

CARACTERIZAÇÃO DO REMODELAMENTO DO TECIDO ADIPOSEO, ATROFIA MUSCULAR E INFLAMAÇÃO EM MODELO EXPERIMENTAL DE CAQUEXIA COM VISTAS AO ESTUDO DO MICROBIOMA

Lucas de Moura Carvalho¹; Yara N. L. Faustino de Maria², David A. Barbosa³, Ana Carolina Humberto⁴, Fabiano B. Menegidio⁵, Regina Costa de Oliveira⁶; Luiz R. Nunes⁷, Daniela Leite Jabes⁸.

1. Estudante do curso de Biomedicina; e-mail: lucas.mc03@gmail.com
2. Mestranda na Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: yaralima07@gmail.com
3. Doutorando na Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: aciole.d@gmail.com
4. Estudante do curso de Ciências Biológicas; e-mail: anacarol.dracarys@gmail.com
5. Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: fabianomenegidio@umc.br
6. Professora; e-mail: reginaco@umc.br
7. Professor; e-mail: nunes1212@gmail.com
8. Professora da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: danielajabes@umc.br

Área do Conhecimento: Genética Molecular e Biologia Tecidual.

Palavras-chave: Caquexia, Atrofia, Inflamação, Remodelamento Tecidual.

INTRODUÇÃO

A caquexia é reconhecida como uma síndrome metabólica associada a diversas doenças, como câncer, doença renal crônica e doenças cardíacas crônicas, entre outras (WILLIAM *et al.*, 2008; FEARON *et al.*, 2011). Caracteriza-se pela redução de massa muscular, depleção de estoques de tecido adiposo e quadro de inflamação crônica generalizada (TISDALE *et al.*, 2008; BATISTA *et al.*, 2013). A etiologia da caquexia ainda permanece desconhecida, mas está diretamente relacionada à redução da massa muscular e depleção dos estoques de gordura. Nesse sentido, o principal marcador clínico da síndrome é a redução da massa corpórea total sem causa clínica aparente, que afeta inicialmente os depósitos de tecido adiposo branco e o tecido muscular esquelético. Dentro desse contexto, atualmente, destaca-se o importante papel do tecido muscular, uma vez que se configura como o tecido mais precocemente afetado pela síndrome. Além disto, devido à acentuada diminuição muscular, sendo ela localizada ou sistêmica, eleva-se a mortalidade de pacientes com câncer, que podem apresentar quadros relacionados à insuficiência respiratória, devido a diminuição de tônus do diafragma e músculo cardíaco. Diante do exposto, é evidente que a caracterização da caquexia é complexa, e, portanto, faz-se necessário avaliar, além dos dados de perda de massa corpórea total, outras variáveis, tais como dados referentes a alterações na massa muscular, massa do TAB, bem como a expressão de marcadores de atrofia muscular e marcadores de inflamação de maneira a obter uma caracterização mais completa do quadro. Recentemente, nos propusemos a identificar e analisar a composição da microbiota intestinal de camundongos C57BL/6 durante o desenvolvimento da caquexia induzida por transplante de células LLC. Os animais foram então acompanhados por 28 dias, sendo sacrificados ao final deste período, com extração de tecido adiposo e muscular. Para avaliar o desenvolvimento da caquexia, foram obtidos dados da massa corporal diários, ao longo de todo o período experimental. Dentre estes animais, obtivemos 8 animais controle, 8 animais caquéticos e 10 portadores de tumor. Desta forma, considerando a complexidade da síndrome da caquexia associada ao câncer, em particular, o papel dos ajustes imunometabólicos durante o seu desenvolvimento, é de extrema valia a classificação mais completa dos parâmetros morfofuncionais e do perfil de expressão gênica de marcadores de atrofia e

inflamação em tecido adiposo e muscular dos camundongos C57BL/6 que foram submetidos há caquexia induzida, especialmente no que se refere a identificação mais completa dos camundongos caquéticos e dos portadores de tumor.

OBJETIVOS

Avaliar o remodelamento do tecido adiposo, tecido muscular e o perfil de expressão gênica de marcadores de inflamação e atrofia muscular em tecidos de camundongos submetidos ao transplante de células LLC com vistas a uma classificação completa daqueles animais portadores de tumor (TB) e com caquexia (CAQ).

