

CARACTERIZAÇÃO DO PAPEL DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS POSITIVAS PARA *MYH11* NA INDUÇÃO DE ADIPÓCITOS BEGES EM CAMUNDONGOS PORTADORES DE CAQUEXIA ASSOCIADA AO CÂNCER

Juli Raquel da Silva Ferreira¹, Ana Júlia de O. Machado², Eduarda V. da Silva³, Kaltinaitis B. N. H. dos Santos⁴, Miguel Luiz Batista Júnior⁵

1. Estudante do curso de Farmácia; e-mail: juliraquel8@gmail.com
2. Estudante do curso de Biomedicina; e-mail: ana.julia.oliveira369@gmail.com
3. Estudante do curso de Farmácia; e-mail: duh.vieira.silva@gmail.com
4. Mestre em Engenharia Biomédica; e-mail: kaltinaitis@hotmail.com
5. Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: migueljr4@me.com

Área de conhecimento: Fisiologia de órgãos e tecidos.

Palavras-chave: Caquexia; *Browning*; Células mesenquimais positivas para *Myh11*.

INTRODUÇÃO

A caquexia é uma síndrome crônica multifatorial caracterizada pela redução contínua e involuntária de massa corpórea (tecido muscular e tecido adiposo), que não pode ser revertida por suporte nutricional convencional. Na síndrome caquética, estudos mostram que o tecido adiposo branco (TAB) é precocemente afetado, fato que resulta em uma série de modificações morfofuncionais que resultam no remodelamento deste tecido. Além disso, mais recentemente, foi observado um aumento na população de células adiposas no TAB com características morfofuncionais similares aos adipócitos marrons, que são presentes no tecido adiposo marrom (TAM). Estes são denominados adipócitos “*bege*”, tipo celular resultante de um fenômeno conhecido como “*browning*” do TAB. Classicamente, este fenótipo foi descrito em resposta a um estímulo adrenérgico, como, por exemplo, a exposição prolongada ao frio, e, mais recentemente, foi descrito na síndrome caquética. Como resultados, estas células aumentam a capacidade termogênica e metabólica do TAB. No entanto, ainda não se sabe se esse fenômeno é ocasionado pela transdiferenciação de adipócitos brancos, ou se os adipócitos beges emergem de células precursoras através de um processo denominado adipogênese *de novo*, ou ambos. Estudos recentes demonstram que células murais (como músculo liso vascular e pericitos) residentes no TAB são importantes progenitoras de adipócitos beges após exposição ao frio. Por outro lado, pouco se sabe acerca da possível participação destas células murais na origem das células bege na síndrome caquética. Diante disso, este projeto visa verificar a participação de células tronco mesenquimais positivas para *Myh11* na diferenciação de adipócitos bege induzidos pela caquexia associada ao câncer.

OBJETIVOS

Geral

Investigar o potencial de diferenciação de células precursoras de músculo liso positivas para *Myh11* em células beges induzidas pela caquexia associada ao câncer.

Específicos

- Avaliar o remodelamento do TAB sob seus aspectos morfológicos em camundongos portadores de caquexia associada ao câncer (grupo tumor) induzida por células LLC pelo período de 28 dias;

- Verificar a participação das células precursoras de músculo liso na diferenciação de adipócitos brancos em adipócitos bege em camundongos portadores de caquexia associada ao câncer.

