

O PAPEL DO PERICITO TIPO 1 NA DIFERENCIAÇÃO PARA ADIPÓCITOS BEGES EM CAMUNDONGOS PORTADORES DE CAQUEXIA ASSOCIADA AO CÂNCER

Ana Júlia de Oliveira Machado¹, Eduarda Vieira da Silva², Juli Raquel da Silva Ferreira³, Kaltinaitis B. N. H. dos Santos⁴, Miguel Luiz Batista Júnior⁵.

1. Estudante do Curso de Biomedicina; e-mail: ana.julia.oliveira369@gmail.com¹
2. Estudante do Curso de Farmácia; e-mail: eduarda.vieira.slv@gmail.com²
3. Estudante do Curso de Farmácia; e-mail: juliraquel8@gmail.com³
4. Doutorando no PPG em Engenharia Biomédica; e-mail: kaltinaitis@hotmail.com⁴
5. Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: migueljr4@me.com⁵

Área de Conhecimento: Fisiopatologia de órgãos e tecidos.

Palavras-chave: Caquexia, *browning*, células tronco mesenquimais, pericitos tipo 1.

INTRODUÇÃO

A caquexia é uma síndrome multifatorial caracterizada pela redução contínua de massa corporal total que não pode ser totalmente revertida por suporte nutricional. Essa síndrome leva ao comprometimento funcional progressivo e acomete, principalmente, a musculatura esquelética e o tecido adiposo (TA). No desenvolvimento da caquexia o TA é afetado precocemente, sendo este, um órgão endócrino constituído de diversos tipos celulares, incluindo, adipócitos brancos, adipócitos marrons, adipócitos beges, pericitos, células precursoras de adipócitos, dentre outras. O acúmulo de adipócitos beges no tecido adiposo branco (TAB) é conhecido como *browning*, um processo induzido de acordo com a necessidade termogênica. A caquexia é capaz de induzir o *browning* no TAB, tendo-se redução acentuada de massa corporal, principalmente, do TA e da musculatura esquelética. Os adipócitos, dependendo das condições do meio interno, são derivados de células tronco mesenquimais (CTM) multipotentes que apresentam a habilidade de se diferenciar e gerar diversas linhagens celulares. Estudos comprovam que as CTM se diferenciam em adipócitos. Todavia, não é conhecido se durante o processo de *browning*, induzido pela caquexia associada ao câncer, as CTM precursoras de pericitos do tipo 1 são recrutadas para se diferenciarem em adipócitos beges. Com isso, o objetivo deste projeto é avaliar o potencial de diferenciação dos precursores de pericitos do tipo 1 em adipócitos beges induzidos pela caquexia associada ao câncer, através do cruzamento de camundongos das linhagens selvagem.

OBJETIVOS

Geral

Identificar o potencial de diferenciação dos precursores de pericitos do tipo 1 em adipócitos beges induzidos pela caquexia associada ao câncer.

Específicos

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

- Verificar a participação dos precursores de pericitos do tipo 1 na diferenciação dos adipócitos brancos em adipócitos beges nos camundongos portadores de caquexia associada ao câncer.

