

AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DE ADIPÓCITOS BEGE PELA CAQUEXIA ASSOCIADA AO CÂNCER EM ADIPÓCITOS NOCAUTES PARA TLR4

Luís Felipe Galvão Valdivia¹; Miguel Luiz Batista Júnior²

1. Estudante do Curso de Biomedicina; e-mail: luisfelipe.gvaldivia@gmail.com
2. Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: migueljr4@me.com

Área do conhecimento: Biologia Tecidual, Fisiologia de Órgãos e Sistemas

Palavras-chave: Caquexia; Tecido Adiposo; *Browning*; TLR4.

INTRODUÇÃO

A caquexia é uma síndrome multifatorial, relacionada à inflamação sistêmica, caos metabólico e principalmente com a redução contínua de massa adiposa e muscular esquelética (BATISTA *et al.*, 2013; BATISTA *et al.*, 2012;). O tecido adiposo (TA) encontra-se precocemente afetado pela síndrome e tem papel importante no seu desenvolvimento (SEELAENDER; BATISTA, 2014). Sendo considerado um órgão heterogêneo dividido em TA branco (TAB) e TA marrom (TAM), cada qual com suas características morfológicas e metabólicas distintas (BATISTA *et al.*, 2012). O remodelamento do TA é o resultado final de um conjunto de alterações morfofuncionais que acometem este tecido (BATISTA *et al.*, 2012). Recentemente o *browning* tem sido apontado como principal processo de remodelamento do TA, contribuindo com a evolução do quadro caquético pelo excessivo gasto energético e o aumento das taxas de lipólise (HENRIQUES *et al.*, 2018). No entanto, pouco se sabe sobre a sua origem. Existem indícios sugerindo que o aumento dos processos inflamatórios em decorrência da alta liberação de citocinas secretadas pelo tumor e pelo TA sejam potenciais causadores deste fenômeno (HENRIQUES *et al.*, 2018). Estudos do nosso grupo de pesquisa e de outros autores mostraram que os animais nocautes para TLR4 sistêmico reduziram a atividade inflamatória (HENRIQUES *et al.*, 2018), atenuaram o processo de *browning* (HENRIQUES *et al.*, 2018), diminuíram a atrofia muscular (ZHANG *et al.*, 2017), tiveram aumento de sobrevida (CANNON *et al.*, 2007), aumento de massa magra e gordurosa (CANNON *et al.*, 2007), diminuição de citocinas pró-inflamatórias no soro (HENRIQUES *et al.*, 2018), entre outros. Conseqüentemente, amenizando os efeitos da caquexia associada ao câncer. Neste cenário, pode-se depreender que além da atenuação da inflamação sistêmica induzida pela caquexia, a atenuação de importantes eventos metabólicos no TA, como redução da lipólise e da indução do fenótipo de *browning*, são fenômenos descritos recentemente e que impactam na magnitude da disfunção do TA. Além disso, estudos do nosso grupo de pesquisa, publicados recentemente, demonstraram que o tratamento farmacológico com Atorvastatina, um antagonista de TLR4, aumentou a sobrevida de animais portadores de tumor LLC, além de atenuar a redução de massa corporal e o remodelamento do TA (HENRIQUES *et al.*, 2018). Neste sentido, a fim de estudarmos o papel da deleção específica (condicional) do TLR4 nos adipócitos, o presente projeto propõe a avaliação dos efeitos da deleção do TLR4 por meio do sistema CRE-Lox e a repercussão deste aspecto no remodelamento do TA frente a síndrome de caquexia.

OBJETIVOS

Avaliar o papel do *Toll-Like Receptor 4* no remodelamento do tecido adiposo durante a síndrome da caquexia associada ao câncer em animais nocautes adipócito-específico. Principalmente nos aspectos metabólicos dos processos inflamatórios e termogênicos, além dos aspectos morfofuncionais do tecido adiposo.