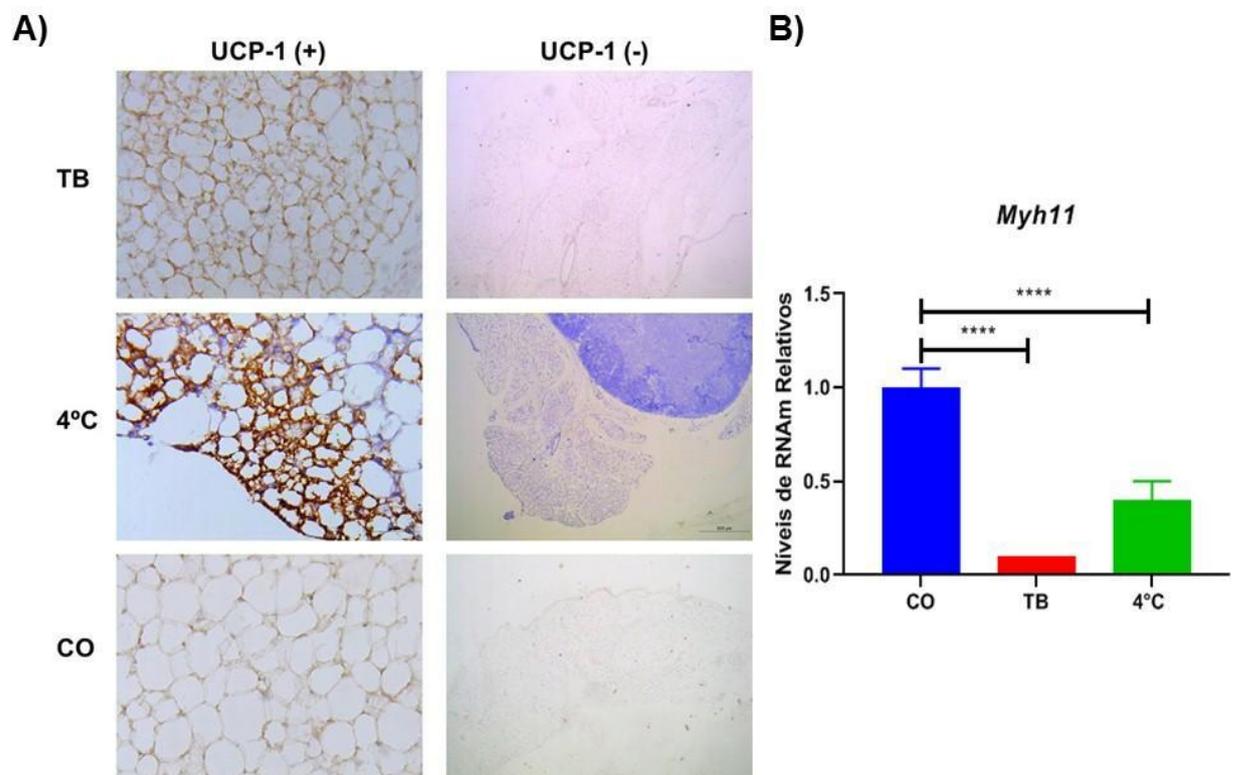
METODOLOGIA

Foram utilizados 15 camundongos machos Wild Type (WT), entre 8 a 10 semanas de vida, divididos em 3 grupos experimentais, sendo eles: Grupo Caquético (TB) (n=8), Grupo Exposto ao Frio Crônico (4°C) (n=3) e Grupo Controle (CO) (n=3). Os animais foram mantidos no biotério central da Universidade de Mogi das Cruzes, acondicionados em gaiolas plásticas com até quatro animais por caixa, 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*. Para a indução tumoral, foram utilizadas células tumorais da linhagem *Lewis Lung Carcinoma* (LLC), injetadas na porção subcutânea no flanco direito dos camundongos do Grupo Caquético (TB) (n=8), na concentração de $3,5 \times 10^5$, em 200ml de meio de cultura (Dulbecco's Modified Eagle's Medium – DMEM). Para indução ao frio, os camundongos do grupo Exposto ao Frio Crônico (4°C) (n=3) foram à princípio aclimatados à uma temperatura média de $15\sim 18^\circ\text{C}$ durante 7 dias e depois alocados em câmara fria em $4\sim 6^\circ\text{C}$ (Frio), onde permaneceram novamente por 7 dias, em ciclos de claro/escuro a cada 12 horas de modo controlado. O grupo teve fornecimento de alimentação e água durante 15 dias. A obtenção dos tecidos foi realizada através da decapitação sem anestesia dos grupos. Foram coletados os tecidos adiposos brancos nos estoques sub-cutâneo inguinal (SC), retroperitoneal (RP), mesentérico (ME) e o estoque de tecido adiposo marrom interescapular (TAM). Os tecidos foram armazenados em fixador HistoChoice® MB em pH 7.4 por 3h. Para a reação de imuno-histoquímica, 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 protéico. 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, seguiu-se com a sequência de desidratação, coloração com H&E e montagem da lâmina com meio sintético Entellan®. As reações de PCR quantitativo foram realizadas utilizando-se o *SYBR Green PCR Master Mix - Applied Biosystems* em um equipamento ABI Prism 7500 *fast Sequence Detection System - Applied Biosystems*. Para a reação foi utilizado 2µl de cDNA da amostra para um volume final de 20µl. O ciclo para as reações de PCR quantitativo foi otimizado iniciando-se com incubações a 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 20 segundos, seguido de anelamento a 60°C por 30 segundos. A especificidade dos produtos amplificados foi