso grupo, Batista et al. (2013) verificaram não somente um aumento na concentração plasmática de IL-6, em pacientes com caquexia associada ao câncer (12,41 vezes maior em comparação ao grupo controle) mas também, uma correlação positiva significativa com a expressão gênica dessa mesma citocina no TASC.

Assim, tanto os fatores inflamatórios, como as modificações no perfil de AGL circulantes poderiam funcionar como um indicador precoce da caquexia. No grupo WSC, encontramos 5 pacientes com PCR > 5 mg/L e, dois deles, a expressão proteica de IL-6 apresentou-se superior a 4 pg/ml. Contudo, os pacientes não demonstraram perda de peso

acentuada. Aparentemente, dentro do grupo WSC podemos aventar a presença de pacientes pré-caquéticos, corroborando então, Fearon et al. (2011), que descrevem o estágio pré-caquético com características similares às do nosso grupo WSC. Isso sugere que o diagnóstico da síndrome na fase definida como pré-caquexia é possível, contribuindo para um tratamento mais eficaz (Argiles et al., 2011; Churm et al., 2009; Dewys et al., 1980; Pacelli et al., 2008; Spiro et al., 2006).

O grupo CC utilizado, demonstrou plenamente estar dentro dos critérios propostos. Em nossos resultados foi observado que os pacientes classificados como caquéticos apresentam uma importante redução da massa corporal e do índice de massa corporal. Outro sintoma comumente presente na caquexia é a anemia. Evans et al. (2008), propõem que concentrações séricas de hemoglobina inferior a 12 g/dL sejam utilizadas como critérios para definição da síndrome. Os resultados mostram que a concentração média de hemoglobina dos pacientes do grupo CC foi de 11,2 [8,3; 12,1] g/dL, inferior ao valor de referência defendido pelos pesquisadores supracitados e significativamente diferentes de todos os demais grupos. Os mesmos autores indicam que a concentração de proteína C reativa superior a 5 mg/L seja utilizada como um dos critérios para definir caquexia e Baumann e Gaudie (1994) relatam que em situações em que há inflamação, o conteúdo de PCR circulante encontra-se aumentado. Diante disso, observamos que a inflamação está efetivamente presente em nossos pacientes dentro do grupo caquético e os resultados mostraram que houve diferença significativa entre os grupos: os pacientes WSC apresentaram valores superiores ao controle (3,95 [0,7; 5,5] mg/L) e os pacientes CC (11,5 [6,3; 12,7] mg/L), mostraram concentração ainda mais aumentada de PCR e diferença significativa também em relação ao WSC.

Conforme mencionado anteriormente, a caquexia está presente em aproximadamente 50% dos pacientes com câncer e em até 80 % nos casos avançados da doença está associada com redução na tolerância ao tratamento do câncer, na qualidade de vida e na duração da sobrevida, representando a causa imediata de morte de 22% a 40% dos pacientes (Seelaender et al., 2012). Os resultados obtidos pelo questionário QLQ-C30 indicam claramente uma redução na qualidade de vida global, aumento dos sintomas relacionados à síndrome, além da presença de anorexia. Além de corroborarem diversas publicações que investigaram a qualidade de vida de pacientes com caquexia associada ao câncer (Kanat et al., 2013; Ruggeri et al., 2013), estes resultados são de relevância clínica, pois, segundo Liedman et al., (2001) a identificação correta e consequente controle dos sintomas pode melhorar a qualidade de vida, a composição corporal e a ingestão de alimentos em pacientes com câncer gástrico.

Por fim, os AGLs presentes no plasma ou provenientes do tecido contribuem para a inflamação sistêmica sendo um possível ativador de vias inflamatórias, como a via do TLR-4 e consequentemente a do NFκB. Propomos assim, que mesmo antes do estabelecimento das mudanças presentes como critérios para o diagnóstico de caquexia, o perfil de AGL e de citocinas possam fornecer subsídios precoces para a detecção do estado pré-caquético.

6 CONCLUSÃO

As alterações encontradas nos pacientes do grupo CC caracterizam a inflamação sistêmica e as alterações do perfil de ácidos graxos livres sugerem que o perfil lipídico tem papel na manutenção e desenvolvimento de processos inflamatórios que culminam em processos crônicos como a caquexia. O tecido adiposo é reconhecido não somente como vítima da caquexia por sofrer elevada lipólise, mas também sendo um contribuinte, modificando o perfil de ácidos graxos plasmáticos e sintetizando fatores pró-inflamatório de pacientes caquéticos serem estocados preferencialmente no tecido adiposo. Uma vez que este tecido sofre elevada lipólise, ele passa a contribuir com o fornecimento destes mediadores lipídicos com potencial pró-inflamatório para tecidos periféricos. Este estudo traz uma contribuição única à literatura, ao estabelecer uma correlação positiva entre mediadores lipídicos e pró-inflamatórios, e demonstrar exatamente o contrário em pacientes controle, exaltando a importância do perfil de lipídios para o desenvolvimento de processos inflamatórios.

REFERÊNCIAS*

- Agustsson T, Rydén M, Hoffstedt J, van Harmelen V, Dicker A, Laurencikiene J, Isaksson B, Permert J, Arner P. Mechanism of increased lipolysis in cancer cachexia. *Cancer Res.* 2007 Jun 1;67(11):5531-7.
- Argilés JM, Alvarez B, López-Soriano FJ. The metabolic basis of cancer cachexia. *Med Res Rev.* 1997 Sep;17(5):477-98.
- Argilés JM, Anker SD, Evans WJ, Morley JE, Fearon KC, Strasser F, Muscaritoli M, Baracos VE. Consensus on cachexia definitions. *J Am Med Dir Assoc.* 2010 May;11(4):229-30.
- Argilés JM, Busquets S, López-Soriano FJ. Anti-inflammatory therapies in cancer cachexia. *Eur J Pharmacol.* 2011 Sep;668 Suppl 1:S81-6.
- Argilés JM, Busquets S, Stemmler B, López-Soriano FJ. Cancer cachexia: understanding the molecular basis. *Nat Rev Cancer.* 2014 Nov; 14(11):754-62.
- Argilés JM, Busquets S, Toledo M, López-Soriano FJ. The role of cytokines in cancer cachexia. *Curr Opin Support Palliat Care.* 2009 Dec;3(4):263-8.
- 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, 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.
- Barber MD, Ross JA, Fearon KC. Cancer cachexia. *Surg Oncol.* 1999 Nov;8(3):133-41.
- Baró L, Hermoso JC, Núñez MC, Jiménez-Rios JA, Gil A. Abnormalities in plasma and red blood cell fatty acid profiles of patients with colorectal cancer. *Br J Cancer.* 1998 Jun;77(11):1978-83.
- Batista ML Jr, Neves RX, Peres SB, Yamashita AS, Shida CS, Farmer SR, Seelaender M. Heterogeneous time-dependent response of adipose tissue during the development of cancer cachexia. *J Endocrinol.* 2012 Dec;215(3):363-73.
- Batista ML Jr, Olivan M, Alcantara PS, Sandoval R, Peres SB, Neves RX, Silverio R, Maximiano LF, Otoch JP, Seelaender M. Adipose tissue-derived factors as potential biomarkers in cachectic cancer patients. *Cytokine.* 2013 Feb;61(2):532-9.
- 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.
- Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. *Immunol Today.* 1994 Feb;15(2):74-80.
- Beck SA, Tisdale MJ. Effect of cancer cachexia on triacylglycerol/fatty acid substrate cycling in white adipose tissue. *Lipids.* 2004 Dec;39(12):1187-9.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscript submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

