

JOANNA DARCK CAROLA CORREIA LIMA

Análise de proteômica do microambiente tumoral de pacientes caquéticos: Desvendando vias biológicas e mecanismos moleculares na caquexia

Tese apresentada ao Programa de Biologia Celular e do Desenvolvimento, no Departamento de Biologia dos Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor Ciências.

Versão corrigida

São Paulo
2020

JOANNA DARCK CAROLA CORREIA LIMA

Análise de proteômica do microambiente tumoral de pacientes caquéticos: Desvendando vias biológicas e mecanismos moleculares na caquexia

Tese apresentada ao Programa de Biologia Celular e do Desenvolvimento, no Departamento de Biologia dos Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Marília Cerqueira Leite Seelaender

Versão corrigida

São Paulo
2020

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Carola Correia Lima, Joanna Darck
Análise de proteômica do microambiente tumoral de
pacientes caquéticos: Desvendando vias biológicas e
mecanismos moleculares na caquexia / Joanna Darck
Carola Correia Lima; orientadora Marília Cerqueira
Leite Seelaender. -- São Paulo, 2020.
118 p.

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

1. Caquexia. 2. Tumor. 3. Inflamação. 4. Estresse
Oxidativo. 5. Fibrose. I. Cerqueira Leite
Seelaender, Marília, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Joanna Darck Carola Correia Lima

Titulo da Dissertação/Tese: **Análise proteômica do microambiente tumoral de pacientes caquéticos:** Desvendando vias biológicas e mecanismos moleculares na caquexia

Orientador: Dra Marília Cerqueira Leite Seelaender

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

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

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente: Assinatura:

Nome:

Instituição:



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 19 de abril de 2016.

PARECER 1282/CEPSH

CAAE nº 54930116.6.0000.5467

A Comissão de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do ICB, nesta data, **APROVOU** o projeto intitulado: "**Análise molecular no microambiente tumoral de pacientes caquéticos: Uma busca de marcadores para diagnóstico precoce da síndrome de caquexia**" dos pesquisadores Profa. Dra. **Marília Cerqueira Leite Seelaender** e da aluna **Joanna Darck Carola Correia Lima**.

Cabe aos pesquisadores elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final) de acordo com a Resolução nº 466/12, item II, II.19 e II.20, do Conselho Nacional de Saúde, conforme modelo constante no site: www.icb.usp.br, como também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste projeto.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **19/04/2017**, bem como anexado uma cópia à Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

Prof. Dr. **PAOLO MARINHO ANDRADE ZANOTTO**
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP



CARTA DE ANUÊNCIA DA CÂMARA DE PESQUISA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA USP

São Paulo, 10 de março de 2016.

Ilmo(a). Sr(a).
Profa. Dra. Marília Cerqueira Leite Seelaender
Pesquisador(a) Responsável

Prezado(a) Senhor(a)

A Câmara de Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, após análise do mérito científico do Projeto de Pesquisa **"Análise molecular no microambiente tumoral de pacientes caquéticos: uma busca de marcadores para diagnóstico precoce da síndrome de caquexia"** considerou como exequível sua realização nas dependências do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo.

Entretanto, lembra que este documento se refere à concordância da Câmara de Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo com a possível realização do estudo, **o que não autoriza o início da pesquisa**, devendo o(a) pesquisador(a) aguardar a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em cumprimento a Resolução do Conselho Nacional de Saúde Nº 466, de 12 de dezembro de 2012.

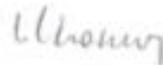
Atenciosamente,

Prof. Dr. Paulo Andrade Lotufo
Presidente da Câmara de Pesquisa

São Paulo, 04 de outubro de 2017

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o Instituto do Câncer do Estado de São Paulo está ciente e concorda em participar do estudo colaborando com o transferência de amostras armazenadas em Biobanco da Rede Acadêmica de Pesquisa sobre o Câncer da Universidade de São Paulo (USP) para o estudo "Análise molecular no microambiente tumoral de pacientes caquéticos: Uma busca de marcadores para diagnóstico precoce da síndrome de caquexia" do Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, sob responsabilidade da pesquisadora, Profa. Dra. Marília Cerqueira Leite Seelaender.



Prof. Dr. Roger Chammas

Coordenador

Centro de Investigação Translacional em Oncologia

Instituto do Câncer do Estado de São Paulo

Prof. Dr. Roger Chammas

Coordenador

Centro de Investigação Translacional em Oncologia

Instituto do Câncer do Estado de São Paulo



Eu dedico esse momento incondicionalmente às várias expressões do amor. Amor de mãe, Amor de companheira de vida, Amor de filho de quatro patas.

MÃE, FANI E SNOW

AGRADECIMENTOS

À toda energia que rege o movimento do mundo. À minha força maior na Terra, meu exemplo mais puro de amor: Mãe te dedico todas as minhas conquistas, hoje e sempre! Toda família, muito obrigada!

Chegar em casa do trabalho nunca foi tão gratificante até o dia que eu te conheci, Snow! Com você eu aprendi TANTO sobre o amor, sobre lealdade, sobre confiança! Meu primeiro filho de 4 patas, te amo!

Os dias mais difíceis e mais felizes dessa jornada eu compartilhei principalmente com você, Fani. Obrigada por enxergar o melhor de mim. Como diria Guimarães Rosa: “Qualquer amor já é um pouquinho de saúde, um descanso na loucura”.

À sorte de ter tido não apenas uma orientadora e sim uma amiga, uma mãe, uma professora, uma desorientadora também! 8 anos trabalhando juntas, muitas viagens, muitos artigos, muitos relatórios, muitas cervejas, muitos experimentos, muitas risadas ao redor do mundo... “Ah éééé”, muito amor também!

Sabe a sorte de ter entrado na pós-graduação e ter ganhado uma família? Eu tive! De primeiro ganhei um irmão, ele se chama Emídio, as vezes ele é Pai também, porém todas as vezes ele é amor. Para você, eu dedico José Saramago “Se tens um coração de ferro, bom proveito! O meu, fizeram-no de carne, e sangra todo dia”. Em seguida eu ganhei o HOMEM mais incrível que eu já conheci na vida, o nome dele é Andrews, é lindo, é inteligente, sabe cozinhar, sabe trocar lâmpada e dobrar lençol de elástico! É minha alma de outras vidas, aquela pessoa que te entende só de olhar. E sem contar no meu outro irmão de “janela”, Raony. Era para ser apenas uma colaboração científica... veja bem, ganhei para vida! Ele me ensinou a técnica de laboratório mais marcante da minha vida! Admiro muito sua persistência e seu caráter científico. Sonho com o dia que compartilharemos uma sala e laboratório, colocaremos Lady Gaga para os alunos e ensinaremos a coreografia!

À casa da gente! Todas as gerações que passaram nessa casa! Quantas histórias e churrascos! Aconchego do lar! Ao meu melhor amigo, irmão e companheiro, Tales! De capelinha para o meu coração!

A todos meus colegas de laboratório, agradeço a dedicação, ensinamentos, discussões, brigas e madrugadas. Especialmente aos meus amores Silvio, Ivanir e Emilia. Amo vocês!

Antes de chegar em São Paulo, eu trouxe uma bagagem linda de amigos e pessoas queridas que me inspiram muito na simplicidade e vontade de viver! Márcia, Amanda, Suenny, Ricardo, Isa, Andressa, Olavo... e também agora o baby João e Pedro!! Tia Marisa e família, obrigada por todo apoio! Ingrid e família, sou eternamente grata! Aos meus amores lindos, Marcones e Livia. Amo vocês!!!!

I would like to thank you to two labs that I was involved during this time. Professor Sir Peter Ratcliffe, it was a pleasure being in your group! I have no doubts that it was the most incredible time of my life! I grow up as a scientist and person! I am very happy to be part of this amazing carotid body team. Thanks a lot: Tammie, Olívia, Norma, Julie, Tom, Gloria, Nils, Ya-Min, Ran, Silvia, Samvid, Jess, Maria, James, Veronique, Atsu, Professor Chris, Professor David. University of Oxford thank you very much! I will be back soon!!! Also, Professor Sarah Ewald at University of Virginia, thank you very much for the incredible time at your lab!

À todos os pacientes pela generosa contribuição à ciência e pesquisa!

À toda equipe de colaborações, Dra Fernanda Janku, Dr Emer Ferro, Dr Leo Iwai, Dr. Paulo Sérgio Martins, obrigada pelo suporte e contribuição nesse trabalho.

A Professora Patrícia Gama, Professor Roger Chammas e Professor Pinhata, obrigada por compor essa banca de avaliação incrível! Vocês são uma inspiração para essa jovem (nem tanto) aspirante à cientista!!!

À todos do Instituto de Ciências Biomédicas, em especial a todo grupo de professores e alunos do departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. A todos os servidores do Instituto que trabalham para melhoria do ambiente! Ao serviço da biblioteca, segurança e secretaria, em especial a Tania. Ah, ouvir o Sr Peninha cantar todas as manhãs ajudou muito a começar o dia com alegria!!

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo financiamento do projeto desenvolvido no país (2016/02780-9) e pelo financiamento do estágio no exterior realizado na Universidade de Oxford (2018/20083-1). Agradeço também ao apoio a pesquisa da CAPES e CNPq.

“Eu sou um intelectual que não tem medo de ser amoroso. Amo as gentes e amo o mundo. E é porque amo as pessoas e amo o mundo que eu brigo para que a justiça social se implante antes da caridade.”

Paulo Freire **VIVE!**

RESUMO

Lima JDCC. **Análise proteômica do microambiente tumoral de pacientes caquéticos:** Desvendando vias biológicas e mecanismos moleculares na caquexia. 2020. **118p** [Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2020.

A caquexia é uma síndrome paraneoplásica (CAC) associada ao mau prognóstico. A caquexia é caracterizada por perda de massa muscular com ou sem perda de tecido adiposo. A CAC é impulsionada por uma associação múltipla de alterações metabólicas, incluindo ingestão reduzida de alimentos, gasto energético aumentado e inflamação. O objetivo do presente estudo foi caracterizar proteínas alteradas no tumor de pacientes caquéticos e seus respectivos mecanismos moleculares envolvidos na caquexia. Foram recrutados 74 pacientes (câncer estável em peso $n = 31$; câncer caquético $n = 43$) com diagnóstico de câncer colorretal, e biópsias de tumores foram coletadas durante a cirurgia. A análise proteômica foi realizada. 71 proteínas foram estatisticamente significativamente diferentes entre os grupos (valor de $p < 0,05$). A análise da Ontologia do Gene mostrou que sua maioria das proteínas estavam relacionadas ao metabolismo energético, estresse oxidativo, remodelamento extracelular da matriz e manutenção celular. A fim de aumentar o conhecimento dos mecanismos envolvidos na fibrose e no estresse oxidativo, mostramos a presença de deposição de colágeno no tumor, ativação da alfa-SMA, vimentina e genes relacionados ao estresse oxidativo. Nossos resultados demonstram a ativação da via TGF β no tumor, através p38 MAPK. Os dados sugerem que a resposta inflamatória intratumoral contribui para o aparecimento da fibrose. A remodelação do tumor, provavelmente pela transdiferenciação induzida por TGF β dos fibroblastos para os miofibroblastos, induz um perfil desequilibrado de citocinas inflamatórias, angiogênese e elevação dos componentes da matriz extracelular (EMC). Por outro lado, especula-se que essas alterações possam ser alteradas em resposta à hipóxia no microambiente tumoral de pacientes caquéticos. Além disso, os resultados fornecem informações sobre a adoção de análises de amostras de tumores para o diagnóstico precoce da síndrome.

Palavras-chave: Tumor; Caquexia; Fibrose; Inflamação; Hipóxia; Estresse Oxidativo.

ABSTRACT

Lima JDCC. **Proteomic analysis in tumor microenvironment of cachectic patients: Understanding biological pathways and molecular mechanisms in cachexia.** 2020. 118p [Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2020.

Cachexia is a paraneoplastic syndrome related with poor prognosis. Cachexia is characterised by muscle wasting with or without loss of adipose tissue. CAC is driven by multiple association of metabolic changes including reduced food intake, enhanced energy expenditure and inflammation. The aim of the present study was to characterize proteins altered in the tumour and respective the molecular mechanisms involved in cachexia. Methods 74 patients (weight stable cancer n = 31; cachectic cancer n = 43) diagnosed with colorectal cancer were recruited, and tumour biopsies were collected during surgery. Proteomic analysis was performed. 71 proteins were statistically significantly different between the groups (p value<0.05). Gene Ontology analysis showed that their majority consisted of proteins related with energetic and protein metabolism, oxidative stress, matrix extracellular remodelling and cellular maintenance. In order to increase the knowledge of the mechanisms involved in the fibrosis and oxidative stress, we show the presence of collagen deposition in the tumour, activation of alfa-SMA, vimentin and genes related to oxidative stress. Our results demonstrate TGF- β pathway activation in the tumour in cachexia, through the (non-canonical) mitogen-activated protein kinase pathway. The results show that during cachexia, intratumoural inflammatory response contributes to the onset of fibrosis. Tumour remodelling, probably by TGF- β -induced transdifferentiation of fibroblasts to myofibroblasts, induces unbalanced inflammatory cytokine profile, angiogenesis, and elevation of extracellular matrix components (EMC). On the other hand, we speculate that these changes may be altered in response to hypoxia in tumor microenvironment of cachectic patients. Furthermore, the results provide insight on the adoption of tumour sample analysis for precocious diagnosis of the syndrome.

Keywords Tumour; Cachexia; Fibrosis; Inflammation; Hypoxia; Oxidative stress.

ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
FDA	<i>Food and drugs Administration</i>
IMC	Índice de massa corporal
PCR	Proteína C-Reativa
PIF	Fator indutor de proteólise
LMF	Fator mobilizador de lipídeos
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
IL-6	Interleucina -6
IL-1	Interleucina -1
IFN γ	Interferon gamma
CRC	Câncer colorretal
IL-8	Interleucina-8
CAFS	Fibroblastos associados ao câncer
MEC	Componentes de matriz extracelular
Hif-1a	Fator indutor de hipóxia
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
EMT	Transição epitelial-mesenquimal
TGFB	Fator de transformação do crescimento beta
Alfa-SMA	Alfa – actina 2
ERO	Espécies reativas de oxigênio
PKM2	Piruvato quinase
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
QLQC30	Qualidade de vida
FAACT	Pontuação anorexica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
WSC	<i>Weight stable cancer</i>
CC	<i>Cachectic cancer</i>
NACL	Cloreto de sódio
TEAB	Brometo de tetraetilamônio
TFA	Ácido Trifluoroacético
LC-MS/MS	Espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida
GO	<i>Gene ontology</i>
RT-PCR	<i>reação da transcriptase reversa</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
PBS	Tampão fosfato salino
LLC	<i>Lewis Lung Carcinoma</i>
DEPC	Dicarbonato de dietila
DAB	3, 3 -diaminobenzidine
mRNA	Rna mensageiro
HSPs	Proteínas de choque térmico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Critérios para diagnóstico da Caquexia	26
Figura 2 Estágios da caquexia associada ao câncer no Consenso Brasileiro de Caquexia.....	27
Figura 3 Fisiopatologia da caquexia	30
Figura 4 <i>Hallmarks</i> do câncer	32
Figura 5 Estresse oxidativo no microambiente tumoral	35
Figura 6 Ferramenta utilizada para diagnóstico da caquexia	41
Figura 7 Esquema de marcação isotópica	44
Figura 8 Gráfico de expressão das proteínas no tumor.....	62
Figura 9 Análise de ontologia do gene	64
Figura 10 Rede de interação proteína-proteína	65
Figura 11 Expressão gênica de fatores da matriz extracelular no tumor.	67
Figura 12 Imunohistoquímica para colágeno tipo III e α -SMA no tumor.	69
Figura 13 Expressão das isoformas de TGF β e da via canônica mediada pelas SMADS no tumor.....	70
Figura 14 Interação entre a via da MAPK e a sinalização de TGF β na caquexia.	72
Figura 15 Processo de angiogênese e hipóxia no tumor de pacientes caquéticos.....	74
Figura 16 Cálculo do consumo de alimento dos animais após inoculação.....	75
Figura 17 Análise da dimensão do tumor nos animais WT e IL1-R - / -.....	76
Figura 18 Perfil de citocinas inflamatórias no microambiente tumoral.	77
Figura 19 Expressão gênica de marcadores de transição epitelial-mesenquimal no microambiente tumoral.....	78
Figura 20 Expressão proteica da via da α -SMA no fígado, tecido adiposo e músculo nos animais WT e IL-1Rko.	79
Figura 21 Hibridização in situ para HIF1a e VEGF no tumor dos animais WT e IL1-R-/-.....	80
Figura 22 Expressão gênica de fatores relacionados ao estresse oxidativo. Resultados expressos como média \pm erro padrão. A expressão do gene alvo foi normalizada para o gene de limpeza beta 2 microglobulina (B2m). * diferença significativa entre CC e WSC, $p < 0,05$. Número de amostra (n=7-9 por grupo)81	81
Figura 23 Correlação de Spearman entre o estresse oxidativo e hipóxia.....	82
Figura 24 Microscopia eletrônica de transmissão dos exossomos isolados derivados do tumor.....	83
Figura 25 Expressão proteica do alfa- CD63 nos exossomos derivado do tumor.	84
Figura 26 Expressão proteica de HSP70 e HSP90 nos exossomos derivado do tumor de pacientes.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 : Lista de Primers relacionado a matriz extracelular	47
Tabela 2 Lista de fatores analisados por multiplex	49
Tabela 3 Lista de primers relacionado ao estresse oxidativo	54
Tabela 4 Classificação geral dos pacientes	60
Tabela 5 Peso dos tecidos dos grupos de animais selvagens (WT) e KO(IL-1R-/-)	75

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	20
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
2.1. História da caquexia	24
2.2. Definição clínica.....	25
2.3. Fisiopatologia da caquexia.....	28
2.4. Câncer colorretal e o microambiente tumoral.....	31
3. OBJETIVOS.....	38
3.1. Objetivo Geral	38
3.2. Objetivos específicos.....	38
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1. Ética da pesquisa	40
4.2. Recrutamento dos pacientes, aplicação do termo de consentimento e avaliação clínica.....	40
4.3. Coleta de sangue e análise dos parâmetros bioquímicos	40
4.4. Diagnóstico de caquexia e critérios de exclusão.....	41
4.5. Coleta do material biológico	42
4.6. Análise Patológica do Tumor	42
4.7. Preparação das amostras	43
4.8. Marcação isotópica.....	43
4.9. Aquisição de dados por LC-MS/MS.....	45
4.10. Análise de Dados do Proteoma.....	45
4.11. Banco de dados.....	46
4.12. Reação em cadeia da Polimerase (PCR em tempo Real).....	47
4.13. Determinação da expressão proteica por Luminex® e Western blotting	48
4.14. Análises Histológicas.....	50
4.15. Obtenção de animais e inoculação do tumor	52
4.16. Análise de bioluminescência das células LLC-GFP	52
4.16. Expressão gênica – IL-1R <i>knockouts</i> (PCR em tempo Real	53
4.17. RNA Scope (Hibridização <i>in situ</i>).....	53
4.18. Expressão gênica – Estresse oxidativo (PCR em tempo real)	54
4.19. Cultura primária do tumor.....	55

4.20. Isolamento dos exossomos.....	55
4.21. Caracterização dos exossomos.....	55
4.22. Quantificação das proteínas de choque térmico (HSP70 E HSP90) pelo método Elisa.....	56
4.23. Análise estatística.....	57
5. Resultados.....	59
5.1. Dados clínicos.....	59
5.2. Análise de proteômica.....	61
5.3. Expressão gênica dos fatores envolvidos no processo de fibrose.....	66
5.4. Análise histológica para detecção de colágeno e ativação de fibroblastos.....	67
5.5. A sinalização de TGF β através da via canônica mediada pelas SMADs na caquexia.....	69
5.6. Análise da interação entre a via da MAPK e a sinalização de TGF β na caquexia.....	71
5.7. Investigação da permeabilidade vascular mediada pela via TGF β / MAPK72	
5.8. Avaliação da ingestão alimentar após inoculação tumoral.....	74
5.9. Peso dos tecidos dos animais selvagens e knockouts para IL-1R.....	75
5.10. Análise da dimensão do tumor entre os animais selvagens (WT) e KO (IL-1R $^{-/-}$).....	76
5.11. Caracterização da inflamação no tumor entre os animais selvagens (WT) e KO (IL-1R $^{-/-}$).....	77
5.12. Impacto da expressão de fatores relacionados à hipóxia (HIF1A e VEGF) nos animais WT e IL-1Rko.....	79
5.13. Relação entre o estresse oxidativo na caquexia.....	81
5.14. Correlação do estresse oxidativo e hipóxia no microambiente tumoral de pacientes caquéticos.....	82
5.15. Morfologia dos exossomos.....	83
5.16. Detecção de marcadores proteicos específicos de exossomos.....	84
5.17. Expressão das HSPs nos exossomos derivados do tumor de pacientes com caquexia.....	84
6. Discussão.....	88
7. CONCLUSÃO.....	98
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*.....	100
9. ANEXOS.....	111

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A caquexia é caracterizada como uma síndrome metabólica que causa extrema perda de massa corporal, especificamente perda de massa muscular que pode estar associada ou não a perda de tecido adiposo (FEARON et al., 2011). É um sintoma que se associa há inúmeras condições crônicas, tais como, insuficiência renal crônica, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS – do inglês *Acquired Immunodeficiency Syndrome*), doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), esclerose múltipla e câncer. De modo geral, o quadro de caquexia leva ao comprometimento funcional, desempenho físico diminuído e, conseqüentemente, redução da sobrevida (EVANS et al., 2008; TISDALE, 2009). A caquexia associada ao câncer é considerada uma doença progressiva e as manifestações clínicas dos pacientes são variáveis, porém, sempre sendo associadas a perda de massa corporal, presença ou não da anorexia, fadiga, náusea, saciedade precoce, anemia e presença marcante da inflamação sistêmica (EVANS et al., 2008; FEARON et al., 2011; LAVIANO; KOVERECH; MARI, 2015; LAVIANO; PALDINO, 2014).

Quando associada ao câncer, a prevalência geral de caquexia varia de 40%, no diagnóstico do câncer, a 80%, na doença avançada. E tem sido considerada a causa de morte direta e principal de 20% a 30% dos pacientes com tumores sólidos, além de reduzir a sobrevida média em até 30% (BRUERA, 1997; FOX et al., 2009; TISDALE, 2009; VON HAEHLING; ANKER, 2014). A caquexia pode se desenvolver em diversos tipos de tumores, porém, já foi demonstrado que a maior incidência é no câncer de pâncreas (88,9%), seguido pelo câncer gástrico (76,5%), câncer de cólon e reto (55%) e câncer de esôfago (52,9%) (SUN; QUAN; YU, 2015).

Infortunadamente, é provável que a incidência de caquexia associada ao câncer aumente nos próximos anos. Uma estimativa recente sugeriu que mais de 160.000 pessoas nos Estados Unidos se encontram no hospital com um diagnóstico de caquexia a cada ano (ARTHUR et al., 2014). Apesar de décadas de pesquisa, não existe tratamento padrão aprovado pela Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (FDA – do inglês *Food and Drug Administration*); o desenvolvimento terapêutico no campo

da caquexia associada ao câncer permanece uma necessidade crítica não atendida (DUNNE et al., 2019). Além disso, embora a nutrição seja um elemento essencial no tratamento do câncer, estudos demonstraram que embora alguns pacientes apresentem um efeito benéfico para o aconselhamento nutricional (DE WAELE et al., 2015; RAVASCO, 2015), outros estudos mostraram que o aconselhamento dietético precoce foi eficiente para estabilizar a ingestão alimentar, mas não teve efeito benéfico sobre a mortalidade e outros parâmetros da síndrome (BOURDEL-MARCHASSON et al., 2014) confirmando, portanto, que do ponto de vista clínico, uma vez estabelecida, a caquexia não pode ser revertida com suplementação e estratégias terapêuticas nutricionais (ARGILÉS et al., 2019; FEARON et al., 2011).

Fisiologicamente, a caquexia é caracterizada por um balanço energético negativo, além de alterações hormonais e de neuropeptídeos associados aos mecanismos de saciedade, bem como mecanicamente pela contribuição do microambiente tumoral através da criação de um ambiente inflamatório gerando um caos metabólico (PETRUZZELLI; WAGNER, 2016; PORPORATO, 2016). Diante disso, a caquexia tem sido abordada como uma síndrome multifatorial e multiórgãos, que resulta da reprogramação sistêmica do metabolismo do hospedeiro em resposta, também, ao crescimento e progressão do tumor. De fato, um vasto número de artigos na literatura demonstram que o tumor pode promover e induzir a caquexia secretando fatores que influenciam diretamente na perda de tecido adiposo e muscular (HE et al., 2014; LIN; SCOTT, 2012; PETRUZZELLI et al., 2014; ZHANG et al., 2017) além de promover alterações e desbalanço na função de órgãos, tais como, fígado, intestino, cérebro e sistema imunológico, sendo considerada uma síndrome multiorgânica (ARGILÉS et al., 2014; EVANS et al., 2008; PORPORATO, 2016). Embora o papel do tumor no desenvolvimento da caquexia tenha sido cada vez mais investigado devido sua extrema contribuição no desenvolvimento da síndrome, a caquexia associada ao câncer não é apenas uma complicação da progressão do tumor como massa, pois as células tumorais induzem alterações sistêmicas. Algumas evidências científicas já demonstraram que a incidência de caquexia não é relacionada com a progressão e estadiamento tumoral (LIMA et al., 2019a; PETRUZZELLI;

WAGNER, 2016; YOUNES; NOGUCHI, 2000). De certo modo, isso indica a importância de entender ativamente a interação entre o tumor e o hospedeiro em nível sistêmico, com um foco particular nas dependências metabólicas dos tumores em crescimento.

Apesar dos avanços científicos obtidos até os dias atuais que caracterizam a caquexia como um processo inflamatório crônico, ainda assim, não existem ferramentas e critérios de diagnóstico e tratamento disponíveis nas bases científicas e clínicas, tendo em vista complexidade da síndrome. Diante disso, a importância no entendimento entre a interação complexa do microambiente tumoral e seu hospedeiro, é de extrema necessidade para definir e caracterizar o melhor tratamento dos pacientes com caquexia associada ao câncer. A análise proteômica no tumor de pacientes com caquexia é uma oportunidade para investigar proteínas que possam servir como biomarcadores, bem como, entender funções e vias biológicas alteradas que possam direcionar o caminho para o tratamento da síndrome.

Revisão Bibliográfica

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. História da caquexia

Historicamente, a caquexia foi descrita há mais de 3.500 anos em trechos bíblicos pelo rei Davi, considerado o segundo e maior dos reis de Israel, cujo sofria de um distúrbio alimentar. Em suas descrições, o rei Davi relatou em uma passagem bíblica momentos desde a falta de ingestão de alimentos, através da parte “ *I forgot to eat my bread/ eu esqueci de comer meu pão*”, que aborda o quadro de anorexia (falta de apetite), como também, demonstra a perda de peso extrema e involuntária, associada à fraqueza e fadiga, através da parte “ *My knees are weak through fasting; and my flesh failed of fatness; My strenght failed.../ “Meus joelhos estão fracos pelo jejum; e minha carne falhou em gordura; e minha força falhou...”*. (BEN-NOUN, 2004)

Posteriormente, Hipócrates (460 - 377 a.C.), um dos criadores da medicina grego, escreveu:

“the flesh is consumed and becomes water...the abdomen fills with water, the feet and legs swell, the shoulders, clavicles, chest, and thighs melt away... The illness is fatal/A carne é consumida e se transforma em água... o abdômen se enche de água, os pés e as pernas incham, os ombros, as clavículas, o tórax e as coxas desaparecem ... A doença é fatal.”

Em seus relatos transcritos, a caquexia é considerada uma síndrome que transforma a carne em água, se tornando uma doença fatal (VAKIL; GOLWALA, 1951). Sendo assim, o termo caquexia é derivado de palavras gregas, e resultante da combinação das palavras *kakos*, que significa má e *hexis*, que significa condição (DOEHNER; ANKER, 2002).

Em meados de 1860, um médico francês, Charles Mauriac descreveu pela primeira vez a caquexia em doenças cardíacas, abordando a perda de peso involuntária como um fenômeno secundário comumente observados em doenças cardíacas. Mais recentemente, a ganhadora do Prêmio Nobel de Literatura de 2009, Herta Müller, escreveu em seu livro “The Hunger Angel” que

“uma vez que a carne desaparece do corpo, carregar os ossos se torna um fardo; atrai você para a terra”(HERTA, 2009). Subsequentemente, a caquexia foi sendo cada vez mais estudada e descoberta como uma consequência e complicação em inúmeras doenças, e somente nas últimas décadas a síndrome recebeu uma maior atenção (DOEHNER; ANKER, 2002). Embora os avanços obtidos nos últimos 20 anos, a etiologia da caquexia continua desconhecida, bem como ainda não existem critérios fidedignos para diagnóstico clínico, o que impede e inviabiliza uma terapia eficaz (ARGILÉS et al., 2014; EVANS et al., 2008; FEARON et al., 2011; MADDOCKS et al., 2016)

2.2. Definição clínica

Em linhas gerais, a caquexia tem sido caracterizada como uma síndrome metabólica altamente complicada, associada às doenças subjacentes e primordialmente caracterizada pela perda involuntária de peso, principalmente de massa muscular com ou sem perda de massa gordurosa, além de comumente associada à anorexia e resistência à insulina. Além disso, a característica e manifestação mais constante na caquexia é a presença da inflamação sistêmica. (MORLEY; THOMAS; WILSON, 2006; PORPORATO, 2016; SEELAENDER et al., 2015)

Conforme descrito anteriormente, embora a caquexia não seja até o momento, alvo de uma definição exata, precisa e uniforme, muitas definições de caquexia foram publicadas e discutidas na literatura (BLUM et al., 2010; EVANS et al., 2008; FEARON et al., 2011; MUSCARITOLI et al., 2010). Porém, apenas nos anos atuais, as diretrizes para o diagnóstico da caquexia associada ao câncer surgiram e seguem aparecendo. Definições anteriores descreveram a caquexia como "uma síndrome envolvendo a perda de músculo e gordura diretamente causada diretamente por fatores tumorais, ou indiretamente através da resposta do hospedeiro à presença do tumor" (MACDONALD et al., 2003) Posteriormente, aprimorando essa definição, além da perda de peso, outros parâmetros foram inseridos, tais como a presença da inflamação sistêmica, pois estudos indicam consistentemente a presença desse sintoma (FEARON; VOSS; HUSTEAD, 2006).

Esses inúmeros e importantes avanços na comunidade científica que estuda caquexia, houve um consenso internacional com critérios para diagnóstico da caquexia. Desse modo, em 2008, Evans e colaboradores, propuseram uma definição de caquexia baseado nas descobertas até o presente momento, utilizando critérios específicos de diagnóstico que consistia na perda de peso involuntária acrescidas de importantes alterações em parâmetros físicos e bioquímicos (EVANS et al., 2008). Nesse consenso, alguns parâmetros foram estabelecidos como critérios de definição, nos quais incluem-se a perda involuntária de peso corporal nos últimos 12 meses, que significa uma percentagem de perda de peso menor/igual a 5% do peso corporal anterior relatado ou índice de massa corporal (IMC) menor que 20kg/m², acrescidos de mais três das cinco alterações, a saber: diminuição da força muscular, fadiga, anorexia, diminuição da massa livre de gordura e alterações bioquímicas caracterizadas pela anemia, através dos valores de hemoglobina menor que 12g/dL; alterações nas concentrações séricas da albumina (<3,2g/dL) e aumento de marcadores inflamatórios, que podem ser mensurados tanto pelo aumento de proteínas de fase aguda, quanto pelo aumento de proteína C-reativa (PCR) e também, um aumento em citocinas inflamatórias, conforme descrito através do aumento da interleucina-6, como pode ser observado abaixo na figura 1.

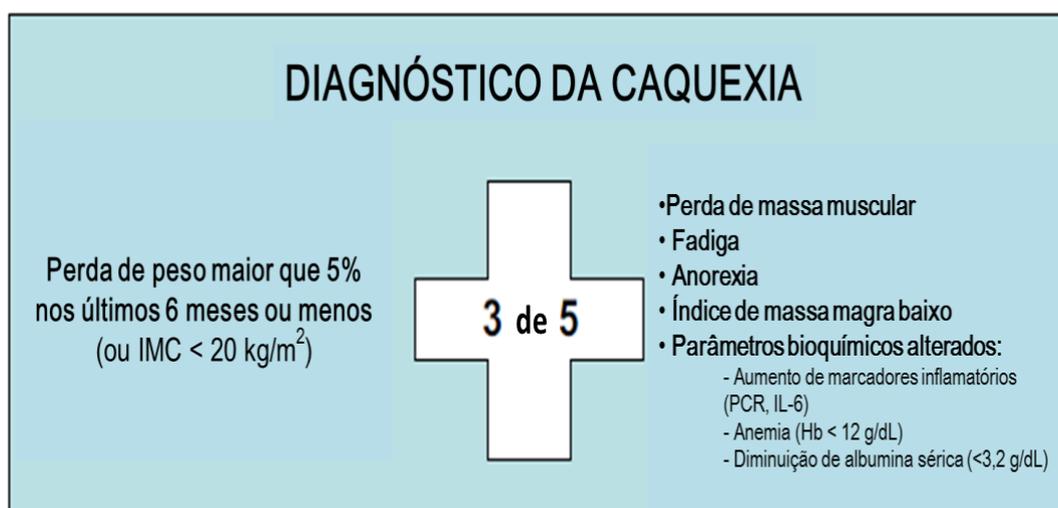


Figura 1 Critérios para diagnóstico da Caquexia (adaptado de EVANS et al., 2008).

Posteriormente, em 2009, o grupo de trabalho Triagem do Estado Nutricional em Oncologia (SCRINO) definiu caquexia como perda de peso

superior a 10% e estabeleceu classes de caquexia com base em anorexia, saciedade precoce e fadiga(BOZZETTI; MARIANI, 2009).