METODOLOGIA

As amostras de tecido adiposo foram armazenadas em fixador em pH 7,4 por 3 h, em seguida foram desidratados com concentrações crescentes de álcool: 70, 95 e 100%. Após a desidratação, foram clareadas com banhos de xilol e parafinizados em parafina Paraplast X-tra e emblocados em *Tissue Cassetes*. As amostras foram cortadas no micrótomo rotativo em cortes de 5 µm de espessura que foram sobrepostos em lâminas para microscopia. Para a desparafinização as amostras foram submetidas a 2 banhos de 30 min com xilol, seguidos de hidratação em banhos de 5 min em álcool 100, 95 e 70% respectivamente, e corados, por fim lavados com água destilada corrente. A coloração com H&E foi realizada logo após na seguinte sequência: (i) 3 min com hematoxilina; (ii) 5 s com eosina, seguidos de hidratação em banhos de 5 min em álcool 95%, 10 min em álcool 100% e 10 min em xilol, por fim secados em temperatura ambiente. Após coloração as lâminas foram fechadas com Entellan®. As análises histológicas foram realizadas utilizando imagens digitalizadas e obtidas com um microscópio óptico, com câmera. Para cada corte histológico, foram capturadas 5 imagens por animal. Para estas análises morfométricas, de tecido adiposo foram consideradas a área média de 100 adipócitos por animal. Para a análise histométrica de fibras musculares utilizou-se o software imagej, logo as imagens capturadas tiveram o contraste aumentado em 0,5% e foram convertidas para cor binária e contabilizadas (porcentagem de fibras musculares preenchidas) dentro de 4 transectos lineares. O anticorpo utilizado para a reação de imunohistoquímica foi anti-TNF- α , empregando seus respectivos controles positivos e negativos. A recuperação antigênica das amostras foi realizada pela indução de calor úmido por 50 min a 93°C, com a solução tampão de citrato a pH 6. Em seguida realizou-se o bloqueio proteico com a solução 10% GOAT com 1% de BSA por 2 horas. Foram utilizados os anticorpos primários específicos para o marcador de inflamação sistêmica TNF- α , em incubação overnight a 4°C. Após a incubação, foi aplicado o bloqueio da peroxidase utilizando a solução do kit DAB Reagent Set por 15 min e o bloqueio com anticorpo secundário utilizando a solução MAX PO. Realizou-se a revelação das lâminas com o cromógeno DAB; a contra-coloração com hematoxilina por 3 min e reidratação dos tecidos com 5 min em álcool 95%, 5 min em álcool 100% e 10 min em xilol. Para a obtenção das imagens, bem como análise qualitativa dos tecidos processados, foi utilizado um microscópio óptico, com câmera. Para a realização da análise de expressão gênica por qPCR, utilizou-se para o isolamento do RNA o kit RNeasy® Lipid Tissue – para tecido adiposo e RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit para o tecido muscular. Para a reação de transcrição reversa foram utilizados 120 ng de RNA em amostras de tecido adiposo e 200 ng de RNA total de tecido muscular em um volume final de 10 µL. A reação foi conduzida por meio do kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription, de acordo com as recomendações do fabricante, em aparelho termociclador. As condições para a reação foram 25°C por 10 min, 37°C por 120 min e 85°C por 5 min. Por fim, para a reação de qPCR foi utilizado 5X HOT FIREPol EvaGreen qPCR SuperMix. Para a reação foi utilizado 1 µL de cDNA sintetizado da etapa transcrição reversa, para um volume final da reação de 10 µL. As condições para a reação foram de 50°C por 20 s, 95°C por 15 min e 40 ciclos a 95°C por 20 s, seguido de 60°C por 30 s e 72°C por 30 s. Os dados obtidos a partir da reação de qPCR foram expressos como um limiar de ciclagem (Ct), que representa uma linha de base

de detecção de fluorescência. Os *primers* selecionados para realizar os ensaios foram os responsáveis por amplificar os genes: IL-6, IL-6r, Atrogina-1, F4/80, CCL2, HSL, FAS, bem como os genes RPL19 e GAPDH, utilizados como controles endógenos para a validação dos dados.