- Ben-Baruch A. The Tumor-Promoting Flow of Cells Into, Within and Out of the Tumor Site: Regulation by the Inflammatory Axis of TNF α and Chemokines. *Cancer Microenviron.* 2012 Aug; 5(2):151-64.
- Berstad P, Thiis-Evensen E, Vatn MH, Almendingen K. Fatty acids in habitual diet, plasma phospholipids, and tumour and normal colonic biopsies in young colorectal cancer patients. *J Oncol.* 2012;2012:254801.
- Bertevello PS, Seelaender MC. Heterogeneous response of adipose tissue to cancer cachexia. *Braz J Med Biol Res.* 2001 Sep;34(9):1161-7.
- Bing C. Lipid mobilization in cachexia: mechanisms and mediators. *Curr Opin Support Palliat Care.* 2011 Dec;5(4):356-60.
- Busquets S, Carbó N, Almendro V, Figueras M, López-Soriano FJ, Argilés JM. Hyperlipemia: a role in regulating UCP3 gene expression in skeletal muscle during cancer cachexia? *FEBS Lett.* 2001 Sep 14;505(2):255-8.
- Calder PC. Long chain fatty acids and gene expression in inflammation and immunity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2013 Jul;16(4):425-33.
- Calder PC. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr.* 2006 Jun;83(6 Suppl):1505S-1519S.
- Camargo RG, Riccardi DM, Ribeiro HQ, Carnevali LC Jr, de Matos-Neto EM, Enjiu L, Neves RX, Lima JD, Figuerêdo RG, de Alcântara PS, Maximiano L, Otoch J, Batista M Jr, Püschel G, Seelaender M. NF- κ Bp65 and Expression of Its Pro-Inflammatory Target Genes Are Upregulated in the Subcutaneous Adipose Tissue of Cachectic Cancer Patients. *Nutrients.* 2015 Jun 4;7(6):4465-79.
- Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Rodríguez A, Ramírez B, Rotellar F, Valentí V, Silva C, Gil MJ, Salvador J, Frühbeck G. Increased tenascin C and Toll-like receptor 4 levels in visceral adipose tissue as a link between inflammation and extracellular matrix remodeling in obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012 Oct;97(10):E1880-9.
- Churm D, Andrew IM, Holden K, Hildreth AJ, Hawkins C. A questionnaire study of the approach to the anorexia-cachexia syndrome in patients with cancer by staff in a district general hospital. *Support Care Cancer.* 2009 May;17(5):503-7.
- Consenso brasileiro de caquexia e anorexia em cuidados paliativos. *Revista Brasileira de Cuidados Paliativos.* 2011;3:1-42.
- Costa I, Moral R, Solanas M, Andreu FJ, Ruiz de Villa MC, Escrich E. High corn oil and extra virgin olive oil diets and experimental mammary carcinogenesis: clinicopathological and immunohistochemical p21Ha-Ras expression study. *Virchows Arch.* 2011 Feb;458(2):141-51.
- Dewys WD, Begg C, Lavin PT, Band PR, Bennett JM, Bertino JR, Cohen MH, Douglass HO Jr, Engstrom PF, Ezdinli EZ, Horton J, Johnson GJ, Moertel CG, Oken MM, Perlia C, Rosenbaum C, Silverstein MN, Skeel RT, Sponzo RW, Tormey DC. Prognostic effect of

weight loss prior to chemotherapy in cancer patients. Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Med.* 1980 Oct;69(4):491-7.

Duval PA, Vargas BL, Fripp JC, Arrieira ICO, Lazzeri B, Destri K, Assunção MCF. Caquexia em pacientes oncológicos internados em um programa de internação domiciliar interdisciplinar. *Revista Brasileira de Cancerologia.* 2010;56(2):207-12.

Dwyer JH, Allayee H, Dwyer KM, Fan J, Wu H, Mar R, Lusi AJ, Mehrabian M. Arachidonate 5-lipoxygenase promoter genotype, dietary arachidonic acid, and atherosclerosis. *N Engl J Med.* 2004 Jan 1;350(1):29-37.

Evans RD, Williamson DH. Tissue-specific effects of rapid tumour growth on lipid metabolism in the rat during lactation and on litter removal. *Biochem J.* 1988 May 15;252(1):65-72.

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.

Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2005 May;115(5):911-9; quiz 920.

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.

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

Fearon KC, Voss AC, Hustead DS; Cancer Cachexia Study Group. Definition of cancer cachexia: effect of weight loss, reduced food intake, and systemic inflammation on functional status and prognosis. *Am J Clin Nutr.* 2006 Jun;83(6):1345-50.

Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem.* 1957 May; 226(1):497-509.

Fox KM, Brooks JM, Gandra SR, Markus R, Chiou CF. Estimation of Cachexia among Cancer Patients Based on Four Definitions. *J Oncol.* 2009;2009:693458.

Glass CK, Olefsky JM. Inflammation and lipid signaling in the etiology of insulin resistance. *Cell Metab.* 2012 May 2;15(5):635-45.

Gómez Candela C, Bermejo López LM, Loria Kohen V. Importance of a balanced omega 6/omega 3 ratio for the maintenance of health: nutritional recommendations. *Nutr Hosp.* 2011 Mar-Apr;26(2):323-9.