analisada pelas curvas de dissociação geradas pelo equipamento. Foram utilizados concomitantemente controles negativos para confirmar a ausência de qualquer tipo de contaminante no meio reacional. Os dados obtidos foram expressos como um limiar de ciclagem (Ct) que representa uma linha de base de detecção de fluorescência, correspondente a fase exponencial. Baseando-se no Ct obtido, estimamos a quantidade inicial de cDNA aplicado nas diferentes amostras. Assim, o valor do Ct está correlacionado com os níveis de mRNA usados na reação. A expressão gênica foi determinada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. Os resultados obtidos foram relativizados pelo gene de controle interno *ribosomal protein L19* (RPL-19). A análise dos dados foi realizada através do *software GraphPad Prism 8* (GraphPad, San Diego, CA, USA). A média \pm erro padrão da média, ou desvio padrão, foram calculados em todas as variáveis usadas. Foi utilizado o teste ANOVA *one-way* Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de *Tukey* para comparação de duas variáveis diferentes. O critério de significância adotado foi de $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o sacrifício dos animais, à princípio foi realizada a técnica de imuno-histoquímica para observar histologicamente a presença de células beges no depósito subcutâneo do TAB através da marcação da proteína UCP-1. Concomitantemente, foi feita a análise de expressão gênica de *Myh11*, a fim de verificar-se a expressão desse gene e relacionar ao processo de formação de novos adipócitos beges a partir de células progenitoras positivas para *Myh11*, e, comparar com o modelo clássico de indução de *Browning* (exposição do frio crônico) e o grupo controle.

Figura 1 – Análise imuno-histológica do TAB do estoque subcutâneo para averiguação do fenótipo de *Browning* e expressão gênica de *Myh11*.



A) IHC para marcação da proteína UCP-1 no TAB subcutâneo (SC) em todos os grupos. Escala de aumento utilizada: 50 μ m para UCP-1 (+) e 500 μ m para UCP-1 (-). **B)** Razão da expressão gênica de *Myh11* em relação ao *Rpl-19*. Os resultados estão expressos em média (n=3) \pm desvio padrão da média. A análise estatística foi feita utilizando *Anova one way*, seguido de pós-teste *Tukey*; ****p \leq 0,0001. Camundongo caquético – TB; Exposto ao frio crônico – 4°C; Controle – CO.

