Ariene Murari Soares de Pinho

**Análise das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo e seu
potencial adipogênico em pacientes com caquexia associada ao câncer**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Doutora em Ciências

Programa de Clínica Cirúrgica

Orientador: Prof. Dr. José Pinhata Otoch

São Paulo

2021

Ariene Murari Soares de Pinho

Análise das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo e seu potencial adipogênico em pacientes com caquexia associada ao câncer

Este exemplar corresponde à versão final da tese com correções e alterações sugeridas pela Comissão Julgadora durante a defesa realizada por Ariene Murari Soares de Pinho em 16 de agosto de 2021, apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

Programa de Clínica Cirúrgica

Orientador: Prof. Dr. José Pinhata Otoch

São Paulo

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Pinho, Ariene Murari Soares de
Análise das células-tronco mesenquimais do
tecido adiposo e seu potencial adipogênico em
pacientes com caquexia associada ao câncer / Ariene
Murari Soares de Pinho. -- São Paulo, 2021.
Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Clínica Cirúrgica.
Orientador: José Pinhata Otoch.

Descritores: 1.Caquexia 2.Neoplasias 3.Tecido
adiposo 4.Células-tronco mesenquimais 5.Inflamação
6.Adipogênese

USP/FM/DBD-196/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª. ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

“O importante é não deixar de questionar. A curiosidade tem sua própria razão de existir. Não se pode deixar de nos maravilhar ao contemplar os mistérios da eternidade, da vida, da estrutura maravilhosa da realidade, tenta apenas compreender um pouco deste mistério todos os dias.”

Albert Einstein

Dedico ao meu primo querido, Ercis: Um anjo que voltou ao Céu, após vir à Terra nos mostrar que é possível em todos os momentos da vida vivê-la de forma leve, pura e alegre.

Com todo meu amor

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus por sempre me abençoar colocando pessoas tão maravilhosas ao meu redor, por plantar dentro de mim essa paixão que tenho pela Ciência, e permitir que eu siga este caminho.

Agradeço aos meus pais por todos os conselhos, por sempre torcerem por mim, e me apoiarem nas decisões que tomei, e por toda ajuda financeira que me deram para que eu nunca desistisse dos meus sonhos. Aos meus irmãos Euri e Simi por toda preocupação e incentivo constante. AMO MUITO TODOS VOCÊS, tudo o que conquistei é também mérito de vocês.

Muito obrigada, Victor pelo maior presente que eu poderia ganhar, nosso filho, meu bem mais precioso. Com certeza fez de mim uma mulher mais forte para conduzir meus passos. Agradeço também por todo apoio e caronas tarde da noite para que eu não voltasse só, após longas horas de experimentos.

Muito obrigada mãe, Vó Nenê, e meus sogros Silvana e Victor, que em meio a Pandemia cuidaram tão bem do meu filho permitindo que eu ficasse tranquila para me dedicar à pesquisa, sem a ajuda de vocês chegar aqui não seria possível.

Meu profundo agradecimento ao meu orientador, José Pinhata Otoch, pelo exemplo de pessoa maravilhosa que é, coração enorme sempre pronto a ajudar aos outros. Muito obrigada por me receber tão bem e permitir que eu realizasse este sonho de ajudar ao próximo através da pesquisa.

Professora Marília Seelaender, minha orientadora querida, não tenho palavras para expressar a admiração que sinto por você, saiba que sou muito grata por me receber de braços abertos, por todos os seus conselhos, ensinamentos e oportunidades. Sou muito abençoada por tudo que aprendo com você a cada dia.

Agradeço do fundo do meu coração à Raquel Galvão Figueiredo e Joyce C. Rosa de Jesus pela amizade, e por toda ajuda ao longo dessa jornada, por me ajudarem com os experimentos, pelos conselhos, discussões de resultados,

e principalmente por serem minhas mãos ao longo da minha gravidez, poupando-me de estar em contato com reagentes tóxicos, e permitir que minha pesquisa não parasse, muito obrigada.

Katrin Radloff, Ana Flávia M. Pessoa, Nelson Inácio P. Neto, Gabriela Salim de Castro e Micheli Joana Alves muito obrigada pela amizade, pela paciência e por dividirem seus conhecimentos. Thainá Vilella e Dalete Barcelos, meus presentinhos de Deus, obrigada por toda ajuda que me deram nos experimentos, saibam que aprendi muito com vocês. Fani, Joanna, Silvio, Cebola, Márcia e Renata muito obrigada por tudo. Em especial agradeço a Ivanir Pires pela amizade, pela preocupação e por toda ajuda durante os experimentos.

Agradeço a todos do laboratório da Professora Alisson e do laboratório do Zeca José César Rosa Neto em especial Mathew, Lucas, Janaina e Luana por compartilharem seus conhecimentos. Marley, muito obrigada pelos sorrisos, sempre!

Meu agradecimento especial à Eliane Monico por toda atenção e preocupação, pelas conversas e por sua alegria. Meu agradecimento à Junko por toda atenção que recebi.

Agradeço aos médicos que colaboraram com este projeto, em especial ao Dr Paulo Alcântara, Dr Flávio Tokeshi, Dra Linda Maximiano, Dra Fernanda Formiga e Dr Thiago Manzione.

Meu mais profundo agradecimento aos pacientes que aceitaram participar deste projeto, que por compartilharem suas enfermidades possibilitam esperança para uma melhor qualidade de vida e quem sabe a reversão da caquexia.

Agradecimentos

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa e financiamento da minha pesquisa (número do processo: 88882.386847/2019-01).

Sumário

Lista de Abreviaturas e Siglas	12
Lista de Tabelas	16
Resumo	17
Abstract.....	18
1. INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Caquexia associada ao câncer	18
2.2 Tecido adiposo na caquexia	19
2.3 Tecido adiposo e adipogênese	21
2.4 Células-tronco mesenquimais	22
3. OBJETIVOS.....	24
3.1. Gerais.....	24
3.2. Específicos	24
4. MÉTODOS	25
4.1 Aprovação no Comitê de Ética	25
4.2 Recrutamento dos Pacientes	25
4.3 Critérios de inclusão	25
4.4 Critérios de exclusão	25
4.5 Critérios para diagnosticar a caquexia	26
4.6 Coleta de sangue e análise dos parâmetros bioquímicos	27
4.7 Obtenção do tecido adiposo	28
4.8 Cultivo celular	28
4.8.1 Isolamento das células da fração vascular estromal do tecido adiposo	28
4.8.2 Determinação do número de células	29
4.8.3 Cultivo das células-tronco mesenquimais	29
4.8.4 Recuperação das células aderidas às placas de cultivo.....	29
4.9 Análise por citometria de fluxo	30
4.10 Diferenciação adipogênica	33
4.10.1 Caracterização adipogênica.....	33
4.11 Avaliação da proliferação das células-tronco do tecido adiposo subcutâneo.....	33
4.12 Avaliação da apoptose das células-tronco do tecido adiposo subcutâneo	34

4.13 Análise da expressão gênica do tecido adiposo subcutâneo e das células-tronco isoladas do tecido adiposo subcutâneo.	35
4.13.1 Extração de RNA do tecido adiposo subcutâneo	35
4.13.2 Extração de RNA das células-tronco do tecido adiposo subcutâneo	36
4.13.3 Transcrição Reversa	36
4.13.4 Expressão Gênica	37
4.15 Análise das citocinas presentes no meio de cultura das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo subcutâneo	38
4.16 Avaliação das redes de interações	39
4.17 Análise estatística	39
5. RESULTADOS.....	41
5.1 Características gerais dos pacientes.....	41
5.2 Cultivo celular	43
5.2.1 Quantificação das células da fração estromal após dissociação tecidual.....	43
5.2.3 Quantificação das células após dissociação tecidual e passagem celular	45
5.3 Caracterização das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo durante cultivo celular	46
5.4 Avaliação das células-tronco mesenquimais por citometria de fluxo.....	46
5.5 Avaliação adipogênica.....	48
5.6 Avaliação da proliferação das células-tronco do tecido adiposo subcutâneo	48
5.7 Avaliação da apoptose das células-tronco do tecido adiposo subcutâneo	50
4.8 Expressão gênica nas células-tronco mesenquimais do tecido adiposo subcutâneo.....	51
5.9 Expressão gênica do tecido adiposo subcutâneo	55
5.10 Expressão proteica de citocinas presentes no meio de cultura das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo subcutâneo.....	56
5.11 Análise de componente principal (PCA) de dados de expressão gênica e citocinas secretadas pelas células-tronco mesenquimais	59
5.12 Interação de redes entre citocinas e genes avaliados nas células-tronco mesenquimais	60
6. DISCUSSÃO	62
7.CONCLUSÃO	71
ANEXOS	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

Lista de Abreviaturas e Siglas

ATP	Adenosina trifosfato
APC.Cy7	Aloficocianina 7
BSA	Albumina de soro bovino; do inglês, <i>bovine serum albumin</i>
CC	grupo com câncer e caquexia; do inglês, <i>câncer cachexia</i>
CD	do inglês, cluster of differentiation
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CEP	Comitê de ética e pesquisa
Ct	Limiar de ciclagem
DAPI	Diamidina fenili
DMEM	do inglês, <i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i>
DNA	Ácido desoxinucleico
DNase	Desoxirribonuclease
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético (tipo de anticoagulante)
FAACT-ESPEN	do inglês, <i>Functional Assessment of Anorexia/Cachexia Therapy – The European Society for Clinical Nutrition and Metabolism</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GAPDH	Glicealdeído 3-fosfato desidrogenase
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HIF1a	Fator induzido por hipóxia 1 alfa
HU/USP	Hospital Universitário da Universidade de São Paulo
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corporal
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MCP1	Proteína 1 quimioatrativa de monócitos
MSC	Células-tronco mesenquimais; do inglês, <i>mesenchymal stem cells</i>

N	número de pacientes
NFkB	Fator de transcrição nuclear kappa B
PBS	Tampão fosfato salino; do inglês, <i>phosphate buffered saline</i>
PCA	Análise de Componentes Principais
PCR	Proteína C-reativa
PD	Passagem celular; do inglês <i>population doubling</i>
PDGFRa	Receptor alfa do fator de crescimento derivado de plaquetas
P/E	Penicilina e estreptomicina
PE	Ficoeritrina
PERCPCy-5.5	Proteína clorofila peridina-R-ficoeritrina cianina
PFA	Paraformaldeído
PPARg	Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma tipo Gama
PPIA	Peptidilprolil isomerase A
QLQ-C30	European Organisation for Research and Treatment of Cancer – Quality of Life Questionnaire Core 30
RPM	Rotação por minuto
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
RNase	Ribonuclease
Sca-1	Antígeno 1 de células-tronco; do inglês, <i>stem cells antigen-1</i>
SFB	Soro fetal bovino
SIDA	Síndrome de imunodeficiência adquirida
SVF	Fração vascular estromal; do inglês, <i>vascular stromal fraction</i>
TASC	Tecido adiposo subcutâneo
TAPT	Tecido adiposo visceral peri-tumoral
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TdT	Desoxinucleotidie transferase terminal
TFAM	Fator de transcrição mitocondrial A
TMB	Taxa metabólica basal

TNFa	Fator de necrose tumoral alfa
TNM	Tumor linfonodo metástase
U.A.	Unidade arbitrária
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
WAT	Tecido adiposo branco; do inglês, <i>white adipose tissue</i>
WSC	Grupo com câncer e peso estável; do inglês, <i>weight stable câncer</i>

Lista de Figuras

- Figura 1 Estratégia de gate utilizada para caracterizar as células-tronco mesenquimais
- Figura 2 Células avaliadas da fração vascular estromal do tecido adiposo
- Figura 3 Quantificação das células cultivadas do tecido adiposo subcutâneo
- Figura 4 Células-tronco mesenquimais em cultivo celular
- Figura 5 Marcação de superfície das células-tronco
- Figura 6 População de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo subcutâneo após cultivo celular
- Figura 7 Diferenciação adipogênica
- Figura 8 Microfotografia das células-tronco após ensaio de proliferação
- Figura 9 Avaliação da porcentagem proliferativa das células-tronco mesenquimais após cultivo
- Figura 10 Microfotografia das células-tronco após ensaio de apoptose
- Figura 11 Quantificação das células-tronco mesenquimais em apoptose após cultivo celular
- Figura 12 Expressão gênica das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo subcutâneo
- Figura 13 Expressão gênica das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo subcutâneo
- Figura 24 Expressão gênica das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo subcutâneo
- Figura 15 Correlação de Spearman
- Figura 16 Avaliação de citocinas pró inflamatórias presentes no meio de cultivo de células-tronco mesenquimais
- Figura 17 Correlação de Spearman entre citocinas e expressão de RNAm
- Figura 18 Análise de componentes principais (PCA)
- Figura 19 Funções biológicas das citocinas e genes avaliados nas células-tronco mesenquimais do tecido adiposo dos pacientes com câncer e caquexia

Lista de Tabelas

Tabela 1	Painel de anticorpos de imunofenotipagem
Tabela 2	Lista de primers avaliados no tecido adiposo subcutâneo
Tabela 3	Lista de Primers avaliados nas células-tronco do tecido adiposo subcutâneo
Tabela 4	Características gerais dos pacientes
Tabela 5	Percepção da qualidade de vida
Tabela 6	Parâmetros bioquímicos utilizados para o diagnóstico da Caquexia
Tabela 7	Quantificação das células da fração estromal após dissociação tecidual
Tabela 8	Análise da expressão gênica do tecido adiposo subcutâneo dos pacientes

Resumo

Pinho AMS. *Avaliação das células-tronco mesenquimais e seu potencial adipogênico em pacientes com caquexia associada ao câncer* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2021.

A caquexia associada ao câncer é uma síndrome multifatorial relacionada à perda de tecido adiposo, massa muscular esquelética e alterações metabólicas diversas. Nosso grupo tem demonstrado que o tecido adiposo é um importante contribuinte na etiologia da inflamação sistêmica, pela secreção ativa de fatores inflamatórios e aumento da taxa metabólica basal. Os adipócitos são originados a partir da diferenciação das células-tronco mesenquimais (MSCs), que além do potencial adipogênico são consideradas também imunomoduladoras. O objetivo deste trabalho foi analisar as MSCs do tecido adiposo de pacientes com câncer gastrointestinal com e sem caquexia, quanto ao seu potencial adipogênico e inflamatório na síndrome de caquexia. O estudo incluiu 64 pacientes divididos em três grupos: pacientes submetidos à cirurgia para remoção de hérnia abdominal ou colecistectomia (controles), pacientes com câncer e peso estável (WSC), e pacientes com câncer e caquexia (CC). Durante o ato cirúrgico foram coletadas biópsias do tecido adiposo subcutâneo e visceral próximo ao tumor, utilizadas para avaliação da expressão de genes termogênicos e adipogênicos, e para obtenção das MSCs, que após isoladas, foram cultivadas sob três condições de cultivo: meio com soro fetal bovino (SFB) e com os estímulos pró-inflamatórios IL6 ou TNF α , para análise de expressão gênica e das citocinas pró-inflamatórias secretadas em meio de cultura. Após dissociação do tecido adiposo subcutâneo, os pacientes do grupo CC apresentaram menor número de células viáveis da fração vascular estromal, comparados ao grupo WSC ($p < 0,012$). Não houve diferença no número das células obtidas do TAPT entre os grupos. O potencial proliferativo das MSCs sob os diferentes estímulos não apresentou diferença entre os grupos, e a apoptose nas células estimuladas com IL6 foi maior no grupo Controle comparado aos grupos WSC e CC ($p < 0,0001$). A estimulação com TNF α aumentou significativamente a expressão dos genes HIF1 α , TFAM, NF κ B-p50 e NF κ B-p65 em comparação às outras condições de cultivo (SFB ou IL6). O estímulo do TNF α induziu aumento de concentração de citocinas MCP1, IL6 e IL8 presentes no meio de cultura em comparação às células cultivadas com SFB ou IL6, em WSC e CC. A correlação entre as citocinas secretadas pelas MSCs foi positiva ($p < 0,05$), e a expressão proteica das citocinas IL6, IL8 e VEGF apresentou correlação negativa com aquela dos genes NF κ B-p50 e NF κ B-p65. Análise por Componente Principal (PCA) confirmou que a resposta ao estímulo TNF α em ambos os grupos câncer difere das demais condições de cultivo. Nossos resultados demonstram que o TNF α estimula a produção de fatores inflamatórios nas MSCs de pacientes com câncer com e sem caquexia, e esta citocina parece contribuir para o papel das MSCs do tecido adiposo na manutenção de um ambiente inflamatório relacionado à caquexia.

Descritores: Caquexia; Neoplasias; Tecido adiposo; Células-tronco mesenquimais; Inflamação; Adipogênese.

Abstract

Pinho AMS. *Evaluation of mesenchymal stem cells adipogenic potential in patients with cancer-associated cachexia* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo", 2021.

Cancer-associated cachexia is a multifactorial syndrome related to the loss of adipose tissue, skeletal muscle mass, and various metabolic changes. Our group has demonstrated that adipose tissue is an important player in the etiology of systemic inflammation, contributing to the significant increase in the amount of circulating inflammatory factors and potentially, to increase metabolic rate. Adipocytes originate from the differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs), which, in addition to adipogenic potential, are also considered immunomodulatory. Our objective was to analyze MSCs from the white adipose tissue of patients with gastrointestinal cancer with and without cachexia, regarding their adipogenic and inflammatory potential. The study included 64 patients divided into three groups: patients after surgery to remove abdominal hernia or after cholecystectomy (control), cancer patients with stable weight (WSC), or cachexia (CC). During surgery, biopsies of subcutaneous and visceral peritumoral adipose tissue were collected and used to evaluate the expression of thermogenic and adipogenic genes, as well as employed to obtain the MSCs. The latter were cultured without (fetal bovine serum-SFB) and with the pro-inflammatory stimuli IL6 and TNF α , for analysis of gene expression and pro-inflammatory cytokines secreted in the culture medium. After dissociation of the subcutaneous adipose tissue, patients in the CC cell group showed fewer stromal vascular fraction cells compared to WSC ($p < 0,012$); there was no difference in the number of TAPT-derived cells. The evaluation of the proliferative potential of MSCs under different stimuli did not show any difference among the groups, and the percentage of apoptotic was higher for those stimulated with IL6 in the Control group, compared to WSC and CC ($p < 0,0001$). Cells stimulated with TNF α increased the expression of HIF1 α , TFAM, NF κ B-p50 and NF κ B-p65 genes, compared to other culture conditions (SFB or IL6), for which there was no difference among groups. TNF α stimulation increased the concentration of cytokines MCP1, IL6 and IL8 present in the culture medium compared to cells cultured with SFB or IL6, in WSC and CC. The correlation between the cytokines secreted by MSCs was positive ($p < 0,05$), and the cytokines IL6, IL8 and VEGF showed negative correlation with the expression of the NF κ B-p50 and NF κ B-p65 genes. Principal Component Analysis (PCA) confirmed that the response to TNF α in both groups with cancer differs from the other incubation conditions. Our results demonstrate that TNF α stimulates the production of inflammatory factors in MSCs of cancer patients with and without cachexia, and this cytokine seems to contribute to the adipose tissue MSCs role in maintaining an inflammatory environment related to cachexia.

