

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

Felipe Dos Santos Henriques¹; Miguel Luiz Batista Jr²; Claudio S. Shida³

Estudante do Curso de Biomedicina; Felipehenriques12@hotmail.com¹

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; migueljr@usp.br²

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; csshida@gmail.com³

Área do Conhecimento: Fisiologia de órgãos e sistemas

Palavras-chave: Caquexia; Tecido Adiposo; Macrófagos; MCP-1.

INTRODUÇÃO

A caquexia é uma síndrome complexa de etiologia desconhecida, atualmente conhecida como síndrome inflamatória crônica, caracterizada pela diminuição do peso corporal (sintoma clínico marcante), depleção dos estoques de gordura, diminuição da massa muscular, anorexia, astenia e distúrbios metabólicos. (BRUERA & SWEENEY, 2000). Os MØs infiltrados em ratos caquéticos podem, em parte, favorecer um *milieu* 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 quimiocina proteína quimioatratante para monócitos 1 (MCP-1) (TAKAHASHI *et al.*, 2003). Durante o processo inflamatório a MCP-1 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).

OBJETIVOS

Avaliar a expressão gênica da MCP-1 nas células adiposas isoladas dos diferentes depósitos do tecido adiposo branco (TAB, TAME, TAE, TARP e TASC) durante o desenvolvimento do quadro de caquexia induzido pelo tumor de Walker 256.

METODOLOGIA

Implante tumoral, sacrifício dos animais e coleta dos tecidos. As células do tumor de Walker 256 foram injetadas subcutaneamente no flanco direito dos ratos (2×10^7 células, em 1 mL de solução salina 0,9 %) (SEELAENDER *et al.*, 1996). Os animais foram sacrificados por decaptação sem anestesia. Após o sacrifício os tecidos foram dissecados cuidadosamente, pesados e armazenados para posterior análise da expressão gênica. A massa corporal e o consumo de ração foram aferidos diariamente, ao longo dos 14 dias do período experimental em balança de precisão (OHAUS[®] USA). Isolamento dos Adipócitos. O isolamento dos adipócitos foi realizado de acordo com o método adaptado descrito por Rodbell (1964). Os depósitos de TAB foram fragmentados com tesoura fina em tampão até formar um homogeneizado do tecido, a seguir, o tecido adiposo será colocado em tampão ELB (contendo também collagenase tipo II e soro fetal bovino 20%), sendo incubado em banho-maria por 60 minutos, com agitação a 37°C. Os adipócitos (camada superior) serão colocados num outro recipiente e o sobrenadante será descartado. Reação de transcrição reversa (RT). Será utilizado 1µg de RNA total na reação 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 é efetuada a 70°C por 10 minutos, adicionada a transcriptase reversa, continua o ciclo à 42°C por 60 minutos e 95°C por 10 minutos. A reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) é uma técnica usada para estimar os valores do nível de RNA mensageiro nos genes testados, comparando as amostras e o controle interno (18S ribossomal RNA – rRNA) em duplicatas, baseado na detecção em tempo real de produtos do PCR mensurados por fluorescência, quantificado com o detector de sequência ABI Prism 5700 (Applied Biosystems) baseado na metodologia previamente descrita (BUSTIN, 2000). *Análise estatística*. Foi utilizado como análise estatística o teste t sendo o valor adotado para significância de 5% ($p < 0,05$)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Acompanhamentos de ingestão de ração e peso dos ratos com tumor e controle.

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, 2003). Sabendo que a redução da massa corpórea é considerada o principal marcador clínico para o diagnóstico da caquexia, observou-se que durante o desenvolvimento da caquexia os ratos que foram inoculados com as células tumorais continuaram ganhando massa corporal, no entanto, quando comparado os grupos do 14º dia após a inoculação das células tumorais com o grupo controle (mesma idade), ficou evidente que a ganho da massa corporal foi menor. Através do acompanhamento de peso dos ratos tumor e controle conseguimos notar uma diferença na redução de massa dos ratos já a partir do 10º dia após inoculação do tumor comparando com o grupo controle (Figura 1).

	Controle (g)	Tumor 4 dias (g)	Tumor 7 dias (g)	Controle Tumor 14 dias (g)	Controle
MC-Tumor	220,8±18,4	232,7±9,6	247,8±17,8	264,4±21,4	255,1±21,4*
Massa do Tumor		0,38±0,11	4,4±2,53		12,05±6,43

Figura 1: Acompanhamento da ingestão de ração dos ratos tumor e controle nos dias 0, 4, 7 e 14. Para análise estatística foi utilizado o teste *test t*: * $p < 0,05$ em relação ao controle de mesma idade. MC - Tumor: Massa corpórea do tumor.

No acompanhamento da ingestão de ração foi observado que o consumo de ração nos ratos controle (sem a presença do tumor) apresenta uma maior ingestão de ração comparado com os ratos com o tumor de Walker 256 (Figura 2). Essa diferença ocorre, pois estudos mostram que a utilização do tumor Walker 256 é capaz de induzir a anorexia, com isso faz com que o estado de caquexia se agrave ainda mais (GUAITANI *et al.* 1982).