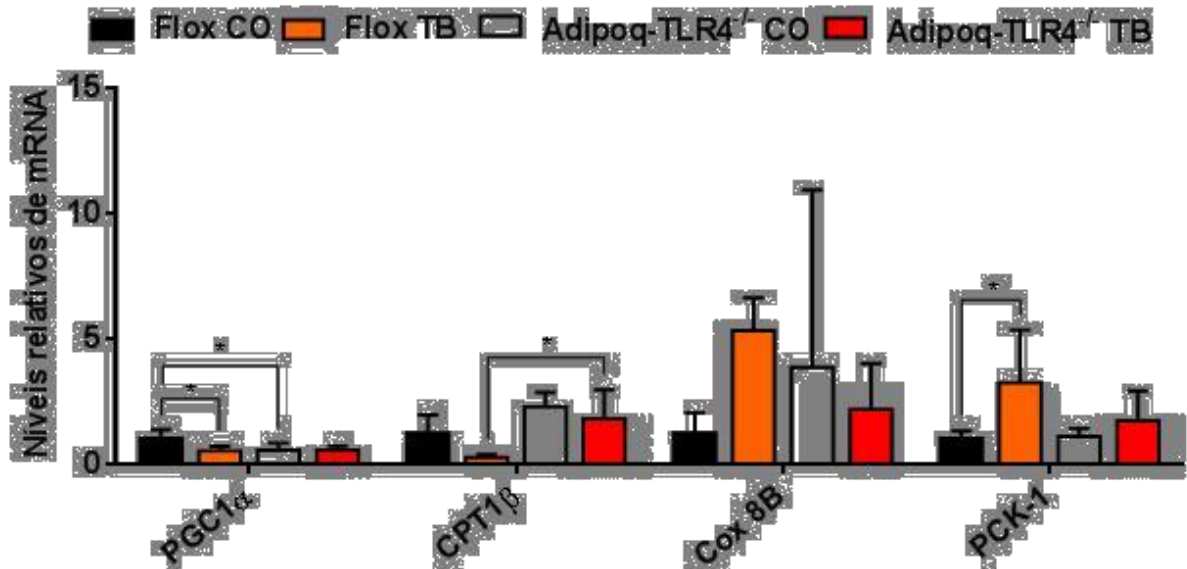
METODOLOGIA

Foram utilizados 30 camundongos machos entre 8 e 10 semanas, de linhagem C57BL/6 (CEUA 007/2018) nocautes para TLR4 obtidos através do cruzamento de animais B6(Cg)-Tlr4^{tm1.1Karp}/J e B6; FVB-Tg (Adipoq-cre)1Evdr/J pelo sistema CRE-Lox. Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais: 1) B6(Cg)-Tlr4^{tm1.1Karp}/J Controle (Flox CO, n=5); 2) B6(Cg)-Tlr4^{tm1.1Karp}/J Tumor (Flox TB, n=4); 3) B6;FVB-Tg (Adipoq-cre)1Evdr/J Controle (Adipoq-TLR4^{-/-} CO, n=5) 4) B6;FVB-Tg (Adipoq-cre)1Evdr/J Tumor (Adipoq-TLR4^{-/-} TB, n=7). A indução tumoral foi realizada com células LLC e posteriormente, foi contado 28 dias até o final do período experimental. Após a eutanásia, o soro foi extraído e os tecidos adiposos e musculares foram dissecados e armazenados para análises posteriores de expressão gênica e proteica. Para a análise estatística foi utilizado o *software GraphPad Prism 6*, utilizando teste ANOVA *two-way* e pós-teste *Tukey*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados obtidos até o presente momento, apresentados no relatório parcial, a deleção adipócito-específica do receptor TLR4 parece não contribuir de forma significativa na instalação da síndrome da caquexia nos animais portadores de tumor, diferentemente do que ocorre na deleção global do receptor TLR4 (HENRIQUES *et al.*, 2017). No entanto, o tecido adiposo geralmente mais afetado na síndrome da caquexia é o TAEP, o qual se encontra preservado nos animais com deleção adipócito-específica, sugerindo uma possível preservação na massa do tecido durante a síndrome nesses animais (BATISTA *et al.*, 2012). Outros dados importantes apresentados previamente foram de expressão gênica das proteínas UCP-1 e CIDEA, ambas envolvidas diretamente e indiretamente ao processo do *browning* do TA. Nesses resultados, foi observado que nenhum dos grupos apresentou diferenças significativas na expressão de UCP-1, como ocorre normalmente sob as mesmas condições experimentais (HENRIQUES *et al.*, 2018). No entanto, diversos estudos apontam que na fase final da caquexia, os níveis de UCP-1 não estão necessariamente elevados (KIR *et al.*, 2014). Para o gene CIDEA, os animais portadores de tumor e com a deleção adipócito-específica, não apresentaram diferenças significativas quando comparados aos seus controles. Esses dados podem contribuir com uma possível preservação do remodelamento do TA nos animais nocautes. Começando com os marcadores de remodelamento do TA, sendo eles PGC1 α e CPT1 β (Figura 1), e para a avaliação dos processos metabólicos de oxidação de ácidos graxos, reesterificação de gordura entre outros, foram verificados os níveis de expressão gênica para Cox8B e PCK-1 (Figura 1) (HENRIQUES *et al.