

ALTERAÇÃO DA EXPRESSÃO DE QUIMIOCINAS ATRATORAS DE CÉLULAS POLIMORFONUCLEARES NO TECIDO ADIPOSEO BRANCO DE RATO COM CAQUEXIA

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 Federal de São Paulo; shida@unifesp.br³

Área do Conhecimento: Fisiologia de órgãos e sistemas

Palavras-chave: Caquexia; Inflamação; Leucócitos Polimorfonucleares

INTRODUÇÃO

A caquexia associada ao câncer é uma síndrome complexa, caracterizada pela diminuição do peso corporal, depleção dos estoques de gordura na massa muscular, anorexia, astenia e distúrbios metabólicos (BRUERA & SWEENEY, 2000). No tecido adiposo dessa síndrome, as células inflamatórias ou células imunes compõem uma importante e grande parcela, sendo que até 20% são constituídos por neutrófilos, linfócitos e macrófagos infiltrados (CASPAR-BAUGUIL *et al.*, 2009). Em vários processos inflamatórios, infecciosos ou não-infecciosos, a inflamação crônica é caracterizada pela presença de células mononucleares que é geralmente precedida pela infiltração tecidual de neutrófilos, que são células que caracterizam a inflamação aguda (SCHYMEINSKY *et al.*, 2007). Recentemente, observou-se que alterações morfofuncionais precoces no tecido adiposo branco ocorrem durante o desenvolvimento dessa síndrome, assim a proposta do trabalho foi avaliarmos a evolução temporal do processo inflamatório nesse tecido.

OBJETIVOS

Avaliar a expressão das quimiocinas atratoras CCL3, CCL5 e CXCL2 na fração vascular do estroma (FVE) do tecido adiposo branco durante o desenvolvimento do quadro de caquexia induzido pelo tumor de Walker 256.

METODOLOGIA

Implante tumoral, sacrifício dos animais e coleta dos tecidos. Os procedimentos experimentais estão de acordo com a Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Mogi das Cruzes (Nº. 006 / 2011). Foram estudados 20 ratos machos de 250 a 300 g da linhagem Wistar. 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 o tecido foi dissecado cuidadosamente, pesado e armazenado para posterior análise da expressão gênica. Isolamento da Fração Vascular do Estroma. O isolamento da FVE 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 diluído com tampão ELB (contendo colagenase tipo II e 20% de soro fetal bovino) e incubado em banho-maria com agitação por 60 minutos, a 37°C. Por centrifugação os adipócitos (camada superior) foram separados da FVE. Reação de transcrição reversa (RT). Foi utilizado 2µg 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; o ciclo continua a 42°C por 60 minutos; e, por final, 95°C por 10 minutos. A reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) é uma técnica usada para estimar os valores do nível de RNA mensageiro nos genes testados, comparando gene alvo com o controle interno (RPL-19) em duplicatas. Os produtos do PCR foram quantificados com o detector de sequência ABI Prism 7500 fast da Applied Biosystems (BUSTIN, 2000). *Análise estatística.* A análise dos resultados foram realizadas através do software GraphPad Prism 5. O teste utilizado foi *Anova one way*, seguido pelo pós teste *Tukey*, utilizando $p < 0,05$ como estatisticamente significante.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Evolução temporal da massa do tecido adiposo mesentérico dos ratos com tumor durante 14 dias após a inoculação do tumor.

Sabendo que a redução da massa corpórea é considerada o principal marcador clínico para o diagnóstico da caquexia, observamos que durante o desenvolvimento da caquexia o tecido mesentérico dos ratos, que foram inoculados com as células tumorais, apresentou uma diminuição de sua massa no decorrer dos 14 dias. Analisando a Figura 1 conseguimos observar diferença na redução de massa do TAME a partir do 7º dia após inoculação do tumor, quando comparada com o grupo controle. Porém, só observamos diferença, estatisticamente relevante, entre o grupo controle e grupo 4 dias; e entre controle e 14 dias. Essa redução na massa do tecido adiposo mesentérico nos mostra um dos efeitos na qual o tumor de Walker 256 induz no animal, sendo ela a diminuição da massa no depósito de gordura analisado, com isso levando nosso animal a apresentar um dos principais marcadores para o estado inicial da caquexia, além disso, observamos características típicas de um estado caquético durante o período de tratamento dos animais (14 dias) onde o mesmo apresentava um estado debilitante com perda de peso, desencadeada por perturbações metabólicas no indivíduo portador de tumor (TISDALE, 2003). Estas alterações promovem anorexia, perda de peso, saciedade prematura, anemia e alterações no metabolismo dos carboidratos, gorduras e proteínas.