González-Pérez A, Horrillo R, Ferré N, Gronert K, Dong B, Morán-Salvador E, Titos E, Martínez-Clemente M, López-Parra M, Arroyo V, Clària J. Obesity-induced insulin resistance

and hepatic steatosis are alleviated by omega-3 fatty acids: a role for resolvins and protectins. *FASEB J.* 2009 Jun;23(6):1946-57.

Gupta V, Gopinath P, Iqbal MA, Mazurek S, Wellen KE, Bamezai RN. Interplay between epigenetics & cancer metabolism. *Curr Pharm Des.* 2014; 20(11):1706-14.

Huang S, Rutkowski JM, Snodgrass RG, Ono-Moore KD, Schneider DA, Newman JW, Adams SH, Hwang DH. Saturated fatty acids activate TLR-mediated proinflammatory signaling pathways. *J Lipid Res.* 2012 Sep;53(9):2002-13.

Iijima J, Konno K, Itano N. Inflammatory alterations of the extracellular matrix in the tumor microenvironment. *Cancers (Basel).* 2011 Aug 9;3 (3):3189-205.

Itoh M, Suganami T, Hachiya R, Ogawa Y. Adipose tissue remodeling as homeostatic inflammation. *Int J Inflam.* 2011;2011:720926.

Kanat O, Cubukcu E, Avci N, Budak F, Ercan I, Canhoroz M, Olmez F. Comparison of three different treatment modalities in the management of cancer cachexia. *Tumori.* 2013 Mar-Apr;99(2):229-33.

Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Egashira K, Kasuga M. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest.* 2006 Jun;116(6):1494-505.

Kang JX. Omega-3: a link between global climate change and human health. *Biotechnol Adv.* 2011 Jul-Aug;29(4):388-90.

Kazantzis M, Seelaender MC. Cancer cachexia modifies the zonal distribution of lipid metabolism-related proteins in rat liver. *Cell Tissue Res.* 2005 Sep;321(3):419-27.

Kishton RJ, Rathmell JC. Novel therapeutic targets of tumor metabolism. *Cancer J.* 2015 Mar-Apr; 21(2):62-9.

Kremmyda LS, Tvrzicka E, Stankova B, Zak A. Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease: a review. part 2: fatty acid physiological roles and applications in human health and disease. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2011 Sep;155(3):195-218.

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* 2006 Apr-Jun; 27(2-3):95-125.

Laurencikiene J, van Harmelen V, Arvidsson Nordström E, Dicker A, Blomqvist L, Näslund E, 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.

Lee YH, Giraud J, Davis RJ, White MF. c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. *J Biol Chem.* 2003 Jan 31;278(5):2896-902.

Liedman B, Svedlund J, Sullivan M, Larsson L, Lundell L. Symptom control may improve food intake, body composition, and aspects of quality of life after gastrectomy in cancer patients. *Dig Dis Sci*. 2001 Dec;46(12):2673-80.

Lira FS, Rosa JC, Pimentel GD, Tarini VA, Arida RM, Faloppa F, Alves ES, do Nascimento CO, Oyama LM, Seelaender M, de Mello MT, Santos RV. Inflammation and adipose tissue: effects of progressive load training in rats. *Lipids Health Dis*. 2010 Oct 4;9:109.

Long QQ, Yi YX, Qiu J, Xu CJ, Huang PL. Fatty acid synthase (FASN) levels in serum of colorectal cancer patients: correlation with clinical outcomes. *Tumour Biol*. 2014 Apr;35(4):3855-9.

López-Soriano J, Argilés JM, López-Soriano FJ. Lipid metabolism in rats bearing the Yoshida AH-130 ascites hepatoma. *Mol Cell Biochem*. 1996 Dec 6;165(1):17-23.

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.

Martínez-Fernández L, Laiglesia LM, Huerta AE, Martínez JA, Moreno-Aliaga MJ. Omega-3 fatty acids and adipose tissue function in obesity and metabolic syndrome. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2015 Jul 25.

Masoodi M, Kuda O, Rossmeisl M, Flachs P, Kopecky J. Lipid signaling in adipose tissue: Connecting inflammation & metabolism. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Apr;1851(4):503-518.

Mathupala SP, Rempel A, Pedersen PL. Glucose catabolism in cancer cells. Isolation, sequence, and activity of the promoter for type II hexokinase. *J Biol Chem*. 1995 Jul 14;270(28):16918-25.

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

Moreno-Aliaga MJ, Lorente-Cebrián S, Martínez JA. Regulation of adipokine secretion by n-3 fatty acids. *Proc Nutr Soc*. 2010 Aug;69(3):324-32.

Mulligan HD, Tisdale MJ. Metabolic substrate utilization by tumour and host tissues in cancer cachexia. *Biochem J*. 1991 Jul 15;277:321-6.

Muscaritoli M, Anker SD, Argilés J, Aversa Z, Bauer JM, Biolo G, Boirie Y, Bosaeus I, Cederholm T, Costelli P, Fearon KC, Laviano A, Maggio M, Rossi Fanelli F, Schneider SM, Schols A, Sieber CC. Consensus definition of sarcopenia, cachexia and pre-cachexia: joint document elaborated by Special Interest Groups (SIG) "cachexia-anorexia in chronic wasting diseases" and "nutrition in geriatrics". *Clin Nutr*. 2010 Apr;29(2):154-9.

Neves RX, Rosa JC, Yamashita AS, Matos Neto EM, Riccardi DMR, Santos FL, Batista Jr ML, Seelaender MCL. White adipose tissue cells and the progression of cachexia: inflammatory pathways. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*, 2015

Noori N, Dukkipati R, Kovesdy CP, Sim JJ, Feroze U, Murali SB, Bross R, Benner D, Kopple JD, Kalantar-Zadeh K. Dietary omega-3 fatty acid, ratio of omega-6 to omega-3 intake, inflammation, and survival in long-term hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis*. 2011 Aug;58(2):248-56.

Obukowicz MG, Raz A, Pyla PD, Rico JG, Wendling JM, Needleman P. Identification and characterization of a novel delta6/delta5 fatty acid desaturase inhibitor as a potential anti-inflammatory agent. *Biochem Pharmacol*. 1998 Apr 1;55(7):1045-58.