RESULTADOS /DISCUSSÃO

Com relação às análises morfométricas realizadas no tecido muscular gastrocnêmio, nossos dados mostram que os animais caquéticos apresentam redução de suas fibras musculares quando comparados ao grupo controle ($p < 0,0001$). Animais portadores de tumor, por sua vez, não apresentam o perfil de atrofia verificado nos animais caquéticos, indicando que seu tecido muscular se apresenta distinto tanto do animal controle (sem atrofia), como do animal caquético. Embora poucos estudos abordem essa respectiva classificação e abordagem entre os grupos de animais caquéticos e portadores de tumor, é cada vez mais evidente os mecanismos de remodelamento do tecido muscular, quando acometidos à um quadro de caquexia associada ao câncer. Diante disto, Xi et al. (2016) avaliaram a atrofia muscular frente ao tratamento com mitofusina-2 em camundongos BALB/c submetidos à caquexia induzida por inoculação de células HCT116. O estudo explana em um dos resultados apresentados por microscopia de amostras do músculo gastrocnêmio fixadas e coradas em H&E, que animais com caquexia apresentaram fibras musculares com cerca de 30 μm de diâmetro em relação ao grupo controle, com cerca de 55 μm de diâmetro. Surpreendentemente, os animais caquéticos tratados com reposição de Mfn-2, demonstraram atenuação no quadro de atrofia muscular, com cerca de 45 μm de diâmetro em suas fibras, o que leva a inferir que o papel potencial da proteína Mfn-2 pode estar diretamente ligado à manutenção e preservação da matriz muscular. Até o momento, sabe-se que ela está diretamente relacionada ao funcionamento mitocondrial, em particular do músculo esquelético, o que seria peça-chave para seu respectivo desempenho energético. No mesmo ano, Mu e colaboradores, em um trabalho com indução de caquexia por transplante de células K7M2 em camundongos C57BL/6, também avaliaram a atrofia muscular, apresentando resultados semelhantes aos obtidos em nossas análises, no qual animais caquéticos parecem possuir menor quantidade de fibras musculares (cerca de 0,75 μm de diâmetro), quando comparados aos animais controle, com 1 μm de diâmetro. Além da coloração por H&E nosso estudo para análise das fibras musculares contou também com a metodologia de conversão de cores binárias que foram contabilizadas (porcentagem de fibras musculares preenchidas) avaliando-se 4 transectos lineares por lâmina. Este método é apresentado por Varian et al. (2016), que de maneira similar, avaliaram se dietas a base de *L. reuteri* eram capazes de reduzir índices sistêmicos de inflamação e inibir a perda de massa muscular, comumente presente em condições de senilidade de camundongos da linhagem CD-1. Surpreendentemente, ao avaliar por microscopia as fibras musculares preenchidas nos campos por conversão binária, os animais tratados com o probiótico apresentaram maior quantidade (~2x) de fibras musculares, quando comparados aos animais que não receberam a suplementação. Apesar de seguirmos o método qualitativo por imunohistoquímica, avaliando o marcador inflamatório TNF- α , em amostras de tecido adiposo retroperitoneal aos grupos experimentais estudados, não obtivemos sucesso ao visualizar por microscopia as amostras fixadas em lâmina, uma vez que não houve marcação da citocina. Achados em literatura tem indicado resultados de maior conclusividade, como por exemplo o projeto conduzido por Henriques et al. (2017), que apresentou uma análise translacional do tecido adiposo mesentérico de pacientes (n=12) com quadro de câncer gastrointestinal associado a caquexia, e com o modelo experimental utilizando Ratos Wistar, cuja a caquexia foi induzida por injeção de células tumorais Walker 256. Interessantemente, ao avaliarem os níveis plasmáticos de TNF- α em ratos caquéticos, observaram um aumento (2x) dos níveis, em comparação ao grupo de animais controles, o que sugere uma possível ruptura imunometabólica, sendo indicativa por uma acentuada presença de células inflamatórias, assim como o efeito lipolítico ocasionado por esta citocina em toda matriz adiposa. Desta forma, para investigar se tais achados se demonstravam

alinhados ao modelo animal proposto, o grupo verificou pelo método qualitativo de imunohistoquímica a marcação de TNF- α nas amostras de tecido adiposo dos pacientes caquéticos e portadores de tumor, e de fato encontraram três perfis de marcação: (i) indivíduos saudáveis não apresentaram marcação desta citocina, (ii) indivíduos portadores de tumor, demonstraram presença de caráter intermediário de marcação desta citocina; (iii) indivíduos com quadros de caquexia possuem acentuada marcação em sua matriz celular, logo o que valida os dados obtidos por análise sorológica realizada. Com relação aos dados de expressão gênica da Atrogina-1, principal marcador de atrofia muscular de caquexia, foi possível identificar que os níveis de expressão aumentam gradativamente e de maneira estatisticamente significativa entre controles e portadores de tumor, e entre portadores de tumor e caquéticos ($p=0,04$). Dados de atrofia muscular em animais caquéticos são esperados, já que é característica marcante do paciente acometido pela caquexia, no entanto, a caracterização de grupos portadores de tumor em modelo experimental de caquexia por indução de células LLC em camundongos C57BL/6 é inédita na literatura e, nesse sentido, as análises histométricas aliadas aos dados de expressão gênica indicam que os animais portadores de tumor apresentam perfil de atrofia muscular intermediário entre aquele observado em animais saudáveis e caquéticos. Yuan et al. (2015), demonstraram que a Atrogina-1 e a MuRF-1 parecem estar super expressas em indivíduos com caquexia associada ao câncer em relação ao grupo de pacientes portadores de tumor. Adicionalmente, os autores demonstraram em modelo experimental, utilizando camundongos BALB/c, submetidos a indução de câncer por células tumorais (C26), que o gene Atrogina-1, quando silenciado, protege os miofibrilos da atrofia induzida por TNF- α . Ao verificar a expressão do gene IL6-r, houve diferença estatística entre animais do grupo controle e caquético ($p=0,02$) e entre controle e TB ($p=0,01$). Entretanto, quando comparamos os grupos de animais TB e caquéticos, ambos possuem superexpressão do gene receptor de IL6. Mediadores inflamatórios, incluindo IL-6, desempenham papéis importantes em vários eventos durante a inflamação e também estão envolvidos no desenvolvimento e progressão de vários tipos de câncer. É possível que essa interleucina pró-inflamatória, super-expressa tanto nos animais caquéticos quanto nos animais TB, seja associada a presença do tumor, independente do quadro caquético. Inclusive, é sabido que a IL-6 é uma citocina pleiotrópica com uma ampla gama de ações biológicas, incluindo função imune, metabolismo, hematopoiese e oncogênese e pode apresentar funções pró e anti-inflamatórias, dependendo da condição. Com relação às análises morfológicas e histométricas realizadas no tecido adiposo, também foi possível diferenciar o animal portador de tumor do animal caquético, que demonstra um padrão de área de adipócitos diferente entre os animais caquéticos ($p<0,05$) quando comparados aos animais portadores de tumor. Estes resultados também foram descritos por Batista et al. (2016), quando avaliaram o perfil de remodelamento de tecido adiposo em pacientes com caquexia associada ao câncer gastrointestinal, demonstrando que indivíduos portadores de tumor possuíam maior depósito de tecido adiposo quando comparados ao grupo caquético.

