

PPAR- γ E ADIPOGÊNESE DE TECIDO ADIPOSEO BRANCO DE RATOS INOCULADOS COM TUMOR DE WALKER 256

Renato dos Santos Henriques¹, Cláudio S. Shida², Miguel Luiz Batista Júnior³

Estudante do Curso de biomedicina; e-mail: Renato-henriques@hotmail.com¹

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: csshida@gmail.com²

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: migueljr@usp.com³

Área do Conhecimento: Fisiologia de órgãos e sistemas

Palavras-chave: Caquexia, Adipogênese, PPAR γ

INTRODUÇÃO

A caquexia é uma síndrome cujo sintoma mais notável é a acentuada e rápida perda de peso corporal acompanhado de uma depleção da massa muscular esquelética e do tecido adiposo branco (TAB). Afeta cerca da metade de todos os pacientes de câncer e está presente na grande maioria dos pacientes com câncer avançado (Argilés *et al.*, 1997; Fearon & Moses, 2002). Possui característica multifacetada e etiologia extremamente complexa, diretamente relacionada à redução da sobrevivência e à prognose adversa (revisão de Barber *et al.*, 1999). Embora bastante estudada ainda não há terapia conhecida que a reverta. A maturação do adipócito é acompanhada pelo acúmulo intracelular de lipídio, processo mediado principalmente pela proteína 1C ligadora ao elemento regulado por esteróis (SREBP-1C, do inglês, *sterol regulatory element binding protein-1C*) que, além de ativar a expressão gênica de PPAR γ -2, ativa a via lipogênica através da expressão dos genes que codificam suas principais enzimas, tais como; acetil-CoA carboxilase (ACC), ácido graxo sintase (FAS), esteroil CoA desaturase-1 (SCD-1) e glicerol-3-fosfato acetiltransferase (GPAT). No entanto, pouco se sabe a respeito dos possíveis efeitos do quadro de caquexia associada ao câncer no processo de diferenciação fenotípica do pré-adipócito para adipócito no tecido adiposo. Adicionalmente, PPAR γ -2 modula uma série de genes relacionados não só ao metabolismo, mas também aos eventos que culminam na adipogênese. Por outro lado, apesar deste destacado papel, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares envolvidos nestas alterações, notadamente em adipócitos de animais caquéticos e como estas alterações ocorrem ao longo do desenvolvimento deste quadro em animais portadores do tumor de Walker 256.

OBJETIVOS

Objetivos gerais

Avaliar a expressão gênica e protéica dos fatores de transcrição PPAR- γ 2, RXR em adipócitos isolados em ratos inoculados subcutaneamente com tumor de Walker 256. Para isso, avaliaremos o papel de citocinas pró-inflamatórias, notadamente o TNF- α e sua influência na expressão de genes relacionados à diferenciação e metabolismo em adipócitos durante o estabelecimento do quadro de caquexia associada ao câncer.

METODOLOGIA

Foram estudados ratos machos da linhagem Wistar com 8 semanas de vida (250-300g), obtidos no biotério da Universidade de Mogi das Cruzes. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas individuais, a uma temperatura média de $24 \pm 1^\circ \text{C}$, com ciclos de claro/escuro a cada 12 horas de modo controlado. Os animais foram divididos em dois grupos experimentais: (1) controle e (2) tumor, sendo o último subdividido em 7 e 14 dia após a inoculação das células tumorais. 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 decapitação sem anestesia. Após o sacrifício os tecidos foram dissecados cuidadosamente e pesados. 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). A análise de expressão protéica foi por western blotting das proteínas da aP2, LPL, C/EBP α , PPAR γ -2, RXR- α , e será conduzida como em Kazantzis & Seelaender (2005). E a expressão gênica começou pela extração de RNA total. O RNA total será isolado das amostras usando reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA), seguindo recomendações do fabricante. O RNA isolado será armazenado a -70°C para posterior análise por RT-PCR. A transcrição reversa é efetuada a 70°C por 10 minutos, adicionada a transcriptase reversa, continua o ciclo a 42°C por 60 minutos e 95°C por 10 minutos. Feito esse procedimento a expressão foi lida por RT-PCR, quantificado com o detector de sequência ABI Prism 5700 (Applied Biosystems) baseado na metodologia previamente descrita (Bustin, 2000). E a análise estatística utilizada foi a análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey. O valor adotado para significância será de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nossas aferições das massas de ração ingerida pelos ratos mostraram que os ratos a partir do dia 10 diminuíram significativamente a ingestão da ração, conforme a figura 1. Isso significa que tumor induziu a anorexia.