METODOLOGIA

Foram utilizados 10 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 com 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, frio crônico e tumor. A indução tumoral foi realizada com células tumorais da linhagem *Lewis Lung Carcinoma* (LLC), que foram injetadas subcutaneamente no flanco direito dos camundongos, no qual sua concentração estará a $3,5 \times 10^5$, em 200ml de meio de cultura (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium* – DMEM). Os camundongos do Grupo Frio crônico foram aclimatados a uma temperatura média de $15\text{--}18^\circ\text{C}$ (Act) durante 7 dias e depois alocados em câmara fria a 6°C (Frio), na qual permaneceram por 8 dias. O frio crônico foi utilizado como controle positivo para de indução de browning nos camundongos. A obtenção dos tecidos foi realizada através da decapitação sem anestesia dos grupos. Foram coletados os tecidos adiposos brancos nos estoques subcutâneo inguinal (SC). Os tecidos foram armazenados em fixador *HistoChoice*® MB em pH 7.4 por 3h. 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 desidratação das lâminas e montagem da lâmina com meio sintético Entellan®. Foi utilizado $1\mu\text{g}$ de RNA total na reação contendo Oligodt ($500\mu\text{g}/\text{mL}$), 10mM de cada dNTP, 5x *First-Strand Buffer*, DTT e 200 U de transcriptase reversa (*Super Script II-Invitrogen*). A transcrição reversa foi efetuada a 70°C por 10 minutos, após adicionada a transcriptase reversa, continua-se o ciclo à 42°C por 60 minutos e 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 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*) como na metodologia previamente descrita. A reação foi realizada em condições de ciclagem pré-determinadas, sendo duas etapas de 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos, à amplificação ocorreu em 40 ciclos: a desnaturação a 95°C por 15 segundos e o anelamento a 63°C por 60 segundos, com extensão a 72°C por 2 minutos. Os primers foram desenhados com base no banco de dados *Genbank*. O gene NG2 e o gene Pref-1 foram os escolhidos para serem analisado pelo qRT-PCR. A análise dos dados foi realizada através do software *GraphPad Prism 8*, adotando-se o critério de significância de $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A caquexia é uma síndrome capaz de induzir um fenômeno descrito como *browning*, o que resulta no remodelamento do TAB. Neste processo, adipócitos brancos apresentam características de marrom, sendo estes denominados de adipócitos beges. Estes adipócitos beges são caracterizados pela expressão da proteína desacopladora 1 (UCP-1), dito isso, realizou-se a técnica de IHC para verificar a marcação de forma qualitativa desta proteína nos

grupos controle, frio e caquexia do estoque subcutâneo (SC) do TAB. Isto pode ser observado na figura abaixo no (figura 1).

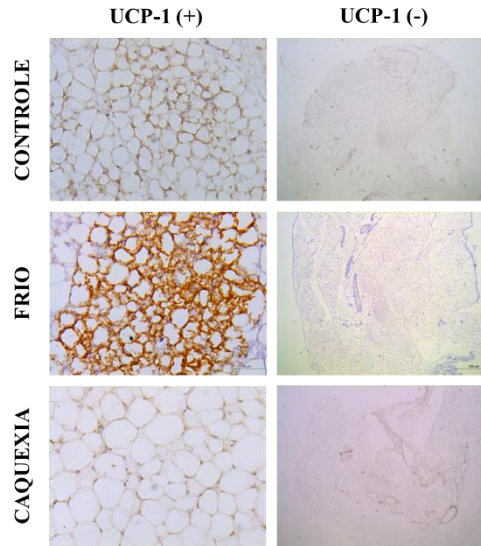


Figura 1: Técnica de IHC com marcação da proteína UCP-1 no TAB subcutâneo (SC) de camundongos da linhagem selvagem (*wild-type*) do grupo controle, frio e caquexia. Microscopia com aumento de 40 vezes e 4 vezes, respectivamente. Na primeira coluna é possível observar a marcação realizada com a proteína UCP-1 e na segunda coluna o controle negativo para esta amostra. Fixação realizada com *HistoChoice*.

Ao analisar-se esses resultados (figura 1), percebeu-se que todos os tecidos apresentavam positividade para a proteína UCP-1. No entanto, este resultado não era o esperado para o grupo controle. Acredita-se que, este resultado foi devido a marcações inespecíficas provavelmente em decorrência da utilização de uma solução de bloqueio que não apresentou total funcionamento. Ademais, pôde-se concluir que o estoque subcutâneo do TAB, dos camundongos da linhagem selvagem (*wild-type*) do grupo de exposição ao frio e do grupo de indução a caquexia, sofreu remodelamento devido ao *browning*. Sendo este, um resultado condizente com o que é descrito pela literatura. Dando continuidade aos experimentos, realizou-se a análise da expressão gênica de dois genes (NG2 e Pref-1) em amostras de fração celular do estroma vascular (SVF) do TA inguinal. Assim, utilizamos a expressão do gene NG2 e Pref-1 como marcadores da densidade de células positivas para este gene. A análise do Pref-1 foi adicionada para determinarmos a densidade de células já comprometidas com a linhagem de adipócitos. Na imagem a seguir (figura 2) é possível visualizar o gráfico contendo a expressão do gene Pref-1 e NG2 em diferentes grupos de animais.