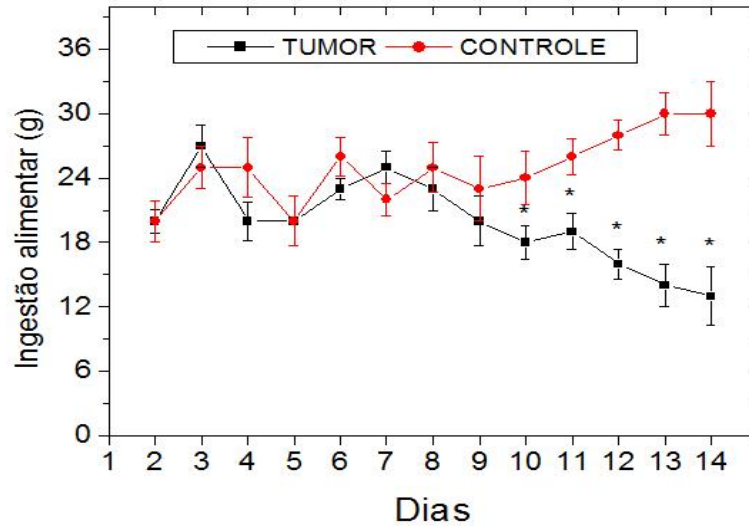


Figura 2: Acompanhamento da ingestão de ração dos ratos tumor e controle durante 14 dias.

Expressão gênica da MCP-1

Foi analisado a expressão de mRNA de células isoladas (adipócitos) da MCP-1 (alvo), utilizando o gene do 18S como controle interno, para os diferentes depósitos de TAB, TAME, TAE, TARP e TASC (Figura 3). Cada tecido foi avaliado em diferentes períodos do desenvolvimento da caquexia, ou seja, controle, 7 e 14 dias após a inoculação das células tumorais. A Figura 3 mostra que, há um decréscimo na expressão gênica da MCP-1 a partir do dia 7 no TAME e TAE e no dia 14 no TAE, e o TAME do dia 14 volta a se apresentar como controle. Interessante ressaltar que resultados da expressão gênica da MCP-1 de mRNA extraídos de tecidos, não de adipócitos isolados, de trabalhos anteriores do grupo, mostram que essa adipocina é consideravelmente expressa apenas no 14º dia (TAE e TARP) após a inoculação do tumor, só que agora observamos que quando realizado a expressão de adipócitos isoladas desses tecidos o mesmo não ocorre.

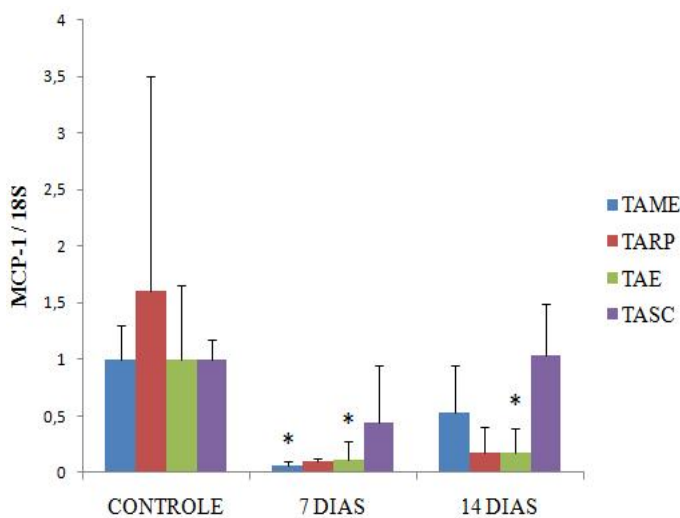


Figura 3: Razão da expressão gênica da MCP-1 em relação ao 18S. Os resultados estão representados em média (n=5) ± erro padrão da média, nos diferentes períodos experimentais (controle, 7º e 14º dias após a inoculação das células tumorais) e diferentes depósitos TAME, tecido adiposo mesentérico, TAE, tecido adiposo epididimal, TARP, tecido adiposo retroperitoneal e TASC tecido adiposo subcutâneo. Para análise estatística foi utilizado t: * p<0,01 em relação ao controle.

CONCLUSÃO

Foi observado um decréscimo na expressão do gene MCP-1 para células isoladas no dia 7 e 14 nos tecidos TAME e TAE. Estudos do grupo com tecido inteiro mostraram que há um aumento expressão da MCP-1 no dia 14, sugerindo, então, que o aumento da expressão da MCP-1 pode ser a fração vascular do estroma (FVE), fração na qual estão localizados os diferentes tipos de células que estão infiltradas no tecido adiposo como, por exemplo, os macrófagos, células endoteliais, células tronco e fibroblastos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASHIDA, N.; ARAI, H.; YAMASAKI, M.; KITA, T. J. *Biology Chemical.*, 276(19): 16555-16560. 2001.

BIWAS, S. K.; SODHI, A. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 22: 527-538. 2002.

BRUERA, E.; SWEENEY, C. *Lancet Oncology*, 1: 138-147. 2000.

GUAITANI, A.; RECCHIA, M.; ROCCHETTI, M.; BARTOSEK, I.; GARATTINI, S. Walker carcinoma 256: a model for studies on tumor induced anorexia and cachexia. *Oncology*, 39, 173–8. 1982.

RODBELL, M. *Journal Biology Chemical*, 239:375-380. 1964.

SEELAENDER, M. C. L.; CURI, R. *Molecular Biology Internships.*, 39: 1037-1047. 1996.

TAKAHASHI, K.; MIZUARAI, S.; ARAKI, H.; MASHIKO, S.; ISHIHARA, A.; *Journal Biology Chemical.*, 78(47): 46654-46660. 2003.

TISDALE, M. J. *The Journal of Supportive Oncology*, 3(1): 159-168, 2003.

AGRADECIMENTOS

Agradeço CNPq e FAPESP pelo auxílio financeiro e, também, Rodrigo Xavier Das Neves pela ajuda na parte experimental.