



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

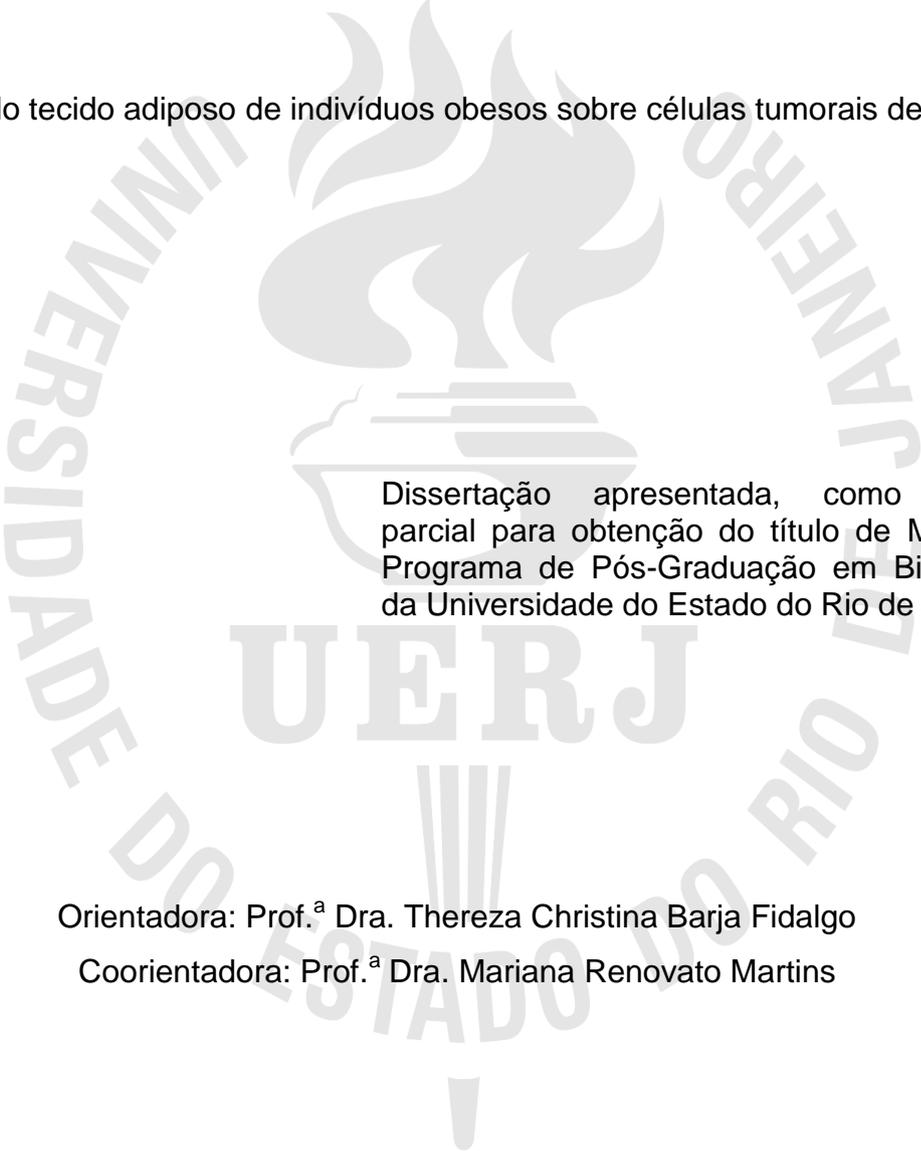
Isadora Ramos de Andrade

**Papel do tecido adiposo de indivíduos obesos sobre células
tumerais de mama**

Rio de Janeiro
2018

Isadora Ramos de Andrade

Papel do tecido adiposo de indivíduos obesos sobre células tumorais de mama



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Thereza Christina Barja Fidalgo

Coorientadora: Prof.^a Dra. Mariana Renovato Martins

Rio de Janeiro

2018

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

A553 Andrade, Isadora Ramos de.
Papel do tecido adiposo de indivíduos obesos sobre células tumorais de mama / Isadora Ramos de Andrade. – 2018.
93 f.

Orientadora: Thereza Christina Barja Fidalgo.
Coorientadora: Mariana Renovato Martins.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Obesidade – Teses. 2. Tecido adiposo - Teses. 3. Mama – Câncer – Teses. 4. Neoplasias da Mama. I. Fidalgo, Thereza Christina Barja. II. Martins, Mariana Renovato. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616-006:616-056.2

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus pais, que sempre acreditaram em mim, me apoiaram, e lutaram muito para eu chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

A Deus, e aos orixás, em especial, minha mãe Oxum, por sempre me abençoarem, protegerem, me darem forças e me guiarem sempre nos melhores caminhos.

Aos meus pais, Luciano e Cláudia, que sempre me deram muito amor, me apoiaram em todas as minhas escolhas, me incentivaram, acreditaram em mim, e por terem contribuído pela pessoa digna que sou hoje. São os amores da minha vida.

À minha família: meu irmão Lucas, meus tios, minha vó, meus primos, por todo amor e apoio emocional que me deram.

À minha co-orientadora Mariana, por ter me aceitado como aluna desde a iniciação, pela confiança em mim, por todo conhecimento compartilhado comigo, pela paciência, por me incentivar, por ser compreensiva e uma pessoa maravilhosa.

À minha orientadora Christina Barja-Fidalgo pela oportunidade de poder fazer parte da equipe de seu laboratório, pelo conhecimento compartilhado.

Aos meus companheiros e ex-companheiros do LFCM: minha irmãzinha Clara, João, Daniel, Mariele, Hayandra, Xúlia, Renatinha Thamiris, Ágatha, Edward, Natália, Thaís, Vivi, Rafael, Roberta, Simone, Vany, que tornaram o meu dia-a-dia no laboratório muito mais feliz!

Aos técnicos do LFCM: Gabriele e Genilson, por toda atenção e dedicação.

Aos meus amigos da faculdade: Thayane, Carlos, Elaine, Priscila e Cassiana, Orlando e Thayan (*in memoriam*) que deixavam as minhas aulas mais alegres e se tornaram muito importantes na minha vida.

Aos meus amigos de infância: Ana Carolina, Mylena, Pâmella, Kellen e Sergio Luiz, por tudo que passamos juntos, por todo amor e companheirismo, por também sempre me apoiarem, e por serem essenciais na minha vida.

Às minhas amigas da escola e da vida: Bia, Monica, Mandis, Nandinha, Tatiana, Larissinha, Patrícia, Larissa, que também são muito importantes na minha vida, por poder contar em todos os momentos, por fazerem da minha vida muito mais feliz!

A ciência se compõe de erros que, por sua vez, são os passos até a verdade.

Julio Verne

RESUMO

ANDRADE, Isadora Ramos de. **Papel do tecido adiposo de indivíduos obesos sobre células tumorais de mama**. 2018. 93 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

A obesidade é uma doença multifatorial caracterizada por um quadro de metainflamação sustentado pelo tecido adiposo (TA). A mesma se constitui em um grande problema de saúde pública pelo seu impacto nos cofres públicos e principalmente por sua associação com diversas doenças, incluindo o câncer. Evidências mostram que a obesidade está ligada a um pior prognóstico e um risco aumentado de morte em mulheres com câncer de mama. Com o objetivo de estudar os efeitos da obesidade sobre o desenvolvimento e progressão tumoral, investigamos a influência de fatores secretados pelo TA sobre células de adenocarcinoma mamário humano. Para tanto, as células MCF-7 e MDA-MB-231 foram estimuladas, *in vitro*, com o meio condicionado (MC) ou com a fração de vesículas extracelulares (MPs) secretados por TAs obtidos, respectivamente, de indivíduos obesos ou eutróficos durante cirurgia bariátrica ou plástica, avaliando-se as alterações induzidas sobre a homeostasia e função dessas células, além dos mecanismos e vias de sinalização envolvidos. Para tanto, as células MCF-7 e MDA-MB-231 foram estimuladas durante 24h com 20% (v/v) de MC ou com MPs (20 µg/ml) derivadas de indivíduos obesos ou eutróficos. O ensaio de proliferação celular foi avaliado pelo método MTT, na presença ou ausência do inibidor da via MAPK/ERK (PD98059); a migração celular foi avaliada através do método de *wound healing* e a invasão celular por migração através do uso de insertos porosos do tipo *transwell* (revestido com gelatina 1%), ambos na presença ou ausência do inibidor da via PI3K/AKT (LY294002). A expressão de ERK e AKT nas células MCF-7 e MDA-MB-231 e a expressão de MMP-2 e MMP-9 nas MPs foram analisadas por *Western Blotting*. A expressão de RNAm para MMP-9 foi avaliada por PCR em tempo real; a atividade proteolítica de MMP-2 e 9 presentes nas MPs foi avaliada por zimografia. Para os ensaios de tubulogênese em Matrigel, as células endoteliais (HMEC-1) foram incubadas com o sobrenadante de células MDA-MB-231 sem tratamento ou previamente tratadas com o MC derivado do TA obeso. Nossos resultados mostraram que em comparação ao TA magro, o MC e as MPs oriundos do TA obeso induziram aumento na proliferação das células MCF-7, sem alterá-la nas células MDA-MB-231. Por outro lado, o MC e as MPs do TA obeso aumentaram a migração e invasividade das células MDA-MB-231. Além disso, observamos que as MPs liberadas pelo TA obeso aumentaram a fosforilação de ERK nas células MCF-7, enquanto aumentaram a fosforilação de AKT nas células MDA-MB-231. O inibidor de MAPK/ERK diminuiu a proliferação das células MCF-7, enquanto o inibidor da PI3K/AKT diminuiu tanto a migração quanto a invasão das células MDA-MB-231. Adicionalmente, observamos que o tratamento das células HMEC-1 com o sobrenadante das células MDA-MB-231 previamente tratadas com o MC do TA obeso apresentaram maior capacidade tubulogênica em comparação ao tratamento do MC do TA magro. Este efeito não foi observado quando as células HMEC-1 foram tratadas diretamente com o MC oriundo do TA obeso. Observamos ainda que as MPs liberadas pelo TA obeso são enriquecidas em MMP-2 e MMP-9 bioativas, corroborando o aumento da capacidade invasiva dessas células no ambiente obeso. Em conjunto, nossos resultados indicam que o microambiente do TA obeso influencia funções celulares prioritárias para a progressão do câncer de mama, aumentando a malignidade das células tumorais através da secreção pelo TA de moléculas e de MPs com atividades pró-tumorais.

Palavras-chave: Obesidade. Tecido adiposo. Micropartículas. Câncer de mama.

ABSTRACT

ANDRADE, Isadora Ramos de. **Role of adipose tissue from obese subjects on breast tumor cells**. 2018. 93 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Obesity is a multifactorial disease characterized by a meta-inflammation sustained by the adipose tissue (TA). It constitutes a major public health problem because of its impact on public coffers and especially because of its association with several diseases, including cancer. Evidences show that obesity is linked to a worse prognosis and an increased risk of death in women with breast cancer. In order to evaluate the influence of adipose tissue (AT) on tumor cells, we stimulated, in vitro, human mammary adenocarcinoma cells (MCF-7 and MDA-MB-231) with conditioned medium (CM) or extracellular vesicle fraction (MPs) secreted by AT derived from obese or lean individuals, which were obtained during bariatric or plastic surgery, respectively. Our objective was to investigate the effects of secretion from obese AT on breast cancer cells, as well as the mechanisms and signaling pathways behind them. MCF-7 and MDA-MB-231 cells were stimulated for 24 h with 20% (V/V) MC or MPs (20 µg/ml) derived from obese or lean individuals; the cell proliferation assay was evaluated by the MTT method in the presence or absence of the MAPK/ERK pathway inhibitor (PD98059); cell migration was performed by the wound healing method and cell invasion by transwell migration (coated with 1% gelatin), both in the presence or absence of the PI3K/AKT pathway inhibitor (LY294002); ERK and AKT expression (in MCF-7 and MDA-MB-231 cells) and expression of MMP-2 and 9 (in MPs) were evaluated by Western blotting; for the Matrigel tubulogenesis assays, endothelial cells (HMEC-1) were incubated with the culture supernatant from untreated MDA-MB-231 cells or MDA-MB-231 cells previously treated with the CM derived from the obese AT; MMP-9 mRNA expression was evaluated by real-time PCR; the proteolytic activity of MMP-2 and 9 present in the MPs was evaluated by zymography. Our results demonstrated that MC and MPs from obese AT increased the proliferation of MCF-7 cells, without altering it in MDA-MB-231 cells. On the other hand, MC and MPs from obese AT increased the migration and invasiveness of MDA-MB-231 cells. In addition, we observed that both the CM and MPs released by obese AT increased ERK phosphorylation in MCF-7 cells, while only MPs increased the phosphorylation of AKT in MDA-MB-231 cells. The MAPK/ERK inhibitor decreased the proliferation of MCF-7 cells, whereas the PI3K/AKT inhibitor decreased both migration and invasion of MDA-MB-231 cells. Additionally, we observed that the treatment of the HMEC-1 cells with the supernatant from MDA-MB-231 cells previously treated with the CM from the obese AT showed increased tubulogenic capacity. It is important to note that this effect was not observed when HMEC-1 cells were treated with only the CM from obese AT. Interestingly, the MPs released by obese AT were enriched in bioactives MMP-2 and 9, possibly explaining the increase in the invasive capacity of these cells. Taken together, our results indicate that the microenvironment of obese AT influences priority functions for the progression of breast cancer, increasing the malignancy of the tumor cells through the secretion by molecules and MPs from AT with pro-tumor activities.

Keywords: Obesity. Adipose tissue. Microparticles. Breast cancer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1 –	Classificação do IMC.....	14
Figura 1 -	Mapa da prevalência mundial da obesidade nos homens	15
Figura 2 -	Mapa da prevalência mundial da obesidade nas mulheres	16
Figura 3 –	Componentes do tecido adiposo.....	19
Figura 4 -	Processos metabólicos e fisiológicos regulados pela secreção de adipocinas pelo tecido adiposo branco.....	20
Figura 5 –	Modulação fenotípica do tecido adiposo.....	24
Figura 6 -	Casos de câncer (em todos os sítios anatômicos) entre ambos os sexos (mundialmente) em 2012, atribuíveis ao excesso de índice de massa corporal, demonstrado pelo site anatômico como porcentagens do número total de todos esses casos atribuíveis em todos os locais anatômicos nesta população.....	25
Figura 7 –	Marcas envolvidas na progressão tumoral	27
Figura 8 –	Fração atribuível dos principais fatores de risco do câncer nos Estados Unidos	28
Figura 9 –	Fatores extrínsecos e intrínsecos celulares envolvidos na obesidade e câncer de mama.....	30
Figura 10 -	Estimativa do número de novos casos, em homens e mulheres, no Brasil.....	31
Figura 11 –	Tecido normal da mama.....	32
Figura 12 –	Carcinoma de ducto <i>in situ</i> (DCIS).....	33
Figura 13 -	Carcinoma de lóbulo <i>in situ</i> (LCIS).....	34
Figura 14 –	Vesículas extracelulares: biogênese, composição e destino.....	37
Figura 15 –	Padronização da concentração do MC.....	51
Figura 16 –	Efeito da secreção do TA obeso sobre a proliferação celular das células MCF-7 e MDA-MB-231.....	52
Figura 17 –	Efeito da secreção do TA obeso sobre a migração células das células MCF-7 e MDA-MB-231.....	53
Figura 18 -	Efeito da secreção do TA obeso sobre a invasão das células MDA-MB-231.....	54

Figura 19 - Efeito da secreção do TA obeso sobre as vias de sinalização de ERK e AKT nas células MCF-7 e MDA-MB-231, respectivamente.....	56
Figura 20 - Avaliação do papel da via de sinalização ERK/MAPK na proliferação das células MCF-7.....	57
Figura 21 - Avaliação do papel da via de sinalização PI3K/AKT na migração das células MDA-MB-231.....	58
Figura 22 - Avaliação do papel da via de sinalização PI3K/AKT na invasão das células MDA-MB-231.....	59
Figura 23 - Efeito do MC e das MPs do TA sobre as células MDA-MB-231 na indução da tubulogênese em células HMEC-1.....	60
Figura 24 - Efeito do MC <i>per se</i> sobre as células endoteliais.....	61
Figura 25 - Efeito das moléculas secretadas pelo tecido adiposo sobre a expressão de RNA mensageiro para MMP-9.....	62
Figura 26 - Expressão de MMP-9 e 2 nas micropartículas.....	63
Figura 27 - Avaliação da atividade proteolítica das micropartículas.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT	Proteína quinase B
BSA	Albumina de soro fetal bovino
CIS	Carcinoma <i>in situ</i>
DCIS	Carcinoma de ducto <i>in situ</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMT2	Diabetes Mellitus do tipo 2
ECL	Enhanced chemiluminescence
ER	Receptor de estrogênio
ERK	Quinase regulada por sinais extracelulares
ESCRT	Complexo de classificação endosomal responsável pelo transporte
HER2	Fator de crescimento epidermal do tipo 2
HIF-1 α	Fator induzido pela hipóxia
HMEC-1	Célula endotelial da microvasculatura humana
IDC	Carcinoma de ducto invasivo
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corporal
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ISEV	<i>International Society for Extracellular Vesicles</i>
LCIS	Carcinoma de lóbulo <i>in situ</i>
M199	<i>Medium 199</i>
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
MC	Meio condicionado
MVB	Corpos multivesiculares
MP	Micropartícula
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-zil)-2,5-difenilterazólio)
NF κ B	Fator nuclear κ B
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAI	Inibidor do plasminogênio ativado
PGE2	Prostaglandina 2

PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PR	Receptor de progesterona
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
SBTI	Inibidor de tripsina
SFB	Soro fetal bovino
STAT3	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3
SDS	Dodecilssulfato de sódio
TA	Tecido adiposo
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
UV	Ultravioleta
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
α	Alfa
κ	Kappa
β	Beta
nm	Nanômetro
μm	Micrômetro
mM	Milimolar
mg/L	Miligramas por Litro
CO ₂	Molécula de gás carbônico
x	Multiplicação
g	Gravidade
mL	Mililitro
v	Volume
μL	Microlitro
°C	Graus celsius
$\mu\text{g/mL}$	Microgramas por mililitro
H ₂ O ₂	Molécula de peróxido de hidrogênio
Δ	Delta
p	Valor p
MP/ μL	Micropartículas por microlitro
Na ₃ VO ₄	Ortovanadato de sódio
V	Volt
mA	Miliampère
A	Ampère

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	14
1	OBJETIVOS	41
1.1	Geral	41
1.2	Específicos	41
2	MATERIAL E MÉTODOS	42
2.1	Linhagens celulares	42
2.2	Cultura de células	42
2.3	Contagem de células	43
2.4	Obtenção do meio condicionado do tecido adiposo	43
2.5	Isolamento e quantificação das micropartículas	43
2.6	Ensaio de proliferação (MTT)	44
2.7	Obtenção de extratos totais	45
2.8	Eletroforese e <i>western blotting</i>	45
2.9	Ensaio de migração por <i>wound healing</i>	46
2.10	Ensaio de invasão celular	47
2.11	Tubulogênese	47
2.12	RT-PCR	48
2.13	Zimografia	49
2.14	Análises estatísticas	50
3	RESULTADOS	51
3.1	Padronização da concentração de meio condicionado a ser utilizada nos experimentos	51
3.2	O meio condicionado e as micropartículas do tecido adiposo obeso aumentam a proliferação das células MCF-7	52
3.3	O meio condicionado e as micropartículas do tecido adiposo obeso aumentam a migração das células MDA-MB-231	53
3.4	O meio condicionado e as micropartículas do tecido adiposo obeso aumentam a capacidade invasiva das células MDA-MB-231 ..	54
3.5	O meio condicionado e as micropartículas do tecido adiposo obeso ativam as vias de sinalização de ERK e AKT nas células	

	MCF-7 e MDA-MB-231, respectivamente.....	55
3.6	A via de sinalização da ERK tem um papel primordial no aumento da proliferação das células MCF-7 induzido pelo meio condicionado e pelas micropartículas do tecido adiposo obeso.....	56
3.7	A via de sinalização da AKT tem um papel primordial no aumento na migração e invasão das células MDA-MB-231 causado pelo meio condicionado e pelas micropartículas do tecido adiposo obeso.....	57
3.8	O sobrenadante de células MDA-MB-231, tratadas com o meio condicionado derivado do tecido adiposo obeso, aumenta as propriedades angiogênicas de células HMEC-1.....	59
3.9	Meio condicionado do tecido adiposo <i>per se</i> não induziu tubulogênese na HMEC-1.....	61
3.10	O tratamento das células MDA-MB-231 com as micropartículas do TA obeso aumenta a expressão de RNAm para MMP-9.....	62
3.11	Micropartículas oriundas do tecido adiposo obeso expressam MMP-2 e 9 bioativas.....	63
4	DISCUSSÃO.....	65
	CONCLUSÃO.....	72
	REFERÊNCIAS.....	73
	ANEXO - Aprovação do Comitê de Ética.....	91

INTRODUÇÃO

Obesidade

Atualmente vivemos uma pandemia de obesidade que afeta milhões de homens e mulheres em todo o mundo. De acordo com a organização mundial da saúde (OMS), a classificação do estado de obesidade é definida de acordo com o índice de massa corporal (IMC), através do seguinte cálculo: peso de uma pessoa em quilogramas, dividido pelo quadrado da altura em metros ($IMC = \text{peso (kg)} / \text{altura}^2 \text{ (m)}$) (tabela 1). O resultado do cálculo do IMC igual ou superior a 25, é definido como sobrepeso, e igual ou superior a 30 caracteriza a obesidade (OMS, 2016).