Descriptors: Cachexia; Neoplasms; Adipose tissue; Mesenchymal stem cells; Inflammation; Adipogenesis.

1. INTRODUÇÃO

A caquexia é uma síndrome que está relacionada a diferentes tipos de doenças, entre elas, câncer, síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), esclerose múltipla, tuberculose, artrite reumatóide, doenças cardíacas crônicas, entre outras (1,2). Em pacientes com câncer, cerca de 50% desenvolvem em diferentes graus a caquexia, e dos que se tornam caquéticos, aproximadamente 80% vêm a falecer em decorrência de alterações metabólicas relacionadas à síndrome.

O câncer é considerado um grave problema de saúde pública mundial, sendo hoje em dia uma das quatro principais causas de incidência de mortalidade prematura (pessoas com menos de 70 anos de idade) (3). Segundo dados do INCA (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva), o câncer de pulmão é o mais frequente no mundo, seguido pelo câncer de mama, colorretal e próstata.

A prevalência da caquexia pode variar de acordo com o tipo tumoral e localização, estando presente em aproximadamente 87% dos pacientes com câncer pancreático e gástrico, e em 61% dos pacientes com câncer de pulmão, cólon e próstata (4).

Os principais sintomas causados pela caquexia são redução de peso de maneira involuntária, com comprometimento e degradação do tecido adiposo e tecido muscular, anorexia, e má absorção dos nutrientes pelo organismo. Todos esses sintomas estão relacionados à presença de inflamação sistêmica contínua (5).

Nosso grupo tem demonstrado que o tecido adiposo é um importante contribuinte na etiologia da inflamação sistêmica característica da síndrome (6). Esse tecido, além de ser marcadamente afetado pela síndrome, secreta ativamente fatores inflamatórios neste contexto clínico (7,8). Entretanto, os componentes celulares envolvidos nessas alterações não estão completamente descritos. As células-tronco mesenquimais (MSCs) presentes no tecido adiposo são responsáveis por originar os adipócitos, e cada vez mais estudos vêm mostrando seu potencial imunomodulador (9).

Foi nosso interesse estudar, pela primeira vez em pacientes com câncer e caquexia, o comportamento das MSCs do tecido adiposo, e sua contribuição no processo da adipogênese e inflamatório da caquexia associada ao câncer.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Caquexia associada ao câncer

A palavra Caquexia é derivada do Grego, onde “*Kakos*” significa mau, e “*hexis*” condição (1), pois as diversas alterações metabólicas desenvolvidas em pacientes caquéticos levam ao comprometimento da qualidade de vida, dificultando a resposta a tratamentos, e conseqüentemente levando o paciente à morte (5).

A caquexia é uma síndrome que envolve diversos órgãos, e a inflamação que acomete a caquexia é decorrente da interação entre o tumor e organismo. A caquexia é caracterizada principalmente pela perda de massa corporal associada à degradação do tecido adiposo e tecido muscular, porém, baseado no estágio de desenvolvimento em que se encontra, pode ser classificada em três diferentes estágios: pré-caquexia, quando observa-se as alterações metabólicas e anorexia antes da perda da massa corporal; caquexia propriamente dita, quando a perda de peso é $\geq 5\%$ ou $\text{IMC} \leq 20$ e perda de peso ≥ 2 , ou sarcopenia e perda de peso maior que 2%, e frequentemente relacionada a anorexia e inflamação sistêmica; e caquexia refratária, quando a expectativa de vida do paciente não ultrapassa três meses (5,10)

Diversos marcadores inflamatórios e citocinas que são secretados pelo tumor e diversos órgãos são relacionados à caquexia, entre os principais estão a proteína C-reativa (PCR), hemoglobina, albumina, adiponectina, leptina, interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (4,11,12). Para ajudar no diagnóstico da caquexia foram desenvolvidos questionários de qualidade de vida, performance física e aspectos que abordam perda de peso, anorexia, distúrbios inflamatórios, imunológicos e metabólicos, que através das pontuações relatadas pelos pacientes facilitam o diagnóstico do estágio de desenvolvimento da caquexia (13,14).

A caquexia associada ao câncer é vista como uma doença secundária em pacientes com câncer, e quando presente causa disfunção progressiva, caracterizada por uma resposta inflamatória sistêmica. Clinicamente, os sintomas mais notáveis da caquexia associada ao câncer são diminuição da massa muscular esquelética, músculo cardíaco, perda de gordura e piora da qualidade de vida dos pacientes com redução da eficácia de tratamentos como quimioterapia e radioterapia anticâncer (4). Atualmente, não existem intervenções médicas eficazes que revertam por completo esta síndrome.

A perda de peso em pacientes caquéticos não decorre da redução na ingestão de alimentos, pois mesmo aumentando-se a ingestão de calorias, o quadro clínico não é revertido (1). Diversos desarranjos metabólicos podem contribuir para o desenvolvimento da caquexia; entre eles, aumento na taxa metabólica basal (TMB) e do gasto energético em repouso, resultando em um estado fisiológico hipermetabólico. Pacientes com câncer apresentam uma elevada TMB anterior à perda de massa corpórea, sugerindo que esse fator seja um agravante do processo de caquexia, e não uma consequência desta síndrome (15).

2.2 Tecido adiposo na caquexia

Na caquexia, o tecido adiposo branco (WAT, do inglês = *White Adipose Tissue*) é um órgão extremamente comprometido, com alterações morfológicas e moleculares relacionadas à atrofia dos adipócitos, e redução acentuada de seu tamanho e diminuição no potencial adipogênico (16), aumento significativo de fibrose e desarranjo nas fibras colágenas na matriz extracelular (16–19), aumento da expressão gênica relacionada à termogênese (16,20), ativação da lipólise intracelular, evidenciada pela elevada taxa de glicerol e ácidos graxos livres no plasma de pacientes com câncer avançado, e diminuição das inclusões lipídicas - depósitos de reservas (20).

Argilés e colaboradores associaram a perda do tecido adiposo a três processos diferentes. O primeiro deles é atribuído ao aumento da atividade lipolítica no tecido adiposo, no qual há quebra de triacilglicerol (TAG) em ácidos graxos não essenciais e glicerol decorrente da ação da enzima lipase hormônio

sensível (HSL). Outro fator responsável pela perda do tecido adiposo é a redução da captação de lípidos para os tecidos causado pela diminuição da atividade da lipase de lipoproteína (LPL), que promove a hidrólise de TAG presente em lipoproteínas, em ácidos graxos e glicerol. E por fim, há redução na disponibilidade de ácidos graxos para captação e depósito no tecido adiposo prejudicando o processo de lipogênese na caquexia (21).

Os depósitos do WAT são compostos pelo tecido adiposo subcutâneo superior (localizado abaixo da pele na superfície abdominal) e inferior (localizado na região gluteofemoral), e tecido adiposo visceral (composto pelos depósitos mesentérico, omental, epicardial e mediastinal) (22). O WAT é caracterizado principalmente por sua heterogeneidade morfofuncional, pois baseado em sua localização anatômica, os depósitos de tecido adiposo podem apresentar diferenças na sua fisiologia e composição celular (22).

O tecido adiposo é um órgão endócrino, pois células presentes neste tecido são capazes de secretar citocinas e adipocinas que atuam na modulação de processos importantes como proliferação, metabolismo, termogênese, angiogênese, apoptose e inflamação, e por isso é considerado um potente contribuidor da manutenção da inflamação sistêmica na caquexia (23–26). No contexto inflamatório sabe-se que diversas citocinas secretadas pelos adipócitos, células de defesa e células tumorais estão diretamente relacionadas à indução da caquexia, entre as quais estão o TNF- α , IL-1, IL-6, interferon gama (IFN γ), entre outras (1). Muitas das citocinas liberadas pelo tecido adiposo estão relacionadas à modulação do sistema imune, incluindo TNF- α , IL-6, interleucina 8 (IL-8), interleucina 10 (IL-10), interleucina 4 (IL-4) e proteína 1 quimiotratora de monócitos (MCP-1) (27).

Estudo *in vitro* com adipócitos mostrou que a ativação da via do NF- κ B está envolvida diretamente com a extensa lipólise do WAT (26,28). Uma etapa central no controle da expressão celular de citocinas pró-inflamatórias é a ativação em células do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B), que induz a transcrição da maioria dos genes relacionados com a inflamação, incluindo as chamadas "citocinas caquéticas clássicas" TNF- α , IL-6, interleucina 1 beta (IL-1 β), IFN γ e de quimiocinas como MCP-1. A transcrição de genes pró-

inflamatórios na via de sinalização do NF- κ B deve-se principalmente pela regulação do heterodímero NF- κ Bp65-p50 (26).

A via de sinalização de NF- κ B tem sido descrita atuando em outros processos biológicos, incluindo a proliferação celular, a diferenciação e a sobrevivência celular. Sua ativação pode ser iniciada por um grande número de estímulos extracelulares: respostas inflamatórias, como a sinalização das citocinas IL-1 β , TNF- α , entre outros (29).

2.3 Tecido adiposo e adipogênese

O tecido adiposo branco está envolvido com o balanço energético metabólico, principalmente no estoque e mobilização de energia na forma de triglicerídeos (30,31). WAT está distribuído por todo o corpo, constituindo aproximadamente 20% do peso corporal de um adulto saudável, e é composto por dois depósitos diferentes, visceral e subcutâneo (30,32).

As células que caracterizam o tecido adiposo são os adipócitos, e células que compõem a fração vascular estromal, sendo estas representadas pelas células-tronco mesenquimais (MSCs, do inglês: *mesenchymal stem cells*), pré-adipócitos, células endoteliais, fibroblastos e células do sistema imune, como macrófagos, neutrófilos e linfócitos (27). As mitocôndrias são fatores importantes no tecido adiposo, pois a maturação dos adipócitos requer grande quantidade de ATP para manter processos como lipólise, oxidação e síntese de ácidos graxos (33).

Os adipócitos originam-se das células-tronco mesenquimais, através de um processo que constitui 2 etapas, a primeira é a diferenciação das MSCs em progenitores da linhagem adipogênica, e esta etapa vem seguida pela maturação, que ocorre entre os progenitores em células especializadas, ou seja, os adipócitos (34).

Inúmeras vias de sinalização estão envolvidas no processo de adipogênese, (35) e grande parte delas envolvem principalmente o receptor gama ativado pelo proliferador de peroxissoma (PPAR- γ), sendo este considerado o regulador transcricional da adipogênese (34,36). O PPAR- γ além de ser fundamental para que a diferenciação adipogênica aconteça, ele também

é essencial para a manutenção dos adipócitos, pois atua na transcrição do gene do metabolismo lipídico, metabolismo da glicose e sensibilidade à insulina (30,37).

2.4 Células-tronco mesenquimais

As células-tronco são células indiferenciadas e que apresentam como principal característica autorrenovação, ou seja, são capazes de se multiplicar mantendo seu estado indiferenciado, proporcionando uma reposição de sua população de maneira constante nos tecidos, e como característica essencial, elas apresentam potencial para diferenciarem em diversos tipos celulares. (38). Desta forma, acredita-se que células-tronco presentes nos diferentes tecidos tenham papel fundamental na regeneração de tecidos quando estes sofrem uma lesão (39–41), podendo migrar ao local lesado (38), enxertar e se diferenciar em células funcionais em estágio final, reparando assim o tecido lesado (40,42).

As células-tronco são classificadas em embrionárias e adultas, as embrionárias estão presentes no embrião, mais precisamente no estágio de blastocisto, são células capazes de originar todas as células do corpo humano (43). As células-tronco adultas são divididas em hematopoiéticas e mesenquimais, sendo as hematopoiéticas encontradas na medula óssea, e apresentam potencial para originar as diferentes células da linhagem sanguínea (44).

As células-tronco mesenquimais são células encontrada na fração vascular estromal de diferentes tecidos (44), entre eles medula óssea, poupa do dente, cordão umbilical, placenta e tecido adiposo (40). As MSCs foram identificadas pela primeira vez na medula óssea por Friedenstein e colaboradores em meados de 1960 (38,39). Estas células são definidas como células multipotentes, pois dependendo do estímulo que recebem conseguem diferenciar-se em adipócitos, miócitos, osteócitos e condrócitos (45,46).

Em 2006, a Sociedade Internacional de Terapia Celular estabeleceu três características mínimas para definir as MSCs. Elas devem apresentar marcação positiva para os antígenos de superfície CD105, CD90, CD73, Sca-1, CD44 e CD71, e adicionalmente não devem expressar os marcadores de superfície

CD45, CD34, CD14, CD11b, CD11c, CD79alfa ou CD19, e HLA-DR. Elas devem aderir ao plástico em cultura, apresentar morfologia fibroblastóide e serem capazes de diferenciar-se em diferentes tipos celulares como adipócitos, condrócitos e osteócitos (47).

Recentemente, trabalhos têm mostrado que MSCs na presença de exossomos tumorais promovem perda significativa de peso com queda na taxa de gordura corporal (48), além de alteração na via do TGF β , o que reduz a adipogênese favorecendo a diferenciação em fibroblastos (48).

Outra característica atribuída às MSCs é seu perfil imunomodulador, pois cada vez mais trabalhos relatam que há um complexo *crosstalk* entre as MSCs e células do sistema imune inato e adaptativo (49,50). O efeito imunomodulatório de células-tronco mesenquimais com células do sistema imune ocorre via parácrina e contato célula-célula (51). Estudos *in vitro* e *in vivo* estão sendo realizados de modo a avaliar o efeito imunomodulador e terapêutico das células-tronco através do transplante destas células ou fatores secretados por elas no processo de perda muscular na caquexia (52,53). Embora muita atenção é dada à perda muscular na caquexia, é importante ressaltar que alterações no tecido adiposo geralmente antecedem a perda de massa muscular na caquexia (54).

Sabendo da importância do tecido adiposo no controle dos diversos processos biológicos, e da sua importância na caquexia, pareceu-nos oportuno investigar o papel das células-tronco do tecido adiposo, bem como seu potencial adipogênico e inflamatório nos pacientes caquéticos.

3. OBJETIVOS

3.1. Gerais

Este trabalho teve como objetivo analisar as células-tronco mesenquimais do tecido adiposo subcutâneo e visceral peri-tumoral de pacientes com câncer colorretal com peso estável e pacientes caquéticos.

3.2. Específicos

Os objetivos específicos foram:

1. Verificar se há diferença no número de células da fração vascular estromal nos depósitos do tecido adiposo subcutâneo e peri-tumoral;
2. Caracterizar as células-tronco mesenquimais do tecido adiposo;
3. Avaliar o potencial proliferativo e apoptótico das células-tronco mesenquimais após cultivo com e sem estímulos pró-inflamatórios;
4. Investigar se há produção de citocinas pró-inflamatórias pelas células-tronco mesenquimais após o cultivo celular;
5. Avaliar a expressão de genes envolvidos com a adipogênese, metabolismo energético e pró-inflamatório nas células-tronco mesenquimais cultivadas;
6. Realizar correlações entre expressão gênica, citocinas secretadas e parâmetros bioquímicos dos pacientes.

4. MÉTODOS

4.1 Aprovação no Comitê de Ética

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelas Comissões de Ética em Pesquisa (CEP), e registrado na base virtual de registro de pesquisas envolvendo seres humanos (Plataforma Brasil): da Faculdade de Medicina da USP (Anexo 1), nº do Parecer Consubstanciado na Plataforma Brasil, CAAE: 51578115.7.0000.0065, e nº do Parecer Consubstanciado Hospital Universitário – HU USP: 1.362.888. Todo material coletado foi utilizado exclusivamente na pesquisa proposta, e amostra não utilizadas foram armazenadas no biorrepositório CEP SH. 051/2014.

4.2 Recrutamento dos Pacientes

Os pacientes candidatos a voluntários foram convidados a participar do estudo na consulta ambulatorial da Clínica Cirúrgica, por médicos especialistas em cirurgia oncológica do Hospital Universitário da USP (HU-USP). Todos os pacientes foram informados do objetivo e procedimentos do projeto, assinando um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2).

4.3 Critérios de inclusão

Ambos os sexos, com idade entre 18 e 85 anos, com diagnóstico de tumor maligno colorretal com indicação à cirurgia, ou pacientes com indicação cirúrgica para retirada de hérnias da parede abdominal (umbilical ou inguinal) ou colecistectomias, e disposição em participar do estudo.

4.4 Critérios de exclusão

Estar realizando tratamento quimioterápico/ radioterápico no momento; uso de anti-inflamatórios continuamente, antibióticos ou uso crônico de

corticóides; obesidade ($\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$); ter recebido bolsa de sangue no período próximo as coletas; apresentar falência renal ou hepática, AIDS, doenças inflamatórias intestinais ou processos inflamatórios crônicos não relacionados à caquexia, como distúrbios autoimunes; pacientes a ser submetidos à cirurgia para retirada de hérnia ou à colecistectomia, que apresentarem o parâmetro sérico proteína C-Reativa (PCR) $>5\text{mg/mL}$ por apresentarem-se inflamados.

4.5 Critérios para diagnosticar a caquexia

Para diagnóstico da caquexia foram utilizados os seguintes critérios, segundo Evans *et al.*, 2008 (55):

- Variação no peso corporal – perda involuntária de peso nos últimos 6 meses maior ou igual a 5 % da massa corporal inicial.
- IMC – menor que 20 kg/m^2 para pacientes com menos de 65 anos e menor que 22 kg/m^2 para pacientes com idade maior ou igual a 65 anos. $\text{IMC} = \text{Peso (Kg)} / \text{Altura}^2 \text{ (m)}$.

