

EFEITOS DA CAQUEXIA EM PRÉ-ADIPÓCITOS DE CAMUNDONGOS KNOCKOUT PARA TLR4 NO PERÍODO DA ADIPOGÊNESE *IN VITRO*

Magno Alves Lopes¹; Sidney Barnabé Peres²; Miguel Luiz Batista Jr³

Estudante do Curso de Biologia; e-mail; magnolopes22@hotmail.com¹
Professor da Universidade Estadual de Maringá; sbperes@gmail.com²
Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; miguelj@umc.br³

Área do Conhecimento: Fisiologia de Órgãos e Sistemas.

Palavras-chave: Adipogênese, Tecido Adiposo, Caquexia, TLR4

INTRODUÇÃO

O tecido adiposo é um órgão endócrino composto predominantemente por adipócitos. Para que o adipócito amadureça, o mesmo deve passar pelo processo denominado adipogênese, onde há a conversão de pré-adipócitos a em adipócitos maduros (SERTIÉ, 2010). O processo de diferenciação é altamente controlado pela ativação sequencial de fatores de transcrição adipogênicos, incluindo o receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomas (PPAR γ), a proteína 1c ligadora do elemento regulado por esteróis (SREBP-1c) e as proteínas ligantes ao amplificador CCAAT (CCAAT/*enhancer binding protein* C/EBPs) (FONSECA-ALANIS *et al.*, 2006; SERTIÉ, 2010). Usualmente, utiliza-se uma linhagem de preadipócitos (3T3-L1) para estudos *in vitro*. A linhagem 3T3-L1 possui várias características positivas para tais estudos, sendo uma linhagem homogênea e imortalizada (COSTA, 2010). Das síndromes que afetam o TA, uma que se destaca é a caquexia, atingindo cerca de 50 a 80% dos pacientes com câncer, diminuindo o tempo de vida dos mesmos. A caquexia associada ao câncer provoca uma perda progressiva de tecidos corporais, ela pode ser classificada em caquexia primária ou secundária. A caquexia primária o indivíduo sofre alterações metabólicas influenciadas pelo tumor associada por inflamações, essas alterações influenciam a perda da massa magra e gorda e de proteína visceral. Na caquexia secundária há uma obstrução no TGI pelo tumor dificultando a absorção de nutrientes e ressecções intestinais maciças levando o indivíduo a anorexia. A perda de massa corporal na caquexia esta associada à grande expressão de TNF- α nos organismos de indivíduos caquéticos, inibindo a adipogênese e induzindo o desdiferenciamento de adipócitos maduros levando a diminuição do tecido adiposo (ALVES *et al.* 2009). Os receptores *Toll-like* (TLRs) são um conjunto proteínas transmembranas pertencentes à imunidade inata, eles atuam como receptores que reconhecem patógenos e inicia uma resposta inflamatória quando os detecta, dentro dos principais componentes na família *Toll-like*, o TLR4 é um dos mais importantes e um dos mais expressos, por oferecer proteção contra bactérias gram-negativas, proteínas virais e ácidos lipoteicóico (*Staphylococcus aureus*). Estudos revelam que ácido-graxos podem se ligar ao TLR4 ativando uma cascata sinalizadora no período da adipogênese, sendo assim um dos receptores que podem induzir a diferenciação do pré-adipócito (QUEIROZ *et al.*, 2009; SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2011). No entanto a poucos estudos referente à essa ligação do receptor TLR4 com a adipogênese, necessitando assim de mais estudos nessa área.

OBJETIVO

Avaliar os efeitos do soro de camundongos caquéticos no padrão de diferenciação celular de pré-adipócitos em cultura primária provenientes de camundongos *knockout* para TLR4 e selvagens durante a adipogênese *in vitro*.

MÉTODOLOGIA

Células 3T3-L1 e pré-adipócitos provenientes de tecido adiposo mesentérico, controle e mutante (*knockout* para TLR4) foram plaqueadas a 1×10^4 em placas de cultura de 24 poços em triplicata ($n=3$) e cultivadas em DMEM suplementados com 10% Bovine Serum e 2% antibióticos, foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de gás carbônico (CO_2), para as células 3T3-L1 foi utilizado a incubação com 10% do soro de camundongos C57Bl/6 caquético, e as células de cultura primária foram incubados com a presença do tumor LLC (Lewis Lung Carcinoma) sob o método de co-cultura utilizando filtros *Transwell* com a porosidade de $3\mu\text{m}$. A diferenciação dos pré-adipócitos foi estimulada com meio DMEM suplementado com $1\mu\text{M}$ de dexametasona, $0,5\text{mM}$ de IBMX e $1,67\mu\text{M}$ de insulina suplementado com 10% de Fetal Bovine Serum (FBS). No entanto só foram registrados até o momento os dias 0 e 3 da adipogênese.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos pré-adipócitos de linhagem celular 3T3-L1 foram realizados os ensaios utilizando o soro do animal caquético, onde após 72 horas de incubação com o soro houve morte celular nas células tratadas, isso foi devido ao soro ter sido extraído do animal com a síndrome caquética bem estabelecida, já que essa síndrome atinge o organismo de modo sistêmico. O soro do animal caquético é constituído por diversas citocinas, onde que por causa da síndrome estavam alteradas, mudando assim o seu efeito nas células, citocinas como as IL-6, TNF- α , leptina, com as alterações dessas moléculas há uma redução no tecido adiposo. A diminuição de leptina auxilia a expressão de TNF- α , reduzindo os estoques de gordura e interferindo no ciclo celular (ALVES *et al*, 2009). Com as citocinas alteradas no soro, as células se tornaram inviáveis, e em uma concentração desse soro elevada pode desencadear morte celular, assim como pode ser visualizado na Figura 1.