Tabela 1 - Classificação do IMC

IMC (kg/m ²)	Classificação
Abaixo de 18,5	Abaixo do Peso
18,5 – 24,9	Peso Normal
24,9 – 29,9	Sobrepeso
30 – 34,9	Obesidade grau I
35 – 39,9	Obesidade grau II
Maior ou igual a 40	Obesidade grau III

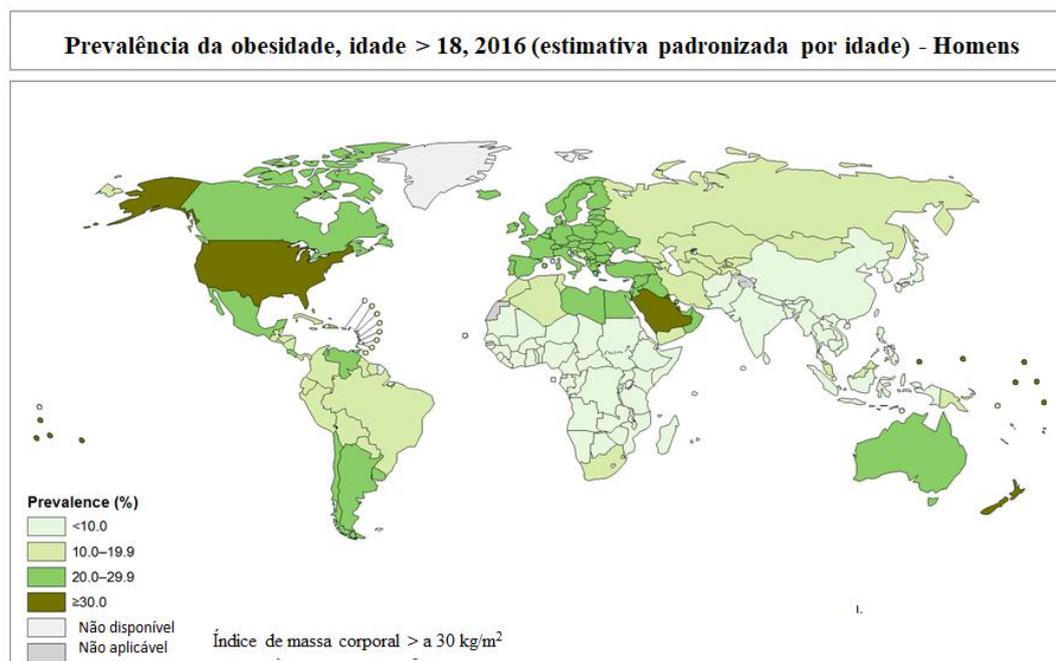
Fonte: Adaptado de Organização Mundial da Saúde (2017).

A prevalência da obesidade aproximadamente triplicou nas últimas 4 décadas. No ano de 2016, mais de 1,9 bilhões de adultos apresentavam sobrepeso, e desse número mais de 650 milhões eram obesos. Ou seja, cerca de 39% da população mundial com idade igual ou superior a 18 anos apresentavam sobrepeso (39% de homens e 40% das mulheres) e 13% obesidade (11% dos homens e 15% das mulheres) (Figuras 1 e 2, respectivamente) (OMS, 2016).

Além disso, ainda em 2016, 41 milhões de crianças menores de 5 anos de idade e mais de 340 milhões de crianças e adolescentes, com idades entre 5 a 19 anos apresentavam sobrepeso ou obesidade (OMS, 2016). O grande problema associado a esse aumento alarmante se constitui do fato de que cerca de 70% das

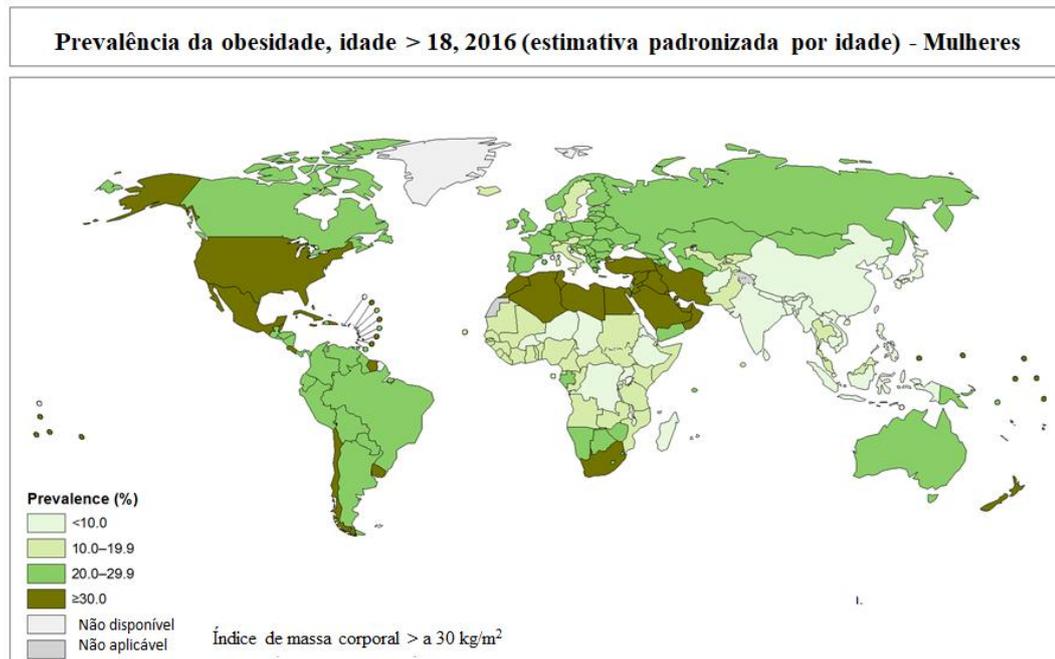
crianças/adolescentes obesos tendem a se tornarem adultos obesos (NICKLAS et al., 2001). A maior prevalência de sobrepeso e obesidade acontece na região das Américas (61% de adultos acima do peso e 27% de adultos obesos), enquanto a menor incidência acontece na região Sudeste da Ásia (22% e 5%, respectivamente). Em todas as regiões do mundo as mulheres apresentaram maior propensão ao desenvolvimento da obesidade que os homens, podendo chegar até ao dobro da incidência (OMS, 2016).

Figura 1 - Mapa da prevalência mundial da obesidade nos homens



Fonte: Adaptado da Organização Mundial da Saúde, 2016
(http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_Obesity_2016_Male.png).

Figura 2 - Mapa da prevalência mundial da obesidade nas mulheres



Fonte: Adaptado de Organização Mundial da Saúde, 2016

(http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_Obesity_2016_Female.png).

Obesidade e o Índice de Mortalidade

O que antigamente era considerado um problema apenas de países desenvolvidos, já atinge há alguns anos países de baixa e média renda, principalmente em ambientes urbanos (BRAY e BOUCHARD, 2004). É importante ressaltar, que o sobrepeso e a obesidade estão relacionados a mais mortes em todo o mundo do que o baixo peso (subnutrição). Nos Estados Unidos, no ano de 2000, 15% das mortes foram atribuídas ao excesso de peso (MOKDAD et al., 2004). Aproximadamente 2,8 milhões de pessoas morrem por ano por consequências relacionadas ao excesso de peso (OMS, 2016). Além disso, um outro fator alarmante é o fato de o sobrepeso e obesidade diminuírem a expectativa da idade média de vida em torno de 4 a 7 anos (PEETERS et al., 2013).

Obesidade e o Custo Econômico

Em junho de 2013, a Sociedade Médica Americana classificou a obesidade como uma doença, e hoje, ela é considerada como um dos problemas mais graves de saúde pública do século XXI, devido às inúmeras doenças as quais encontra-se associada (*American Medical Association House of Delegates*, 2013). Nos Estados Unidos, estimativas do ano de 2005 indicaram que foram gastos com pacientes homens obesos cerca de 1,152 dólares por ano, e com mulheres obesas esse valor foi maior que o dobro, custando cerca 3,613 dólares. Esses valores equivalem aproximadamente um gasto de 190 bilhões de dólares por ano com despesas de saúde; cerca de 21% de todos os gastos com despesas médicas são relacionadas ao tratamento da obesidade ou suas comorbidades associadas (CAWLEY e MEYERHOEFER, 2012). No ano de 2011 o valor com as despesas médicas aumentou para 270 bilhões de dólares, e a previsão é que continue aumentando drasticamente (*Society of Actuaries*, 2011).

Já no Brasil, com o Sistema Único de Saúde (SUS), os gastos com a saúde pública relacionados ao excesso de peso/obesidade foram de aproximadamente 2,1 bilhões anuais (dados baseados nos anos de 2008-2010). Os maiores custos de atendimentos laboratorial e hospitalar, em ambos os sexos, foram devido à doenças cardiovasculares (747 milhões), seguido de neoplasias (299,8 milhões), asma (34 milhões), osteoartrite (3,9 milhões) e diabetes tipo 2 (3,7 milhões) (BAHIA et al, 2012). A previsão é que a incidência dessas doenças duplique até o ano de 2050, consequentemente duplicando os custos da saúde. Em 40 anos, seriam gastos 330 bilhões, e caso houvesse uma redução de 5% do IMC médio da população, ocorreria uma economia de cerca de 57 bilhões de reais com relação a essa estimativa (RTVELADZE, 2013).

Tecido Adiposo

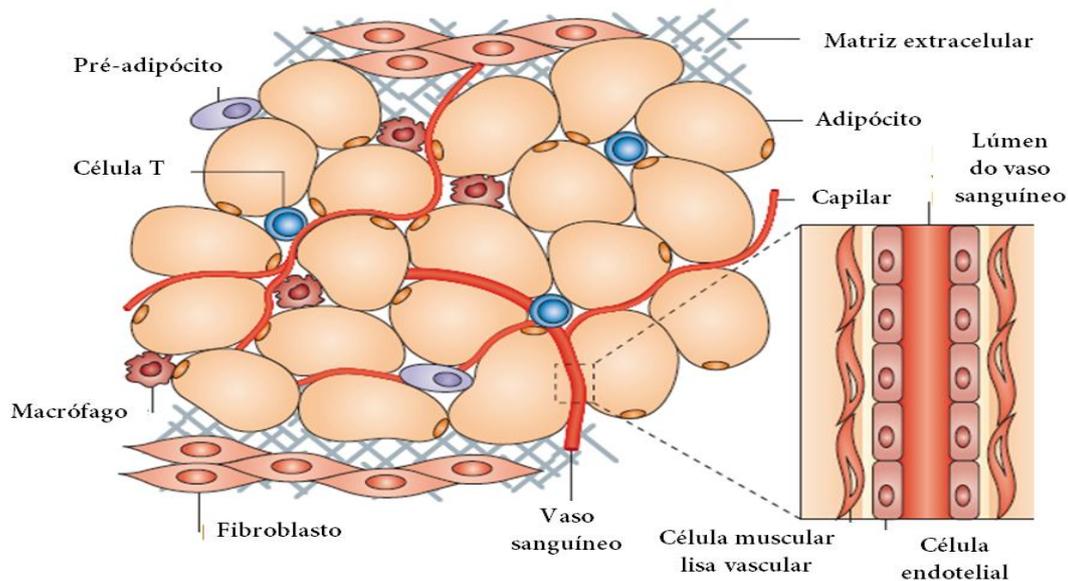
Os mamíferos possuem dois tipos de tecido adiposo (TA), o branco e o marrom, os quais além de terem diferentes funções, também apresentam composição e localidades diferentes. Enquanto a TA branco é especializado no

armazenamento de energia, e é um importante órgão endócrino envolvido principalmente no controle da regulação do peso, o TA marrom é o principal tecido regulador da termogênese em resposta à ingestão de alimentos e ao frio (RÀFOLS, 2014). Este apresenta um menor número de células de gordura, porém possui suprimentos vasculares mais ricos devido à abundância de mitocôndrias presentes, que também são as responsáveis pela coloração marrom (FONSECA-ALANIZ et al., 2006; KIESS et al., 2008). Em seres humanos, na fase pós-natal, esse tecido é identificado em apenas algumas regiões do corpo como a cervical, supraclavicular, axilar e paraventral (REDINGER et al., 2009).

O TA branco constitui o principal componente do TA do corpo, fornece a maior parte da gordura corporal total, é a fonte de ácidos graxos, e encontra-se disperso por diversas partes do corpo (AHIMA e FLIER, 2000; FONSECA-ALANIZ et al, 2007). Seus principais depósitos viscerais são na região intra-abdominal, ao redor do omento, intestinos e áreas peri-renais, e nas regiões subcutâneas das nádegas, coxas e abdômen (GESTA et al., 2007). Representa a principal fonte de ácidos graxos no estado de jejum pós-prandial para a utilização de energia e produção de calor (REDINGER, 2009).

O TA é composto não só por adipócitos maduros diferenciados, mas também por diversos outros tipos celulares, que compõem a fração vascular do estroma. Essa fração contém células endoteliais, células nervosas, células do sistema imune, especialmente os monócitos/macrófagos, linfócitos T e B, células dendríticas, mastócitos, neutrófilos, eosinófilos, pericitos, fibroblastos, miócitos, células-tronco derivadas do próprio TA e os pré-adipócitos (WOZNIAK et al, 2009; RÀFOLS, 2014; EXLEY et al., 2014; VIEIRA-POTTER et al, 2014) (Figura 3).

Figura 3 - Componentes do tecido adiposo



Nota: Os adipócitos são os principais componentes do tecido adiposo, e são cruciais para o armazenamento de energia e atividade endócrina. Os outros tipos celulares que estão presentes são células precursoras (incluindo os pré-adipócitos), fibroblastos, células vasculares e células do sistema imune, as quais juntas constituem a fração vascular estromal do tecido adiposo. As células vasculares incluem tanto as células endoteliais como as células musculares lisas vasculares, que estão associadas aos principais vasos sanguíneos. Os vasos sanguíneos no tecido adiposo são necessários para o bom fluxo de nutrientes e oxigênio para os adipócitos, e são as vias condutoras que permitem a distribuição de adipocinas. As células vasculares também secretam, e são sensíveis às proteínas secretadas pelo tecido adiposo. Outros componentes do tecido adiposo ativos incluem macrófagos e células T, que têm papéis principais na determinação do estado imune do tecido adiposo. Os fibroblastos presentes na matriz extracelular fornecem suporte mecânico para o tecido. Os fatores que são secretados pelas diferentes células componentes são fundamentais para manter a homeostase no tecido adiposo e o corpo.

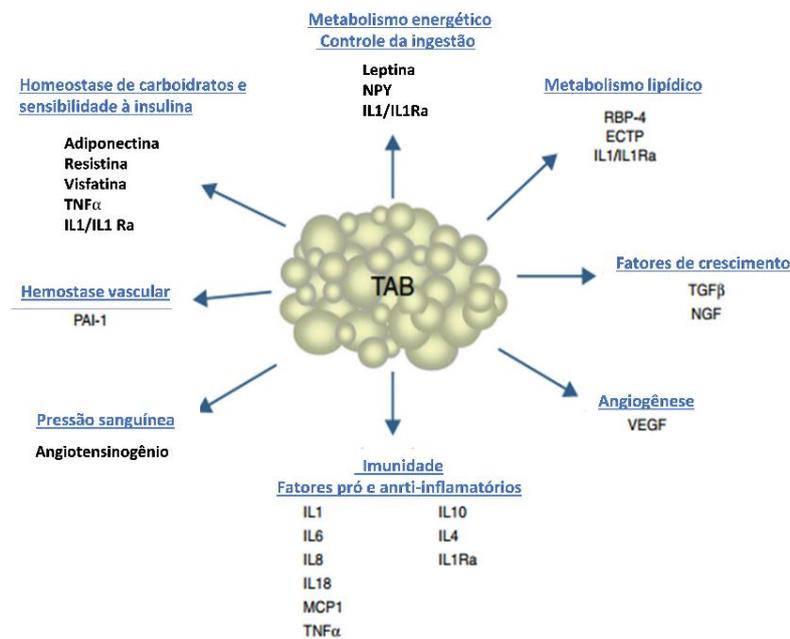
Fonte: Adaptado de Ouchi, 2011

A transformação conceitual do TA de um órgão passivo de armazenamento de energia a um participante ativo da regulação hormonal da homeostase ocorreu relativamente há pouco tempo (TRAYHURN e BEATTIE, 2001). Em 1994, o TA foi identificado como a fonte do hormônio leptina, esta proteína foi encontrada como sendo produto do gene obeso (Ob), o qual encontra-se mutado na forma murina e em humanos na obesidade hereditária. Tal achado abriu as portas para uma nova era de pesquisas focadas na endocrinologia desse tecido (ZHANG et al., 1994).

Desde então, sabe-se que ele é responsável pela síntese e secreção de uma série de peptídeos bioativos, conhecidos como adipocinas, incluindo mais de 50 citocinas, quimiocinas, fatores semelhantes a hormônios e outros mediadores, que atuam tanto a nível autócrino/parácrino, quanto endócrino, podendo ser anti ou pró-

inflamatórios (PROENÇA et al., 2014) (Figura 4). As adipocinas participam na regulação do metabolismo da glicose e lipídios, homeostase energética, comportamento alimentar, sensibilidade à insulina, inflamação, imunidade, função vascular e adipogênese (ROMACHO et al., 2014).

Figura 4 - Processos metabólicos e fisiológicos regulados pela secreção de adipocinas pelo tecido adiposo branco



Nota: O tecido adiposo tem um papel endócrino muito importante para a homeostase.
Fonte: Adaptado de Esteve Ràfols, 2014.

A gordura corporal e homeostase energética são asseguradas através do processo de remodelamento da gordura, sem ganho excessivo de peso, ou perda (REDINGER, 2009). Este processo é controlado pelos neuropeptídeos hipotalâmicos, que são os responsáveis pelo apetite e saciedade. O gasto energético é regulado pelos sistemas nervosos central e autônomo, que atingem a homeostase energética equilibrada, dependendo das necessidades fisiológicas (SPIEGELMAN e FLIER, 2001). As condições de maior gasto energético determinam a lipólise do TA branco, e conseqüentemente o aumento da liberação de ácidos graxos, enquanto que, quanto menor o gasto energético, ocorre um armazenamento dessa gordura.

Globalmente, vivemos em uma Era em que as pessoas vêm adotando hábitos de vida que propiciam a obesidade. Desde a Revolução Industrial, com o crescimento econômico, desenvolvimento e avanço tecnológico, pode-se dizer que houve um efeito perturbador e negativo sobre a saúde. O aumento na ingestão de alimentos com alta densidade energética, que possuem grande quantidade de gordura saturada, atrelados à diminuição ou até mesmo nenhuma prática de atividades físicas estão diretamente relacionados ao aumento do índice de obesidade (OMS, 2016). Este quadro de modernidade está fortemente relacionado com o aumento das taxas de obesidade na infância, o que futuramente acarretará obesidade, também, na vida adulta (BALOG, 2015).