E ao menos 3 dos seguintes critérios:

- Diminuição da força muscular;
- Fadiga;
- Anorexia;
- Baixo índice de massa corporal livre de gordura;
- Concentração plasmática de albumina – concentração menor que 35 g/dl ;
- Evidência de inflamação – concentração plasmática elevada de Proteína C Reativa (PCR) $>5\text{mg/l}$;
- Anemia, $\text{Hb} < 12 \text{ g/dl}$.

Dos pacientes que aceitaram participar do projeto, foram obtidas medidas antropométricas (altura, peso) e os mesmos responderam a um questionário de qualidade de vida, no dia anterior à cirurgia. Os questionários aplicados foram EORTC QLQ-C30 e FAAct-ESPEN. O questionário EORTC QLQ-C30 (*European Organisation for Research and Treatment of Cancer – Quality of Life*

Questionnaire Core 30) aborda três aspectos de qualidade de vida e comprometimento nas atividades diárias do paciente, são eles: funcionalidade (físico, cognitivo, emocional e social), sintomático (fadiga, dor, náuseas e vômitos) e saúde global. E o questionário FAACT-ESPEN (Functional Assessment of Anorexia/Cachexia Therapy – The European Society for Clinical Nutrition and Metabolism) é utilizado para avaliar o grau de anorexia do paciente. Após a utilização destes dados para classificação, os pacientes foram divididos em três grupos:

- Grupo Control (do inglês: *control*): Pacientes sem câncer e não caquéticos submetidos a cirurgia para correção de hérnias da parede abdominal ou colecistectomias, n=16.
- Grupo WSC (do inglês: *weight stable cancer*): pacientes com câncer colorretal não caquéticos, n=19.
- Grupo CC (do inglês: *cancer and cachexia*): pacientes com câncer colorretal e caquéticos, n=29.

4.6 Coleta de sangue e análise dos parâmetros bioquímicos

Previamente ao procedimento cirúrgico, foram coletados 10 ml de sangue de cada paciente em tubos de coleta sem e com anti-coagulante (EDTA), para a obtenção de soro e plasma, respectivamente. Os tubos foram centrifugados 3000 rpm por 15 minutos a temperatura de 4°C, e os materiais armazenados a -80°C para serem utilizados em análises posteriores.

As concentrações plasmáticas de proteína C-Reativa, albumina, glicose, colesterol total, lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de alta densidade (HDL), triacilglicerol e hemoglobina (sangue total) foram quantificadas utilizando kits comerciais (Glicose HK liquiform, ref. 133; Triglicérides liquiform, ref. 87; HDL LE, ref. 98; LDL liquiform, ref. 111; Albumina, ref.19; PCR Ultra Turbiquet Plus, ref. 335; Hemoglobina da empresa Labtest diagnóstica). As análises foram realizadas no equipamento LabMax 240 (Labtest Diagnóstica).

4.7 Obtenção do tecido adiposo

A coleta do tecido adiposo foi realizada em ambiente cirúrgico, sob condições normais de assepsia. Não houve modificações na condução do procedimento cirúrgico, portanto, sem influência no tratamento e nos procedimentos anestésicos e cirúrgico dos voluntários, e sem incômodo doloroso adicional aos mesmos.

Foram coletadas amostras de cerca de 2g do tecido adiposo da região subcutânea (TASC) de todos os grupos, e do tecido adiposo visceral próximo ao tumor (TAPT) dos pacientes com câncer. Uma porção do fragmento de tecido adiposo coletado foi mantido em gelo seco, e posteriormente armazenado em freezer -80°C. O restante do tecido adiposo, ainda em centro cirúrgico foi transferido a um tubo Falcon contendo 5ml de solução tampão *Phosphate Buffered Saline* – PBS (Gibco, USA) suplementado a 1% de Penicilina e Estreptomicina - P/E (Gibco, USA). A amostra biológica em solução tampão foi mantida refrigerada a 4°C até chegar ao laboratório, sendo então utilizada para cultivo celular.

4.8 Cultivo celular

4.8.1 Isolamento das células da fração vascular estromal do tecido adiposo

Em ambiente estéril, o tecido adiposo foi fragmentado e lavado extensivamente com tampão PBS a 1% P/E. Em seguida, acrescentou-se 2mg/ml da enzima colagenase tipo I + 2mg/ml da enzima colagenase tipo II (SIGMA ALDRICH), em PBS por aproximadamente 1 hora a 37°C e agitação constante (56,57). A seguir, a ação enzimática foi neutralizada pela adição de DMEM *Dulbecco's modified Eagle's medium low glucose* (SIGMA ALDRICH) suplementado com 15% de soro fetal bovino – SFB (GIBCO, USA). A solução foi centrifugada a 1500 rpm sob temperatura ambiente; ao final da centrifugação separamos o sobrenadante contendo os adipócitos e a fração vascular estromal (SVF, do inglês *stromal vascular fraction*), ressuspendida em DMEM e

centrifugada novamente, como descrito anteriormente. Após, as células foram novamente ressuspensas em DMEM e utilizadas para o cultivo celular.

4.8.2 Determinação do número de células

Uma alíquota de 10 µl da solução de células da SVF foi utilizada para avaliar o número de células na suspensão. Acrescentou-se a esta solução 10 µl do corante *Trypan Blue* (Gibco, USA), que cora apenas as células que apresentam sua membrana degradada, ou seja, inviáveis. A análise foi realizada em Câmara de Neubauer nos quadrantes laterais e quantificadas em microscópio óptico Nikon.

4.8.3 Cultivo das células-tronco mesenquimais

As células da fração vâsculoestromal obtidas foram plaqueadas em placa de 25cm³, e cultivadas em meio DMEM contendo 15% de Soro Fetal Bovino, suplementado com penicilina 62ug/mL e estreptomicina 50ug/mL. Após 24h, o meio de cultura foi trocado para eliminação de hemácias e manter as células-tronco mesenquimais presentes no cultivo, após esta etapa o meio foi trocado a cada dois dias até que as células alcançassem aproximadamente 80% de confluência, ou seja, foram mantidas em cultivo até formarem uma monocamada de células que preenchesse aproximadamente 80% do fundo da placa de cultivo, sem que ocorresse sobreposição das células umas às outras, quando então foram submetidas à tripsinização, promovendo assim a soltura das células aderidas ao fundo da placa de cultivo.

Todos os materiais utilizados nos ensaios foram autoclavados por 60 min a 121°C.

4.8.4 Recuperação das células aderidas às placas de cultivo

Com o auxílio de uma bomba de sucção a vácuo, o meio de cultura foi sugado. Adicionou-se 5 ml de PBS à garrafa de cultura, homogeneizando e

lavando-a. A lavagem foi repetida duas vezes, 1ml de Tripsina 0,025% (SIGMA ALDRICH) foi adicionado, e as placas mantidas a 37°C por 3 a 5 minutos até que as células se soltassem completamente. A ação da tripsina foi neutralizada pela adição de 5 ml de meio DMEM contendo 10% de Soro Bovino Fetal. Após, o conteúdo foi transferido para um tubo Falcon e centrifugado por 5 minutos a 1500 rpm e temperatura ambiente (58).

As células foram ressuspensas em 1 ml de meio DMEM suplementado com 15% Soro Fetal Bovino, deste volume cerca de 10 µl foram retirados para observação em câmara de Neubauer para contagem celular.

As células foram transferidas a uma garrafa de cultivo de 75cm², e cultivadas sob mesmas condições, de forma a promover sua expansão até atingirem novamente 80% de confluência, e serem tripsinizadas novamente. Cada etapa de soltura das células (tripsinização) chamamos de passagem celular, e representamos como PD – do inglês: *population doubling*.

A primeira passagem celular (1PD) e segunda passagem celular (2PD) foram realizadas de forma a promover a obtenção de uma maior quantidade de células, as quais foram utilizadas nos experimentos propostos em 3PD. A cada passagem celular as mesmas foram quantificadas em câmara de Neubauer.

4.9 Análise por citometria de fluxo

Para confirmar o fenótipo das células cultivadas foram realizadas análises de citometria de fluxo. Utilizou-se suspensões de células obtidas em 3PD. Os anticorpos monoclonais (tabela 1) para marcação positiva das MSCs utilizados foram: CD73-PE, CD90-FITC e CD105-PERCPCy-5.5 e marcação negativa CD11b-APC.Cy7, e para marcador nuclear foi utilizado DAPI-Alexa Fluor (BD Biosciences).

Sob fluxo laminar, aproximadamente 1×10^6 células foram transferidas para cada tubo. Os tubos foram centrifugados à 1700rpm, por 5 minutos, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em 170 µL de solução *Facs Buffer* (500 mL de PBS + 10 mL SFB) em cada poço com células, homogeneizou-se bem o auxílio de uma

ponteira. Novamente foi realizada a centrifugação a 1700rpm (300g) por 5 minutos, o sobrenadante foi desprezado, em seguida adicionou 100 μ L descontando o volume de anticorpo monoclonais de superfície, no poço identificado como não marcado foi adicionado 100 μ L de *Facs Buffer*. A solução foi homogeneizada e incubada por 30 minutos no escuro e temperatura ambiente. Após o término da incubação, a solução foi centrifugada a 1700rpm, por 5 minutos, o sobrenadante foi desprezado, e adicionou-se 170 μ L solução Facs Buffer, a solução foi centrifugada sob mesmas condições acima e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas em 100 μ L de formaldeído 1%, e em seguida transferidas para um tubo de citometria. Adicionou-se 200 μ L de Facs Buffer nos tubos que continham as células, e acrescentou-se este volume no respectivo tubo de citometria. As amostras foram armazenadas a 4°C até o momento da leitura no citômetro. Foi realizada a leitura no Citômetro de Fluxo Amnis FlowSight (EMD Millipore Bioscience), e realizada a análise de dados no IDEAS® software (BD Bioscience). Ao menos 15000 eventos foram realizados para cada marcação.

As estratégias de *gating* utilizadas para separar a população de células em estudo foram: Frequência x gradiente de células em foco (Figura 1A); frequência x singlets (aquelas com área maior e alto *aspect ratio*, que diz respeito à razão entre o menor eixo das células pelo maior eixo da mesma) (Figura 1B); frequência x CD11b (como exclusão) (Figura 1C); CD90 x CD73 (duplo positivo para MSCs) (Figura 1D); frequência de duplo positivo x CD105 (Figura 1E).

Tabela 1. Painel de anticorpos de imunofenotipagem

Painel	Anticorpo	Fluorocromo	descrição	Nº Cat.
+	CD90	FITC	pertencente à família das imunoglobulinas, precursor de glicoproteína de membrana Thy 1	561558
+	CD105	PERCP Cy5.5	receptor de TGF β III relacionado à proliferação celular	560839
+	CD73	PE	Ecto-5'-nucleotidase, relacionado à proliferação celular	563198
-	CD11b	APC.Cy7	Marcador de células hematopoiéticas	557657

Painel de anticorpos de imunofenotipagem. CD: Grupo de diferenciação (do inglês, Cluster of Differentiation); FITC: Isotiocianato de fluoresceína; PERCP Cy5.5: proteína clorofila peridina-R-ficoeritrina cianina; PE: Ficoeritrina; APC.Cy7: Alofococianina 7. +: Marcação de superfície positiva para células-tronco mesenquimais; marcação de superfície negativa para células-tronco mesenquimais.

Figura 1. Estratégia de *gate* utilizada para caracterizar as células-tronco mesenquimais. Estratégias de análises para células-tronco mesenquimais utilizadas foram: (A) Frequência x gradiente RMS: utilizado para selecionarmos as células em foco; (B) Aspect Ratio (diz respeito à razão entre o menor eixo das células pelo maior eixo da mesma x área (selecionamos as células com áreas maiores); (C) Frequência x CD11b (como exclusão); (D) CD90 x CD73 (duplo positivo para célula tronco mesenquimais (MSCs)); (E) Frequência de duplo positivo x CD105. *Aspect ratio* próximo a 1 significa células circulares e *singles*. CD: Grupo de diferenciação (do inglês: *Cluster of Differentiation*).

4.10 Diferenciação adipogênica

Foram semeadas aproximadamente 1×10^4 células em 3PD em placa de 24 poços, e incubadas a 37°C, 5% CO₂, e meio de cultura DMEM, suplementado com 15% de SFB durante 24 horas para promover adesão. Após esse período, o meio de cultura foi retirado, e as células lavadas com PBS para remoção de resíduos. O meio de cultivo utilizado a partir desta etapa foi específico para indução da adipogênese (DMEM, 10% FCS, 1% P/E, 0,1 µmol/L dexametazona, 5 µg/ml insulina, 0,5 mmol/L isobutilmetilxantine e 60 µmol/L indometacina). O meio de cultura foi trocado a cada 3 dias, durante 21 dias (16).

4.10.1 Caracterização adipogênica

O fenótipo adipogênico das culturas foi analisado através da detecção da presença de gotículas de gordura nos vacúolos lipídicos presentes nas células. As células foram fixadas em PFA (Paraformaldeído) 4% por 1 hora, após realizou-se 2 lavagens com PBS seguida de 2 lavagens com água destilada. Após esse procedimento, as células foram incubadas por 50 minutos em temperatura ambiente com 500 µl do corante Oil Red O (Sigma) em isopropanol 0,5% diluído em água (3:2) e filtrado em malha de 0,45 µm. Em seguida, removeu-se o corante e as células fixadas foram lavadas novamente com água destilada. As células coradas foram analisadas no microscópio de luz Zeiss Integration Eyepiece I Kpl 8, Zeiss, Alemanha do laboratório da Professora Dra Patrícia Gama no Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biomédicas – USP, São Paulo (59).

4.11 Avaliação da proliferação das células-tronco do tecido adiposo subcutâneo

Utilizou-se células em 3PD, as quais foram plaqueadas na concentração de 1×10^4 células por poço, em placa de 24 wells. As células foram incubadas com o marcador de proliferação celular EDU-Alexa Fluor 594 (Invitrogen), e

diferentes meios de cultivo: Meio de cultura DMEM suplementado com 15% de SFB (sem estímulo), e meios com estímulos pró-inflamatórios: Meio de cultura DMEM suplementado com 15% de SFB e 50ng/ml IL6, e Meio de cultura DMEM suplementado com 15% de SFB e 100ng/ml TNFa (60,61).

Após 24 horas, as células foram fixadas em paraformaldeído (PFA) 4% e lavadas com PBS suplementado a 3% de BSA - *Bovine serum albumin* (SIGMA Aldrich). Em seguida, adicionou-se o coquetel de reação do Kit-iT contendo o fluorocromo Alexa Fluor 594 por 30 minutos. Novamente lavou-se as células com PBS suplementado a 3% de BSA. E então corou-se o núcleo com corante DAPI (diamidina fenilindole). As lamínulas foram fixadas em lâminas e armazenadas em freezer -20°C para análise e quantificação do potencial proliferativo. Para a quantificação das células utilizou-se uma grade de contagem na imagem, e foram escolhidos 3 campos centrais de cada imagem, contou-se 100 células de cada campo selecionado e após foi avaliada a porcentagem de células em proliferação. As imagens foram obtidas no equipamento Axio Scan. Z1 e analisadas no software Zeiss, do laboratório da Professora Dra Glaucia Maria Machado-Santelli no Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biomédicas – USP, São Paulo.

4.12 Avaliação da apoptose das células-tronco do tecido adiposo subcutâneo

As células-tronco em 3PD foram plaqueadas na concentração de 1×10^4 células por poço, em placa de 24 wells. As células foram incubadas com o marcador apoptótico TÚNEL-Alexa Fluor 594 (Invitrogen), e diferentes meios de cultivo: Meio de cultura DMEM suplementado com 15% de SFB, Meio de cultura DMEM suplementado com 15% de SFB e 50ng/ml IL6, e Meio de cultura DMEM suplementado com 15% de SFB e 100ng/ml TNFa.

Após 24h, as células foram fixadas com uma solução de paraformaldeído a 4% por 5 minutos, e em seguida lavadas duas vezes por 5 minutos cada lavagem em solução de PBS 1x. Posteriormente, as células foram permeabilizadas com 0,25% de Triton em PBS. Novamente realizou-se duas lavagens em solução de PBS, por 5 minutos cada, para então serem incubadas

com a solução de TÚNEL (1:10) com o coquetel de reação contendo fluorocromo Alexa Fluor 594 por uma hora a 37°C. Passado o tempo de reação do coquetel, foi realizada uma nova lavagem de 3% de BSA em PBS 2x por 5 minutos. As lamínulas foram montadas em Prolong Gold com o corante nuclear DAPI. Para a quantificação das células utilizou-se uma grade de contagem na imagem, e foram escolhidos 3 campos centrais de cada imagem, contou-se 100 células de cada campo selecionado e após foi avaliada a porcentagem de células em apoptose. As imagens foram realizadas no equipamento Axio Scan. Z1, e analisadas no software Zeiss.

4.13 Análise da expressão gênica do tecido adiposo subcutâneo e das células-tronco isoladas do tecido adiposo subcutâneo.

4.13.1 Extração de RNA do tecido adiposo subcutâneo

A extração do RNA total presente no tecido adiposo subcutâneo ocorreu pela adição de 1ml do reagente Trizol® (Life Technologies) em aproximadamente 300 mg do tecido. As amostras foram homogeneizadas em tubos livres de RNase e DNase, e centrifugadas a 14000 RPM por 15 minutos a 4°C. Após, a camada superior de gordura "*fat layer*" foi descartada, e o sobrenadante contendo o RNA foi transferido para um novo tubo. O sobrenadante foi homogeneizado com 200 µl de clorofórmio, incubado durante 2 minutos na temperatura ambiente, e então as amostras foram centrifugadas a 14000 RPM durante 10 minutos a 4 °C. A fase aquosa translúcida foi transferida a um novo tubo livre de RNase e DNase. A precipitação do RNA ocorreu por adicionar e misturar vigorosamente, à fase aquosa, 500 µl de isopropanol 100%, as amostras foram incubadas então à temperatura ambiente durante 10 minutos, e centrifugadas a 10000 RPM por 10 minutos, a 4 °C. Após a centrifugação descartou-se o sobrenadante do tubo e adicionou-se 1 ml de álcool etílico 75%. A amostra foi agitada vigorosamente e centrifugada a 7500 RPM por 5 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi novamente descartado, e o RNA aderido à parede do tubo foi ressuspendido (20-50 µl) em água ultrapura livre de RNase e DNase. A

concentração do RNA total foi avaliada em espectrofotômetro Synergy™ H1 (BIOTEK, Estados Unidos), sob comprimento de onda de 260nm/280nm.

