

EXPRESSÃO E REGULAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MCP-1 E SUA RELAÇÃO COM MACRÓFAGOS INFILTRADOS EM TECIDO ADIPOSEO DE RATOS COM TUMOR WALKER 256

Natália Fazenda de Carvalho Joaquim¹; Miguel Luiz Batista Júnior²; Cláudio Saburo Shida³

Estudante do Curso de Biomedicina; e-mail: natycarvalho@msn.com¹

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: migueljr@usp.br²

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: shida@umc.br³

Área do Conhecimento: Fisiologia de órgãos e sistemas

Palavras-chaves: caquexia; tecido adiposo ; MCP-1

INTRODUÇÃO

A caquexia é uma síndrome complexa de etiologia desconhecida, atualmente conhecida como síndrome inflamatória crônica. Os macrófagos infiltrados em ratos caquéticos podem, em parte, favorecer um quadro inflamatório, conforme observado na obesidade, contribuindo para os distúrbios metabólicos, agravamento da caquexia e depleção dos depósitos de gordura. O mecanismo sugerido para migração de monócitos para o tecido adiposo, em estado de inflamação crônica sistêmica, é a proteína quimioatratante para monócitos 1 (MCP-1) que promove a atração de monócitos, linfócitos T e células NK para o sítio de inflamação, atuando na ativação do monócito, por meio do receptor CCR2, e em sua transmigração através do endotélio capilar (Biswas & Sodhi, 2002; Ashida *et al.*, 2001). Camundongos que super expressam MCP-1 apresentam um grande número de macrófagos infiltrados no tecido adiposo branco (TAB) (Kamei *et al.*, 2006).

OBJETIVOS

Avaliar a expressão gênica de MCP-1 no tecido adiposo branco durante o desenvolvimento do quadro de caquexia induzido pelo tumor de Walker 256. Acompanhar a ingestão alimentar e a perda de massa corpórea nos grupos controle e tumor.

METODOLOGIA

Após a abertura de um grupo contendo treze animais, o controle de peso e a ingestão alimentar foram avaliados preferencialmente todos os dias na vigência do tumor e nos mesmos horários. Estes animais foram divididos em grupo tumor, constituído de nove animais com células tumorais inoculadas subcutaneamente no flanco direito e o grupo controle, constituído de quatro animais sem tumor. Foi acompanhado o desenvolvimento do tumor por quatorze dias, sendo que, os animais foram divididos e sacrificados no sétimo dia e décimo quarto dia após inoculação das células tumorais. Os animais foram sacrificados por decapitação sem anestesia. Os tecidos adiposos epididimal (TAE) e retroperitoneal (TARP) e mesentérico (TAME) foram coletados e para posterior análise da expressão gênica. Foram coletados também o sangue com EDTA, que foi centrifugado a 400g por 15 minutos a 4°C e este foi armazenado a -80°C para posterior análise bioquímica. As amostras utilizadas para avaliação da expressão gênica de MCP-1 foram coletadas na Universidade de São Paulo (USP), Departamento

de Ciências Biomédicas II, no laboratório de lípidos da Prof^a. DR^a Marília Cerqueira Seelaender. A análise da expressão gênica foi realizada através da reação em cadeia da polimerase em tempo real. A extração de RNA total foi isolada das amostras de tecido adiposo usando reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA), seguindo as recomendações do fabricante. O RNA total extraído do tecido adiposo e de macrófagos dos diferentes grupos experimentais foram colocados em presença de Deoxiribonuclease I, DNase altamente purificada, para a remoção do DNA genômico. Após ter o RNA foi realizado a reação de transcrição reversa onde foi utilizado 1 µg de RNA total contendo Oligo dt (500 µg/mL), 10 mM de cada dNTP, 5x First-Strand Buffer, DTT e 200 U de transcriptase reversa (SuperScript II-Invitrogen). A transcrição reversa foi efetuada a 70°C por 10 minutos, adicionando a transcriptase reversa, continuou o ciclo à 42°C por 60 minutos e 95°C por 10 minutos. A reação ocorreu em condições de ciclagem pré-determinadas, sendo duas etapas de 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos, a amplificação ocorreu em 40 ciclos: a desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento a 63° por 60 segundos, com extensão a 72°C por 2 minutos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os animais do grupo tumor apresentaram uma discreta perda de peso em relação ao controle a partir do décimo dia após inoculação das células tumorais. Esta discreta perda de peso pode estar relacionada com ao peso do tumor, que não foi mensurado separadamente da massa corpórea do animal. A caquexia se caracteriza por estado debilitante, com perda de peso, desencadeada por perturbações metabólicas no indivíduo portador de tumor. Esta promove anorexia, astenia, perda de peso, saciedade prematura, anemia e alterações no metabolismo dos carboidratos, gorduras e proteínas (Tisdale, 2005). A ingestão alimentar de ração pelo grupo tumor diminuiu com a evolução do tumor quando comparado com o grupo controle. A anorexia frequentemente acompanha a caquexia e tem papel de destaque na perda de peso corporal do paciente. Na anorexia, o decréscimo na ingestão alimentar é normalmente associado com diminuição do dispêndio energético, enquanto que na caquexia o gasto de energia é aumentado. No entanto, a anorexia *per se* não explica as alterações decorrentes da caquexia. Contudo, a perda de peso e o hipermetabolismo promovido pelo tumor não são compensados por incremento espontâneo de alimento, sugerindo distúrbio nos controles hormonais (Tisdale 2005). A expressão gênica de MCP-1 no TAE e TARP, na Figura 1, mostra que a expressão gênica de MCP-1 aumenta conforme o desenvolvimento do tumor. Nota-se que a expressão no TAE e TARP é maior no décimo quarto dia após inoculação do tumor. O aumento da expressão gênica de MCP-1 corrobora com outros estudos do nosso grupo que caracterizaram o aumento de macrófagos infiltrados e conseqüentemente a instalação de um quadro inflamatório no tecido adiposo, sugerindo que a MCP-1 pode ter importante papel nesse processo.