Inflamação Crônica de Baixo Grau do Tecido Adiposo

Uma das marcas principais da obesidade é a expansão do TA, devido a hiperplasia e hipertrofia dos adipócitos. Seu aumento impacta em doenças ligadas ao excesso de peso, como por exemplo disfunções psicossociais, apneia do sono, estigma e osteoartrite (BRAY, 2004). A hipertrofia dos adipócitos também gera uma mudança na secreção dos adipócitos para um perfil pró-inflamatório (UNGER et al., 2010). A fim de atenuar a toxicidade, ácidos graxos livres são esterificados em glicerol, produzindo triacilglicerol inerte, cujo excesso resulta na hipertrofia dos adipócitos (GUH et al., 2009). No entanto, na obesidade, o excesso de ácidos graxos produzidos por adipócitos disfuncionais rompe membranas celulares de células adjacentes, resultando no estresse do retículo endoplasmático e dano mitocondrial (UNGER et al., 2010). Os ácidos graxos livres também podem atuar estimulando a atividade de inflamossomas presentes nos macrófagos e nos monócitos, que podem desencadear a cascata de ativação do fator nuclear κ B, (NF κ B) (WEN et al., 2011), o qual está diretamente relacionado com a transcrição de citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF- α), IL-6, IL-1, prostaglandina 2 (PGE2) (GHOSH et al., 1998; FAIN, 2006; HAYDEN e GOSH, 2008). O palmitato, por exemplo, pode aumentar a atividade de receptores do tipo *toll-like*, como o receptor *toll-like* 4 (GLASS e OLEFSKY, 2012), também podendo levar ao estímulo da translocação de NF κ B.

A hipertrofia dos adipócitos pode levar à sua morte, gerando a liberação de conteúdo celular no espaço extracelular (CINTI et al., 2005; DALMAS et al., 2011), pode também, resultar em hipóxia, que pode ser causada devido a limitação física dos vasos sanguíneos presentes no TA, responsáveis pelo suprimento desses grandes adipócitos (YE, 2009). Esta, por sua vez, está associada a um aumento na expressão do fator indutor da hipóxia (HIF-1 α) por esses adipócitos, cujo aumento está associado a inibição da síntese de adiponectina e do ativador do plasminogênio (PAI-1) (CHEN et al., 2006), indução do aumento da produção de leptina, expressão de metaloproteinases 2 e 9 (MMP-2 e 9) e do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (LOLMÈDE et al., 2003; Ye, 2007; HOSOGAI et al., 2007; WANG et al., 2007, HURSTING e BERGER, 2010; BONOMINI et al., 2015). Além disso, pode levar ao aumento dos níveis de proteínas quimiotáticas de monócitos (MCP1), exacerbando o recrutamento de macrófagos para o TA obeso. A infiltração dessas células tanto nos depósitos de TA subcutâneo, quanto visceral, ao redor de adipócitos moribundos formam estruturas conhecidas como “estruturas em forma de coroa” (CANCELLO et al., 2005; OLEFSKY e GLASS, 2010) (Figura 5). A secreção de quantidades aumentadas de adipocinas pró-inflamatórias pelos adipócitos hipertrofiados, como a MCP-1, TNF- α , IL-6, IL-8, PAI-1 e leptina (OUCHI et al., 2011) levam não só a infiltração de macrófagos, mas também linfócitos e células do estroma, alterando significativamente o microambiente do TA. Células inflamatórias, principalmente os macrófagos, podem compreender até 50% das células presentes no tecido adiposo de indivíduos obesos, quando normalmente constituem cerca de 5-10% das células presentes no TA de indivíduos eutróficos (WEISBERG et al., 2003). Essa infiltração maciça dos macrófagos no TA leva ao quadro de inflamação crônica, que não só modifica o metabolismo local, como também influencia na homeostase energética sistêmica (BERG e SCHERER, 2005; KANDA et al., 2006; MAURY et al., 2007; SIMPSON, 2013).

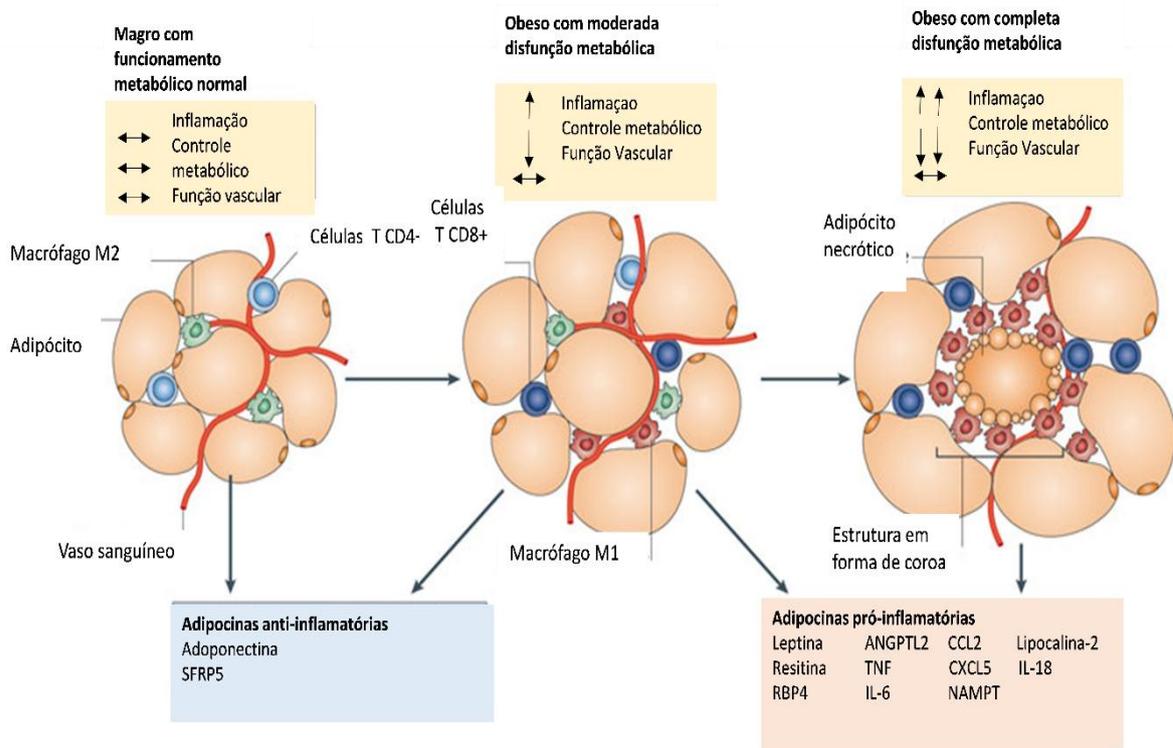
De acordo com os dados da literatura vistos anteriormente, nosso grupo demonstrou *in vitro* que o tecido adiposo de indivíduos obesos apresenta aumento nos níveis de adipocinas em comparação com o tecido adiposo de indivíduos saudáveis. Após 24 h de incubação, o meio condicionado derivado de explantes de tecido adiposo omental liberou quantidades aumentadas de TNF- α , leptina, IL-10, VEGF, MIP1- α , enquanto não foram observadas diferenças para MCP-1 e IL-6,

quando comparadas ao tecido adiposo subcutâneo de indivíduos saudáveis (RENOVATO-MARTINS et al., 2017).

Obesidade e Doenças Associadas

Na obesidade, devido ao quadro de inflamação crônica, os adipócitos e as células do sistema imune presentes no TA secretam diversos mediadores inflamatórios, como por exemplo, MCP-1 (CCL-2), TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-8, PAI-1 e leptina, os quais estão diretamente relacionados ao aparecimento de inúmeras doenças metabólicas, como diabetes tipo II (em decorrência da resistência à insulina), hiperglicemia, hipertensão, doenças cardiovasculares, dislipidemia, síndrome metabólica, esteatose hepática não alcoólica, e diversos tipos de câncer (HURSTING e BERGER, 2010; BONOMINI et al., 2015; BRAY, 2004; CALLE e KAAKS, 2004). Tal associação com diversas doenças que torna a obesidade como um dos principais problemas de saúde pública, impactando diretamente no índice de mortalidade da população e também nos cofres públicos.

Figura 5 - Modulação fenotípica do tecido adiposo



Nota: À medida que a obesidade se desenvolve, os adipócitos sofrem hipertrofia devido ao aumento do armazenamento de triglicédeos, com as mudanças qualitativas na expansão do tecido adiposo ocorre a transição para um fenótipo metabolicamente disfuncional.

Fonte: Adaptado de Ouchi, 2011

Obesidade e Câncer

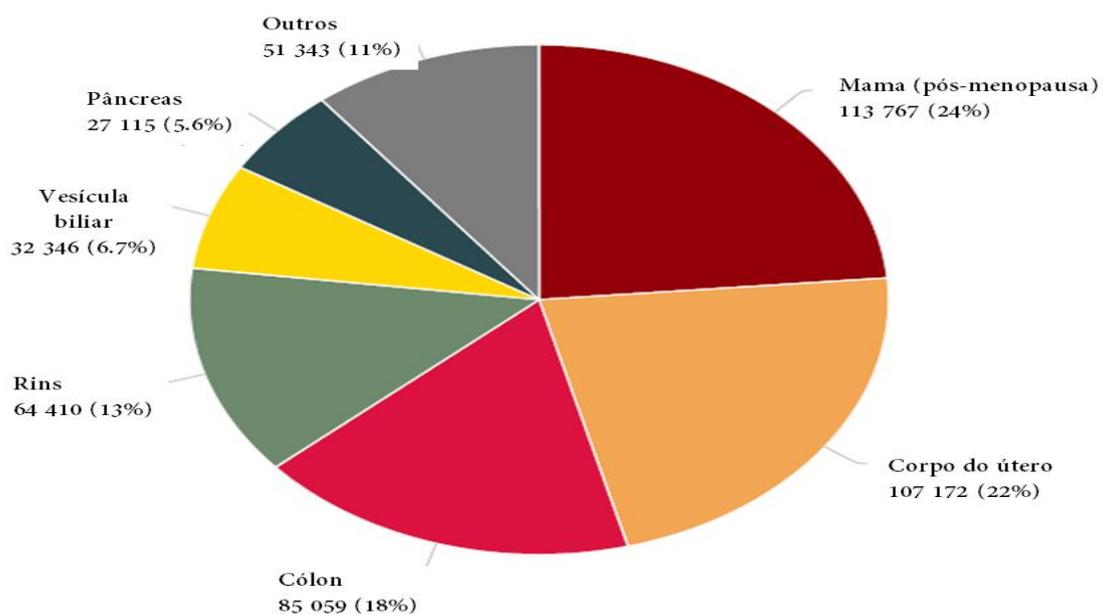
As adipocinas funcionam não apenas na sinalização parácrina local, mas também têm um efeito sistêmico através da secreção na circulação e comunicação com locais distantes. Diversas adipocinas liberadas em grande quantidade na obesidade, como por exemplo o TNF- α , IL-6, IL-8, CCL2, apresentam papel na progressão tumoral (KAIDAR-PERSON et al., 2011; IYENGAR et al., 2013; SIMPSON e BROWN, 2013). Diversos estudos epidemiológicos já relataram que a obesidade é um fator de risco estabelecido para diferentes tipos de câncer, como o de cólon, endométrio, mama, pulmão, rins, esôfago, pâncreas, vesícula biliar, fígado, neoplasias hematológicas, entre outros (CALLE e KAAKS, 2004; WISEMAN, 2008; LICHTMAN, 2010).

Um estudo realizado por Calle e colaboradores, com mais de 900 mil adultos norte-americanos, revelou que a proporção de todas as mortes causadas por

câncer, devido ao sobrepeso e obesidade, na idade igual ou superior a 50 anos, chega a 14% entre os homens e 20% entre as mulheres (CALLE et al., 2003). Um outro trabalho estimou que cerca de 3,6% dos novos casos de câncer em adultos, no ano de 2012, poderiam ser atribuídos ao alto IMC (ARNOLD et al., 2015). A obesidade leva a um pior prognóstico e aumento da mortalidade relacionada ao câncer (KAIDAR-PERSON et al., 2011; PAREKH et al., 2012), sobre a hipótese dessas relações serem causais, as implicações para a saúde pública dos Estados Unidos são impactantes, pois mais de 90 mil mortes por ano poderiam ser evitadas se a população mantivesse o índice de massa corporal normal (IMC =18,5-24,9) ao longo da vida (CALLE et al., 2003).

Segundo uma revisão sistemática abrangente realizada pela Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC) e pela OMS, realizada no ano de 2012, concluiu-se que o câncer de mama pós-menopausa, seguido do câncer de colo de útero e cólon são os oferecem a maior incidência de risco com relação ao excesso de peso (Figura 6).

Figura 6 - Casos de câncer (em todos os sítios anatômicos) entre ambos os sexos (mundialmente) em 2012, atribuíveis ao excesso de índice de massa corporal, demonstrado pelo site anatômico como porcentagens do número total de todos esses casos atribuíveis em todos os locais anatômicos nesta população



Fonte: Adaptado de IARC - OMS, 2012)

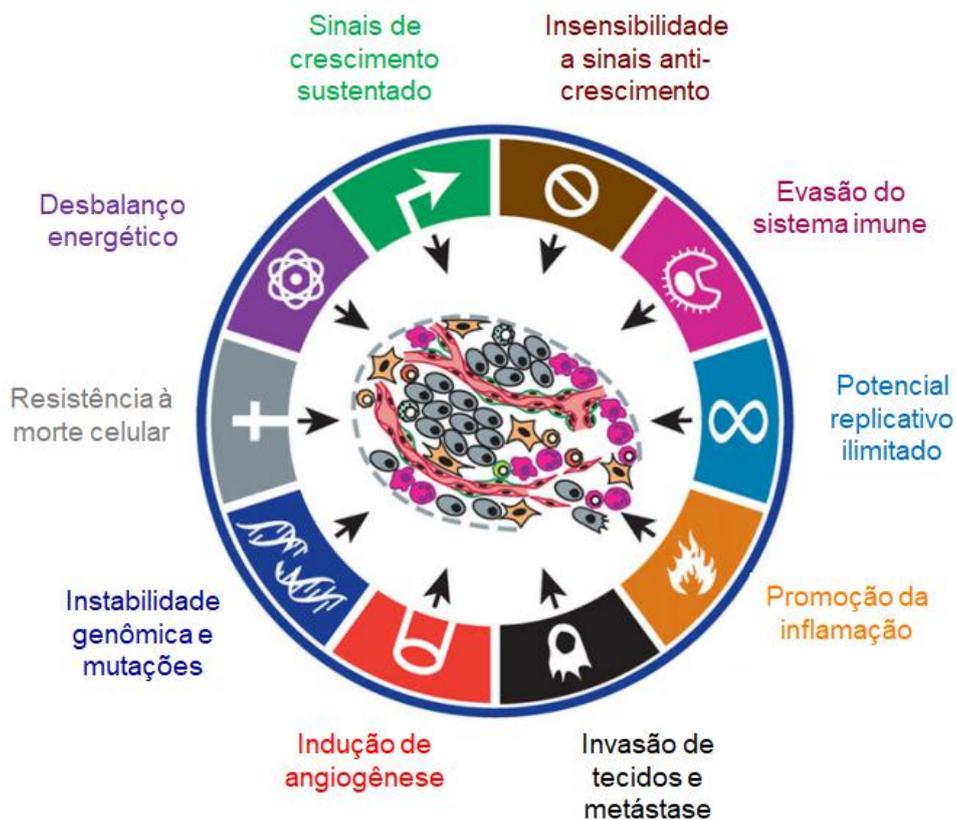
Câncer

Câncer é o termo dado a um conjunto amplo de mais de 100 doenças que pode afetar qualquer parte do corpo (HANAHAN e WEINBERG, 2000). De acordo com observações experimentais, foram estabelecidos três princípios básicos para a iniciação do processo de carcinogênese (COHEN e ELLWEIN, 1991). O primeiro princípio descreve que o câncer surge a partir de erros genéticos em células anteriormente normais, mediante um carcinógeno ou espontaneamente. A base da carcinogênese genética começou inicialmente por Boveri, com sua teoria da mutação somática (BOVERI, 1914). Mais recentemente, com o avanço da biologia molecular e a descoberta de oncogenes e genes supressores, a evidência desse princípio tornou-se definitiva (PIMENTEL, 1986; STANBRIDGE, 1990; BISHOP, 1991). O segundo princípio básico descreve que é necessário que mais de um erro genético ocorra para que haja o desenvolvimento do câncer (BERENBLUM e SHUBIK, 1947; BERENBLUM, 1954; WEINSTEIN, 1988). O terceiro e último princípio baseia-se na etapa de replicação do DNA, que não ocorre com 100% de fidelidade. Logo, a cada replicação, há uma nova oportunidade para a ocorrência de mutações somáticas, contribuindo para a carcinogênese (MENDELSON, 1990; LEWIN e DOVER, 1994; CAHILL et al., 1999; FRANK e NOWAK, 2004). Além da etapa de iniciação, foram estabelecidas mais duas etapas no desenvolvimento tumoral: promoção e progressão (MARTÍN DE CIVETTA e CIVETTA, 2011). A etapa de promoção, acontece quando as células geneticamente alteradas, sofrem ação de oncopromotores, que as transformam em células malignas, de forma lenta e gradual (ORDMAN et al., 1985; (MARTÍN DE CIVETTA e CIVETTA, 2011). A última etapa, de progressão, caracteriza-se pela multiplicação descontrolada e irreversível dessas células, as quais possuem a capacidade de invadir outros tecidos e órgãos, gerando o quadro de metástase (MAREEL e LEROY, 2003; MARTÍN DE CIVETTA e CIVETTA, 2011).

A carcinogênese é um processo que ocorre em etapas (MARTÍN DE CIVETTA e CIVETTA, 2011), as quais refletem alterações genéticas que levam a transformação progressiva de células normais em malignas (BALMAIN, 1993). Hanahan e Weinberg propuseram inicialmente seis marcas que estariam relacionadas a esse processo de progressão tumoral; como a capacidade de

sustentar a auto-sinalização para a proliferação; inibição de supressores do crescimento; imortalidade replicativa; indução da angiogênese, resistência à apoptose; invasão e metástase (HANAHAN e WEINBERG, 2000). Com o avanço das pesquisas nessa área foram observadas novas marcas envolvidas na progressão tumoral (Figura 7), como a inflamação; instabilidade genômica, mutação; escape do sistema imune e o desbalanço energético. Estes, em conjunto, constituem uma organização essencial para a compreensão das doenças neoplásicas (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

Figura 7 - Marcas envolvidas na progressão tumoral



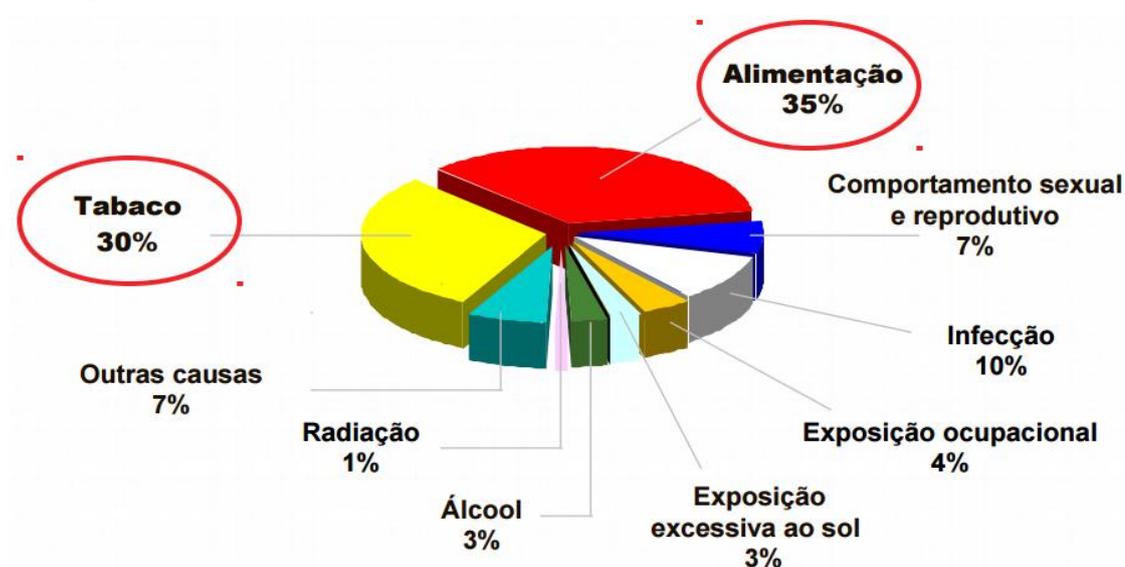
Nota: As células normais evoluem progressivamente para um estado neoplásico, no qual adquirem diversas características que as permitem tornar-se tumorigênicas.