4.13.2 Extração de RNA das células-tronco do tecido adiposo subcutâneo

As células-tronco em 3PD foram plaqueadas na concentração de 1×10^4 por poço e cultivadas por 24h com os seguintes meios de cultivo: Meio de cultura DMEM suplementado com 15% de SFB, Meio de cultura DMEM suplementado com 15% de SFB e 50ng/ml IL6, e Meio de cultura DMEM suplementado com 15% de SFB e 100ng/ml TNFa, após as células foram utilizadas para obtenção do RNAm.

A extração do RNA total presente nas células-tronco mesenquimais cultivadas foi realizada conforme especificação do fabricante PureLink® RNA Mini Kit (Life technologies). Primeiramente, as células cultivadas foram centrifugadas a $2000 \times g$ por 5 min à 4°C, o sobrenadante foi descartado, e as células utilizadas para extração do RNA. Utilizou-se por amostra 0,3 mL de Solução de Lise contendo 1% de 2-mercaptoetanol para cada mL da Solução, após as células foram passadas 10 vezes em agulhas de 21 gauge acopladas à seringas livres de RNase para facilitar a lise das células e obtenção do RNA. As concentrações de RNA foram determinadas medindo-se a absorbância sob 260nm/280nm em espectrofotômetro Synergy™ H1 (BIOTEK, Estados Unidos).

4.13.3 Transcrição Reversa

As amostras de RNA foram transcritas para DNA complementar (cDNA) em termociclador (Veriti®). Para a síntese de cDNA do tecido adiposo subcutâneo utilizamos 2 µg de RNA total, e para as células tronco mesenquimais foram utilizados na reação 0,5 µg de RNA total de cada amostra com Randomprimers, utilizando High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Invitrogen) num volume final de 20 µL. A transcrição reversa foi efetuada em um ciclo único, cujas etapas foram: 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C, 5

segundos a 85°C e termina a 4°C. As amostras de cDNA obtidas foram armazenadas a -20°C até a realização do experimento (62).

4.13.4 Expressão Gênica

A expressão dos genes foi quantificada por RT-PCR, utilizando o aparelho QuantStudio™12K Flex System with Array Card Block (Life Technologies) e SYBR Green 2x como marcador de fluorescência (Invitrogen, USA).

Para a reação foram utilizados 2 µL de cDNA da amostra para um volume final de 10 µL. Para que a reação acontecesse foram realizados dois ciclos de 50°C por 2 minutos, e 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de amplificação: desnaturação a 95°C por 15 segundos; anelamento a 60°C por 60 segundos e 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. Os resultados foram expressos com base na relação do RNAm de cada gene de interesse relativizando com o conteúdo de RNAm do gene GAPDH para análise do tecido adiposo subcutâneo, e do gene PPIA para análise das células-tronco mesenquimais isoladas. Os primers foram desenhados com base no banco de dados Genbank, a lista de *primers* utilizados para análise do tecido adiposo subcutâneo estão representados na tabela 2, e os *primers* utilizados para avaliação das células-tronco estão na tabela 3.

Tabela 2. Lista de primers avaliados no tecido adiposo subcutâneo

GENES	FORWARD	REVERSE
PGC1a	TCAAGCCACTACAGACACC	TCTCTGCGATATTCTTCCCT
PPARg	AAGAGCCTTCCAACCTCCC	GAAACCCTTGCATCCTTCAC
TFAM	AAGATTCCAAGAAGCTAAGGGTG	CGAGTTTCGTCCTCTTTAGCA
PDGFRa	GCCGCTTCCTGATATTGAG	TCCGTGATGATGTTTGAGAC
GAPDH	CCTCTGACTTCAACAGCGAC	CGTTGTCATACCAGGAAATGAG

PGC1a: coativador 1 alfa do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma tipo gama; PPARg: do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma tipo gama; TFAM: Fator de transcrição mitocondrial A; PDGFRa: receptor alfa do fator de crescimento derivado de plaquetas; GAPDH: Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase.

Tabela 3. Lista de Primers avaliados nas células-tronco do tecido adiposo subcutâneo

GENE	FORWARD	REVERSE
PDGFRa	GCCGCTTCCTGATATTGAG	TCCGTGATGATGTTTGAGAC
PPARg	AAGAGCCTTCCAACCTCCC	GAAACCCTTGCATCCTTCAC
TFAM	AAGATTCCAAGAAGCTAAGGGTG	CGAGTTTCGTCCTCTTTAGCA
HIF1a	CTC ATC AGT TGC CAC TTC C	ATC CAA ATC ACC AGC ATC CA
NFkB-p50	ACA CTT AGC AAT CAT CCA CC	AAT CCT CCA CCA CAT CTT CC
NFkB-p65	ATA CCA CCA AGA CCC ACC C	GCC TCA TAG AAG CCA TCC C
PPIA	TGCTGGACCCAACACAAATG	AACACCACATGCTTGCCATC

Lista de Primers avaliados nas células-tronco do tecido adiposo subcutâneo. PPARg: do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma tipo gama; TFAM: fator de transcrição mitocondrial A; PDGFRa: receptor alfa do fator de crescimento derivado de plaquetas; NFkB-p50: fator nuclear kappa-B subunidade p50; NFkB-p65: fator nuclear kappa-B subunidade p65; PPIA: Peptidilprolil isomerase A.

4.15 Análise das citocinas presentes no meio de cultura das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo subcutâneo

Foram utilizadas células em 3PD, as quais foram plaqueadas na concentração de 1×10^4 células por poço, em placa de 24 poços. Utilizou-se três diferentes meios de cultivo: Meio de cultura DMEM suplementado com 15% de SFB, Meio de cultura DMEM suplementado com 15% de SFB e 50ng/ml IL6, e Meio de cultura DMEM suplementado com 15% de SFB e 100ng/ml TNFa.

As células foram cultivadas por 24 horas, após este período o meio de cultura foi retirado e armazenado em freezer -80°C para análise de citocinas inflamatórias presentes no meio de cultivo das MSCs.

As citocinas pró-inflamatórias analisadas foram IL6, TNFa, quimiocina MCP-1, IL-8 (interleucina 8) e VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) (Merck Millipore).

O meio de cultura das células cultivadas após descongelamento foi incubado por 2 horas com a mistura de microesferas MagPlex® e os anticorpos. Após, antígenos-alvo ligados às microesferas com uma mistura de anticorpos de captura biotinilados foram incubados por 1 hora, e em seguida 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 e proteínas foram analisados no software Analyst 5.1 e, posteriormente foram relativizados pela concentração de proteína total.

4.16 Avaliação das redes de interações

As redes de interações entre citocinas MCP1, IL6, IL8, VEGF, e genes PPARg, PDGFRa (receptor alfa do fator de crescimento derivado de plaquetas), NFkB p50, NFkB p65, TFAM (fator de transcrição mitocondrial A) e HIF1a (Fator induzido por hipóxia 1 alfa) foram construídas usando o banco de dados STRING online (<https://string-db.org>) versão 11.0 Todas as análises de rede STRING foram realizadas com um nível de confiança médio (0,4) (63).

4.17 Análise estatística

Para as análises estatísticas aplicou-se primeiramente o teste de Kolmogorov-Smirnov para determinar a distribuição normal dos dados. Os dados paramétricos foram expressos com média $\pm$ erro-padrão, e os dados não paramétricos em mediana [1º quartil; 3º quartil]. Os grupos foram comparados empregando-se a análise de variância de um fator (ANOVA one way), seguida do teste de Tukey para dados paramétricos; para dados com distribuição assimétrica, foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn's. As médias entre os grupos WSC e CC foram comparadas pelo teste t de Student para dados paramétricos, ou teste de Mann-Whitney para os dados não paramétricos.

Para os grupos em que as células foram submetidas às diferentes condições de cultivo, em que as análises se dão também em função do estímulo, as comparações foram analisadas por ANOVA fatorial two way, seguida pelo teste de Tukey. A análise de correlação entre as variáveis de interesse foi realizada a partir do coeficiente de Spearman. Além disso, para investigar as relações entre as variáveis e visualizar padrões significativos nos dados de

expressão gênica e citocinas secretadas pelas células realizamos o componente principal análise (PCA). As análises estatísticas foram realizadas por meio do *software* GraphPad Prism versão 9.1.0 (GraphPad Software, Inc, La Jolla, CA, USA) e as análises PCA foram realizadas utilizando o *software* RStudio 1.0.153 (RStudio: Integrated Development Environment for R, Inc., Boston, MA, USA). Para todas as análises, adotou-se valor de significância de 0,05.

5. RESULTADOS

5.1 Características gerais dos pacientes

As características gerais dos pacientes estão ilustradas na tabela 4. Foram recrutados 64 pacientes, sendo 16 pacientes do grupo controle, 19 do grupo com câncer e peso estável e 29 pacientes do grupo com câncer e caquexia. A média de idade não foi diferente entre os grupos. Embora o índice de massa corporal IMC (Kg/m²) tenha apresentado média superior a 20 Kg/m² nos pacientes caquéticos, a média foi significativamente menor no grupo CC comparado aos demais grupos ($p < 0,0001$). A porcentagem de perda de peso dos pacientes durante os seis meses anteriores à cirurgia, informada pelo paciente no momento da aplicação do questionário e TCLE foi maior nos pacientes do grupo CC comparado aos demais grupos ($p < 0,0001$).

Ao analisarmos o estadiamento do tumor, agrupamos os pacientes em graus I e II, e graus III e IV, conforme o Sistema de Classificação de Tumores TNM (Tumor-Linfonodo-Metástase), preconizado pela União Internacional para o Controle do Câncer, e dados mostraram que não houve diferença entre os grupos com câncer e peso estável e caquéticos, de modo que caquexia pode se manifestar em pacientes nos estágios iniciais e tardios da doença.

Com relação à localização do tumor, em ambos os grupos WSC e CC prevaleceram tumores na região do cólon, seguido por tumor no reto.

Tabela 4. Características gerais dos pacientes

	Control	WSC	CC	p
n	16	19	29	
Gênero (F/M)	5/11	10/9	15/14	
idade (anos)	53,94 ± 3,58	59,68 ± 2,78	60,9 ± 2,57	0,253
IMC (kg/m²)	27,05 ± 0,53	26,02 ± 0,59	21,11 ± 0,67	<0,0001 ^{a,c}
Peso atual (kg)	74,83 ± 1,96	72,00 ± 2,56	57,32 ± 2,20	<0,0001 ^{a,c}
Perda de peso (%)	0,0 [0,0; 0,0]	0,0 [0,0; 3,53]	14,93 [9,52; 22,99]	<0,0001 ^{a,c}

Estadiamento tumoral (n)				
Inicial (I-II)	-	12 (63%)	10 (34%)	
Avançado (III- IV)	-	7 (37%)	19 (66%)	
Localização do tumor	-	Cólon (n=15) reto (n=4)	cólon (n=27) reto (n=2)	
Procedimento cirúrgico (grupo controle)	hérnias (n=11) colecistite (n=5)	-	-	

Características gerais dos pacientes Dados expressos em média $\pm$ erro padrão ou mediana [1º quartil; 3º quartil], p=nível de significância do teste One Way Anova e teste Kruskal-Wallis. Control: paciente do grupo controle; WSC: paciente com câncer sem perda de peso; CC: paciente com câncer e caquexia. IMC: índice de massa corporal. ^a nível de significância entre os grupos WSC vs. CC; ^b nível de significância entre os grupos Controle vs. WSC; ^c nível de significância entre os grupos Controle vs. CC.

A avaliação da percepção da qualidade de vida global dos pacientes realizada através da aplicação do questionário QLQ-C30 mostrou que os pacientes caquéticos apresentam marcada tendência a ter um menor escore quando comparados aos pacientes do grupo Controle ($p=0,054$), sendo que valores mais baixos indicativos de menor qualidade de vida. A pontuação relacionada ao questionário de escala funcional, aborda aspectos físicos, cognitivos, emocionais e sociais foi menor nos pacientes caquéticos, comparado aos demais grupos. Adicionalmente, análise do questionário de sintomas, relacionado à percepção de fadiga, dor, náuseas e vômitos apresentou escore maior para pacientes do grupo caquéticos em relação aos pacientes do grupo controle e WSC.

A pontuação do questionário aplicado para avaliar o grau de anorexia FAACT-ESPEN foi estatisticamente menor para os pacientes caquéticos (o que significa maior grau de anorexia), comparado aos demais grupos. Dados na tabela 5.

Tabela 5. Percepção da qualidade de vida

Questionário	Control	WSC	CC	p
QLQ-C30 ESG	83,33 [66,67; 97,92]	70,84 [62,50; 83,33]	66,67 [41,67; 83,33]	0,054
QLQ-C30 EF	93,34 [84,44; 100,0]	91,11 [73,33; 95,56]	73,33 [53,33; 82,22]	<0,0001 ^{a,c}
QLQ-C30 ES	5,13 [0,00; 12,82]	12,82 [7,69; 23,08]	25,64 [17,95; 48,72]	<0,0001 ^{a,c}
FAACT-ESPEN	39,50 [38,25; 42,00]	37,00 [36,00; 39,00]	29,00 [22,00; 33,00]	<0,0001 ^{a,c}

Percepção da qualidade de vida. Dados expressos em mediana [1º quartil; 3º quartil], p=nível de significância do teste Kruskal-Wallis. QLQ-C30 ESG: questionário de qualidade de vida de escala de saúde global; QLQ-C30 EF: questionário de qualidade de vida de escala funcional; QLQ-C30 ES: questionário de qualidade de vida de escala de sintomas; FAACT-ESPEN: questionário para avaliar o grau de anorexia. ^a nível de significância entre os grupos WSC vs. CC; ^b nível de significância entre os grupos Controle vs. WSC; ^c nível de significância entre os grupos Controle vs. CC

Considerando os parâmetros bioquímicos para diagnosticar a caquexia, conforme proposto por Evans et al., em 2008 (22), a análise do conteúdo sérico de Proteína C-reativa (PCR), um importante marcador utilizado como parâmetro para análise da inflamação sistêmica, revelou concentrações superiores nos pacientes caquéticos em relação aos outros grupos. A Albumina sérica, um indicador do estado nutricional, e da inflamação sistêmica (27) não apresentou diferença estatística entre os grupos. Ao analisar as concentrações sérica de hemoglobina, observamos que pacientes caquéticos apresentaram concentrações menores em relação ao grupo Controle.

As concentrações séricas de glicose e triacilglicerol foram estatisticamente diferentes entre os grupos Controle vs. CC ($p=0,031$ e $p=0,012$ respectivamente). Contudo, o conteúdo sérico colesterol total, LDL e HDL não apresentaram alterações entre os diferentes grupos avaliados.

Tabela 6. Parâmetros bioquímicos utilizados para o diagnóstico da caquexia

	Control	WSC	CC	p
PCR (mg/L)	1.45 [0,55; 3,65]	4.61 [1,54; 5,82]	12,03 [5,18; 12,41]	<0,0001 ^{b,c}
Albumina (g/dL)	4,15 [3,28; 4,95]	3.81 [3,57; 4,05]	3,62 [3,13; 3,95]	0,1228
Hemoglobina (g/dL)	14,67 ± 0,31	13,08 ± 0,43	11,23 ± 0,37	<0,0001 ^{a,b,c}
Glicose	103 [90,3; 121]	52,5 [41; 94]	80 [35,9; 101]	0,031 ^c
Colesterol total	224 [149; 254]	207 [178; 250]	188 [157; 216]	0,293
LDL	116,5 [85,5; 145,5]	124 [85; 142]	112 [80; 129]	0,521
HDL	43 [31; 58]	44 [36; 57]	44 [35; 50]	0,937
Triacilglicerol	168 [131; 264,3]	142 [108; 250]	125 [81; 175]	0,012 ^c

Parâmetros bioquímicos utilizados para o diagnóstico da caquexia. Dados expressos em média ± erro padrão ou mediana [1º quartil; 3º quartil], p=nível de significância do teste Kruskal-Wallis. Controle: paciente do grupo controle; WSC: paciente com câncer sem perda de peso; CC: paciente com câncer e caquexia. IMC: índice de massa corporal. ^a nível de significância entre os grupos WSC vs. CC; ^b nível de significância entre os grupos Controle vs. WSC; ^c nível de significância entre os grupos Controle vs. CC

5.2 Cultivo celular

5.2.1 Quantificação das células da fração estromal após dissociação tecidual

Após etapa de dissociação tecidual, as células da fração do estroma vascular do tecido adiposo subcutâneo e peri-tumoral foram quantificadas em câmara de Neubauer. As células consideradas foram as de maior diâmetro e espiculadas, características das células de interesse (figura 2). Ao avaliarmos o tecido adiposo subcutâneo, pacientes do grupo CC apresentaram menor quantidade de células quando comparados aos pacientes do grupo WSC e Controle ($p=0,012$). Não houve diferença significativa na quantificação das células obtidas do tecido adiposo peri-tumoral entre os grupos WSC e CC ($p=0,271$). Não houve diferença ao avaliar-se os diferentes depósitos de gordura (SC x TAPT) em pacientes do mesmo grupo, conforme ilustrado na tabela 7.

Figura 2. Células avaliadas da fração vascular estromal do tecido adiposo. Fotomicrografia das células da fração estromal após dissociação tecidual. Aumento de 40x, as setas indicam as células quantificadas, observadas no campo de contagem da câmara de Neubauer.