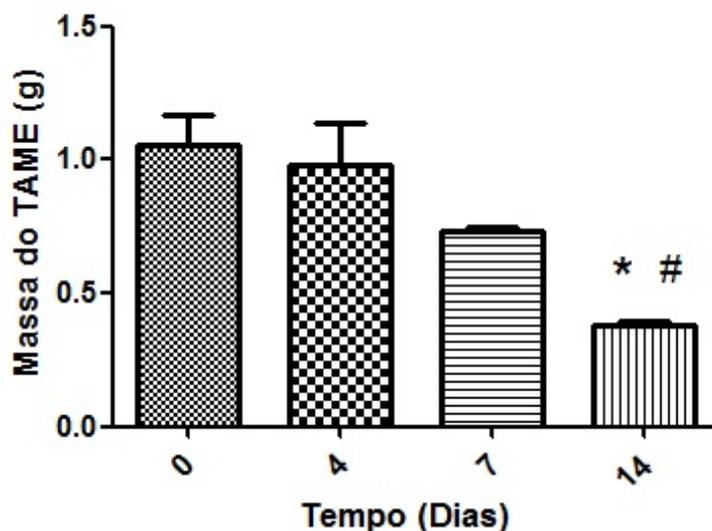


Figura 1: Evolução temporal da massa do tecido adiposo mesentérico (TAME) durante 14 dias. Os resultados estão representados como média \pm erro padrão da média, nos diferentes períodos experimentais (controle, 4º, 7º e 14º dias após a inoculação das células tumorais). * $p < 0,01$ em relação ao controle, # $p < 0,05$ em relação ao tempo 4. TAME, tecido adiposo mesentérico.

Expressão gênica das quimiocinas atradoras de células polimorfonucleares

Avaliamos a expressão de mRNA utilizando a técnica de qPCR. Os genes analisados foram a CCL3, CCL5 e CXCL2 do tecido adiposo mesentérico dos ratos inoculados com tumor e controles.

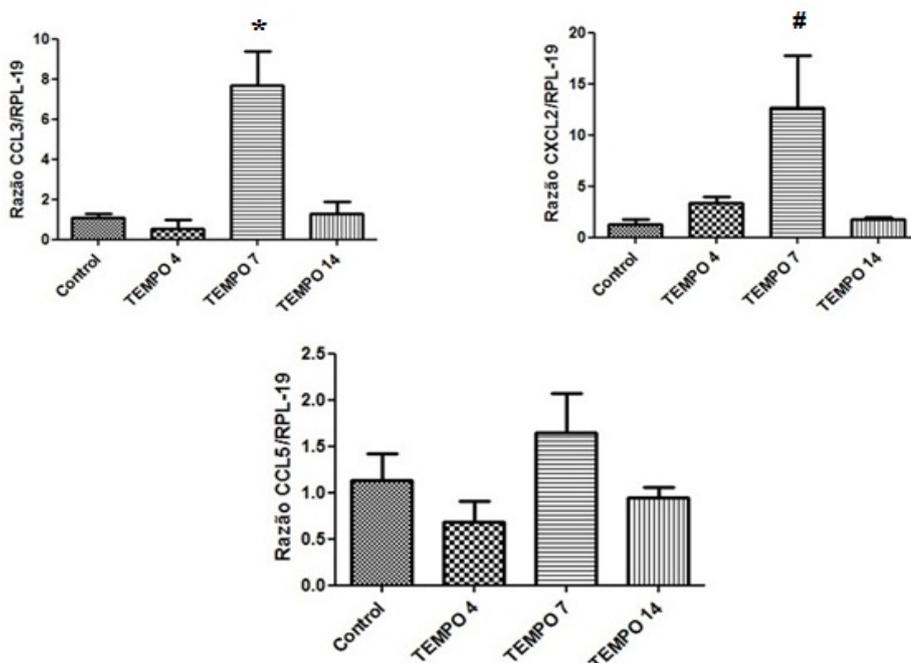


Figura 2: Razão da expressão gênica da CCL3, CCL5 e CXCL2 em relação ao RPL-19 da FVE do TAME. Os resultados estão representados em média \pm erro padrão da média, nos diferentes períodos experimentais (controle, 4°, 7° e 14° dias após a inoculação das células tumorais). * $p < 0,05$ em relação ao controle, # $p < 0,01$ em relação ao controle. FVE, fração vascular do estroma; TAME, tecido adiposo mesentérico.

A expressão de mRNA das quimiocinas CCL3 e CXCL2 foram as que mais variaram. A expressão gênica da CCL3 no dia 7, após inoculação do tumor, mostrou aumento de 4 vezes quando comparado ao controle sem tumor; já a expressão da CXCL2 também apresentou aumento no dia 7, mas de 10 vezes quando comparado ao controle; e a expressão da CCL5 não apresentou diferença em nenhum dos períodos de tempo avaliados (Figura 2).

CONCLUSÃO

Nosso estudo mostrou que há aumento da expressão gênica das quimiocinas atradoras de leucócitos polimorfonucleares CCL3 e CXCL2 nas células do FVE, de tecido adiposo mesentérico, 7 dias após a inoculação do tumor. Esses dados sugerem que as quimiocinas atradoras CCL3 e CXCL2 participam da instalação do processo inflamatório e devem ter papel relevante no desenvolvimento da síndrome, perdendo importância no final, quando os animais estão em estado terminal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

CASPAR-BAUGUIL, S.; COUSIN, B.; BOUR, S.; CASTIELLA, L. *Journal Physiologic and Biochemistry*, 65(4):423-36, 2009.

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

SCHYMEINSKY, J.; MÓCSAI, A.; WALZOG, B. *Thrombosis and Haemostasis*, 98(2): 262-73, 2007.

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

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

AGRADECIMENTOS

Agradeço CNPq e FAPESP pelo auxílio financeiro.