

ALTERAÇÃO NA EXPRESSÃO DE MARCADORES RELACIONADOS À ADIPOGÊNESE E A APOPTOSE NO TECIDO ADIPOSE MESENTÉRICO EM RATOS COM CAQUEXIA INDUZIDA PELO TUMOR DE WALKER 256

Felipe de Oliveira Franco ¹, Felipe dos Santos Henriques ², Magno Alves Lopes ³
Pâmela Viegas Knöbl ⁴, Kaltinaitis Benetton Nunes Hypolito dos Santos ⁵, Rodrigo
Xavier das Neves ⁶, Miguel Luiz Batista Júnior ⁷

Estudante do Curso de Ciências Biológicas da Universidade de Mogi das Cruzes;
e-mail: felipe.franco.sp@gmail.com ¹

Estudante do Curso de Mestrado em Biotecnologia da Universidade de Mogi das
Cruzes; e-mail: felipehenriques12@hotmail.com ²

Estudante do Curso de Ciências Biológicas da Universidade de Mogi das Cruzes; e-
mail: magnolopes22@hotmail.com ³

Estudante do Curso de Biomedicina da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail:
pamelaknobl@hotmail.com ⁴

Estudante do Curso de Biomedicina da Universidade de Mogi das Cruzes;
e-mail: kaltinaitis@hotmail.com ⁵

Estudante do Curso de Doutorado em Biologia Celular e do Desenvolvimento da
Universidade de São Paulo; e-mail: labita.adipose@gmail.com ⁶

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: migueljr@umc.com.br ⁷

Área do Conhecimento: Fisiologia de órgãos e sistemas

Palavras-chave: Caquexia; Adipogênese; Caspases; Apoptose;

INTRODUÇÃO

A caquexia é uma síndrome multifacetada de etiologia desconhecida, associada a doenças subjacentes, sendo caracterizada pela acentuada redução da massa corporal total e afetando principalmente o tecido muscular estriado esquelético e o Tecido Adiposo Branco (TAB). Além das profundas alterações morfológicas e metabólicas induzidas pela caquexia, estudos recentes que avaliaram as alterações induzidas no TAB em decorrência da obesidade, demonstraram o remodelamento (alteração nos tipos celulares) e consequente alteração no conteúdo da Matriz Extracelular (MEC) (LEE *et al.*, 2010). A remodelagem da MEC é resultado da combinação entre síntese e degradação de matriz, com deposição de algumas proteínas específicas (tenacina e fibrina), que ocorrem tanto em resposta fisiológicas, tais como reparação tecidual, bem como em processos patológicos, tal como na inflamação (STREULI, *et al.*, 1999). A MEC forma uma rede complexa de moléculas multifuncionais e estruturais que compreendem as diversas isoformas de colágeno, glicoproteínas adesivas e proteoglicanas. Essa rede fornece suporte para a célula e vias de sinalização que controlam sua migração, proliferação e diferenciação, como no TAB, onde a remodelação da MEC exerce papel central na diferenciação do adipócito. Apesar dos

mecanismos moleculares serem apenas parcialmente compreendidos, a remodelação da MEC ocorre concomitantemente com a ativação e/ou repressão de uma “rede” transcricional envolvida na adipogênese, que pode ser ativada ou reprimida de acordo com estímulos extracelulares (KEOPHIPHATH *et al.*, 2009). Dos tipos celulares que compõem o TAB, o pré-adipócito pode atuar na formação da fibrose intersticial, composta em sua maior parte por colágeno e fibronectina (HENEGAR *et al.*, 2008). Durante o desenvolvimento da síndrome de caquexia, a exposição do pré-adipócito a moléculas produzidas localmente (TAB) e/ou pelo próprio tumor podem induzir alterações que culminam na remodelação da MEC, que podem ter papel central na diferenciação fenotípica do mesmo e incluem inflamação, proliferação, migração aumentada e diminuição da diferenciação celular. Sabemos que a perda de massa do TAB está relacionada com a diminuição da lipogênese (síntese de Triacilglicerol (TAG)) e com o aumento da lipólise (Hidrólise de TAG), pois cerca de 80% do volume dos adipócitos são representados pelo TAG, mas até onde o presente momento nenhum estudo elucidou como ocorre o *turnover* celular do TAB na vigência da síndrome, se há alteração na diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos maduros (adipogênese) e no processo de apoptose e ainda, sobre o efeito da MEC na adipogênese na vigência da síndrome.

