

CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS BEGE INDUZIDAS ATRAVÉS DA CAQUEXIA ASSOCIADA AO CÂNCER

Eduarda Vieira da Silva¹, Ana Júlia de O. Machado², Juli Raquel da S. Ferreira³, Kaltinaitis B. N. H. dos Santos⁴, Miguel Luiz Batista Júnior⁵.

1. Estudante do Curso de Farmácia; e-mail: eduarda.vieira.slv@gmail.com¹
2. Estudante do Curso de Biomedicina; e-mail: ana.julia.oliveira369@gmail.com²
3. Estudante do Curso de Farmácia; e-mail: juliraquel8@gmail.com³
4. Doutorando em Engenharia Biomédica; e-mail: kaltinaitis@hotmail.com⁴
5. Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: migueljr4@me.com⁵

Área do Conhecimento: Fisiopatologia de órgãos e tecidos.

Palavras-chave: Caquexia; adipócitos bege; *browning*; transdiferenciação.

INTRODUÇÃO

A caquexia é uma síndrome multifatorial, apresentando redução progressiva de massa corpórea e encontrando-se geralmente associada a doenças crônicas, como, o câncer. Esta síndrome possui grande incidência em pacientes oncológicos em estado avançado, podendo levar os mesmos a óbito. Durante o desenvolvimento da caquexia o tecido adiposo (TA) é precocemente afetado, resultando na depleção tecidual, atrofia dos adipócitos e no aumento do gasto energético. O TA pode ser subdividido, do ponto de vista morfológico, entre tecido adiposo branco (TAB) e tecido adiposo marrom (TAM). O TAB possui como principal função o armazenamento de lipídeos. Enquanto o TAM apresenta como função suprir a demanda termogênica do organismo. Ao decorrer da síndrome caquética, é observado um aumento no gasto energético, em decorrer das alterações metabólicas, acarretando mudanças no TAB, onde os adipócitos brancos adquirem características morfofuncionais de adipócitos marrons, desta maneira há fatores termogênicos expressados por adipócitos residentes no TAB, estes são denominados de adipócitos beges. A origem dos adipócitos beges podem ser múltiplas, podendo ocorrer adipogênese “*de novo*” ou via transdiferenciação. Nesta última, tem-se o aparecimento da célula bege através de um adipócito maduro. Estudos sugerem que, os adipócitos submetidos a transdiferenciação, poderiam apresentar característica latente, desta maneira, quando estimuladas, passariam a realizar termogênese, e na ausência desse estímulo voltariam a possuir fenótipo de adipócito branco, sendo denominados como adipócitos beges latentes. Diante disso, esse projeto visa verificar a transdiferenciação dos adipócitos beges latentes, diante a síndrome da caquexia associada ao câncer.

OBJETIVOS

Geral

Identificar se as células adiposas maduras presentes no TAB possuem a capacidade de se transdiferenciar em células beges latentes.

Específicos

- Avaliar as alterações morfológicas nos animais Adiponectin-cre/R26R, submetidos à caquexia associada ao câncer (grupo tumor).
- Verificar a participação dos adipócitos maduros do TAB no processo de transdiferenciação para célula bege latente em camundongos portadores de caquexia associada ao câncer.