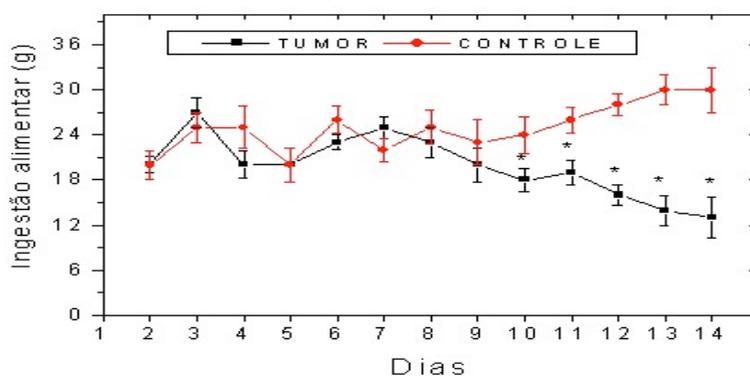


Figura 1: Ingestão diária média de ração por dos ratos controle e com tumor inoculado. Para análise estatística foi utilizado *Anova* seguido pelo pós teste *Tukey*: * $p < 0,05$. Barra de erro: desvio padrão.

O PPAR γ desempenha um papel importante no tecido adiposo branco, tratando-se do armazenamento de lipídios e na diferenciação dos adipócitos, atuando como um potente estimulante da cascata de diferenciação celular do adipócito (Tachibana *et. al.*, 2008). Além disso, ele também possui grande importância no processo de inflamação e no metabolismo da glicose (Lehrke & Lazar, 2005). A expressão gênica de PPAR- γ nos tecidos TARP, TAE

e TAME sofreram uma diminuição, quando comparados ao grupo controle, com algumas variações durante o período que compreende o quarto e o décimo quarto dia após a inoculação do tumor como mostra a figura 2A. Na figura 2B, a expressão protéica do PPAR- γ também mostrou uma diminuição na expressão dessa proteína nos dias 7 e 14. Nossos resultados sugerem que a diminuição da expressão de PPAR γ pode afetar alterações diretas na adipogênese, processo no qual o gene é de capital importância.

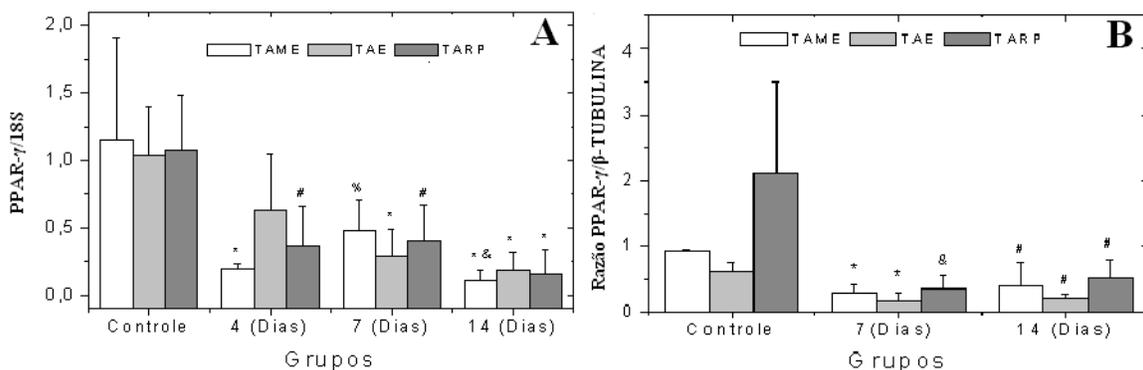


Figura 2: Razão da expressão gênica do PPAR γ em relação ao 18S (A) e da proteína PPAR γ 2 em relação ao β -Tubulina (B). Para análise estatística foi utilizado *Anova* seguido pelo pós teste *Tukey*: * $p < 0,05$ em relação ao controle; # $p < 0,01$ em relação ao controle; % $p < 0,05$ em relação ao quarto dia; & $p < 0,05$ em relação ao sétimo dia. Barra de erro desvio padrão.