Foi possível observar qualitativamente o aparecimento de adipócitos beges nas amostras de TAB subcutâneo dos grupos TB e, majoritariamente, 4°C. Isso se deu através da marcação da proteína UCP-1, que, quando expressa de forma ectópica no TAB, indica a presença de adipócitos beges no tecido, o que caracteriza o fenômeno de *Browning*, além da formação de adipócitos multiloculares infiltrados no tecido comparados com o grupo controle, o qual apresenta adipócitos uniloculares e sem marcação para a proteína analisada. Através da análise de expressão gênica foi possível observar uma diminuição na expressão de *Myh11*, principalmente no grupo TB, quando comparado com o grupo controle. Esse resultado pode indicar que células progenitoras positivas para *Myh11* presentes no TAB se comprometeram a se diferenciar em células de linhagem adipogênica, especificamente adipócitos beges. Dados já sugerem que durante o processo de diferenciação de células beges que expressam

Myh11, há uma redução na expressão desse gene relacionado à sua assinatura muscular lisa. Além disso, curiosamente, segundo um estudo recente, foi observado *in vitro* que pacientes portadores de câncer pancreático associado à caquexia são afetados negativamente no fenótipo contrátil de células musculares lisas, de forma que observou-se uma diminuição na expressão de duas proteínas-chave envolvidas no processo de contração desse tipo celular, sendo elas a α -actina de músculo liso (α - SMA) e a α -proteína de músculo liso 22 (SM22 α), além de uma redução significativa na expressão de outra proteína muscular lisa, a actina do músculo liso γ . Apesar de não ter sido analisada a expressão do gene deste estudo em questão, esses dados podem corroborar para a diminuição deste marcador quando comparado não só ao grupo controle (CO), mas principalmente ao grupo frio (4°C), que apresenta quantitativamente mais expressão de *Myh11* e mais marcação da proteína UCP-1 que o grupo caquético (TB).

CONCLUSÃO

A origem das células beges ainda não é bem compreendida e continua em debate, visto que o fenômeno de *Browning* é controverso e são necessárias ferramentas adicionais para marcar e manipular progenitores de adipócitos beges. Contudo, neste estudo pode-se observar que houve redução na expressão de *Myh11* nos grupos 4°C e TB quando comparados com o grupo CO, fator que pode indicar o comprometimento na diferenciação de células progenitoras positivas para *Myh11* para adipócitos beges.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BATISTA, M. L., JR.; OLIVAN, M.; ALCANTARA, P. S.; SANDOVAL, R.; PERES, S. B.; NEVES, R. X.; SILVERIO, R.; MAXIMIANO, L. F.; OTOCH, J. P.; SEELAENDER, M. Adipose tissue-derived factors as potential biomarkers in cachectic cancer patients. **Cytokine**, v. 61, n. 2, p. 532-539, 2013.

BERRY, D. C.; JIANG, Y.; GRAFF, J. M. Mouse strains to study cold-inducible beige progenitors and beige adipocyte formation and function. **Nat Commun**, v. 7, n., p. 10184, 2016.

FEARON, K. C. The 2011 ESPEN Arvid Wretling lecture: cancer cachexia: the potential impact of translational research on patient-focused outcomes. **Clin Nutr**, v. 31, n. 5, p. 577- 582, 2012.

HENRIQUES, F.; LOPES, M. A.; FRANCO, F. O.; KNOBL, P.; SANTOS, K. B.; BUENO, L. L.; CORREA, V. A.; BEDARD, A. H.; GUILHERME, A.; BIRBRAIR, A.; PERES, S. B.; FARMER, S. R.; BATISTA, M. L., JR. Toll-Like Receptor-4 Disruption Suppresses Adipose Tissue Remodeling and Increases Survival in Cancer Cachexia Syndrome. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 18024, 2018.

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.

LONG, J. Z.; SVENSSON, K. J.; TSAI, L.; ZENG, X.; ROH, H. C.; KONG, X.; RAO, R. R.; LOU, J.; LOKURKAR, I.; BAUR, W.; CASTELLOT, J. J., JR.; ROSEN, E. D.; SPIEGELMAN, B. M. A smooth muscle-like origin for beige adipocytes. **Cell Metab**, v. 19, n. 5, p. 810-820, 2014.

MCGOWN, C.; BIRERDINC, A.; YOUNOSSI, Z. M. Adipose tissue as an endocrine organ. **Clin Liver Dis**, v. 18, n. 1, p. 41-58, 2014.