Fonte: Adaptado de Hanahan e Weinberg, 2011.

Geralmente, o câncer é causado tanto por fatores externos: meio ambiente, exposição à radiação e agentes infecciosos, como pelo estilo de vida do indivíduo: tabagismo, alcoolismo, má alimentação, sedentarismo, entre outros (BLOT e

TARONE, 2015) (Figura 8). O mesmo pode ser causado também por fatores internos, que na maioria das vezes, são mutações genéticas herdadas, modificações hormonais ou condições imunológicas, que estão ligadas a capacidade do organismo de se defender das agressões externas. Todos esses fatores podem agir em conjunto ou em sequência para causar o câncer (*American Cancer Society*; 2017, INCA, 2016; TORRE et al., 2015).

Figura 8 - Fração atribuível dos principais fatores de risco do câncer nos Estados Unidos



Fonte: Adaptado de Blot e Tarone, 2015.

Assim como a obesidade, o câncer atualmente é um dos principais problemas de saúde pública no mundo. O impacto econômico do câncer é significativo e está aumentando, por exemplo, o custo econômico anual total do câncer no mundo somente no ano de 2010 foi estimado em aproximadamente 1,16 trilhões de dólares (STEWART e WILD, 2014). Globalmente, no ano de 2012, houveram cerca de 14 milhões de novos casos de câncer, e é esperado que o número de novos casos aumente em até 70% nas próximas 2 décadas (FERLAY et al., 2013). Nos Estados Unidos, a estimativa de novos casos no ano de 2017 foi de 1.688.780 (SIEGEL et al., 2017). No Brasil, segundo dados do INCA, para o ano de 2016, foram esperados o surgimento de 596 mil novos casos de câncer; entre os homens, com exceção do câncer de pele não melanoma, foram esperados cerca de 295.200 novos casos, e

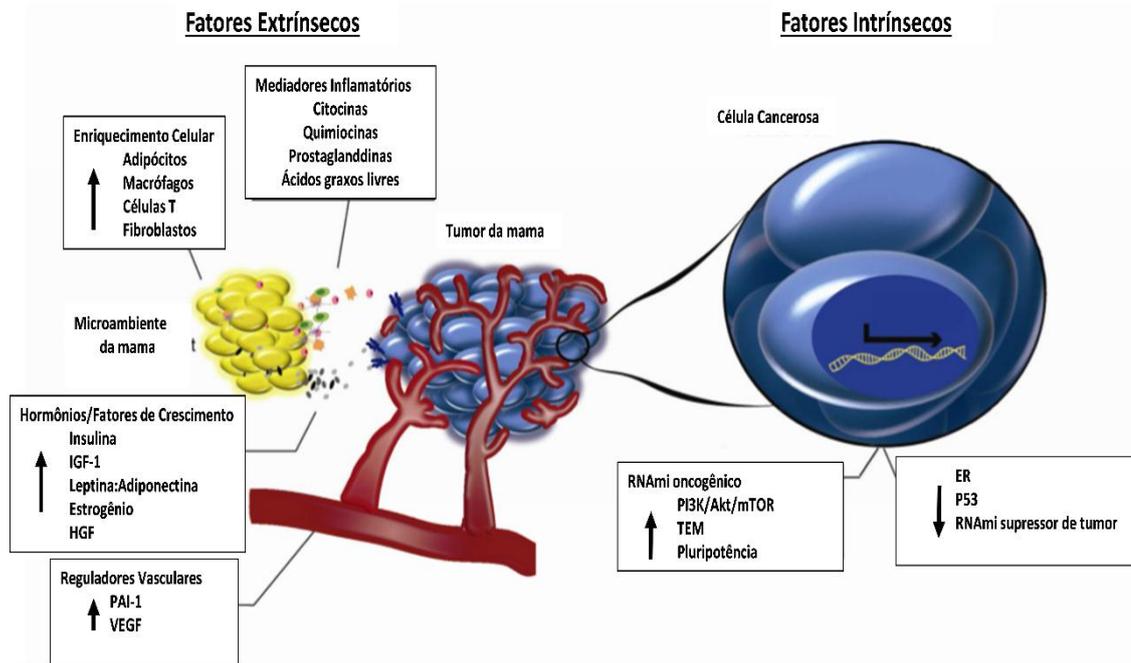
entre as mulheres, cerca de 300.870. A maior incidência de câncer são os de pele não melanoma (entre ambos os sexos), seguidos pelo câncer de próstata e o de mama (INCA, 2015).

O câncer é a segunda maior causa de morte no mundo, e foi responsável por cerca de 8,8 milhões de mortes apenas no ano de 2015. Mundialmente, 1 a cada 6 mortes é devido ao câncer (FERLAY et al., 2013). No ano de 2017, a estimativa de mortes por câncer nos Estados Unidos foi de cerca de 600.920 casos (SIEGEL et al., 2017). No Brasil, no ano de 2016, foram estimados cerca de 190 mil óbitos (INCA, 2015). Espera-se que o índice de mortes aumente devido ao crescimento e aumento da expectativa de vida da população, da urbanização e globalização, além principalmente do estilo de vida atual (INCA, 2015). De acordo com a OMS, cerca de 30 a 50% das mortes por câncer poderiam ser evitadas por mudanças no estilo de vida, como redução em produtos com tabaco, consumo de álcool, manutenção de um IMC saudável e práticas de exercícios regulares (OMS, 2016).

Obesidade e Câncer de Mama

Segundo dados da Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC) de 2012 o câncer de mama pós-menopausa é o que possui a maior associação com o excesso de peso, representando 24% dos casos. (Figura 6) (GLOBOCAN, 2012). Entretanto, diversos trabalhos demonstram que o aumento do risco, recorrência e mortalidade do câncer de mama devido a obesidade não estão relacionados apenas às condições pós-menopausa, também sendo observados em mulheres pré-menopausa (CALLE et al, 2003; RENEHAN et al., 2008; HALL et al., 2000; CHAN et al., 2014). Mulheres obesas (IMC > 30) são mais propensas a um diagnóstico com tumores maiores, maior incidência de metástases nos linfonodos, e um elevado risco de uma recorrência, que mulheres eutróficas (RENEHAN et al, 2008). Nesse contexto, as secreções oriundas do TA obeso inflamado contribuem para esse quadro, gerando um aumento no risco de morte causado pelo câncer de mama (CALLE e KAAKS, 2004) (Figura 9).

Figura 9 - Fatores extrínsecos e intrínsecos celulares envolvidos na obesidade e câncer de mama



Fonte: Adaptado de Ford, 2013

Câncer de Mama

O câncer de mama é o segundo mais comum no mundo, seguido pelo câncer de pele, do tipo não-melanoma (OMS, 2016), é o mais comum entre as mulheres, respondendo por cerca de 22% dos casos a cada ano. Seu desenvolvimento é relativamente raro antes dos 35 anos, e acima desta faixa etária possui um crescimento mais rápido e progressivo, principalmente acima dos 50 anos. Os homens também podem desenvolvê-lo, porém, com uma probabilidade muito menor, representando apenas 1% do total de casos da doença (INCA, 2015).

O INCA estimou para o ano de 2014, o diagnóstico de aproximadamente 57.120 novos casos de câncer de mama no Brasil (Figura 10) e o número de mortes de aproximadamente 13.345 pacientes. No ano de 2016, a estimativa aumentou para cerca de 57.960 novos casos e 14.338 mortes, sendo 181 homens e 14.206 mulheres (INCA, 2015).

Figura 10 - Estimativa do número de novos casos, em homens e mulheres, Brasil



Fonte: Adaptado do INCA, 2016.

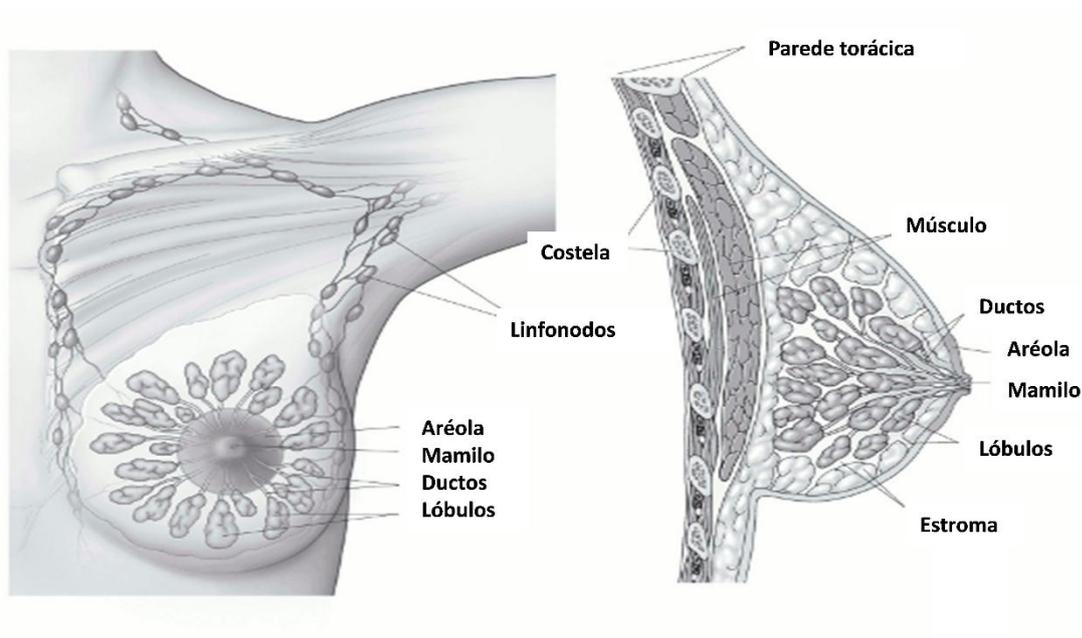
A Sociedade Americana do Câncer estimou para 2015, em mulheres, o diagnóstico de 60.290 novos casos de carcinoma de mama in situ – CIS (o CIS é não- invasivo, sendo a mais precoce forma de câncer de mama), 231.840 novos casos de cânceres de mama invasivos, e a morte de 40.290 mulheres devido ao câncer de mama. No ano de 2017, a estimativa subiu para 63.410 novos casos diagnosticados de CIS, 252.710 novos casos de cânceres de mama invasivos e aproximadamente 40.600 casos de morte.

Estrutura da Mama

A mama é composta por diferentes células. A mesma é estruturada em lóbulos (glândulas produtoras de leite), pelos ductos (pequenos túbulos que transportam o leite dos lobos ao mamilo) e pelo estroma, que é constituído por TA e tecido conjuntivo, o qual envolve os ductos e lobos, vasos sanguíneos e linfáticos (Figura 11) (*American Cancer Society, 2015*).

O câncer de mama pode se originar a partir de qualquer célula que compõe a mama. Geralmente, inicia-se nas células epiteliais - os chamados carcinomas -; quando se iniciam no tecido epitelial glandular são chamados de adenocarcinoma. Os principais adenocarcinomas são o carcinoma de ducto *in situ* (DCIS) e o carcinoma de lóbulo *in situ* (LCIS), respectivamente. A classificação é realizada de acordo com o fenótipo microscópico das células. Os mesmos são menos frequentes nos tecidos estromais. (*American Cancer Society, 2016*).

Figura 11 - Tecido normal da mama



Fonte: Adaptado de *American Cancer Society, 2016*.

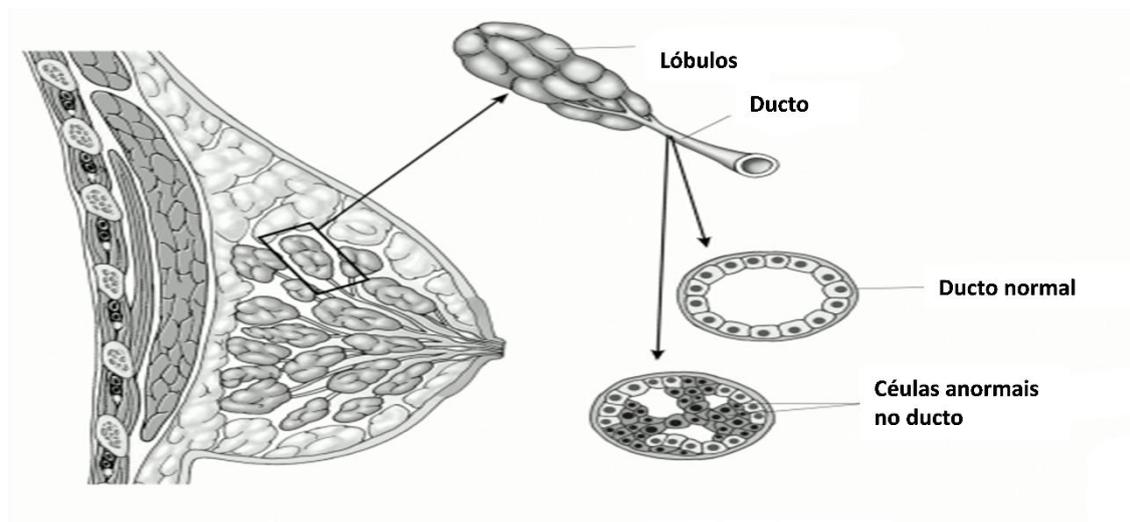
Carcinoma ductal in situ (DCIS)

O DCIS (Figura 12), refere-se à substituição das células epiteliais normais do ducto mamário por células anormais, porém ainda dentro da camada de tecido de origem. Embora o DCIS possa apresentar uma massa palpável, é mais frequentemente detectada na mamografia, onde é comumente identificada pelo aparecimento de microcalcificações (pequenos pedaços de cálcio que aparecem como pontos brancos em cachos). A maioria dessas microcalcificações são

inofensivas, porém alguns tipos podem ser um indicativo de um câncer *in situ* ou invasivo.

Uma vez que as células anormais do DCIS estão contidas dentro da camada de células onde eles se originaram, eles não podem se espalhar para outros órgãos e causar doença grave ou morte. No entanto, se não tratada, tem o potencial de evoluir para um câncer invasivo. Logo, o principal objetivo do tratamento para o DCIS é prevenir a progressão para um câncer invasivo (*American Cancer Society*, 2015). Estudos de acompanhamento a longo prazo com mulheres cujo DCIS não foi tratado devido a um diagnóstico errado classificado como benígno, apontaram que 20-53% das mulheres foram diagnosticadas com um câncer invasivo ao longo de 10 anos (EUSEBI et al., 1994; ALLRED, 2010).

Figura 12 - Carcinoma de ducto *in situ*



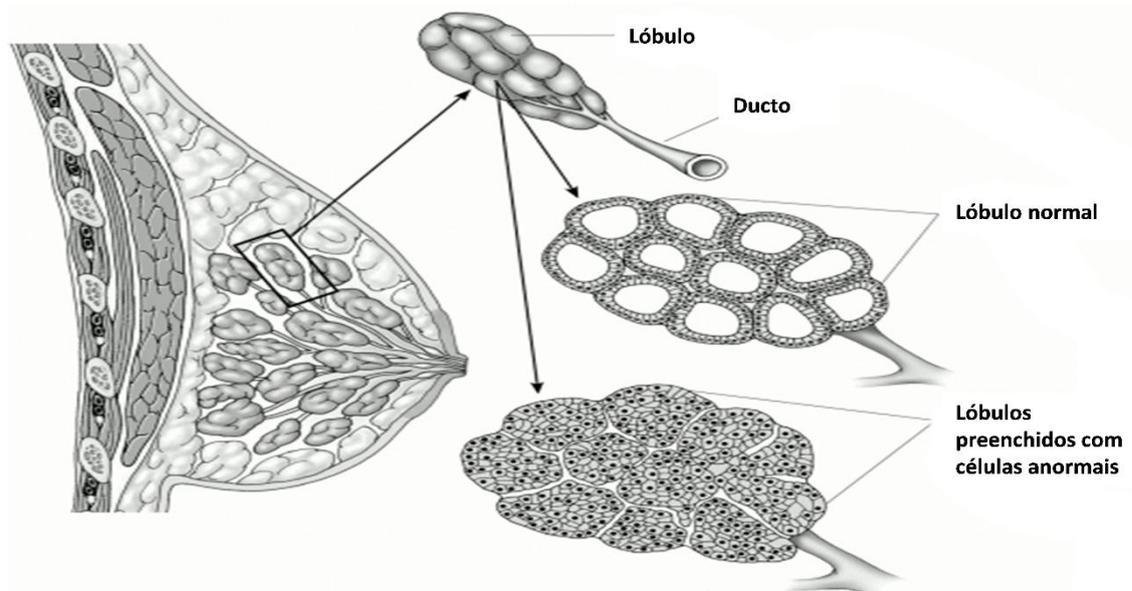
Fonte: Adaptado de *American Cancer Society*, 2016.

Carcinoma de lóbulo *in situ* (LCIS)

O LCIS refere-se as células que se assemelham a células cancerosas que crescem dentro da parede dos lóbulos, porém, sem atravessá-la (*American Cancer Society*, 2015) (Figura 13). O LCIS, geralmente, não é considerado como um precursor do câncer invasivo, entretanto, pode ser um marcador para o aumento do

risco do desenvolvimento do câncer de mama invasivo. A exceção é uma variante relativamente incomum, conhecida como LCIS pleomórfico, no qual as células parecem mais atípicas ao microscópio, este tipo está associado a um maior risco de câncer invasivo e muitas vezes é tratado como um câncer precursor (PIERI et al., 2014). A forte evidência de que o LCIS é mais um indicador de risco do que um precursor direto do câncer vem de estudos baseados em registros, como por exemplo, um estudo realizado com mulheres diagnosticadas com LCIS de 1973 a 1998, onde foi descoberto que 7% das mulheres desenvolveram câncer de mama invasivo dentro de 10 anos (CHUBA et al., 2005).

Figura 13 - Carcinoma de lóbulo *in situ*



Fonte: Adaptado de *American Cancer Society*, 2015.

Carcinoma ductal invasivo (IDC)

Este é o tipo de câncer de mama invasivo mais comum. Inicia-se no ducto da mama, que por sua vez se rompe através da parede do ducto e cresce em direção ao TA da mama. Neste ponto, é capaz de se espalhar para outras partes do corpo através do sistema linfático e da corrente sanguínea. A cada dez cânceres invasivos de mama, oito são carcinomas de ducto invasivos (*American Cancer Society*, 2015).