*, 2018). O PGC1 α foi menos expresso nos grupos Flox TB e Adipoq-TLR4^{-/-} CO quando comparados com Flox CO (respectivamente 50% menor p=0.02 e 54% menor p=0.03). O PGC1 α é descrito por ser um importante gene para a expressão de UCP-1 no TAB (RUTKOWSKI *et al.*, 2015). Neste estudo, a expressão deste gene está diminuída nos grupos Flox TB e Adipoq-TLR4^{-/-}CO quando comparados ao grupo Flox CO. No estudo de Henriques *et al.*, (2018) este gene não apresentou diferenças entre os grupos TB. A expressão do CPT1 β do grupo Adipoq-TLR4^{-/-} TB mostrou um aumento de 6 vezes (p=0.03) quando comparado ao grupo Flox TB, o que pode indicar que os animais deste grupo estão sofrendo uma maior oxidação lipídica (MORAES *et al.*, 2017). Foi observado aumento de 3,1 vezes (p=0.04) na expressão de PCK-1 no grupo Flox TB em comparação ao seu respectivo controle, o que pode indicar que a reesterificação de gordura pode estar afetada neste grupo, diferentemente do que é observado no grupo Adipoq-TLR4^{-/-}. Não foi detectada diferença na expressão gênica de Cox 8B. Demonstrado os principais marcadores de remodelamento do TA, é necessário ainda apresentar os marcadores de atividade inflamatória no tecido, uma vez que o TLR4 possui um papel fundamental na inflamação. Os genes marcadores de atividade inflamatória analisados foram TNF α , IL-6, CD68 e F4/80. Para os genes do TNF α e da IL-6, os principais marcadores inflamatórios, ambos os grupos não apresentaram diferenças significativas entre si, diferentemente do que é visto por alguns

autores sob condições semelhantes: Henriques et al (2018) apesar de não apresentar expressão gênica de TNF α , observou níveis significativos da proteína no tecido através da técnica de imunohistoquímica em animais nocaute global; e Zhang et al (2017) apresentou uma preservação da atividade inflamatória com a proteínas TNF α e IL-6 nos animais mutantes portadores de tumor em comparação ao selvagem portador de tumor.



Para o gene CD68, o grupo Flox TB apresentou expressão 45% menor ($p=0.02$) em comparação ao seu controle. Para os animais mutantes, nenhuma diferença significativa foi observada. De acordo com Batista et al (2012), os níveis relativos de CD68 são maiores à medida em que a caquexia avança nos animais portadores de tumor. No caso do F4/80, é observado um aumento de até 6 vezes ($p=0.03$) nos níveis de expressão do grupo Flox TB em relação ao seu controle. Novamente para os animais mutantes, não são observadas diferenças entre si. Levando-se em consideração os níveis não significativos no grupo Adipoq-TLR4^{-/-} TB, existe a hipótese de que os animais mutantes sofrem uma preservação da ação inflamatória devido à deleção do TLR4, quando comparados ao seu controle.