Tabela 7. Quantificação das células da fração estromal após dissociação tecidual

Depósito do TA	Control	WSC	CC	p
TASC	17,5 [3,75: 38,25] (n=6)	15,0 [4,0: 25,75] (n=10)	7,0 [1,0: 12,0] (n=21)	0,012 ^a
TAPT	-	27,28 ± 5,52 (n=9)	18,96 ± 4,82 (n=12)	0,271

Quantificação das células da fração estromal após dissociação tecidual. Valores expressam o número $\times 10^4$ de células da fração estromal do tecido adiposo subcutâneo e visceral quantificadas na fração do estroma vascular. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão ou mediana [1º quartil; 3º quartil], p=nível de significância do teste t e Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn. ^a nível de significância entre os grupos WSC vs CC. WSC: paciente com câncer sem perda de peso; CC: paciente com câncer e caquexia. TA: tecido adiposo; TASC: tecido adiposo subcutâneo; TAPT: tecido adiposo visceral próximo ao tumor; n: número de pacientes por grupo.

5.2.3 Quantificação das células após dissociação tecidual e passagem celular

Realizamos o teste estatístico ANOVA-two way para avaliar a quantificação das células da fração do estroma vascular (SVF, do inglês *stromal vascular fraction*) após etapa de dissociação tecidual, e células cultivadas em primeira, segunda e terceira passagem celular, conforme ilustrado no gráfico abaixo (figura 3). Para a avaliação da interação grupo vs. passagem celular não houve diferença estatística ($p=0,856$), também não houve diferença entre os diferentes grupos estudados: controle, câncer e peso estável, e câncer e caquexia ($p=0,556$). Porém, a variação na quantidade de células entre as passagens celulares foi estatisticamente diferente ($p=0,018$). O pós teste de Tukey mostrou que a quantidade de células do grupo CC em 3PD foi maior comparada às células do mesmo grupo em 2PD e 1PD, já a quantidade de células do grupo WSC em 3PD foi maior quando comparada às células do grupo CC em 2PD e 3PD.

Figura 3. Quantificação das células cultivadas do tecido adiposo subcutâneo. Quantificação celular da fração do estroma vascular do tecido adiposo subcutâneo – SVF, células em primeira passagem – 1PD, segunda passagem – 2PD e terceira passagem celular – 3PD. Número de células $\times 10^5$ células/mL. Control: grupo controle ($n=2$), WSC: grupo com cancer e peso estável ($n=5$), CC: grupo com câncer e caquexia ($n=7$). Dados expressos em média $\pm$ erro padrão, p =nível de significância do teste Anova two-way e pós teste de Tukey. * $p<0,05$; ** $p<0,01$. PD: do inglês, population doubling.

5.3 Caracterização das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo durante cultivo celular

Após dissociação do tecido adiposo e cultivo celular, as células apresentaram morfologia fibroblastóide e adesão à placa (figura 4), conforme descrito em literatura (28).

Figura 4. Células-tronco mesenquimais em cultivo celular. Fotomicrografia das células-tronco do tecido adiposo subcutâneo. Células-tronco mesenquimais em placa de cultivo. Adesão ao plástico, e morfologia fibroblastóide.

5.4 Avaliação das células-tronco mesenquimais por citometria de fluxo

Outro aspecto fundamental para caracterizar as células-tronco mesenquimais é a marcação por citometria, as MSCs não apresentam marcadores de superfície específicos para caracterizá-las, sendo necessário empregar um painel de marcadores positivos e negativos para confirmar seu fenótipo (28). As células após cultivo avaliadas por citometria de fluxo apresentaram marcação positiva para os anticorpos anti-human CD105, CD90 e CD73, e marcação negativa para a detecção do anticorpo anti-humano CD11b. O anticorpo DAPI foi utilizado para marcação nuclear. A figura 5 é uma imagem emitida pelo citômetro de Fluxo Amnis FlowSight, o qual detecta a fluorescência emitida pelos respectivos anticorpos ligados ao seu fluorocromo.

Estatisticamente não houve diferença entre a porcentagem de células com estas marcações entre os grupos WSC e CC ($p=0,171$), representado na figura 6.

Figura 5. Marcação de superfície das células-tronco. Microfotografia das células tronco mesenquimais do tecido adiposo subcutâneo em 3º passagem celular. Marcação positiva para os anticorpos anti-human CD90, CD73 e CD105, e marcação negativa para anticorpo anti-human CD11b. DAPI utilizado como marcação nuclear. Merge1: sobreposição da marcação nuclear (DAPI) + CD90; Merge2: DAPI + CD73; Merge3: DAPI + CD105. Aumento de 20x.

Figura 6. População de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo subcutâneo após cultivo celular. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão do teste t. % de células-tronco mesenquimais – MSCs com marcação positiva CD90, CD73, CD105 e marcação negativa para CD11b. WSC (n=2) e CC (n=2).

5.5 Avaliação adipogênica

A capacidade de diferenciar-se em adipócitos, condrócitos e miócitos após estímulo é mais uma das características que definem uma célula-tronco mesenquimal. As células cultivadas induzidas à diferenciação adipogênica apresentaram presença de vacúolos lipídicos (Fig. 7A), os quais podem ser vistos corados por imunohistoquímica com Oil Red O, e visualizados na cor avermelhada na Figura 7B.

Figura 7. Diferenciação adipogênica. A. Microfotografia das células após diferenciação das células-tronco mesenquimais em adipócitos. B. Vacúolos lipídicos corados em vermelho (Oil Red O).

5.6 Avaliação da proliferação das células-tronco do tecido adiposo subcutâneo

A técnica de EdU foi utilizada para avaliar a taxa proliferativa das células cultivadas, este ensaio de proliferação celular quantifica diretamente o DNA recém-sintetizado, seguindo a incorporação de um análogo da timidina contendo alcino EdU (5-etinil-2'-desoxiuridina) que é incorporado ao DNA durante a síntese ativa do DNA, o EdU incorporado é então detectado por estar ligado a um fluorocromo (64). A figura 8 é uma fotografia das células cultivadas após 24h, a coloração azul representa o núcleo das células senescentes, já a coloração rosa representa o núcleo das células em proliferação.

Figura 8. Microfotografia das células-tronco após ensaio de proliferação. Células-tronco mesenquimais em cultura coradas por imunofluorescência, para marcação nuclear e detecção da proliferação celular. Foto em aumento de 40x. Núcleo celular em senescência corado com DAPI – representado pela cor azul, e células em fase de proliferação coradas com EDU-Alexa Fluor 594 – representadas pela cor rosa.

A porcentagem proliferativa das células em terceira passagem em diferentes condições de cultivo (condição normal – SFB e estímulos inflamatórios IL6 ou TNFa) não apresentou diferença estatística entre os grupos ($p=0,247$), e também não houve diferença entre as diferentes condições de cultivo ($p=0,973$), conforme ilustrado na Figura 9.

Figura 9. Avaliação da porcentagem proliferativa das células-tronco mesenquimais após cultivo. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão, p =nível de significância do teste Anova two-way. Control SFB ($n=3$), WSC SFB ($n=7$), CC SFB ($n=6$), Control IL6 ($n=4$), WSC IL6 ($n=7$), CC IL6 ($n=6$), Control TNFa ($n=3$), WSC TNFa ($n=7$), CC TNFa ($n=4$). SFB: Soro Fetal Bovino; IL6: Interleucina 6; TNFa: Fator de Necrose Tumoral alfa.

5.7 Avaliação da apoptose das células-tronco do tecido adiposo subcutâneo

A técnica de Túnel foi utilizada para avaliar a taxa de apoptose das células cultivadas, o ensaio acontece através da enzima desoxinucleotidil transferase terminal (TdT), que catalisa a ligação de desoxinucleotídeos acoplado ao fluorocromo aos terminais 3'- hidroxila residuais das quebras de fita dupla após fragmentação do DNA. A figura 10 é uma fotografia das células cultivadas após 24h, a coloração azul representa o núcleo das células senescentes, e a coloração rosa representa o núcleo das células em apoptose.

Figura 10. Microfotografia das células-tronco após ensaio de apoptose. Células-tronco mesenquimais em cultura coradas por imunofluorescência, para marcação nuclear e detecção do percentual de células em apoptose. Núcleo celular em senescência corado com DAPI – representado pela cor azul, e células em apoptose coradas com Túnel-Alexa Fluor 594 – representadas pela cor vermelha.

Ao avaliar a porcentagem de células em apoptose após cultivo foi detectada diferença estatística entre os grupos Controle vs. WSC e CC ($p < 0,0001$), entretanto não houve diferença comparando-se os diferentes estímulos ($p = 0,505$). O pós-teste de Tukey mostrou que células estimuladas com IL-6 de ambos os grupos com câncer WSC e CC apresentaram menor taxa

apoptótica comparadas às células com mesmo estímulo inflamatório do grupo controle, conforme figura 11.

Figura 11. Quantificação das células-tronco mesenquimais em apoptose após cultivo celular. Cultivo de 24h sob condições normais (SFB) e estímulos inflamatórios de IL6 ou TNFa. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão, p=nível de significância do teste Anova two-way. *p=0,017; **p=0,006. Control SFB (n=4), WSC SFB (n=4), CC SFB (n=6), Control IL6 (n=3), WSC IL6 (n=5), CC IL6 (n=6), Control TNFa (n=3), WSC TNFa (n=6), CC TNFa (n=6).

4.8 Expressão gênica nas células-tronco mesenquimais do tecido adiposo subcutâneo.

Ao analisar a expressão do gene PDGFRa não foi detectada diferença estatística entre os grupos WSC e CC (p=0,196), e tampouco entre os diferentes estímulos SFB, IL6 e TNFa (p= 0,675) (figura 12A). O mesmo foi observado ao avaliarmos a expressão do gene PPARg (figura 12B), não havendo diferença estatística na expressão entre os grupos (p=0,651) e diferentes estímulos (p=0,129).

Figura 12. Expressão gênica das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo subcutâneo. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão, p = nível de significância do teste Anova two-way. PDGFRα: platelet-derived factor receptor A; PPARγ: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma; Beta1: receptor adrenergic β 1; PPIA: peptidylpropil isomerase A, u.a: unidade arbitrária.

Dados sobre a expressão do gene HIF1a mostraram que não houve diferença estatística entre os grupos WSC e CC ($p=0,089$); entretanto, a diferença entre as diferentes condições de cultivo foi significativa ($p=0,009$). Conforme ilustrado na figura 13A, o pós teste de Tukey mostrou que *in vitro*, células do grupo CC estimuladas com TNFα aumentaram significativamente a expressão do gene HIF1a comparada às células cultivadas com SFB, ou estimuladas com IL6, tanto no grupo WSC quanto no grupo CC. Células do grupo WSC estimuladas com TNFα apresentaram uma tendência maior em expressar HIF1a em relação às células do mesmo grupo estimuladas com IL6 ($p=0,063$).

Ao avaliarmos a expressão do gene TFAM nas células-tronco do tecido adiposo obtivemos diferença estatística entre os grupos ($p=0,011$), diferentes estímulos ($p<0,0001$) e na interação entre grupos e estímulos ($p=0,013$), conforme figura 13B. O pós teste de Tukey mostrou que células do grupo CC estimuladas com TNFα promoveram uma maior expressão deste gene em comparação às células de ambos os grupo cultivadas com SFB e IL6.

Figura 13. Expressão gênica das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo subcutâneo. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão, p = nível de significância do teste Anova two-way com pós teste de Tukey. HIF1a: Hypoxia-inducible factor 1-alpha; TFAM: Mitochondrial transcription factor A; PPIA: peptidylpropil isomerase A, u.a: unidade arbitrária. * p <0,05; ** p <0,01; **** p <0,0001; p =0,063 tendência para atingir nível de significância entre WSC IL6 e WSC TNF- α .

A expressão do gene p50 não apresentou diferença estatística entre os grupos (p =0,388). Em contrapartida, a diferença entre os diferentes estímulos foi significativa (p <0,028). Análise com o pós teste de Tukey mostrou que células-tronco do grupo CC cultivadas com TNF- α apresentaram maior expressão deste gene quando comparadas às células cultivadas com SFB e IL6 dos grupos WSC e CC, conforme figura 14A.

Ao avaliarmos a expressão de NF- κ B-p65 não obtivemos diferença na expressão para os diferentes estímulos (p =0,112), porém a diferença entre os grupos foi significativa (p =0,014). Análises pós teste mostrou que células do grupo CC cultivadas com TNF- α apresentaram maior expressão deste gene quando comparada às células WSC SFB, WSC IL6 e WSC TNF- α , além de apresentarem tendência a apresentarem maior expressão deste gene quando comparadas às células CC IL6 e CC TNF- α , conforme ilustrado na figura 14B.

Figura 14. Expressão gênica das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo subcutâneo. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão, p = nível de significância do teste Anova two-way e pós teste Tukey's. WSC SFB (n=6), WSC IL6 (n=5), WSC TNFa (n=5), CC SFB (n=5), CC IL6 (n=6), CC (n=6). NFkB p50: fator nuclear kappa-B subunidade p50; NFkB-p65: fator nuclear kappa-B subunidade p65, PPIA: lpropiol isomerase A, u.a: unidade arbitrária. * $p<0,05$; ** $p<0,01$.

Ao avaliarmos as expressões de RNAm das MSCs cultivadas apenas com SFB em toda população do estudo (grupos WSC e CC), obtivemos correlações positivas entre as seguintes expressões gênicas: NFkB-p50 vs. NFkB-p65 (figura 15A), NFkB-p65 vs. HIF1a (figura 15B); NFkB-p50 vs. PDGFRa (figura 15C); HIF1a vs. PDGFRa (figura 15D). Avaliamos também a correlação entre dados de expressões gênicas e dados bioquímicos dos pacientes, e apenas a expressão do RNAm NFkB-p50 se correlacionou positivamente com a proteína C-reativa, conforme figura 15E.

Figura 15. Correlação de Spearman. Correlação entre diferentes expressões de RNAm, e entre RNAm e Proteína C-reativa em células-tronco mesenquimais.

5.9 Expressão gênica do tecido adiposo subcutâneo

A avaliação da expressão de RNAm do tecido adiposo subcutâneo está ilustrada na tabela 8. A expressão de PPARg e PGC1a relacionados à adipogênese não apresentou diferença estatística entre os grupos ($p=0,513$;

$p > 0,999$ respectivamente). Entretanto, a expressão gênica de PDGFRa, importante por controlar o balanço entre células estromais e adipogênese foi estatisticamente maior em pacientes do grupo CC. A expressão do gene TFAM, envolvido com o metabolismo energético apresentou diferença entre os grupos, sendo maior nos pacientes do grupo CC em relação ao grupo WSC ($p = 0,038$).

Tabela 8. Análise da expressão gênica do tecido adiposo subcutâneo dos pacientes

	CONTROL	WSC	CC	p
TFAM	-	$0,811 \pm 0,189$	$2,019 \pm 0,469$	0,038
PGC1a	-	0,550 [0,208; 2,465]	0,4800 [0,143; 3,570]	$> 0,999$
PDGFRa	-	$1,099 \pm 0,1434$	$3,586 \pm 0,2822$	$< 0,0001$
PPARg	0,9700 [0,860; 1,398]	0,720 [0,450; 1,080]	0,910 [0,560; 1,350]	0,513

Análise da expressão gênica do tecido adiposo subcutâneo dos pacientes. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão, p = nível de significância do teste Anova one-way

5.10 Expressão proteica de citocinas presentes no meio de cultura das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo subcutâneo

Ao avaliarmos a concentração de citocinas pró-inflamatórias secretadas pelas células-tronco *in vitro* notamos que o estímulo TNFa foi capaz de aumentar significativamente a concentração de IL6 (figura 16A), MCP1 (figura 16B) e IL8 (figura 16C) no meio de cultivo, quando comparado ao meio das células cultivadas com SFB ou IL6, estes dados foram observados tanto no grupo WSC quanto CC.

A concentração das citocinas IL6, MCP1 e IL8 presentes no meio de cultivo das células não apresentou diferença estatística entre os grupos ($p = 0,608$, $p = 0,049$, $p = 0,319$ respectivamente). Entretanto, para os diferentes estímulos a diferença foi significativa para IL6, MCP1 e IL8 ($p < 0,0001$).

A concentração de VEGF secretada pelas células *in vitro* não apresentou diferença estatística entre grupos ($p = 0,506$), porém dados mostram uma tendência das células estimuladas com TNFa apresentarem uma maior

concentração desta citocina no meio de cultivo, comparado ao cultivo com SFB ou IL6 ($p=0,063$), conforme figura 16D.

Figura 16. Avaliação de citocinas pró inflamatórias presentes no meio de cultivo de células-tronco mesenquimais. Valores expressos em pg/mL de citocinas MCP1, IL6 e IL8 presentes no meio de cultivo das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo subcutâneo, após período 24h de cultivo. SFB: Soro Fetal Bovino; IL-6: interleucina – 6; TNF-α: fator de necrose tumoral – alfa; MCP-1: proteína 1 quimioatrativa de monócitos; IL-8: interleucina – 8; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão, p = nível de significância do teste Anova two-Way e pós teste de Tukey *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$.

Através de uma análise entre toda população de estudo do grupo WSC e CC, o meio de cultivo das células mantidas sem estímulo inflamatório, ou seja, apenas cultivadas com SFB mostrou correlações positivas fortes entre as diferentes citocinas pró-inflamatórias secretadas pelas células-tronco, IL6 vs. MCP1 (figura 17A), IL8 vs MCP1(figura 17B), VEGF vs. MCP1 (figura 17C), VEGF vs. IL6 (figura 17D), IL8 vs. IL6 (figura 17E) e IL8 vs. VEGF (figura 17F).

As concentrações de citocinas presentes no meio de cultivo das células-tronco cultivadas apenas com SFB apresentaram correlação negativa com a expressão de RNAm NFkB-p50 e NFkB-p65 avaliado em todos os pacientes dos grupos WSC e CC: NFkB-p50 vs IL6 (pg/mL) Figura 17G, NFkB-p50 vs. IL8 (pg/mL) figura 17H, NFkB-p50 vs. VEGF (pg/mL) figura 17I, NFkB-p65 vs. VEGF (pg/mL) figura 17J.

Figura 17. Correlação de Spearman entre citocinas e expressão de RNAm. Correlação entre citocinas pró-inflamatórias presentes no meio de cultivo sem estímulos das células-tronco mesenquimais, e entre citocinas e expressão de RNAm para todos os grupos de câncer, WSC e CC. A-F: correlações positivas entre citocinas (pg/mL) e expressão de RNAm.