CONCLUSÕES

Finalmente, é possível inferir que os objetivos aqui propostos por este projeto foram alcançados, de modo que ao realizar as análises histológicas, sendo elas em tecidos adiposos ou musculares de camundongos, submetidos a caquexia induzida por células LLC, foi possível identificar o remodelamento da matriz celular, assim como indicar as diferenças morfométricas e anatomopatológicas entre o grupo de animais caquéticos e os animais portadores de tumor. Logo, ao realizar a metodologia de qPCR, os resultados demonstraram-se congruentes ao que é descrito em literatura, destacando-se o marcador de inflamação sistêmica, IL-6r e de atrofia muscular, Atrogina-1, que aqui demonstram-se em maior nível de expressão do grupo de animais caquético, quando comparados aos grupos controle e portadores de tumor. Além disto, é evidente que os dados representativos dos animais portadores de tumor são inéditos, uma vez que definem um caráter intermediário de atrofia e quadro de inflamação, quando

comparados aos outros grupos. Dessa forma, nossos dados em conjunto, apresentados nesse relatório final, são inovadores ao realizar a caracterização do remodelamento do perfil tecidual e molecular entre animais com caquexia associada ao câncer e animais TB.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BATISTA, M. L. *et al.* Adipose tissue-derived factors as potential biomarkers in cachectic cancer patients. **Cytokine**, v. 61, n. 2, p. 532-539, 2013.

BATISTA, M. L. *et al.* Cachexia-associated adipose tissue morphological rearrangement in gastrointestinal cancer patients. **Journal of cachexia, sarcopenia and muscle**, v. 7, n. 1, p. 37-47, 2016.

FEARON, K. *et al.* Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. **The lancet oncology**, v. 12, n. 5, p. 489-495, 2011.

HENRIQUES, F. S. *et al.* Early suppression of adipocyte lipid turnover induces immunometabolic modulation in cancer cachexia syndrome. **The FASEB Journal**, v. 31, n. 5, p. 1976-1986, 2017.

MU, X. *et al.* Notch signaling mediates skeletal muscle atrophy in cancer cachexia caused by osteosarcoma. **Sarcoma**, v. 2016, 2016.

TISDALE, J. M. Cachexia in cancer patients. **Rev. Cancer**, v.2, p.862-871, 2008.

VARIAN BJ, *et al.* Beneficial bacteria inhibit cachexia. **Oncotarget**. v.. 7,11 (2016).

WILLIAM, J. *et al.* Cachexia: a new definition. **Clin Nutr**, v. 27, p. 793-799, 2008.

XI, Q. *et al.* Mitofusin-2 prevents skeletal muscle wasting in cancer cachexia. **Oncology letters**. v..12,5 2016.

YUAN, Lei *et al.* Muscle-specific E3 ubiquitin ligases are involved in muscle atrophy of cancer cachexia: an in vitro and in vivo study. **Oncology reports**, v. 33, n. 5, p. 2261-2268, 2015.

AGRADECIMENTOS

A UMC e FAPESP pelo apoio durante o desenvolvimento do projeto, aos amigos, colegas e professores pelo incentivo e pelo aprendizado.