

CARACTERIZAÇÃO DAS ALTERAÇÕES IMUNOMETABÓLICAS DO TECIDO ADIPOSEO BRANCO DURANTE A CAQUEXIA INDUZIDA POR CÉLULAS LLC EM CAMUNDONGOS

Juliana Cristina Vieira¹; Felipe dos Santos Henriques²; Miguel Luiz Batista Junior³

Estudante do Curso de Farmácia; e-mail: julianac_vieira@hotmail.com¹

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail:

felipehenriques12@hotmail.com²

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

Área do Conhecimento: Fisiologia de Órgãos e Sistemas

Palavras-chave: Caquexia, LLC, curva de sobrevida, eventos inflamatórios, metabolismo, tecido adiposo branco;

INTRODUÇÃO

A caquexia associada ao câncer é uma síndrome complexa caracterizada pela redução do peso corporal, depleção dos estoques de gordura, diminuição da massa muscular, anorexia, astenia e distúrbios metabólicos. De fisiopatologia desconhecida, acredita-se que a caquexia associada ao câncer seja resultado de uma variedade de interações entre o hospedeiro e o tumor. Além de um simples estoque de lipídeos o tecido adiposo é atualmente descrito como órgão endócrino responsável por controlar o metabolismo de lipídeos e corporal, funções imunológicas e reprodutivas e manter a homeostase energética. Há relatos de que a síndrome caquética é acompanhada pela redução preferencial de tecido adiposo branco (TAB) e diminuição do volume das células adipócitas. Sabe-se ainda que esta redução ocorre inicialmente no TAB em relação ao tecido músculo esquelético, afetado nas fases finais da síndrome. Desta forma, tem-se postulado que tais alterações nos estoques de gordura antecedem o início do desenvolvimento da caquexia e podem ter papel importante como “gatilho” para o “caos metabólico característico desta síndrome. Além das alterações metabólicas, estudos recentes tem demonstrado o aumento do infiltrado celular, notadamente macrófagos, nos estoques de TAB que apresentaram alterações metabólicas. Porém, até onde sabemos, não há relato do possível papel das da inflamação no metabolismo do TAB na caquexia.

OBJETIVOS

O presente estudo tem por objetivo avaliar a evolução temporal da caquexia induzida por células LLC em camundongos (C57BL/6), a fim de determinar a possível relação entre os eventos inflamatórios e metabólicos que antecedem o estabelecimento da síndrome.

METODOLOGIA

Foram utilizados 50 camundongos C57BL/6 com genótipo *wild type* e *knockout* para TLR4. Os animais foram divididos em 4 grupos, sendo eles *wild type* controle (WTC), *wild type* tumor (WTT), mutante (*knockout*) controle (MC) e mutante tumor (MT). Os animais dos grupos “tumor” receberam $3,5 \times 10^5$ de células LLC inoculadas, que induz o crescimento do tumor e faz com que o animal entre em estado caquético. Após isso, os animais foram acompanhados periodicamente durante 28 dias. Foi aferido o tamanho do tumor, e a massa corpórea do animal. Após os 28 dias de experimentação, os animais

foram sacrificados e seus órgãos e tecidos foram pesados. As amostras dos diferentes estoques de tecido adiposo branco foram devidamente armazenadas e nelas foram realizadas as técnicas de histologia, histometria, imunohistoquímica (anticorpos CD68, CD3, UCP1 e TNF) e PCR em tempo real (genes TNF, CD68, F4/80, CD3, IL6, IL1b, TLR2, TLR4, TLR9, TIRAP MyD88, TRAF6, NFkB)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração de células tumorais LLC de $3,5 \times 10^5$ foi à escolhida para a utilização como modelo de caquexia induzida, por apresentar redução na massa corporal acima de 5%, durante o período experimental, confirmado pelo grupo experimental WTC que após os 28 dias de experimentação, apresentou uma redução de 5% em seu o coeficiente de variação no 28º dia, além disso, quando avaliado a massa corpórea total no ultimo dia experimental, conseguimos notar uma redução significativa de 12,27% e 6,82%, respectivamente, nos grupos tumores WTT e MT, apesar dos animais transgênicos apresentaram uma deleção específica, o grupo MT obteve uma menor redução na sua massa corporal total. Todos os estoques de tecido adiposo dos animais caquéticos apresentaram uma redução de sua massa, quando comparados ao seu respectivo controle, evidenciando que isto pode ser efeito da síndrome, padrão este que também pode ser verificado em outros modelos experimentais como o Wistar.