Obukowicz MG, Welsch DJ, Salsgiver WJ, Martin-Berger CL, Chinn KS, Duffin KL, Raz A, Needleman P. Novel, selective delta6 or delta5 fatty acid desaturase inhibitors as antiinflammatory agents in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998 Oct;287(1):157-66.

Ortis F, Cardozo AK, Crispim D, Störling J, Mandrup-Poulsen T, Eizirik DL. Cytokine-induced proapoptotic gene expression in insulin-producing cells is related to rapid, sustained, and nonoscillatory nuclear factor-kappaB activation. *Mol Endocrinol*. 2006 Aug;20(8):1867-79.

Pacelli F, Bossola M, Rosa F, Tortorelli AP, Papa V, Doglietto GB. Is malnutrition still a risk factor of postoperative complications in gastric cancer surgery? *Clin Nutr*. 2008 Jun;27(3):398-407.

Pais-ribeiro J, Pinto C, Santos C. Validation study of the portuguese version of the QLC-C30-V.3. *Psic., Saúde & Doenças*. 2008;9(1):89-102.

Peinado JR, Jimenez-Gomez Y, Pulido MR, Ortega-Bellido M, Diaz-Lopez C, Padillo FJ, Lopez-Miranda J, Vazquez-Martínez R, Malagón MM. The stromal-vascular fraction of adipose tissue contributes to major differences between subcutaneous and visceral fat depots. *Proteomics*. 2010 Sep;10(18):3356-66.

Puppa MJ, White JP, Sato S, Cairns M, Baynes JW, Carson JA. Gut barrier dysfunction in the Apc(Min/+) mouse model of colon cancer cachexia. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Dec;1812(12):1601-6.

Ramos KL, Colquhoun A. Protective role of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in the metabolic response of C6 rat glioma cells to polyunsaturated fatty acid exposure. *Glia*. 2003 Aug;43(2):149-66.

Ribeiro HQT. Papel da via do TLR-4 dependente do MyD88 na inflamação do tecido adiposo subcutâneo de pacientes com câncer e caquexia. [Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Ruggeri E, Agostini F, Fettucciari L, Giannantonio M, Pironi L, Pannuti F. Home artificial nutrition in advanced cancer patients. *Tumori*. 2013 Mar-Apr;99(2):218-24.

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 MCL. Metabolismo de lípidos em ratos portadores do tumor de Walker 256: avaliação do sistema carnitina palmitoil transferase mitocondrial hepático. [Tese

(Doutorado em Fisiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 1995.

Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol*. 2008 May;8(5):349-61.

Serhan CN. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature*. 2014 Jun 5;510(7503):92-101.

Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006 Nov;116(11):3015-25.

Shostak K, Chariot A. NF- κ B, stem cells and breast cancer: the links get stronger. *Breast Cancer Res*. 2011 Jul 26;13(4):214.

Silvério R. A modulação da lipase de triacilglicerol do adipócito (ATGL) e da perilipina 1 contribui para o aumento da lipólise em pacientes caquéticos.[tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual)].São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Spiro A, Baldwin C, Patterson A, Thomas J, Andreyev HJ. The views and practice of oncologists towards nutritional support in patients receiving chemotherapy. *Br J Cancer*. 2006 Aug 21;95(4):431-4.

Springer J, von Haehling S, Anker SD. The need for a standardized definition for cachexia in chronic illness. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2006 Aug;2(8):416-7.

Suganami T, Nishida J, Ogawa Y. A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 Oct;25(10):2062-8.

Suganami T, Tanimoto-Koyama K, Nishida J, Itoh M, Yuan X, Mizuarai S, Kotani H, Yamaoka S, Miyake K, Aoe S, Kamei Y, Ogawa Y. Role of the Toll-like receptor 4/NF-kappaB pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007 Jan;27(1):84-91.

Tan BH, Fearon KC. Cachexia: prevalence and impact in medicine. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2008 Jul;11(4):400-7.

Tijerina AJ. The biochemical basis of metabolism in cancer cachexia. *Dimens Crit Care Nurs*. 2004 Nov-Dec;23(6):237-43.

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

Tsoli M, Schweiger M, Vanniasinghe AS, Painter A, Zechner R, Clarke S, Robertson G. Depletion of white adipose tissue in cancer cachexia syndrome is associated with inflammatory signaling and disrupted circadian regulation. *PLoS One*. 2014 Mar 25;9(3):e92966.

Vandanmagsar B, Youm YH, Ravussin A, Galgani JE, Stadler K, Mynatt RL, et al. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Med* 2011;17:179–88.

Vitseva OI, Tanriverdi K, Tchkonja TT, Kirkland JL, McDonnell ME, Apovian CM, Freedman J, Gokce N. Inducible Toll-like receptor and NF-kappaB regulatory pathway expression in human adipose tissue. *Obesity (Silver Spring)*. 2008 May;16(5):932-7.

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.

Wen H, Gris D, Lei Y, Jha S, Zhang L, Huang MT, et al. Fatty acid-induced NLRP3 ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nat Immunol* 2011;12:408–15.

White PJ, Marette A. Is omega-3 key to unlocking inflammation in obesity? *Diabetologia*. 2006 Sep;49(9):1999-2001.

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

ESTUDO: Heterogeneidade do tecido adiposo na caquexia: perfil lipídico dos depósitos subcutâneo e visceral em pacientes com câncer.

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

Eu, _____, sexo _____, profissão _____, residente e domiciliado na _____, telefone _____, portador da Cédula de identidade, RG _____ e inscrito no CPF/MF _____, nascido (a) em ____/____/____, abaixo assinado (a), concordo de livre e espontânea vontade em participar como voluntário (a) do estudo ***“Heterogeneidade do tecido adiposo na caquexia: perfil lipídico dos depósitos subcutâneo e visceral em pacientes com câncer”***. Declaro que obtive todas as informações necessárias, bem como todos os eventuais esclarecimentos quanto às dúvidas por mim apresentadas e que irei receber uma via idêntica deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Estou ciente que:

- I) O estudo se faz necessário para que possamos investigar as possíveis causas da caquexia, caracterizada pela grande perda de peso, atrofia muscular, fadiga, fraqueza e diminuição do apetite; temos como objetivo verificar se a caquexia afeta as microestruturas do fígado e também a verificação do metabolismo hepático;
- II) Caso o paciente aceite participar desta pesquisa e **dependendo de cada procedimento cirúrgico** efetuado, poderá ser retirados fragmentos de aproximadamente um grama por tecido (**sendo ele: adiposo subcutâneo e visceral**), com tempo total de coleta de aproximadamente 5 minutos. Esse procedimento possui grau de risco mínimo e não interfere nos procedimentos padrões da cirurgia. Mas se houver intercorrência com o (a) participante da pesquisa, decorrente da pesquisa, este será atendido no HU/USP, segundo o critério do mesmo (Hospital de atendimento secundário). Esse material coletado será importante para o entendimento da etiologia do processo da caquexia;
- III) Concordo que serão realizadas coletas de **20 mL de sangue** em pacientes com câncer (exceto hepático), mas sem caquexia e pacientes com câncer (exceto hepático) e caquexia, para que os parâmetros plasmáticos e séricos possam ser aferidos. A coleta será realizada por um profissional da saúde devidamente habilitado e ocorrerá durante a sessão do treino. Nos pacientes controles será realizada previamente à cirurgia uma coleta de sangue (**20 ml**), sem interferir no procedimento cirúrgico, por um profissional da saúde devidamente habilitado;

() Sim ou () Não
- IV) Essas coletas (sangue e tecido) serão realizadas apenas para este estudo e ou em outros projetos (pesquisas futuras) desde que autorizada pela Comissão de Ética deste Instituto, em nada influenciará o tratamento e não modificará o procedimento anestésico e cirúrgico;
- V) Não vai me curar, não vai me causar nenhum problema, não haverá nenhum incômodo de dor no momento da coleta;
- VI) A participação neste projeto não tem objetivo de me submeter a um tratamento, bem como não me acarretará qualquer despesa financeira com relação aos procedimentos médicos, clínicos e terapêuticos efetuados com o estudo;

- VII)** Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;
- VIII)** A desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem estar físico. Não virá a interferir no atendimento ou tratamento médico;
- IX)** Os resultados obtidos durante este estudo serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados;
- X)** Concordo que o material e os dados coletados, por mim autorizados, e os resultados de análises obtidos pelos pesquisadores poderão ser utilizados em outros projetos (pesquisas futuras);
() Sim ou () Não
- XI)** Concordo que após os materiais serem coletados e armazenados em soluções específicas para cada técnica, serão acondicionados em freezer -80° para manter a integridade do tecido, e posteriormente serem utilizados;
() Sim ou () Não
- XII)** Concordo que após os materiais serem utilizados para fins de pesquisa e os objetivos serem alcançados, o restante será incinerado em local para descarte de material biológico humano, conforme preconizado nas resoluções do Conselho Nacional de Saúde (CNS);
() Sim ou () Não
- XIII)** Caso eu desejar, poderei pessoalmente tomar conhecimento dos resultados ao final desta pesquisa que terá uma duração prevista de 12 a 18 meses;
() Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
() Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

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

São Paulo, _____ de _____ de 20____

() 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

ANEXO B – Questionário de qualidade de vida - EORTC QLC-C30

PORTUGUESE

EORTC QO-C30 (version 3)

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

Escreva as iniciais do seu nome:

A data de nascimento (dia, mês, ano):

A data de hoje (dia, mês, ano):

31

	Não	Um pouco	Bastante	Muito
1. Custa-lhe fazer esforços mais violentos, por exemplo, carregar um saco de compras pesado ou uma mala?	1	2	3	4
2. Custa-lhe percorrer uma <u>grande</u> distância a pé?	1	2	3	4
3. Custa-lhe dar um <u>pequeno</u> passeio a pé, fora de casa?	1	2	3	4
4. Precisa de ficar na cama ou numa cadeira durante o dia?	1	2	3	4
5. Precisa que o/a ajudem a comer, a vestir-se, a lavar-se ou a ir à casa de banho?	1	2	3	4
Durante a última semana :				
	Não	Um pouco	Bastante	Muito
6. Sentiu-se limitado/a no seu emprego ou no desempenho das suas actividades diárias?	1	2	3	4
7. Sentiu-se limitado/a na ocupação habitual dos seus tempos livres ou noutras actividades de lazer?	1	2	3	4
8. Teve falta de ar?	1	2	3	4
9. Teve dores?	1	2	3	4
10. Precisou de descansar?	1	2	3	4
11. Teve dificuldade em dormir?	1	2	3	4
12. Sentiu-se fraco/a?	1	2	3	4
13. Teve falta de apetite?	1	2	3	4
14. Teve enjoos?	1	2	3	4
15. Vomitou?	1	2	3	4

Por favor, passe à página seguinte

Durante a última semana :	Não	Um pouco	Bastante	Muito
16. Teve prisão de ventre?	1	2	3	4
17. Teve diarreia?	1	2	3	4
18. Sentiu-se cansado/a?	1	2	3	4
19. As dores perturbaram as suas actividades diárias?	1	2	3	4
20. Teve dificuldade em concentrar-se, por exemplo, para ler o jornal ou ver televisão?	1	2	3	4
21. Sentiu-se tenso/a?	1	2	3	4
22. Teve preocupações?	1	2	3	4
23. Sentiu-se irritável?	1	2	3	4
24. Sentiu-se deprimido/a?	1	2	3	4
25. Teve dificuldade em lembrar-se das coisas?	1	2	3	4
26. O seu estado físico ou tratamento médico interferiram na sua vida <u>familiar</u> ?	1	2	3	4
27. O seu estado físico ou tratamento médico interferiram na sua actividade <u>social</u> ?	1	2	3	4
28. O seu estado físico ou tratamento médico causaram-lhe problemas de ordem financeira?	1	2	3	4

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

29. Como classificaria a sua saúde em geral durante a última semana?

1	2	3	4	5	6	7
Péssima						Óptima

30. Como classificaria a sua qualidade de vida global durante a última semana?

1	2	3	4	5	6	7
Péssima						Óptima

ANEXO C – Questionário de anorexia – FAACT-ESPEN

Nome e sobrenome:

Sexo: Data de nascimento:

Tipo de neoplasia:

Estadiamento:

Terapia precedente:

Comorbidade:

Primeira visita:

Perda de peso(S/N):

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

Peso (na hospitalização):

Altura:

IMC:

Como está seu apetite no último mês? Aumentado Normal Diminuído

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

Pontuação anoréxica

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

Questionário anorexia

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

Escala analógica visual

Faminto

Saciado

Cm:

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

Terapia realizada (cirurgia/ radio/ quimio):

Complicações:

ANEXO D – Tabelas de correlação entre perfil de ácidos graxos e marcadores inflamatórios

Tabela 12 – Corelação da porcentagem de ácidos graxos no plasma, agrupados conforme sua classificação, e expressão proteica de marcadores inflamatórios de pacientes no grupo controle (N).