Em 2011, uma outra classificação e definição do consenso internacional propôs mediante os dados publicados na literatura, que a caquexia ainda pode ser subdividida e observada em fases de relevância clínica: pré-caquexia, caquexia e caquexia refratária, conforme ilustrado na Figura 2. De acordo com Fearon e colaboradores, na fase inicial, chamada de pré-caquexia, foi incluído os pacientes que apresentavam uma perda de peso corporal $\leq 5\%$, presença de anorexia e alterações metabólicas; a fase posterior, chamada de caquexia propriamente dita, foi definida como presença da perda de peso involuntária e $> 5\%$ durante um período de 6 meses, ou também pelo IMC $< 20 \text{ kg/m}^2$; e, a ultima fase, denominada de caquexia refratária, inclui os pacientes que não respondem mais às terapias anticâncer.(FEARON et al., 2011)

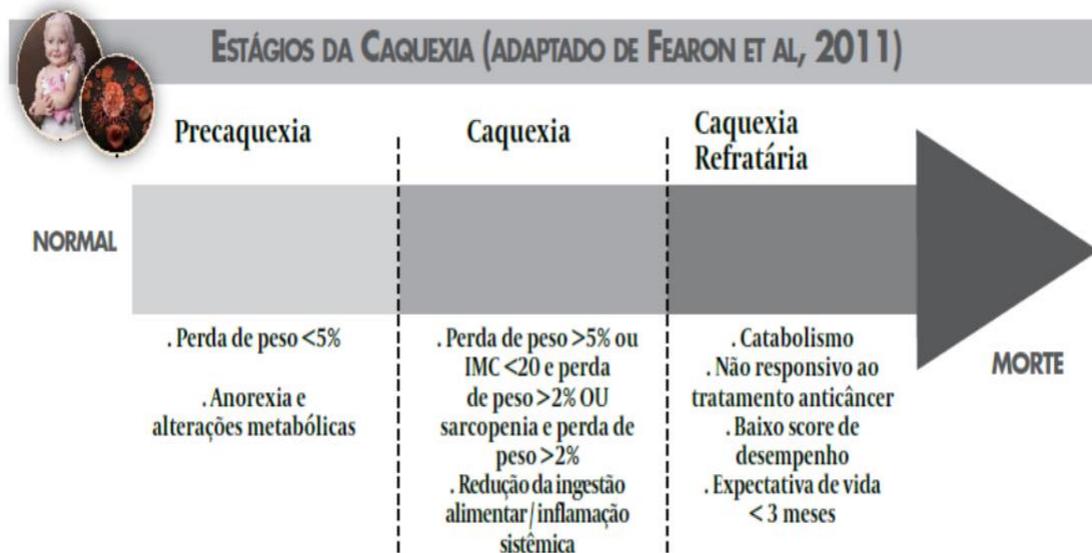


Figura 2 Estágios da caquexia associada ao câncer no Consenso Brasileiro de Caquexia (adaptado de FEARON et al., 2011).

Atualmente, uma década após a definição do primeiro consenso internacional de caquexia, a comunidade e sociedade científica têm discutido em conferências internacionais a necessidade da atualização da definição de caquexia. As descobertas atuais permitem uma análise precisa de quantificação de perda de massa muscular, através de análises secundárias de imagens oncológicas padrão (BARACOS; MAZURAK; BHULLAR, 2019) bem

bem como, já foi demonstrado mecanismos relacionados com a expressão de hormônios que regulam o peso corporal, ingestão de alimentos e a homeostase energética (VANHOUTTE et al., 2016). Diante disso, existe uma necessidade atual das definições de caquexia serem atualizadas para garantir uma melhora no diagnóstico precoce da síndrome além de guiar e direcionar novos alvos e estratégias terapêuticas.

2.3. Fisiopatologia da caquexia

Os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na caquexia são complexos. A caquexia é caracterizada por aumento da taxa metabólica basal que não é compensada pelo aumento da ingestão calórica. Acredita-se que, no caso da caquexia, o aumento do gasto energético em repouso é uma possível causa da síndrome (POEHLMAN et al., 1994; SOMERVILLE; KOORNNEEF, 2002). Em adição, estudos demonstram um desbalanço entre síntese proteica e degradação proteica, levando para um quadro de perda de músculo esquelético (BHOGAL; LORITE; TISDALE, 2006; HARDEE; MONTALVO; CARSON, 2017; SMITH; TISDALE, 1993).

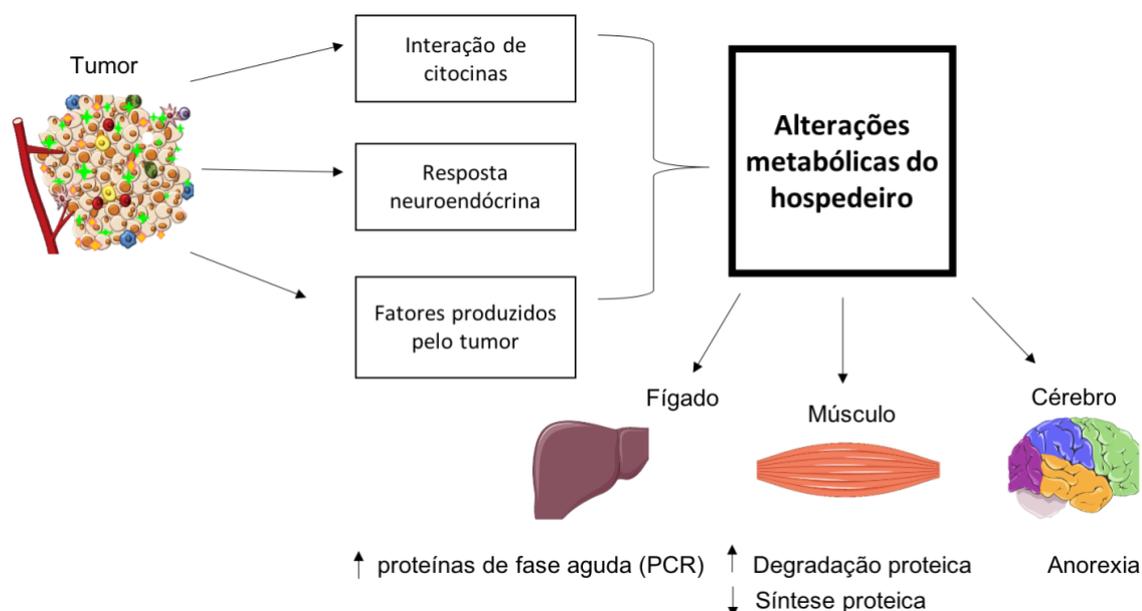
Baseado nas alterações metabólicas observadas na caquexia, percebe-se que essas questões são resultados da interação de fatores tumorais, fatores do hospedeiro e também da interação entre eles (DONOHOE; RYAN; REYNOLDS, 2011). Nesse contexto, o papel do tumor é diretamente relacionado pela produção de fatores pró-inflamatórios, que resultam e iniciam a resposta inflamatória sistêmica, bem como os fatores pró-caquéticos que estão relacionados com os efeitos catabólicos dos tecidos periféricos. (M.J., 2010; SKIPWORTH et al., 2007). Estudos realizados na urina de pacientes com caquexia associada ao câncer, demonstraram a presença de uma glicoproteína denominada fator indutor de proteólise (PIF) (TODOROV et al., 1996) que atua diretamente na depleção de músculo esquelético, bem como, recentemente foi identificado o fator de mobilização de lipídeos (LMF) que atua diretamente na perda de massa adiposa (RUSSELL; TISDALE, 2010). Além desses fatores, o resultado da interação entre tumor e hospedeiro culminam em uma produção excessiva de citocinas inflamatórias que acarretam em sintomas da caquexia (Figura 3). As citocinas regulam as vias de síntese e degradação proteica,

atuam no metabolismo lipídico na caquexia, bem como, influencia na produção de proteínas de fase aguda no fígado (FALCONER et al., 1995; GORDON; GREEN; GOGGIN, 2005; YOUNG-HEE et al., 2008).

O papel central das citocinas é funcionar como mediadores intercelulares parácrinos. Assim, as citocinas desenvolvem um papel importante na imunomodulação e têm sido implicadas na etiologia da caquexia. Além de atuar na interação célula-a-célula as citocinas podem modular na resposta antitumoral; todavia, durante a inflamação crônica, elas podem induzir a transformação celular e malignidade (ARGILÉS et al., 2009; MANTOVANI; MADEDDU, 2007) bem como, mediar o perfil de infiltrado inflamatório no tumor (DONOHOE; RYAN; REYNOLDS, 2011). Estudos em pacientes já caracterizam diferenças no perfil de macrófagos infiltrados no tumor de pacientes com caquexia (DE MATOS-NETO et al., 2015a). Não se sabe até o presente momento se a produção de citocinas inicia-se a partir de células inflamatórias tumorais ou hospedeiras. Acredita-se que independente da fonte de produção inicial, ocorre uma produção no tumor (local), bem como em tecidos periféricos, pela resposta do hospedeiro, e essa produção excessiva atua como gatilho da resposta proteica da fase aguda (APPR) observada na caquexia (DONOHOE; RYAN; REYNOLDS, 2011).

Estudos científicos descreveram o aumento sérico de várias citocinas pró-inflamatórias promovendo a caquexia em pacientes, entre elas, fator de necrose tumoral alfa (TNF α), interleucina-6 (IL-6), interleucina-1 (IL-1) e interferon gama (IFN γ) (M.J., 2010; MANTOVANI et al., 2000; STRASSMANN et al., 1992; TISDALE, 1997). Em adição, estudos recentes analisando a inflamação local no tumor de pacientes caquéticos mostraram alterações na expressão gênica e proteica de citocinas inflamatórias (DE MATOS-NETO et al., 2015a; LIMA et al., 2019b), bem como, a presença de inflamação em tecidos periféricos, tais como, tecido adiposo (ALVES et al., 2017a; CAMARGO et al., 2015a) e musculo (DE CASTRO et al., 2019). Recentemente, estudos tem descrito IL-8 como um importante biomarcador na caquexia associada ao câncer. Um estudo realizado com 110 pacientes com câncer pancreático, encontrou IL-8 aumentado nos indivíduos com caquexia, além de apresentar um aumento gradual com a progressão da doença, através da relação com a perda de peso (HOU et al., 2018). Recentemente, uma análise de

transcriptoma no tumor de pacientes com câncer de pulmão de células pequenas revela uma alta expressão de IL-8 correlacionada com pior prognóstico, além de induzir atrofia muscular (CURY et al., 2019). Estudos pioneiros na caquexia em modelos animais, demonstraram que a administração crônica dessas citocinas, isoladamente ou em combinação, é capaz de reduzir a ingestão de alimentos e induzir a caquexia do câncer (GELIN et al., 2014; NOGUCHI et al., 1996). Em paralelo, estudos que utilizaram anticorpos especificamente anti-IL-6, anti-IL-1 e anti-IFN- γ , demonstraram efeitos positivos na redução da manifestação da caquexia, muito embora, nenhum anticorpo isolado tenha comprovadamente revertido todas as características da síndrome (NOGUCHI et al., 1996). Mais recente, estudos usando anticorpos neutralizantes contra o TNF α não mostraram benefício, sugerindo que atingir apenas o TNF α não é suficiente para prevenir a caquexia (JATOI et al., 2010).



(Adaptado de Skipworth et al. (2007).

Figura 3 Fisiopatologia da caquexia

Baseado no papel central do microambiente tumoral na contribuição do desenvolvimento da caquexia, é de extrema importância entender os mecanismos moleculares relacionados entre a interação tumor-hospedeiro na gênese desta síndrome. Por ser considerada uma patologia multifatorial,

estudos anteriores do nosso grupo demonstrou que o tumor contribui efetivamente para o processo de inflamação sistêmica na caquexia (DE MATOS-NETO et al., 2015a; LIMA et al., 2019b). Mediante essa extrema importância do tumor na caquexia, é necessário investigar outras possíveis alterações e funções moleculares que podem estar induzindo a caquexia, a fim de auxiliar na busca de biomarcadores para diagnóstico, bem como, possíveis vias metabólicas que possam ser investigadas para desenvolvimento de estratégias terapêuticas na caquexia.

2.4. Câncer colorretal e o microambiente tumoral

O câncer colorretal (CRC) é considerado a terceira principal causa de morte por câncer no mundo, e sua incidência está aumentando constantemente nos países em desenvolvimento (RAWLA; SUNKARA; BARSOUK, 2019) e é associado com o desenvolvimento de caquexia em até 55% dos casos (SUN; QUAN; YU, 2015). Os fatores de risco hereditários e ambientais desempenham um papel no desenvolvimento do câncer colorretal. O CRC se origina de lesões benignas conhecidas como adenomas que podem acumular mutações nas vias de sinalização críticas para a manutenção de células-tronco, proliferação e supressão tumoral (FEARON, 2011; FEARON; VOGELSTEIN, 1990) e podem evoluir para CRCs invasivos que podem, finalmente, se espalhar para órgãos distantes, caracterizando a metástase.

Os CRCs na verdade compreendem um grupo muito heterogêneo de doenças causadas por uma vasta gama de mutações e mutagênicos. Globalmente, existem duas principais vias de lesão no câncer colorretal: a via tradicional de adenoma-carcinoma, que acomete 70-90% dos cânceres colorretais e a via de neoplasia serrilhada (10-20 % de câncer colorretal). Os fenótipos de instabilidade cromossômica geralmente se desenvolvem por uma mutação APC, seguidos pela ativação do RAS ou perda de função do TP53. Por outro lado, a via de neoplasia serrilhada está associada a mutações RAS e RAF e instabilidade epigenética (DEKKER et al., 2019). O tratamento primordial para o câncer colorretal continua sendo o principal curso de tratamento nos casos de diagnóstico precoce, porém não é um tratamento eficaz nos casos avançados. (TAURIELLO; BATLLE, 2016).

O microambiente tumoral é fator determinante e dominante do comportamento das células tumorais e da progressão do câncer. O microambiente tumoral é composto por células tumorais, células do tecido de origem, fibroblastos, células que formam os vasos sanguíneos, componentes estruturais da matriz extracelular, fatores de crescimento e células do sistema imune que se infiltram no tumor (WANG et al., 2017). Durante a evolução do tumor, ocorrem alterações na composição do estroma do tumor. Os fibroblastos tornam-se fibroblastos ativados chamados CAFs e o conteúdo geral da matriz extracelular (MEC) é remodelado. Numerosos pesquisadores apoiaram que o estroma associado a tumores participa da progressão do tumor, metástase e resposta à quimioterapia (SANDBERG et al., 2019).

Nos anos 2000, Hanahan e Weinberg (HANAHAN; WEINBERG, 2000) publicaram um trabalho descrevendo capacidades das células tumorais, que consistiam principalmente no crescimento e proliferação, mecanismos de evasão do sistema imunológico e apoptose, sustentação da angiogênese e consequentemente, capacidade de invasão e metástase, e além disso, a inflamação promovida pelo tumor (Figura 4) (HANAHAN; WEINBERG, 2011)

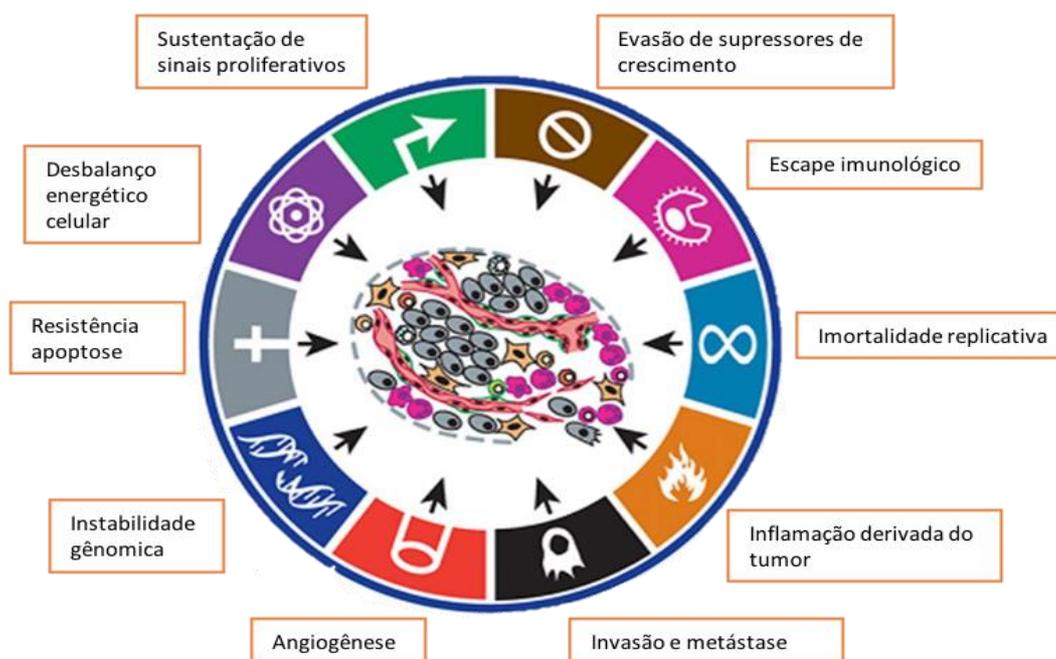


Figura 4 Hallmarks do câncer .
Adaptado de Hanahan e Weinberg, 2011.

Entre as marcas do câncer descritas por Hanahan e Weinberg, está o processo de proliferação celular descontrolado. Esse processo é mediado por estímulos autócrinos, entre as próprias células tumorais, através da interação de fatores de crescimento e receptores de superfície tumorais, bem como, estímulo parácrinos, que ocorrem entre células tumorais e outros componentes do microambiente (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Em determinadas situações, as células tumorais se adaptam e estimulam o remodelamento do microambiente tumoral para sobreviver as condições adversas, como por exemplo, na ausência de oxigênio (hipóxia) e falta de nutrientes, por meio da ativação do processo de angiogênese (FOLKMAN, 1972; WYCKOFF et al., 2004), além de recrutar células inflamatórias (ativação do sistema imunológico) e fibroblastos e também ocorre um processo de remodelamento da matriz extracelular (KYRIAKIDES et al., 2001; QUINTERO-FABIÁN et al., 2019)

Um evento crucial que inicia o processo angiogênese é a estabilização do fator induzível por hipóxia 1-alfa (HIF-1 α)(COLEMAN; RATCLIFFE, 2009; MAXWELL; RATCLIFFE, 2002; PUGH; RATCLIFFE, 2003). No microambiente tumoral sabe-se que a citocina inflamatória, IL-1 β , pode regular a expressão do HIF-1 α e conseqüentemente ativar fatores pró-angiogênicos, tais como, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Esse processo demonstra que a inflamação atua como um fator chave no desenvolvimento do tumor(FORSYTHE et al., 1996; JUNG et al., 2003; VORONOV et al., 2002). A importância de entender o processo de angiogênese no tumor ocorre devido ao fato de ser o caminho mecânico de conexão com todos os outros órgãos do indivíduo, causando os efeitos sistêmicos.

Outro *hallmark* descrito por Hanahan e Weinberg, foi a capacidade de invasão das células tumorais. Essa aquisição de motilidade das células tumorais pode ocorrer principalmente pelo processo conhecido como transição epitelial-mesenquimal (EMT), que pode ser induzido pelos processos de inflamação e fibrose, evento no qual as células tumorais adquirem características de fibroblastos, aumentando a motilidade até alcançar os vasos sanguíneos(LAMBERT; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2016; ROCHE, 2018). A característica principal da EMT é perda da expressão de marcadores epiteliais (E-caderina) e, em muitos tumores, o aumento da expressão de fatores mesenquimais, tais como, N-caderina and vimentina (LOH et al., 2019;

RØSLAND et al., 2019; THIERY, 2003; THIERY et al., 2009). Estudos mostram que fibrose no tumor é associada com o aumento da expressão de MEC, incluindo colágeno, actina do músculo liso (SMA) e vimentina, bem como esses fatores são descritos por serem mediados pelo fator de crescimento transformador beta (TGF β) (GRELET et al., 2017; NISSEN; KARSDAL; WILLUMSEN, 2019).

Em uma análise crítica ao artigo publicado Hanahan e Weinberg (2011), Fiaschi and Chiarugi (2012) demonstram que espécies reativas de oxigênio (ERO) exercem um papel fundamental que afeta várias características do câncer discutidas por Hanahan e Weinberg (2011), considerando estudos que demonstraram que os principais componentes do estresse oxidativo são altamente expressos em tumores, além de contribuírem diretamente para proliferação, resistência apoptose e induzindo o processo de angiogênese. (FIASCHI; CHIARUGI, 2012). Além da contribuição regulatória do microambiente tumoral, o estresse oxidativo atua também no estroma, conforme descrito anteriormente, induzindo o processo de fibrose tumoral. Já foi de fato demonstrado a ativação dos fibroblastos é profundamente afetada pelo estresse oxidativo no câncer (TOULLEC et al., 2010). Os fibroblastos associados ao câncer (CAFs) contribuem na promoção de um ambiente pró-oxidante e já foi identificado em diversos tipos de tumores, onde exercem seus efeitos por diferentes mecanismos, incluindo a secreção de fatores pró-inflamatórios (ARCUCCI et al., 2016; CHAN et al., 2017; GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010; QIAN; POLLARD, 2010) (Figura 5).

Curiosamente, estudos demonstram que a hipóxia é diretamente relacionada ao aumento de ERO e promovem a progressão do tumor (TAFANI et al., 2016; WEINBERG; RAMNATH; NAGRATH, 2019). A ativação de HIF ocorre em resposta ao estresse. Em um ambiente hipóxico, a hidroxilação de HIF α é inviabilizada e conseqüentemente induz a estabilização desse fator e translocação para o núcleo, o que induz a transcrição de genes e fatores inflamatórios (SCHÖDEL; RATCLIFFE, 2019; SEMENZA, 2013). No microambiente tumoral, o estresse oxidativo e a produção de ERO servem de substrato e fonte para estabilizar HIF-1 α durante a hipóxia, produzindo efeitos que variam desde reprogramação metabólica ao fenótipo glicolítico,

aumentando a capacidade de tumorigênese e resistência à apoptose e tratamentos quimioterápicos (AL TAMEEMI et al., 2019; JING et al., 2019)

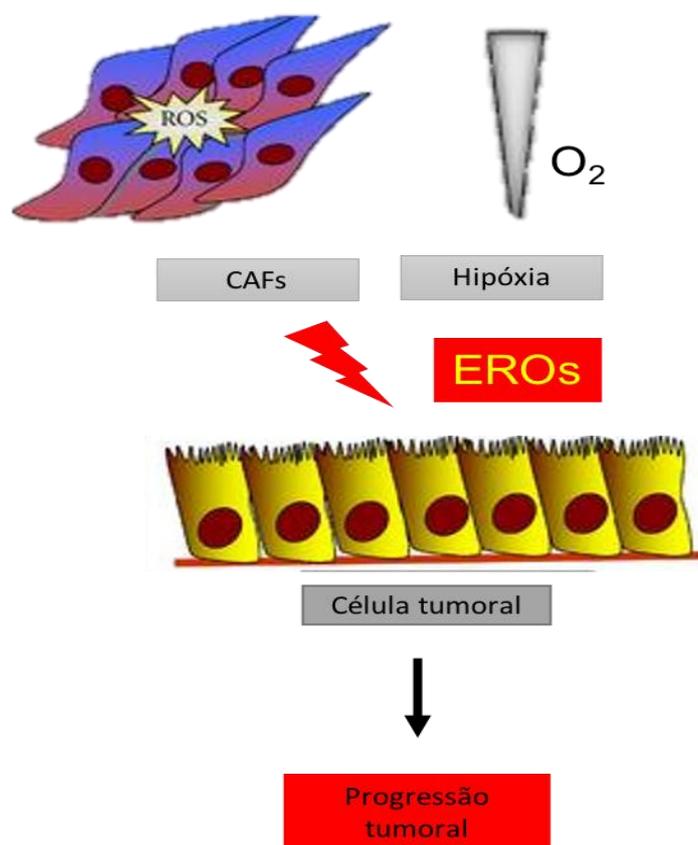


Figura 5 Estresse oxidativo no microambiente tumoral

(Adaptado Fiaschi e Chiarugi, 2012)

O processo de reprogramação metabólica sofrido no tumor em resposta ao ambiente hipóxico e mediado pelas espécies reativas de oxigênio é principalmente caracterizada pelo aumento da atividade da via glicolítica e pela desregulação do metabolismo lipídico, definido pelo efeito Warburg. (AVAGLIANO et al., 2018; O. WARBURG, 1956; W et al., 2018). Essa correlação positiva entre hipóxia, estresse oxidativo e CAFs, induzem as células tumorais a carregar o lactato, produzido pelas células hipóxicas ou CAFs e nutrem as células tumorais mais oxidativas através da respiração e das funções anabólicas (PAVLIDES et al., 2009, 2010). Sabe-se que as células tumorais com altos níveis de ERO podem causar uma disfunção mitocondrial,

atividade oncogênica, atividade peroxissômica, atividade aumentada de oxidases, cicloxigenases, lipoxigenases (LIOU; STORZ, 2010). Além disso, já foi demonstrado que as células tumorais usam essa relação entre o metabolismo e estresse oxidativo para induzir o crescimento e proliferação celular, de modo que, ao utilizar substratos e intermediários metabólicos nas vias bioquímicas que levam à produção das principais moléculas antioxidantes, as células tumorais apoiam diretamente os mecanismos de desintoxicação de ERO [14,19]. Recentemente foi demonstrado que o estresse oxidativo leva a limitação da fosforilação oxidativa (KUMARI et al., 2018) e além disso, regula a atividade da piruvato quinase 2 (PKM2), enzima que regula a etapa final da glicólise (GHANBARI MOVAHED et al., 2019). Essas inúmeras alterações metabólicas têm efeito no transcriptoma da célula tumoral, permitindo a adaptação para lidar com altos níveis de ROS, regulando positivamente os sistemas de defesa anti-oxidante e ajudando as células cancerígenas a reprogramação da atividade metabólica para o aumento da capacidade de sobreviver em um ambiente hostil.

Na caquexia, o papel do estresse oxidativo ainda permanece obscuro, porém inúmeros estudos definem como um dos mecanismos mais comuns de diferentes causas de caquexia (ÁBRIGO et al., 2018a). Essas definições são baseadas devido ao aumento de EROs no músculo em pacientes caquéticos e modificações de proteínas dependentes de oxidação (LAVIANO et al., 2007; LI et al., 1998). Estudos recentes com pacientes com caquexia associada ao câncer demonstraram oxidação de proteínas no músculo esquelético e uma diminuição dos níveis de antioxidantes no soro (BARREIRO et al., 2005; MANTOVANI et al., 2003). Acredita-se, portanto, que o estresse oxidativo pode modular outros mecanismos envolvidos na caquexia, incluindo aumento dos níveis de ROS e à falha dos sistemas antioxidantes que operam nas células musculares.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar alterações proteômicas em tumores colorretais de pacientes sem caquexia e com caquexia e identificar proteínas e vias de sinalização relevantes que possam contribuir para o gatilho e progressão da caquexia

3.2. Objetivos específicos

- ⇒ Caracterizar o proteoma dos tumores de pacientes com caquexia e respectivos controles, de peso estável e identificar proteínas e vias alteradas;
- ⇒ Validar as proteínas alteradas segundo a análise proteômica por ensaios de biologia molecular;
- ⇒ Sugerir proteínas e vias de sinalizações como alvos de diagnóstico.

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Ética da pesquisa

Essa pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas/Universidade de São Paulo, Comitê de Ética Humana do Hospital Universitário/Universidade de São Paulo, Santa Casa da Misericórdia de São Paulo e a Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) conforme pode ser visto nos pareceres que estão em anexos na presente Tese apresentada.

4.2. Recrutamento dos pacientes, aplicação do termo de consentimento e avaliação clínica

O recrutamento dos voluntários foi realizado do período de 2016 a 2019. Os voluntários foram pacientes diagnosticados com adenocarcinoma de cólon e reto na Clínica Cirúrgica do Hospital Universitário e na Santa Casa de São Paulo. No período do recrutamento, todos os voluntários assinaram do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Após a obtenção do TCLE os pacientes foram entrevistados utilizando-se os seguintes questionários: avaliação da qualidade de vida (QLQ-C30 –validado em português); avaliação de escala de anorexia (FAACT-ESPEN – pontuação anoréxica); análise de medidas antropométricas, tais como idade, peso, altura. Uma cópia em branco do TCLE encontra-se em anexo.

4.3. Coleta de sangue e análise dos parâmetros bioquímicos

Aproximadamente 20 mL de sangue foram coletados dos pacientes que estavam em jejum previamente ao procedimento cirúrgico. O sangue foi distribuído em tubos com ou sem anti-coagulante (EDTA) e, em seguida, centrifugado a 3000 rpm, durante 15 minutos a 4 °C, para a obtenção de plasma e soro, respetivamente. As alíquotas de soro e plasma foram armazenadas em freezer a –80 °C para análises posteriores. As análises dos

parâmetros bioquímicos utilizados para o diagnóstico da caquexia foram conduzidas com o analisador bioquímico automático para análises clínicas LabMax 240, versão 2.00, Tóquio, Japão), utilizando kits comerciais (Labtest®).

4.4. Diagnóstico de caquexia e critérios de exclusão

O diagnóstico da caquexia foi seguindo os critérios definidos por Evans *et al.* (2008) descritos anteriormente. Desse modo, o voluntário foi considerado caquético quando apresentou perda involuntária de massa corporal nos últimos 6 meses maior ou igual a 5 % da massa corporal informada e atendeu a no mínimo três dos cinco critérios expostos na figura 1 acima. Conforme descrito no TCLE, nenhuma alteração no protocolo clínico-cirúrgico ocorreu em decorrência da participação no estudo. A classificação dos pacientes foi realizada utilizando-se uma ferramenta eletrônica baseada nos critérios estabelecidos pelo consenso internacional desenvolvida pelo Dr Rodolfo Gonzalez Camargo, ilustrada na figura 6 abaixo.

PATIENT'S INFORMATION			FIRST CRITERIA - WEIGHT LOSS		
Identification	Gender	Age (Years)	Weight variation	BMI (kg/m ²)	Result
481A	Male	62	-16%	20,11	IN
Height (m)	Prev. weight (kg)	Current weight (kg)	Treatment	Cancer	
1,77	75	63			
SECOND CRITERIA - WEIGHT STRENGTH			THIRD CRITERIA - FATIGUE		
Method	Score	Result	Method	Score	Result
Questionnaire (QLC-C30)	86,6666667	OUT	Questionnaire (QLC-C30)	88,89	OUT
Answer 1	1		Answer 10	1	
Answer 2	2		Answer 12	1	
Answer 3	1		Answer 18	2	
Answer 4	2				
Answer 5	1				
FOURTH CRITERIA - ANOREXIA			FIFTH CRITERIA - FAT FREE MASS INDEX		
Method	Score	Result	Method	Score	Result
Questionnaire (QLC-C30)	66,67	OUT	DEXA Scan	---	---
Answer 13	2		Lean mass (kg)		
SIXTH CRITERIA - BIOCHEMICAL PARAMETERS			GROUP CLASSIFICATION		BARCODE
Parameters	Concentration	Result	CANCER CACHECTIC		
C-Reactive protein (mg/l)	12,62	IN	LEVEL OF EXCLUSION CRITERIA		
IL-6 (pg/ml)			0	NONE	
Anemia - Hb (g/dl)	10,80				
Albumin (g/dl)	2,97				

Adaptado de Evans, 2008

Figura 6 Ferramenta utilizada para diagnóstico da caquexia

Após a classificação, os pacientes foram divididos em dois grupos: Câncer sem Caquexia (WSC) - grupo de voluntários portadores de tumor colorretal submetidos a procedimento cirúrgico para retirada do tumor; e Câncer com Caquexia (CC) - grupo de voluntários caquéticos portadores de tumor colorretal submetidos a procedimento cirúrgico para retirada do tumor.

Critérios de exclusão: Os voluntários que realizavam tratamento quimioterápico, que utilizavam anti-inflamatórios continuamente, que apresentavam falência renal ou hepática, AIDS, doenças inflamatórias intestinais ou processos inflamatórios crônicos não relacionados à caquexia, como distúrbios autoimunes, foram excluídos do estudo.

4.5. Coleta do material biológico

Durante o procedimento cirúrgico realizado nos hospitais responsáveis, um fragmento pequeno de tumor (com variação aproximada de 50mg-1,0g) foi retirado pelo patologista de plantão do Serviço de Anatomia Patológica e imediatamente armazenados. Os fragmentos do tumor foram colocados em microtubos e congelados imediatamente em nitrogênio líquido para posteriores análises de expressão gênica e proteica. Um outro fragmento do tumor foi coletado em paraformaldeído 4%. Em adição, para o isolamento dos exossomos, um fragmento do tumor foi coletado em meio de cultura fresco conforme será explicado nos itens posteriores e processados imediatamente no laboratório.

4.6. Análise Patológica do Tumor

A análise patológica do tumor foi realizada com o Serviço de Anatomia Patológica de cada hospital. Os prontuários e lâminas foram revisados junto com o médico patologista para definição do estadiamento tumoral. O protocolo de estadiamento tumoral foi segundo a classificação TNM: T (invasão do tumor); N (linfonodos comprometidos); M (presença de metástase).

- **Estudo 1 – Caracterização do proteoma do microambiente tumoral de pacientes com caquexia**

Nesse estudo, foram utilizados os fragmentos de tumores para realizar a análise proteômica. As amostras foram preparadas e utilizadas a técnica de marcação isotópica que serão descritas detalhadamente nos tópicos a seguir.

4.7. Preparação das amostras

Fragmentos de tumores foram homogeneizadas com tampão de Uréia 8M (8M uréia, 40 mM Tris, pH 8.0, 30 mM NaCl, 1 tablete de inibidor de fosfatase protease e as amostras foram centrifugados a 20000g, 4 °C por 15 minutos. A concentração de proteína total foi realizada pelo método de Bradford, descrita previamente por M.M. Bradford (1976) (BRADFORD, 1976). Posteriormente, 100ug de proteína foram utilizadas para digestão enzimática com tripsina (Promega Corp, Madison, WI, USA). Os peptídeos foram, portanto, quantificados através de um método fluorimétrico utilizando o marcador fluorescamine (C₁₇H₁₀O₄, Invitrogen, Eugene, Oregon, USA - C₁₇H₁₀O₄) (CUNHA et al., 2008). As concentrações de peptídeos nas amostras desconhecidas foram determinadas através de uma curva padrão utilizando o peptídeo 5A (LTLR TKL) como padrão. A fluorescência foi medida nos comprimentos de onda 370 nm (excitação) e 480 nm (emissão).