METODOLOGIA

Foram utilizados 15 camundongos machos, entre 8 a 10 semanas, de linhagens selvagens. Esses animais foram obtidos e mantidos no biotério central da Universidade de Mogi das Cruzes, adequados em gaiolas plásticas que possuíram no máximo quatro animais por caixa, sendo mantidos a uma temperatura média de $24 \pm 1^\circ\text{C}$, com ciclo claro/escuro a cada 12 horas de modo controlado, e água e comida ad libitum. Foram divididos em 3 grupos, dentre eles controle (CO), frio crônico (FC) e tumor (TB). Para a indução tumoral foi utilizado células tumorais da linhagem *Lewis Lung Carcinoma* (LLC), que foram injetadas no subcutâneo no flanco direito dos camundongos, no qual sua concentração correspondeu a $3,5 \times 10^5$, em 200ml de meio de cultura (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium* – DMEM). A inoculação tumoral será realizada no grupo TB ($n = 9$). Os animais do grupo frio crônico ($n = 3$), foram tomados como controle positivo para o processo de *browning*, visto que são considerados o modelo clássico de indução. Para isso, foram primeiramente aclimatados utilizando a temperatura média $15-18^\circ\text{C}$ durante 7 dias e em seguida serão alocados em uma câmara fria com temperatura entre $4-6^\circ\text{C}$, onde foram mantidos por 7 dias, possuindo ciclos de claro/escuro a cada 12 horas de modo controlado e fornecimento de água e comida durante os 15 dias. A obtenção dos tecidos foi realizada através da decapitação sem anestesia dos grupos. A massa e temperatura corporal dos animais foram monitoradas durante todo o período experimental, que durará 28 dias. Foram coletados os tecidos adiposos brancos nos estoques subcutâneo inguinal (SC), epididimal (EP) e o estoque de tecido adiposo marrom interescapular (TAM). Para a reação de imunohistoquímica, foi utilizado o polímero *Histofine One Detection System: HRP Polymer* (ThermoScientific® TL-125- HLJ), realizando os controles positivos e negativos. A recuperação antigênica foi feita através de indução de calor, durante 50 minutos a 93°C , em todas as lâminas produzidas. Posteriormente foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena (Peróxido de hidrogênio 3% durante 10 minutos) e o bloqueio proteico. Incubou-se com os anticorpos primários específicos (anti-UCP1) overnight, a aplicação do polímero *Histofine One Detection* durante 20 min e a incubação do anticorpo secundário *Anti-Rabbit* por 2h. Foi realizada a revelação das lâminas com o cromógeno DAB (Diaminobenzidina). Por fim, realizou-se a coloração dos núcleos com hematoxilina, desidratação das lâminas e montagem da lâmina com meio sintético Entellan®. Será utilizado $1\mu\text{g}$ de RNA total na reação contendo Oligodt ($500\mu\text{g}/\text{mL}$), 10mM de cada dNTP, $5\times$ *First-Strand Buffer*, DTT e 200 U de transcriptase reversa (Super Script 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. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR). Técnica usada para estimar os valores do nível de RNA mensageiro nos genes testados, comparando as amostras e o controle interno (RPL-19) em duplicatas, baseado na detecção em tempo real de produtos do PCR medidos por fluorescência, quantificado com o detector de sequência ABI Prism 7500 (AppliedBiosystems). A reação ocorrerá em condições de ciclagem pré determinadas, sendo duas etapas de 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos, a amplificação ocorre em 40 ciclos: a desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento a 63° por 60 segundos, com extensão a 72°C por 2 minutos. Os primers serão desenhados com base no banco de dados Genbank.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A síndrome caquética é capaz de induzir o efeito de *browning* no TAB, no qual há o aparecimento de características fundamentais do TAM em meio aos adipócitos do TAB. Durante esse fenômeno, os adipócitos presentes no TAB, passam a expressar um conjunto de genes, que originalmente seriam expressados apenas no TAM. Devido a este fenômeno, os adipócitos do TAB que sofrem essas alterações passam a se denominar adipócitos beges,

sendo capazes de realizar o processo de termogênese, esse processo contribui para o gasto energético exacerbado observado na síndrome caquexia. Em vista disso, foram realizadas análises no TAB, utilizando a técnica de IHC para identificar a presença de UCP-1 e qRT-PCR, com a finalidade de verificar a expressão de um conjunto de genes, cujo a expressão deveria encontrar-se restrita ao TAM, como pode ser observado na figura 1.