Linhas de adenocarcinoma mamário: MCF-7 e MDA-MB-231

As linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231 são provenientes de adenocarcinomas mamários. A linhagem celular MCF-7, de acordo com o perfil da expressão gênica, pertence ao subtipo luminal A (BURDALL et al., 2003), é positiva para o receptor de estrogênio (ER⁺), negativa para vimentina e possui caráter não invasivo (SCHIEMANN et al., 1997). A linhagem celular MDA-MB-231 é classificada como basal, ou seja, é negativa para os receptores de estrogênio (ER⁻), progesterona (PR⁻) e fator de crescimento epidermal (HER2⁻), possui caráter invasivo, sendo conhecida como triplo negativa (HOLLIDAY e SPEIRS, 2011). Cerca de 75% dos cânceres de mama do tipo triplo negativo são classificados no subtipo basal definido pelo perfil de expressão gênica, e possuem um prognóstico mais pobre a curto prazo do que outros subtipos, em parte porque atualmente não há terapias direcionadas para esses tumores (BIANCHINI et al., 2016)

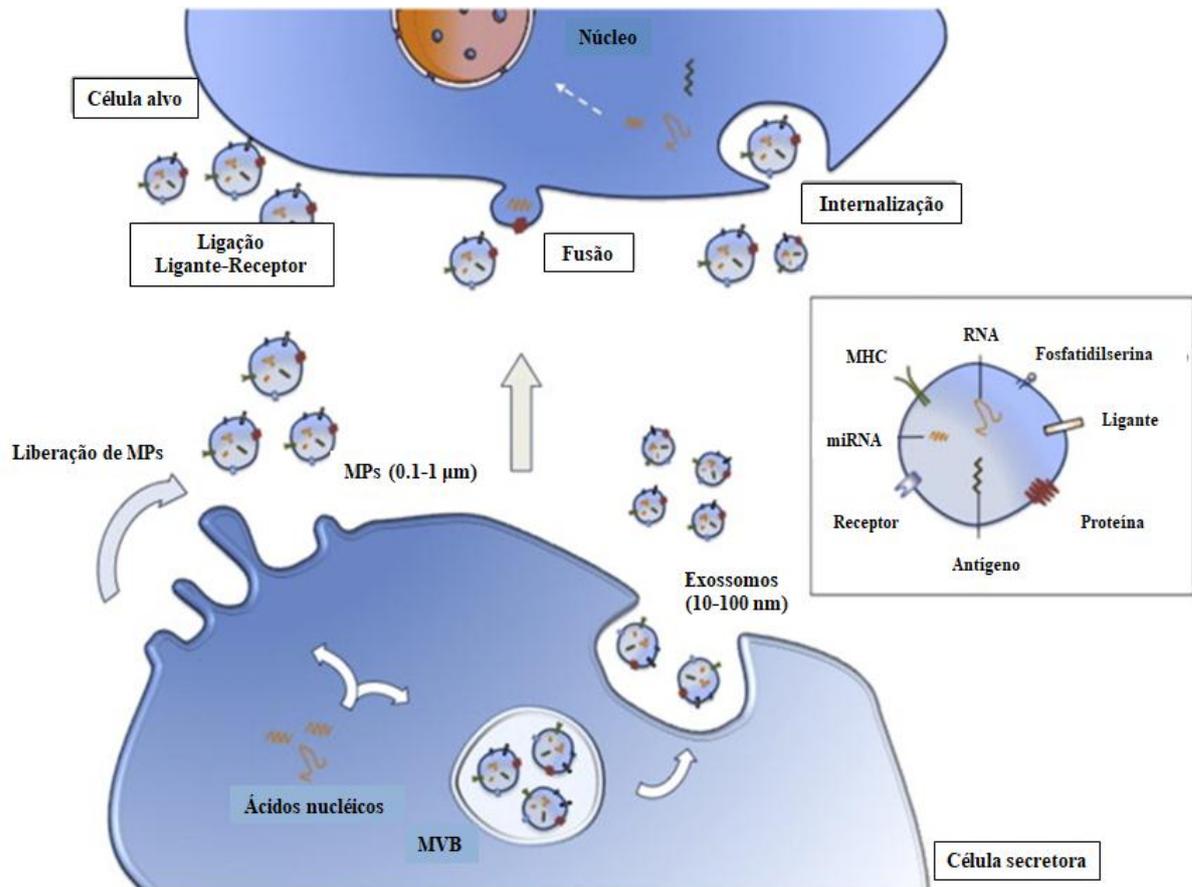
Dados na literatura mostram que as células MDA-MB-231 são capazes de proliferarem e migrarem a partir da sinalização da PI3K/AKT, e que a proliferação e migração são inibidas quando utilizado um inibidor desta via (WANG, 2009). Sabe-se que essa via regula vários processos celulares, como proliferação celular, sobrevivência e migração (CANTLEY, 2002). Além disso, a mesma é capaz de modular positivamente a expressão de VEGF nas células endoteliais (JIANG et al., 2009). O VEGF está diretamente relacionado ao processo angiogênico (SHWEIKI et al., 1992), que é essencial para o suprimento nutricional do tumor, permitindo a continuação de seu crescimento e sua disseminação, gerando um quadro de metástase (FOLKMAN, 1995), e alguns trabalhos demonstram que as células MDA-MB-231 são capazes de secretar VEGF (TANG et al., 2006; LEE et al., 2007). Outros dados na literatura relatam que as células MDA-MB-231 expressam MMP-2 e MMP-9, as quais estão associadas as vias da p38, MAPK e STAT-3, indicando seu grande poder invasivo (LI et al., 2015). Um estudo realizado por Li e colaboradores demonstrou que as células MCF-7 podem migrar e invadir de maneira dependente da via de sinalização da ERK (LI et al., 2017); outros trabalhos demonstraram que a leptina pode induzir o aumento de sua proliferação, bem como a transição epitélio-mesênquima, (TEM) através da via de sinalização da STAT-3 (DIEUDONE et al., 2002; CHANQ et al., 2015). A leptina também é capaz de aumentar a proliferação

das células MDA-MB-231 via STAT-3 (RAY et al., 2007). Como os dados da literatura sugerem, essas células possuem diversos mecanismos que favorecem sua sobrevivência, os quais ainda precisam ser bem elucidados.

Vesículas Extracelulares (VEs)

São pequenas vesículas de membrana liberadas por diferentes tipos celulares. Recentemente, a Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV) propôs recomendações baseadas na padronização da coleta de amostras, métodos de isolamento e análises nas pesquisas de VEs (WITWER et al., 2013). Contudo, embora tenham sido feitos esforços para homogeneizar os protocolos, a confusão entre diferentes tipos de VEs ainda são observáveis na literatura. As principais VEs estudadas são os exossomos e as micropartículas, que se diferem em termos de biogênese, morfologia, tamanho e via de secreção (TUAL-CHALOT et al., 2011; GRACEB et al., 2014) (Figura 14).

Figura 14 - Vesículas extracelulares: Biogênese, Composição e Destino



Nota: As micropartículas (MPs) são formadas através de brotamento da membrana plasmática, enquanto os exossomos são gerados pela fusão de corpos multivesiculares (MVB) com a membrana, induzindo sua liberação no ambiente. MPs e exossomos podem atingir as células destinatárias por meio da interação direta pela ligação do ligante-receptor, por fusão com a membrana plasmática, e por processos de internalização. Esses caminhos resultam na entrega de proteínas e ácidos nucleicos em direção a membrana, citoplasma ou núcleo das células alvo. As vesículas extracelulares como uma representação esquemática (caixa direita) podem transportar proteínas de membrana, como ligantes, receptores, proteínas, fosfolípidios, moléculas de MHC e/ou componentes internalizados como ácidos nucleicos (miRNA e RNA) e antígenos.

Fonte: Adaptado de Milbank et al., 2016.

Os exossomos apresentam de 30 a 100 nm de diâmetro, são originados a partir do compartimento das células da membrana endossomal, através da invaginação mediada por endocitose de fragmentos de membrana que se fundem para formarem os corpos multivesiculares (RAPOSO e STOOVOGEL, 2013). A formação dos corpos multivesiculares envolve mecanismos moleculares agrupados em quatro complexos de proteínas, o complexo de classificação endossomal responsável pelo transporte (ESCRT)-0, I, II e III, os quais estão envolvidos no reconhecimento de proteínas na membrana endossomal e fusão da membrana

(Raposo e Stoorvogel, 2013). Os corpos multivesiculares (MVB) podem ser degradados por lisossomos ou então se fundirem com a membrana plasmática, induzindo a exocitose desses endossomas, originando os chamados exossomos (COLOMBO et al., 2014)

Inicialmente consideradas como "poeira celular" (WOLF, 1967), as MPs são consideradas pequenas vesículas bioativas com um diâmetro entre 0,1 a 1 μm , são liberadas por "brotamento de membrana" após ativação celular química ou física, ou durante o processo de apoptose. Essa ativação estimula a indução de um aumento constante da concentração de cálcio intracelular, levando a uma proteólise dependente de cálcio das proteínas do citoesqueleto (MIYOSHI et al., 1996), além da ativação da quinase e inibição da fosfatase (YAN et al., 2009), ambos contribuindo para a ruptura do citoesqueleto, passo essencial para a posterior liberação das MPs. O aumento da concentração de cálcio intracelular também induz mudanças na atividade de transportadores de fosfolípidos, induzindo a externalização da fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina, as quais estão localizadas naturalmente na parte interna da membrana plasmática (PANATALA et al., 2015), como resultado do excesso de carga negativa devido a exposição desses fosfolípidos, também ocorre a ruptura da membrana para posterior liberação de MPs. As MPs apresentam em sua superfície antígenos que são específicos das suas células originárias, que independem do mecanismo pelo qual as MP são formadas, e que funcionam como marcadores celulares (AUPEIX et al., 1997). No entanto, aproximadamente 50% das MPs não expõe a fosfatidilserina em sua superfície (ARRAUD et al., 2014). Diversas vias de sinalização que conduzem a um aumento da concentração intracelular de cálcio estão implicadas nos mecanismos de liberação de MPs, assim, o ROS (Burger et al., 2011), Rho associado a quinase (ROCK-1) (SEBBAGH et al., 2001) e a quinase regulada por sinal extracelular (ERK) (KUNZELMANN-MARCHE et al., 2002) são alguns dos possíveis mecanismos moleculares na indução da liberação das MPs.

Por outro lado, a liberação de MPs pela indução da apoptose é dependente da ativação da ROCK-1 e Caspase 3 (COLEMAN et al., 2001), que promovem o aumento da geração de força em actina-miosina, contribuindo para a formação de filamentos (MEKAWA et al., 1999). Durante a apoptose, ROCK I é clivada por caspases ativadas, tornando-se ativa. Como consequência, as vesiculações da membrana são necessárias para a redistribuição do DNA fragmentado a partir da

região nuclear para as vesículas de membrana e corpos apoptóticos (COLEMAN et al., 2001).

As VEs podem, naturalmente, transportar sinais distintos, carregados por proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, dependendo do estímulo ou célula de origem, apresentando conteúdo altamente heterogêneo (RAPOSO e STOOVOGEL, 2013). Uma vez liberadas, através dos mecanismos descritos anteriormente, as VEs assumem as suas funções de comunicação célula-célula através da interação com suas células receptoras. As VEs podem interagir com células alvo e então modificar seu fenótipo ou sua função por diferentes mecanismos (MARTINES e ANDRIANTSITOHAINA, 2011; TUAL-CHALOT et al., 2011; ANDRIANTSITOHAINA et al., 2012; GACEB et al., 2014): através da interação direta com os receptores presentes na superfície de suas células alvo e sua subsequente ativação da cascata de sinalização, ou pela transferência de lipídios, proteínas, ácidos nucleicos por fusão ou internalização com as células-alvo.

As VEs apresentam papel importante nos processos de comunicação, tanto nas respostas fisiológicas, através da vigilância imunológica (RAPOSO et al., 1996), coagulação sanguínea (DEL CONDE et al., 2005), reparação de tecidos (MARTINES e ANDRIANTSITOHAINA, 2011), como também em inúmeras doenças. Diversos estudos têm demonstrado a associação de VEs em doenças como HIV (AUPEIX et al., 1997), lúpus (COMBES et al., 1999), pré-eclâmpsia (VANWIJK et al., 2002), diabetes mellitus do tipo 2 (DMT2) (NOMURA et al., 1995), doenças cardiovasculares (NOMURA et al., 2000), e o câncer (KANAZAWA et al., 2003; KIM et al., 2003).

Um estudo realizado por Heinrich e colaboradores demonstrou que ratos obesos alimentados por longo período com uma dieta hiperlipídica, em comparação com ratos eutróficos alimentados com uma dieta normal, apresentaram um aumento nos níveis circulantes de MPs no plasma (HEINRICH et al., 2015). Estudos pré-clínicos realizados em pacientes com obesidade, síndrome metabólica e DMT2, também apresentaram aumento nos níveis circulantes de MPs (AGOUNI et al., 2008; CAMPELLO et al., 2015; DIAMANT et al., 2002; GOICHOT et al., 2006; NOCI et al., 2015).

Há pouco tempo se acreditava que as MPs eram liberadas apenas por células endoteliais, plaquetárias ou leucocitárias. Porém, estudos mais recentes demonstraram que as mesmas podem ser liberadas também por adipócitos, por

exemplo (AOKI et al., 2007). As MPs estão envolvidas na sinalização entre adipócitos e os macrófagos, na sinalização da insulina no fígado e em células musculares. Além disso apresentam um papel multifacetado no câncer, sendo capazes de promoverem a progressão tumoral pela modulação do microambiente tumoral (AOKI et al., 2010; KRANENDONK et al., 2014; KRALISCH et al., 2014; MULLER et al., 2009; DOS ANJOS PULTZ et al., 2017).

Nosso grupo demonstrou recentemente níveis elevados de MPs no plasma de indivíduos obesos, e que esse aumento de MPs na circulação é derivado de pré-adipócitos (PREF-1⁺) e leucócitos (CD45), em comparação a indivíduos magros. Não houve diferença na quantidade de MPs circulantes derivada de células endoteliais (CD31) ou de neutrófilos (CD66b) entre os grupos obeso e magro (RENOVATO-MARTINS et al., 2017). Além do aumento de MPs na circulação, também há aumento da liberação de MPs pelo tecido adiposo omental desses pacientes, as quais têm origem principalmente a partir dos leucócitos (CD45) e pré-adipócitos (PREF-1⁺). No entanto, a quantidade de MPs derivada de células endoteliais (CD31⁺) ou de adipócitos (FABP⁺) liberadas pelo tecido adiposo de pacientes obesos foi similar àquelas liberadas pelo tecido adiposo de indivíduos magros. Além disso, demonstramos que MPs liberadas pelo TA de pacientes obesos são capazes de transportarem receptores, como o TLR8, e assim modularem monócitos humanos para um perfil pró-inflamatório (CD14⁺16⁺) (RENOVATO-MARTINS et al., 2017).

Em conjunto, tais achados sugerem que as MPs do TA apresentam papéis fundamentais em vários processos, contribuindo para o agravamento de condições pró-inflamatórias na obesidade, bem como no aparecimento de comorbidades associadas à mesma. Nesse contexto, sabe-se que a associação entre o câncer de mama e obesidade é freqüentemente descrita, no entanto, pouco se sabe sobre a influência da secreção liberada pelo TA obeso sobre a modulação do comportamento de células tumorais de mama.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Tendo em vista a intrínseca relação entre a obesidade e o câncer de mama demonstrada pela literatura, o principal objetivo deste trabalho foi avaliar como os fatores secretados pelo tecido adiposo oriundos de pacientes obesos, em especial, as micropartículas, poderiam modular as células tumorais de mama. Posto isto, desenvolvemos um modelo, *in vitro*, de cultura de explantes de TA colhidos de indivíduos obesos e eutróficos obtidos durante cirurgias bariátricas ou plásticas, respectivamente. A partir deste modelo, investigamos os efeitos dos fatores secretados pelo TA obeso sobre mecanismos celulares e moleculares em duas diferentes linhagens celulares de adenocarcinoma mamário: a MCF-7, que não é invasiva e responde a hormônios, e MDA-MB-231, que é invasiva e conhecida como triplo negativa.

1.2 Objetivos específicos

Avaliação do efeito do meio condicionado (MC) e micropartículas (MPs) provenientes do TA de indivíduos obesos e saudáveis sobre as células MCF-7 e MDA-MB-231, investigando marcas relacionadas com a progressão tumoral, como:

- a) Proliferação celular;
- b) Migração celular;
- c) Invasão celular;
- d) Vias de sinalização que estariam modulando tais efeitos;
- e) Capacidade de indução de tubulogênese;
- f) Expressão do RNAm para MMP-9;
- g) Papel das MPs na expressão e atividade de MMPs;

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Linhagens celulares

As linhagens celulares de adenocarcinoma mamário MCF-7 e MDA-MB-231 e a linhagem celular da microvasculatura humana (HMEC-1) foram obtidas do Banco de células *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, Virgini, USA).

2.2 Cultura de células

As linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231 foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Gibco, Life Technologies, Calrsbad, California, EUA), enquanto a HMEC-1 foi cultivada em meio de cultura MCDB suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Ambos os meios foram suplementados com 3,7 g/L de NaHCO₃ (Merck), 5,2 g/L de HEPES (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), 60 mg/L de penicilina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), 100 mg/L de estreptomicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e com 10% SFB (Cultilab, Campinas, Brasil), em pH 7,2. As culturas foram mantidas a 37°C em uma atmosfera com 5% de CO₂, sendo armazenadas em garrafas de cultura (*Corning*). O meio de cultura foi renovado ou as células foram repicadas, quando confluentes, a cada 2-3 dias. Para a lavagem das células e repicagem foi utilizada a solução de Hank's EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) (5mM), a qual desfaz as ligações adesivas dependentes de cátions (Ca⁺² e Mg⁺²), facilitando assim a atuação da tripsina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) na soltura das células da garrafa. Depois de soltas, as células foram centrifugadas 400 x g, a 20°C, por 10 minutos (Beckman, GS-15R Centrifuge). As células foram utilizadas no máximo até a 12ª passagem.

2.3 Contagem de Células

O número de células presentes na suspensão celular foi determinado por contagem em câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi determinada pelo método de exclusão por Azul de Trypan (Gibco Invitrogen Corporation) 0,2% em PBS.

2.4 Obtenção do meio condicionado do tecido adiposo

As cirurgias onde foram coletados os explantes de TA foram realizadas no Hospital Federal de Ipanema (HFI) e no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) – UFRJ. Os fragmentos de TA subcutâneo foram obtidos a partir de indivíduos eutróficos (grupo controle), durante cirurgia plástica, enquanto os fragmentos de TA visceral foram obtidos a partir de pacientes obesos submetidos à cirurgia bariátrica (grupo obeso). Resumidamente, menos de 2 horas após a cirurgia, os fragmentos de TA foram lavados e limpos com solução salina tamponada com fosfato, em seguida, os explantes de TA (100 mg/mL) foram incubados em M199 contendo 1% de SFB, a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, os sobrenadantes de cultura (MC) foram centrifugados durante 10 min a 350 x g/4°C para a remoção de debris celulares, sendo armazenados a -80°C, para posteriores análises.

2.5 Isolamento e quantificação das micropartículas

As MPs foram obtidas a partir dos meios condicionados oriundos dos tecidos adiposos de indivíduos obesos ou saudáveis. Primeiramente, as amostras foram centrifugadas a 2000 x g, por 10 minutos, a 4°C, para a remoção de restos celulares (Eppendorf 5415R, Hamburgo, Alemanha). Em seguida, o sobrenadante obtido foi centrifugado novamente, dessa vez a 20000 x g, por 70 minutos, a 4°C (Beckman, GS-15R Centrifuge). O pellet obtido após a última centrifugação foi ressuspenso em meio 199, sem vermelho de fenol, suplementado com 1% de SFB (mantendo-se,

exatamente, o mesmo volume de meio que havia antes da centrifugação). Uma amostra controle contendo microesferas de 1 μm (*Life Technologies*, Carlsbad, CA, EUA) foi utilizada para definir com precisão adequada, no citômetro de fluxo, o perfil FSC/SSC que continham as MPs (<eventos 1 μm), e microesferas de 10 μm foram utilizados como calibradores para estimar o número de MP/ μL .

2.6 Ensaio de proliferação (MTT)

As células MCF-7 ($6,0 \times 10^3$ células/poço; $1,81 \times 10^4$ células/ cm^2) e MDA-MB-231 ($3,0 \times 10^3$ células/poço; $9,09 \times 10^4$ células/ cm^2) foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 horas, a 37°C e 5% de CO_2 , em meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Posteriormente, as células foram lavadas e tratadas com os estímulos: MC (20%), ou MPs (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) oriundos da cultura de explantes de TA de indivíduos eutróficos ou obesos, em DMEM suplementado com 1% de SFB, na presença ou não do inibidor PD98059 (3mM) (inibidor da via de sinalização MAPK/ERK) (*Cell Signaling*, Massachusetts, EUA) e incubadas por 24 h, a 37°C e 5% de CO_2 . Utilizamos um grupo incubado com DMEM suplementado com 10% de SFB, como controle positivo de proliferação. A proliferação das células foi determinada através do ensaio de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2,5-difeniliterazólio) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) a cristais de formazan. O MTT, diluído em PBS (5 mg/mL), foi adicionado às células em uma concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{poço}$. Após 4 horas o sobrenadante com MTT foi descartado, e os cristais de formazan formados foram dissolvidos em 100 μL de álcool isopropílico por poço. As placas foram então incubadas por mais 30 min. a 37°C , e em seguida foi realizada a leitura no leitor de placas EnVision® (Perkin Elmer, Massachusetts, EUA), em comprimento de onda de absorbância de 570nm.