4.8. Marcação isotópica

Em seguida, as amostras de peptídeos foram marcadas para quantificação conforme descrito anteriormente (BOERSEMA et al., 2008). Este método de marcação isotópica empregado baseia-se na dimetilação de grupamentos amina com formaldeído na presença de cianoborohidreto. Estes dois reagentes: formaldeído e cianoborohidreto de sódio são comercialmente disponíveis em formas deuteradas e não deuteradas permitindo diferentes combinações. Neste estudo foram utilizadas 3 formas isotópicas. O produto final destas reações adiciona 28, 30 ou 32 Da à massa final de cada peptídeo em cada sítio de marcação disponível (lisina ou N-terminal), podendo ser observado no espectro de MS. Resumidamente, 5 µg de extrato de peptídeos foram diluídos em 100 µl tampão de Bicarbonato de trietilamônio (TEAB) para

uma concentração final de 100 mM. Na capela, foram adicionados 4 µl das diferentes formas isotópicas dos formaldeídos a uma concentração de 4% de acordo com o esquema de marcação desejado. Em seguida 4 µl de NaBH₃CN a 0,6 M foram adicionados e as amostras incubadas por 2 horas e 30 minutos à temperatura ambiente. Após este período, 16 µl de bicarbonato de amônio foram adicionados e misturados. As amostras foram transferidas para o gelo e acidificadas com 8 µl de ácido fórmico. As amostras marcadas com diferentes isótopos foram misturadas conforme esquema de marcação desejado e aplicados em pré-colunas C18 (OASIS – Waters, UK), lavadas com água deionizada e eluídas com 100% de acetonitrila contendo 0,15% de ácido trifluoracético (TFA). As amostras foram secas em uma centrifuga a vácuo e armazenadas a temperatura de -20°C. A figura 7 sumariza a estratégia de marcação utilizada nas biópsias de tumores enviadas para análise de proteômica.

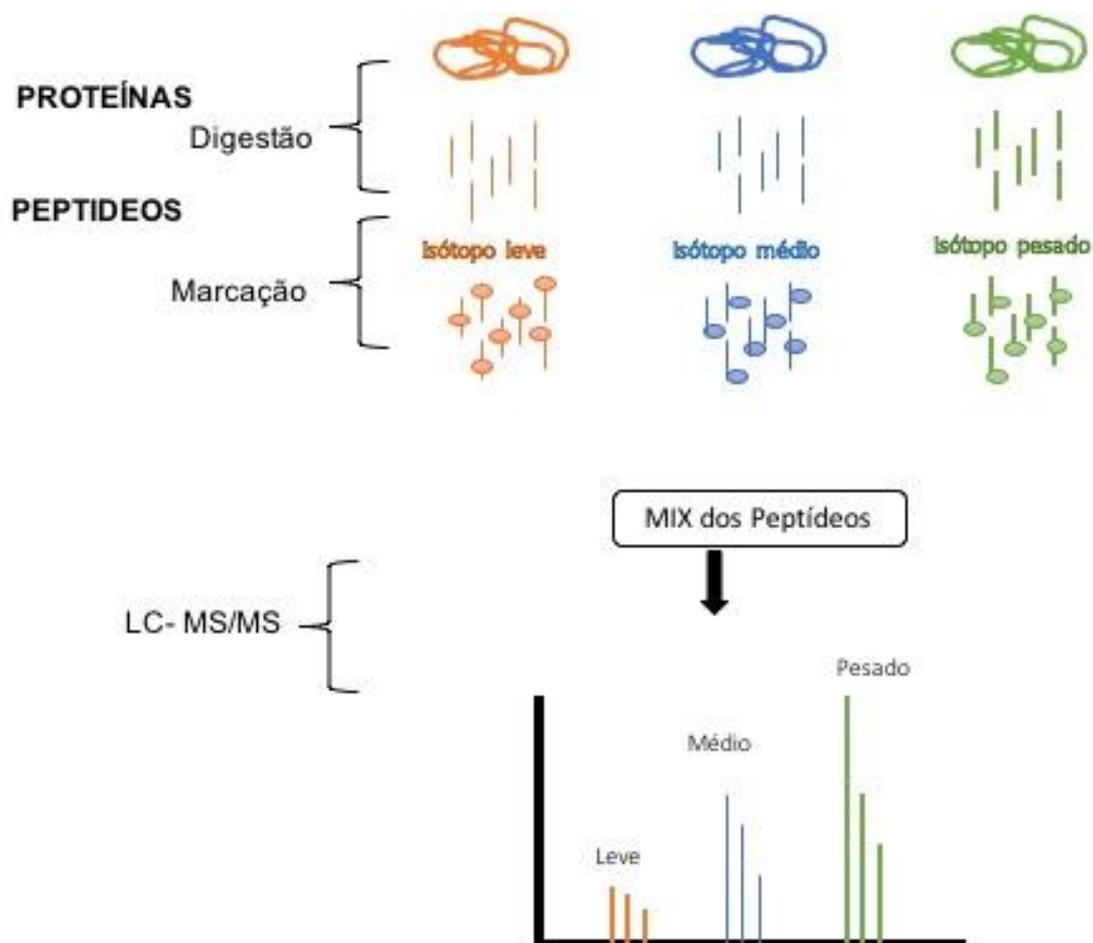


Figura 7 Esquema de marcação isotópica

Quantificação relativa de extratos peptídicos dos tumores dos pacientes com e sem caquexia.

4.9. Aquisição de dados por LC-MS/MS

As amostras de peptídeos marcadas foram ressuspensas em 10 µL de ácido fórmico a 0,1% (Solvente A) e submetidas à análise por cromatografia líquida Easy NLC II (Thermo Scientific, USA) acoplada a espectrômetro de massa LTQ-Orbitrap vellus (Thermo Scientific, USA). Os peptídeos foram separados em um gradiente de eluição de 5-45% de solvente B (ácido fórmico a 0,1% em acetonitrila) por 90 min em um fluxo de 200 nL/min. As amostras correram em uma pré-coluna (ID 360µm OD x 100 µm). Os dados foram adquiridos automaticamente depois da geração de múltiplos peptídeos protonados pelo ESI (Eletro spray de ionização), seguido pela dissociação MS/MS (Top 10) pela colisão com nitrogênio (ICD) em uma intensidade de 10 a 30 eV, tensão capilar de 2,3 kV. O tempo de injeção no Ion-trap foi fixado em 100ms e a injeção FT-MS efetuada com uma resolução de 1000ms 30,000 a m/z 300-1800. A varredura da fragmentação foi realizada com o mínimo de 5000 contagens e uma exclusão dinâmica em 70 segundos.

4.10. Análise de Dados do Proteoma

As análises de sequenciamento dos peptídeos foram realizadas através do programa MASCOT versão 2.2 (Matrix Science Ltd, UK). Os arquivos brutos (extensão raw), gerados pelo espectrômetro foram convertidos para arquivos no formato de texto (extensão mgf) pelo programa Mascot Distiller versão 2.1.1 (Matrix Science Ltd, UK). Os dados foram submetidos ao programa Mascot, utilizando como parâmetros: banco de dados SWISPROT, taxonomia *Homo sapiens*, com digestão enzimática com tripsina e as modificações variáveis selecionadas foram: acetilação de N-terminal e oxidação de metionina. Adicionalmente foi utilizado o módulo de quantificação relativa do Mascot Distiller levando em consideração peptídeos marcados por dimetilação com formaldeído. A tolerância do erro utilizada para os íons precursores de MS e MS/MS foi de 0,5 Da. Após a obtenção dos resultados, as sequências peptídicas foram validadas por interpretação manual para a eliminação dos resultados falsos positivo.

Para fins de análise quantitativa os dados foram analisados com base na razão experimental (CC)/controle (WSC). Com intuito de identificar e observar as proteínas que estavam aumentadas ou diminuídas comparadas com o controle do experimento, foi utilizado como critério de corte para as proteínas aumentadas (“upregulated”) a razão experimental (CC)/controle (WSC) maior que 2 e para as proteínas diminuídas (“downregulated”) a razão experimental (CC)/controle (WSC) menor que 0,5. Foram consideradas válidas as proteínas que foram identificadas e quantificadas em pelo menos três replicatas biológicas.

4.11. Banco de dados

Após a identificação e quantificação das proteínas, uma etapa importante é investigar as vias biológicas envolvidas nos processos, bem como a rede de interação proteica, que poderá ser responsável por diversas alterações que ocorrem no organismo mediante a condição de estudo. Dentre as ferramentas desenvolvidas, a análise de ontologia do gene (Gene Ontology - GO) tem como objetivo principal agrupar todas as informações sobre as funções gênicas e divide nas seguintes categorias: processo biológico, função molecular e componente celular. (ASHBURNER et al., 2000). No presente trabalho, a análise de ontologia dos genes foi conduzida no EnrichR (CHEN et al., 2013; KULESHOV et al., 2016). Os Processos Biológicos dos genes secretados desregulados foram realizadas com os links (<http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>) e os o resultado do enriquecimento é representado pelo valor de $-\log_{10}$ (p-valor). Em adição, a análise de rede de interação dos genes e proteínas reguladas nesse estudo foi realizada utilizando a ferramenta STRING (“Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes” website- <https://string-db.org/>). Essa ferramenta de análise foi recentemente descrita por Franceschini *et al* 2012 (FRANCESCHINI et al., 2013) e visa fornecer uma perspectiva global de todos os dados de interações disponíveis que são atualmente conhecidas e preditas, bem como baseadas em ligações e associações físicas (diretas) e funcionais (indiretas).

- **Estudo 2 – Avaliação da fibrose tecidual no tumor e sua contribuição no desenvolvimento da caquexia**

Nessa etapa do estudo, a proposta foi validar dados e funções obtidas na análise de proteômica. Diante disso, a primeira função biológica detectada em associação às proteínas mais abundantes foi referente ao processo de fibrose. As amostras foram preparadas e utilizadas a para diferentes técnicas, tais como PCR em tempo real, western blotting, imunohistoquímica, para caracterizar a fibrose tecidual no tumor e sua contribuição no desenvolvimento da caquexia.

4.12. Reação em cadeia da Polimerase (PCR em tempo Real)

O RNA total dos fragmentos tumorais (aproximadamente 50mg) foi extraído utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA), seguindo recomendações do fabricante. A concentração de RNA foi mensurada na absorbância de 260 nm/ 280 nm. Posteriormente, a etapa de transcrição do RNA em cDNA foi realizada no termociclador (Veriti®, ThermoFisher, USA), utilizando a enzima de transcrição reversa (RT). A síntese do cDNA foi realizada utilizando-se 2 µg de RNA total de cada amostra seguindo as instruções do fabricante (Invitrogen no. 4375575). A análise da expressão gênica foi efetuada por RT-PCR (KUBISTA et al., 2006) utilizando o aparelho QuantStudio™ 12K Flex System com Array Card Block (Life Technologies, Carlsbad, CA) e SYBER Green 2x como marcador de fluorescência (Invitrogen, USA). A expressão gênica foi determinada através da fórmula: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). O gene constitutivo utilizado foi beta-microglobulina (B2m). A sequência de primers utilizados encontram-se descritos na tabela 1 abaixo.

Tabela 1 : Lista de Primers relacionado a matriz extracelular

Gene	Sequência 5' → 3'
Matriz extracelular	
B2m	GAATTGCTATGTGTCTGGGT

	TCTTCAAACCTCCATGATGCT
COL1A	Fw: AGAGGTTTCCCTGGCGA Rev: ACCAGCATCACCCCTTAGCA
COL3A	Fw: CTCAGGGTGTCAAGGGT Rev: CAGGGTTTCCATCTCTTCCA
MMP2	Fw: TGAGACCGCCATGTCCA Rev: TCGCACACCACATCTTTCC
MMP9	Fw: ACTACTGTGCCTTTGAGTCC Rev: GCCAGTACTTCCCATCCT
TGF β 3	Fw: AACAAATTCCTGGCGATACCT Rev: GTAGTGAACCCGTTGATGTC
Vimentin	Fw: AAAGGAACCAATGAGTCCCT Rev: GCAGGTCTTGGTATTCACGA
HIF-1 α	Fw: CTCATCAGTTGCACTCC Rev: ATCCAATCACCAGCATCCA

4.13. Determinação da expressão proteica por Luminex® e Western blotting

Protocolo de extração: Foi adicionado aos fragmentos dos tumores 1 mL de tampão para lise e extração de proteínas contendo TRIS BASE 50 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Triton x-100 1% acrescidos com inibidor de protease e fosfatase (cOmplete™ ULTRA Tablets, Protease e Fosfatase Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich). As amostras foram homogeneizadas com homogeneizador elétrico tipo *polytron* (Homogeneizador Uniscience). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 40 minutos a 14.000 rpm e temperatura de -4 °C. O sobrenadante (proteínas extraídas) foi coletado delicadamente e transferido para microtubo limpo e armazenado em freezer -80 °C. A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método Bradford, conforme descrito anteriormente. A leitura foi realizada em placa de 96 poços no espectrofotômetro Synergy H1 Multi-Mode Reader (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

Protocolo do Ensaio Luminex®: O protocolo do ensaio de Luminex® consiste da incubação da amostra proteica com a mistura de microesferas Magplex® (Grand Island, NY, USA) cobertas com diferentes anticorpos listados na tabela 2 a seguir por duas horas, conforme o kit HCYTMAG-60K-PX30. Posteriormente, os anticorpos de captura biotinilados foram incubados por 1 hora; acrescidos da incubação com estreptavidina marcada com ficoeritrina por 30 minutos; todas as incubações ocorreram sob agitação constante a 400 rpm. As microesferas foram, então, identificadas através do equipamento Luminex® MAGPIX (Life Technologies). Após a leitura, a análise de quantificação de cada citocina foi conduzida no software Analyst 5.1 e, posteriormente, os resultados foram relativizados pela concentração de proteína tecidual total quando necessário.

Tabela 2 Lista de fatores analisados por multiplex

Proteínas	Abreviação
Fator de transformação do crescimento beta 1	TGFβ 1
Fator de transformação do crescimento beta 2	TGFβ 2
Fator de transformação do crescimento beta 3	TGFβ 3
JNK	Jnk
Proteínas quinases p38 ativadas por mitógeno	p38
Quinase MEK	MEK
Quinase MSK	MSK
O transdutor de sinal e ativador da transcrição 1	STAT1
TP53	P53
O fator de transcrição ativador 2	ATF-2

Western blotting: Um volume equivalente a 80 µg de proteínas das amostras e 5 µL de padrão de peso molecular (Fermentas Life Science, Burlington, Ontario, Canada) foi aplicado ao gel de gradiente Bolt™ 4-12% Bis-Tris Plus (Invitrogen) e as proteínas foram separadas por eletroforese por 1 hora e 30 minutos, a 100 V. As proteínas analisadas foram: SMAD2, SMAD2 fosforilada, SMAD3, SMAD3 fosforilada. Após a separação das frações protéicas em gel, a transferência eletroforética foi realizada para uma membrana de nitrocelulose

(GE healthcare, AMERSHAM Biosciences, UK). O processo de transferência das proteínas foi realizado sob corrente de 250 mA, a 4°C por 1 hora. Para avaliar a eficiência da transferência, as membranas contendo as proteínas foram coradas em solução de Ponceau. Em seguida foi realizado o bloqueio por 3 horas (PBS, tween 20 0,1%, leite em pó desnatado 5%) para posterior adição dos anticorpos. Os anticorpos foram diluídos em solução de bloqueio e incubados com as membranas a 4°C, overnight sob leve agitação. Posteriormente, foram realizadas as lavagens da membrana com a solução de lavagem (TBS 1X + 0,05% Tween 20). Em seguida, foi feita uma incubação com o anticorpo secundário anti-rabbit marcado com peroxidase (HRP), diluído 1:10000, em solução bloqueadora durante 1 hora. Após o secundário, a membrana foi lavada cuidadosamente com a solução de lavagem e a visualização das bandas foi realizada com reagente ECL (GE Healthcare) que contém o substrato da peroxidase. As imagens obtidas foram capturadas no ImageScanner (GE Healthcare).

4.14. Análises Histológicas

Processamento da amostra: Os fragmentos coletados em solução fixadora de paraformaldeído 4% foram processados em álcool 70%. Primeiramente, foram desidratados com concentração crescente de álcool, em seguida foram imersos em banhos de xilol e incluídos em paraplast (Paraplast X-TRA, SIGMA-ALDRICH). Posteriormente, os fragmentos foram emblocados em “Tissue Cassettes” (FISCHER SCIENTIFIC) e cortados no micrótomo (R Jung-Heidelberg). Os cortes foram realizados com espessura de 4 microns e coletados em lâminas cobertas com polilisina (SIGMA).

Coloração por Picro Sirius Red: Após a desparafinização e hidratação, o material foi corado por 1 hora com Direct Red 80 (Sigma Aldrich, Spruce Street, St Louis, USA). Posteriormente, os cortes foram colocados no álcool absoluto, e então, foram transferidos para uma bateria de álcool em diferentes concentrações por 5 minutos (95%, 70%) respectivamente. Para finalizar, os cortes foram imersos em 3 banhos com xilol com duração de 5 minutos cada. Em seguida, as lâminas foram montadas com Permount (Toluene Solution,

Fischer Scientific). Para aquisição das imagens com luz polarizada, foi utilizado o microscópio Carl Zeiss modelo 25 ICS Standard (Carl Zeiss MicroImaging, LLC, Nova Iorque, Estados Unidos) com câmera Canon modelo DS126151 acoplada ao microscópio.

Análise de imunohistoquímica: As lâminas de tumor foram desparafinizadas e hidratadas. A recuperação antigênica foi realizada utilizando-se o tampão de ácido cítrico (0,01M) pH 6,0, durante 30 min a 97°C na panela de pressão. Em seguida foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com solução H₂O₂ 3% (MERCK) e então os cortes foram lavados (3 x 5 minutos) com tampão de lavagem de tampão de fosfato salino (PBS 1X). O bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos foi realizado com solução de albumina 10% durante 1 hora. A incubação com anticorpo primário foi realizada por 16 -18 horas à 4 °C. Os anticorpos usados foram: anti-colágeno tipo III rabbit (1:100, Cat#19369; Rockland Immunochemicals, Pottstown, PA, EUA), α -SMA (1:100, Ab5694; Abcam, Cambridge,- MA, USA), e CD34 (Cat#3569; Cell Signalling Technology Inc. Danvers, Massachusetts, EUA). Após incubação com anticorpo, os cortes foram lavados com tampão de lavagem e em seguida, foram incubados com o anticorpo secundário Anti-Rabbit durante 1 hora. Posteriormente, foi utilizado o complexo terciário ABC Peroxidase Staining Kit (Thermo Scientific, Rockford, USA), por 30 minutos em temperatura ambiente seguindo as instruções do fabricante. Subsequentemente, as lâminas foram lavadas novamente com tampão de lavagem e o sinal foi revelado com diaminobenzidina Metal Enhanced DAB Substrate Kit (Thermo Scientific, Rockford, USA). Todas as lâminas foram montadas com Permunt (Toluene Solution, Fischer Scientific) e então, observadas no microscópio de luz e fotografadas com a câmera digital acoplada DXM1200C.

- **Estudo 3 – Caracterização do modelo *knockout* para IL-1R e seu papel na caquexia associada ao câncer**

Todas as etapas realizadas nesse capítulo com modelo animal foram realizadas na Universidade de Virgínia sob orientação da Professora Dra. Sarah Ewald como parte de uma colaboração e realização de um curto estágio no exterior com duração de 30 dias.

4.15. Obtenção de animais e inoculação do tumor

O estudo foi realizado com animais do tipo C57BL / 6 em duas condições específicas: selvagem (wild type -WT) ou camundongos IL-1R - / - (B6.129S7-il1r tm1 / mx / J) que foram originalmente obtidos no The Jackson Laboratory e verificados por qPCR conforme recomendado pelo fornecedor (<https://www.jax.org/tensão/003245>). Os animais foram criados e mantidos em condições de ABSL1, seguindo o protocolo aprovado pelo Comitê de Cuidado e Uso de Animais da Universidade da Virgínia. Antes de cada experimento, camundongos IL-1R - / - e selvagens foram organizados com idade igual a 10 semanas. Os animais C57BL / 6 foram alojados no protocolo com cama suja para normalizar a microbiota e depois inoculados com células *Lewis Lung Carcinoma-GFP (LLC-GFP)*. Para inoculação do tumor foram utilizados 5 milhões de LLCs foram injetados por via subcutânea e o peso dos animais e a ingestão de alimentos foram monitorados diariamente. Os animais foram sacrificados com 20 ou 21 dias após a inoculação do tumor. O sangue dos animais foi coletado para separação de soro para análises posteriores. Durante o sacrifício, os tecidos foram coletados imediatamente e armazenados adequadamente de acordo com o protocolo planejado.

4.16. Análise de bioluminescência das células LLC-GFP

Os camundongos que foram inoculados com as células de LLC acopladas com GFP, foram transportados até o centro de análise na Universidade de Virginia no 20 dia do experimento. Os animais foram anestesiados com isoflurano 0,08-1,5% via inalatória, durante cinco minutos e foram colocados dentro do *in vivo* Imaging - IVIS® Lumina XRMS (PerkinElmer, USA) com tempo de exposição de três minutos, seguindo com quantificação da bioluminescência. As imagens adquiridas que refletem a bioluminescência captada foram analisadas usando *software* disponibilizado no centro de análise da Universidade de Virginia através do *IVIS Spectrum* (Caliper Lifesciences, Alameda, CA). A intensidade do sinal foi avaliada por fótons por segundo por centímetro quadrado por steradiano (p/s/cm²/sr).

4.16. Expressão gênica – IL-1R *knockouts* (PCR em tempo Real)

O RNA total foi isolado de fragmentos do tumor coletado durante o sacrifício dos animais. O conteúdo de mRNA das citocinas inflamatórias e dos componentes da matriz extracelular foi avaliado por PCR em tempo real (2- $\Delta\Delta$ CT) conforme descrito no item anterior 4.12.

4.17. RNA Scope (Hibridização *in situ*)

Para hibridação *in situ*, o ensaio manual de escopo de RNA foi conduzido em tecidos embebidos em parafina de acordo com as instruções do fabricante (Advanced Cell Diagnostics, Newark, CA, EUA). O fragmento de tumor foi preparado conforme descrito no item 4.14. Antes de iniciar o protocolo, as lâminas foram colocadas em uma incubadora a 60 ° C por 1 h. A água DEPC foi preparada adicionando 1 ml de DEPC (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). O protocolo de RNAScope consiste em passar as lâminas em xilol por 2 vezes (3 minutos cada) e etanol a 100% (2 vezes, 1 minuto cada). O reagente de recuperação de alvo do fabricante foi preparado diluindo a solução fornecida 10: 1 com água DEPC. O peróxido de hidrogênio (fornecido no kit) foi aplicado nas lâminas por 10 minutos. A solução de recuperação de alvo ACD foi aquecida no microondas em uma caixa resistente ao calor até o ponto de ebulição e colocada no vaporizador pré-aquecido (Brown, Kronberg im Taunus, Alemanha). As lâminas foram lavadas em água DEPC duas vezes antes de colocá-las na solução de recuperação de alvo ACD no vaporizador pré-aquecido por 15 minutos. Imediatamente depois, as lâminas foram colocadas em água DEPC (por 2 minutos) e etanol a 100% (por 1 minuto) antes de secá-las. Uma caneta de cera foi usada para circundar as amostras. A protease plus foi aplicada às amostras por 17 minutos em um forno a 40 ° C (HybEZ Oven, ACD), seguido de 2 lavagens de água DEPC à temperatura ambiente (por 2 minutos cada). As seguintes sondas RNAScope foram aplicadas: Mm-Hif-1 α (Ref. 313821), Mm-Vegfa-OI (Ref. 43961). As sondas foram incubadas no forno a 40 ° C por 2 horas. O tampão de lavagem do fabricante (no kit) foi diluído 50: 1 com água DEPC. As lâminas foram lavadas no tampão 2 vezes, durante 2

minutos cada. O processo de hibridação e amplificação foi realizado seguindo as instruções do fabricante. O sinal foi detectado pela aplicação da solução DAB (volume igual de DAB-A + DAB-B, dependente do número da lâmina) nas lâminas por 10 minutos. As lâminas foram lavadas em água da torneira para interromper a reação, coradas com hematoxilina (Sigma Aldrich) e novamente lavadas em água da torneira. As lâminas passaram pelo processo inverso de álcool e xilol e foram cobertas com uma lamínula. Os slides foram avaliados no microscópio de luz e as imagens foram adquiridos no microscópio acoplados a câmera.

- **Estudo 4 – Caracterização dos exossomos derivados do tumor e papel do estresse oxidativo na caquexia**

4.18. Expressão gênica – Estresse oxidativo (PCR em tempo real)

O RNA total foi isolado de fragmentos do tumor coletado durante o sacrifício dos animais. O conteúdo de mRNA das citocinas inflamatórias e dos componentes da matriz extracelular foi avaliado por PCR em tempo real ($2^{-\Delta\Delta CT}$) conforme descrito no item anterior 4.12. A sequência de primers utilizados encontram-se descritos na tabela 3 abaixo.

Tabela 3 Lista de primers relacionado ao estresse oxidativo

Estresse oxidativo	
Prdx5	Fw: GTCTGAGTGTTAATGATGCCT Rev: TAATAAGTCTGTCTCCTTCCCA
SOD	Fw:GTTTGCGTCGTAGTCTCCTG Rev:GGTCCATTACTTTCCTTCTGCT
Pdia3	Fw:GAATAGTCCCATTAGCAAAGGT Rev:ACAATTCCATCAGCAGTCCT
Prdx1	Fw:CACGGAGATCATTGCTTTCAG Rev: GTATTGACCCATGCTAGATGAC
Pkm2	Fw: CAGAGAACCAAAGGACCTCAG Rev:ATGTGCTCCAGGAATGTGTC

Hspa1	Fw: TGCTGATCCAGGTGTACGAG Rev: TGGTGATGGTGATCTTGTTGG
-------	--

4.19. Cultura primária do tumor

Os fragmentos de tumor foram coletados durante a cirurgia em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) com baixa glicose e foram primeiramente lavados com solução de PBS contendo estreptomicina para evitar contaminação adquirida no procedimento cirúrgico. Em seguida, o processo de dissociação mecânica foi realizado com uma pinça e bisturi, adquirindo pequenos fragmentos de tumor, gerando explante. Os fragmentos de tumores seccionados foram distribuídos em placas de cultura de 6 poços (Corning Incorporated, NY, USA) e adicionados 1ml de um novo meio de cultura DMEM suplementados com 20% de soro fetal bovino (SFB; Gibco, Brasil), penicilina 100U/mL e estreptomicina 100µg/mL (Sigma-Aldrich®, EUA). As placas foram acondicionadas em incubadora a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ (Thermo Forma, EUA), durante o período de 24 horas. Após 24 horas de incubação, o meio de cultura foi coletado para isolamento dos exossomos secretados.

4.20. Isolamento dos exossomos

Após a coleta do meio de cultura foram adicionados 1ml do Kit total de Isolamento dos Exossomos (de cultura- Invitrogen 4478359; Grand Island, NY, EUA), de acordo com as informações do fabricante. A solução foi incubada durante 16 horas na temperatura de 4°C. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 10000g por 1 hora a 4°C. Após essa etapa os exossomos isolados formaram um *pellet*. O *pellet* foi ressuscitado em PBS na concentração de 1x, conforme recomendado pelo fabricante.

4.21. Caracterização dos exossomos

A caracterização do exossomos foi realizada pela análise de microscopia eletrônica e marcação de proteínas específicas por Western blotting. *Microscopia eletrônica de transmissão:* A análise de microscopia eletrônica foi realizada no Setor de Técnicas Histológicas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os fragmentos de tumor foram fixados em solução de McDowell a 4°C, foram lavados em solução tampão Cacodilato de Sódio (EMS®) e pós-fixados em solução aquosa de Tetróxido de Ósmio (OsO₄) a 2% (EMS®), durante 90 minutos sob agitação moderada e constante, no escuro em temperatura ambiente. Em seguida, foram lavados novamente em tampão Cacodilato de Sódio; e então, foram lavados em água destilada e contrastados em bloco com solução aquosa de Acetato de Uranila (EMS®) durante 90 minutos sob agitação moderada e constante, no escuro em temperatura ambiente. Em seguida, o material foi lavado em água destilada e desidratado em série crescente de etanol (50%, 70% e 90% por 10 minutos cada e 100% por 20 minutos); posteriormente em óxido de propileno (MERCK®), durante 10 minutos, seguida da embebição do material em resina araldite (502 Polyscience Inc®). Depois, o material foi transferido para resina araldite e permaneceu por dois períodos de 8 horas cada, por fim, o material foi transferido para uma nova resina pura por 3 dias em estufa a 60°C. Depois de secos, os blocos foram trimados, cortados com navalha de diamante a uma espessura de 70-90 nm (cortes ultrafinos). Estes cortes foram coletados em *grids* e corados com acetato de Uranila (EMS®) e com Citrato de Chumbo (MERCK®), depois de corados, foram observados e fotografados no microscópio eletrônico de transmissão (JEOL JFM 1010®). *Western blotting:* A técnica de Western blotting aplicada nesse procedimento foi realizada conforme descrito no item 4.13. Foi examinada a expressão do marcador de superfície alpha-CD63 em diferentes concentrações do extrato. Para essa análise foram utilizadas amostras em diferentes concentrações 50ug, 12,5 ug e 3,1ug com o intuito de verificar a correlação direta do marcador e intensidade de expressão.

4.22. Quantificação das proteínas de choque térmico (HSP70 E HSP90) pelo método Elisa

A fração proteica total foi extraída a partir dos exossomos isolados derivados do tumor através da adição do tampão de extração (75ul de RIPA) acrescido de inibidores de proteases e fosfatases. Em seguida, as amostras foram centrifugadas. Após isso, determinou-se a quantificação de proteínas pelo método de Bradford, conforme descrito no item 4.7. A quantificação das proteínas HSP70 e HSP90 tanto dos exossomos derivados do tumor quanto dos respectivos plasmas foram realizadas utilizando o kit Cusabio HSP70/HSP90a (CSB-E14905h e CSB-E13462h), conforme recomendação do fabricante.

4.23. Análise estatística

Os dados foram expressos em média \pm erro-padrão ou mediana [1o. quartil; 3o. quartil]. Os dados foram analisados no software Graph Pad Prism (versão 7.0, Graph Pad, software, Inc). Antes da análise estatística, foi realizado um teste de distribuição de Gauss para todas as amostras (teste de D'Agostino-Pearson omnibus, teste Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov). Posteriormente, os grupos foram comparados empregando-se teste t de Student e, se necessário, o teste de Mann-Whitney, com comparação múltipla. Para as análises de correlações de Spearman observou-se a relação linear entre as variáveis. Para a análise de estadiamento tumoral e dependência de caquexia foi realizado o teste qui-quadrado com correção de Yates, tendo em vista que são análises qualitativas. Foi considerado estatisticamente significativo o valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

5. Resultados

5.1. Dados clínicos

Após concordarem em participar do estudo, 74 pacientes foram recrutados. Os pacientes foram divididos em dois grupos: pacientes com câncer e pacientes de peso estável, esses últimos considerados câncer sem caquexia (WSC n=31) e pacientes com câncer e perda de peso, sendo considerados câncer com caquexia (CC n=43). Os resultados dos dados clínicos encontram-se descritos na tabela 3. Os pacientes encontraram-se distribuídos de modo homogêneo em gênero, etnia, idade e altura. A análise da massa corporal anterior, ou seja, a massa corporal informada pelo paciente no tempo de 12 meses antes da inclusão no estudo, não apresentou diferença estatística entre os grupos ($p=0,392$); em contrapartida, a análise tanto da massa corporal atual aferida quanto do índice de massa corporal (IMC, kg/m^2) demonstrou a significativa perda de peso no grupo com caquexia (CC), quando comparados com o grupo WSC ($p=0,017$ e $p=0,0001$ respectivamente). Ao realizar a análise dos parâmetros bioquímicos verificamos que a concentração de hemoglobina sérica no grupo CC era significativamente inferior, quando comparada à do grupo WSC ($p=0,0001$), caracterizando a presença da anemia. Em adição, a concentração sérica da proteína C-reativa estava significativamente aumentada no grupo CC ($p=0,039$), caracterizando a presença da inflamação sistêmica no grupo caquético. O conteúdo de albumina sérica apresentou uma tendência estatística para ser inferior no grupo CC ($p=0,069$). O colesterol total e a concentração de glicose dos pacientes com caquexia não mostraram alteração ($p=0,165$ e $p=0,633$, respectivamente). Em contrapartida, a análise mais detalhada do perfil lipídico mostrou uma redução HDL e triglicerídeos nos pacientes com caquexia ($p=0,012$ e $p=0,031$, respectivamente). Com a análise dos questionários foi possível identificar que o grupo CC apresentava uma diminuição acentuada da qualidade de vida global, aferida através do QLQ-C30 (valores mais baixos = menor qualidade de vida), em comparação com o grupo WSC ($p < 0,038$). Além da qualidade de vida, o grupo com caquexia apresentou anorexia, que foi aferida pelo questionário FAACT-ESPEN ($p=0,002$). A subsequente análise patológica do tumor

demonstrou que a presença de caquexia independia do estadiamento tumoral, ou seja, a caquexia também se manifesta nos estágios iniciais da doença, portanto, constitui um fator independente, bem como as dimensões do tumor não interferiam na manifestação da síndrome ($p=0,229$).