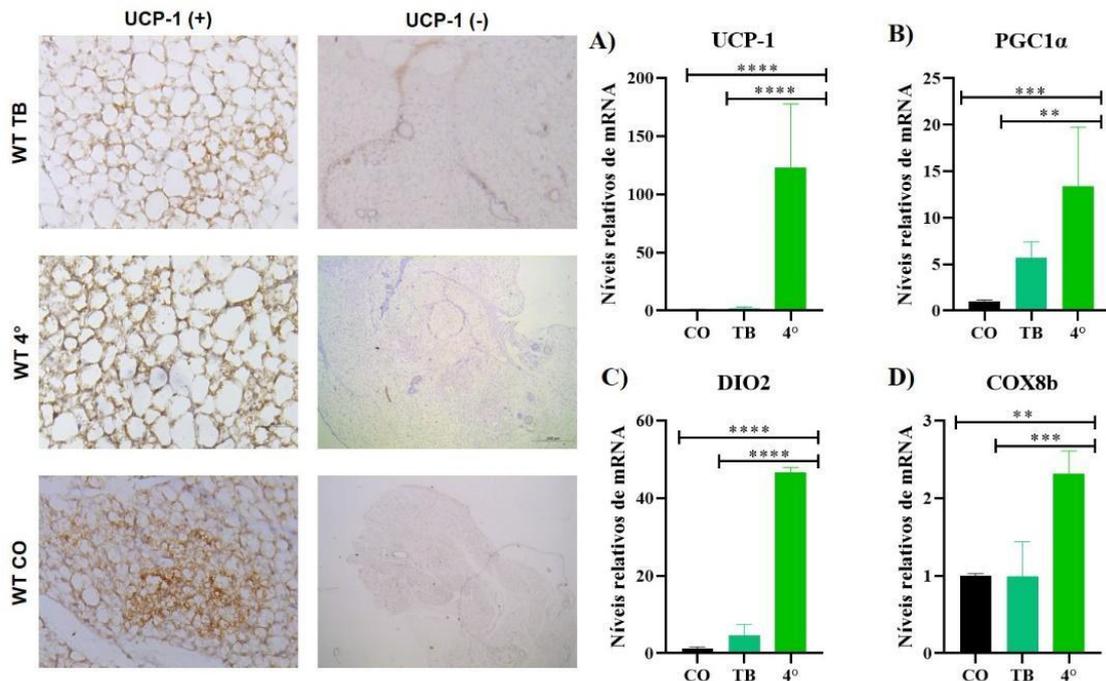


Figura 1 – A direita encontra-se a análise da expressão gênica de marcadores de adipócitos bebes. **(A)** UCP-1. **(B)** PGC1α. **(C)** DIO2. **(D)** Cox8b. Os resultados estão expressos em média (CO n = 3; TB n = 9; 4° n = 3) ± desvio padrão da média. A análise estatística foi realizada utilizando o teste não paramétrico ANOVA *one-way*. **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 em comparação com o respectivo controle. A esquerda é possível observar a IHC com marcação para UCP-1 no tecido adiposo subcutâneo. Os núcleos foram corados com hematoxilina. Na coluna da esquerda, encontram-se as imagens das amostras com o anticorpo UCP-1, fotomicroscopias com aumento de 40x. Na coluna da direita, pode-se observar as amostrar com o controle negativo para UCP-1, sendo as fotomicroscopias com aumento de 4x.

Inicialmente, foi verificada a expressão gênica do principal marcador de células bebes, a proteína UCP-1. Os dados encontrados ao avaliar a expressão gênica, indicaram um aumento nos níveis de expressão de UCP-1 nos adipócitos do grupo FC, sendo $p < 0,0001$, quando comparado aos grupos CO e TB. Uma vez observado alterações nos níveis de UCP-1, foi realizado a técnica de IHC, para verificar se essa proteína estava realmente se formando, como visto acima é possível observar a presença dessa proteína em todos os grupos, sendo observada de forma mais homogênea nos grupos FC e TB, e visualmente mais forte no grupo FC, já no grupo CO há a indicação de ligação inespecífica, visto que não há homogeneidade na marcação, além de contradizer fortemente os resultados obtidos no qRT-PCR. A partir disso, foram analisados outros genes, ligados a “assinatura” da célula bebes, como o PGC1α, e genes ligados a termogênese, como Citocromo C Oxidase Subunidade VIIIb (Cox8b) e a iodotironina desidrodinase tipo II (DIO2). O PGC1α teve um padrão de expressão gênica similar ao observado no gene UCP-1, possuindo altos níveis de expressão no grupo FC, com relação aos grupos experimentais CO ($p = 0,0007$) e TB ($p = 0,0055$). Quando comparado o grupo CO com o grupo TB, pode-se observar que há um aumento na expressão de PGC1α no grupo TB, contudo esse aumento não indicou significância, de acordo com o teste ANOVA *one-way*.