2.7 Obtenção de extratos totais

As células MCF-7 ($1,0 \times 10^5$ células/poço; $1,04 \times 10^4$ células/ cm^2) e MDA-MB-231 (5×10^4 células/poço; $5,2 \times 10^3$ células/ cm^2) foram plaqueadas em placas de 6 poços e incubadas por 24 horas, a 37°C e 5% de CO_2 , em meio DMEM

suplementado com 10% de SFB. Após atingirem confluência, as células foram tratadas com os seguintes estímulos: MC (20%), ou MPs (20 µg/mL) oriundos da cultura de explantes de TA de indivíduos eutróficos ou obesos, em DMEM suplementado com 10% de SFB, por 24 h, 37°C e 5% de CO₂. No final do tratamento, as células foram lisadas em tampão de lise RIPA (Tris 50 mM; pH 8; Triton X-100 1% (v/v); NaCl 150 mM; SDS 0,1%; EDTA 5 mM; NaF 50 mM; ortovanadato de sódio (Na₃VO₄) 1mM; fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 1 mM; coquetel de inibidores (aprotininina 1 µM e leupeptina 1µM) e inibidor de tripsina (SBTI) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). A obtenção do extrato total das MPs *per se*, foi obtida a partir do isolamento das MPs a partir de uma quantidade inicial de 1,5 mL do MC do TA de cada paciente, individualmente. Após o isolamento, as MPs foram ressuspensas diretamente em 50 µL de tampão de lise RIPA. O conteúdo de proteínas do extrato total foi determinado pelo método de BCA (Thermo Scientific, Rockford, EUA), e após a determinação do conteúdo proteico, foram adicionados aos extratos 20% do seu volume de tampão de amostra 5x concentrado (Tris-HCl 50 mM, pH 6,8; SDS 1%, 2-mercaptoetanol 5%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,001%). As amostras foram fervidas em água (100 °C) por 5 minutos para a sua desnaturação.

2.8 Eletroforese e *western blotting*

O volume dos extratos celulares correspondente a 20 µg de proteína foram fracionados por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) desnaturante. O padrão de peso molecular correu em paralelo para estimar o peso molecular das amostras. Após 120 minutos de eletroforese a 100 V e 25 mA, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose, por 30 min., 25V-1.0A, no equipamento Trans-Blot® Turbo™ (Transfer System, Bio-Rad). A eficiência da transferência foi avaliada pela coloração da membrana com o vermelho de Ponceau, a qual foi, em seguida, lavada abundantemente com água destilada para retirar toda a coloração. Posteriormente, as membranas foram bloqueadas com TBS (Tris 20 mM, pH 7,5 e NaCl 0,5 M) contendo Tween 20 (0,1% v/v, T-TBS) e 5% de BSA *overnight* ou por 2 horas, e incubadas *overnight* com os determinados anticorpos primários: anti-Akt (goat – 1:5000) (Santa Cruz Biotechnology, Texas, EUA), anti-

pAKT (rabbit – 1:2000) (Millipore Massachusetts, EUA), anti-ERK (rabbit - 1:2000) (Santa Cruz Biotechnology, Texas, EUA), pERK 1/2 (mouse – 1:2000) (Cell Signaling ,Massachusetts, EUA), e actina (mouse – 1:1000) (*Cell Signaling* ,Massachusetts, EUA), anti-MMP-2 (rabbit 1:1000 e anti-MMP-9 (rabbit – 1:1000) (Abcam) . Após 3 lavagens de 10 minutos com o Tween-TBS, as membranas foram incubadas com os anticorpos secundários anti-IgG específicos conjugados à biotina (1:10.000) (Invitrogen, Carlsbad, EUA), à temperatura ambiente e sob agitação durante 1 hora. Posteriormente, as membranas foram lavadas novamente e incubadas com estreptavidina conjugada a peroxidase (1:10.000) (Invitrogen, Carlsbad, EUA) durante 1 hora. Para a detecção das bandas foi utilizado o kit de revelação por quimioluminescência (ECL – Super Signal West Pico Chemilumnescent Substrate) (Thermo Scientific, Rockford, EUA). As membranas foram fotografadas utilizando o ChemiDoc[®] Imaging System (Bio RAD, California, USA) e a densitometria foi analisada no programa ImageJ.

2.9 Ensaio de migração pelo método de lesão de monocamada (*wound healing*)

As células MCF-7 ($1,0 \times 10^6$ células/poço; $1,04 \times 10^5$ células/cm²) e MDA-MB-231 (5×10^5 células/poço; $5,2 \times 10^4$ células/cm²) foram plaqueadas em placas de 6 poços, incubadas a 37°C e 5 % de CO₂, em meio DMEM suplementado com 10% de SFB até atingirem 100% de confluência. Posteriormente, foram pré-tratadas com os estímulos do MC (20%), ou MPs (20 µg/mL) oriundos da cultura de explantes de TA de indivíduos eutróficos ou obesos, em DMEM suplementado com 1% de SFB na presença ou não do inibidor LY294002 (3 mM) (inibidor da via de sinalização PI3K/AKT) (*Cell Signaling*, Massachusetts, EUA) e incubadas durante 24 horas. Após esse tempo, os sobrenadantes com os estímulos foram descartados e as células foram lavadas e tratadas com mitomicina (5µg/mL) em DMEM sem SFB, por 2 horas. Em seguida, os sobrenadantes foram descartados, as células lavadas e incubadas com DMEM sem SFB. Com o auxílio de uma ponteira de pipeta, foi feito um risco na placa, na posição vertical, para a remoção das células. Tais regiões foram fotografadas nos tempos de 0, 24 e 48 horas, em microscópio invertido (Olympus IX71), no aumento de 10x. As análises do fechamento foram realizadas com auxílio do software photoshop CS5.

2.10 Ensaio de invasão celular

Os ensaios de migração foram feitos em câmaras de transwell (Becton Dickinson), com base técnica descrita por (VASSE et al., 2001). Estas câmaras são constituídas de membranas de policarbonato, na forma de insertos, que são colocadas no interior de poços de placa de cultura de 24 poços. Para este ensaio, utilizamos insertos com membranas de porosidade de 8 μm , devido ao tipo celular estudado. Primeiramente, as células MDA-MB-231 (5×10^4 células/poço; $1,31 \times 10^4$ células/ cm^2) foram plaqueadas em placas de 12 poços e incubadas por 24 horas a 37°C e 5% de CO_2 em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de FBS. Ambas as células foram tratadas com os estímulos do MC (20%), ou MPs (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) oriundos da cultura de explantes de TA de indivíduos eutróficos ou obesos, em DMEM suplementado com 1% de SFB, na presença ou não do inibidor LY294002 (3 mM) e incubadas durante 24 horas. Após esse tempo, em paralelo, foram adicionados 200 μL de gelatina 1% dentro dos insertos presentes nos poços, em seguida foi retirado o excesso e os insertos foram expostos por 15 minutos à luz UV para a polimerização. Posteriormente, as células foram tripsinizadas e colocadas dentro dos insertos (3×10^4 células/ inserto) em um volume final de 200 μL de DMEM suplementado com 1% de FBS. Na parte inferior (fora do inserto) foram adicionados 800 μL de DMEM suplementado com 10% de FBS (agente quimiotático), totalizando 1 mL. A migração das células ocorreu no tempo de 24 horas. Após o devido tempo, foram retiradas as células contidas na parte superior do inserto. As células que migraram através da membrana (parte inferior do inserto) foram fixadas e coradas com o kit panótico (Interlab). A contagem das células que migraram foi realizada microscópio invertido (Olympus IX71), contando 10 campos aleatórios em um aumento de 10x. As análises da quantidade de células que migraram foram realizadas com auxílio do software photoshop CS5.

2.11 Tubulogênese

As células MDA-MB-231 ($1,5 \times 10^5$ células/ poço; $7,89 \times 10^4$ células/ cm^2) foram plaqueadas em placas de 24 poços em meio de cultura DMEM suplementado

com 10% de SFB, sendo incubadas por 24 horas, a 37°C e 5% de CO₂. Posteriormente, foram tratadas com os estímulos do MC (20%), ou MPs (20 µg/mL) oriundos da cultura de explantes de TA de indivíduos eutróficos ou obesos, em DMEM suplementado com 5% de SFB. Enquanto isso, as células endoteliais HMEC-1 (3×10^5 células/poço; $1,57 \times 10^5$ células/cm²) também foram plaqueadas em placa de 24 poços em meio de cultura MCDB-131 suplementado com 10% de FBS, sendo incubadas por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. Após as 24 horas de tratamento das células MDA-MB-231, retiramos o sobrenadante dessas células, o qual foi dado como estímulo para as células endoteliais por 24 horas. As células endoteliais foram tratadas, também com o MC derivado do TA dos indivíduos eutróficos ou obesos, durante 24 horas. Posteriormente, as células endoteliais HMEC-1 foram lavadas e tripsinizadas, sendo colocadas em placas de 96 poços ($2,5 \times 10^4$ células/poço; $7,57 \times 10^4$ células/cm²) sobre 55µL do Matrigel®. Após esse tempo, retiramos o sobrenadante e fixamos as células sobre o Matrigel® com gluteraldeído 1,1 % em PBS, durante 20 minutos em temperatura ambiente. A retirada do fixador foi feita por três lavagens com PBS 1X. Não houve danos nas estruturas tubulares por esse tipo de fixação. As análises do número total e o comprimento das ramificações (brotos ou prolongamentos celulares endoteliais, que resultam no aspecto em “rede” da diferenciação angiogênica) foram feitas em campo claro, no microscópio invertido (Olympus IX71) em um aumento de 4 e 10 X. Foram capturadas imagens de pelo menos 4 campos aleatórios, que foram analisadas com o auxílio do programa Adobe Photoshop 7.1. As análises foram realizadas no tempo de 6 horas.

2.12 RT-PCR

As células MDA-MB-231 (5×10^4 células/poço, $5,2 \times 10^3$ células/cm²) foram plaqueadas em placas de 6 poços e incubadas por 24 horas, a 37°C e 5% de CO₂ em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB. Posteriormente, foram tratadas com os estímulos do MC (20%), ou MPs (20 µg/mL) oriundos da cultura de explantes de TA de indivíduos eutróficos ou obesos, em DMEM suplementado com 5% de SFB. O RNA total foi extraído pelo método de separação por coluna através

do kit RNAeasy Mini Spin Column (Qiagen), de acordo com o protocolo do determinado pelo fabricante. A quantificação e pureza do RNA total foram determinadas através do espectrofotômetro NanoVue® Plus. As amostras de RNA foram retro-transcritas em DNA complementar utilizando-se o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems), que contém tampão de magnésio contendo H₂O, dNTPs, primers randômicos e a enzima transcriptase reversa. As amostras de DNA complementar foram estocadas em freezer em freezer -20°C até o momento de uso. A amplificação de MMP-9 (Qiagen – QT00040040) foi realizada utilizando o cDNA na presença da sonda fluorescente SybrGreen® (Qiagen) em uma reação de PCR. O nível da expressão do gene analisado foi normatizado em relação a actina (Qiagen – QT01680476). A expressão relativa foi determinada pela análise do $2^{-\Delta\Delta Ct}$, que representa o valor da expressão do gene analisado em relação ao seu calibrador. O qPCR foi realizado em Rotor Gene Q e os *amplicons* foram quantificados pelo sistema de fluorescência da SybrGreen®. A condição padrão da reação de PCR foi: 95°C por 5 minutos, seguidos de 40 ciclos a 95°C por 5 segundos e 60°C por 10 segundos, subsequente a uma curva-padrão de desnaturação.

2.13 Zimografia

As MPs do TA foram isoladas (conforme o item 2.5) e o “*pellet*” final ressuspenso em tampão de lise RIPA (conforme o item 2.7) para que o conteúdo interno presente nas MPs pudesse ser acessado. As amostras (20 µg) foram tratadas com o tampão de amostra e submetidas ao gel fracionador de policacrilamida SDS-PAGE. O padrão de peso molecular correu em paralelo para estimar o peso molecular das amostras. A corrida foi realizada em aproximadamente 2 horas, a 100V, e a 4°C. Posteriormente, o gel foi lavado em solução de renaturação por 1 hora a temperatura ambiente (TA), trocando a solução a cada 15 minutos. Em seguida o gel foi incubado com o tampão de desenvolvimento, por 72 h, a 37°C. Após esse tempo o gel foi corado com *Coomassie Blue* 0,2%, e então descorado até o aparecimento das bandas de digestão.

2.14 Análises estatísticas

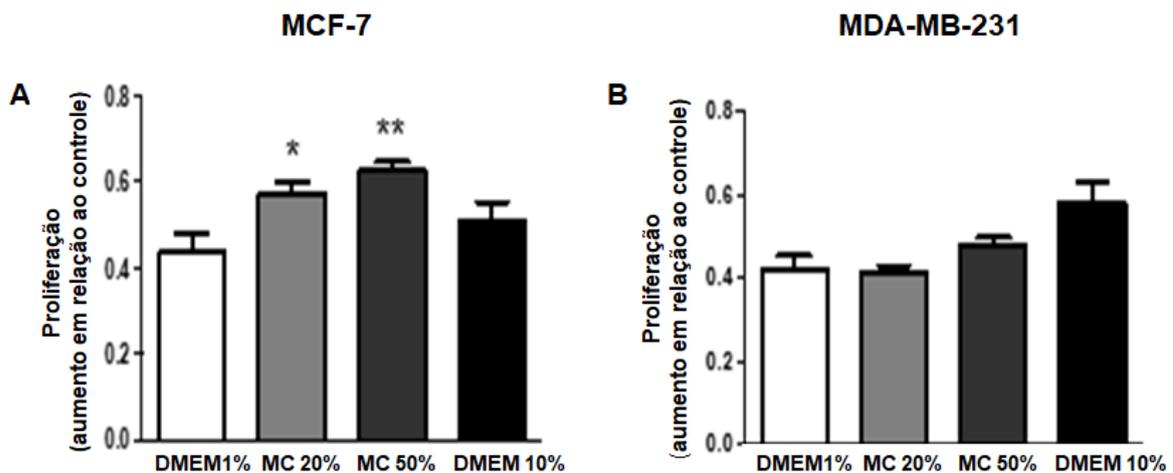
Os dados são expressos como médias \pm erro padrão da média. As comparações de médias para variáveis quantitativas entre os grupos foram realizadas utilizando teste t de *Student* ou teste *one-way* ANOVA, seguido pelo pós-teste Sidak. Para toda análise, um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. A avaliação estatística foi realizada usando o *software GraphPad Prism* versão 7.0 (*GraphPad Software*, La Jolla, CA).

3 RESULTADOS

3.1 Padronização da concentração de meio condicionado a ser utilizada nos experimentos

Nosso primeiro passo foi a avaliação da melhor concentração de MC a ser utilizado no tratamento das células de adenocarcinoma mamário. Para isso, realizamos um ensaio de viabilidade/proliferação celular pelo método do MTT. As células foram tratadas com concentrações de 20% e 50% v/v do MC proveniente do TA obeso, em DMEM suplementado com 1% de SFB. Observamos que no tempo de 24 horas, as concentrações de 20% e 50% induziram um aumento na viabilidade/proliferação das células MCF-7 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, respectivamente) (Figura 15 A), mas não alteraram a viabilidade/proliferação das células MDA-MB-231 (Figura 15 B). Possivelmente, não observamos diferenças nas células MDA-MB-231, devido sua alta taxa de proliferação. Sendo assim, acreditamos que no tempo de 24 horas as mesmas já apresentem um platô de crescimento. Portanto, escolhemos a concentração de 20% (v/v) como concentração padrão a ser realizada em todos os experimentos.

Figura 15 - Padronização da concentração do MC



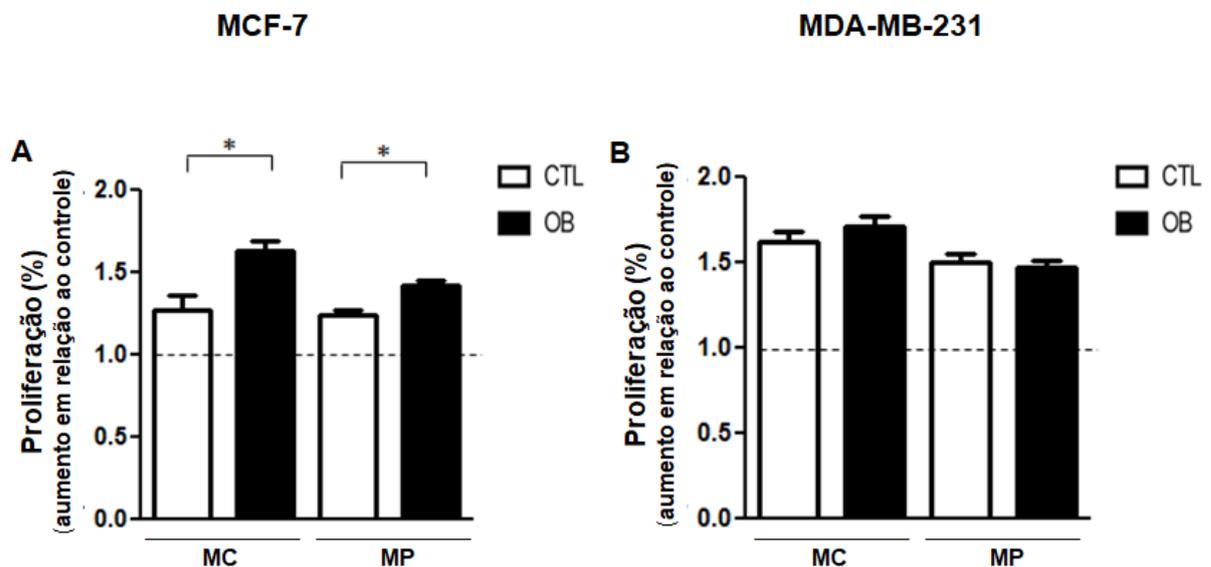
Nota: As células MCF-7 e MDA-MB-231 (A e B, respectivamente) foram tratadas por 24 h com os MC na concentração de 20% e 50%.V/V. Após o tratamento a proliferação/viabilidade celular foi avaliada pelo método de MTT. Os resultados são representativos de 3 diferentes experimentos. O teste one-way- anova com pós-teste de Sidak foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$). Utilizamos como controle do experimento o DMEM com 1% de SFB. Os resultados foram representados como média \pm erro padrão.

Fonte: A autora, 2018.

3.2 O meio condicionado e as micropartículas do tecido adiposo obeso aumentam a proliferação das células MCF-7

Sabe-se que as células tumorais possuem capacidade proliferativa exacerbada devido a autossuficiência de fatores de crescimento e devido à ativação constitutiva dos receptores do tipo tirosina quinase, sendo um dos principais mecanismos para o desenvolvimento do tumor (HANAHAN e WEINBERG, 2011). Sendo assim, avaliamos se o tratamento derivado do TA obeso seria capaz de induzir alterações na capacidade de proliferação das linhagens de células MCF-7 e MDA-MB-231, em comparação ao tratamento proveniente do TA controle. Observamos que, quando comparado ao grupo controle, no tempo de 24 horas, tanto o MC e MPs provenientes do TA obeso induziram o aumento da proliferação nas células MCF-7 (* $p < 0.05$) (Figura 16 A). Este efeito não foi observado nas células MDA-MB-231 (Figura 16 B).

Figura 16 - Efeito da secreção do TA obeso sobre a proliferação celular das células MCF-7 e MDA-MB-231



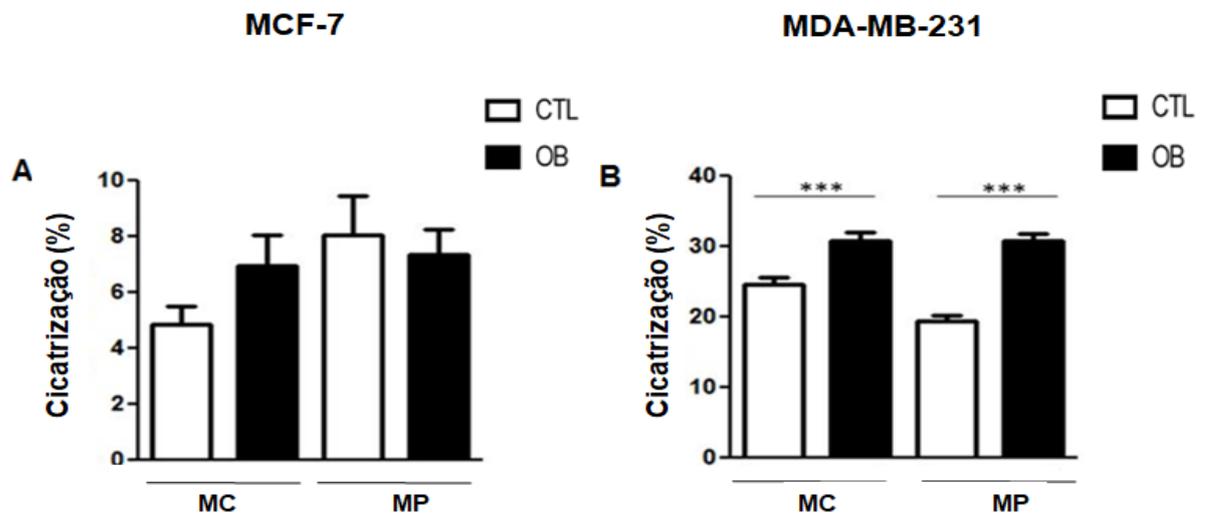
Nota: As células MCF-7 e MDA-MB-231 (A e B, respectivamente) foram tratadas por 24 h com o MC (20% V/V) ou MP (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) provenientes do TA controle e obeso. Posteriormente, a proliferação celular foi avaliada pelo método de MTT, por 24 h. Os resultados são representativos de 3 diferentes experimentos. O teste one-way- anova com pós-teste de Sidak foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos (* $p < 0.05$). Os resultados foram representados como média \pm erro padrão. A linha tracejada representa o grupo que não recebeu nenhum estímulo, sendo tratado com meio DMEM sem SFB.