Tabela 4 Classificação geral dos pacientes

Características dos pacientes			
	WSC	CC	p
Gênero (M/F)	13/18	20/23	
Etnia	Branco n=17 Negro n=1 Mestiço n=2 Asiático n=3 Não-declarado n=8	Branco n=32 Negro n=1 Mestiço n=6 Asiático n=2 Não-declarado n=3	
Idade (anos)	61.1 ± 2.09 n=30	64 ± 2.04 n=42	0.337
Altura (m)	1.64 ± 0.016 n=30	1.64 ± 0.014 n=42	0.941
Massa corporal anterior (Kg)	68.75 ± 1.871 n=30	71.33 ± 2.157 n=42	0.392
Massa corporal atual (Kg)	68.17 ± 1.92 n=30	60.78 ± 1.98 n=42	0.0117
ΔMassa corporal (Kg)	0 [0.0;0.0]	9.65 [6.45;12.25]	<0.0001
ΔMassa corporal (%)	0 [0.0.0;0.0]	14.29 [8.48;17.67]	<0.0001
IMC (Kg/m ²)	25.11 ± 0.503 n=30	22.35 ± 0.572 n=42	0.001
Parâmetros Bioquímicos			
Proteína C-Reativa (mg/dL)	4.6[2.27;11.25] n=29	10.77[4.31;12.64] n=42	0.039
Hemoglobina (g/dL)	13.73 ± 0.472 n=27	11.35 ± 0.332 n=37	<0.0001
Albumina (g/dL)	3.824 ± 0.183 n=29	3.382 ± 0.153 n=42	0.069
Colesterol total (mg/dL)	179.2 ± 10.5, n=28	160.3 ± 8.472, n=43	0.165
HDL- colesterol (mg/dL)	39.45 ± 2.66, n=29	31.81 ± 1.672, n=42	0.012
Triglicerídeos (mg/dL)	126[98.5;164.5] n=29	88[70;153] n=43	0.031

Glicose (mg/dL)	104[88.5;134.5] n=29	102[85;130] n=43	0.633
<i>Análise dos questionários</i>			
Qualidade de vida (QLQC-30)	66.67 [66.67;100] n=27	66.67 [52.08;83.33] n=36	0.038
Anorexia (FAACT-ESPEN)	36.43 ± 0.651 n=28	32.2 ± 1.00 n=41	0.002
<i>Análise Patológica do tumor</i>			
Estágio tumoral inicial (I-II)	11 (35.48%)	17 (42.50%)	0.788
Estágio tumoral avançado (III-IV)	20 (64.52%)	23 (57.50%)	
T classificação (T1-T2) (T3-T4)	14 (45.16%) 17 (54.84%)	20 (47.62%) 22 (52.38%)	0.835
N classificação N0 N1-N2	21 (67.74%) 10 (32.26%)	23 (53.49%) 20 (46.51%)	0.217
M classificação M0 M1	29 (93.55%) 2 (6.45%)	40 (93.02%) 3 (6.98%)	0.929
Tamanho do tumor (cm)	3.5 [2.5;6] n=30	4.6 [2.85;7.13] n=43	0.229

Dados expressos em média \pm erro padrão, ² Dados expressos em mediana [1^o quartil; 3^o quartil], Δ : diferença entre a massa corporal anterior informada e a massa corporal atual. p=nível de significância do teste Mann-Whitney. n:número de amostras; *Diferença estatística entre os grupos WSC vs CC (p<0,05)

5.2. Análise de proteômica

- **Estudo 1- Caracterização das proteínas identificadas na análise do proteoma no microambiente tumoral**

Após a identificação das proteínas através da análise de proteômica, conforme descrito no item 4.7 - 4.11, foram realizados múltiplos testes de bioinformática. Em resumo, identificou-se total de 398 proteínas. Após essa busca, verificou-se que existia um perfil proteico diferentemente expresso entre o tumor dos pacientes com caquexia e daqueles pacientes de peso estável. Entre as proteínas diferentemente expressas, pôde-se identificar 71 proteínas que apresentou diferença estatística entre os grupos. Esses dados foram, portanto,

clusterizados e estão apresentados figura 8 abaixo. Dentre as 71 proteínas, 48 proteínas apresentavam-se aumentadas no grupo CC, enquanto 23 proteínas estavam diminuídas no grupo com caquexia. Para essa análise foi utilizado a razão de marcação experimental/controle, quando uma razão maior que 2, as proteínas estavam altamente expressas no grupo caquéticos e quando a essa razão apresentou-se menor que 0.5, as proteínas estavam menos expressas nos tumores do grupo com caquexia.

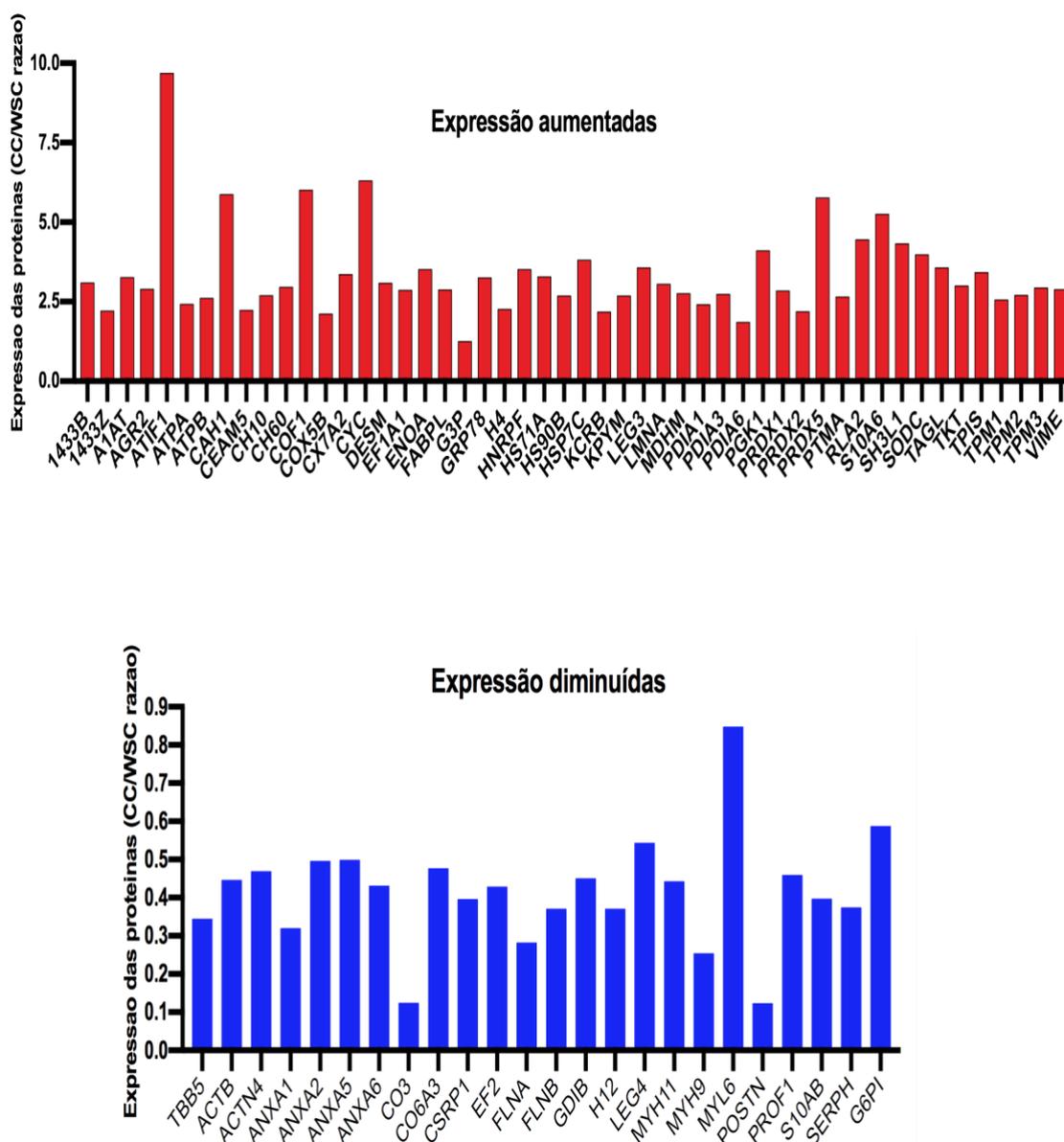
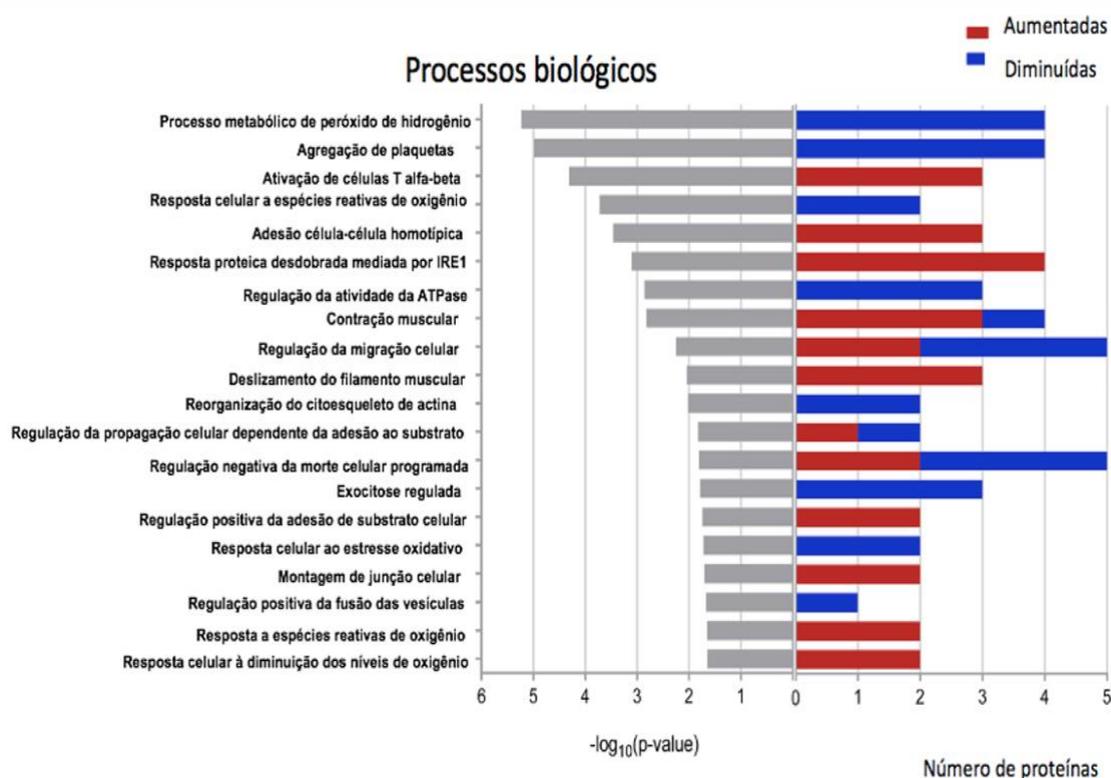


Figura 8 Gráfico de expressão das proteínas no tumor

Representação na cor vermelha as proteínas aumentadas no grupo CC e em azul as proteínas diminuídas no grupo CC.

Em seguida, foi realizada a análise de enriquecimento funcional das proteínas diferencialmente abundantes. A ontologia gênica - *Gene Ontology* (GO) foi conduzida no software EnrichR e Funrich e está ilustrada na figura 9. O enriquecimento funcional ($-\log_{10}$ (p-value)) foi avaliado e classificado de acordo com os processos biológicos e componentes celulares. Os processos biológicos identificados estavam relacionados ao estresse oxidativo, metabolismo energético, ativação de células T, resposta celular à diminuição dos níveis de oxigênio e também, regulação da migração celular, citoesqueleto e junção celular. Em uma análise mais ampla, as principais proteínas destacadas nessa análise são Proteínas de Choque Térmico (HSPs), Chaperona Redox Proteína Dissulfeto Isomerase A6 (PDIA6), A dissulfeto de proteína-isomerase A3 (PDIA3), a Enolase 1 (ENO1), Piruvato quinase M 2 (PKM2). Vale ressaltar que esses processos biológicos destacados são importantes em estudos relacionados com câncer. Por fim, de maneira bastante interessante, a análise dos componentes celulares relacionou as proteínas abundantes provenientes de exossomos e citoplasma em sua grande maioria, porém também dos centrossomos, nucleossomos, nucléolo, lisossomos e mitocôndrias.



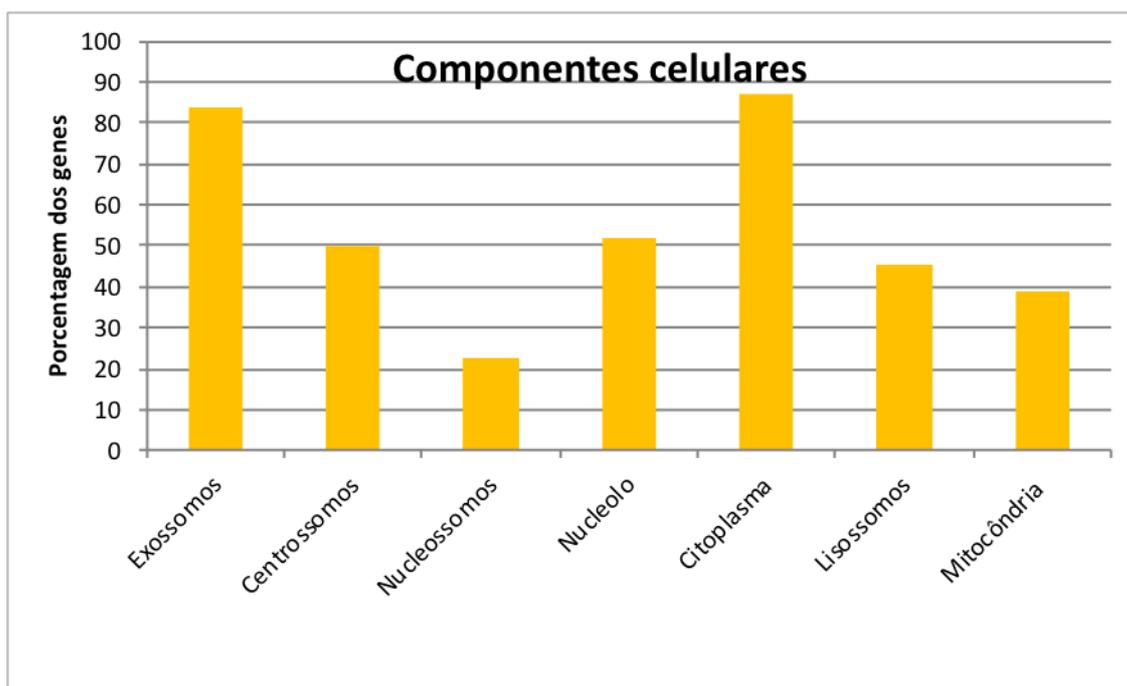


Figura 9 Análise de ontologia do gene

Representando os processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares das proteínas abundantemente expressas.

Figura 10 ilustra a interação entre as proteínas que foram diferencialmente abundantes realizadas por meio do programa *String* 10.0, onde os nós representam proteínas identificadas e as linhas representam as associações funcionais previstas. Como é possível verificar, existe um *cluster* forte de interação das proteínas de choque térmico e estresse oxidativo. Pode-se observar, adicionalmente uma interação de proteínas relacionadas a alterações no citoesqueleto, processos de diferenciação, migração, adesão celular e fibrose, demonstrado pela interação das proteínas: desmina, vimentina, laminina, protomiosina, galectina 3 e a proteína A6 de ligação ao cálcio S100 (S100A6).

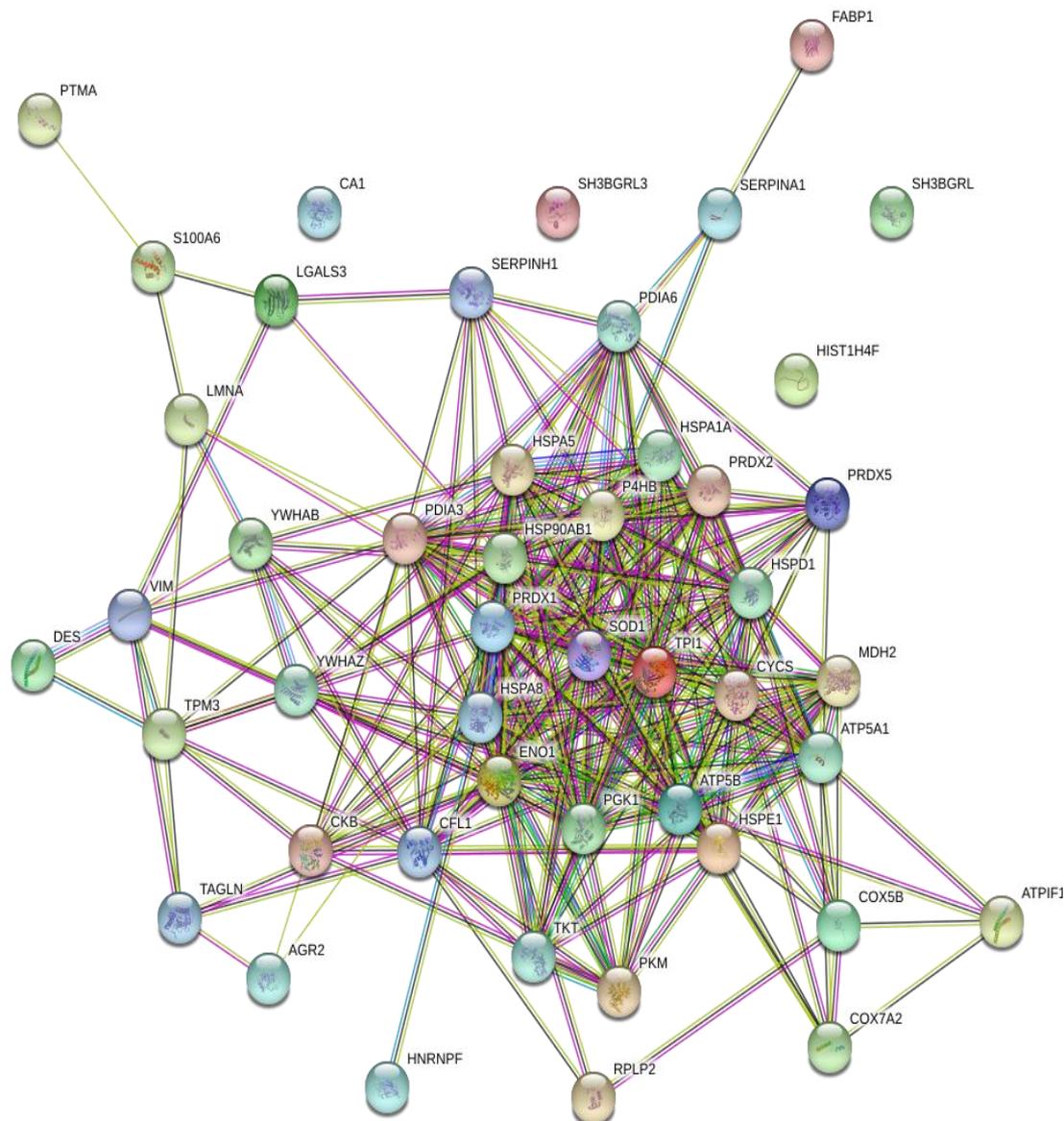


Figura 10 Rede de interação proteína-proteína

Análise de interação das proteínas abundantemente expressas no tumor de pacientes com caquexia

Um dos objetivos propostos no presente trabalho era avaliar e aprofundar os efeitos biológicos das proteínas identificadas nessa análise. Desse modo, após a caracterização e análise de dados do proteoma do tumor dos pacientes com caquexia, dois novos objetivos primordiais foram traçados. O primeiro objetivo estava relacionado a investigar os efeitos das proteínas da matriz extracelular e caracterizar o processo de fibrose no microambiente tumoral dos pacientes caquéticos. O segundo objetivo delineado era identificar o papel das HSPs e

estresse oxidativo na caquexia, considerando ser o maior cluster de proteínas detectadas na análise de proteômica.

- **Estudo 2 - Investigação das proteínas relacionadas ao processo de fibrose no tumor de pacientes com caquexia**

5.3. Expressão gênica dos fatores envolvidos no processo de fibrose

Conforme mostrado anteriormente pelo nosso grupo (BATISTA et al., 2012; DE MATOS-NETO et al., 2015b; LIMA et al., 2019b), a inflamação tem um papel central no desenvolvimento da caquexia. Com o intuito de validar os dados de proteômica e investigar o papel da fibrose no tumor dos pacientes caquéticos, foram investigados marcadores bem definidos de fibrose, incluindo colágeno, vimentina, metaloproteinases da matriz 2 e 9 (MMP2 e MMP9) e α -SMA. Esses dados estão apresentados na figura 11. Expressão gênica de COL1A e COL3A aumentou significativamente no grupo CC, quando comparada com o grupo WSC ($p = 0,03$; $p=0,05$, respectivamente). Em adição, a expressão gênica de vimentina (um filamento intermediário tipo III relacionado à motilidade celular) estava significativamente aumentada no tumor de CC ($p = 0,02$). Esse dado corroborou outros estudos que demonstraram a correlação de vimentina com o número de fibroblastos ativados na caquexia (ALVES et al., 2017b). Embora os dados patológicos do tumor não mostrassem relação com a incidência de caquexia, foi avaliado o potencial de invasão e migração de células tumorais na caquexia, através da análise da expressão gênica de MMP2 e MMP9, porém não se detectou diferença estatística entre os grupos ($p = 0,959$; $p = 0,328$; para CC e WSC, respectivamente). Alguns dados da literatura demonstram que a via de sinalização do TGF β pode induzir a expressão de componentes da matriz extracelular (PAPAGEORGIS, 2015; PAPAGEORGIS; STYLIANOPOULOS, 2015). Em concordância, a expressão gênica de TGF β 3 apresentou-se aumentada no tumor dos pacientes caquéticos ($p = 0,039$). Esses dados iniciais são consistentes com dados anteriores publicados de fibrose no tecido adiposo na caquexia cancerosa (ALVES et al., 2017b; BATISTA et al., 2012). Foi realizado uma análise da expressão desses fatores

envolvidos com processo de fibrose e o estadiamento tumoral e não foi encontrado diferença estatística, conforme pode ser visto figura suplementar 2 que pode ser encontrada em anexo.

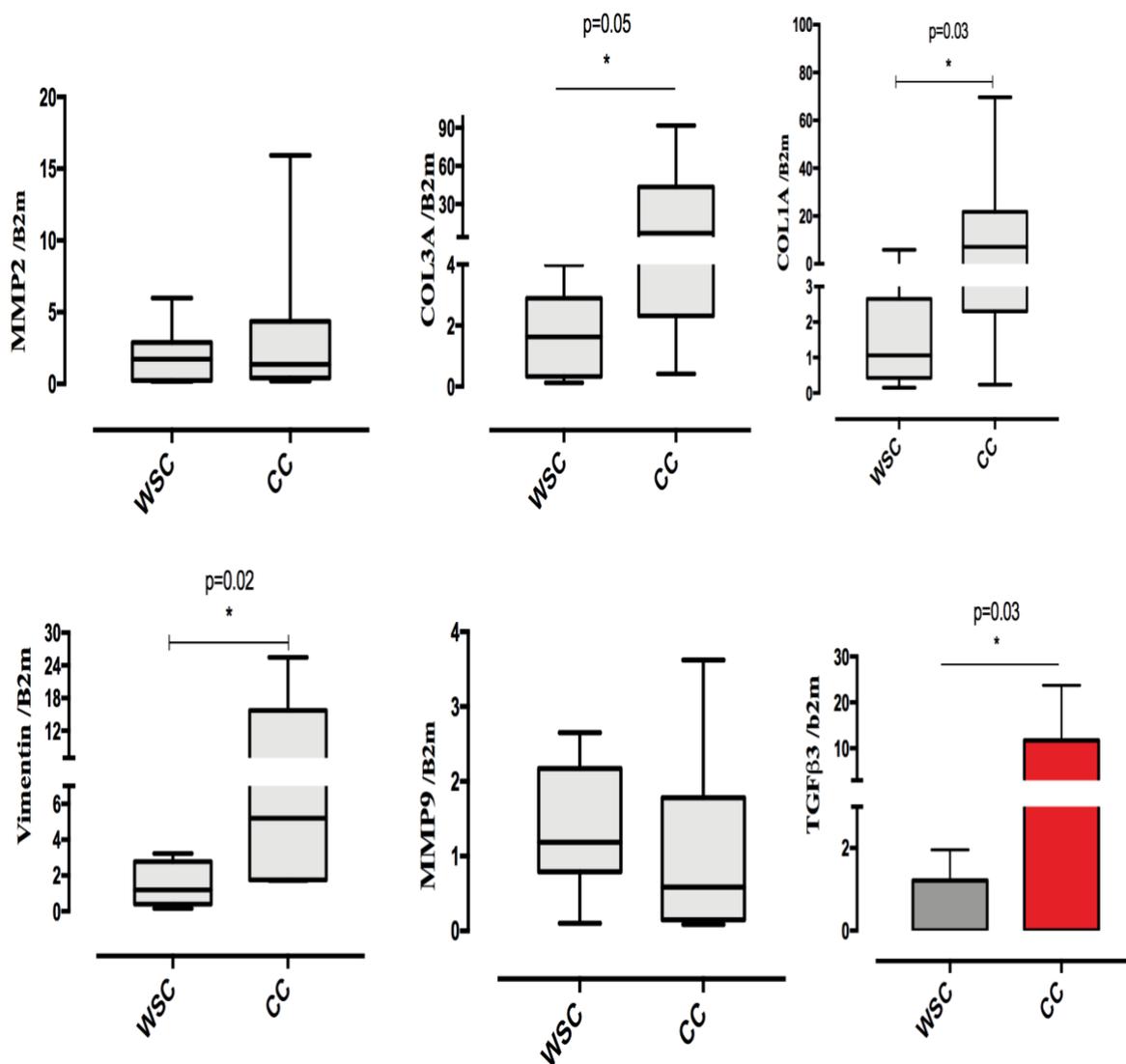


Figura 11 Expressão gênica de fatores da matriz extracelular no tumor.

Dados expressos em média \pm erro padrão ou em mediana [primeiro quartil; terceiro quartil]. WSC n= 7-8 e CC n=7-8. Gene de referência endógeno: Beta-2-microglobulina (B2m) * diferença significativa $p < 0,05$

5.4. Análise histológica para detecção de colágeno e ativação de fibroblastos

Uma das principais características da fibrose é a deposição excessiva de colágeno e ativação dos fibroblastos. Diante disso, viu-se necessário avaliar esses processos na caquexia associada ao câncer. Os dados estão apresentados na figura 12. Observou-se através da técnica de imunohistoquímica e por coloração picrosírius que a deposição de colágeno tipo III foi maior nos tumores de pacientes com caquexia, quando comparados com os pacientes de peso estável ($p = 0,0006$). Em adição, foi investigada a expressão da actina do músculo alfa-liso ($p < 0,0001$), com o intuito de investigar a possível transição de fibroblastos para miofibroblastos, e pôde-se demonstrar, através da imunohistoquímica, que esta proteína apresenta maior expressão nos tumores de pacientes caquéticos, conforme ilustrado na figura 12. Os dados de controle positivo e negativo do experimento de imunohistoquímica estão em anexos. Como conclusão dessa etapa inicial, esses achados sugerem que as possíveis alterações nos miofibroblastos estão possivelmente envolvidas no processo de fibrose no microambiente tumoral de pacientes caquéticos.

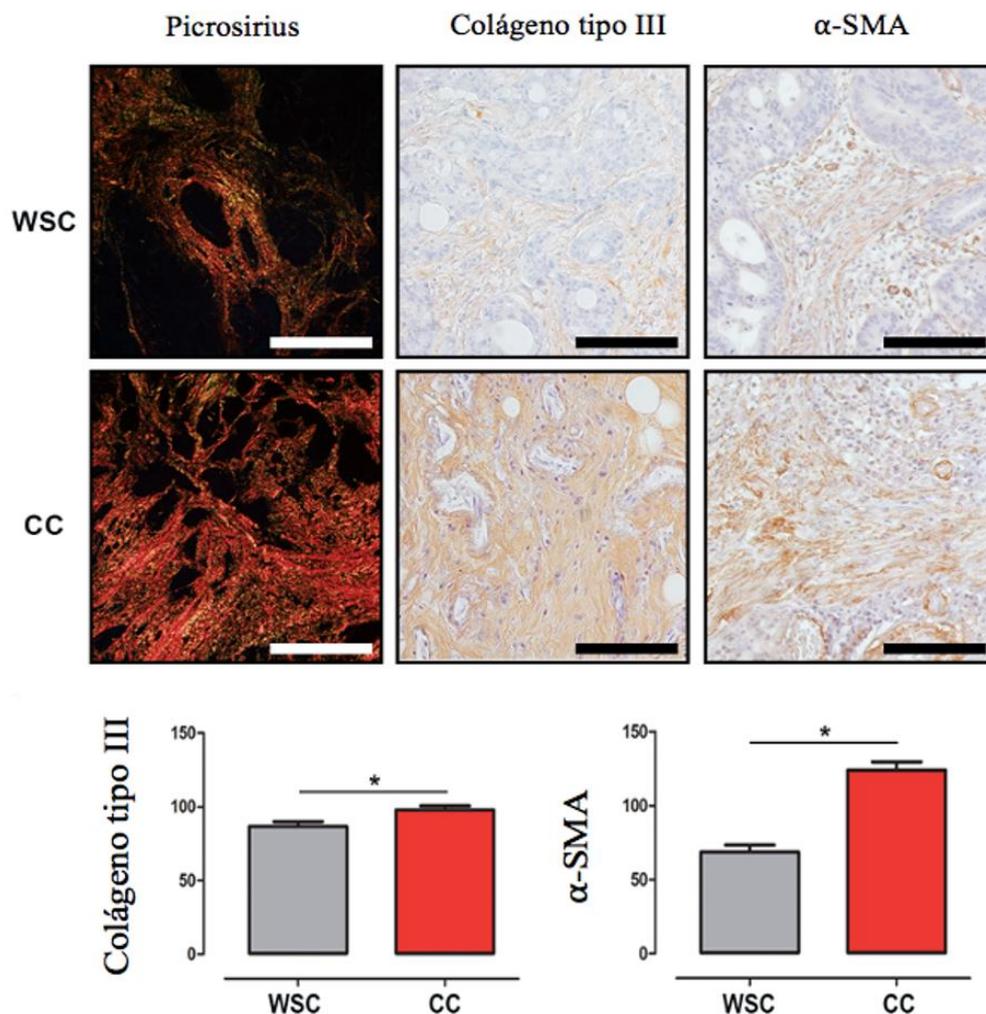


Figura 12 Imunohistoquímica para colágeno tipo III e α -SMA no tumor.

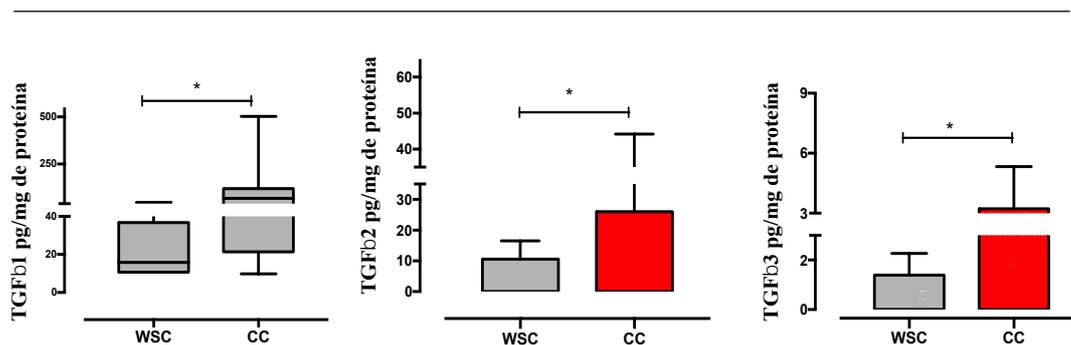
Coloração Picro Sirius Red representativa ($n = 1$ por grupo) e imunohistoquímica para o colágeno III (WSC $n = 5$; CC $n = 5$) e α -SMA (WSC $n = 5$; CC $n = 5$) na amostra tumoral. * diferença significativa $p < 0,05$; Barra de escala: 112 μ m

5.5. A sinalização de TGF β através da via canônica mediada pelas SMADs na caquexia

A fim de estabelecer a contribuição da ativação do TGF β para a remodelação do tumor na caquexia do câncer, avaliamos a expressão proteica das três isoformas do TGF β nas biópsias tumorais. A via de TGF β apresentou-se altamente regulada na caquexia. A análise da expressão proteica através da técnica de multiplex revelou que a expressão de TGF β 1, TGF β 2 e TGF β 3

apresentou-se aumentada no tumor dos pacientes com caquexia, conforme demonstrado pela figura 13 ($p = 0,003$; $p = 0,050$; $p = 0,047$, respectivamente). Um importante ponto da sinalização de TGF β é que sua ativação pode ser mediada tanto pela via canônica (dependente de SMAD), quanto pelas vias de sinalização não canônicas, como as MAPKs ERK1 / 2, JNK1 / 2 e p38 (ÁBRIGO et al., 2018b). Diante disso, examinou-se a via canônica de ativação de TGF β , objetivando desvendar os mecanismos moleculares envolvidos na síndrome. Como pode ser visto na figura 13, não foi possível identificar diferença estatística na expressão das SMADs nas biópsias de tumores entre os grupos ($p = 0,628$; $p = 0,400$, respectivamente). Além disso, foi investigado a interação entre a expressão de TGF β e o estadiamento tumoral porém não foi encontrado diferença estatística, conforme pode ser visto na figura suplementar 3 que pode ser encontrada em anexo.

Sinalização de TGF β



Via Canônica (dependente de SMADs)

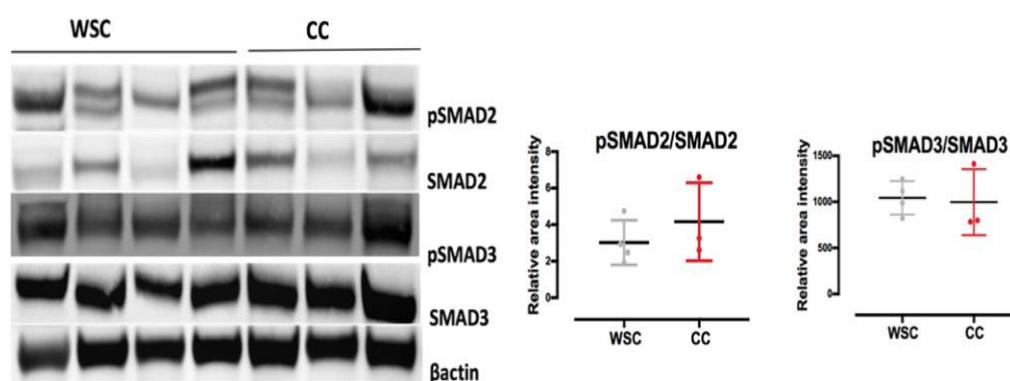


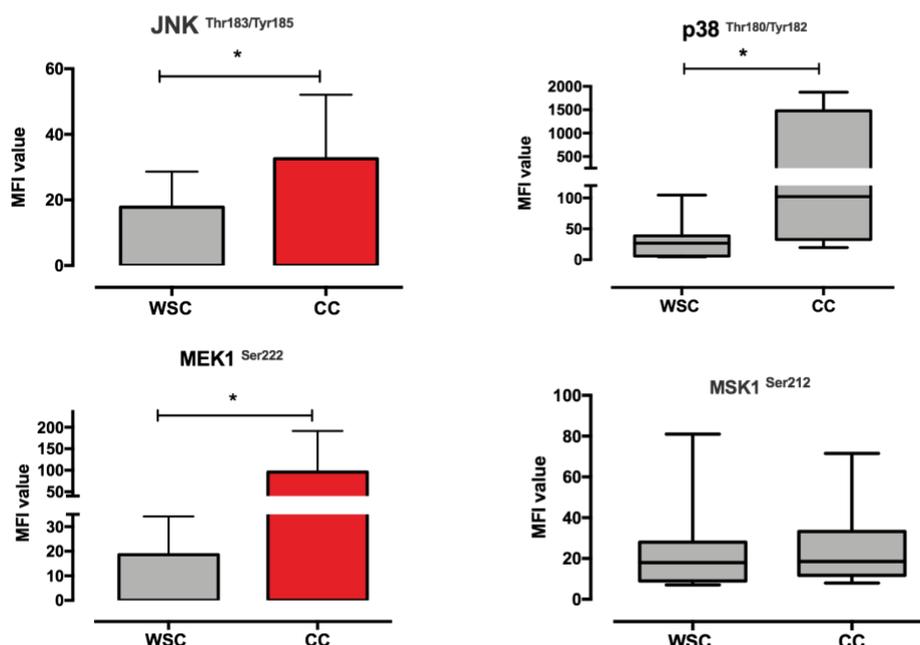
Figura 13 Expressão das isoformas de TGF β e da via canônica mediada pelas SMADs no tumor.