5.11 Análise de componente principal (PCA) de dados de expressão gênica e citocinas secretadas pelas células-tronco mesenquimais

Após analisar os dados de expressão gênica das células-tronco mesenquimais e as citocinas pró inflamatórias secretadas por elas após cultivo, empregando a Análise de Componentes Principais (PCA) para correlacionar os respectivos resultados (Figura 18). Analisando os genes NFkB-p50, NFkB-p65, PPARg, PDGFRa, TFAM, HIF1a, e citocinas inflamatórias secretadas pelas células e presentes no meio de cultivo MCP1, IL6, IL8 e VEGF, encontramos *clusters* distintos de dados que se sobrepõem uns aos outros ao longo do primeiro componente principal (Dim 1), que são as células cultivadas com SFB e estimuladas com IL6 em ambos os grupos WSC e CC (Figura 19). Em contrapartida, o estímulo inflamatório TNFa parece se comportar de forma

semelhante em ambos os grupos WSC e CC (Dim 2), destacando-se das demais condições de cultivo.

Figura 18. Análise de componentes principais (PCA). Dados de expressão gênica e citocinas secretadas pelas células-tronco mesenquimais. Dispersão bidimensional PCA o gráfico representa os padrões de expressão gênica e citocinas pró-inflamatórias secretadas pelas células-tronco cultivadas sem estímulo inflamatório – SFB – soro fetal bovino, e estímulos inflamatórios IL6 – interleucina 6 ou TNFα – fator de necrose tumoral alfa, grupo WSC – cancer e peso estável e CC – cancer e caquexia: X = Dim1-Componente Principal 1 (39,54% de variância); Y = Dim2-Componente Principal 2 (Variação de 25,10%).

5.12 Interação de redes entre citocinas e genes avaliados nas células-tronco mesenquimais

A análise da interação de redes entre as citocinas MCP1, IL6, IL8 e VEGF e genes PPAR γ , TFAM, HIF1 α , PDGFRA, NFkB-p50 e NFkB-p65 conectou todos deles, mostrando existir interação. A proteína VEGF foi a única a não apresentar envolvimento com processos metabólicos, o qual está representado pela cor verde nos círculos (false discovery rate= 0,017). Além disso, esta interação de rede mostrou como ilustrados por círculos com cor azul, as citocinas e genes envolvidos na resposta inflamatória (false discovery rate <0,001), que são IL6, IL8, MCP1, p50, p65 e HIF1 α . E os envolvidos no processo de diferenciação

celular representado pela cor roxa estão IL6, NFkB-p50, NFkB-p65, HIF1a, VEGF, PDGFRa e PPARg (false discovery rate $<0,001$), conforme ilustrado na figura 19.

Figura 19. Funções biológicas das citocinas e genes avaliados nas células-tronco mesenquimais do tecido adiposo dos pacientes com câncer e caquexia. Redes de interações entre genes e proteínas. As análises da rede de interações foram construídas usando o programa online STRING com um nível de confiança médio (0,4). A espessura da linha indica a força de evidência, com conexões mais grossas indicando maior confiança na interação das citocinas e genes. Os círculos roxos representam as proteínas e genes envolvidos na regulação da diferenciação celular, os círculos azuis estão envolvidos na resposta inflamatória, círculo verde: nos processos metabólicos.

6. DISCUSSÃO

A caquexia é uma síndrome multifatorial de difícil diagnóstico e tratamento, observada em diversas doenças, como doença renal crônica, insuficiência cardíaca crônica, câncer, entre outras (55). Quando associada ao câncer, prejudica o quadro clínico dos pacientes, diminui a qualidade de vida, e é capaz de comprometer completamente o desfecho do tratamento. Embora a presença do tumor seja uma explicação para as alterações causadas, pois além de alterações no metabolismo energético, o tumor secreta diversos fatores inflamatórios (65), não se pode dizer que o tumor seja a causa direta, mas sugere-se que sua presença desencadeia uma resposta equivocada do organismo, que gera uma inflamação que se torna sistêmica.

Apesar de não haver uma definição clara e precisa da caquexia, o consenso internacional aborda alguns critérios e características clínicas para auxiliar o diagnóstico, que são perda de peso involuntária, perda de massa muscular e tecido adiposo, presença de anorexia, elevada taxa de proteína C-reativa, hipoalbuminemia, anemia, baixa qualidade de vida, entre outros (5). Baseado nestes parâmetros, a análise dos nossos resultados mostrou que pacientes do grupo com caquexia (CC) apresentaram características dos critérios propostos pelo consenso, incluindo perda de peso significativa aos 6 meses anteriores à cirurgia, com redução da massa corporal e peso atual no momento da cirurgia, conforme dados apresentados na tabela 4. Avaliação dos parâmetros bioquímicos demonstrou que nos pacientes do grupo CC a concentração média de hemoglobina foi 11.23 ± 0.37 , valor inferior ao de referência estabelecido pelo consenso (12 g/dL); este valor foi significativamente inferior comparado aos grupos controle e câncer sem caquexia (WSC). A albuminemia, entretanto não apresentou diferença estatística entre os grupos. A inflamação local e sistêmica desempenha um importante papel no desenvolvimento da caquexia, sendo que alterações inflamatórias estão relacionadas a um pior prognóstico em pacientes com câncer (66). Neste estudo, a concentração de PCR, indicadora de inflamação sistêmica estava aumentada no grupo CC e a percepção da qualidade de vida dos pacientes, avaliada através da aplicação do questionário QLQ-C30, e os três aspectos abordados neste

questionário Saúde Global, Sintomática (fadiga, dor, náuseas e vômitos), e Funcionalidade (física, cognitiva, emocional e social) foram todos prejudicados nos pacientes com câncer e caquexia. Além disso, dados relacionados à aplicação do questionário FAACT-ESPEN, que avalia o grau de anorexia, evidenciou que pacientes caquéticos apresentam reduzida pontuação, o que está relacionado ao maior grau de anorexia.

Adicionalmente, nosso grupo demonstrou anteriormente que pacientes com diferentes graus de estadiamento tumoral podem desenvolver esta síndrome, não havendo relação direta entre tamanho/estadiamento do tumor com o grau de gravidade ou a presença de caquexia (67), conforme evidenciado em nossos resultados, de modo que provavelmente a resposta do organismo contra o tumor possa ter influência para a instalação e manutenção da caquexia. Nesse sentido, a resposta de órgãos e tecidos, bem como do sistema imunitário, ganha relevância, estando potencialmente implicada com as disfunções características da caquexia.

A caquexia acomete aproximadamente 50% dos pacientes com câncer (68), e aproximadamente de 20% a 40% são causa direta de todas as mortes por câncer (4). Dados atuais revelam que o câncer colorretal é o segundo tipo mais frequente no Brasil, estando atrás apenas do câncer de próstata em homens, e câncer de mama em mulheres, e em ambos os sexos o câncer colorretal encontra-se como o terceiro tipo mais frequente em casos de mortalidade por câncer (69). Ao avaliarmos a localização do tumor nos pacientes deste estudo, a região do cólon foi a predominante em ambos os grupos com câncer, seguida pela região do reto.

Na etiologia da caquexia, o tecido adiposo contribui ativamente para a progressão da síndrome, pois sua ação endócrina, através da produção e secreção de fatores inflamatórios, e alterações relacionadas ao metabolismo energético contribuem ao agravamento do quadro clínico do paciente. Os fatores secretados pelo tecido adiposo atuam na função adipocitária (função autócrina e parácrina), além de sintetizarem uma infinidade de citocinas pró-inflamatórias (16,62) que atuam em diversas vias metabólicas produzindo um grande impacto nas funções corporais e contribuindo para a inflamação sistêmica (33,70).

O tecido adiposo é composto por adipócitos, pré adipócitos, células-tronco mesenquimais, fibroblastos e células do sistema imune (71). O processo de desenvolvimento dos adipócitos presentes no tecido adiposo tem origem nas células-tronco mesenquimais (MSCs) (72), e diante destas considerações, objetivamos avaliar o perfil das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo de pacientes caquéticos, e seu envolvimento na adipogênese e contribuição no processo inflamatório durante a caquexia. A Sociedade Internacional de Terapia Celular estabeleceu alguns critérios para caracterizar as MSCs, elas devem aderir ao plástico quando em cultura, apresentar morfologia fibroblastóide, e expressar diferentes antígenos de superfície, tais como CD90, CD75, CD105, e não expressar antígenos de linhagem hematopoiética, além de apresentarem potencial de diferenciação em adipócitos, condrócitos, miócitos e osteócitos *in vitro* (47). Estas características que corroboram dados observados nas células extraídas do tecido adiposo e cultivadas neste estudo, pois tais células apresentaram adesão e morfologia fibroblastóide *in vitro*, marcações de antígenos de superfície positivas para CD73, CD90, CD105 e marcação negativa para CD11b, além de diferenciarem-se em adipócitos após estímulo.

A caquexia apresenta como uma das características clínicas mais notáveis a perda de massa corporal, com redução significativa do tecido adiposo (73). Em nossos resultados, após dissociação tecidual dos depósitos de tecido adiposo subcutâneo e visceral peri-tumoral, pacientes do grupo com caquexia apresentaram menor quantidade de células da fração vâsculoestromal do tecido adiposo subcutâneo comparados aos grupos controle e WSC, já no tecido peri-tumoral esta diferença não foi significativa.

Nosso grupo demonstrou anteriormente uma acentuada modificação plasmática em pacientes caquéticos, com aumento significativo da concentração de adipocinas e moléculas pró-inflamatórias como TNF α , IL6 e interleucina 10 - IL10 (16), além disso, em modelo animal depósitos de gordura retroperitoneal e epididimal no estágio avançado da caquexia apresentaram aumento significativo da expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias IL6 e TNF α (62). Em seres humanos, ao avaliarem o depósito do tecido adiposo subcutâneo foi observado que a expressão dos genes TNF- α foi significativamente maior em pacientes com câncer e caquexia quando comparados ao grupo WSC (74). A IL6 é uma citocina

inflamatória que medeia uma série de funções fisiológicas, entre as principais estão proliferação e sobrevivência celular, potencialização de sinais apoptóticos (75), atuação em efeitos no metabolismo geral através de funções endócrinas, com potencial a atingir diversos órgãos (76), ativação da resposta imune aguda, estímulo de hepatócitos para produção da proteína C-reativa, entre outras (77,78). A citocina TNF α , assim como a IL6, é uma citocina pleiotrópica, pois participa de inúmeras funções fisiológicas, com participação na homeostase imunológica, defesa do hospedeiro e principalmente participa da inflamação durante infecção, em pacientes com câncer pode induzir efeitos diversos como apoptose celular, angiogênese, diferenciação e migração celular, ativação de células imunes, favorecendo potencialmente o desenvolvimento e progressão do tumor (79). Baseando-nos em todas estas evidências, utilizamos como estímulo para as células-tronco mesenquimais as citocinas pró-inflamatórias IL6 e TNF- α , a fim de avaliarmos o comportamento destas células nesse cenário inflamatório. A escolha do tecido adiposo subcutâneo ser utilizado para a obtenção das MSCs foi devido a dados anteriores de que este depósito de gordura responde precocemente à presença do tumor no organismo, em comparação ao tecido adiposo visceral (16).

A morte celular programada ou apoptose desempenha um importante papel na integridade genômica, pois impede que células danificadas com possíveis erros no material genético proliferem. Porém, a desregulação apoptótica é vista em diversas doenças, entre elas o câncer. Diversos promotores tumorais atuam inibindo a apoptose, entre eles a citocina IL6 (80), um estudo mostrou que adenocarcinomas e carcinomas em pacientes com câncer colorretal estão associados a uma progressiva inibição da apoptose (81). Trabalhos sugerem que um dos mecanismos da ação da IL6 na inibição da apoptose é através da inibição da via de sinalização de morte celular JNK (c-Jun N-terminal kinases) (82). Esta inibição da apoptose pela presença da citocina IL6 pôde ser observada em nossos resultados, pois ao avaliarmos o percentual apoptótico das MSCs cultivadas sob diferentes condições de cultivo, notou-se que as células dos pacientes com câncer com e sem caquexia estimuladas com IL6 apresentaram uma menor porcentagem de células em apoptose quando

comparadas às células do grupo controle, e as células cultivadas sem estímulos inflamatórios e estimuladas com TNF α , essa diferença não foi observada.

Durante a embriogênese, as MSCs são essenciais para o processo de formação de tecidos e reparo de lesões, e o PDGFR α é um marcador chave das MSCs no equilíbrio entre a população de células mesenquimais adipogênica e não adipogênica (71). Estudos *in vivo* mostraram que praticamente todas as MSCs derivadas da medula óssea e do tecido adiposo branco originam-se de células mesodérmicas e embrionárias positivas para PDGFR α (83). No tecido adiposo, o PDGFR α é um marcador das MSCs precursoras de adipócitos (71,84), e sua função é fundamental no controle entre células estromais e células adipogênica durante a organogênese do tecido adiposo. A superexpressão do PDGFR α está relacionada à inibição da formação do tecido adiposo branco embrionário, pois reduz a diferenciação das MSCs em adipócitos, e favorece a diferenciação em fibroblastos, que são células especializadas na produção de colágeno. Como consequência deste desequilíbrio entre adipócitos e fibroblastos há um remodelamento inadequado da matriz extra celular e aumento de fibrose no tecido adiposo (71). Portanto, estas descobertas identificam o PDGFR α como o regulador do comprometimento celular na geração de manutenção de fibroblastos pertencentes à fração estromal, ou geração de adipócitos (71). Esta alteração da expressão de PDGFR α foi observada neste trabalho, pois a expressão gênica no depósito de tecido adiposo subcutâneo de pacientes caquéticos foi significativamente maior em comparação ao grupo WSC, o que sugere uma possível ligação ao aumento de fibrose já visto por nosso grupo anteriormente (85).

Para avaliação adipogênica das MSCs decidimos investigar a expressão do gene PPAR γ , pois a proteína codificada por ele é considerada um regulador da adipogênese. Ele normalmente é expresso no estroma do tecido adiposo, região que inclui as MSC e pré-adipócitos, atuando na proliferação dos adipócitos e na diferenciação (86). O PPAR γ é membro de uma família relativamente grande de receptores nucleares, que apresentam como coativador transcricional o PGC-1 α , que interage com diversos fatores de transcrição envolvidos em uma variedade de respostas biológicas, o que inclui biogênese mitocondrial, termogênese adaptativa, metabolismo de glicose e ácidos graxos,

entre outras funções (87–89). O coativador de transcrição é uma proteína ou um complexo de proteínas que favorecem a transcrição de um gene ao interagir com fatores de transcrição, não ligando-se diretamente ao DNA (90). Desta forma o PGC1 α se liga ao PPAR γ e conseqüentemente há ativação da transcrição de genes envolvidos no processo de diferenciação dos adipócitos (87). Nossos dados mostraram que análise da expressão gênica do PPAR γ e PGC1 α no depósito do tecido adiposo subcutâneo não houve diferença estatística entre os grupos, e ao avaliarmos a expressão do PPAR γ nas MSCs cultivadas com e sem estímulos inflamatórios IL6 e TNF α também não foi observado diferença entre os grupos.

Um fenômeno comum que acomete muitos pacientes com câncer é a presença de mutações no DNA mitocondrial. As mitocôndrias são organelas essenciais para o funcionamento celular, pois elas são fonte de energia para o metabolismo, regulam inúmeras atividades fisiológicas importantes como produção de energia, sistema de espécies reativas de oxigênio (91), entre outras (92). O fator de transcrição mitocondrial A (TFAM) é considerado fundamental para que ocorra a condensação do DNA mitocondrial, replicação e transcrição do DNA mitocondrial (91). Em pacientes com câncer, a superexpressão do TFAM está relacionada a um aumento da taxa de crescimento tumoral (93); entretanto, trabalho com células cancerígenas humanas *in vitro* mostrou que a redução da expressão do TFAM pode inibir a proliferação celular, migração e capacidade de invasão (92). Dados apresentados neste trabalho sobre a expressão gênica TFAM no tecido adiposo subcutâneo de pacientes caquéticos foi estatisticamente maior quando comparado ao grupo WSC. Adicionalmente, o estímulo por TNF α em MSCs de pacientes com câncer e caquexia aumentou estatisticamente a expressão gênica do TFAM quando comparada à do grupo WSC.

O tumor é caracterizado por microambiente com baixa concentração de oxigênio, ou seja, em hipóxia; em decorrência de vascularização anormal, favorecendo o crescimento tumoral (94). A proteína codificada pelo gene HIF1 α é o regulador principal da resposta à hipóxia, e o acúmulo das subunidades do HIF estão relacionados a proliferação, apoptose, regulação da angiogênese, sobrevivência celular, adesão, entre outros (95). As MSCs localizam-se próximas

a estruturas vasculares, e em baixa concentração de oxigênio apresentam alterações em seus mecanismos funcionais, com diminuição da capacidade de adesão *in vitro*, aumento da taxa proliferativa e presença de um estado quiescente, o que compromete o potencial de diferenciação (57). A avaliação da expressão gênica do HIF1a nas MSCs cultivadas neste estudo não apresentou diferença estatística entre os grupos, porém, o estímulo inflamatório do TNF α aumentou significativamente sua expressão em ambos os grupos com câncer, sugerindo que a inflamação local promove uma resposta à hipóxia. Adicionalmente, o percentual proliferativo das MSCs em mesma passagem celular manteve-se o mesmo entre os grupos e as diferentes condições de cultivo.

A vascularização é fundamental para a homeostase do tecido adiposo, pois além de fornecer oxigênio e nutrientes ao tecido, ela também transporta metabólitos, como por exemplo fatores de crescimento (96), que são essenciais para o remodelamento deste tecido (97,98). O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é visto como um dos mais importantes reguladores da angiogênese, ele está relacionado à proliferação maligna com aumento de oxigenação local e fornecimento de nutrientes favoráveis a metástase do paciente (99). Pacientes com câncer apresentam expressão elevada de VEGF no microambiente tumoral e em diferentes órgãos (100), além de presente em grande concentração sérica (101). Em nossos resultados, as células-tronco cultivadas com TNF α apresentaram tendência a expressar uma maior concentração de citocinas VEGF no meio de cultura em comparação às outras condições de cultivo, como na presença de IL6 ou ausência de estímulo inflamatório, revelando um possível potencial a contribuir com a inflamação local e sistêmica.