O DIO2, manteve os padrões verificados anteriormente, em relação aos níveis elevados do gene no grupo FC, sendo esse aumento observado com relação aos grupos CO ($p < 0,0001$) e TB ($p < 0,0001$). Em relação a expressão de Cox8b, os níveis elevados de expressão no grupo FC encontram-se elevados em relação aos grupos CO ($p = 0,0032$) e TB ($p = 0,0006$). Quando comparado os grupos CO e TB, é possível verificar que a expressão de Cox8b nesses grupos é similar, sendo demonstrado na literatura que pode haver presença da expressão deste gene no TAB em animais em condições normais. Em suma, os dados apresentados mostram que tanto em situações clássicas (frio), quanto em situações alternativas (caquexia), há a ocorrência da expressão de genes tidos como marcadores para o processo de *browning*, indicando que há a formação de adipócitos beges no TAB, indicando a confirmação do aumento de gasto energético nessas situações, visto que a termogênese nesses animais encontra-se aumentada. Além disso, o isolamento das células adiposas para realização das análises de expressão gênica, possibilitou excluir a expressão de demais células presentes no TAB que não adipócitos. Contudo, o isolamento dos adipócitos, corresponde a adipócitos comprometidos, não especificando a sua linhagem, impossibilitando uma análise concreta da origem via transdiferenciação. Devido a isso, é indicado mais estudos sobre a origem real dessas células, de maneira que, a linhagem das células seja marcada, como seria possível no caso do modelo genético Adipoq-cre/R26R.

CONCLUSÕES

A caquexia é uma importante síndrome que acomete pacientes com doenças crônicas, como o câncer. Em casos de pacientes portadores de câncer em estado avançado, a síndrome pode apresentar-se em cerca de 60-80% desses pacientes, sendo responsável por aproximadamente 20% dos óbitos. Nesta síndrome há um metabolismo negativo, na qual, o gasto energético encontra-se aumentado, sendo esse aumento no gasto energético oriundo do surgimento das células beges no TAB, células que realizam termogênese. Os marcadores utilizados comprovam a presença do fenômeno de *browning*, nos grupos FC e TB, em vista das amostras utilizadas tratarem de adipócitos isolados, os níveis de expressão obtidos correspondem apenas aos adipócitos já formados, tornando a distinção entre células oriundas da adipogênese “*de novo*” e transdiferenciação incerta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBATELLI, G.; MURANO, I.; MADSEN, L.; HAO, Q.; JIMENEZ, M.; KRISTIANSEN, K.; GIACOBINO, J. P.; DE MATTEIS, R.; CINTI, S. The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 298, n. 6, p. E1244-1253, 2010.

HENRIQUES, F. S.; SERTIE, R. A. L.; FRANCO, F. O.; KNOBL, P.; NEVES, R. X.; ANDREOTTI, S.; LIMA, F. B.; GUILHERME, A.; SEELAENDER, M.; BATISTA, M. L., JR. Early suppression of adipocyte lipid turnover induces immunometabolic modulation in cancer cachexia syndrome. **FASEB J**, v. 31, n. 5, p. 1976-1986, 2017.

COHEN, P.; SPIEGELMAN, B. M. Brown and Beige Fat: Molecular Parts of a Thermogenic Machine. **Diabetes**, v. 64, n. 7, p. 2346-2351, 2015.

HENRIQUES, FELIPE; LOPES, MAGNO A.; FRANCO, FELIPE O.; KNOBL, PAMELA; SANTOS, KALTINAITIS B.; BUENO, LUANA L.; CORREA, VICTOR A.; BEDARD, ALEXANDER H.; GUILHERME, ADILSON; BIRBRAIR, ALEXANDER; PERES, SIDNEY B.; FARMER, STEPHEN R.; BATISTA, MIGUEL L. Toll-Like Receptor-4 Disruption Suppresses Adipose Tissue Remodeling and Increases Survival in Cancer Cachexia Syndrome. **Scientific Reports**, v. 8, p. 1-12, 2018.

HARMS, M.; SEALE, P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. **Nat Med**, v. 19, n. 10, p. 1252-1263, 2013.

KAJIMURA, S.; SPIEGELMAN, B. M.; SEALE, P. Brown and Beige Fat: Physiological Roles beyond Heat Generation. **Cell Metab**, v. 22, n. 4, p. 546-559, 2015.

ROSENWALD, M.; PERDIKARI, A.; RULICKE, T.; WOLFRUM, C. Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. **Nat Cell Biol**, v. 15, n. 6, p. 659-667, 2013.

VAITKUS, J. A.; CELI, F. S. The role of adipose tissue in cancer-associated cachexia. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 242, n. 5, p. 473-481, 2017.

WU, J.; COHEN, P.; SPIEGELMAN, B. M. Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown? **Genes Dev**, v. 27, n. 3, p. 234-250, 2013.