

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

Luís Felipe Galvão Valdivia<sup>1</sup>; Magno Alves Lopes<sup>2</sup>; Miguel Luiz Batista Júnior<sup>3</sup>

1. Estudante do Curso de Biomedicina; e-mail: luisfelipe.gvaldivia@gmail.com
2. Instituto de Fisiologia CAS; e-mail: magnolopes22@hotmail.com
3. Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: migueljr4@me.com

Área do conhecimento: **Biologia Tecidual; Fisiologia de Órgãos e Sistemas**

**Palavras-chaves:** 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; LOPES, *et al.*, 2018). 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, afim 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**

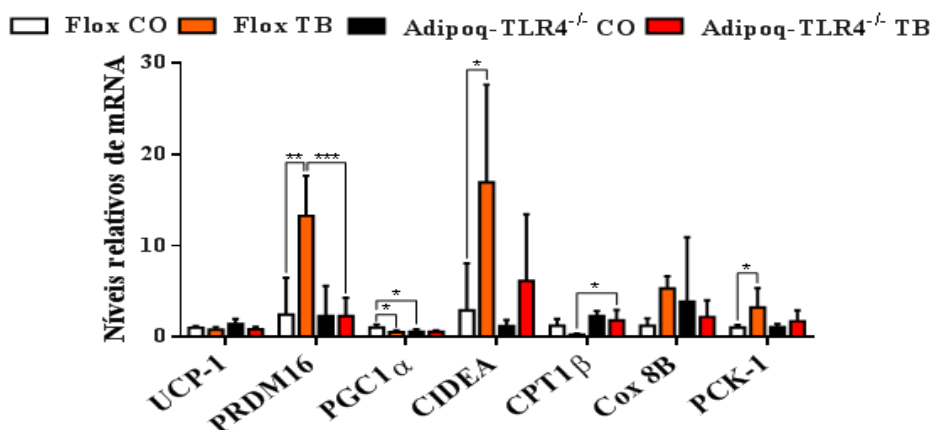
Avaliar o papel do *Toll-Like Receptor 4* no remodelamento do tecido adiposo durante a síndrome da caquexia associada ao câncer em animais nocautes adipócito-específico. Principalmente nos aspectos metabólicos dos processos inflamatórios e termogênicos, além dos aspectos morfofuncionais do tecido adiposo.