Observamos na figura 3A e 3B que nos tecidos TAE e TARP, houve uma diminuição na expressão gênica de CEBP α e SREBP 1c em todos os dias. Enquanto que no tecido TAME ficou inalterado, como mostra a figura 3A e 3B.

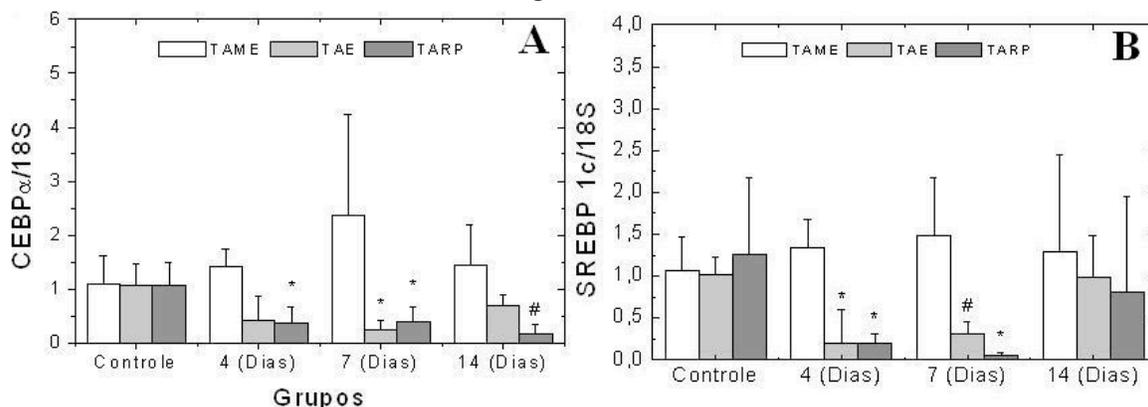


Figura 3: – Razão da expressão gênica do CEBP α em relação ao 18S(A). **Figura 3:** Razão da expressão gênica do SREBP 1c em relação ao 18S.(B). Para análise estatística foi utilizado *Anova* seguido pelo pós teste *Tukey*: * $p < 0,05$ em relação ao controle; # $p < 0,01$ em relação ao controle. Barra de erro: desvio padrão

CONCLUSÕES

Observamos que a expressão do PPAR γ , tanto protéica como gênica, diminuiu com a evolução do tumor, a partir do quarto dia nos três tecidos(TAE, TARP, TAME). Essa diminuição sugere que o PPAR γ pode estar relacionado à perda de estoques de tecido adiposo característica da caquexia, interferindo na massa gorda total. Enquanto as proteínas CEBP- α e SREBP-1C tiveram sua expressão reduzida no TARP e TAE, ao contrário do

TAME. Isso mostra que o tumor não interfere na expressão dessas proteínas no tecido adiposo mesentérico. Concluimos que nosso estudo sugere que a evolução do tumor pode ter afetado negativamente a adipogênese nos três tecidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARGILÉS, J.M.; ALVAREZ, B.; LOPEZ-SORIANO, F.J. *Medicinal Research Reviews* 17: 477-498 1997.

BARBER, M.D.; ROSS, J.A.; FEARON, K.C. *Surgical Oncology*, 8: 133-141, 1999.

BUSTIN, S.A. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25:169-193, 2000.

FEARON, K.C.; MOSES, A. G. *International journal of cardiology*, 85: 73-81, 2002.

KAZANTZIS, M.; SEELAENDER, M.C. *Cell and tissue research*, 321: 419-427, 2005.2004.

LEHRKE, M; LAZAR, M. The many faces of PPAR γ . *Cell*, 123: 993–999, 2005.

TACHIBANA, K; YAMASAKI, D; ISHIMOTO, K; DOI, T. The Role of PPARs in Cancer. PPAR Research. Volume 2008, 15 pages.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a FAPESP e a CNPq pela auxílio e, também, Rodrigo Xavier Das Neves.