	IFN- γ (pg/ml)	IL-1ra (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-8 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	CCL2 (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)
SAF (%)	0,4077 (8)	0,0084 (9)	-0,0612 (9)	0,2500 (9)	0,5071 (9)	-0,0500 (9)	0,1667 (9)
	0,2807	0,9810	0,8626	0,4795	0,1515	0,8875	0,6373
MUFA (%)	0,0741 (8)	0,4286 (9)	0,6121 (9)	-0,2000 (9)	-0,3148 (9)	0,0667 (9)	0,0667 (9)
	0,8445	0,2254	0,0834	0,5716	0,3733	0,8504	0,8504
PUFA (%)	-0,0494 (8)	-0,1429 (9)	-0,1574 (9)	-0,1000 (9)	-0,2273 (9)	0,2333 (9)	-0,1000 (9)
	0,8960	0,6862	0,6562	0,7773	0,5202	0,5093	0,7773
PUFA-n3 (%)	-0,5559 (8)	-0,4538 (9)	-0,4634 (9)	-0,6167 (9)	-0,5596 (9)	-0,2833 (9)	-0,8000 (9)
	0,1413	0,1993	0,1899	0,0811	0,1135	0,4229	0,0237
PUFA-n6 (%)	-0,0494 (8)	-0,1429 (9)	-0,1574 (9)	-0,1000 (9)	-0,2273 (9)	0,2333 (9)	-0,1000 (9)
	0,8960	0,6862	0,6562	0,7773	0,5202	0,5093	0,7773

Valores do Coeficiente da Correlação de Spearman (r), tamanho amostral (n) e nível de significância (p). Dados destacados em azul $r > 0,800$, dados destacados em vermelho $p < 0,05$.

Tabela 13 –Correlação da porcentagem de ácidos graxos no plasma, agrupados conforme sua classificação, e expressão proteica de marcadores inflamatórios de pacientes no grupo câncer sem caquexia (WSC).

	IFN- γ (pg/ml)	IL-1ra (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-8 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	CCL2 (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)
SAF (%)	-0,3128	0,0000	-0,4378	-0,1818	-0,2632	-0,2587	-0,0490
	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)
	0,2995	1,0000	0,1465	0,5465	0,3828	0,3908	0,8710
MUFA (%)	0,4288	0,1092	0,1646	-0,0140	0,4737	0,2028	0,1399
	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)
	0,1549	0,7173	0,5851	0,9630	0,1162	0,5012	0,6427
PUFA (%)	-0,0668	-0,2958	0,1436	0,1329	-0,2421	-0,0839	-0,1189
	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)
	0,8247	0,3266	0,6339	0,6594	0,4220	0,7808	0,6934
PUFA-n6 (%)	0,0879	-0,2394	0,3783	0,3566	-0,1298	0,0280	0,0909
	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)
	0,7707	0,4271	0,2096	0,2369	0,6668	0,9261	0,7630

Valores do Coeficiente da Correlação de Spearman (r), tamanho amostral (n) e nível de significância (p). Dados destacados em azul $r > 0,800$, dados destacados em vermelho $p < 0,05$.

Tabela 14 –Correlação da porcentagem de ácidos graxos no plasma, agrupados conforme sua classificação, e expressão proteica de marcadores inflamatórios de pacientes no grupo câncer sem caquexia (CC).

	IFN- γ (pg/ml)	IL-1ra (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-8 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	CCL2 (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)
SAF (%)	0,5664	0,6529	0,3670	0,5182	0,1060	0,0818	0,1636
	(10)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)
	0,0893	0,0390	0,2458	0,1013	0,7375	0,7958	0,6048
MUFA (%)	-0,1322	-0,2207	-0,2569	-0,2545	0,2581	-0,0091	-0,0636
	(10)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)
	0,6917	0,4852	0,4166	0,4209	0,4144	0,9771	0,8405
PUFA (%)	0,4103	0,5069	0,2667	0,2597	0,4111	-0,0273	0,0364
	(10)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)
	0,2183	0,1089	0,3991	0,4115	0,1936	0,9311	0,9082
PUFA-n6 (%)	0,4103	0,5069	0,2667	0,2597	0,4111	-0,0273	0,0364
	(10)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)
	0,2183	0,1089	0,3991	0,4115	0,1936	0,9311	0,9082

Valores do Coeficiente da Correlação de Spearman (r), tamanho amostral (n) e nível de significância (p). Dados destacados em azul $r > 0,800$, dados destacados em vermelho $p < 0,05$.

Tabela 15 –Correlação da porcentagem de ácidos graxos no plasma, individualmente, e expressão proteica de marcadores inflamatórios de pacientes no grupo controle (N).