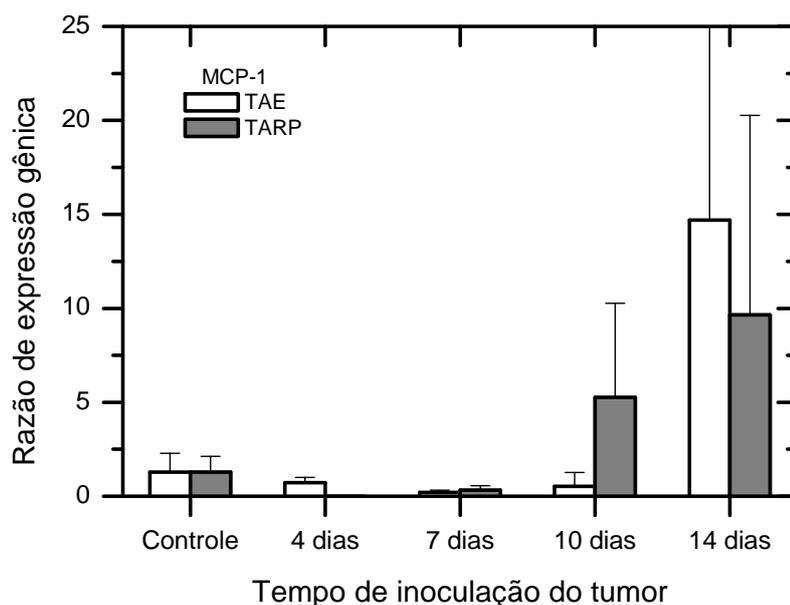


Figura 1. Razão da expressão gênica de MCP-1 no TARP e TAE no grupo tumor em relação ao grupo controle no decorrer de quatorze dias após inoculação das células tumorais.

Nossos resultados corroboram com o de Kanda *et al.* (2006), que verificou o aumento na expressão gênica de MCP-1 em ratos obesos e, além disso, observou que ela contribui para a infiltração de macrófagos no tecido adiposo, resistência a insulina e esteatose hepática. Porém, na obesidade há aumento do TAB enquanto que na caquexia há redução. Neste contexto, o aumento da expressão gênica de MCP-1 pode sugerir um quadro inflamatório, tanto na caquexia induzida pelo câncer como em um estado de obesidade, mostrando que a expressão gênica de MCP-1 pode funcionar como um indicador de um quadro inflamatório crônico no TAB.

CONCLUSÕES

Observamos que, em relação ao controle, os animais pertencentes ao grupo tumor apresentaram uma discreta perda de peso juntamente com perda de apetite na evolução do tumor e a expressão gênica de MCP-1 no TAE e TARP aumenta, sendo que sua maior expressão encontra-se no décimo quarto dia sugerindo um quadro inflamatório. A expressão de MCP-1 pode ser utilizada como um indicador de um quadro inflamatório crônico no TAB. Os resultados sugerem a necessidade de mais estudos, enfocando outros indicadores de um quadro inflamatório crônico no tecido adiposo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ashida, N.; Arai, H.; Yamasaki, M.; Kita, T., Distinct Signaling Pathways for MCP-1-dependent Integrin Activation and Chemotaxis, *J. Biol. Chem.* 276(19): 16555-16560, 2001.

Biwas, S. K.; Sodhi, A. In Vitro Activation of Murine Peritoneal Macrophages by Monocyte Chemoattractant Protein-1: Upregulation of CD11b, Production of Proinflammatory Cytokines, and the Signal Transduction Pathway *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 22: 527-538, 2002.

Kanda, H.; Tateya, S.; Tamori, Y.; Kotani, K.; Hiasa, K.; Kitazawa, R.; Kitazawa, S.; Miyachi, H.; Maeda, S.; Egashira, K.; Kasuga, M.; MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance and hepatic steatosis in obesity. *The Journal of Clinical Investigation*, 116, 1494 -1509, 2006.

Kamei, N.; Tobe, K.; Suzuki, R.; Ohsugi, M.; Watanabe, T. et al. Overexpression of Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Adipose Tissues Causes Macrophage Recruitment and Insulin Resistance. *J. Biol. Chem.* 281(36): 26602-26614, 2006.

Tisdale, M. J. Molecular Pathways Leading to Cancer Cachexia. *Physiology* v. 20, p. 340-348, 2005.