O processo de inflamação ocorre principalmente com a ativação da via do NF- κ B, este complexo é visto como regulador da expressão de genes envolvidos com a resposta imune e inflamatória (29), as subunidades que compõe este complexo são p52, p50, p65, p105 e p100, elas são responsáveis por induzir a expressão gênica pela ligação a sítios-alvo do DNA. As subunidades p50 e p65 são consideradas fundamentais para que esta via de sinalização aconteça (73). Nosso grupo tem mostrado um aumento na via do NF- κ B no tecido adiposo de

pacientes com caquexia, e isto consequentemente relaciona-se à inflamação local (73). Em modelo animal com avançado grau da caquexia foi observado aumento expressivo das subunidades p50 e p65 no tecido adiposo e em adipócitos isolados (62). Em contrapartida, sabe-se que as MSCs apresentam também um papel imunomodulador, pois são produtoras de citocinas e fatores que atuam como imunossupressores em células do sistema imune inato e adaptativo (102), e em células com ação supressora ou promotoras do tumor (47). Porém, pouco se sabe a respeito da contribuição das MSCs do tecido adiposo no processo inflamatório da caquexia. Resultados apresentados neste trabalho mostraram que a citocina pró-inflamatória TNF α aumentou significativamente a expressão dos genes NF κ B-p50 e NF κ B-p65 nas MSCs de pacientes com caquexia, quando comparado aos outros estímulos. Este aumento da expressão não foi observado em pacientes do grupo WSC. Foram avaliados também citocinas pró-inflamatórias secretadas pelas MSCs após cultivo celular, e dados mostraram que após estímulo com TNF α houve aumento estatístico de citocinas pró-inflamatórias mediadas pela ativação da via NF κ B, como MCP1, IL8 e IL6 em ambos os grupos com câncer, quando comparado às outras condições de cultivo. Além disso, a expressão do gene NF- κ Bp50 correlacionou-se positivamente com a concentração sérica de proteína C-reativa, e correlacionou-se negativamente com as concentrações de citocinas IL6, IL8 e VEGF presentes no meio de cultivo das MSCs. Além disso, a concentração de NF κ B p65 correlacionou-se negativamente com a concentração de VEGF presente no meio de cultivo das MSCs.

A citocina MCP-1 é um potente recrutador de monócitos sanguíneos em resposta à inflamação local e tumores. Embora a produção de MCP-1 seja considerada parte da defesa do hospedeiro contra tumores, dados revelam que sua presença regula um ciclo vicioso entre as células tumorais e os macrófagos, o que promove uma resposta exarcebada do mecanismo de defesa do sistema imune promovendo a progressão tumoral (103). Dados avaliados da concentração de citocinas MCP1 expressos no meio de cultura das MSCs em cultura correlacionaram-se positivamente com as citocinas pró-inflamatórias IL8, IL6 e VEGF. A citocina IL8, outra citocina superexpressa no meio de cultivo das células após estímulo com TNF α apresenta propriedade pró-inflamatórias, sua

expressão é influenciada por diversos fatores, principalmente estímulos que desencadeiam estresse celular, como hipóxia, espécies reativas de oxigênio, e presença de fatores pró-inflamatórios, entre eles o TNFa (104), conforme confirmado por nossos resultados. Diversos fatores de transcrição apresentam-se como promotores de IL8, e a regulação da via NFkB é vista como fundamental para sua atividade transcricional (105). Altas concentrações de IL8 estão envolvidas com a proliferação de células endoteliais, na formação de tubos capilares e na expressão de metaloproteinasas da matriz extracelular, como já visto por nosso grupo anteriormente (85), além de atuarem na atividade angiogênica (106), informação esta que foi observada em nossos resultados, através da correlação positiva entre as concentrações de citocinas IL8 e VEGF secretadas pelas MSCs e presentes no meio de cultivo.

Uma análise geral do conjunto de dados avaliados nas MSCs foi realizada através do Componente de Análise Principal (PCA), que tem como objetivo estabelecer relações, se houver, entre as diferentes dimensões (variáveis analisadas). Todos os valores de covariância possíveis entre todas as diferentes variáveis são calculados (107). E nossos resultados mostraram que a presença da citocina pró-inflamatória TNFa modula o comportamento das MSCs em ambos os grupos de pacientes com câncer, fazendo com que tenham comportamentos diferentes das células cultivadas sem estímulo e estimuladas com IL6.

Contudo, diante de nossos achados, a presença da citocina pró-inflamatória TNFa parece contribuir para que as células-tronco do tecido adiposo de pacientes com caquexia ativem genes e secretem citocinas pró-inflamatórias de modo a favorecer o caos metabólico durante a síndrome caquexia.

7.CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstraram que o número de células da fração vasculoestromal presentes no tecido adiposo subcutâneo de pacientes caquéticos é reduzido, e a presença da citocina pró-inflamatória TNF-a em contato com as células-tronco mesenquimais do tecido adiposo de pacientes com câncer e caquexia promove um aumento da expressão de genes e citocinas pró-inflamatórias, além de ativação do gene relacionado à hipóxia e alteração no metabolismo mitocondrial. Demonstramos aqui, pela primeira vez que a citocina pró-inflamatória TNF-a contribui para a modulação das células-tronco do tecido adiposo na manutenção de um ambiente inflamatório relacionado à caquexia.

ANEXOS

Anexo 1: Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa - FMUSP

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 09/12/2015, APROVOU o Protocolo de Pesquisa nº 514/15 intitulado: "ANÁLISE DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DO TECIDO ADIPOSEO, E SEU POTENCIAL ADIPOGÊNICO EM PACIENTES COM CAQUEXIA ASSOCIADA AO CÂNCER" apresentado pelo Departamento de CIRURGIA

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466/12, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: José Pinhata Otoch

Pesquisador (a) Executante: Ariene Murari Soares de Pinho

CEP-FMUSP, 09 de Dezembro de 2015.

Prof. Dra. Maria Aparecida Azevedo Kolke Folgueira
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Anexo 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

ESTUDO: “Análise das células tronco mesenquimais do tecido adiposo, e seu potencial adipogênico em pacientes com caquexia associada ao câncer.”

O sr(a) será internado na Divisão de Cirurgia do Hospital Universitário da USP. Neste serviço além de cuidarmos dos pacientes, realizamos cirurgias e, também, estudamos as doenças com a finalidade de melhorar o atendimento aos pacientes.

Desta forma, o sr(a) 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 participação neste estudo será de muita importância para nós.

Caso o sr(a) não queira participar ou queira desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo ao seu tratamento, ou seja, sua participação é espontânea.

Estou ciente que:

- I) O estudo é de importância para que possamos investigar as possíveis causas da caquexia (perda de peso, apetite e qualidade de vida), uma possível consequência da sua doença;
- II) Caso aceite participar da pesquisa, se for o caso, o médico responsável pela sua cirurgia (após retirada do tecido adiposo visceral) irá separar fragmentos do mesmo, de aproximadamente 3cm³ (aproximadamente do tamanho de um feijão), que serão utilizados posteriormente para análise como parte desse projeto.
- III) Será realizada uma coleta de sangue (20 ml) previamente à cirurgia, sem interferir no procedimento cirúrgico, por um profissional da saúde devidamente habilitado, também no próprio hospital, em condições de assepsia, ou seja limpeza total. O seu sangue será analisado para verificarmos grau de inflamação, que é uma medida utilizada pela equipe de saúde para entender as mudanças que ocorrem em seu organismo devido a doença e a associação desta inflamação com o que você sente.
- IV) **Todos esses procedimentos podem aumentar o tempo de cirurgia em não mais que 5 minutos. Não será necessário prolongar a anestesia, por que os procedimentos realizados para a coleta são os mesmos da cirurgia. A coleta de amostras para esse estudo não modifica, de forma alguma, os procedimentos padrão da cirurgia a qual você será submetido.** Todo esse material servirá para entender melhor a doença chamada caquexia.

- V)** Mesmo que você concorde com a doação das amostras, o cirurgião e a equipe médica poderão coletar apenas algumas delas ou nenhuma (dependendo do caso), conforme a condução da cirurgia, para que não haja aumento de riscos para você.
- VI)** As coletas realizadas, de tecidos e sangue servirão para o entendimento e estudo da doença e poderão ajudar na busca de tratamento. A participação neste projeto não tem como objetivo, contudo, tratar sua doença, mas sim dar uma contribuição para que possamos definir as alterações que ocorrem no corpo devido a doença.
- VII)** Você não terá qualquer despesa financeira com relação aos procedimentos médicos, clínicos e terapêuticos efetuados no estudo;
- VIII)** Você não receberá compensação financeira por participação do estudo, pois os procedimentos do estudo serão realizados nas visitas que você já deverá fazer ao hospital, dentro da indicação médica.
- IX)** Você tem a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;
- X)** A desistência não causará nenhum prejuízo à sua saúde ou bem-estar físico. Não virá a interferir no atendimento ou tratamento médico, ou nos agendamentos necessários.
- XI)** Os resultados obtidos durante este estudo serão mantidos em sigilo, mas você deve concordar que sejam divulgados em publicações científicas (resumos de congressos, livros e artigos de periódicos científicos), desde que seus dados pessoais não sejam mencionados. Isso é importante para garantir que a pesquisa possa ser conhecida e possivelmente melhorar o diagnóstico, o atendimento e o tratamento de pacientes com a mesma doença que a sua.
- XII)** O material coletado poderá ser armazenado em soluções específicas para cada técnica, refrigerado a 4°C, ou freezer a -80°C, para manter a integridade das amostras e posterior utilização, sempre dentro da mesma linha de pesquisa;
- XIII)** Após a utilização do material coletado para a pesquisa, caso haja material remanescente, este será incinerado (queimado) em local para descarte de material biológico humano;
- XIV)** Caso você desejar, poderá, pessoalmente, tomar conhecimento dos resultados ao final desta pesquisa;
 - () Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
 - () Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

- XV)** Este Projeto será desenvolvido na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo /USP/ São Paulo e Hospital Universitário, numa colaboração que envolve os seguintes pesquisadores: José Pinhata Otoch (FM/ USP); Marília Cerqueira Leite Seelaender (ICB/ USP); Linda Maximiniano e Paulo Sérgio Martins Alcântara (HU/ USP); e Miguel Batista Junior (UMC – Universidade de Mogi das Cruzes).
- XVI)** A qualquer momento, você poderá entrar em contato com a Comissão de Ética em Experimentos com seres Humanos da Faculdade de Medicina da USP, ou a Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário, que são os órgãos que avaliam a realização de pesquisas com pessoas e garantem que a pesquisa da qual você participa seja de importância clínica e/ou científica e que está sendo conduzida de forma apropriada. O telefone, email e endereço dessas comissões estão no fim desse documento, que será emitido em 2 vias, para que você tenha uma cópia.
- XVII)** Caso você tenha, em algum momento, desconforto relacionado à sua doença (a participação na pesquisa só poderá causar desconforto adicional mínimo, relacionado à coleta de sangue), você deverá entrar em contato com o telefone fornecido ao final desse documento (Pronto-atendimento do HU).

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

_____, portador da Cédula de identidade,
RG _____, e inscrito no
CPF/MF _____ nascido (a) em ____ / ____
/ _____, abaixo assinado (a), concordo de livre e espontânea vontade em
participar como voluntário (a) do estudo “Análise das células tronco
mesenquimais do tecido adiposo, e seu potencial adipogênico em pacientes com
caquexia associada ao câncer”.

São Paulo, _____ de _____ de 20__

() Participante da pesquisa _____

Testemunha 1: _____
Nome / RG / Telefone

Testemunha 2: _____
Nome / RG / Telefone

Responsável Médico e pelo Projeto: _____

Prof. Dr. José Pinhata Otoch

Hospital Universitário/ Faculdade de Medicina USP

Tel 11 3091-9291 / 11 3091-9489

Identificação do CEP-HU/USP:

Endereço: Av. Prof. Lineu Preste, 2565 – Cidade Universitária – Butantã,
São Paulo – SP, CEP: 05508-000, telefone: 3091-9457, e-mail:
cep@hu.usp.br (funcionamento - 8h às 12h e das 14h às 17h)

Identificação do CEP-FMUSP:

Endereço: Av. Dr. Arnaldo, 251 - sala 36 - 21º andar - Cerqueira Cesar, São
Paulo – SP, CEP 01246-000, telefone: 3893-4401, e-mail: cep.fm@usp.br
(funcionamento - 8h às 16h)

Pronto-atendimento do HU: Endereço: Av. Prof. Lineu Preste, 2565 – Cidade
Universitária – Butantã, São Paulo – SP, CEP: 05508-000, telefone: 3091-9344
(funcionamento 24h)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tisdale MJ. Biology of cachexia. *J Natl Cancer Inst.* 1997;89(23):1763–73.
2. Fearon KCH, Glass DJ, Guttridge DC. Cancer cachexia: Mediators, signaling, and metabolic pathways. *Cell Metab.* 2012;16(2):153–66.
3. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018 Nov;68(6):394–424.
4. Ni J, Zhang L. Cancer cachexia: Definition, staging, and emerging treatments. *Cancer Manag Res.* 2020;12:5597–605.
5. Fearon K, Strasser F, Anker SD, Bosaeus I, Bruera E, Fainsinger RL, et al. Definition and classification of cancer cachexia: An international consensus. *Lancet Oncol [Internet].* 2011;12(5):489–95. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(10\)70218-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70218-7)
6. Batista JL, Neves RX, Peres SB, Yamashita AS, Shida CS, Farmer SR, et al. Heterogeneous time-dependent response of adipose tissue during the development of cancer cachexia. *J Endocrinol.* 2012 Dec;215(3):363–73.
7. Batista ML, Olivan M, Alcantara PSM, Sandoval R, Peres SB, Neves RX, et al. Adipose tissue-derived factors as potential biomarkers in cachectic cancer patients. *Cytokine.* 2013 Feb;61(2):532–9.
8. Henriques FS, Sertié RAL, Franco FO, Knobl P, Neves RX, Andreotti S, et al. Early suppression of adipocyte lipid turnover induces immunometabolic modulation in cancer cachexia syndrome. *FASEB J.* 2017 May 1;31(5):1976–86.
9. Wang B, Lin Y, Hu Y, Shan W, Liu S, Xu Y, et al. MTOR inhibition improves the immunomodulatory properties of human bone marrow mesenchymal stem cells by inducing COX-2 and PGE2. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8(1):1–13.
10. Gonzalez Camargo R, Quintas Teixeira Ribeiro H, Vieira Geraldo M, Matos-Neto E, Xavier Neves R, Carlos Carnevali Jr L, et al. Cancer Cachexia and MicroRNAs. 2015 [cited 2020 May 29]; Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/367561>
11. Argilés JM, Moore-Carrasco R, Busquets S, López-Soriano FJ. Catabolic mediators as targets for cancer cachexia. *Drug Discov Today.* 2003;8(18):838–44.
12. Argilés JM, Busquets S, Toledo M, López-Soriano FJ. The role of cytokines in cancer cachexia. *Curr Opin Support Palliat Care [Internet].* 2009 Dec [cited 2021 Jun 7];3(4):263–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19713854/>
13. Argilés JM, Betancourt A, Guàrdia-Olmos J, Però-Cebollero M, López-Soriano FJ, Madeddu C, et al. Validation of the CACHexia SCORe (CASCO). Staging cancer patients: The use of miniCASCO as a simplified tool. *Front Physiol.* 2017;8(FEB):1–9.
14. 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. 2010;
15. Dev R. The assessment and management of cancer cachexia: Hypogonadism

- and hypermetabolism among supportive and palliative care patients. *Curr Opin Support Palliat Care*. 2014;8(3):279–85.
16. Batista ML, Henriques FS, Neves RX, Oliván MR, Matos-Neto EM, Alcântara PSM, et al. Cachexia-associated adipose tissue morphological rearrangement in gastrointestinal cancer patients. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2016 Mar 1;7(1):37–47.
 17. Bing C, Russell S, Becket E, Pope M, Tisdale MJ, Trayhurn P, et al. Adipose atrophy in cancer cachexia: Morphologic and molecular analysis of adipose tissue in tumour-bearing mice. *Br J Cancer*. 2006;95(8):1028–37.
 18. Shellock FG, Riedinger MS, Fishbein MC. Brown adipose tissue in cancer patients: Possible cause of cancer-induced cachexia. *J Cancer Res Clin Oncol* [Internet]. 1986 Feb [cited 2021 Jun 7];111(1):82–5. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00402783>
 19. Alves MJ, Figuerêdo RG, Azevedo FF, Cavallaro DA, Neto NIP, Lima JDC, et al. Adipose tissue fibrosis in human cancer cachexia: The role of TGF β pathway. *BMC Cancer*. 2017 Mar 14;17(1).
 20. Kim J, Hematti P. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: A novel type of alternatively activated macrophages. *Exp Hematol*. 2009 Dec 1;37(12):1445–53.
 21. Argilés JM, López-Soriano J, Almendro V, Busquets S, López-Soriano FJ. Cross-talk between skeletal muscle and adipose tissue: A link with obesity? *Med Res Rev*. 2005;25(1):49–65.
 22. Kwok KHM, Lam KSL, Xu A. Heterogeneity of white adipose tissue: Molecular basis and clinical implications. *Exp Mol Med* [Internet]. 2016;48(3):e215-12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/emm.2016.5>
 23. Lira FS, Rosa JC, Zanchi NE, Yamashita AS, Lopes RD, Lopes AC, et al. Regulation of inflammation in the adipose tissue in cancer cachexia: Effect of exercise. Vol. 27, *Cell Biochemistry and Function*. Cell Biochem Funct; 2009. p. 71–5.
 24. Machado AP, Costa Rosa LFPB, Seelaender MCL. 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.
 25. Batista ML, Peres SB, McDonald ME, Alcantara PSM, Oliván M, Otoch JP, et al. Adipose tissue inflammation and cancer cachexia: Possible role of nuclear transcription factors. Vol. 57, *Cytokine*. Cytokine; 2012. p. 9–16.
 26. Camargo RG, dos Reis Riccardi DM, Ribeiro HQT, Carnevali LC, de Matos-Neto EM, Enju L, et al. Nf-kbp65 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.
 27. Esteve Ràfols M. Adipose tissue: Cell heterogeneity and functional diversity. *Endocrinol y Nutr (English Ed)*. 2014 Feb 1;61(2):100–12.
 28. Laurencikiene J, Van Harmelen V, Nordström EA, Dicker A, Blomqvist L, Näslund E, et al. NF- κ B is important for TNF- α -induced lipolysis in human adipocytes. *J Lipid Res*. 2007;48(5):1069–77.