Dados expressos em média \pm erro padrão ou em mediana [primeiro quartil; terceiro quartil]. WSC (n=7) e CC (n=10). * diferença significativa $p < 0,05$. Western blotting para SMAD2/pSMAD2 e SMAD3/pSMAD3 (n=3)

5.6. Análise da interação entre a via da MAPK e a sinalização de TGF β na caquexia

Além de induzir a ativação das SMAD, o TGF β também modula a atividade da via MAPK, uma importante via de sinalização que desempenha papel central na ativação do catabolismo muscular em modelos animais de caquexia do câncer (ÁBRIGO et al., 2018b). Diante disso, a expressão proteica de diversos fatores relacionados à via MAPK estava alterada no tumor de pacientes caquéticos. Os dados estão apresentados na figura 14. Além disso, foi observado que a expressão de p38, JNK e MEK1 aumentou significativamente no grupo CC ($p = 0,025$; $p = 0,050$, $p = 0,024$; respectivamente). Em contrapartida, a expressão da proteína MSK1 não mostra diferenças entre os grupos (figura 14). Além disso, a concentração proteica de p53, um importante supressor de tumor, mostrou uma diminuição no grupo CC ($p = 0,057$). Diante dos dados obtidos, é possível destacar que a sinalização do TGF β ocorre através da ativação da via MAPK no tumor de pacientes caquéticos e que isso pode estar associado à proliferação de células tumorais, angiogênese, proteção contra apoptose e também pode interferir na resistência à quimioterapia, radioterapia e outras terapias direcionadas (ÁBRIGO et al., 2018b; CHAPNICK et al., 2011).

Sinalização da MAPK



Fatores de transcrição

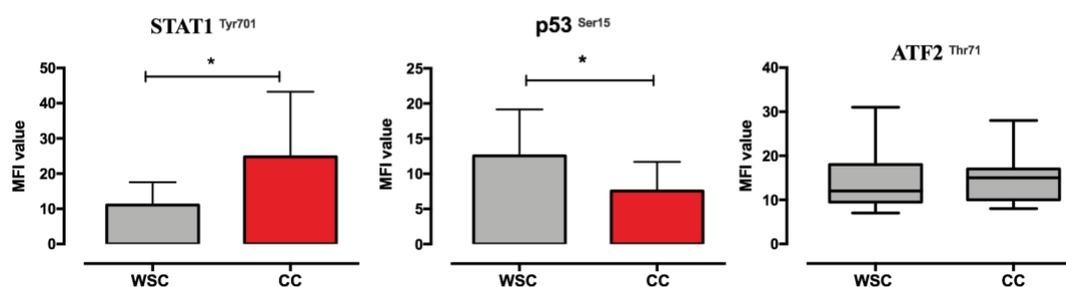


Figura 14 Interação entre a via da MAPK e a sinalização de TGF β na caquexia.

Dados expressos em média \pm erro padrão ou em mediana [primeiro quartil; terceiro quartil]. WSC (n=10-12) e CC (n=10-12). * Diferença estatística p<0.05. Concentração de proteína em pg/ml ou MFI (Média da intensidade de fluorescência)

5.7. Investigação da permeabilidade vascular mediada pela via TGF β / MAPK

Diversos estudos anteriores demonstraram que o TGF β atua diretamente na regulação da angiogênese intratumoral (BATLLE et al., 2019; ZONNEVILLE et al., 2018). Diante disso, os dados desse estudo mostraram que o tumor dos

pacientes caquéticos apresentou uma maior presença de células positivas para CD34 ($p = 0,003$), resultando no aumento de angiogênese. Ainda nesse contexto, a literatura apresenta a proteína HIF-1 α como regulador principal da angiogênese através da ativação de fatores angiogênicos, tais como o VEGF (COLEMAN; RATCLIFFE, 2009; MAXWELL; RATCLIFFE, 2002; PUGH; RATCLIFFE, 2003). Diante disso, a análise de expressão gênica de HIF-1 α resultou em um aumento da expressão em pacientes caquéticos em comparação com pacientes com câncer de peso estável ($p = 0,050$). Os dados estão apresentados na figura 15. Desse modo, esses dados demonstram o papel da hipóxia na caquexia e sua possível regulação na sinalização do TGF β e indução da fibrose tecidual. O processo de angiogênese caracterizado pelo aumento da expressão de VEGF e CD34, possivelmente regulado por hipóxia, pode desempenhar um papel importante no comportamento agressivo do tumor na caquexia. Em estudos anteriores, Tang *et al.*, (2018) descreveram a atividade do HIF-1 α / TGF β envolvida na resistência à terapia no câncer colorretal e propuseram a análise dessa assinatura genética na previsão do resultado de um paciente, o que poderia indicar uma abordagem clínica alternativa (TANG *et al.*, 2018). Com o exposto acima, vê-se necessário que mais estudos envolvam uma análise mais profunda do papel dessa via de sinalização de HIF-1 α / TGF β para o tratamento da caquexia.

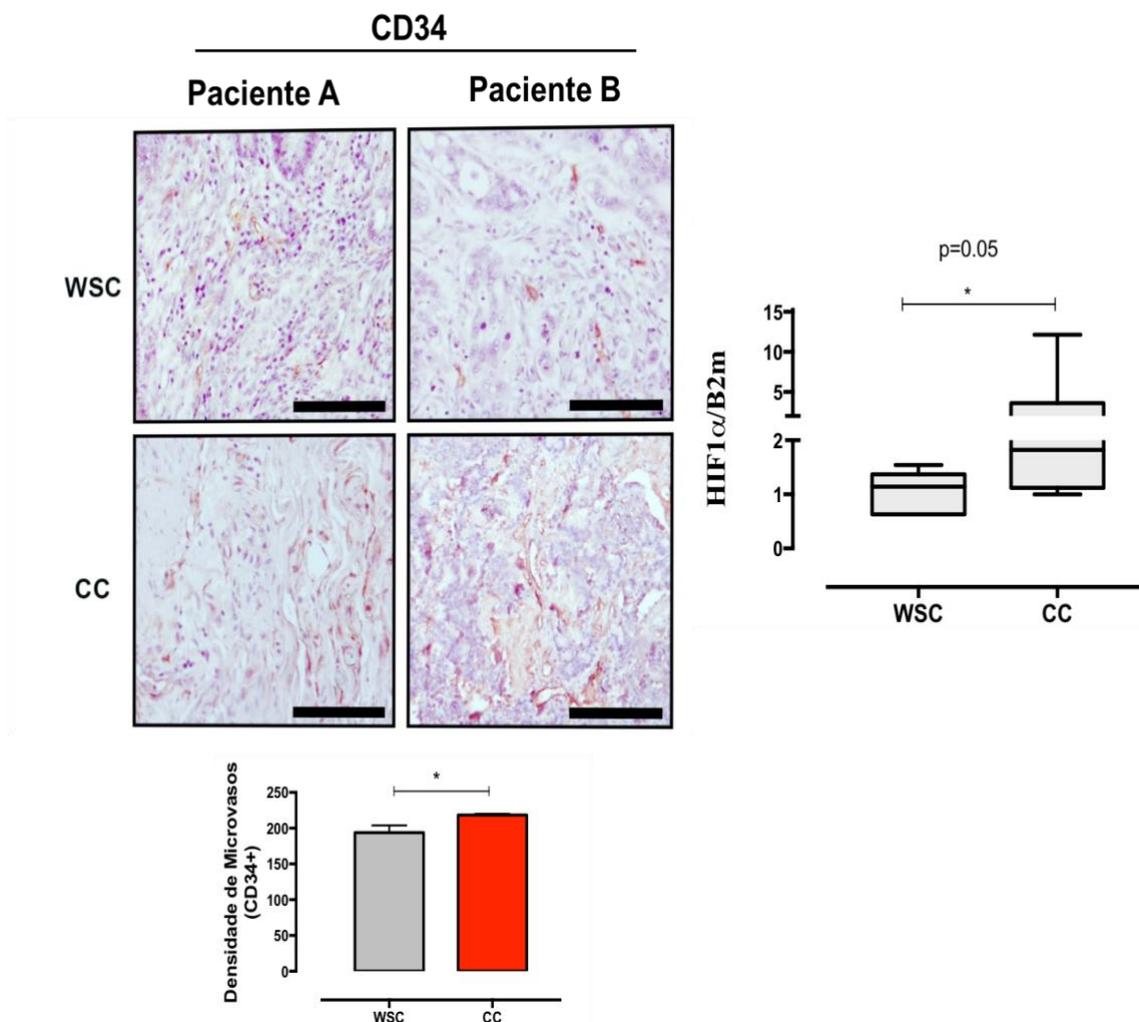


Figura 15 Processo de angiogênese e hipóxia no tumor de pacientes caquéticos.

Dados expressos em média \pm erro padrão ou em mediana [primeiro quartil; terceiro quartil]. * Diferença estatística $p < 0.05$. Imunohistoquímica para CD34 (Densidade de microvasos-CD34+; WSC n=4 e CC n=4). Expressão gênica da proteína HIF-1 α (WSC n=7 e CC n=7). Barra de escala: 110.0 μ m.

Estudo 3 – Desvendando o papel da IL-1R na caquexia associada ao câncer

5.8. Avaliação da ingestão alimentar após inoculação tumoral

A análise inicial dos animais selvagens e knockouts para IL-1R resultou em uma alteração na perda de peso entre os grupos. Inicialmente, pode-se observar que a perda de peso foi significativamente maior no grupo tipo selvagem (WT), em comparação com os camundongos knockout para IL1R (IL-

1R -/-) ($p = 0,0056$; $-0,26\text{g} / 21$ dias e $1,025\text{g} / 21$ dias, respectivamente), conforme ilustrado na figura 16 abaixo.

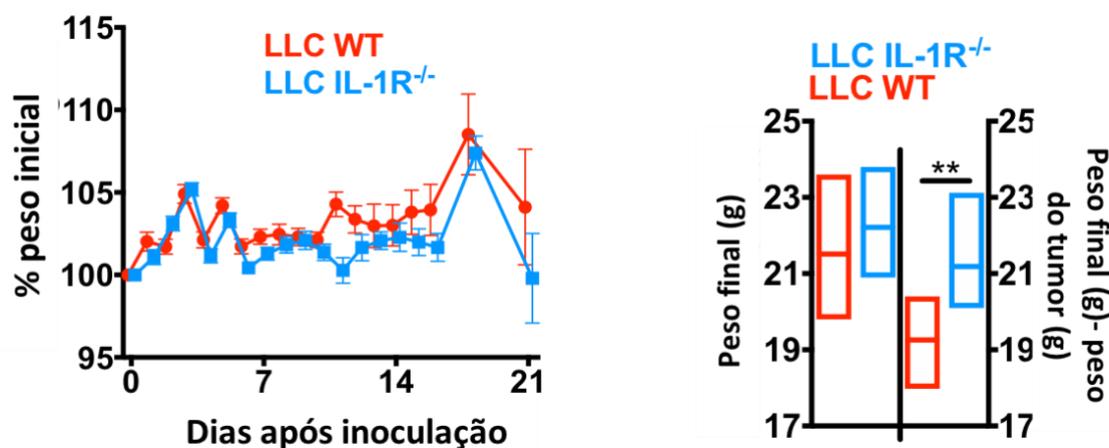


Figura 16 Cálculo do consumo de alimento dos animais após inoculação.

5.9. Peso dos tecidos dos animais selvagens e knockouts para IL-1R

Após 21 dias da inoculação das células tumorais foi realizado o peso dos tecidos dos animais com intuito de avaliar alteração no peso relativo dos tecidos. Conforme pode ser observado na tabela 3 a seguir, não houve diferença entre o peso do tecido adiposo, músculos e cérebro.

Tabela 5 Peso dos tecidos dos grupos de animais selvagens (WT) e KO(IL-1R^{-/-})

Tecido	WT	IL-1R ^{-/-}	<i>p</i> -value
Tecido adipose Subcutâneo (g)	0.069 ± 0.007	0.057 ± 0.008	0.384
Tecido adipose visceral (g)	0.138 ± 0.007	0.151 ± 0.006	0.244
Quadriceps (g)	0.105 ± 0.009	0.110 ± 0.011	0.751
Extensor digitorum longus (EDL) (g)	0.014 ± 0.002	0.029 ± 0.009	0.153
Cérebro (g)	0.421 ± 0.007	0.449 ± 0.014	0.09

5.10. Análise da dimensão do tumor entre os animais selvagens (WT) e KO (IL-1R-/-)

A análise estatística sobre o peso do tumor entre os grupos indica que o receptor de IL-1 pode influenciar o crescimento do tumor. Nos camundongos WT, o peso do tumor aumentou significativamente em comparação com o grupo IL-1R - / - (como pode ser visto na figura 16; $p = 0,015$). A análise de bioluminescência através do sistema de imagem IVIS (Xenogen - IVIS® Spectrum) demonstrou que o tamanho do tumor era menor nos animais deficientes para IL-1R - / -, corroborando os resultados do peso da massa total de tumor retirada durante a colheita dos tecidos (Figura 17).

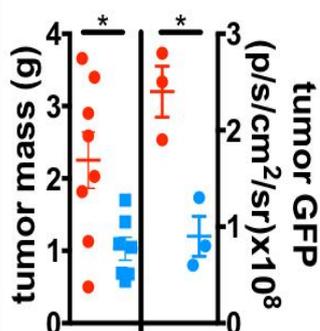
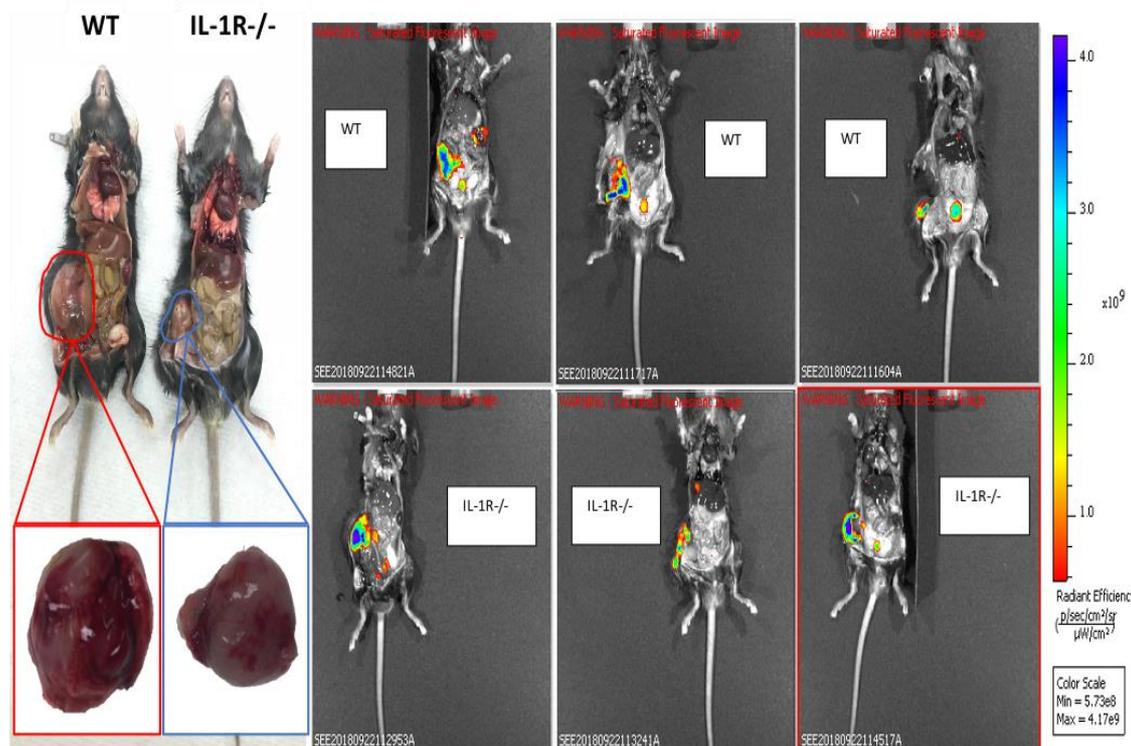


Figura 17 Análise da dimensão do tumor nos animais WT e IL1-R - / -.

Sinal de bioluminescência in vivo do tumor WT e IL-1R - / -. B: Peso tumoral de camundongos WT e IL-1R - / -. * diferença significativa entre os ratos WT e IL-1R - / -.

5.11. Caracterização da inflamação no tumor entre os animais selvagens (WT) e KO (IL-1R-/-)

Foi realizado uma análise da expressão gênica de citocinas inflamatórias no microambiente tumoral dos grupos WT e IL-1R-/- . Os resultados dessa análise demonstram que a citocina pró-inflamatória IL-1b no tumor diminuiu nos animais KO (IL1-R -/-) em comparação com camundongos WT ($p = 0,015$), como pode ser visto na figura 18. Em adição, não houve diferença estatística na análise de expressão gênica de outras citocinas inflamatórias, tais como, TNF α e IL-6.

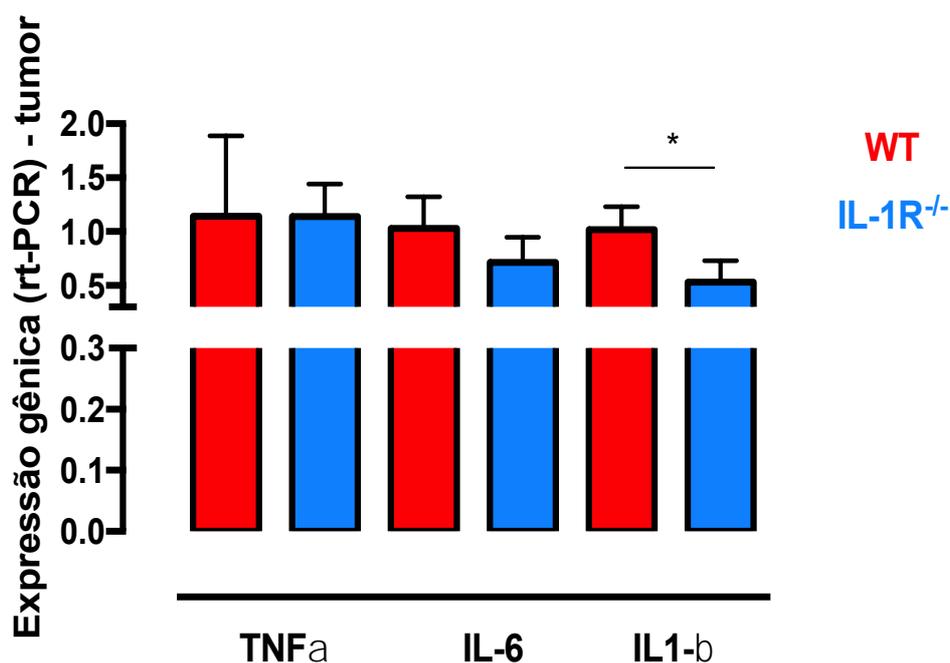


Figura 18 Perfil de citocinas inflamatórias no microambiente tumoral.

Resultados expressos como média \pm erro padrão. A expressão do gene alvo foi normalizada para o gene normalizador de referência beta 2 microglobulina (B2m). * diferença significativa entre WT e IL-1R - / -; $p < 0,05$. Número de amostras (n=4 por grupo)

Essa análise inicial consistiu em avaliar a expressão genica dos componentes da matriz extracelular. Como observado na figura 19, a expressão gênica da fibronectina 1 diminuiu no tumor dos animais IL-1R - / - KO quando comparada aos camundongos WT ($p = 0,014$). Além do mais, a expressão gênica do colágeno 3, colágeno 1 e MMP2 não apresentou diferença estatística entre os grupos, como pode ser visto na figura 19. Embora a fibronectina pareça desempenhar um papel fundamental em múltiplas facetas da progressão do tumor, também foi demonstrado que ela participa de processos associados à migração, fibrose e metástase.

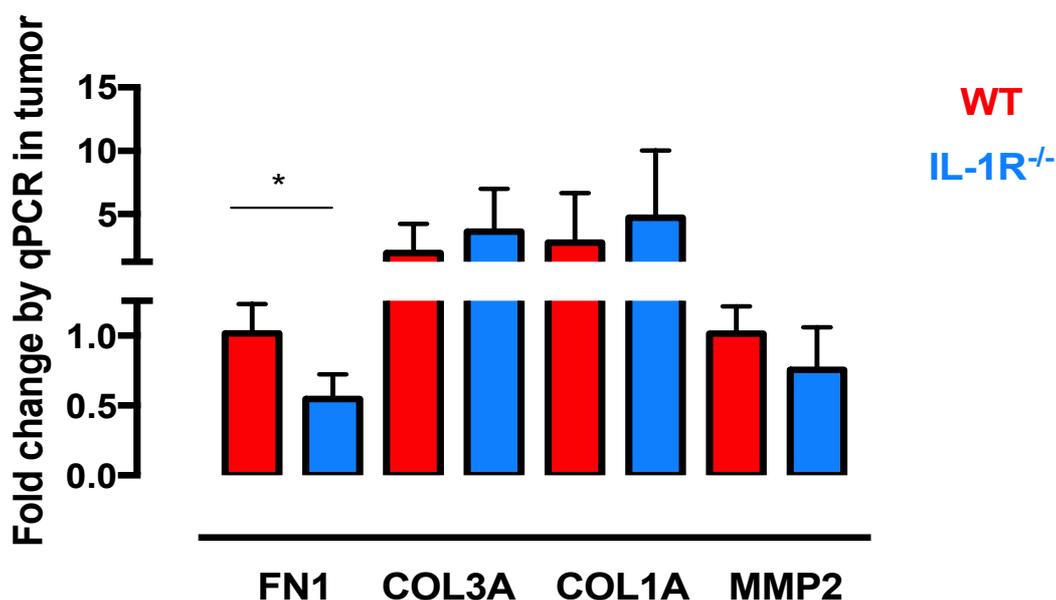


Figura 19 Expressão gênica de marcadores de transição epitelial-mesênquimal no microambiente tumoral.

Resultados expressos como média \pm erro padrão. A expressão do gene alvo foi normalizada com o gene controle beta 2 microglobulina (B2m). * diferença significativa entre WT e IL-1R^{-/-}. Número de amostra (n=4 por grupo).

Em seguida, foi investigada a expressão proteica para alfa actina de músculo liso nos tecidos periféricos, com o intuito de verificar a presença de fibrose. Através da técnica de Western blotting, pôde-se observar que houve uma redução drástica na expressão de α -SMA no fígado nos camundongos IL-1R^{-/-}. Esse resultado demonstra, portanto, que os animais KO para IL-1R apresentam uma redução da fibrose hepática. Em contrapartida, a análise de α -SMA no tecido adiposo e músculo, demonstra um efeito contrario no grupo IL-1R^{-/-}. (Figura 20)

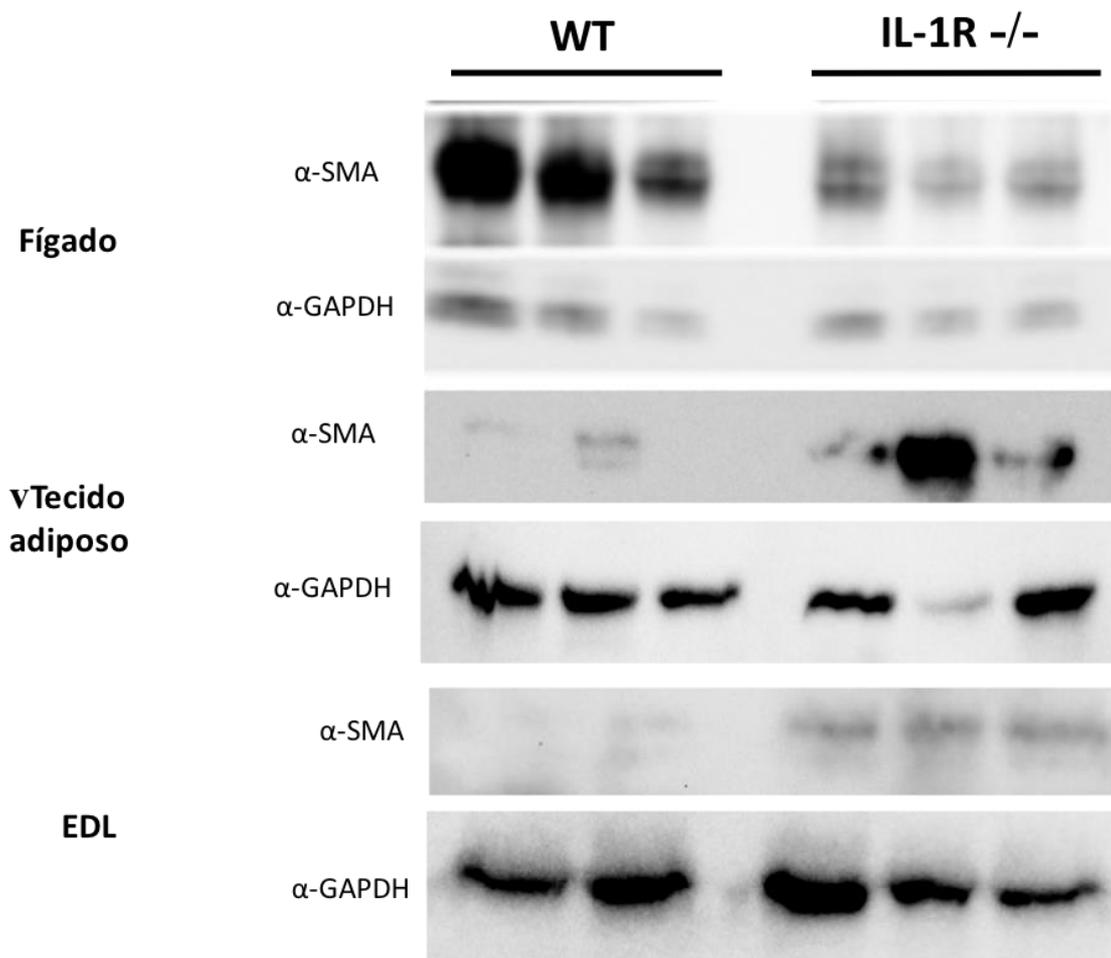


Figura 20 Expressão proteica da via da α -SMA no fígado, tecido adiposo e músculo nos animais WT e IL-1Rko.

As imagens dos blots selecionadas são representativas para α -SMA e α -GAPDH (proteína normalizadora),

Diante do exposto acima, pode-se perceber que o receptor IL-1 exerce um papel fundamental no desenvolvimento da fibrose em modelos animais de caquexia.

5.12. Impacto da expressão de fatores relacionados à hipóxia (HIF-1 α e VEGF) nos animais WT e IL-1Rko

Baseado na literatura observou-se que a hipóxia pode regular a expressão de genes relacionados à matriz extracelular e a fibrose (TANG et al., 2018; ZODE et al., 2011). Tendo em vista que foi observado um aumento de HIF-1 α no tumor de pacientes caquéticos, bem como uma alteração das proteínas associadas ao remodelamento de matriz extracelular, resolveu-se investigar a

expressão de HIF-1 α e o processo de angiogênese nos animais deficientes para IL-1R. Desse modo, com o intuito de avaliar o papel de IL-1R na expressão dos genes relacionados à hipóxia foi realizado a análise de hibridização *in situ* para os genes HIF-1 α e VEGF nos animais WT e IL-1R $^{-/-}$. Os resultados dessa análise de hibridização *in situ* através da técnica de RNAScope mostrou redução da expressão de mRNA dos fatores HIF-1 α e VEGF nos animais IL-1R *knockout*. Esses resultados apresenta um papel fundamental do receptor de IL-1R na regulação da hipóxia e angiogênese no microambiente tumoral, e conseqüentemente uma resposta na patofisiologia da fibrose.

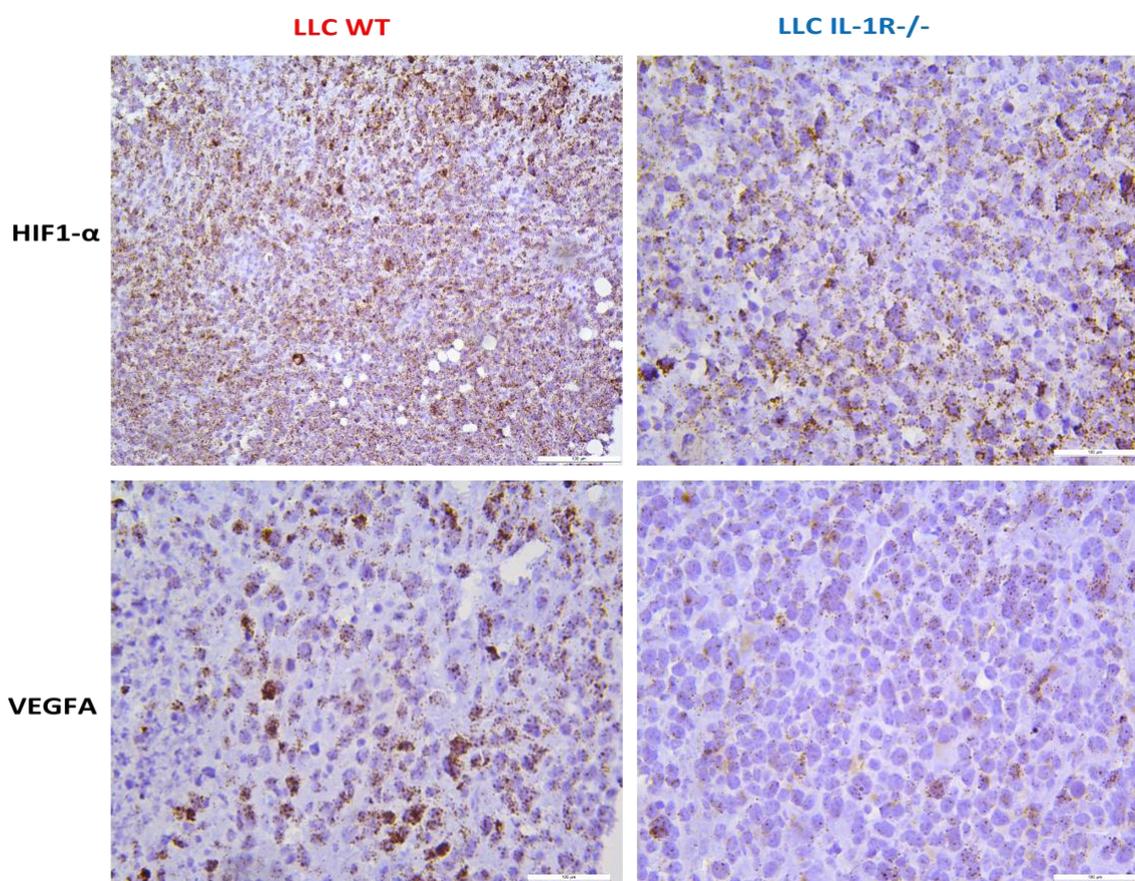


Figura 21 Hibridização *in situ* para HIF-1 α e VEGF no tumor dos animais WT e IL1-R $^{-/-}$.

Imagens representativas.