Posteriormente, realizamos a histologia e a histometria, observamos que o estoque em que mais apresentou diferença no diâmetro dos adipócitos foi o Tecido Adiposo Subcutâneo, onde houve uma redução de 41,77% (Figura 1 – 1) no diâmetro dos adipócitos dos animais selvagens que apresentavam a síndrome caquética (WTT) quando comparado com seu controle (WTC).

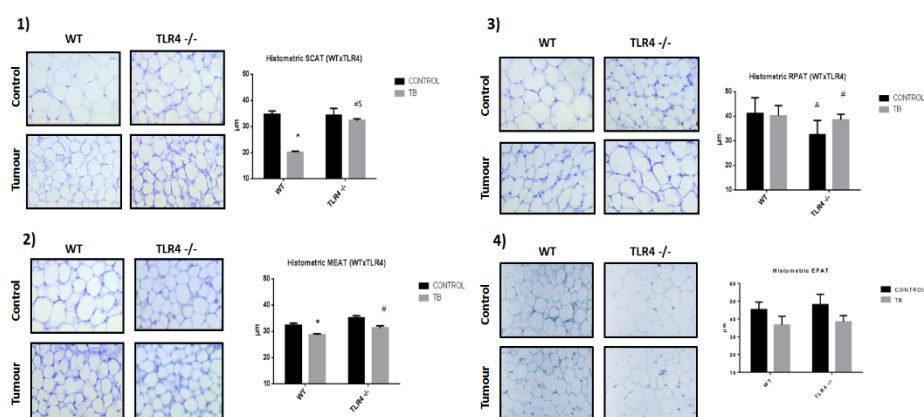


Figura 1: Histometria dos estoques de Tecido Adiposo Subcutâneo (1), Mesentérico (2), Retroperitoneal (3) e Epididimal (4), dos diferentes grupos na mesma condição experimental. Os resultados são expressos em médias \pm desvio padrão na mesma condição experimental onde $p < 0,0001$.

Os animais TLR4^{-/-} curiosamente têm seus estoques de tecido preservados de alguma forma perante a síndrome, o Tecido Adiposo Subcutâneo sofre uma redução de apenas 6,16% no diâmetro de seus adipócitos (grupo MT), já no Tecido Adiposo Mesentérico do grupo MT, apresenta uma redução de apenas 11,01% como pode ser observado claramente na figura 1.

Apesar de ter seus adipócitos e seu tecido preservado, os animais TLR4^{-/-} apresentam uma diâmetro tumoral muito maior, quando comparados aos animais WT, além de apresentarem crescimento exponencial do diâmetro do tumor.

A partir dos resultados obtidos, realizou-se a técnica de imunohistoquímica nas amostras de tecido subcutâneo dos animais. Aplicou-se a técnica para a detecção de UCP1 na amostra, houve uma diminuição desta proteína nos animais MT em 44,73% quando comparados com os animais WTT (figura 2a). Os animais controles SC apresentam 39,41% mais UCP1 do que os animais controle MC.

Sob esta mesma condição, ambos (MT e WTT) tiveram quantidades aumentadas de CD68 (figura 2b), TNF (figura 2c) e CD3 (figura 2d) quando comparados a seus respectivos controles, porém para todas as análises, os animais mutantes apresentaram menor aumento destas variáveis quando comparados ao aumento dos animais WTT x WTC.

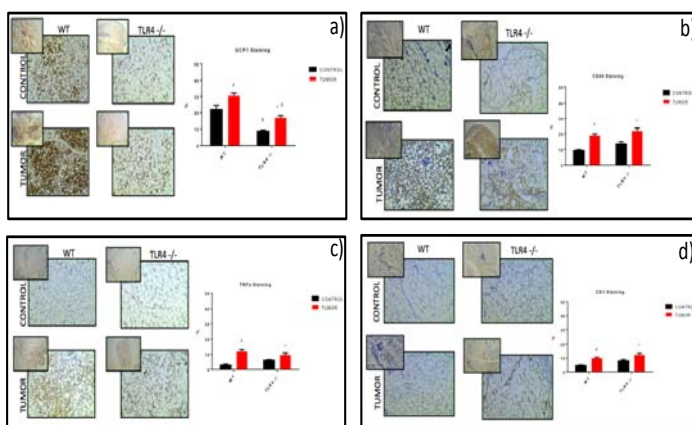


Figura 2: Imunohistoquímica (IHC) no TASC durante a caquexia induzida nos diferentes grupos. a) IHC e quantificação para o marcador UCP-1. b) IHC e quantificação para o marcador CD68. c) IHC e quantificação para o marcador TNFa. d) IHC e quantificação para o marcador CD3. As secções de tecido foram contra-coradas com hematoxilina. Aumento de 200x e 40x. * P <0,01 em relação ST vs SC; & P <0,01 MC vs SC; # P <0,01 MT vs MC.