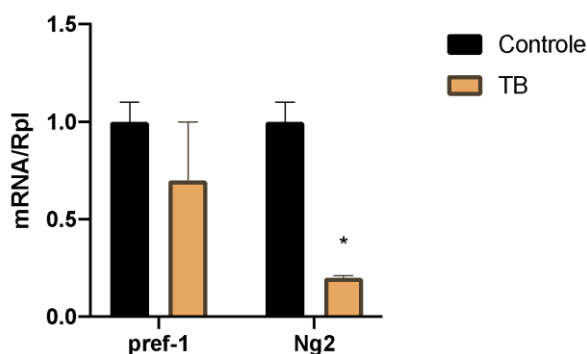


Figura 2: qPCR do gene Pref-1 e do gene NG2 para a comparação da expressão gênica entre animais do grupo controle e do grupo tumor (TB). * diferença em relação ao controle, $p < 0.05$.

De acordo com os dados previamente apresentados, é possível analisar que a quantidade de RNA mensageiro do gene NG2 decresceu no grupo tumor. Dito isso, há duas formas de interpretar-se este dado, (1) a diminuição de células que expressam NG2 no TB é devido ao comprometimento de outras células a se diferenciarem em provenientes da célula progenitora (NG2+), ou (2) houve uma redução na densidade das células progenitoras. O fator pré-adipócito 1 (Pref-1) é sintetizado como uma proteína de transmembrana e originalmente foi identificado como inibidor da diferenciação de adipócitos. A análise da expressão do gene pref-1 foi realizada, tendo em vista, verificar o comprometimento de células progenitoras adipogênicas. Através da técnica de qPCR foi possível observar que a quantidade de RNA mensageiro estava no grupo tumor ao comparar-se com o grupo controle. A diminuição da expressão do gene pref-1 indica diferenciação dos adipócitos.

CONCLUSÃO

De acordo com os dados coletados, pôde-se analisar que a densidade de células positivas para NG2 é afetada pela síndrome. Em contrapartida, as células positivas para Pref-1, um marcador clássico de pré-adipócitos, não se alteraram. Este resultado, mesmo que inicial, sugere a possibilidade da participação de células NG2 positivas na adipogênese bege. Contudo, para que pudéssemos confirmar se adipócitos foram comprometidos com a diferenciação, seria necessário a utilização e diferentes sistemas de marcadores de linhagem, em particular para NG2 e adiponectina.

REFERÊNCIAS

- BATISTA, M.I. et al. Adipose tissue inflammation and cancer cachexia: Possible role of nuclear transcription factors. **Cytokine**, [s.l.], v. 57, n. 1, p.9-16, janeiro 2012.
- BATISTA, M.L., Jr., et al., Adipose tissue-derived factors as potential biomarkers in cachectic cancer patients. **Cytokine**, [s.l.], v. 61, n. 2, p.532-529, novembro 2013.
- BIRBRAIR, Alexander et al. Pericytes: multitasking cells in the regeneration of injured, diseased, and aged skeletal muscle. **Frontiers In Aging Neuroscience**, [s.l.], v. 6, setembro 2014.
- BIRBRAIR, Alexander et al. Type-2 pericytes participate in normal and tumoral angiogenesis. **American Journal Of Physiology-cell Physiology**, [s.l.], v. 307, n. 1, p.25, julho 2014.
- BLUM, D. et al. Validation of the Consensus-Definition for Cancer Cachexia and evaluation of a classification model--a study based on data from an international multicentre project (EPCRC-CSA). **Annals Of Oncology**, [s.l.], v. 25, n. 8, p.1635-1642, fevereiro 2014.
- HARMS, Matthew; SEALE, Patrick. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. **Nature Medicine**, [s.l.], v. 19, n. 10, p.1252-1263, setembro 2013.
- HENRIQUES, Felipe et al. Toll-Like Receptor-4 Disruption Suppresses Adipose Tissue Remodeling and Increases Survival in Cancer Cachexia Syndrome. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 8, n. 1, dezembro 2018.
- XU, Jianguang et al. A systematic review: differentiation of stem cells into functional pericytes. **The FASEB Journal**, [s.l.], v. 31, n. 5, p.1775-1786, maio 2017.