- **Estudo 4 - Desvendar o papel regulatório das proteínas de estresse oxidativo no tumor de pacientes caquéticos e caracterizar os exossomos derivados do tumor**

5.13. Relação entre o estresse oxidativo na caquexia

Baseado nas proteínas de estresse oxidativo identificadas nas análises de proteômica, foi realizado a validação através da técnica de expressão genica por PCR em tempo real. Pode observar um aumento da expressão gênica das peroxirredoxinas no grupo CC. A expressão do PRDX1 mRNA apresentou-se significativamente maior no grupo CC, além disso, PRDX5 mRNA apresentou uma tendência a ser aumentado no grupo CC ($p=0.065$). Corroborando os dados de proteômica, a expressão genica da superóxido dismutase (SOD) e da piruvato quinase 2 (PKM2) estavam significativamente maiores nos tumores de pacientes caquéticos quando comparados com os pacientes sem caquexia. Em contrapartida, não foi encontrada diferença estatística na expressão genica da HSPa1. Os dados estão representados na figura 21

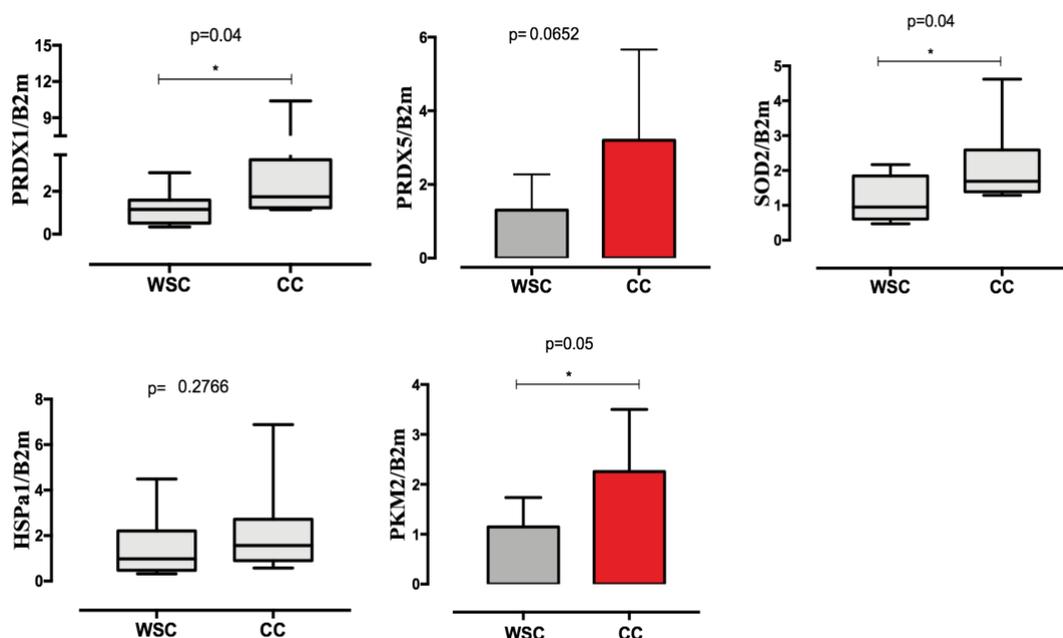


Figura 22 Expressão gênica de fatores relacionados ao estresse oxidativo. Resultados expressos como média \pm erro padrão. A expressão do gene alvo foi normalizada para o gene de limpeza beta 2 microglobulina (B2m). * diferença significativa entre CC e WSC, $p < 0,05$. Número de amostra (n=7-9 por grupo)

5.14. Correlação do estresse oxidativo e hipóxia no microambiente tumoral de pacientes caquéticos

Tendo em vista a estreita relação do aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) e o processo de hipóxia, foi realizado uma análise de correlação de Spearman entre os fatores associados ao estresse oxidativo e os dados estão apresentados na figura 23 a seguir. Diante da análise realizada, foi possível identificar uma correlação positiva entre a PRDX1, SOD e HSPA1 com HIF-1 α apenas no grupo CC. Todas essas correlações identificadas no grupo com CC apresentavam um forte valor de interação (r). Curiosamente, no grupo WSC não foi possível identificar correlações entre os fatores de estresse oxidativo e hipóxia. Esses dados sugerem fortemente que o estresse oxidativo mediado por hipóxia é uma característica intrínseca da caquexia e com isso se torna um importante alvo terapêutico.

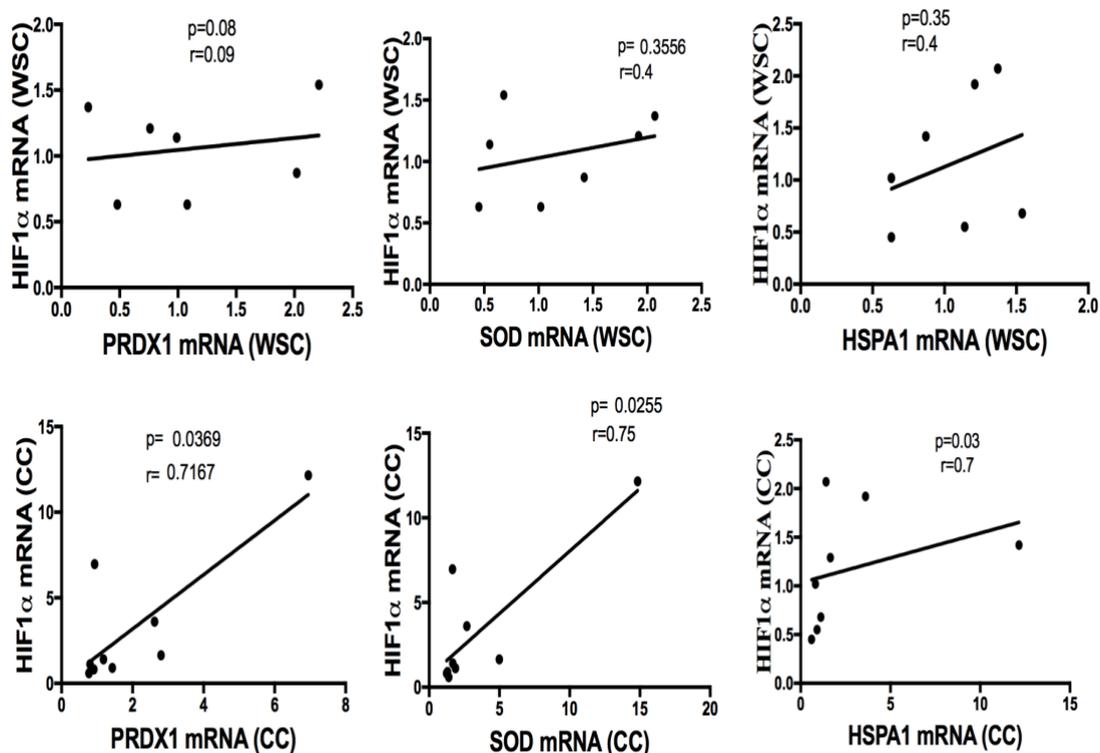


Figura 23 Correlação de Spearman entre o estresse oxidativo e hipóxia
 Dados apresentados pela correlação de Spearman. R = coeficiente de Spearman. Significante quando $p < 0,05$.

5.15. Morfologia dos exossomos

Pequenos fragmentos dos tumores (*explants*) foram mantidos em cultura por 24 horas. Após a coleta e isolamento das vesículas secretadas, a caracterização das vesículas ocorreu por meio da microscopia eletrônica, que definiu a morfologia das vesículas. A microscopia eletrônica de transmissão é considerada uma ferramenta fundamental na caracterização da morfologia dos exossomos. Os exossomos foram observados em microscópio eletrônico de transmissão por contraste negativo. Diante das imagens obtidas, pode-se observar que os exossomos apresentaram-se em um formato arredondado e “*cup-shaped*” (centro côncavo) e no geral, eram de tamanho homogêneo, como pode ser observado na figura 24.

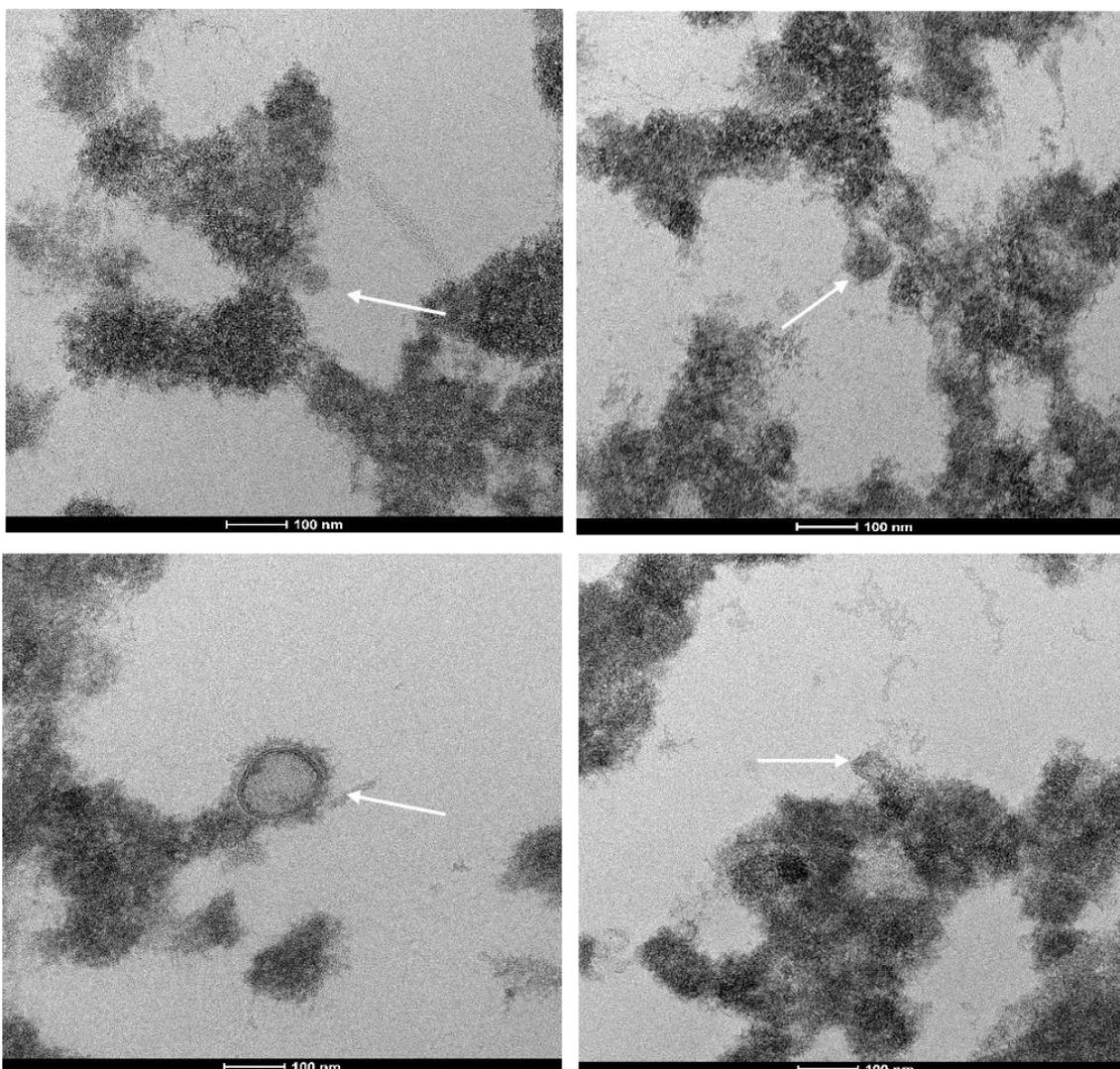


Figura 24 Microscopia eletrônica de transmissão dos exossomos isolados derivados do tumor

5.16. Detecção de marcadores proteicos específicos de exossomos

Foi realizada a análise da expressão proteica da proteína transmembrana CD63, como continuidade ao processo de caracterização dos exossomos isolados. A análise de CD63 foi avaliada por *Western Blotting* e encontra-se representada na figura 25. Observou-se que o preparado de exossomos apresentava as proteínas CD63 e a expressão desta proteína está diretamente correlacionada com a concentração de proteínas dos exossomos. Na figura 25 pode-se observar uma maior intensidade de CD63 no extrato proteico que continham 50ug de proteínas, bem como uma menor intensidade da marcação com 3,1ug de proteína.

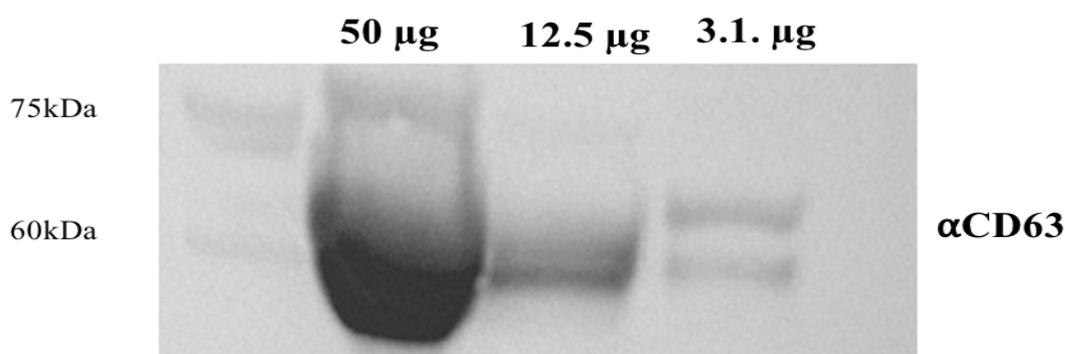


Figura 25 Expressão proteica do alfa- CD63 nos exossomos derivado do tumor.

5.17. Expressão das HSPs nos exossomos derivados do tumor de pacientes com caquexia

A análise de expressão proteica através do método de Elisa demonstrou que os exossomos derivados do tumor de pacientes com caquexia estavam enriquecidos de HSP70, conforme pode ser observado na figura 26 abaixo ($p=0.02$). Em contrapartida, não houve uma diferença estatística na expressão de HSP90 entre os grupos. Por outro lado, a expressão das HSP circulantes resultou em um aumento no soro dos pacientes caquéticos quando comparados com o soro dos pacientes sem caquexia ($p=0.041$). Além disso, as análises de correlações demonstraram uma correlação significativa da HSP70

expressos nos exossomos com marcadores de caquexia, tais como proteína – C-reativa e índice de massa corporal, conforme pode ser encontrado na figura 26.

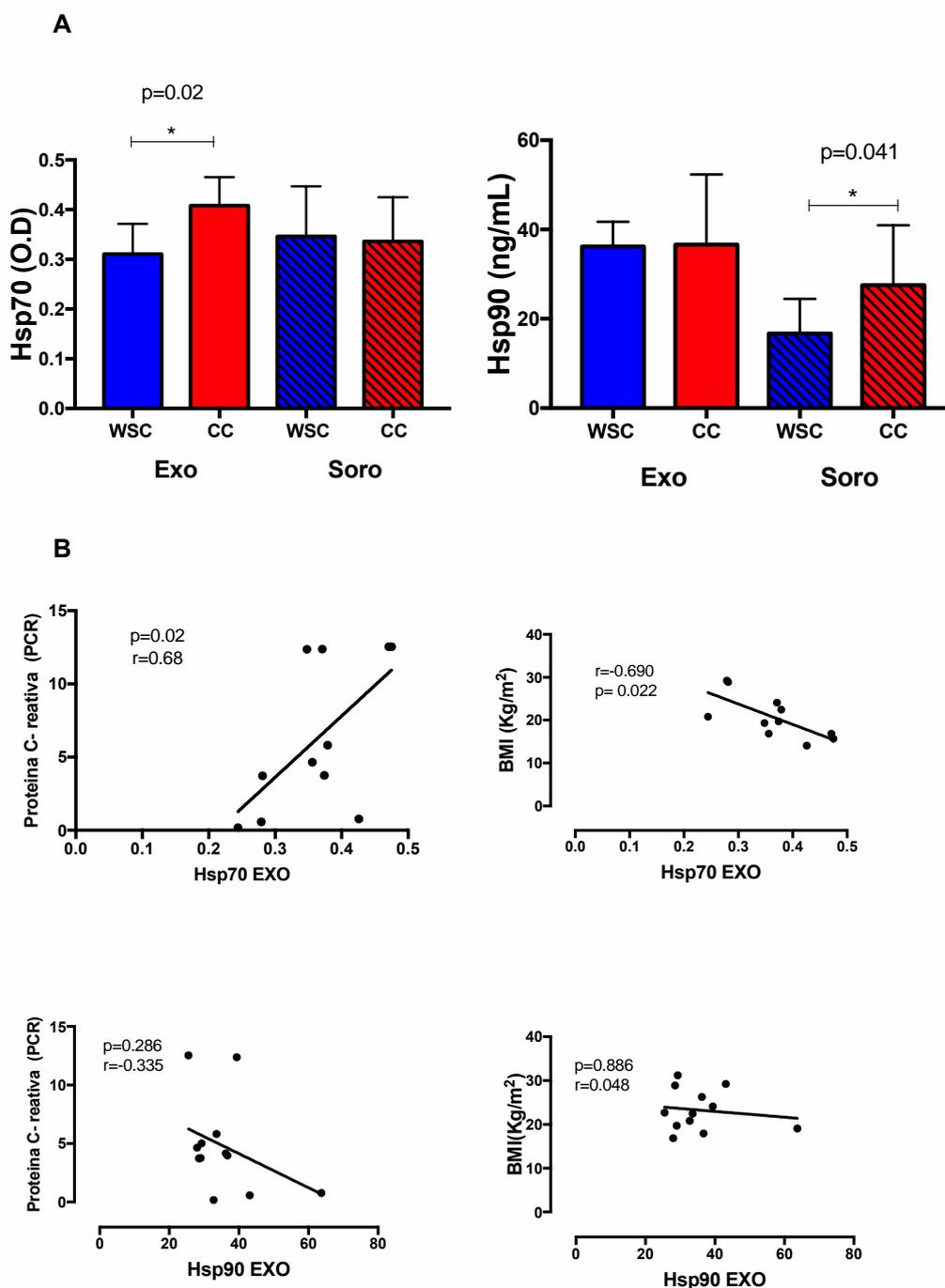


Figura 26 **Expressão proteica de HSP70 e HSP90 nos exossomos derivado do tumor de pacientes.** Resultados expressos como média ± erro padrão. WSC (5-7) e CC (5-7). * Diferença estatística $p < 0,05$. Correlação de Spearman. R = coeficiente de Spearman.

5.18. Expressão de citocinas inflamatórias expressas nos exossomos

A análise de expressão proteica das citocinas expressas nos exossomos derivados do tumor foi realizado através da análise de multiplex. O conteúdo de citocinas inflamatórias apresentaram diferenças significativas entre os exossomos derivados de tumores sem caquexia e com caquexia. Conforme pode ser encontrado na figura 27, os exossomos derivados de tumores de pacientes caquéticos apresentaram um aumento na expressão de TNF α (p=0.039) e IL-8 (p=0.002) em comparação com os exossomos derivados de tumores de pacientes de peso estável. A análise de IFN γ , IL-10, IL-13, IL-1b não apresentaram diferenças significativas.

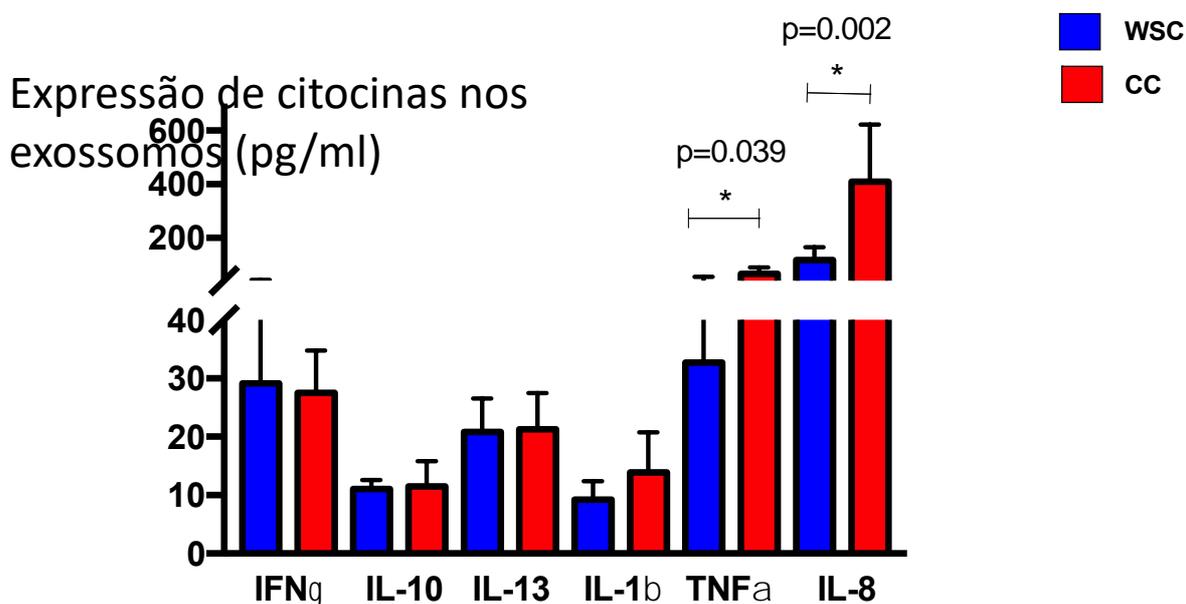


Figura 27 Expressão proteica de citocinas inflamatórias nos exossomos derivado do tumor de pacientes Resultados expressos como média \pm erro padrão. WSC (6) e CC (6). * Diferença estatística p<0,05.

Discussão

6. Discussão

A caquexia é descrita como uma síndrome multifatorial comumente associada a diversas doenças tais como, doença pulmonar obstrutiva crônica, doença renal crônica, insuficiência cardíaca crônica, AIDS e câncer (ARGILÉS et al., 2014; EVANS et al., 2008; FEARON et al., 2011). Quando associada ao câncer, a caquexia se manifesta em cerca de 80% dos pacientes (AOYAGI et al., 2015; PORPORATO, 2016). Um estudo recente baseado em achados de autópsia mostrou que a caquexia representa a causa final de óbito de aproximadamente 20%-40% dos pacientes com câncer (SESTERHENN et al., 2012). Acredita-se que as alterações metabólicas que ocorrem na caquexia provêm da interação de fatores tumorais e fatores do hospedeiro (DONOHOE; RYAN; REYNOLDS, 2011). Estudos retratam que o caos metabólico gerado pela caquexia associada ao câncer é subsidiado pelo perfil secretório das células tumorais, tendo em vista que esse induz alterações no metabolismo energético (ARGILÉS et al., 2014; DASGUPTA et al., 2017). A resposta local no tumor é caracterizada pela capacidade das células tumorais em produzir os fatores pró-inflamatórios, tais como, fator de necrose tumoral (TNF α), interleucina 6 (IL6), quimiocina atraente de monócitos (CCL2), entre outros e fatores pro caquéticos, tais como, fator indutor de proteólise (PIF) (DE MATOS-NETO et al., 2015a; LIMA et al., 2019b; TODOROV et al., 1996) e fator mobilizador de lipídeos (LMF) (BING et al., 2010), e estes podem atuar diretamente na perda de massa muscular e tecido adiposo, respectivamente. Dados anteriores do grupo demonstraram que o microambiente tumoral de pacientes caquéticos apresenta um perfil inflamatório distinto dos pacientes que não manifestam a caquexia (DE MATOS-NETO et al., 2015a). Desse modo, tornou-se necessário realizar uma análise mais ampla das funções biológicas alteradas no tumor de pacientes caquéticos. O objetivo do presente trabalho foi conduzir análise proteômica no tumor dos pacientes com caquexia e comparar com tumor de pacientes sem caquexia. Após essa caracterização inicial, foi necessário validar as proteínas e funções biológicas que resultaram alteradas pela caquexia, com o intuito de desvendar os mecanismos moleculares que regulam a síndrome.

Conforme descrito anteriormente nesse trabalho, embora não haja uma definição da etiologia e desenvolvimento da caquexia, o consenso internacional descreve algumas manifestações clínicas primordiais da síndrome, a saber, perda de peso involuntária, anorexia, baixa qualidade de vida, alterações bioquímicas, entre elas, hipoalbuminemia, anemia, e concentração elevada na circulação de proteína C-reativa, caracterizando a presença da inflamação sistêmica (EVANS et al., 2008; FEARON et al., 2011). A análise dos dados dos pacientes envolvidos no presente estudo, nos permite observar que o grupo com caquexia (CC) estava dentro dos critérios propostos pelo consenso: apresentando acentuada perda de peso, como observado na tabela 3. Além de alterações nos parâmetros bioquímicos, presença de anemia, elevada proteína C-reativa, albumina como também alterações no perfil lipídico. Sabe-se que a inflamação desempenha um papel central na contribuição do desenvolvimento da caquexia. Esse processo inflamatório decorre tanto da resposta local do tumor, quanto na resposta sistêmica do hospedeiro com aumento de proteínas de fase aguda (DEJONG et al., 2005). Além disso, diversos estudos realizados em pacientes com câncer têm demonstrado um pior prognóstico em pacientes que manifestam alterações inflamatórias (MCMILLAN, 2009, 2013). Anteriormente, demonstramos alterações nos tumores e tecidos periféricos de pacientes com caquexia e peso estável, que apresentavam diferenças entre si nos perfis clássicos de citocinas, como TNF α , IL-6 e IL1b, que são postulados como fatores relevantes no desenvolvimento e progressão da caquexia.(ALVES et al., 2017b; CAMARGO et al., 2015b; NETO et al., 2018). Em adição, outro estudo recente publicado pelo grupo apontou que outros fatores não clássicos estavam aumentados na caquexia, como por exemplo, IL-8, IFN γ , GM-CSF, EGF, VEGF e G-CSF (LIMA et al., 2019b). Esses fatores detêm importantes funções em processos moleculares incluindo angiogênese, inflamação, malignidade tumoral e evasão imunológica(LONG et al., 2016; NEVEU et al., 2014). Por ser uma síndrome associada ao câncer, alguns estudos postulam a possibilidade de a incidência da caquexia estar eventualmente relacionada ao estadiamento do tumor. O estudo ora apresentado, a análise histopatológica dos tumores de pacientes caquéticos e não caquéticos demonstrou que a incidência de caquexia não é associada ao estadiamento tumoral dos pacientes, tendo em vista que uma média de 43%

dos pacientes com estadiamento inicial (I-II) manifestaram a síndrome. Esses dados corroboram outros estudos que demonstram que a caquexia pode se manifestar em estágios iniciais do câncer (LIMA et al., 2019b; M.J., 2010; MCSORLEY et al., 2018). A fim de caracterizar outras funções biológicas alteradas na caquexia, viu-se necessário realizar uma análise proteômica para caracterizar as proteínas altamente expressas nos tumores dos pacientes caquéticos. Neste estudo, buscou-se, inicialmente, utilizar proteômica para identificar as proteínas reguladoras no tumor de pacientes com caquexia. Entre o total de 398 proteínas identificadas na análise de proteômica, um total de 71 proteínas estavam diferencialmente expressas no grupo com caquexia. De acordo de interação de proteína, conforme representado na figura 10, observou-se dois importantes clusters de proteínas.

O primeiro cluster de proteínas a ser identificado e discutido no presente trabalho foi referente as proteínas relacionadas com matriz extracelular, tais como, vimentina, S100A6, galectina 3, laminina, tropomiosina. De modo direto, todas essas proteínas estão relacionadas com o processo de fibrose. Estudos recentes do grupo demonstram que a caquexia é marcada por um processo de fibrose aberrante no tecido adiposo humano, apoiando ainda achados anteriores sobre resposta inflamatória desequilibrada em vários tecidos, incluindo, tecido adiposo, fígado, cérebro e tumor (ALVES et al., 2017b; DE MATOS-NETO et al., 2015b; LIRA et al., 2012; RICCARDI et al., 2020). Além disso, dentro do protocolo de validação dessas funções biológicas, encontramos uma alta expressão de α -SMA e colágeno no tumor dos pacientes caquéticos. O aumento de α -SMA é geralmente considerada uma característica dos miofibroblastos, em vez de fibroblastos associados a tumores ou fibroblastos associados a câncer (CAFs)(YAZDANI; BANSAL; PRAKASH, 2017). Além disso, essas alterações morfológicas e funcionais levam a uma aberrante produção e remodelação da MEC, caracterizada por fibrose(MANOUSOPOULOU et al., 2018). Os resultados obtidos no presente trabalho, demonstram alterações importantes nos fibroblastos associados ao tumor em pacientes caquéticos e, portanto, permitem a proposição de que o EMT pode contribuir significativamente para o desenvolvimento de resistência ao tratamento nos pacientes. Além disso, um crescente corpo de evidências mostra que a sinalização de TGF β está envolvida no EMT (ALVES et al.,

2017b; LIMA et al., 2019b; ORUQAJ et al., 2015; PETANIDIS et al., 2016). Estudos recentes sugerem que a sinalização do TGF β pode levar à atrofia muscular por um mecanismo dependente da ROS (ÁBRIGO et al., 2018a) e desempenha um papel central na fibrose (GHAFOORY et al., 2018).

Os sinais de TGF β podem ativar a via canônica dependente de SMAD (AHMED et al., 2017), bem como induzir a via de sinalização JNK / p38 MAPK (não canônica) (CHERUKU et al., 2015). Em adição, também foi demonstrado no presente trabalho que todas as isoformas de TGF β estavam aumentadas nos pacientes CC em comparação com os pacientes WSC. Estes resultados confirmam a interação entre TGF β e EMT no tumor de CC. Como a expressão aumentada de TGF β não foi relacionada à maior fosforilação do SMAD, desse modo, foi examinada a via de sinalização MAPK não canônica. Alta expressão de p38, JNK e MEK1 foi encontrada nas amostras de CC, bem como níveis aumentados de fatores de transcrição, como o STAT1, que estão envolvidos em determinar a agressividade do tumor (HIX et al., 2013) e podem ser importantes para a resistência do tumor e evasão imune em pacientes caquéticos. O papel do STAT-1 no câncer não é claro. Estudos anteriores mostraram que o STAT1 poderia exercer um papel oncogênico e de supressão tumoral (MEISSEL et al., 2017). Os resultados descobertos nesse trabalho mostraram uma expressão aumentada de STAT-1 no tumor de pacientes caquéticos em comparação com tumores de pacientes sem caquexia. Recentemente, foi demonstrado pelo grupo que a alta expressão de STAT-1 no tecido adiposo de pacientes caquéticos estava correlacionada com inflamação acentuada em pacientes, que poderia desempenhar importante função biológica na malignidade tumoral, tendo em vista que a ativação de STAT1 em macrófagos associados a tumores (TAM) induz a expressão de arginase e a produção de NO, que, por sua vez, suprime respostas imunes mediadas por células T (KUSMARTSEV; GABRILOVICH, 2005). Em adição, Tauriello et al., (2018) demonstrou que o aumento do conteúdo de TGF β no microambiente tumoral pode representar um mecanismo primário de evasão imunológica e tem sido considerado um importante alvo para imunoterapia no câncer (TAURIELLO et al., 2018). Também foi observado nos resultados obtidos redução da expressão do supressor tumoral bastante conhecido, p53 no grupo com CC. Dados da literatura indicam que a disfunção da p53 subsidia a evasão

imunológica do tumor e a resposta inflamatória (ZHAO et al., 2017). Esses dados indicam que altos níveis de TGF β no tumor estão associados à síntese e secreção de componentes da matriz extracelular através da via de sinalização MAPK não canônica e levam ao processo EMT no tumor de pacientes caquéticos, contribuindo para malignidade tumoral, resposta inflamatória e mau prognóstico. Tendo como base o interesse em entender a assinatura genética na caquexia associada ao câncer, alguns estudos sugerem que a mutação KRAS no câncer colorretal é diretamente relacionada a ativação da via de sinalização da MAPK (HALING et al., 2013) e desenvolvimento de caquexia. Foi recentemente demonstrado que tumores com KRAS mutado estavam associados a um risco aumentado de perda de peso (MILLER et al., 2017; PETRUZZELLI; WAGNER, 2016).

Em adição, um outro mecanismo de bastante interesse e importância biológica é o processo de hipóxia nos tumores. Já foi bastante demonstrado na literatura que os mecanismos de hipóxia desempenham um papel importante na malignidade do câncer, principalmente na modulação da angiogênese. Estudos apontam para o fato de que a ativação do p38 também pode induzir diretamente a ativação do HIF-1 α induzida por hipóxia nas células tumorais e que leva à angiogênese do tumor através principalmente pela expressão do VEGF (CARBAJO-PESCADOR et al., 2013; KOUL; PAL; KOUL, 2013). Recentemente, demonstramos que a expressão de VEGF estava aumentada no tumor de pacientes caquéticos comparados com pacientes de peso estável, porém não foi identificada diferença na expressão de VEGF no soro desses pacientes (LIMA et al., 2019b). O processo de angiogênese foi extensivamente relatado em diversos tipos de tumores, tais como, câncer de próstata (NEVEU et al., 2014), câncer de ovário (LANE et al., 2011), câncer colorretal (LIMA et al., 2019b) e pancreático. No presente estudo, a análise molecular desses possíveis efeitos no tumor dos pacientes com caquexia, pode-se perceber um aumento significativo CD34 + (densidade microvascular), bem como já foi demonstrado que é associado ao aumento de VEGF no grupo CC (LIMA et al., 2019b). Nos últimos anos, muitos estudos demonstraram que os vasos sanguíneos CD34 + desempenham um papel importante no desenvolvimento do tumor e influenciam a gravidade maligna (BALANI; NGUYEN; EAVES, 2017; KONG et al., 2016; MAJCHRZAK et al., 2013).

Recentemente, foi demonstrado que a atividade do eixo de sinalização de IL-1 pode contribuir para a fibrose e induzir a expressão de outras citocinas e fatores, como IL-6 e TGF β (PARK et al., 2018). Para desvendar os mecanismos moleculares envolvidos no processo de fibrose tumoral na caquexia, o presente estudo avaliou os possíveis efeitos do receptor de IL-1 tipo 1 na caquexia associada ao câncer. Estudos anteriores demonstram que camundongos deficientes do receptor de IL-1 tipo 1 (IL-1R) em modelo de caquexia associada à infecção por *Toxoplasma*, recuperam sua massa corporal magra e são protegidos da atrofia hepática, sendo também são protegidos contra o desenvolvimento de fibrose perivascular no fígado e nos músculos (MELCHOR et al., 2019). A realização dessa análise permitiu verificar e demonstrar que os animais deficientes para IL-1R influenciam no crescimento tumoral, tendo em vista que o tumor dos animais IL-1R KO era significativamente menor quando comparado com os animais selvagens. A ausência de IL-1R também influenciou a expressão dos genes relacionados à fibrose, através da redução de fibronectina nos animais IL-1R KO, porém não teve efeito sobre a expressão de citocinas inflamatórias. Em adição, os resultados do presente trabalho demonstram a relação direta da ausência de IL-1R na expressão de α -SMA no fígado, tecido adiposo e músculo dos animais. De fato, uma análise de proteoma na literatura, revelou que existem sobreposições consideráveis nas vias e funções biológicas reguladas por IL-1 β e VEGF na atividade da matriz extracelular, em particular a cascata de proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK) que pode influenciar na angiogênese, proliferação e inflamação (MOHR et al., 2017). Pode-se concluir que HIF-1 α e VEGF são fatores ligados à inflamação e tumorigênese, tendo em vista que apresentaram uma expressão alterada com a deficiência do sistema IL-1/IL-1R. Esses dados corroboram dados da literatura que sugerem que a sinalização de IL-1 é necessária para fibrose em uma variedade de configurações de tecidos, incluindo fígado e músculo (BAGEGHNI et al., 2019; MELCHOR et al., 2019).