Fonte: A autora, 2018.

3.3 O meio condicionado e as micropartículas do tecido adiposo obeso aumentam a migração das células MDA-MB-231

Outro mecanismo também muito importante utilizado pelas células para a progressão tumoral é a sua capacidade migratória, a qual possibilita que a célula migre de uma determinada área para outra. Então, avaliamos se o tratamento com o MC e MPs provenientes do TA obeso seriam capazes de modular a migração das células MCF-7 e MDA-MB-231. Após 24 horas pudemos observar que o tratamento proveniente do TA obeso não induziu a migração das células MCF-7 (Figuras 17 A), entretanto, o MC e as MPs provenientes do TA obeso foram capazes de potencializar a migração das células MDA-MB-231 (**p < 0.005) (Figura 17 B).

Figura 17 - Efeito da secreção do TA obeso sobre a migração células das células MCF-7 e MDA-MB-231



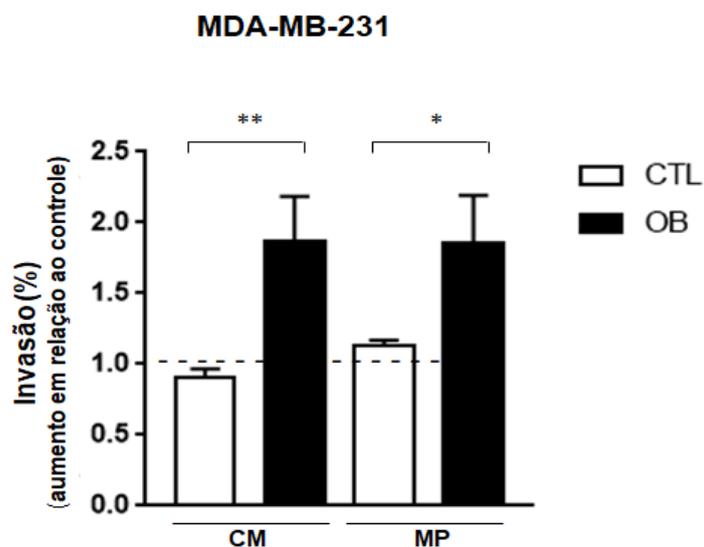
Nota: As células foram pré-tratadas por 24 h com MC (20% V/V) ou MP (20 µg/mL). Após o tratamento, foram incubadas com mitomicina (5 µg/mL) por 2 h em DMEM sem SFB. Em seguida, as células foram lavadas e mantidas em DMEM sem SFB. A migração celular foi avaliada pelo método de *Wound Healing*, no tempo de 24 h (comparado ao tempo 0 h). As fotos foram retiradas no microscópio invertido, em um aumento de 10x (2 fotos por campo). Os resultados são representativos de 3 diferentes experimentos. O teste one-way-anova com pós-teste de Sidak foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos (**p < 0.005). Os resultados foram representados como média ± erro padrão.

Fonte: A autora, 2018.

3.4 O meio condicionado e as micropartículas do tecido adiposo obeso aumentam a capacidade invasiva das células MDA-MB-231

O mecanismo de invasão celular é uma das marcas da progressão tumoral propostas por Hanahan e Weinberg, responsável por dar suporte ao processo de metástase (HANAHAN e WEINBERG, 2011). A invasão celular é caracterizada pela habilidade das células tumorais de atravessarem a membrana basal epitelial do tecido adjacente, e assim, invadirem o estroma intersticial (AZNAVOORIAN et al., 1993). Dessa forma, adquirem capacidade de penetrar na corrente sanguínea e linfática, podendo então invadir outros tecidos e órgãos (HANAHAN e WEINBERG, 2011). Observamos anteriormente que o tanto o MC quanto as MPs derivadas do TA obeso foram capazes de induzirem um aumento na migração das células MDA-MB-231, sendo assim, nos perguntamos se o mesmo tratamento poderia também induzir o aumento da invasão. Como podemos observar na Figura 18, tanto o MC quanto as MPs oriundas do TA induziram aumento na capacidade invasiva das células MDA-MB-231. As células MCF-7 não invadiram (resultado não mostrado).

Figura 18 - Efeito da secreção do TA obeso sobre a invasão das células MDA-MB-231



Nota: As células foram tratadas por 24 h com o MC (20% V/V) ou MP (20 µg/mL), provenientes do TA. A invasão celular foi avaliada pela técnica de migração através do transwell (preenchido por gelatina 1%). As células que migraram através da membrana foram fixadas e coradas com o kit panótico. A contagem das células foi realizada microscópio invertido, contando 10 campos aleatórios em um aumento de 10x. As análises da quantidade de células que migraram foram realizadas com auxílio do software photoshop CS5. Os resultados são representativos de 3

diferentes experimentos. O teste one-way- anova com pós-teste de Sidak foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). Os resultados foram representados como média \pm erro padrão.

Fonte: A autora, 2018.

3.5 O meio condicionado e as micropartículas do tecido adiposo obeso ativam as vias de sinalização de ERK e AKT nas células MCF-7 e MDA-MB-231, respectivamente

Tendo em vista que a secreção proveniente do TA obeso aumentou a proliferação das células MCF-7 e induziu aumento na capacidade migratória e proliferativa das células MDA-MB-231, resolvemos investigar quais vias de sinalização estariam modulando tais processos. É sabido que as células tumorais possuem uma desregulação desses sinais, podendo adquirir a capacidade de sustentar a sinalização proliferativa, migratória e invasiva por diferentes vias de sinalização. Algumas das vias que estão relacionadas aos processos de proliferação/migração, são a PI3K/AKT e MAPK/ERK (CHANG et al., 2003; VANHAESEBROECK et al., 2010).

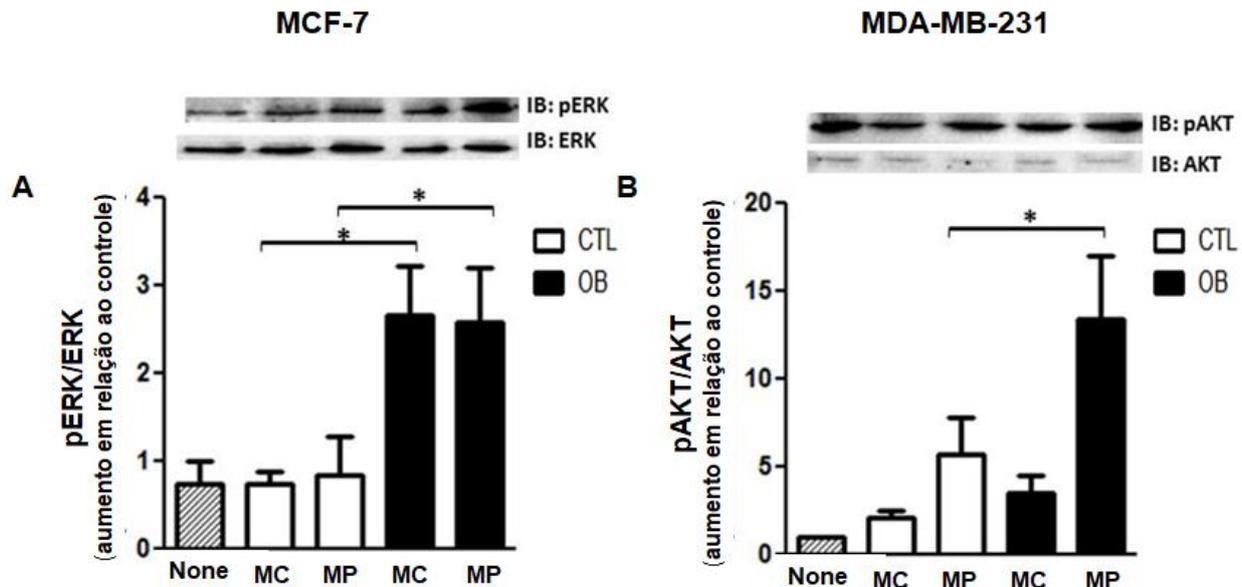
Em condições normais, a via de sinalização da PI3K/AKT contribui em muitos processos, incluindo ciclo celular, crescimento celular, sobrevivência, migração, e no transporte intracelular de vesículas (VANHAESEBROECK et al., 2010). Essa via de transdução de sinais é uma das mais frequentemente atividades no câncer, onde continua tendo um papel importante no crescimento, proliferação, motilidade e sobrevivência celular, porém, em prol das células tumorais (YUAN e CANTLEY, 2008).

A via de transdução de sinais da ERK pertence a família das MAPK (ROUSE et al., 1994), ambas estão relacionadas à regulação da progressão do ciclo celular e apoptose, em diferentes tipos celulares. No câncer, muitas vezes, essas vias sofrem mutações e podem induzir eventos associados tanto ao aumento da proliferação celular quanto a parada do ciclo celular (CHANG et al., 2003).

Nossos resultados demonstraram que o tratamento com o MC e as MPs proveniente do TA obeso, induziu nas células MCF-7 a fosforilação da via de sinalização da ERK (Figura 19 A) sem alterar a via da AKT (resultado não mostrado). Já nas células MDA-MB-231, o tratamento com as MPs do TA obeso induziu a

fosforilação na via de sinalização da AKT (Figura 19 B), não alterando a via de sinalização da ERK (resultado não mostrado).

Figura 19 - Efeito da secreção do TA obeso sobre as vias de sinalização de ERK e AKT nas células MCF-7 e MDA-MB-231, respectivamente



Nota: As células foram tratadas por 24 h com MC (20% V/V) ou MPs (20 ug/mL). O extrato total foi submetido ao SDS-PAGE e posterior *immunoblotting* para detecção de (A) pERK e ERK nas células MCF-7 e (B) pAKT e AKT, nas células MDA-MB-231. Os resultados foram quantificados por densitometria no software *ImageJ*, a partir do cálculo da razão entre os níveis de pAKT/AKT e pERK/ERK. Os resultados são representativos de 3 diferentes experimentos. O teste one-way- anova com pós-teste de Sidak foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos (*P<0.05, **P<0.01, ***p < 0.005). Os resultados foram representados como média \pm erro padrão

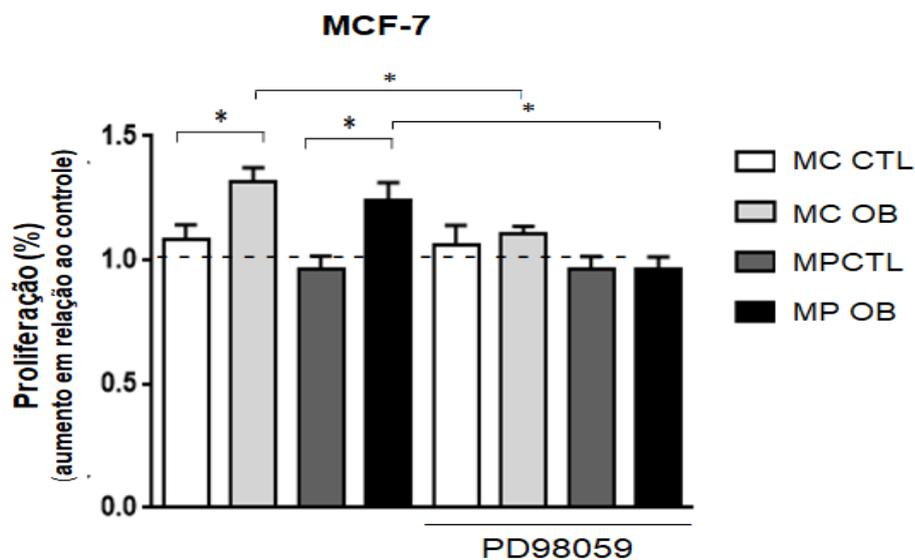
Fonte: A autora, 2018.

3.6 A via de sinalização da ERK tem um papel primordial no aumento da proliferação das células MCF-7 induzido pelo meio condicionado e pelas micropartículas do tecido adiposo obeso

Nossos resultados demonstraram que o MC e as MPs derivados do TA obeso induziram um aumento na proliferação de células MCF-7, além da indução da fosforilação da via de sinalização de ERK. A fim de confirmar se o aumento da proliferação ocorreu por meio dessa via, utilizamos um inibidor da via MAPK/ERK, o PD98059, e realizamos o ensaio de proliferação por MTT. A Figura 20 mostra que o

inibidor desta via de sinalização foi capaz de inibir o efeito causado pelo MC e pelas MPs provenientes do TA obeso, demonstrando que esta via de sinalização tem um papel importante na proliferação de células MCF-7 em condições de obesidade.

Figura 20 - Avaliação do papel da via de sinalização ERK/MAPK na proliferação das células MCF-7



Nota: As células MCF-7 foram tratadas por 24 h com o MC (20% V/V) ou MPs (20 µg/mL) provenientes do TA controle ou obeso, na presença ou ausência do inibidor da via de sinalização da ERK (PD98059). Posteriormente avaliamos a proliferação celular, no tempo de 24 h, pelo método de MTT. Os resultados são representativos de 3 diferentes experimentos. O teste one-way- anova com pós-teste de Sidak foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos (*p<0.05). Os resultados foram representados como média ± erro padrão.

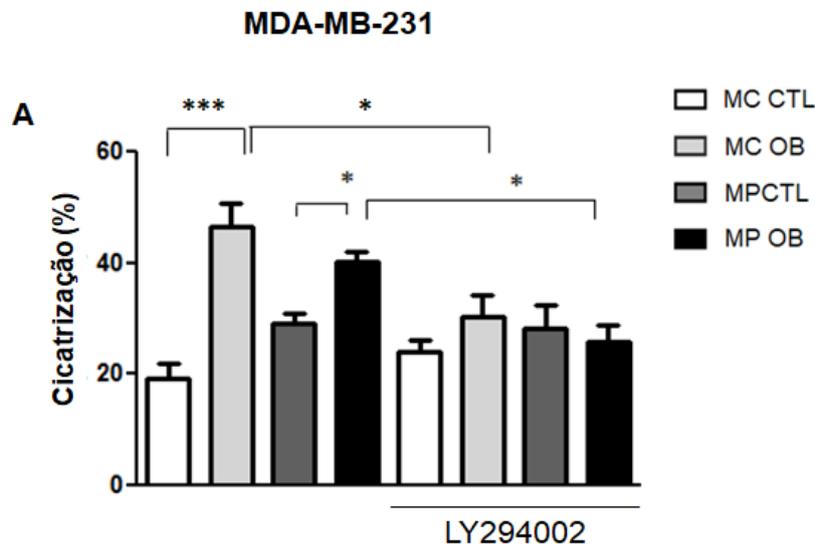
Fonte: A autora, 2018.

3.7 A via de sinalização da AKT tem um papel primordial no aumento na migração e invasão das células MDA-MB-231 causado pelo meio condicionado e pelas micropartículas do tecido adiposo obeso

Uma vez que nossos resultados mostraram que o MC e as MPs oriundos do TA obeso foram capazes de aumentar tanto a migração como a invasão das células MDA-MB-231, bem como um aumento na fosforilação de AKT, avaliamos se esta via de sinalização poderia estar envolvida nesses processos. Para tanto realizamos os ensaios de migração e invasão, nas mesmas condições realizadas anteriormente, com a utilização do inibidor da via da PI3K/AKT, o LY294002. Como podemos

observar na Figura 21, o inibidor desta via foi capaz de diminuir os efeitos causados pela secreção do TA obeso sobre a migração das células MDA-MB-231.

Figura 21 - Avaliação do papel da via de sinalização PI3K/AKT na migração das células MDA-MB-231

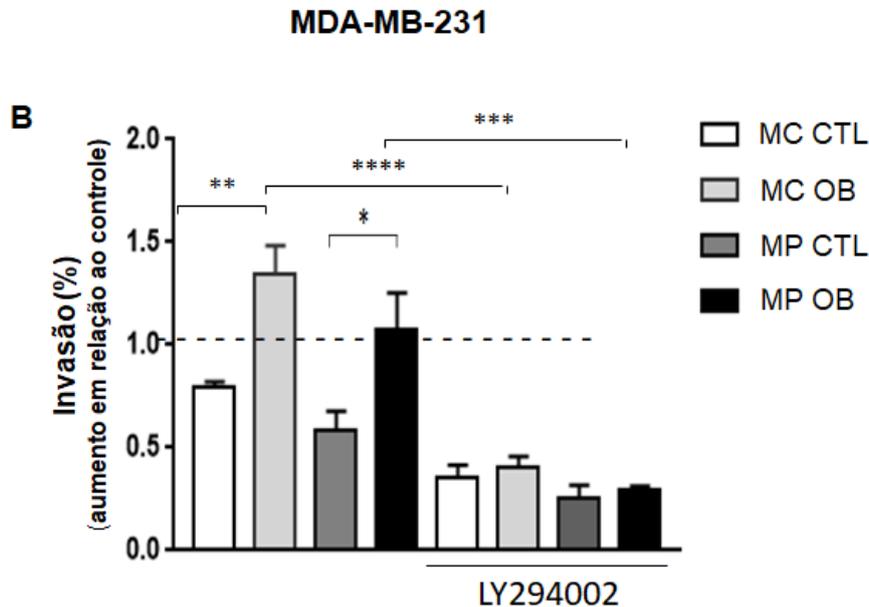


Nota: As células foram pré-tratadas por 24 h com o MC (20% V/V) ou MPs (20 µg/mL), na presença ou ausência do inibidor da via da PI3K/AKT (LY294002). Após o tratamento, foram incubadas com mitomicina (5 µg/mL) por 2 h, em DMEM sem soro. Em seguida, as células foram lavadas e mantidas em DMEM sem soro. A migração celular foi avaliada pelo método de *Wound Healing*, no tempo de 24 h (comparado ao tempo 0 h). As fotos foram retiradas no microscópio invertido, em um aumento de 10x (2 fotos por campo). Os resultados são representativos de 3 diferentes experimentos. O teste one-way- anova com pós-teste de Sidak foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos (*p<0.05, ***p < 0.005). Os resultados foram representados como média ± erro padrão.

Fonte: A autora, 2018.

Além da diminuição da capacidade migratória, a inibição dessa via também foi capaz de prejudicar a invasão das células MDA-MB-231(Figura 22), mediante o tratamento com a secreção proveniente do TA obeso. Portanto, esse resultado demonstra a importância da via da PI3K/AKT, tanto nos processos de migração quanto de invasão.

Figura 22 - Avaliação do papel da via de sinalização PI3K/AKT na invasão das células MDA-MB-231



Nota: As células foram tratadas por 24 h com o MC (20% V/V) ou MP (20 µg/mL), provenientes do TA, na presença ou ausência do inibidor da via da PI3K/AKT (LY294002). A invasão celular foi avaliada pela técnica de migração através do transwell (preenchido por gelatina 1%). As células que migraram através da membrana foram fixadas e coradas com o kit panótico. A contagem das células foi realizada microscópio invertido, contando 10 campos aleatórios em um aumento de 10 X. As análises da quantidade de células que migraram foram realizadas com auxílio do software photoshop CS5. Os resultados são representativos de 3 diferentes experimentos. O teste one-way- anova com pós-teste de Sidak foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, **** $p < 0.001$). Os resultados foram representados como média \pm erro padrão.