29. Gupta SC, Sundaram C, Reuter S, Aggarwal BB. Liturgy of the Hours and Islamic Salat. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2001;1799(10–12):775–87. Available from: <http://www.academia.edu/download/30925174/Anazodo.pdf>
30. Park A. Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells* [Internet]. 2014 [cited 2020 Nov 22];6(1):33. Available from: [/pmc/articles/PMC3927012/?report=abstract](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3927012/?report=abstract)
31. Yarak S, Okamoto OK. Células-tronco derivadas de tecido adiposo humano: desafios atuais e perspectivas clínicas. *An Bras Dermatol*. 2010;85(5):647–56.
32. Becker AS, Zellweger C, Bacanovic S, Franckenberg S, Nagel HW, Frick L, et al. Brown fat does not cause cachexia in cancer patients: A large retrospective longitudinal FDG-PET/CT cohort study. *PLoS One*. 2020;15(10 October):1–17.
33. Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MIC, Lima FB. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. Vol. 50, *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*. Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia; 2006. p. 216–29.
34. Li Y, Jin D, Xie W, Wen L, Chen W, Xu J, et al. PPAR- γ and Wnt Regulate the Differentiation of MSCs into Adipocytes and Osteoblasts Respectively. *Curr Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2017 Oct 17 [cited 2021 Jun 7];13(3):185–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29034841/>
35. Chen Q, Shou P, Zheng C, Jiang M, Cao G, Yang Q, et al. Fate decision of mesenchymal stem cells: Adipocytes or osteoblasts? *Cell Death Differ*. 2016;23(7):1128–39.
36. Tang QQ, Lane MD. Adipogenesis: From stem cell to adipocyte. *Annu Rev Biochem* [Internet]. 2012 Jul [cited 2020 Nov 22];81:715–36. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22463691/>
37. Linhart HG, Ishimura-Oka K, Demayo F, Kibe T, Repka D, Poindexter B, et al. C/EBP α is required for differentiation of white but not brown adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2001 Oct 23 [cited 2020 Nov 22];98(22):12532–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11606718/>
38. Lin W, Huang L, Li Y, Fang B, Li G, Chen L, et al. Mesenchymal Stem Cells and Cancer: Clinical Challenges and Opportunities. *Biomed Res Int*. 2019;2019.
39. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. THE DEVELOPMENT OF FIBROBLAST COLONIES IN MONOLAYER CULTURES OF GUINEA-PIG BONE MARROW AND SPLEEN CELLS. *Cell Prolif* [Internet]. 1970 Oct 1 [cited 2021 Jun 7];3(4):393–403. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x>
40. Murphy MB, Moncivais K, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: Environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Exp Mol Med* [Internet]. 2013;45(11):e54-16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/emm.2013.94>
41. Wang Y, Chen X, Cao W, Shi Y. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: Pathological and therapeutic implications [Internet]. Vol. 15, *Nature Immunology*. Nature Publishing Group; 2014 [cited 2021 Jun 7]. p. 1009–16. Available from: <https://www.nature.com/articles/ni.3002>
42. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002 Dec;13(12):4279–95.

43. Biswas A, Hutchins R. Embryonic Stem Cells. <https://home.liebertpub.com/scd> [Internet]. 2007 May 23 [cited 2021 Jun 7]; Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/scd.2006.0081>
44. Scadden DT. The stem-cell niche as an entity of action [Internet]. Vol. 441, Nature. Nature Publishing Group; 2006 [cited 2021 Jun 7]. p. 1075–9. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature04957>
45. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. In: Tissue Engineering [Internet]. 2001 [cited 2020 May 30]. p. 211–28. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/107632701300062859>
46. C N-A, J R, LE S. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;12(2):126–31.
47. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* [Internet]. 2006 Aug [cited 2021 Jun 7];8(4):315–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16923606/>
48. Wan Z, Chen X, Gao X, Dong Y, Zhao Y, Wei M, et al. Chronic myeloid leukemia-derived exosomes attenuate adipogenesis of adipose derived mesenchymal stem cells via transporting miR-92a-3p. *J Cell Physiol* [Internet]. 2019 Nov 1 [cited 2021 Jun 7];234(11):21274–83. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jcp.28732>
49. Kate Shannon . GODPJSJMCFRN. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiol Behav*. 2016;176(1):139–48.
50. Moyat M, Coakley G, Harris N. Stromal-Immune Cell Crosstalk Maintains Type 2 Immune Cell Populations within Visceral Adipose Tissue. *Immunometabolism*. 2020;
51. Fan XL, Zhang Y, Li X, Fu QL. Mechanisms underlying the protective effects of mesenchymal stem cell-based therapy. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2020;77(14):2771–94. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03454-6>
52. Fukawa T, Yan-Jiang BC, Min-Wen JC, Jun-Hao ET, Huang D, Qian CN, et al. Excessive fatty acid oxidation induces muscle atrophy in cancer cachexia. *Nat Med* [Internet]. 2016 Jun 1 [cited 2021 Jun 7];22(6):666–71. Available from: <https://www.nature.com/articles/nm.4093>
53. Inaba S, Hinohara A, Tachibana M, Tsujikawa K, Fukada S. Muscle regeneration is disrupted by cancer cachexia without loss of muscle stem cell potential. *PLoS One*. 2018;13(10):1–15.
54. Wang S, Li X, Xu M, Wang J, Zhao RC. Reduced adipogenesis after lung tumor exosomes priming in human mesenchymal stem cells via TGF β signaling pathway. *Mol Cell Biochem*. 2017;435(1–2):59–66.
55. Evans WJ, Morley JE, Argilés J, Bales C, Baracos V, Guttridge D, et al. Cachexia: A new definition. *Clin Nutr* [Internet]. 2008 Dec 1 [cited 2021 Jun 7];27(6):793–9. Available from: <http://www.clinicalnutritionjournal.com/article/S0261561408001131/fulltext>

56. Lysaght J, van der Stok EP, Allott EH, Casey R, Donohoe CL, Howard JM, et al. Pro-inflammatory and tumour proliferative properties of excess visceral adipose tissue. *Cancer Lett.* 2011 Dec 15;312(1):62–72.
57. Fotia C, Massa A, Boriani F, Baldini N, Granchi D. Hypoxia enhances proliferation and stemness of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Cytotechnology* [Internet]. 2015;67(6):1073–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10616-014-9731-2>
58. de Pinho AMS, Pereira ISO, Odo MEY, Eça LPM. Comparative histological controlled study of human skin collagen fibers after cell therapy with fibroblasts. *Surg Cosmet Dermatology.* 2015;7(3):206–10.
59. Mehlem A, Hagberg CE, Muhl L, Eriksson U, Falkevall A. Imaging of neutral lipids by oil red O for analyzing the metabolic status in health and disease. *Nat Protoc.* 2013;8(6):1149–54.
60. Baek SJ, Kang SK, Ra JC. In vitro migration capacity of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells reflects their expression of receptors for chemokines and growth factors. *Exp Mol Med.* 2011;43(10):596–603.
61. Abdul-Sater AA, Edilova MI, Clouthier DL, Mbanwi A, Kremmer E, Watts TH. The signaling adaptor TRAF1 negatively regulates Toll-like receptor signaling and this underlies its role in rheumatic disease. *Nat Immunol.* 2017;18(1):26–35.
62. Neves RX, Rosa-Neto JC, Yamashita AS, Matos-Neto EM, Riccardi DMR, Lira FS, et al. White adipose tissue cells and the progression of cachexia: Inflammatory pathways. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2016 May 1;7(2):193–203.
63. Vileigas DF, Harman VM, Freire PP, Marciano CLC, Sant’Ana PG, de Souza SLB, et al. Landscape of heart proteome changes in a diet-induced obesity model. *Sci Rep.* 2019;9(1):1–16.
64. Salic A, Mitchison TJ. A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2008 Feb 19 [cited 2021 Oct 10];105(7):2415. Available from: [/pmc/articles/PMC2268151/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1761151/)
65. Khatami M. Unresolved inflammation: “Immune tsunami” or erosion of integrity in immune-privileged and immune-responsive tissues and acute and chronic inflammatory diseases or cancer. Vol. 11, *Expert Opinion on Biological Therapy.* 2011. p. 1419–32.
66. Forrest LM, McMillan DC, McArdle CS, Angerson WJ, Dunlop DJ. Evaluation of cumulative prognostic scores based on the systemic inflammatory response in patients with inoperable non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* [Internet]. 2003 Sep 15 [cited 2021 Jun 7];89(6):1028–30. Available from: <https://www.nature.com/articles/6601242>
67. LIMA JDCC. O papel do infiltrado inflamatório no tumor e sua contribuição para inflamação sistêmica e desenvolvimento da caquexia. 2016;63.
68. Hussey HJ, Tisdale MJ. Effect of a cachectic factor on carbohydrate metabolism and attenuation by eicosapentaenoic acid. *Br J Cancer.* 1999;80(8):1231–5.
69. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil | INCA - Instituto Nacional de Câncer [Internet]. [cited 2021 Jun 7]. Available from: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil>

70. Cuenca AG, Cuenca AL, Winfield RD, Joiner DN, Gentile L, Delano MJ, et al. Novel Role for Tumor-Induced Expansion of Myeloid-Derived Cells in Cancer Cachexia. *J Immunol* [Internet]. 2014 Jun 15 [cited 2021 Jun 7];192(12):6111–9. Available from: [/pmc/articles/PMC4078793/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2478793/)
71. Sun C, Berry WL, Olson LE. PDGFR α controls the balance of stromal and adipogenic cells during adipose tissue organogenesis. *Dev*. 2017;144(1):83–94.
72. Park A. Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells*. 2014;6(1):33.
73. Camargo RG, dos Reis Riccardi DM, Ribeiro HQT, Carnevali LC, de Matos-Neto EM, Enjiu L, et al. Nf-kbp65 and expression of its pro-inflammatory target genes are upregulated in the subcutaneous adipose tissue of cachectic cancer patients. *Nutrients*. 2015;7(6):4465–79.
74. de Matos-Neto EM, Lima JDCC, de Pereira WO, Figuerêdo RG, Riccardi DM do R, Radloff K, et al. Systemic inflammation in cachexia - Is tumor cytokine expression profile the culprit? *Front Immunol*. 2015;6(DEC):1–11.
75. Kamimura D, Ishihara K, Hirano T. IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. [Internet]. Vol. 149, *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*. Springer, Berlin, Heidelberg; 2003 [cited 2021 Jun 7]. p. 1–38. Available from: <https://link.springer.com/chapter/10.1007/s10254-003-0012-2>
76. Wolvekamp MCJ, Marquet RL. Interleukin-6: historical background, genetics and biological significance [Internet]. Vol. 24, *Immunology Letters*. Immunol Lett; 1990 [cited 2021 Jun 7]. p. 1–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2197219/>
77. Heinrich PC, Behrmann I, Müller-Newen G, Schaper F, Graeve L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway [Internet]. Vol. 334, *Biochemical Journal*. Portland Press Ltd; 1998 [cited 2021 Jun 7]. p. 297–314. Available from: [/biochemj/article/334/2/297/33830/Interleukin-6-type-cytokine-signalling-through-the](https://www.biochemj.org/article/334/2/297/33830/Interleukin-6-type-cytokine-signalling-through-the)
78. Heinrich PC, Castell J V., Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J*. 1990;265(3):621–36.
79. Wajant H. The role of TNF in cancer. *Results Probl Cell Differ* [Internet]. 2009 [cited 2021 Jun 7];49:1–15. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/400_2008_26
80. Wright SC, Zhong J, Larrick JW. Inhibition of apoptosis as a mechanism of tumor promotion. *FASEB J* [Internet]. 1994 Jun 1 [cited 2021 Jun 7];8(9):654–60. Available from: <http://europepmc.org/article/MED/8005393>
81. Elder DJE, Hague A, Hicks DJ, Paraskeva C. Differential growth inhibition by the aspirin metabolite salicylate in human colorectal tumor cell lines: Enhanced apoptosis in carcinoma and in vitro-transformed adenoma relative to adenoma cell lines. *Cancer Res*. 1996;56(10):2273–6.
82. Lin MT, Juan CY, Chang KJ, Chen WJ, Kuo ML. IL-6 inhibits apoptosis and retains oxidative DNA lesions in human gastric cancer AGS cells through up-regulation of anti-apoptotic gene mcl-1. *Carcinogenesis*. 2001;22(12):1947–53.
83. Miwa H, Era T. Tracing the destiny of mesenchymal stem cells from embryo to adult bone marrow and white adipose tissue via pdgfra expression. *Dev*.

- 2018;145(2).
84. Campbell JS, Hughes SD, Gilbertson DG, Palmer TE, Holdren MS, Haran AC, et al. Platelet-derived growth factor C induces liver fibrosis, steatosis, and hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2005 Mar 1 [cited 2021 Jun 7];102(9):3389–94. Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0409722102
 85. Alves MJ, Figuerêdo RG, Azevedo FF, Cavallaro DA, Neto NIP, Lima JDC, et al. Adipose tissue fibrosis in human cancer cachexia: The role of TGF β pathway. *BMC Cancer*. 2017 Mar 14;17(1).
 86. Lowell BB. PPAR γ : An essential regulator of adipogenesis and modulator of fat cell function. *Cell*. 1999;99(3):239–42.
 87. Liang H, Ward WF. PGC-1 α : A key regulator of energy metabolism. *Am J Physiol - Adv Physiol Educ*. 2006;30(4):145–51.
 88. Karamanlidis G, Karamitri A, Docherty K, Hazlerigg DG, Lomax MA. C/EBP β reprograms white 3T3-L1 preadipocytes to a brown adipocyte pattern of gene expression. *J Biol Chem* [Internet]. 2007 Aug 24 [cited 2020 Nov 22];282(34):24660–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17584738/>
 89. Townsend K, Tseng Y-H. Brown adipose tissue. *Adipocyte*. 2012 Jan;1(1):13–24.
 90. Puigserver P, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α (PGC-1 α): Transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev*. 2003;24(1):78–90.
 91. Wallace DC. Mitochondria and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(10):685–98.
 92. Hu W, Ma SL, Liu LL, Zhu YH, Zeng TT, Li Y, et al. Impact of mitochondrial transcription factor A expression on the outcomes of ovarian, endometrial and cervical cancers. *Am J Transl Res*. 2020;12(9):5343–61.
 93. Han B, Izumi H, Yasuniwa Y, Akiyama M, Yamaguchi T, Fujimoto N, et al. Human mitochondrial transcription factor A functions in both nuclei and mitochondria and regulates cancer cell growth. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2011 Apr 29 [cited 2021 Jun 7];408(1):45–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21453679/>
 94. Huang D, Li C, Zhang H. Hypoxia and cancer cell metabolism. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2014;46(3):214–9.
 95. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy [Internet]. Vol. 3, *Nature Reviews Cancer*. European Association for Cardio-Thoracic Surgery; 2003 [cited 2021 Jun 7]. p. 721–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13130303/>
 96. Cao Y. Angiogenesis and vascular functions in modulation of obesity, adipose metabolism, and insulin sensitivity [Internet]. Vol. 18, *Cell Metabolism*. Cell Press; 2013 [cited 2021 Jun 7]. p. 478–89. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24035587/>
 97. Cao Y. Adipose tissue angiogenesis as a therapeutic target for obesity and metabolic diseases [Internet]. Vol. 9, *Nature Reviews Drug Discovery*. Nature Publishing Group; 2010 [cited 2021 Jun 7]. p. 107–15. Available from:

<https://www.nature.com/articles/nrd3055>

98. Wang B, Fu X, Liang X, Deavila JM, Wang Z, Zhao L, et al. Retinoic acid induces white adipose tissue browning by increasing adipose vascularity and inducing beige adipogenesis of PDGFR α + adipose progenitors. *Cell Discov* [Internet]. 2017;3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/celldisc.2017.36>
99. Harmey JH, Bouchier-Hayes D. Vascular endothelial growth factor (VEGF), a survival factor for tumour cells: Implications for anti-angiogenic therapy. *BioEssays* [Internet]. 2002 Mar 1 [cited 2021 Jun 7];24(3):280–3. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/bies.10043>
100. Fontanini G, Lucchi M, Vignati S, Mussi A, Ciardiello F, De Laurentiis M, et al. Angiogenesis as a prognostic indicator of survival in non-small-cell lung carcinoma: A prospective study. *J Natl Cancer Inst*. 1997;89(12):881–6.
101. Wager MGT and JFS. 基因的改变 NIH Public Access. *Bone* [Internet]. 2011;23(1):1–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
102. Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. 2007 [cited 2021 Jun 7]; Available from: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/110/10/3499/1289468/zh802207003499.pdf>
103. Yoshimura T. The chemokine MCP-1 (CCL2) in the host interaction with cancer: A foe or ally? *Cell Mol Immunol*. 2018;15(4):335–45.
104. Mahe Y, Mukaida N, Kuno K, Akiyama M, Ikeda N, Matsushima K, et al. Hepatitis B virus X protein transactivates human interleukin-8 gene through acting on nuclear factor κ B and CCAAT/enhancer-binding protein-like cis-elements. *J Biol Chem*. 1991;266(21):13759–63.
105. Mukaida N, Mahe Y, Matsushima K. Cooperative interaction of nuclear factor- κ B- and cis-regulatory enhancer binding protein-like factor binding elements in activating the interleukin-8 gene by pro-inflammatory cytokines. *J Biol Chem* [Internet]. 1990;265(34):21128–33. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)45336-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(17)45336-1)
106. Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK. IL-8 Directly Enhanced Endothelial Cell Survival, Proliferation, and Matrix Metalloproteinases Production and Regulated Angiogenesis. *J Immunol* [Internet]. 2003 Mar 15 [cited 2021 Jun 7];170(6):3369–76. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12626597/>
107. Lid PP, Planning S. PRINCIPAL COMPONENTS ANALYSIS (PCA)* XIn 1. Vol. 19. 1993.