CONCLUSÕES

- ❖ A concentração de células $3,5 \times 10^5$ foi efetiva na indução da caquexia;
- ❖ A presença da proteína TLR4 é importante no desenvolvimento desta síndrome e que a ausência desta muda o padrão e comportamento de parâmetros importantíssimos na síndrome caquética como por exemplo a perda de peso, o principal marcador clínico;
- ❖ A ausência de TLR4 implicou significativamente na mudança morfológica das células do tecido adiposo, além de suas funções;
- ❖ O knockout de TLR4 promoveu um retardo no início da síndrome caquética nos animais com tumor e amenizou o crescimento deste;
- ❖ Os animais que possuem a via TLR4 deletada compensam de alguma forma superexpressando demais receptores como TLR2 e TLR9;
- ❖ A via TLR4 é um possível alvo terapêutico interessante para a síndrome caquética.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARGILES, J.; LOPEZSORIANO, F. Cancer cachexia. **Int J Oncol**, v. 10, n. 3, p. 565-572, 1997.

AUGUSTSSON, J.; EKSBORG, S.; ERNESTAM, S.; GULLSTROM, E.; VAN VOLLENHOVEN, R. Low-dose glucocorticoid therapy decreases risk for treatment-limiting infusion reaction to infliximab in patients with rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**, v. 66, n. 11, p. 1462-1466, 2007.

BATISTA, M. L., JR.; PERES, S. B.; MCDONALD, M. E.; ALCANTARA, P. S.; OLIVAN, M.; OTOCH, J. P.; FARMER, S. R.; SEELAENDER, M. Adipose tissue inflammation and cancer cachexia: possible role of nuclear transcription factors. **Cytokine**, v. 57, n. 1, p. 9-16, 2012.

BRUERA, E.; SWEENEY, C. Cachexia and asthenia in cancer patients. **Lancet Oncol**, v. 1, n., p. 138-147, 2000.

DAHLMAN, I.; MEJHERT, N.; LINDER, K.; AGUSTSSON, T.; MUTCH, D. M.; KULYTE, A.; ISAKSSON, B.; PERMERT, J.; PETROVIC, N.; NEDERGAARD, J.; SJOLIN, E.; BRODIN, D.; CLEMENT, K.; DAHLMAN-WRIGHT, K.; RYDEN, M.; ARNER, P. Adipose tissue pathways involved in weight loss of cancer cachexia. **Br J Cancer**, v. 102, n. 10, p. 1541-1548, 2010.

DAS, S. K.; EDER, S.; SCHAUER, S.; DIWOKY, C.; TEMMEL, H.; GUERTL, B.; GORKIEWICZ, G.; TAMILARASAN, K. P.; KUMARI, P.; TRAUNER, M.; ZIMMERMANN, R.; VESELY, P.; HAEMMERLE, G.; ZECHNER, R.; HOEFLER, G. Adipose triglyceride lipase contributes to cancer-associated cachexia. **Science**, v. 333, n. 6039, p. 233-238, 2011.

FOULADIUN, M.; KORNER, U.; BOSAEUS, I.; DANERYD, P.; HYLSTANDER, A.; LUNDHOLM, K. G. Body composition and time course changes in regional distribution of fat and lean tissue in unselected cancer patients on palliative care--correlations with food intake, metabolism, exercise capacity, and hormones. **Cancer**, v. 103, n. 10, p. 2189-2198, 2005.

RYDEN, M.; AGUSTSSON, T.; LAURENCIKIENE, J.; BRITTON, T.; SJOLIN, E.; ISAKSSON, B.; PERMERT, J.; ARNER, P. Lipolysis--not inflammation, cell death, or lipogenesis--is involved in adipose tissue loss in cancer cachexia. **Cancer**, v. 113, n. 7, p. 1695-1704, 2008.

SEELAENDER, M. C.; NASCIMENTO, C. M.; CURI, R.; WILLIAMS, J. F. Studies on the lipid metabolism of Walker 256 tumour-bearing rats during the development of cancer cachexia. **Biochem Mol Biol Int**, v. 39, n. 5, p. 1037-1047, 1996.

TISDALE, M. J. Pathogenesis of cancer cachexia. **J Support Oncol**, v. 1, n. 3, p. 159-168, 2003.

TISDALE, M. J. Mechanisms of cancer cachexia. **Physiol Rev**, v. 89, n. 2, p. 381-410, 2009.