## 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<sup>tm1.1Karp/J</sup> e B6;FVB-Tg (Adipoq-cre)1Evdr/J pelo sistema CRE-Lox. Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais: 1) B6(Cg)-Tlr4<sup>tm1.1Karp/J</sup> Controle (Flox CO, n=5); 2) B6(Cg)-Tlr4<sup>tm1.1Karp/J</sup> Tumor (Flox TB, n=4); 3) B6;FVB-Tg (Adipoq-cre)1Evdr/J Controle (Adipoq-TLR4<sup>-/-</sup> CO, n=5) 4) B6;FVB-Tg (Adipoq-cre)1Evdr/J Tumor (Adipoq-TLR4<sup>-/-</sup> 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, animais dos grupos portadores de tumor (TB) apresentaram redução de até 1,8 vezes ( $p=0.003$ ) no ganho de massa corporal em relação aos seus respectivos controles, independente da deleção do TLR4. Bem como, nos dados de adiposidade, onde os estoques de tecido adiposo são relativizados com o peso corporal total, os animais TB mostraram redução de até 67% ( $p=0.006$ ). O índice de caquexia não mostrou diferenças entre os grupos mesmo com a deleção do TLR4, sugerindo que esta deleção adipócito-específica não impediu a instalação da síndrome da caquexia. Nos estudos de Henriques *et al.*, (2018) e Zhang *et al.*, (2017) os animais TLR4<sup>-/-</sup> (nocautes sistêmicos para TLR4), apresentaram preservação no ganho de massa corporal, o que era esperado que ocorresse neste estudo, contudo não foi possível constatar a interferência da deleção adipócito-específica do TLR4 neste aspecto. Os dados de adiposidade podem ser confirmados com os de massa absoluta dos tecidos, onde os estoques do tecido adiposo subcutâneo (TASC) e epididimal (TAEP) dos animais Flox TB estavam de fato menores em relação ao seu controle. No entanto, o TAEP dos animais Adipoq-TLR4<sup>-/-</sup>TB, aparentemente se mostrou preservado na síndrome, não mostrando esta diminuição na massa absoluta ou relativa. Sabido que o remodelamento do TASC de animais TLR4<sup>-/-</sup> com caquexia induzida se encontra atenuado, avaliado principalmente pela expressão de genes envolvidos no processo de *browning* (HENRIQUES *et al.*, 2018), verificamos neste estudo se esta alteração também ocorre em animais TLR4 nocaute adipócito-específico. Para isso, foram realizadas as análises de expressão gênica (Fig. 1) dos principais marcadores de *browning*, tais como UCP1, PGC1 $\alpha$ , PRDM16 e CIDEA. Para a avaliação de processos metabólicos de oxidação de ácidos graxos e reesterificação de gordura, foram realizados ensaios de expressão gênica de CPT1 $\beta$ , Cox 8B e PCK-1. Os dados não indicaram diferença entre os grupos na expressão gênica de UCP-1, porém quando comparados para PRDM16, o grupo Flox TB expressou 3,3 vezes ( $p=0.0007$ ) mais do que o grupo Adipoq-TLR4<sup>-/-</sup>TB. O grupo Flox TB também foi mais expresso para o CIDEA, estando 5,8 vezes ( $p=0.03$ ) maior que o Flox CO, e para PCK-1, estando 3,1 vezes ( $p=0.04$ ) maior que seu controle. O Adipoq-TLR4<sup>-/-</sup>TB foi 6 vezes ( $p=0.03$ ) mais expresso do que o Flox TB para o PGC1 $\alpha$ , indicando que este grupo está sofrendo uma maior oxidação lipídica (MORAES *et al.*, 2017). Com base nos dados de expressão gênica de PRDM16, o grupo Flox TB se apresentou superior ao seu respectivo controle. Diferentemente do grupo Adipoq-TLR4<sup>-/-</sup>TB em relação ao Adipoq-TLR4<sup>-/-</sup>CO, e isto pode indicar uma possível tendência de preservação destes animais mutantes no aspecto do *browning* do TAB.



**Figura 1:** Razão da expressão gênica ao RPL-19 de UCP-1, PRDM16, PGC1 $\alpha$ , CIDEA, CPT1 $\beta$ , Cox 8B e PCK-1 do TASC. Os resultados são expressos em média (n=6 por grupo)  $\pm$  desvio padrão da média. A análise estatística foi feita utilizando *Anova two way*, seguido de pós-teste Tukey; \*p $\leq$ 0,05; \*\*p $\leq$ 0,01; \*\*\*p $\leq$ 0,0005.

Em paralelo aos ensaios de expressão gênica realizados, foram marcadas algumas proteínas envolvidas na sinalização do *browning*, como o estado fosforilado da P38 (p-P38) e AMPK (p-AMPK) no TAEP. Foi visto um aumento da marcação de p-P38 no grupo Flox TB, a qual encontra-se 10 vezes (p=0.0004) maior do que o grupo Adipoq-TLR4<sup>-/-</sup>TB e 4,5 vezes (p=0.001) maior que o Flox CO, contribuindo para uma possível redução do remodelamento do TA no aspecto do *browning* nos animais Adipoq-TLR4<sup>-/-</sup>TB. Porém, para p-AMPK, não houveram diferenças entre os grupos. Quanto a p-P38, sua alta expressão pode estar associada à secreção de citocinas pró-inflamatórias pelo tumor, tais como a IL-6 (TSOLI *et al.*, 2016). Tal expressão pode desencadear processos no TAB como a lipólise, mediada pela AMPK (TSOLI *et al.*, 2016; FRANCO *et al.*, 2017). Mesmo levando em consideração que a p-AMPK não se encontra alterada, é possível que esta alta expressão de p-P38, em conjunto com os dados de adiposidade, esteja resultando na lipólise do tecido, contribuindo com o desenvolvimento da caquexia no grupo Flox TB, e tal processo pode estar sendo preservado no grupo Adipoq-TLR4<sup>-/-</sup>TB. Uma vez que não foi detectada diferença esperada na expressão gênica de UCP-1 entre os grupos TB e CO, foi realizada a marcação da proteína por IHC, para verificar se há presença dela no TASC. Apesar dos dados de expressão gênica não indicarem diferença, a marcação de UCP-1 dos grupos Flox TB e Adipoq-TLR4<sup>-/-</sup>TB indicaram aumento da proteína em comparação aos seus respectivos controles. Isto sugere que ambos os grupos dos animais TB tiveram um aumento na indução de *browning*. Da mesma forma, Henriques *et al.*, (2018) também observou este remodelamento nos animais TB, no entanto foi possível analisar uma menor marcação nos animais TLR4<sup>-/-</sup>.