	IFN- γ (pg/ml)	IL-1 β (pg/ml)	IL-1ra (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-8 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	IL-15 (pg/ml)	CCL2 (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)
14:0	-0,2100 (8)	-0,1369 (9)	0,0168 (9)	-0,1137 (9)	0,4167 (9)	0,2973 (9)	0,5477 (9)	0,0167 (9)	0,2667 (9)
	0,5784	0,6985	0,9621	0,7478	0,2386	0,4004	0,1213	0,9624	0,4507
16:0	0,7289 (8)	0,5477 (9)	0,0336 (9)	0,0874 (9)	0,2333 (9)	0,4372 (9)	0,4108 (9)	-0,0833 (9)	0,2333 (9)
	0,0538	0,1213	0,9242	0,8047	0,5093	0,2163	0,2453	0,8137	0,5093
16:1	-0,1112 (8)	-0,2739 (9)	-0,3950 (9)	-0,5159 (9)	0,1833 (9)	-0,0874 (9)	0,0000 (9)	0,1167 (9)	-0,1167 (9)
	0,7686	0,4386	0,2639	0,1445	0,6041	0,8047	1,0000	0,7414	0,7414
17:0	0,1316 (8)	0,5721 (9)	-0,9304 (9)	-0,8904 (9)	-0,0261 (9)	-0,2009 (9)	-0,3575 (9)	-0,1828 (9)	-0,6180 (9)
	0,7277	0,1056	0,0085	0,0118	0,9411	0,5698	0,3119	0,6052	0,0805
18:0	0,0000 (8)	-0,4108 (9)	0,3193 (9)	0,0350 (9)	0,2167 (9)	0,4284 (9)	0,4108 (9)	0,3500 (9)	0,2833 (9)
	1,0000	0,2453	0,3664	0,9212	0,5400	0,2256	0,2453	0,3222	0,4229
18:1	0,0741 (8)	0,1369 (9)	0,4286 (9)	0,6121 (9)	-0,2000 (9)	-0,3148 (9)	-0,1369 (9)	0,0667 (9)	0,0667 (9)
c9	0,8445	0,6985	0,2254	0,0834	0,5716	0,3733	0,6985	0,8504	0,8504
18:2	0,2224 (8)	0,0000 (9)	-0,4093 (9)	-0,3337 (9)	-0,1506 (9)	0,0088 (9)	-0,5500 (9)	-0,0167 (9)	-0,2176 (9)
	0,5563	1,0000	0,2470	0,3453	0,6701	0,9802	0,1198	0,9622	0,5383
18:3	-0,5559 (8)	-0,4108 (9)	-0,0672 (9)	-0,2273 (9)	-0,5167 (9)	-0,6908 (9)	-0,5477 (9)	0,0667 (9)	-0,5167 (9)
n3	0,1413	0,2453	0,8492	0,5202	0,1439	0,0507	0,1213	0,8504	0,1439
20:3	-0,1646 (8)	0,4178 (9)	-0,3333 (9)	-0,2490 (9)	-0,5255 (9)	-0,7381 (9)	-0,4178 (9)	0,0509 (9)	-0,8306 (9)
n6	0,6633	0,2373	0,3458	0,4812	0,1372	0,0368	0,2373	0,8856	0,0188
20:4	-0,3212 (8)	-0,5477 (9)	-0,0588 (9)	-0,0787 (9)	0,2833 (9)	-0,3672 (9)	-0,2739 (9)	0,5000 (9)	0,0667 (9)
n6	0,3954	0,1213	0,8678	0,8239	0,4229	0,2989	0,4386	0,1573	0,8504
22:5	-0,6252 (8)	0,3000 (9)	-0,3130 (9)	-0,2299 (9)	-0,6755 (9)	-0,3736 (9)	-0,3000 (9)	-0,4747 (9)	-0,7303 (9)
n3	0,0981	0,3961	0,3760	0,5156	0,0560	0,2907	0,3961	0,1794	0,0389

Valores do Coeficiente da Correlação de Spearman (r), tamanho amostral (n) e nível de significância (p). Dados destacados em azul $r > 0,800$, dados destacados em vermelho $p < 0,05$.

Tabela 16 –Correlação da porcentagem de ácidos graxos no plasma, individualmente, e expressão proteica de marcadores inflamatórios de pacientes no grupo câncer sem caquexia (WSC).

	IFN- γ (pg/ml)	IL-1 β (pg/ml)	IL-1ra (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-8 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	IL-15 (pg/ml)	CCL2 (pg/ml)
14:0	-0,4592	0,1359	-0,4272	-0,2433	-0,0870	-0,2074	-0,3771	-0,1233
	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)
	0,1277	0,6523	0,1565	0,4196	0,7729	0,4916	0,2111	0,6827
16:0	-0,3234	0,2184	-0,1655	-0,4904	-0,0839	-0,3228	-0,3846	-0,0839
	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)
	0,2835	0,4689	0,5831	0,1039	0,7808	0,2843	0,2021	0,7808
16:1	0,2917	-0,1310	0,1620	0,1226	0,2587	0,0386	0,3077	0,1329
	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)
	0,3332	0,6639	0,5911	0,6843	0,3908	0,8981	0,3075	0,6594
17:0	0,4043	0,2223	0,0269	0,1765	-0,3203	0,2268	0,2456	-0,1922
	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)
	0,1799	0,4610	0,9289	0,5583	0,2880	0,4519	0,4153	0,5238
18:0	0,0000	-0,1310	0,3310	0,1926	-0,2448	0,3614	0,2028	0,0070
	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)
	1,0000	0,6639	0,2723	0,5229	0,4169	0,2307	0,5012	0,9815
18:1 c9	0,2109	0,1310	-0,0599	0,0140	-0,0559	0,2912	-0,0559	0,1329
	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)
	0,4843	0,6639	0,8426	0,9629	0,8528	0,3341	0,8528	0,6594
18:2	0,0844	-0,2184	-0,2606	0,2592	0,1888	-0,2386	-0,1469	-0,2098
	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)
	0,7796	0,4689	0,3875	0,3900	0,5312	0,4287	0,6262	0,4866
20:3 n6	-0,1276	-0,2797	-0,2969	-0,0019	0,2351	-0,3240	0,0672	0,0597
	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)
	0,6722	0,3536	0,3247	0,9950	0,4355	0,2826	0,8237	0,8430
20:4 n6	-0,2355	-0,2184	-0,4402	0,1997	0,4406	0,0842	0,0350	0,3566
	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)
	0,4348	0,4689	0,1443	0,5079	0,1440	0,7800	0,9077	0,2369
22:5 n3	-0,2588	0,3170	0,1168	-0,3305	-0,5873	0,2510	-0,0508	-0,3843
	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)
	0,3907	0,2931	0,6984	0,2730	0,0514	0,4051	0,8663	0,2024

Valores do Coeficiente da Correlação de Spearman (r), tamanho amostral (n) e nível de significância (p). Dados destacados em azul $r > 0,800$, dados destacados em vermelho $p < 0,05$.

Tabela 17 –Corelação da porcentagem de ácidos graxos no plasma, individualmente, e expressão proteica de marcadores inflamatórios de pacientes no grupo câncer com caquexia (CC).