O segundo cluster identificado na proteômica identificou que as proteínas mais abundantemente expressas estavam diretamente relacionadas com as vias de metabolismo energético. Já é sabido que uma característica crucial do fenótipo do câncer é a reprogramação do metabolismo energético em direção à glicólise (KIM et al., 2007; O. WARBURG, 1956). Diante disso, os

mecanismos que promovem a glicólise ou a alteração da função bioenergética das mitocôndrias propostos para explicar o fenótipo de Warburg. Analisando os dados obtidos no presente trabalho, conforme ilustrado na figura 8, a proteína mais abundante foi a subunidade gama do complexo F1 da ATP sintase (ATIPF1/ATIF1/IF1) que constituem a ATP Sintase, enzima necessária na via metabólica de fosforilação oxidativa para geração de ATP. No entanto, alguns estudos demonstram que o ATIF1 é altamente expressa em carcinomas humanos (CUEZVA et al., 2009; VANDER HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2009) Além disso, foi visto que ATIF1 desempenha um papel regulador no controle do metabolismo energético celular, apoiando fortemente sua participação como um interruptor molecular usado pelas células tumorais para estimular a glicólise aeróbica (SÁNCHEZ-CENIZO et al., 2010) Uma outra proteína envolvida no metabolismo glicolítico é a alfa-enolase (ENO1) que estava significativamente expressa na análise de proteômica nos pacientes caquéticos e sua expressão está envolvida na proliferação e metástase de células tumorais. Molecularmente, já foi demonstrado que os animais deficientes para ENO1 mostram atenuação da proliferação e do aparecimento de metástases além de reversão da transição epitelial-mesenquimal (EMT) *in vitro* (SUN et al., 2019). Os dados integrativos do presente trabalho demonstram um aumento de ENO1 no tumor dos pacientes caquéticos, como também uma indução de EMT, sugerindo uma relação direta dos efeitos da ativação da via glicolítica, hipóxia e estresse oxidativo no processo de fibrose e transição epitelial-mesenquimal. Uma outra proteína identificada com importante papel na via glicolítica é a PKM2. Estudos mostram que PKM2 desempenha um papel importante na reprogramação metabólica de células tumorais e na consequente glicólise aeróbica (CHANETON; GOTTLIEB, 2012). Foi demonstrado que o knockdown de PKM2 afetou parcialmente a estabilidade da subunidade N65-kB p65, indicando que a regulação pós-traducional de p65 é um dos mecanismos usados pelo PKM2 para induzir o crescimento do tumor (AZOITEI et al., 2016) em sido demonstrado que PKM2 no núcleo é capaz de interagir com HIF-1 α (LUO et al., 2011; LUO; SEMENZA, 2012) e além disso, HIF-1 α é particularmente crucial para mudar o programa metabólico das células cancerígenas da fosforilação oxidativa para a glicólise (KUNG-CHUN CHIU et al., 2019).

Diversas proteínas implicadas na resposta ao estresse oxidativo também foram identificadas, tais como proteínas de choque térmico (HSPs), chaperona redox proteína dissulfeto isomerase A6 (PDIA6), dissulfeto de proteína-isomerase A3 (PDIA3), dissulfeto de proteína-isomerase A1 (PDIA1), piruvato quinase 2 (PKM2). A família de proteínas dissulfeto isomerase (PDI) é constituída por um grupo de enzimas multifuncionais do retículo endoplasmático (ER) que catalisam as reações redox. Inúmeras evidências sugerem que as PDIs estão diretamente envolvidas na proliferação e metástase em diversos tipos de câncer (LEE; LEE, 2017). Interessantemente, uma outra proteína abundantemente expressa no tumor dos pacientes caquéticos foi a anidrase carbônica (CA IX) que é uma glicoproteína da superfície celular associada a um tumor que é induzida por hipóxia, envolvida na adaptação à acidose e implicada na progressão do câncer (PASTOREKOVA; GILLIES, 2019). Sabe-se que a hipóxia provoca acúmulo de ROS devido à quantidade insuficiente de O₂. Na caquexia, o papel do estresse oxidativo e os mecanismos de hipóxia ainda não foram bem esclarecidos em pacientes, porém estudos definem como um dos mecanismos mais comuns de diferentes causas da síndrome, baseado principalmente, no aumento dos níveis de ROS e modificações proteicas dependentes da oxidação no musculo esquelético de pacientes com caquexia (ÁBRIGO et al., 2018a). Um outro importante aspecto discutido na caquexia é a diminuição dos níveis de antioxidantes no soro (ELEY; TISDALE, 2007; MANTOVANI et al., 2003). O presente trabalho fornece pela primeira vez, dados científicos que demonstram fortemente a interação exclusiva do estresse oxidativo mediado por hipóxia apenas nos pacientes com caquexia, tendo em vista que as correlações dos fatores PRDX1, SOD e HSPA1 se correlacionaram positivamente com HIF-1 α apenas nos tumores dos pacientes caquéticos. Esses resultados sugerem que o desenvolvimento do estresse oxidativo mediado por hipóxia na caquexia associada ao câncer pode ser atribuído, em partes, ao aumento dos níveis de ROS e à falha dos sistemas antioxidantes que operam nas células tumorais.

Em adição, dados de proteômica obtidos em pacientes obesos com câncer, um fenótipo oposto à caquexia, identificou-se de forma bastante interessante, chaperonas importantes como HSP70, HSP90, chaperonina, calnexina e Protein disulfide isomerase (PDI) no estudo (CRUZ et al., 2020).

Um estudo recente com modelo de células de carcinoma de pulmão de Lewis (LLC), modelo definido que induz caquexia, demonstrou que a atividade catabólica estava associada a altos níveis de Hsp70 e Hsp90 liberados por exossomos derivadas pelo tumor e atuam diretamente via TLR4 na perda de massa muscular (ZHANG et al., 2017). Pode-se perceber que o principal componente celular as proteínas identificadas na análise proteômica do tumor dos pacientes com caquexia, foi derivado dos exossomos e as HSPs, incluindo HSP70 e HSP90, estavam aumentadas formando um cluster central com as proteínas envolvidas no processo de estresse oxidativo. Diante disso, verificou-se que os exossomos derivados do tumor de pacientes com caquexia apresentam níveis elevados de HSP70 em comparação com os exossomos derivados do tumor de pacientes de peso estável. Acredita-se, portanto, que Hsp70 exerce um papel fundamental na caquexia associada ao câncer e podendo ser um fator chave que causa inflamação sistêmica, além de induzir novos estudos que visem a neutralização de HSP70 como uma importante estratégia terapêutica na caquexia associada ao câncer. Além disso, os níveis de HSP foram correlacionados significativamente com marcadores de diagnóstico da caquexia. Adicionalmente, os exossomos derivados de tumores de pacientes caquéticos, apresentaram um aumento da expressão de citocinas inflamatórias, caracterizando um papel importante dos exossomos na manutenção dos processos inflamatórios envolvidos na caquexia.

Conclusão

7. CONCLUSÃO

Neste estudo foi realizada a avaliação proteômica em tumores de pacientes com câncer colorretal que apresentavam ou não caquexia. Foram identificadas um total de 71 proteínas diferentemente expressas entre o grupo sem e com caquexia. Entre as proteínas caracterizadas, duas principais funções biológicas foram investigadas nesse estudo, a fibrose e o estresse oxidativo. A primeira fase do estudo que avaliou o processo de fibrose no tumor indica que a regulação positiva da inflamação contribui para a progressão do processo de fibrose no tumor dos pacientes com caquexia. A remodelação do tecido tumoral, principalmente pela transdiferenciação de fibroblastos para miofibroblastos induzida por TGF β , leva ao perfil desequilibrado de citocinas inflamatórias, angiogênese e remodelamento da matriz extracelular, na qual a hipóxia parece ter um papel importante. A sinalização de TGF β através das vias p38 MAPK induziu fibrose no microambiente tumoral de pacientes caquéticos, em comparação com tumores de pacientes com peso estável. Além disso, acreditamos que a sinalização de TGF β no tecido tumoral possa ser vista como um novo mecanismo subjacente à resistência tumoral que poderia potencialmente reduzir a eficácia do tratamento de pacientes com caquexia associada ao câncer. A continuação desse estudo permitiu observar que o eixo IL-1R desempenha um papel central na regulação do desenvolvimento do tumor e fibrose, através da expressão de fatores importantes na EMT. A segunda fase do estudo foi investigar o papel do estresse oxidativo na caquexia associada ao câncer. Pode-se observar que o estresse oxidativo no tumor de pacientes caquéticos é mediado por hipóxia (HIF-1 α). Além disso, os exossomos derivados do tumor são enriquecidos em HSP70 e citocinas inflamatórias, configurando um marcador bioquímico de estresse e inflamação na caquexia. Esses resultados apresentam avanços significativos no entendimento dos mecanismos moleculares do microambiente tumoral na caquexia, bem como sugerem novos possíveis alvos terapêuticos no tratamento da síndrome.

Referências Bibliográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- ÁBRIGO, J. et al. Role of Oxidative Stress as Key Regulator of Muscle Wasting during Cachexia. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2018, p. 2063179, 2018a.
- ÁBRIGO, J. et al. TGF- β requires the activation of canonical and non-canonical signalling pathways to induce skeletal muscle atrophy. **Biological Chemistry**, v. 399, n. 3, p. 253–264, 2018b.
- AHMED, S. et al. The TGF- β /Smad4 Signaling Pathway in Pancreatic Carcinogenesis and Its Clinical Significance. **Journal of Clinical Medicine**, v. 6, n. 1, p. 5, 2017.
- AL TAMEEMI, W. et al. Hypoxia-Modified Cancer Cell Metabolism. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 7, n. January, p. 1–15, 2019.
- ALVES, M. J. et al. Adipose tissue fibrosis in human cancer cachexia: The role of TGF β pathway. **BMC Cancer**, v. 17, n. 1, p. 1–12, 2017a.
- ALVES, M. J. et al. Adipose tissue fibrosis in human cancer cachexia: The role of TGF β pathway. **BMC Cancer**, v. 17, n. 1, 2017b.
- AOYAGI, T. et al. Cancer cachexia, mechanism and treatment. **World Journal of Gastrointestinal Oncology**, v. 7, n. 4, p. 17, 2015.
- ARCUCCI, A. et al. Cancer: An Oxidative Crosstalk between Solid Tumor Cells and Cancer Associated Fibroblasts. **BioMed Research International**, v. 2016, 2016.
- ARGILÉS, J. M. et al. The role of cytokines in cancer cachexia. **Current Opinion in Supportive and Palliative Care**, v. 3, n. 4, p. 263–268, 2009.
- ARGILÉS, J. M. et al. Cancer cachexia: Understanding the molecular basis. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 11, p. 754–762, 2014.
- ARGILÉS, J. M. et al. Therapeutic strategies against cancer cachexia. **European Journal of Translational Myology**, v. 29, n. 1, p. 4–13, 2019.
- ARTHUR, S. T. et al. One-year prevalence, comorbidities and cost of cachexia-related inpatient admissions in the USA. **Drugs in Context**, v. 3, p. 1–11, 2014.
- AVAGLIANO, A. et al. Metabolic Reprogramming of Cancer Associated Fibroblasts : The Slavery of Stromal Fibroblasts. v. 2018, 2018.
- AZOITEI, N. et al. PKM2 promotes tumor angiogenesis by regulating HIF-1 α through NF- κ B activation. **Molecular Cancer**, v. 15, n. 1, p. 1–15, 2016.
- BAGEGHNI, S. A. et al. Fibroblast-specific deletion of IL-1 receptor-1 reduces adverse cardiac remodeling following myocardial infarction. **JCI Insight**, v. 4, n. 17, p. 1–14, 2019.
- BALANI, S.; NGUYEN, L. V.; EAVES, C. J. Modeling the process of human tumorigenesis. **Nature Communications**, v. 8, n. May, p. 1–10, 2017.
- BARACOS, V. E.; MAZURAK, V. C.; BHULLAR, A. S. Cancer cachexia is defined by an ongoing loss of skeletal muscle mass. v. 8, n. 3, p. 3–12, 2019.
- BARREIRO, E. et al. Both oxidative and nitrosative stress are associated with muscle wasting in tumour-bearing rats. **FEBS Letters**, v. 579, n. 7, p. 1646–1652, 2005.
- BATISTA, M. L. et al. Adipose tissue inflammation and cancer cachexia: Possible role of nuclear transcription factors. **Cytokine**, v. 57, n. 1, p. 9–16, 2012.
- BATLLE, R. et al. Regulation of tumor angiogenesis and mesenchymal–endothelial transition by p38 α through TGF- β and JNK signaling. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1–18, 2019.

- BEN-NOUN, L. The Disease That Caused Weight Loss in King David the Great. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 59, n. 2, p. M143–M145, 2004.
- BHOGAL, A. S.; LORITE, M. L.; TISDALE, M. J. Changes in nucleic acid and protein levels in atrophying skeletal muscle in cancer cachexia. **Anticancer Research**, v. 26, n. 6 B, p. 4149–4154, 2006.
- BING, C. et al. Zinc- α 2-glycoprotein: An adipokine modulator of body fat mass. **International Journal of Obesity**, v. 34, n. 11, p. 1559–1565, 2010.
- BLUM, D. et al. Evolving classification systems for cancer cachexia: Ready for clinical practice? **Supportive Care in Cancer**, v. 18, n. 3, p. 273–279, 2010.
- BOERSEMA, P. J. et al. Triplex protein quantification based on stable isotope labeling by peptide dimethylation applied to cell and tissue lysates. **Proteomics**, v. 8, n. 22, p. 4624–4632, 2008.
- BOURDEL-MARCHASSON, I. et al. Nutritional advice in older patients at risk of malnutrition during treatment for chemotherapy: A two-year randomized controlled trial. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, 2014.
- BOZZETTI, F.; MARIANI, L. Defining and classifying cancer cachexia: A proposal by the SCRINIO Working Group. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 33, n. 4, p. 361–367, 2009.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, maio 1976.
- BRUERA, E. Anorexia , cachexia , and nutrition Does the patient have cachexia ? Why is the patient cachectic ? Which treatments are effective ? **Bmj**, p. 1219–1222, 1997.
- CAMARGO, R. G. et al. Nf-kbp65 and expression of its pro-inflammatory target genes are upregulated in the subcutaneous adipose tissue of cachectic cancer patients. **Nutrients**, v. 7, n. 6, p. 4465–4479, 2015a.
- CAMARGO, R. G. et al. Nf-kbp65 and expression of its pro-inflammatory target genes are upregulated in the subcutaneous adipose tissue of cachectic cancer patients. **Nutrients**, v. 7, n. 6, 2015b.
- CARBAJO-PESCADOR, S. et al. Inhibition of VEGF expression through blockade of Hif1 α and STAT3 signalling mediates the anti-angiogenic effect of melatonin in HepG2 liver cancer cells. **British Journal of Cancer**, v. 109, n. 1, p. 83–91, 2013.
- CHAN, J. S. K. et al. Cancer-associated fibroblasts enact field cancerization by promoting extratumoral oxidative stress. **Cell Death and Disease**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2017.
- CHANETON, B.; GOTTLIEB, E. Rocking cell metabolism: Revised functions of the key glycolytic regulator PKM2 in cancer. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 37, n. 8, p. 309–316, 2012.
- CHAPNICK, D. A. et al. Partners in crime: The TGF β and MAPK pathways in cancer progression. **Cell and Bioscience**, v. 1, n. 1, p. 42, 2011.
- CHEN, E. Y. et al. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. **BMC Bioinformatics**, v. 14, n. 1, p. 128, 2013.
- CHERUKU, H. R. et al. Transforming growth factor- β , MAPK and Wnt signaling interactions in colorectal cancer. **EuPA Open Proteomics**, v. 8, p. 104–115, 2015.
- COLEMAN, M. L.; RATCLIFFE, P. J. Angiogenesis: Escape from hypoxia. **Nature Medicine**, v. 15, n. 5, p. 491–493, 2009.

- CRUZ, A. L. S. et al. Lipid droplets: platforms with multiple functions in cancer hallmarks. **Cell Death and Disease**, v. 11, n. 2, 2020.
- CUEZVA, J. M. et al. The tumor suppressor function of mitochondria: Translation into the clinics. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1792, n. 12, p. 1145–1158, 2009.
- CUNHA, F. M. et al. Intracellular peptides as natural regulators of cell signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 36, p. 24448–24459, 2008.
- CURY, S. S. et al. Tumor transcriptome reveals high expression of IL-8 in non-small cell lung cancer patients with low pectoralis muscle area and reduced survival. **Cancers**, v. 11, n. 9, 2019.
- DASGUPTA, A. et al. Abstract LB-267: Metabolic alterations in tumors cause cachexia in pancreatic cancer. **Cancer Research**, v. 77, n. 13 Supplement, p. LB-267 LP-LB-267, jul. 2017.
- DE CASTRO, G. S. et al. Human cachexia induces changes in mitochondria, autophagy and apoptosis in the skeletal muscle. **Cancers**, v. 11, n. 9, 2019.
- DE MATOS-NETO, E. M. et al. Systemic inflammation in cachexia - Is tumor cytokine expression profile the culprit? **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. DEC, 2015a.
- DE MATOS-NETO, E. M. et al. Systemic Inflammation in Cachexia - Is Tumor Cytokine Expression Profile the Culprit? **Frontiers in immunology**, v. 6, p. 629, 2015b.
- DE WAELE, E. et al. Nutrition therapy in cachectic cancer patients. The Tight Caloric Control (TiCaCo) pilot trial. **Appetite**, v. 91, p. 298–301, 2015.
- DEJONG, C. H. C. et al. Systemic inflammation correlates with increased expression of skeletal muscle ubiquitin but not uncoupling proteins in cancer cachexia. **Oncology Reports**, v. 14, n. 1, p. 257–263, 2005.
- DEKKER, E. et al. Colorectal cancer. **The Lancet**, v. 394, n. 10207, p. 1467–1480, 2019.
- DOEHNER, W.; ANKER, S. D. Cardiac cachexia in early literature: A review of research prior to Medline. **International Journal of Cardiology**, v. 85, n. 1, p. 7–14, 2002.
- DONOHUE, C. L.; RYAN, A. M.; REYNOLDS, J. V. Cancer Cachexia: Mechanisms and Clinical Implications. **Gastroenterology Research and Practice**, v. 2011, p. 1–13, 2011.
- DUNNE, R. F. et al. Cachexia and sarcopenia in older adults with cancer: A comprehensive review. **Cancers**, v. 11, n. 12, p. 1–17, 2019.
- ELEY, H. L.; TISDALE, M. J. Skeletal muscle atrophy, a link between depression of protein synthesis and increase in degradation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 10, p. 7087–7097, 2007.
- EVANS, W. J. et al. Cachexia: A new definition. **Clinical Nutrition**, v. 27, n. 6, p. 793–799, 2008.
- FALCONER, J. S. et al. Acute-phase protein response and survival duration of patients with pancreatic cancer. **Cancer**, v. 75, n. 8, p. 2077–2082, 1995.
- FEARON, E. R. Molecular Genetics of Colorectal Cancer. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 6, n. 1, p. 479–507, 28 fev. 2011.
- FEARON, E. R.; VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, v. 61, n. 5, p. 759–767, jun. 1990.
- FEARON, K. et al. Definition and classification of cancer cachexia: An international consensus. **The Lancet Oncology**, v. 12, n. 5, p. 489–495, 2011.
- FEARON, K. C.; VOSS, A. C.; HUSTEAD, D. S. Definition of cancer cachexia:

- Effect of weight loss, reduced food intake, and systemic inflammation on functional status and prognosis. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 83, n. 6, p. 1345–1350, 2006.
- FIASCHI, T.; CHIARUGI, P. Oxidative stress, tumor microenvironment, and metabolic reprogramming: A diabolic liaison. **International Journal of Cell Biology**, v. 2012, 2012.
- FOLKMAN, J. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. **Annals of surgery**, v. 175, n. 3, p. 409–416, 1972.
- FORSYTHE, J. O. A. et al. Activation of Vascular Endothelial Growth Factor Gene Transcription by Hypoxia-Inducible Factor 1. v. 16, n. 9, p. 4604–4613, 1996.
- FOX, K. M. et al. Estimation of cachexia among cancer patients based on four definitions. **Journal of Oncology**, v. 2009, 2009.
- FRANCESCHINI, A. et al. STRING v9.1: Protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. 808–815, 2013.
- GELIN, J. et al. Role of Endogenous Tumor Necrosis Factor α and Interleukin 1 for Experimental Tumor Growth and the Development of Cancer Cachexia 1. p. 415–421, 2014.
- GHAFOORY, S. et al. Platelet TGF- β 1 deficiency decreases liver fibrosis in a mouse model of liver injury. **Blood advances**, v. 2, n. 5, p. 470–480, 2018.
- GHANBARI MOVAHED, Z. et al. Cancer cells change their glucose metabolism to overcome increased ROS: One step from cancer cell to cancer stem cell? **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 112, n. December 2018, p. 108690, 2019.
- GORDON, J. N.; GREEN, S. R.; GOGGIN, P. M. Cancer cachexia. **QJM - Monthly Journal of the Association of Physicians**, v. 98, n. 11, p. 779–788, 2005.
- GRELET, S. et al. Pleiotropic roles of non-coding RNAs in TGF- β -mediated epithelial-mesenchymal transition and their functions in tumor progression. **Cancers**, v. 9, n. 7, p. 3–8, 2017.
- GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, Inflammation, and Cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883–899, 2010.
- HALING, J. R. et al. Mechanism of MEK inhibition determines efficacy in mutant KRAS- versus BRAF-driven cancers. **Nature**, v. 501, n. 7466, p. 232–236, 2013.
- HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, jan. 2000.
- HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.
- HARDEE, J. P.; MONTALVO, R. N.; CARSON, J. A. Linking cancer cachexia-induced anabolic resistance to skeletal muscle oxidative metabolism. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, 2017.
- HE, W. A. et al. Microvesicles containing miRNAs promote muscle cell death in cancer cachexia via TLR7. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 12, p. 4525–4529, 2014.
- HERTA, M. **Atemschaukel**. München: [s.n.].
- HIX, L. M. et al. Tumor STAT1 transcription factor activity enhances breast tumor growth and immune suppression mediated by myeloid-derived suppressor cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 17, p. 11676–

11688, 2013.

HOU, Y.-C. et al. Elevated Serum Interleukin-8 Level Correlates with Cancer-Related Cachexia and Sarcopenia: An Indicator for Pancreatic Cancer Outcomes. **Journal of Clinical Medicine**, v. 7, n. 12, p. 502, 2018.

JATOI, A. et al. A placebo-controlled, double-blind trial of infliximab for cancer-associated weight loss in elderly and/or poor performance non-small cell lung cancer patients (N01C9). **Lung Cancer**, v. 68, n. 2, p. 234–239, 13 maio 2010.

JING, X. et al. Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment. **Molecular Cancer**, v. 18, n. 1, p. 1–15, 2019.

JUNG, Y. J. et al. IL-1beta-mediated up-regulation of HIF-1alpha via an NFkappaB/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 17, n. 14, p. 2115–2117, 2003.

KIM, J. -W. et al. Hypoxia-Inducible Factor 1 and Dysregulated c-Myc Cooperatively Induce Vascular Endothelial Growth Factor and Metabolic Switches Hexokinase 2 and Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, n. 21, p. 7381–7393, 2007.

KONG, X. et al. CD34 over-expression is associated with gliomas' higher WHO grade. **Medicine (United States)**, v. 95, n. 7, p. e2830, 2016.

KOUL, H. K.; PAL, M.; KOUL, S. Role of p38 MAP Kinase Signal Transduction in Solid Tumors. **Genes & cancer**, v. 4, n. 9–10, p. 342–59, set. 2013.

KULESHOV, M. V. et al. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. **Nucleic acids research**, v. 44, n. W1, p. W90–W97, 2016.

KUMARI, S. et al. Reactive Oxygen Species : A Key Constituent in Cancer Survival. 2018.

KUNG-CHUN CHIU, D. et al. Hypoxia regulates the mitochondrial activity of hepatocellular carcinoma cells through HIF/HEY1/PINK1 pathway. **Cell Death and Disease**, v. 10, n. 12, 2019.

KUSMARTSEV, S.; GABRILOVICH, D. I. STAT1 Signaling Regulates Tumor-Associated Macrophage-Mediated T Cell Deletion. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 8, p. 4880–4891, 2005.

KYRIAKIDES, T. R. et al. Regulation of angiogenesis and matrix remodeling by localized, matrix-mediated antisense gene delivery. **Molecular Therapy**, v. 3, n. 6, p. 842–849, 2001.

LAMBERT, A. W.; PATTABIRAMAN, D. R.; WEINBERG, R. A. Review Emerging Biological Principles of Metastasis. **Cell**, v. 168, n. 4, p. 670–691, 2016.

LANE, D. et al. Prognostic significance of IL-6 and IL-8 ascites levels in ovarian cancer patients. **BMC Cancer**, v. 11, n. 1, p. 210, 2011.

LAVIANO, A. et al. Oxidative stress and wasting in cancer. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 10, n. 4, p. 449–456, 2007.

LAVIANO, A.; KOVERECH, A.; MARI, A. Cachexia: Clinical features when inflammation drives malnutrition. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 74, n. 4, p. 348–354, 2015.

LAVIANO, A.; PALDINO, A. Diagnosing cachexia. **Clinical Practice**, v. 11, n. 1, p. 71–78, 2014.

LEE, E.; LEE, D. H. Emerging roles of protein disulfide isomerase in cancer. **BMB Reports**, v. 50, n. 8, p. 401–410, 2017.

- LI, Y. et al. Skeletal muscle myocytes undergo protein loss and reactive oxygen-mediated NF- κ B activation in response to tumor necrosis factor α . **The FASEB Journal**, v. 12, n. 10, p. 871–880, 1998.
- LIMA, J. D. C. C. et al. Tumour-derived transforming growth factor- β signalling contributes to fibrosis in patients with cancer cachexia. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 10, n. 5, 2019a.
- LIMA, J. D. C. C. et al. Tumour-derived transforming growth factor- β signalling contributes to fibrosis in patients with cancer cachexia. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 55, n. April, 2019b.
- LIN, G. G.; SCOTT, J. G. Tumor-derived PTHrP Triggers Adipose Tissue Browning and Cancer Cachexia. **Nature**, v. 100, n. 2, p. 130–134, 2012.
- LIOU, G.-Y.; STORZ, P. Reactive oxygen species in cancer. **Free Radical Research**, v. 44, n. 5, p. 479–496, 7 jan. 2010.
- LIRA, F. S. et al. Exercise training decreases adipose tissue inflammation in cachectic rats. **Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme**, v. 44, n. 2, p. 91–8, fev. 2012.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.
- LOH et al. The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges. **Cells**, v. 8, n. 10, p. 1118, 20 set. 2019.
- LONG, X. et al. IL-8, a novel messenger to cross-link inflammation and tumor EMT via autocrine and paracrine pathways (Review). **International Journal of Oncology**, v. 48, n. 1, p. 5–12, 2016.
- LUO, W. et al. Pyruvate Kinase M2 Is a PHD3-Stimulated Coactivator for Hypoxia-Inducible Factor 1. **Cell**, v. 145, n. 5, p. 732–744, maio 2011.
- LUO, W.; SEMENZA, G. L. Emerging roles of PKM2 in cell metabolism and cancer progression. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 23, n. 11, p. 560–566, nov. 2012.
- M.J., T. Are tumoral factors responsible for host tissue wasting in cancer cachexia? **Future Oncology**, v. 6, n. 4, p. 503–513, 2010.
- MACDONALD, N. et al. Understanding and managing cancer cachexia. **Journal of the American College of Surgeons**, v. 197, n. 1, p. 143–161, 2003.
- MADDOCKS, M. et al. Practical multimodal care for cancer cachexia. **Current Opinion in Supportive and Palliative Care**, v. 10, n. 4, p. 298–305, 2016.
- MAJCHRZAK, K. et al. Markers of angiogenesis (CD31, CD34, rCBV) and their prognostic value in low-grade gliomas. **Neurologia i Neurochirurgia Polska**, v. 47, n. 4, p. 325–331, 2013.
- MANOUSOPOULOU, A. et al. Quantitative proteomic profiling of primary cancer-associated fibroblasts in oesophageal adenocarcinoma. **British Journal of Cancer**, v. 118, n. 9, p. 1200–1207, 2018.
- MANTOVANI, G. et al. Serum levels of leptin and proinflammatory cytokines in patients with advanced-stage cancer at different sites. **Journal of Molecular Medicine**, v. 78, n. 10, p. 554–561, 2000.
- MANTOVANI, G. et al. Antioxidant agents are effective in inducing lymphocyte progression through cell cycle in advanced cancer patients: Assessment of the most important laboratory indexes of cachexia and oxidative stress. **Journal of**

- Molecular Medicine**, v. 81, n. 10, p. 664–673, 2003.
- MANTOVANI, G.; MADEDDU, C. Proinflammatory Cytokines: Their Role in Multifactorial Cancer Cachexia. In: **Cachexia and Wasting: A Modern Approach**. [s.l.: s.n.]. p. 477–482.
- MAXWELL, P. H.; RATCLIFFE, P. J. Oxygen sensors and angiogenesis. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 13, n. 1, p. 29–37, 2002.
- MCMILLAN, D. C. Systemic inflammation, nutritional status and survival in patients with cancer. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 12, n. 3, p. 223–226, 2009.
- MCMILLAN, D. C. Cancer and systemic inflammation: Stage the tumour and stage the host. **British Journal of Cancer**, v. 109, n. 3, p. 529, 2013.
- MCSORLEY, S. T. et al. The relationship between tumour stage, systemic inflammation, body composition and survival in patients with colorectal cancer. **Clinical Nutrition**, v. 37, n. 4, p. 1279–1285, 2018.
- MEISSL, K. et al. The good and the bad faces of STAT1 in solid tumours. **Cytokine**, v. 89, p. 12–20, 2017.
- MELCHOR, S. J. et al. **Cachexia and fibrosis are costs of chronic IL-1R-mediated disease tolerance in**. [s.l.: s.n.].
- MILLER, A. et al. Blockade of the IL-6 trans-signalling/STAT3 axis suppresses cachexia in Kras-induced lung adenocarcinoma. **Oncogene**, v. 36, n. 21, p. 3059–3066, 2017.
- MOHR, T. et al. Proteome profiling in IL-1 β and VEGF-activated human umbilical vein endothelial cells delineates the interlink between inflammation and angiogenesis. **PLoS ONE**, v. 12, n. 6, p. 1–23, 2017.
- MORLEY, J. E.; THOMAS, D. R.; WILSON, M. G. Review Article. 2006.
- MUSCARITOLI, M. et al. Consensus definition of sarcopenia, cachexia and pre-cachexia: Joint document elaborated by Special Interest Groups (SIG) “cachexia-anorexia in chronic wasting diseases” and “nutrition in geriatrics”. **Clinical Nutrition**, v. 29, n. 2, p. 154–159, 2010.
- NETO, N. I. P. et al. Peritumoural adipose tissue pro-inflammatory cytokines are associated with tumoural growth factors in cancer cachexia patients. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 9, n. 6, p. 1101–1108, 2018.
- NEVEU, B. et al. IL-8 secretion in primary cultures of prostate cells is associated with prostate cancer aggressiveness. **Research and reports in urology**, v. 6, p. 27–34, 2014.
- NISSEN, N. I.; KARSDAL, M.; WILLUMSEN, N. Collagens and Cancer associated fibroblasts in the reactive stroma and its relation to Cancer biology. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 38, n. 1, p. 1–12, 2019.
- NOGUCHI, Y. et al. Are Cytokines Possible Mediators of Cancer Cachexia? **Surgery Today**, v. 26, n. 7, p. 467–475, 1996.
- O. WARBURG. On the origin of cancer cells. **Science**, v. 123, n. 3191, p. 309–314, 1956.
- ORUQAJ, G. et al. Compromised peroxisomes in idiopathic pulmonary fibrosis, a vicious cycle inducing a higher fibrotic response via TGF- β signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 16, p. E2048–E2057, 2015.
- PAPAGEORGIS, P. TGF β signaling in tumor initiation, epithelial-to-mesenchymal transition, and metastasis. **Journal of Oncology**, v. 2015, 2015.
- PAPAGEORGIS, P.; STYLIANOPOULOS, T. Role of TGF β in regulation of the

- tumor microenvironment and drug delivery (review). **International Journal of Oncology**, v. 46, n. 3, p. 933–943, 2015.
- PARK, M. J. et al. IL-1-IL-17 signaling axis contributes to fibrosis and inflammation in two different murine models of systemic sclerosis. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. JUL, p. 1–12, 2018.
- PASTOREKOVA, S.; GILLIES, R. J. The role of carbonic anhydrase IX in cancer development: links to hypoxia, acidosis, and beyond. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 38, n. 1–2, p. 65–77, 2019.
- PAVLIDES, S. et al. The reverse Warburg effect: Aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. **Cell Cycle**, v. 8, n. 23, p. 3984–4001, 2009.
- PAVLIDES, S. et al. Loss of stromal caveolin-1 leads to oxidative stress, mimics hypoxia and drives inflammation in the tumor microenvironment, conferring the “reverse Warburg effect”: A transcriptional informatics analysis with validation. **Cell Cycle**, v. 9, n. 11, p. 2201–2219, 2010.
- PETANIDIS, S. et al. In vitro and ex vivo vanadium antitumor activity in (TGF- β)-induced EMT. Synergistic activity with carboplatin and correlation with tumor metastasis in cancer patients. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 74, p. 121–134, 2016.
- PETRUZZELLI, M. et al. A switch from white to brown fat increases energy expenditure in cancer-associated cachexia. **Cell Metabolism**, v. 20, n. 3, p. 433–447, 2014.
- PETRUZZELLI, M.; WAGNER, E. F. Mechanisms of metabolic dysfunction in cancer-associated cachexia. **Genes and Development**, v. 30, n. 5, p. 489–501, 2016.
- POEHLMAN, E. T. et al. Increased resting metabolic rate in patients with congestive heart failure. **Annals of Internal Medicine**, v. 121, n. 11, p. 860–862, 1994.
- PORPORATO, P. E. Understanding cachexia as a cancer metabolism syndrome. **Oncogenesis**, v. 5, n. 2, p. e200-10, 2016.
- PUGH, C. W.; RATCLIFFE, P. J. Regulation of angiogenesis by hypoxia: Role of the HIF system. **Nature Medicine**, v. 9, n. 6, p. 677–684, 2003.
- QIAN, B.-Z.; POLLARD, J. W. Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. **Cell**, v. 141, n. 1, p. 39–51, abr. 2010.
- QUINTERO-FABIÁN, S. et al. Role of Matrix Metalloproteinases in Angiogenesis and Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 9, n. December, p. 1–21, 2019.
- RAVASCO, P. Nutritional approaches in cancer: Relevance of individualized counseling and supplementation. **Nutrition**, v. 31, n. 4, p. 603–604, 2015.
- RAWLA, P.; SUNKARA, T.; BARSOUK, A. Epidemiology of colorectal cancer: Incidence, mortality, survival, and risk factors. **Przeglad Gastroenterologiczny**, v. 14, n. 2, p. 89–103, 2019.
- RICCARDI, D. M. D. R. et al. Plasma Lipid Profile and Systemic Inflammation in Patients With Cancer Cachexia. **Frontiers in Nutrition**, v. 7, 2020.
- ROCHE, J. The epithelial-to-mesenchymal transition in cancer. **Cancers**, v. 10, n. 2, p. 10–13, 2018.
- RØSLAND, G. V et al. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) is associated with attenuation of succinate dehydrogenase (SDH) in breast cancer through reduced expression of SDHC. p. 1–18, 2019.
- RUSSELL, S. T.; TISDALE, M. J. Mechanism of attenuation of skeletal muscle

atrophy by zinc- α 2-glycoprotein. **Endocrinology**, v. 151, n. 10, p. 4696–4704, 2010.