OBJETIVOS

Avaliar parâmetros relacionados aos processos de apoptose e adipogênese no TAME durante o desenvolvimento da caquexia induzida

METODOLOGIA

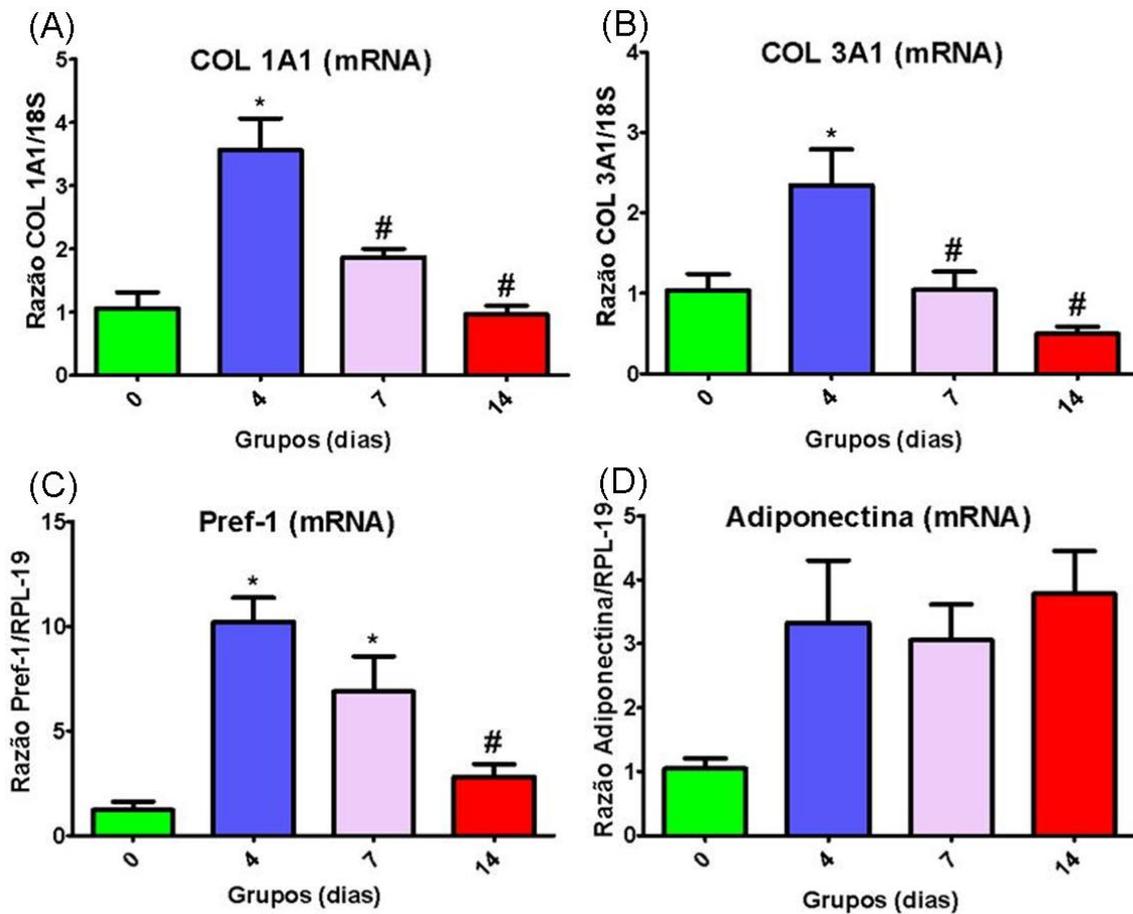
Os procedimentos experimentais estão de acordo com a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de Mogi das Cruzes (N°001/2012). Foram estudados 30 ratos machos da linhagem *Wistar* (250-300g), utilizado células tumorais de *Walker 256* para indução da caquexia, com inoculação subcutânea de 2×10^7 células no flanco direito de cada animal. Os grupos experimentais foram compostos da seguinte forma; 4, 7 e 14 dias após a inoculação das células tumorais, além do grupo controle, onde utilizou-se animais submetidos ao mesmo procedimento, sem inoculação das células tumorais (dia 0). O isolamento da Fração Vascular do Estroma (FVE) foi adaptado de RODBELL (1964). Para a expressão gênica dos colágenos I e III provenientes do TAME foi utilizado 18S como controle interno e para a expressão gênica da Pref-1 e da Adiponectina provenientes da FVE, foi utilizado o RPL-19 como controle, ambos avaliadas por *qRT-PCR*. A expressão proteica das Pró-caspases e Caspases-3 e -9 (marcadores de apoptose) do TAME (Tecido Adiposo Mesentérico) foram avaliadas por *Western Blot*. Para análises estatísticas utilizou-se *ANOVA* em uma via, seguida do pós-teste de *Tukey*. O valor adotado para significância foi $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A expressão dos genes para colágeno tipo I (1A1) do TAME aumentou 3,3 vezes ($p < 0,05$) no 4° dia após a inoculação do tumor, quando comparado ao grupo controle (dia 0), voltando aos níveis normais no período subsequente, nos dias 7 e 14, que são estatisticamente iguais ao controle e diferentes do dia 4. O mesmo ocorreu para o colágeno 3A1 do TAME, onde aumentou 2,2 vezes ($p < 0,05$) no dia 4 e voltou aos níveis normais nos dias 7 e 14 após inoculação, sendo também estatisticamente iguais ao controle e diferentes do dia 4. Já na expressão gênica de Pref-1 da VFE, aumentou 8 vezes ($p < 0,05$) no 4° dia e 5 vezes ($p < 0,05$) no 7° dia em relação ao grupo controle, voltando aos níveis iniciais no 14° dia após a inoculação, quando comparado ao dia 0.