	IFN- γ (pg/ml)	IL-1 β (pg/ml)	IL-1ra (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-8 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	IL-15 (pg/ml)	CCL2 (pg/ml)	IFN- γ (pg/ml)
14:0	-0,2618	-0,4064	-0,3936	-0,4552	-0,4610	0,1206	0,2181	-0,3817	-0,1537
	(10)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)
	0,4321	0,1987	0,2132	0,1500	0,1449	0,7029	0,4904	0,2274	0,6270
16:0	0,2643	0,0000	0,0874	-0,2110	-0,2455	-0,1337	-0,2000	-0,4727	-0,4545
	(10)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)
	0,4278	1,0000	0,7823	0,5046	0,4376	0,6725	0,5271	0,1349	0,1506
16:1	0,2872	-0,0374	0,1267	-0,0184	-0,0410	-0,1086	0,3508	-0,0774	-0,3007
	(10)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)
	0,3888	0,9060	0,6886	0,9536	0,8968	0,7314	0,2673	0,8065	0,3417
17:0	0,1208	-0,4690	-0,0530	0,4907	0,3146	-0,5075	0,2098	0,3528	0,1907
	(10)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)
	0,7169	0,1380	0,8668	0,1207	0,3197	0,1085	0,5071	0,2646	0,5465
18:0	0,3525	0,5963	0,5012	0,6147	0,7636	0,2443	0,2000	0,6636	0,4091
	(10)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)
	0,2903	0,0593	0,1130	0,0519	0,0157	0,4399	0,5271	0,0359	0,1958
18:1 c9	-0,1322	0,0745	-0,1471	-0,2477	-0,2182	0,2904	-0,1000	-0,0273	0,0455
	(10)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)
	0,6917	0,8137	0,6417	0,4334	0,4902	0,3585	0,7518	0,9313	0,8857
18:2	-0,1573	0,2981	0,2437	-0,0826	-0,0727	0,3779	0,1000	-0,1364	0,5818
	(10)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)
	0,6369	0,3458	0,4409	0,7940	0,8181	0,2321	0,7518	0,6663	0,0658
20:3 n6	0,6872	0,4422	0,6479	0,4219	0,6068	0,2119	-0,1483	0,0809	-0,2427
	(10)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)
	0,0393	0,1620	0,0405	0,1822	0,0550	0,5028	0,6390	0,7981	0,4428
20:4 n6	0,5979	0,5217	0,3908	0,3486	0,3636	0,2857	-0,1000	0,1636	-0,4091
	(10)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)
	0,0729	0,0990	0,2165	0,2702	0,2502	0,3662	0,7518	0,6048	0,1958

Valores do Coeficiente da Correlação de Spearman (r), tamanho amostral (n) e nível de significância (p). Dados destacados em azul $r > 0,800$, dados destacados em vermelho $p < 0,05$.

Tabela 18 – Corelação da expressão proteica de marcadores inflamatórios no plasma de pacientes no grupo controle (N).

	IL-1ra (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-8 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	CCL2 (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)
IFN- γ (pg/ml)	-0,1802 (8) 0,6335	-0,0892 (8) 0,8135	0,2965 (8) 0,4328	0,4212 (8) 0,2651	0,1853 (8) 0,6239	0,1112 (8) 0,7686
		0,9214	0,2185	0,1455	0,4622	0,6219
IL-1ra (pg/ml)		(9) 0,0092	(9) 0,5366	(9) 0,6807	(9) 0,1911	(9) 0,0786
			0,1924	0,2202	0,3323	0,6033
IL-6 (pg/ml)			(9) 0,5864	(9) 0,5334	(9) 0,3473	(9) 0,0879
				0,4372	0,6333	0,7333
IL-8 (pg/ml)				(9) 0,2163	(9) 0,0732	(9) 0,0381
					-0,0874	0,6383
IL-10 (pg/ml)					(9) 0,8047	(9) 0,0710
						0,3667
CCL2 (pg/ml)						(9) 0,2997

Valores do Coeficiente da Correlação de Spearman (r), tamanho amostral (n) e nível de significância (p). Dados destacados em azul $r > 0,800$, dados destacados em vermelho $p < 0,05$.

Tabela 19 – Corelação da expressão proteica de marcadores inflamatórios no plasma de pacientes no grupo câncer sem caquexia (WSC).

	IL-1ra (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-8 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	CCL2 (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)
IFN- γ (pg/ml)	0,6230 (12) 0,0388	0,4190 (12) 0,1646 0,5344 (12) 0,0763	0,1547 (12) 0,6080 0,0493 (12) 0,8701 0,5779 (12) 0,0553	0,1446 (12) 0,6315 0,4647 (12) 0,1233 0,6661 (12) 0,1649 (12) 0,5844	0,7557 (12) 0,0122 0,7218 (12) 0,0167 0,7180 (12) 0,0172 0,2517 (12) 0,4037 0,5228 (12) 0,0829	0,3831 (12) 0,2038 0,3627 (12) 0,2290 0,5954 (12) 0,0483 0,7622 (12) 0,0115 0,3298 (12) 0,2740 0,5594 (12) 0,0635
IL-1ra (pg/ml)						
IL-6 (pg/ml)						
IL-8 (pg/ml)						
IL-10 (pg/ml)						
CCL2 (pg/ml)						

Valores do Coeficiente da Correlação de Spearman (r), tamanho amostral (n) e nível de significância (p). Dados destacados em azul $r > 0,800$, dados destacados em vermelho $p < 0,05$.

Tabela 20 – Correlação do perfil de ácidos graxos, agrupados conforme sua classificação, e expressão proteica de marcadores inflamatórios no plasma de pacientes no grupo câncer sem caquexia (CC).

	IL-1ra (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-8 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	CCL2 (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)
IFN- γ (pg/ml)	0,8245 (10) 0,0134	0,4460 (10) 0,1809 0,6311	0,6231 (10) 0,0616 0,7127	0,6384 (10) 0,0555 0,4802	0,2266 (10) 0,4967 0,3862	-0,1511 (10) 0,6504 0,3632
IL-1ra (pg/ml)		0,0460 (11)	0,0242 (11)	0,1289 (11)	0,2219 (11)	0,2507 (11)
IL-6 (pg/ml)			0,8441 (11) 0,0076	-0,0372 (11) 0,9063	0,8349 (11) 0,0083	0,3119 (11) 0,3239
IL-8 (pg/ml)				0,2028 (11) 0,5214	0,7000 (11) 0,0269	0,2364 (11) 0,4548
IL-10 (pg/ml)					-0,2212 (11) 0,4842	-0,0138 (11) 0,9651
CCL2 (pg/ml)						0,3273 (11) 0,3007

Valores do Coeficiente da Correlação de Spearman (r), tamanho amostral (n) e nível de significância (p). Dados destacados em azul $r > 0,800$, dados destacados em vermelho $p < 0,05$.

ANEXO E – Artigo Publicado