CONCLUSÕES

De acordo com os dados coletados até o momento, a hipótese de que a deleção adipócito-específica do receptor TLR4 parece afetar o remodelamento do TA sem uma evidente atenuação do desenvolvimento da síndrome da caquexia associada ao câncer ainda pode ser plausível. Aparentemente o TA de animais mutantes sofre um remodelamento distinto do remodelamento clássico visto na literatura em animais selvagens e até dos animais com a deleção global de TLR4, visto que em alguns aspectos, o tecido é preservado, em outros, não são demonstradas diferenças significativas entre os grupos. No entanto, um dado importante é que nenhum dos ensaios apresentados (tanto nos resultados parciais quanto nos finais) demonstrou uma piora no quadro da caquexia nos animais mutantes, com a exceção do gene CPT1 β , que demonstra uma possível oxidação lipídica mais expressiva. Diferentemente do que é observado nos animais selvagens portadores de tumor, onde em diversos experimentos que avaliam aspectos diferentes demonstraram estarem mais afetados com a presença da caquexia associada ao câncer. Portanto, apesar da necessidade de resultados mais significativos entre os grupos analisados, chegamos a conclusão de que os animais com a deleção adipócito-específica sofrem uma menor ação dos sintomas clássicos da caquexia, possuindo resultados na maioria das vezes iguais ao seu controle. Por fim, torna-se necessário um maior número de experimentos para caracterizar e avaliar com maior

precisão o remodelamento do TA que os animais com a deleção adipócito-específica do TLR4 podem sofrer durante a síndrome da caquexia associada ao câncer.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BATISTA, M.L., Jr., et al., **Adipose tissue-derived factors as potential biomarkers in cachectic cancer patients**. *Cytokine*, 2013. 61(2): p. 532-9.

BATISTA, M.L., Jr., et al., Adipose tissue-derived factors as potential biomarkers in cachectic cancer patients. *Cytokine*, v. 61, n. 1, p. 532-539, 2013.

BATISTA, M.L., Jr., et al., **Heterogeneous time-dependent response of adipose tissue during the development of cancer cachexia**. *J Endocrinol*, 2012. 215(3): p. 363-73.

CANNON, T. Y. et al., **The effect of altered Toll-like receptor 4 signaling on cancer cachexia**. *Archives Of Otolaryngology-Head & Neck Surgery*, 2017. 133(12): p.1263-1269.

FRANCO, F. O., et al., **Cancer cachexia differentially regulates visceral adipose tissue turnover**. *Journal of Endocrinology*, 2017. 232(3): p. 493-500.

HENRIQUES, F., et al., **Toll-Like Receptor-4 Disruption Suppresses Adipose Tissue Remodeling and Increases Survival in Cancer Cachexia Syndrome**. *Scientific Reports*, 2018. 8(1): p. 1-14.

KIR, S., et al., **Tumor-derived PHT-related protein triggers adipose tissue browning and cancer cachexia**. *Nature*, 2014. 513(7516): p. 100-104.

MORAES, Maria N. et al., **Cold-sensing TRPM8 channel participates in circadian control of the brown adipose tissue**. *Molecular Cell Research*, 2017. 346(12): p. 2415-2427.

RUTKOWSKI, Joseph M. et al. **The cell biology of fat expansion**. *The Journal Of Cell Biology*, 2015. 208(5): p. 501-512

SEELAENDER, M.C. and M.L. BATISTA, **Adipose tissue inflammation and cancer cachexia: the role of steroid hormones**. *Horm Mol Biol Clin Investig*, 2014. 17(1): p. 5-12.

ZHANG, G. et al., **Toll-like receptor 4 mediates Lewis lung carcinoma-induced muscle wasting via coordinate activation of protein degradation pathways**. *Scientific Reports*, 2017. 7(1): p.1-8.