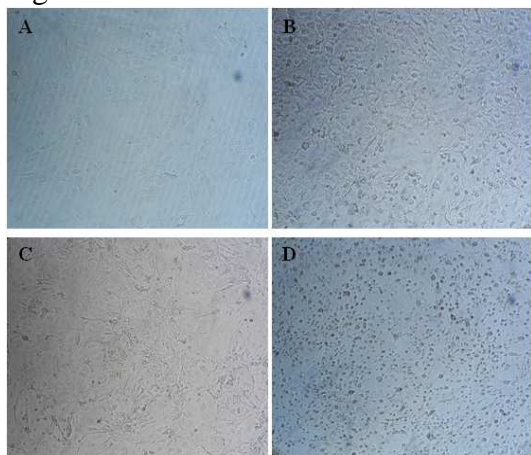


Figura 1: Cultura de pré-adipócitos da linhagem celular 3T3-L1: Pré-adipócitos controle no dia 0 de diferenciação (A); pré-adipócitos controle no dia 3 de diferenciação (B); pré-adipócitos incubados com 10% do soro de camundongos C57Bl/6 caquéticos, no dia 0 de diferenciação (C); pré-adipócitos incubados com 10% do soro de camundongos C57Bl/6 caquéticos, no dia 3 de diferenciação.

Nas culturas de células primárias proveniente do tecido adiposo mesentérico dos camundongos selvagens controle e com a presença da célula tumoral LLC, houve uma redução na proliferação de pré-adipócitos em todas as culturas no período de 3 dias após a indução da diferenciação, como mostra a Figura 2, essa redução da proliferação é possivelmente devido ao fato da célula tumoral ter a capacidade de disputar nutrientes com as outras células do hospedeiro, uma vez que as células tumorais possuem grande

capacidade de rápida multiplicação, Essa competição por nutrientes dificulta a assimilação de nutrientes para as demais células (Nunes et. al., 2007).

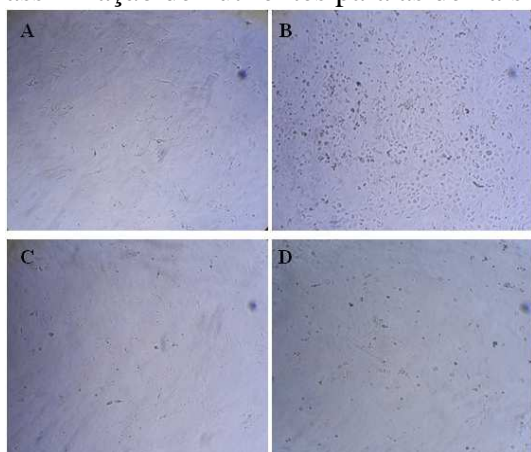


Figura 2: Cultura de pré-adipócitos provenientes de tecido adiposo mesentérico de camundongos C57Bl/6 selvagens nos respectivos dias de diferenciação: Pré-adipócitos controle no dia 0 de diferenciação (A); pré-adipócitos controle no dia 3 de diferenciação (B); pré-adipócitos na presença do tumor no dia 0 de diferenciação (C); pré-adipócitos na presença do tumor no dia 3 de diferenciação.

Além disso, a liberação de fatores tumorais induzem a caquexia, com o aparecimento de distúrbios no metabolismo de proteínas, carboidratos e intolerância a glicose. Além de induzir as células do hospedeiros a desencadear uma resposta inflamatória com liberação de citocinas, como por exemplo, a TNF- α , onde em excesso, pode inibir a adipogênese e crescimento celular (QUEIROZ *et al*, 2009). Tais resultados ainda são ineficientes para concluir que a resposta dos pré-adipócitos do tecido adiposo mesentérico tenha como destino a morte celular por influencia local *in vitro* da célula tumoral, no entanto esses resultados podem ajudar a concluir uma série de dados referentes ao comportamento das células do hospedeiro em contato com algum tipo de célula tumoral. Nas culturas de células referentes aos camundongos mutantes de TLR4 houve maior homogeneidade na viabilidade e crescimento celular, no entanto ainda pode ser visualizada uma pequena diminuição na proliferação celular, sendo que tanto as culturas controle como as culturas que estavam sob influencia do tumor cresceram similar comparando com os camundongos selvagens no 3º dia após a indução da adipogênese, porém ainda nota-se a diferença entre o mutante controle e o mutante pré-adipócito + tumor, como pode ser visualizado na Figura 3, a proteína TLR4 pode ter contribuído com a sutil proliferação celular, já que é uma das principais vias de sinalização de respostas inflamatórias, quando ativadas podem liberar citocinas, tais como TNF- α , IL-6 e IL-12 (KAWAI & AKIRA, 2006). Também há registros que o receptor TLR4 é um dos desencadeadores da adipogênese quando ele é ativado por ácidos graxos (QUEIROZ *et al*, 2009), portanto a ausência desse receptor nas células por ter contribuído para a pequena influencia do tumor nas células.