Diferentemente da adiponectina em células provenientes da FVE, que não apresentou diferença em nenhum dos períodos avaliados, apesar de forte tendência ($p=0,0567$). Portanto houve alteração na expressão gênica dos colágenos I e III na fase inicial da síndrome (Figura 1, A e B), o que pode estar interferindo na adipogênese, já que nossos dados indicam um aumento na população de pré-adipócitos apenas nas fases iniciais (Figura 1, C).

Figura 1. Em (A) e (B), está demonstrada a expressão gênica dos Colágenos 1A1, (I) e 3A1 (III) no TAME, respectivamente durante o desenvolvimento da caquexia induzida; Em (C) e (D), temos a expressão gênica da Pref-1 e da Adiponectina provenientes da FVE, respectivamente; Onde * representa diferença ($p<0,05$) em relação ao controle (dia 0), # em relação ao dia 4.



Tendo em vista agora parâmetros apoptóticos, houve clivagem da Pró-caspase-9 apenas no 7º dia após a inoculação e clivagem da Pró-caspase-3 em todos os períodos avaliados (Figura 2). O aumento da clivagem das Pró-caspases-3 e -9 sugerem um papel relevante da via apoptótica no TAB mesentérico em ratos caquéticos.

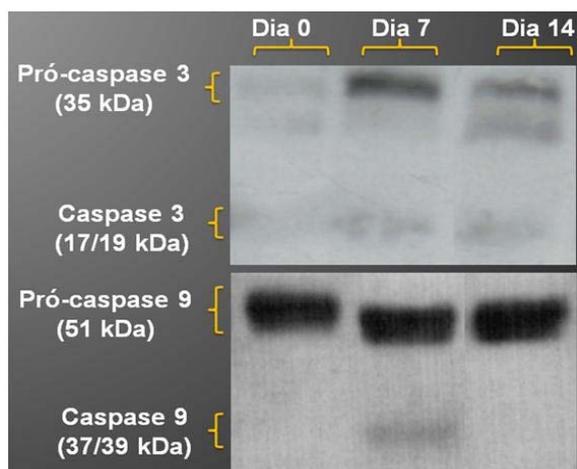


Figura 2. Blot para as Pró-caspases e Caspases-3 e -9 provenientes do TAME na vigência do quadro caquético.

CONCLUSÃO

Nossos dados indicam que haja uma alteração na MEC e um aumento na população de pré-adipócitos no TAME nos estágios iniciais da caquexia induzida, além de um aumento na morte celular em todos os períodos avaliados na vigência da síndrome.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BATISTA JR, M; NEVES, R; PERES, S; YAMASHITA, A; SHIDA, C; FARMER, S; SEELAENDER, M; Heterogeneous Time-Dependent Response of Adipose Tissue During Cancer Cachexia Development, *Journal of Endocrinology*, 2012 (No Prelo).

KEOPHIPHATH, M; ACHARD V; HENEGAR, C; ROUAULT, C; CLEMENT, K; LACASA, D; Macrophage-Secreted Factors Promote a Profibrotic Phenotype in Human Preadipocytes. *Mol Endocrinol*, 2009, 23, 11-24.

HENEGAR, C; TORDJMAN, J; ACHARD, V; LACASA, D; CREMER, I; GUERREMILLO, M; POITOU, C; BASDEVANT, A; STICH, V; VIGUERIE, N; LANGIN, D; BEDOSSA, P; ZUCKER, J; CLEMENT, K; Adipose tissue transcriptomic signature highlights the pathological relevance of extracellular matrix in human obesity, *Genome Biology*, 2008, 9.

LEE, M; WU, Y; FRIED, S; Adipose Tissue Remodeling in Pathophysiology of Obesity, *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2010, 13, 371-376.

RODBELL, M. Metabolism of Isolated Fat Cells. *Journal of Biological Chemistry*, v. 239, n.2, p. 375-380, 1964.

STREULI, C; Extracellular matrix remodeling and cellular differentiation. *Current Opinion in Cell Biology*, 1999, 11, 634-640.

AGRADECIMENTO

Agradeço a FAPESP pelo auxílio financeiro.