SÁNCHEZ-CENIZO, L. et al. Up-regulation of the ATPase Inhibitory Factor 1 (IF1) of the mitochondrial H⁺-ATP synthase in human tumors mediates the metabolic shift of cancer cells to a warburg phenotype. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 33, p. 25308–25313, 2010.

SANDBERG, T. P. et al. Erratum: Molecular profiling of colorectal tumors stratified by the histological tumor-stroma ratio - Increased expression of galectin-1 in tumors with high stromal content (Oncotarget (2018) 9 (31502-31515) DOI: 10.18632/oncotarget.25845). **Oncotarget**, v. 10, n. 24, p. 2416, 2019.

SCHÖDEL, J.; RATCLIFFE, P. J. Mechanisms of hypoxia signalling: new implications for nephrology. 2019.

SEELAENDER, M. et al. Inflammation in Cachexia. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, 2015.

SEMENZA, G. L. HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations Find the latest version : Review series HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. **Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 9, p. 3664–3671, 2013.

SESTERHENN, A. et al. Stellenwert der Autopsie bei Patienten mit Kopf-Halstumoren. **Laryngo-Rhino-Otologie**, v. 91, n. 06, p. 375–380, jun. 2012.

SKIPWORTH, R. J. E. et al. Pathophysiology of cancer cachexia: Much more than host-tumour interaction? **Clinical Nutrition**, v. 26, n. 6, p. 667–676, 2007.

SMITH, K. L.; TISDALE, M. J. Increased protein degradation and decreased protein synthesis in skeletal muscle during cancer cachexia. v. 02, n. August 1992, p. 680–685, 1993.

SOMERVILLE, C.; KOORNNEEF, M. A fortunate choice: The history of Arabidopsis as a model plant. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, n. 11, p. 883–889, 2002.

STRASSMANN, G. et al. Evidence for the involvement of interleukin 6 in experimental cancer cachexia. **Journal of Clinical Investigation**, v. 89, n. 5, p. 1681–1684, 1992.

SUN, L. et al. Alpha-enolase promotes gastric cancer cell proliferation and metastasis via regulating AKT signaling pathway. **European Journal of Pharmacology**, v. 845, p. 8–15, 2019.

SUN, L.; QUAN, X. Q.; YU, S. An Epidemiological Survey of Cachexia in Advanced Cancer Patients and Analysis on Its Diagnostic and Treatment Status. **Nutrition and Cancer**, v. 67, n. 7, p. 1056–1062, 2015.

TAFANI, M. et al. The Interplay of Reactive Oxygen Species, Hypoxia, Inflammation, and Sirtuins in Cancer Initiation and Progression. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.

TANG, Y. A. et al. Hypoxic tumor microenvironment activates GLI2 via HIF-1 α and TGF- β 2 to promote chemoresistance in colorectal cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 26, p. E5990–E5999, 2018.

TAURIELLO, D. V. F. et al. TGF β drives immune evasion in genetically reconstituted colon cancer metastasis. **Nature**, v. 554, n. 7693, p. 538–543, 2018.

TAURIELLO, D. V. F.; BATLLE, E. Targeting the Microenvironment in Advanced Colorectal Cancer. **Trends in Cancer**, v. 2, n. 9, p. 495–504, 2016.

- THIERY, J. P. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, n. 6, p. 740–746, 2003.
- THIERY, J. P. et al. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. **Cell**, v. 139, n. 5, p. 871–890, 2009.
- TISDALE, M. J. Biology of cachexia. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 89, n. 23, p. 1763–1773, 1997.
- TISDALE, M. J. Mechanisms of cancer cachexia. **Physiological Reviews**, v. 89, n. 2, p. 381–410, 2009.
- TODOROV, P. et al. Characterization of a cancer cachectic factor. **Nature**, v. 379, n. 6567, p. 739–742, 1996.
- TOULLEC, A. et al. Oxidative stress promotes myofibroblast differentiation and tumour spreading. **EMBO Molecular Medicine**, v. 2, n. 6, p. 211–230, 2010.
- VAKIL, R. J.; GOLWALA, A. F. Diseases of the heart in childhood. **The Antiseptic**, v. 48, n. 8, p. 580–591, 1951.
- VANDER HEIDEN, M. G.; CANTLEY, L. C.; THOMPSON, C. B. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. **Science**, v. 324, n. 5930, p. 1029–1033, 22 maio 2009.
- VANHOUTTE, G. et al. Cachexia in cancer: what is in the definition? **BMJ Open Gastroenterology**, v. 3, n. 1, p. 1–11, 2016.
- VON HAEHLING, S.; ANKER, S. D. Prevalence, incidence and clinical impact of cachexia: facts and numbers—update 2014. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 5, n. 4, p. 261–263, 2014.
- VORONOV, E. et al. IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. 2002.
- W, S. I. et al. Metabolic Interplay between Tumour Cells and Cancer-Associated Fibroblasts (CAFs) under Hypoxia versus Normoxia. v. 25, n. 3, p. 7–16, 2018.
- WANG, M. et al. Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. **Journal of Cancer**, v. 8, n. 5, p. 761–773, 2017.
- WEINBERG, F.; RAMNATH, N.; NAGRATH, D. Reactive Oxygen Species in the Tumor Microenvironment: An Overview. **Cancers**, v. 11, n. 8, p. 1191, 16 ago. 2019.
- WYCKOFF, J. et al. A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. **Cancer Research**, v. 64, n. 19, p. 7022–7029, 2004.
- YAZDANI, S.; BANSAL, R.; PRAKASH, J. Drug targeting to myofibroblasts: Implications for fibrosis and cancer. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 121, p. 101–116, 2017.
- YOUNES, R. N.; NOGUCHI, Y. Pathophysiology of cancer cachexia. **Revista do Hospital das Clínicas**, v. 55, n. 5, p. 181–193, 2000.
- YOUNG-HEE, L. et al. Oxidative stress resistance through blocking Hsp60 translocation followed by SAPK/JNK inhibition in aged human diploid fibroblast. **Cell biochemistry and function**, v. 26, n. April 2007, p. 320–328, 2008.
- ZHANG, G. et al. Tumor induces muscle wasting in mice through releasing extracellular Hsp70 and Hsp90. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, 2017.
- ZHAO, Z. et al. Epithelial-mesenchymal transition in cancer : Role of the IL-8 / IL-8R axis (Review). n. 6, p. 4577–4584, 2017.
- ZODE, G. S. et al. Transforming growth factor- β 2 increases extracellular matrix proteins in optic nerve head cells via activation of the Smad signaling pathway. **Molecular vision**, v. 17, n. June, p. 1745–58, 2011.
- ZONNEVILLE, J. et al. TGF- β signaling promotes tumor vasculature by

enhancing the pericyte-endothelium association. **BMC Cancer**, v. 18, n. 1, p. 1–13, 2018.

ANEXOS

9. ANEXOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ESTUDO: Inflamação sistêmica em pacientes caquéticos com câncer: mecanismos e estratégias terapêuticas, uma abordagem da medicina translacional.

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 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 e mecanismos (o que está acontecendo no seu corpo) da caquexia (que causa fraqueza, cansaço, perda de peso, de músculo, de apetite e de qualidade de vida), uma possível consequência de muitas doenças crônicas. Nosso objetivo é encontrar as causas dessa doença e possíveis tratamentos.

II) Caso aceite participar da pesquisa, antes da sua internação no hospital, faremos algumas perguntas sobre a sua saúde e poderemos pedir para colher suas fezes (no horário em que você escolher evacuar), saliva e/ou urina. Durante a sua cirurgia, o cirurgião poderá retirar pequenos fragmentos (cerca de 1g, o equivalente ao tamanho de dois grãos de feijão) da gordura da sua barriga ou do seu pescoço (logo abaixo da pele) e de dentro dela (gordura que fica próxima aos órgãos), além de um pedaço um pouco menor (do tamanho aproximado de um grão de feijão) do músculo da sua barriga ou do seu pescoço a depender da localização do seu tumor, que será cortado durante a sua cirurgia (músculo reto abdominal, ou músculo pré-tireoidiano, ou músculo esternocleidomastoideo, ou músculo milo hioideo). Para os pacientes controle, casos de hérnia abdominal ou inguinal, será coletado apenas o tecido adiposo subcutâneo e muscular. Se na sua cirurgia for necessária a retirada de uma pequena porção de fígado (para a análise microscópica), será retirado também um fragmento pequeno (cerca de 0,2g ou dois grãos de arroz) para o estudo. Se a cirurgia envolver a retirada de uma porção de intestino, parte do material que seria descartado poderá ser utilizado para a pesquisa. Se possível, será retirado um fragmento do seu tecido doente na presença do médico patologista, sem prejuízos para o andamento do seu tratamento. **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 e, se você participar do estudo com exercício físico, o material também servirá para entender se o exercício melhora os sintomas da doença.

III) Mesmo que você concorde com a doação de todas as amostras, o cirurgião e a equipe médica poderão coletar apenas algumas delas ou mesmo, nenhuma, conforme a condução da cirurgia, para que não haja aumento de riscos ou qualquer prejuízo para você.

IV) De acordo com os resultados dos exames laboratoriais e clínicos prévios à cirurgia e após consentimento do médico, **você poderá ser convidado a participar do Protocolo de Exercício Físico, que terá duração de seis semanas.** Tais exames, como eletrocardiograma, hemograma e dosagens bioquímicas diversas não terão custos adicionais, pois, são exames já solicitados na rotina ambulatorial (**CLÁUSULA IX**). Se você concordar em participar no estudo que envolve exercício físico, pediremos para realizar coletas de **20 mL de sangue venoso do braço** (quantidade mostrada na seringa que o pesquisador está mostrando a você nesse momento), na primeira, terceira e sexta semana de treinamento, para que os parâmetros plasmáticos e séricos (substâncias no seu sangue) possam ser medidos (isso permite avaliar como você está reagindo ao exercício). A coleta será realizada por um profissional da saúde devidamente habilitado e ocorrerá durante a sessão de exercício, realizada no próprio hospital. Para aqueles que não participam do protocolo de exercício e com a cirurgia marcada para seis semanas após o contato com o pesquisador, serão realizadas três coletas de sangue (20ml) nas primeira, terceira e sexta semanas de acompanhamento. Para os pacientes em que a cirurgia está marcada para menos de seis semanas após o contato com o pesquisador, 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 hospital, em condições de assepsia, ou seja, higiene total. O seu sangue será analisado para verificarmos o grau de inflamação, que é uma medida utilizada pela equipe de saúde para entender as mudanças que ocorrem em seu organismo devido à doença e à associação desta inflamação com o que você sente. Se você também participar da pesquisa com exercício físico, avaliaremos se o protocolo causa melhora dos sintomas. A coleta de sangue pode causar algum desconforto e algumas vezes, aparecimento de hematoma (mancha roxa).

V) Para participantes no protocolo de exercício: Antes da realização do exercício, um médico do hospital deverá avaliar sua condição física (através de verificação de seus batimentos do coração ao caminhar), para garantir sua segurança na realização do protocolo. Esse teste poderá ser repetido no fim do protocolo de exercício, para avaliar seu grau de adaptação ao treinamento (o quanto o treinamento melhorou sua condição cardiorrespiratória – funcionamento do seu coração e do seu pulmão). Esses testes não causam dor e não têm risco associado (teste submáximo).

VI) Para participantes no protocolo de exercício: O protocolo de exercício será realizado 5 dias por semana, por até 6 semanas, nas dependências do hospital, na presença de profissionais de saúde. Você realizará a atividade física dentro de seus próprios limites de conforto e segurança, ou seja, o exercício é individual, conforme as condições de cada participante da pesquisa. Não há nenhuma meta de desempenho a ser atingida e você fará apenas o tempo de exercício que considerar confortável. O protocolo consiste em caminhar numa esteira (como as de academias de ginástica), sempre com a presença de um profissional de saúde ao seu lado. Os desconfortos que

podem ocorrer são aqueles de uma caminhada normal: calor, cansaço e produção de suor. Você pode desistir a qualquer momento, sem precisar fornecer qualquer explicação.

VII) Para participação do protocolo: o exercício será realizado na academia da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo (EEFE-USP) com duração de 6 semanas, frequência de duas vezes semanais e intervalo de descanso de, no mínimo, 48 horas entre as sessões. O treinamento será composto por exercícios para membros superiores (braços), tronco e membros inferiores (pernas). Haverá 2 progressão de intensidade de acordo com a capacidade física do paciente. Serão três fases de treinamento: Adaptação, Transição e Fase final. Os exercícios são:

a) Supino máquina: Adução horizontal da articulação glenoumeral (fechar os braços) combinada com extensão de cotovelos a partir da posição sentada na máquina com o banco ajustado para a altura do executante de modo que os pés estejam totalmente apoiados no chão e as mãos estejam no apoio da máquina, na altura do peitoral;

b) Remada aberta máquina: Abdução horizontal e extensão da articulação glenoumeral a partir da posição sentada com os pés apoiados no chão;

c) Agachamento Smith: Flexão e extensão das articulações de joelhos, quadris e tornozelos: os pés devem estar afastados à largura dos ombros com a barra apoiada sobre os ombros e não sobre o pescoço.

d) Stiff: Flexão de quadril com os joelhos semi estendidos e a coluna em posição neutra, os pés devem estar afastados à largura dos ombros e a barra deve ser segurada com as mãos em pronação (palmas das mãos viradas para dentro) ou em pegada mista com uma mão em pronação e a outra em supinação (palma da mão virada para fora).

() Aceito () Não aceito

VIII) Na avaliação biomecânica serão analisados parâmetros eletromiográficos (de ativação do músculo), dinâmicos e cinemáticos (filmagem) dos movimentos de sua capacidade física de marcha e de sentar e levantar e também o equilíbrio postural do paciente.

a) Avaliação dos movimentos cotidianos: sentar e levantar: Você será instruído (a) a levantar e sentar em uma cadeira sem apoio para os braços. No início do teste o voluntário deverá estar sentado com as costas sem apoio e os pés em contato com o solo, um em cada plataforma de força, o espaçamento dos pés será livre. Você deverá levantar permanecer em pé de modo estável por 1s e em seguida sentar-se, retornando à posição inicial. Serão realizadas cinco repetições do teste.

b) Avaliação da locomoção: você será instruído a caminharem em velocidade auto selecionada passando por 2 plataformas de força, com cada pé fazendo contato com uma das plataformas. Os voluntários deverão utilizar o espaço de 8m disponível para a execução do teste, permitindo assim que a velocidade média possa ser monitorada com o auxílio de um cronômetro. Serão realizadas 5 tentativas válidas.

c) () Aceito () Não aceito

IX) Você pode ser convidado a realizar outros exames pelo seu médico, dentro da conduta clínica regular, cujo resultado também poderá ser usado na pesquisa:

a) No exame de sua composição corporal, o pesquisador avaliará o quanto você tem de músculo, gordura e osso no corpo e como a doença, ou o exercício físico, modificam esse parâmetro; nesse exame, você permanece deitado numa cama e não terá contato com o aparelho, que também não oferece qualquer risco à sua saúde.

b) No exame de ressonância magnética cerebral, o pesquisador avaliará a morfologia (aspecto anatômico), funcionalidade (atividade) e constituição dos componentes do seu cérebro ou como o exercício físico modifica esses parâmetros (ou seja, se o seu cérebro mostra alguma alteração em consequência da doença e se o exercício – caso você esteja também fazendo esse protocolo- altera o que é afetado pela doença); Nesse exame você deverá colocar a cabeça dentro de um aparelho que emite som e por isso, pode causar algum desconforto pelo ruído, ou pela posição em que você se colocará. Esse exame não é perigoso e não causa qualquer mal à sua saúde.

No exame de tomografia computadorizada, o médico avaliará o tamanho da lesão, invasão e comprometimento de estruturas adjacentes (se apenas um ou mais órgãos estão afetados pela doença) e se há gordura dentro do seu músculo. O exame não causa desconfortos e não é necessário o uso de contraste ou modificação de protocolo médico em função da participação na pesquisa. Esse exame não causa dor ou prejuízo à sua saúde.

c) Para entender se os exercícios podem melhorar sua sensação de dor faremos uma avaliação com um equipamento chamado de QST que vai avaliar suas respostas após estímulo térmico (quente/frio) e mecânico (leve pressão).

X) As coletas realizadas de tecidos, tumor, sangue, fezes e os exames de composição corporal servirão para o entendimento e estudo da doença e poderão ajudar na busca de tratamentos. **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.

XI) Você não terá qualquer despesa financeira com relação aos procedimentos médicos, clínicos e terapêuticos efetuados no estudo.

XII) 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. Se participar da pesquisa com exercício, será oferecido vale transporte para todos os dias que vier fazer a atividade no hospital. Caso queira você receberá um pequeno lanche após o treino.

XIII) Você tem a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;

XIV) 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.

XV) 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.

XVI) Você aceita que seus tecidos e fezes sejam utilizados em estudos posteriores envolvendo os temas caquexia, inflamação, câncer e exercício, afim de, compreender os mecanismos envolvidos no surgimento e na avaliação dos efeitos do treinamento físico (quando houver) na síndrome caquexia associada ao câncer:

- () Aceito
- () Não aceito

XVII) O material coletado poderá ser armazenado em soluções específicas para cada técnica, em freezer -80o, para manter a integridade das amostras e posterior utilização, sempre dentro da mesma linha de pesquisa;

XVIII) 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.

Esse é um Projeto Temático, financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (processo n. 12/50079-0), que será desenvolvido no Instituto de Ciências Biomédicas - ICB/USP/São Paulo. numa colaboração que envolve os seguintes pesquisadores: Giorgio Trinchieri e Romina Goldzmid (National Institute of Health - NIH); José Argilés e Silvia Busquets (University of Barcelona); Alessandro Laviano e Maurizio Muscaritoli (University La Sapienza UniRoma); Gerhard Püschel e Tiziana Magaria (University of Potsdam); Stephen Farmer (Boston University); Marília Cerqueira Leite Seelaender, Alison Colquhoun e José Cezar Rosa Neto (ICB/ USP); Paulo Sérgio Alcântara, Linda Maximiniano, Oscar Fujita, Claudio Campi e Emerson Muller (HU/ USP); José Pinhata Otoch e Geraldo Busatto Filho (FMUSP); Emerson Franchini (EEFE/ USP); Renata Wassermann (IME/ USP); Claudia Oller do Nascimento e Lila Misaie Oyama (UNIFESP); e Miguel Batista Junior (UMC – Universidade de Mogi das Cruzes) e Dr. Marcos Fortes (HRBA – Hospital Regional do Baixo Amazonas).

A qualquer momento, você poderá entrar em contato com a Comitê de Ética em Experimentos com seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, ou o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário ou com o Comitê de Ética da Santa Casa de São Paulo, ou o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Câncer Dr. Arnaldo, 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.

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 adicional), você deverá entrar em contato, através do telefone fornecido ao final desse documento (Pronto-atendimento do Instituto de Câncer Dr. Arnaldo, pronto-atendimento do HU, ou ambulatório da Coloproctologia da Santa Casa).

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 ***“Inflamação sistêmica em participante da pesquisas caquéticos com câncer: mecanismos e estratégias terapêuticas, uma abordagem da medicina translacional”***.

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

5São Paulo-SP, _____ de _____ de 20__

Term	P-value	Genes
platelet aggregation (GO:0070527)	5,84E-06	CSRP1;FLNA;MYH9;ACTB
homotypic cell-cell adhesion (GO:0034109)	1,04E-05	CSRP1;FLNA;MYH9;ACTB
hydrogen peroxide catabolic process (GO:0042744)	1,58E-05	PRDX2;PRDX5;PRDX1
hydrogen peroxide metabolic process (GO:0042743)	4,88E-05	PRDX2;PRDX5;PRDX1
positive regulation of vesicle fusion (GO:0031340)	1,90E-04	ANXA1;ANXA2
muscle filament sliding (GO:0030049)	3,45E-04	TPM3;TPM2;TPM1
actin-myosin filament sliding (GO:0033275)	3,45E-04	TPM3;TPM2;TPM1
cellular response to oxidative stress (GO:0034599)	7,90E-04	PRDX2;PRDX5;PRDX1;TPM1
actin filament organization (GO:0007015)	9,26E-04	TPM3;TPM2;TPM1;FLNA
actin cytoskeleton reorganization (GO:0031532)	0,001386	ANXA1;MYH9;FLNA
muscle contraction (GO:0006936)	0,001512	TPM3;TPM2;TPM1;MYH11
regulation of cell migration (GO:0030334)	0,005629	ANXA1;TPM1;LMNA;FLNA;ACTN4
positive regulation of organelle organization (GO:0010638)	0,006278	ANXA1;ANXA2
retina homeostasis (GO:0001895)	0,008263	PRDX1;ACTB
regulation of ATPase activity (GO:0043462)	0,009126	TPM2;TPM1
regulation of substrate adhesion-dependent cell spreading (GO:1900024)	0,009572	FLNA;ACTN4
platelet degranulation (GO:0002576)	0,010166	ANXA5;FLNA;ACTN4
positive regulation of transport (GO:0051050)	0,010966	ANXA1;ANXA2
phagocytosis (GO:0006909)	0,012782	ANXA1;MYH9;PDIA6
positive regulation of cell-substrate adhesion (GO:0010811)	0,01509	AGR2;FLNA
negative regulation of programmed cell death (GO:0043069)	0,015799	PRDX2;PRDX5;ANXA1;ANXA5;FLNA
regulated exocytosis (GO:0045055)	0,016327	ANXA5;FLNA;ACTN4

IRE1-mediated unfolded protein response (GO:0036498)	0,017954	LMNA;PDIA6	
cell junction assembly (GO:0034329)	0,019159	FLNA;ACTB	
response to reactive oxygen species (GO:0000302)	0,019775	PRDX5;TPM1	
regulation of vesicle fusion (GO:0031338)	0,020398	ANXA1;ANXA2	
positive regulation of receptor binding (GO:1900122)	0,021409	ANXA2	
membrane raft assembly (GO:0001765)	0,021409	ANXA2	
alpha-beta T cell activation (GO:0046631)	0,021409	ANXA1	
regulation of cardiac muscle hypertrophy in response to stress (GO:1903242)	0,021409	LMNA	
protein retention in ER lumen (GO:0006621)	0,021409	PDIA3	
cellular response to decreased oxygen levels (GO:0036294)	0,022317	LMNA;PGK1	
positive regulation of cell adhesion (GO:0045785)	0,022317	TPM1;AGR2	
cellular response to reactive oxygen species (GO:0034614)	0,022972	PRDX5;TPM1	
regulation of atrial cardiac muscle cell membrane repolarization (GO:0060372)	0,024933	FLNA	
skeletal muscle myosin thick filament assembly (GO:0030241)	0,024933	MYH11	
bone cell development (GO:0098751)	0,024933	ANXA2	
elastic fiber assembly (GO:0048251)	0,024933	MYH11	
regulation of T-helper 1 cell differentiation (GO:0045625)	0,024933	ANXA1	
peroxisome proliferator activated receptor signaling pathway (GO:0035357)	0,024933	ACTN4	
vesicle transport along actin filament (GO:0030050)	0,024933	ACTN4	
regulation of low-density lipoprotein particle clearance (GO:0010988)	0,024933	ANXA2	
negative regulation of type 2 immune response (GO:0002829)	0,024933	ANXA1	
granulocyte migration (GO:0097530)	0,024933	ANXA1	
regulation of RNA biosynthetic process (GO:2001141)	0,024933	ACTN4	
retinoic acid receptor signaling pathway (GO:0048384)	0,024933	ACTN4	
negative regulation of interleukin-8 secretion (GO:2000483)	0,024933	ANXA1	
actomyosin structure organization (GO:0031032)	0,02707	TPM1;MYH9	
regulation of vascular associated smooth muscle cell migration (GO:1904752)	0,028444	TPM1	

positive regulation of cell aging (GO:0090343)	0,028444	LMNA	
negative regulation of T-helper cell differentiation (GO:0045623)	0,028444	ANXA1	
regulation of PERK-mediated unfolded protein response (GO:1903897)	0,028444	AGR2	
negative regulation of exocytosis (GO:0045920)	0,028444	ANXA1	
regulation of T-helper 2 cell differentiation (GO:0045628)	0,028444	ANXA1	
positive regulation of IRE1-mediated unfolded protein response (GO:1903896)	0,028444	AGR2	
negative regulation of apoptotic process (GO:0043066)	0,030505	PRDX2;PRDX5;ANXA1;ANXA5;FLNA	
maintenance of protein localization in endoplasmic reticulum (GO:0035437)	0,031943	PDIA3	
regulation of muscle system process (GO:0090257)	0,031943	TPM1	
removal of superoxide radicals (GO:0019430)	0,031943	PRDX2	
cytoskeletal anchoring at plasma membrane (GO:0007016)	0,031943	FLNB	
actin crosslink formation (GO:0051764)	0,031943	FLNA	
cellular response to superoxide (GO:0071451)	0,031943	PRDX2	
positive regulation of vacuole organization (GO:0044090)	0,03543	ANXA2	
positive regulation of receptor recycling (GO:0001921)	0,03543	ANXA2	
membrane raft organization (GO:0031579)	0,03543	ANXA2	
negative regulation of cellular protein catabolic process (GO:1903363)	0,03543	ANXA2	
adenylate cyclase-inhibiting dopamine receptor signaling pathway (GO:0007195)	0,03543	FLNA	
actin filament-based transport (GO:0099515)	0,03543	ACTN4	
mitotic nuclear envelope reassembly (GO:0007084)	0,03543	LMNA	
negative regulation of cardiac muscle hypertrophy (GO:0010614)	0,038904	LMNA	
mononuclear cell differentiation (GO:1903131)	0,038904	MYH9	
positive regulation of T-helper cell differentiation (GO:0045624)	0,038904	ANXA1	
monocyte differentiation (GO:0030224)	0,038904	MYH9	
positive regulation of sodium ion transmembrane transporter activity (GO:2000651)	0,038904	ACTN4	
regulation of integrin-mediated signaling pathway (GO:2001044)	0,038904	FLNA	
negative regulation of vascular smooth muscle cell proliferation (GO:1904706)	0,042366	TPM1	

regulation of hormone secretion (GO:0046883)	0,042366	ANXA1	
plasminogen activation (GO:0031639)	0,042366	PGK1	
cardiac muscle fiber development (GO:0048739)	0,042366	MYH11	
positive regulation of endoplasmic reticulum unfolded protein response (GO:1900103)	0,042366	AGR2	
positive regulation of T-helper 1 type immune response (GO:0002827)	0,042366	ANXA1	
skeletal myofibril assembly (GO:0014866)	0,042366	MYH11	
negative regulation of substrate adhesion-dependent cell spreading (GO:1900025)	0,042366	ACTN4	
regulation of IRE1-mediated unfolded protein response (GO:1903894)	0,042366	AGR2	
vesicle budding from membrane (GO:0006900)	0,042366	ANXA2	
striated muscle myosin thick filament assembly (GO:0071688)	0,045816	MYH11	
regulation of cell aging (GO:0090342)	0,045816	LMNA	
regulation of leukocyte migration (GO:0002685)	0,045816	ANXA1	
protein localization to nucleus (GO:0034504)	0,046913	PDIA3;LMNA	
epiboly involved in wound healing (GO:0090505)	0,049253	FLNA	
positive regulation of heart rate (GO:0010460)	0,049253	TPM1	
smooth muscle contraction (GO:0006939)	0,049253	MYH11	
negative regulation of smooth muscle cell migration (GO:0014912)	0,049253	TPM1	

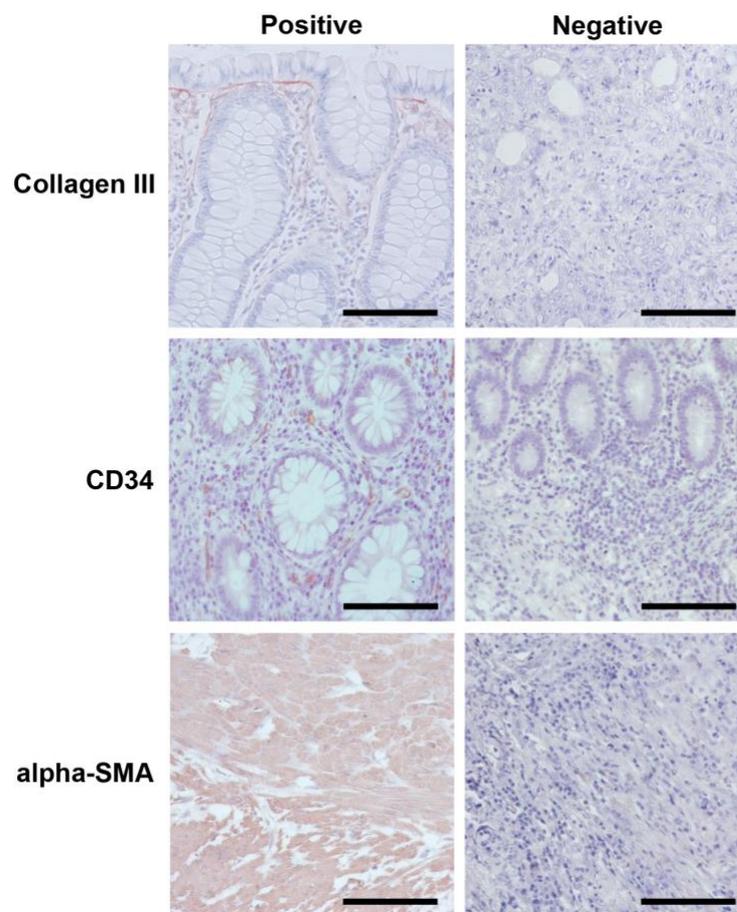


Figura suplementar 1. Controle positivo e negativo das reações de imunohistoquímica. Colágeno III – mucosa do cólon saudável (controle positivo) e câncer de cólon (controle negativo). CD34 - mucosa do cólon saudável (controle positivo) e câncer de cólon (controle negativo). Alfa-actina de músculo liso- tecido muscular (controle positivo) e câncer de colon (controle negativo).

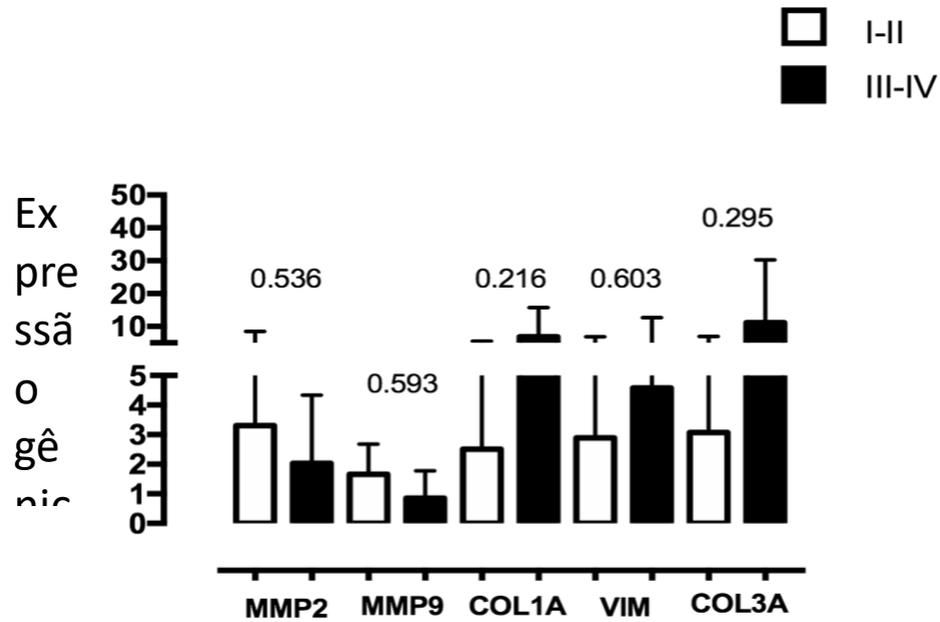


Figura suplementar 2. Expressão gênica dos fatores relacionados a matriz extracelular e o estadiamento tumoral.

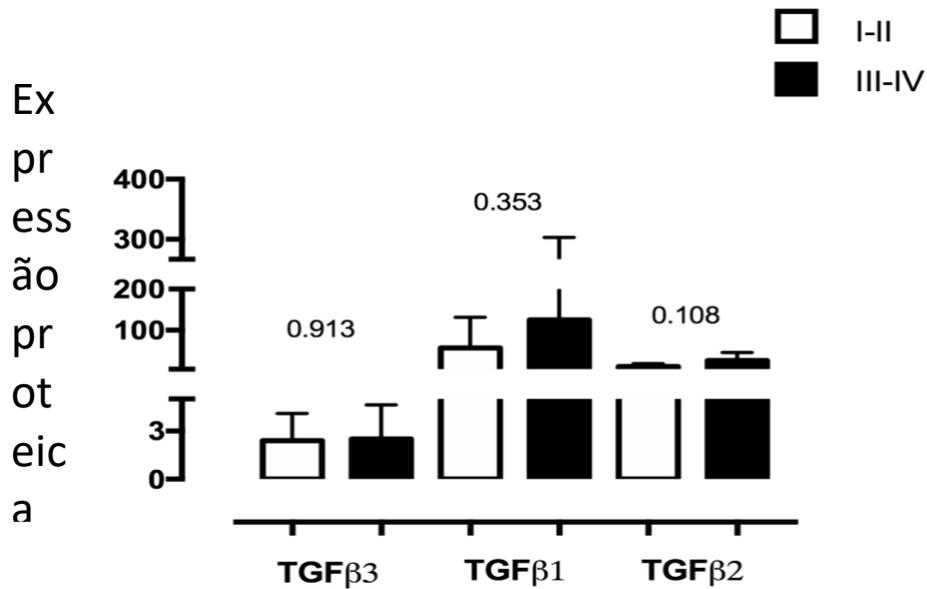


Figura suplementar 3. Expressão proteica de TGFbeta e o estadiamento tumoral.