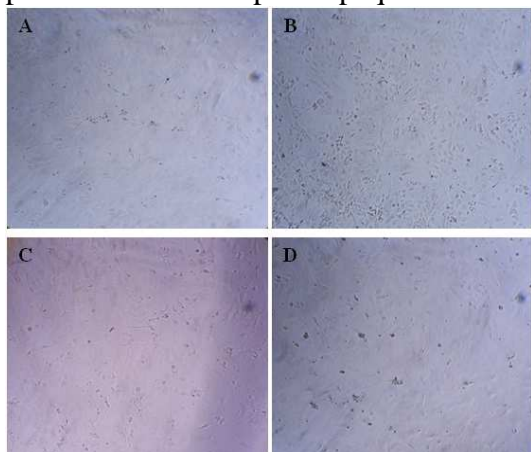


Figura 3: Cultura de pré-adipócitos provenientes de tecido adiposo mesentérico de camundongos C57Bl/6 mutantes (*knockout* para TLR4) nos respectivos dias de diferenciação: Pré-adipócitos controle no dia 0 de diferenciação (A); pré-adipócitos controle no dia 3 de diferenciação (B); pré-adipócitos na presença do tumor no dia 0 de diferenciação (C); pré-adipócitos na presença do tumor no dia 3 de diferenciação.

CONCLUSÕES

O presente estudo ainda está em fase de desenvolvimento, sendo que as principais conclusões que se pode ter são:

1. Houve morte celular nos pré-adipócitos 3T3-L1 incubados com 10% de soro de camundongo caquético no 3º dia de diferenciação celular.
2. Houve redução no crescimento celular dos pré-adipócitos de TAME em co-cultura com células da linhagem tumoral LLC, tanto os pré-adipócitos selvagens quanto mutantes houve redução no crescimento, porém as células mutantes obtiveram maior resistência ao tumor.

REFERÊNCIAS

ALVES, M. J; LIRA, F. S; YAMASHITA, A. S; COUTINHO, M. M; ROSA, J. C; SEELAENDER, M. CAPERUTO, E. C. Versatilidade do Tecido Adiposo na Obesidade e na Caquexia Associada ao Câncer: Possível Papel do Exercício Físico Aeróbio. **Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte**, 8 (1): 147-458, 2009.

COSTA, A. G. V. Regulação da adipogênese e da secreção de quemerina por ácidos graxos de cadeia média e pelo ácido graxo eicosapentaenóico em células 3T3-L1. **Universidade Federal de Viçosa, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2010.

FONSECA-ALANIS, M. H.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M. I. C.; LIMA, F. B. O Tecido Adiposo Como Centro Regulador do Metabolismo. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabolismo**, v. 50, n. 2, 2006.

KAWAI, T; AKIRA, S. TLR Signaling. **Cell Death and Differentiation**, 13, 816–825, 2006.

NUNES, E. A; NAVARRO, F; BACURAU, R. F. P; PONTES JR, F. L; FERNANDES, L, C. Mecanismos potenciais pelos quais o treinamento de força pode afetar a caquexia em pacientes com câncer. **Revista Brasileira de Prescrição e Fisiologia do Exercício**, São Paulo, v.1, n.1, p.1-17, jan./fev. 2007.

QUEIROZ, J. C. F; ALONSO-VALE, M. I. C; CURI, R; LIMA, F. B. Controle da Adipogênese por Ácidos-Graxos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, vol.53, no.5, 2009.

SANTOS, P. P; OLIVEIRA, D. A; SERRÃO, J. E. Proteínas do veneno de *Pachycondyla verenae* (Forel, 1922) (Formicida: Ponerinae). Universidade Federal de Viçosa, **Programa de Pós-Graduação em Entomologia**. 2012.

SERTIÉ, R. A. L. Repercussões do destreinamento físico sobre o metabolismo e a celularidade do tecido adiposo branco periepididimal de ratos. Universidade de São Paulo, **Instituto de Ciências Biomédicas**, 2010.

SIQUEIRA-BATISTA, R; GOMES, P; CALIXTO-LIMA, L; VITORINO, R. R; PEREZ, M. C. A; MENDONÇA, E. G; OLIVEIRA, M. G. A; GELLER, M. Sepse: Atualidades e Perspectivas. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**. 23 (2): 207-216, 2011.