No ensaio de H&E, é visível a maior presença de adipócitos multiloculares nos animais Flox TB, diferentemente dos animais Adipoq-TLR4<sup>-/-</sup> TB, que possivelmente, sofreram menos com este remodelamento. Além disso, quando foi realizado o *PicroSirius*, os animais Flox TB indicaram uma maior marcação de colágeno no tecido, tal marcação foi maior do que nos outros grupos. Uma vez visto o possível aumento de UCP-1 no TASC, indicando uma maior atividade termogênica, foi verificado se a atividade termogênica no TAM também estava alterada nos grupos analisados. Para isso, foram captadas fotos termográficas de animais representantes de todos os grupos. Aparentemente quando comparados os grupos TB, o Flox possui um tecido mais metabolicamente ativo do que o mutante, que por sua vez encontra-se semelhante ao seu controle (Adipoq-TLR4<sup>-/-</sup> CO). No entanto, assim como nos ensaios morfológicos, por se tratar de um ensaio inicial, se torna necessário uma reprodução dos ensaios com um número amostral maior, além de avaliar as expressões gênicas e proteicas de outros tecidos, como o TAM.

## CONCLUSÕES

De acordo com os dados coletados até o momento, a deleção adipócito-específica do TLR4, mesmo que inicialmente, parece não afetar de forma contundente a atenuação do desenvolvimento dos marcadores de caquexia, mesmo quando comparado com animais TLR4<sup>-/-</sup>. Os dados de massa absoluta e relativa do TAEP se mostraram preservados entre os animais Adipoq-TLR4<sup>-/-</sup>TB e Adipoq-TLR4<sup>-/-</sup>CO, o que poderia indicar uma possível atenuação da redução de massa neste tecido, que em condições normais é afetado tanto quanto o TASC durante a caquexia. Apesar de alguns dos marcadores de *browning* se mostrarem preservados no grupo Adipoq-TLR4<sup>-/-</sup>TB (PRDM16 e p-P38), não é possível afirmar com precisão a real atenuação do remodelamento do TA, uma vez que não houveram diferenças entre os grupos TB com o principal marcador de *browning*, a UCP-1, no ensaio de expressão gênica. Por fim, torna-se necessário um maior número de experimentos para caracterizar e avaliar com precisão o perfil inflamatório (que não foi observado até então) e os vários outros remodelamentos do TA que ele pode sofrer durante uma síndrome caquética. De forma a comparar o modelo utilizado com estudos recentes do nosso grupo de pesquisa em que foi avaliado o remodelamento do TA durante a síndrome da caquexia associada ao câncer em camundongos nocautes sistêmicos de TLR4.

## REFERÊNCIAS

- 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., **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.
- LOPES, M. A. et al., **LLC tumor cells-derived factors reduces adipogenesis in co-culture system**. Heliyon, 2018. 7(4): p. e00708.
- MORAES, Maria N. et al., **Cold-sensing TRPM8 channel participates in circadian control of the brown adipose tissue**. Molecular Cell Research, 2017. 1864(12): p. 2415-2427.
- 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.
- TSOLI, M. et al., **Lipolytic and thermogenic depletion of adipose tissue in cancer cachexia**. Seminars in Cell and Developmental Biology, 2016. 54: p. 68-81.
- 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.