Fonte: A autora, 2018.

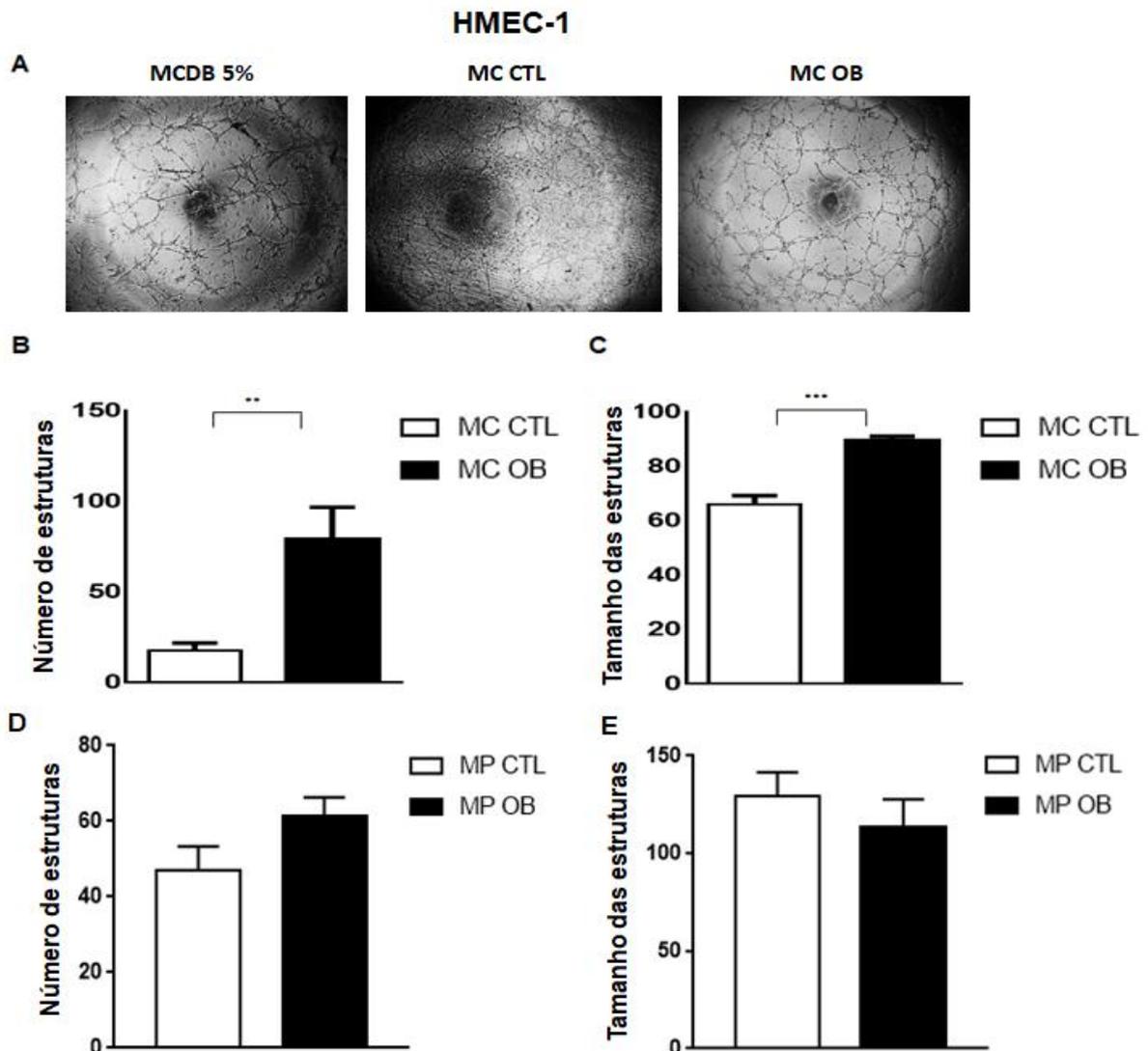
3.8 O sobrenadante de células MDA-MB-231, tratadas com o meio condicionado derivado do tecido adiposo obeso, aumenta as propriedades angiogênicas de células HMEC-1

As células tumorais, assim como os tecidos normais, necessitam de nutrientes e oxigênio para a sustentação de seu crescimento (BROWN et al, 1999), sendo assim precisam induzir a neovascularização. A neovascularização é dependente de fatores de crescimento, produzidos pelas próprias células tumorais. Um dos principais responsáveis é o VEGF, que faz aumentar a proliferação das endoteliais permitindo a formação de vasos sanguíneos (BERGERS e BENJAMIN, 2003). Uma vez que sabemos que o MC proveniente do TA obeso é rico em VEGF, e que o mesmo foi capaz de induzir aumento tanto na migração, quanto na invasão dessas células, avaliamos se células endoteliais tratadas com o

sobrenadante de células MDA-MB-231 (previamente estimuladas com o MC proveniente do TA) seriam capazes de formar túbulos, dando suporte para o processo invasivo (TALMADGE; FIDLER, 2010).

Nossos resultados demonstraram que as células HMEC-1 tratadas com o sobrenadante de células MDA-MB-231 (previamente tratadas com o MC do TA obeso) formaram um maior número de estruturas (Figura 23 B), e que o tamanho dessas estruturas estavam aumentados (Figura 23 C). Não observamos tal efeito nas células endoteliais tratadas com o sobrenadante de células MDA-MB-231 (previamente tratadas com as MPs do TA obeso) o mesmo efeito (Figuras D e E).

Figura 23 - Efeito do MC e das MPs do TA sobre as células MDA-MB-231 na indução da tubulogênese em células HMEC-1



Nota: As células MDA-MB-231 foram tratadas por 24 h com o MC (20% V/V) ou MPs (20 µg/mL) provenientes do TA controle ou obeso. Posteriormente, células HMEC-1 foram tratadas com o sobrenadante da MDA-MB-231 (contendo o MC mais fatores secretados pelas próprias células)

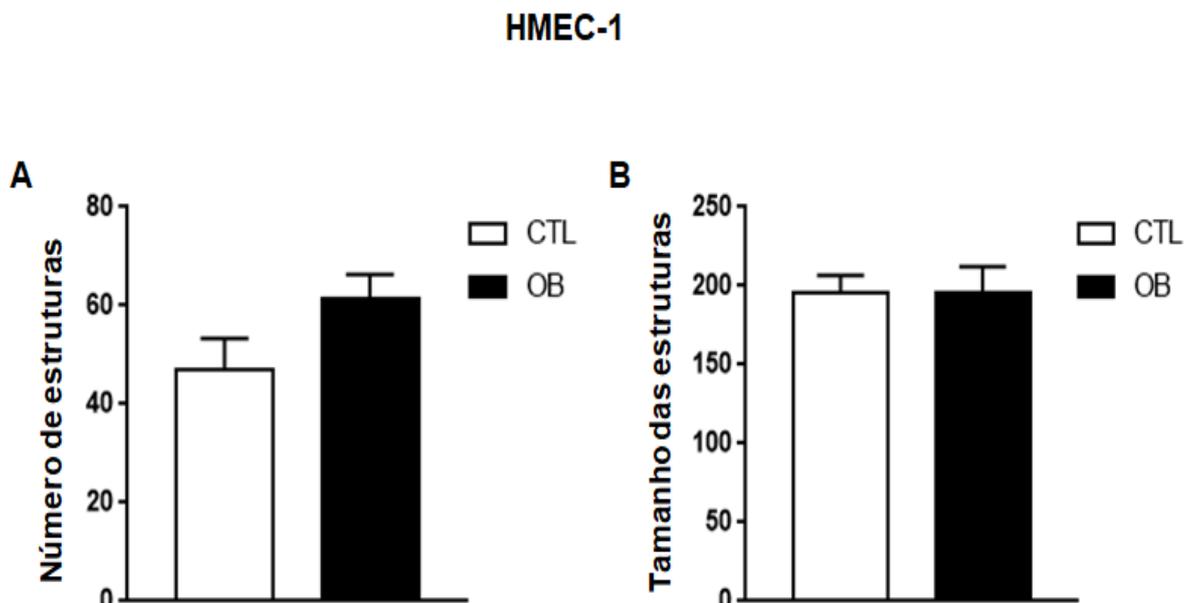
por 24 h às células. Após esse tempo, as células HMEC-1 foram colocadas sobre o Matrigel em uma placa de 96 poços, por 6 horas. As fotos foram obtidas no microscópio invertido. Foi mensurado o tamanho (em pixels) e quantidade de estruturas formadas. Os resultados são representativos de 3 diferentes experimentos. O teste t de *Student* foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos (**P<0.01, ***p < 0.005). Os resultados foram representados como média ± erro padrão.

Fonte: A autora, 2018.

3.9 Meio condicionado do tecido adiposo *per se* não induziu tubulogênese na HMEC-1

Nossos resultados demonstraram que o tratamento das células HMEC-1 com o sobrenadante das células MDA-MB-231 (previamente estimuladas com o MC oriundo do TA obeso) apresentaram capacidade tubulogênica amentada. Sendo assim, nos perguntamos se o MC oriundo do TA obeso *per se* seria capaz de modificar o fenótipo das células HMEC-1 para um perfil mais tubulogênico. Como podemos observar na figura a seguir, nosso resultado demonstra que o MC to TA obeso *per se* não modificou o fenótipo das células HMEC-1 (Figura 24), pois não observamos diferença estatística na tubulogênese.

Figura 24 - Efeito do MC *per se* sobre as células endoteliais



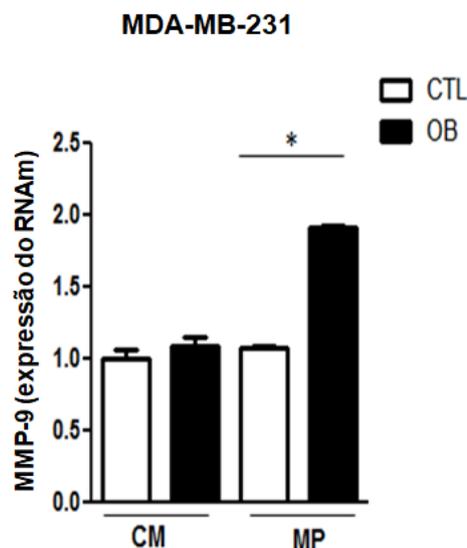
Nota: As células HMEC-1 foram tratadas por 24 horas com o MC (20% V/V) proveniente do TA controle ou obeso. Após esse tempo, as células HMEC-1 foram colocadas sobre o Matrigel em uma placa de 96 poços, por 6 horas. As fotos foram obtidas no microscópio invertido. Foi mensurado o tamanho (em pixels) e quantidade de estruturas formadas. Os resultados são

representativos de 3 diferentes experimentos. O teste t de *Student* foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos. Os resultados foram representados como média \pm erro padrão.
 Fonte: A autora, 2018.

3.10 O tratamento das células MDA-MB-231 com as micropartículas do TA obeso aumenta a expressão de RNAm para MMP-9

As MMPs são enzimas responsáveis pela promoção da progressão tumoral, aumentando a angiogênese do tumor, interrompendo a arquitetura do tecido local permitindo assim o seu crescimento. Além disso, possuem atividade proteolítica, rompendo as barreiras da membrana basal para a propagação metastática (COUSSENS e WERB, 1996). Visto que o processo de invasão é dependente de MMPs e que o tratamento oriundo do TA obeso foi capaz de induzir a invasão das células MDA-MB-231, avaliamos a participação da MMP-9 nesse processo. De acordo com a Figura 25, podemos observar que as MPs provenientes do TA obeso induziram um aumento significativo na expressão do RNAm para MMP-9 nas células MDA-MB-231, o que poderia explicar o aumento da sua invasividade.

Figura 25 - Efeito das moléculas secretadas pelo tecido adiposo sobre a expressão de RNA mensageiro para MMP-9



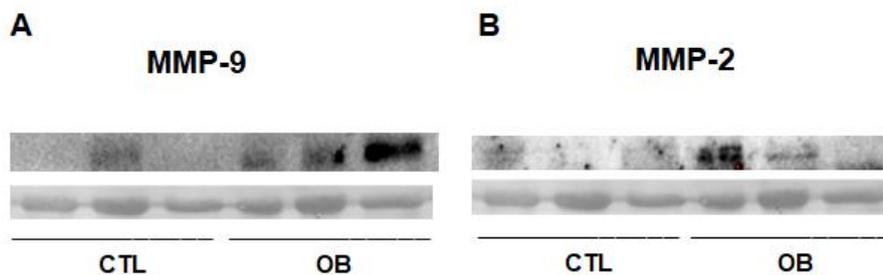
Nota: As células foram tratadas com as MPs (20 μ g/mL) por 24 horas. A expressão de RNAm para MMP-9 foi avaliada por RT-PCR nas células MDA-MB-231. Os resultados são representativos de 3 diferentes experimentos. O teste t de *Student* foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos (* $p < 0.05$). Os resultados foram representados como média \pm erro padrão.

Fonte: A autora, 2018.

3.11 Micropartículas oriundas do tecido adiposo obeso expressam MMP-2 e 9 bioativas

Nesse set de resultados nos perguntamos se as MPs poderiam carregar MMPs, o que poderia explicar, em parte, o aumento a capacidade invasiva das células MDA-MB-231, uma vez que vimos o aumento da capacidade invasiva das células MDA-MB-231 tratadas com o MC e MP oriundas do TA de pacientes obesos. Sabendo-se que as as MMP-2 e 9 estão relacionadas a obesidade (BELO et al., 2013; ALLOTT et al., 2013; LEE et al., 2014) avaliamos, através da técnica de *western blotting*, o conteúdo proteico de ambas nas MPs oriundas dos TA eutrófico e obeso. De maneira interessante, nossos resultados demonstraram que as MPs do TA provenientes do TA obeso expressam um conteúdo significativamente aumentado das MMP-2 e 9 (Figura 26 A e B).

Figura 26 - Expressão de MMP-9 e 2 nas micropartículas

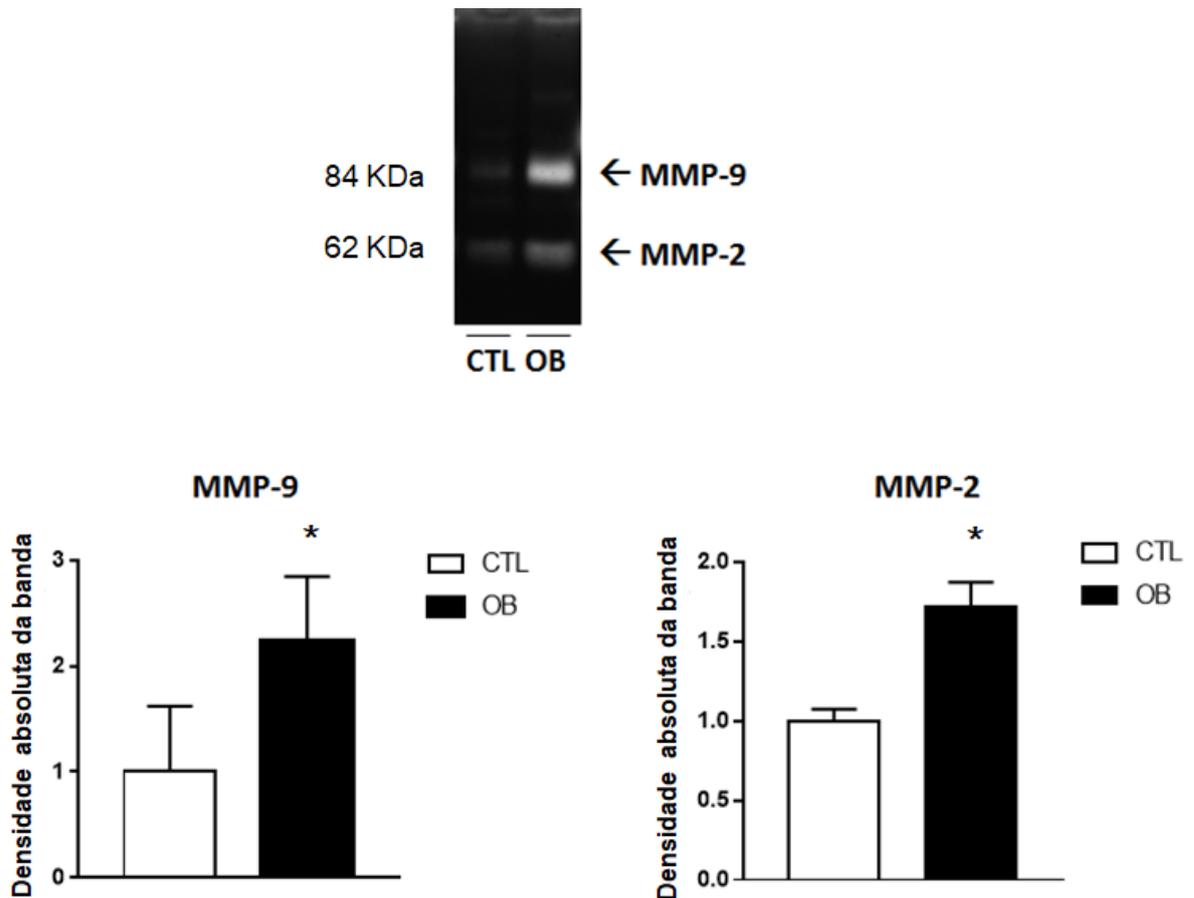


Nota: As MPs foram isoladas do TA e ressuspensas em tampão de lise. As amostras (20 µg) foram tratadas com o tampão de amostra e submetidas ao gel fracionador de policacrilamida SDS-PAGE e em seguida foi realizado o *immunoblotting* para detecção de (A) MMP-9 e (B) MMP-2 (n=6).

Fonte: A autora, 2018

Uma vez que vimos que as MPs expressam MMP-2 e 9, avaliamos por ensaio de zimografia se as mesmas apresentavam atividade proteolítica. De maneira interessante, nossos resultados demonstraram que as MMP-2 e 9 presentes nas MPs oriundas do TA obeso apresentam atividade proteolítica aumentada em relação às MPs oriundas do TA eutrófico.

Figura 27 - Avaliação da atividade proteolítica das micropartículas



Nota: As MPs foram isoladas do TA e ressuspensas em tampão de lise. As amostras (20 μ g) foram tratadas com o tampão de amostra e submetidas ao gel fracionador de policacrilamida SDS-PAGE. Após a corrida o gel foi lavado em solução de renaturação por 1 h a temperatura ambiente. Em seguida o gel foi incubado com o tampão de desenvolvimento, por 72 hrs, a 37°C. Após esse tempo o gel foi corado com *Coomassie Blue* 0,2%, e então descorado até o aparecimento das bandas de digestão (n=6).

Fonte: A autora, 2018.

4 DISCUSSÃO

Diversos estudos têm demonstrado a relação intrínseca entre a obesidade e o aumento do risco de vários tipos de câncer. Com relação ao câncer de mama, evidências claras demonstraram o aumento da incidência deste tipo de câncer em forte relação com o IMC elevado (WOLIN et al., 2010), além de um pior prognóstico (CALLE e KAAKS, 2004; PROTANI et al., 2010; FORD et al., 2013). No presente estudo, buscando mimetizar o ambiente inflamatório presente na obesidade, foi desenvolvido um modelo, *in vitro*, de cultura de explantes de TA obtidos de indivíduos obesos ou de indivíduos eutróficos (grupo controle). A partir deste modelo, investigamos os efeitos dos fatores secretados pelo TA obeso sobre funções celulares primordiais para o desenvolvimento do câncer (HANAHAN e WEINBERG, 2011), em duas diferentes linhagens celulares de adenocarcinoma mamário: a MCF-7, que não é invasiva e responde a hormônios, e MDA-MB-231, que é invasiva e conhecida como triplo negativa.

No nosso modelo estudado comparamos o TA omental de indivíduos obesos com o TA subcutâneo de indivíduos eutróficos, devido à dificuldade de acesso ao tecido omental de pacientes eutróficos. Tal dificuldade é resultado de que pacientes eutróficos que são submetidos à cirurgias mais invasivas geralmente apresentam algum comprometimento da saúde, como dislipidemia, por exemplo. Dessa forma, não seriam um bom grupo controle. Apesar das evidências mostrarem diferenças entre esses dois depósitos de tecido, já foi demonstrado que eles secretam níveis similares de TNF- α (WALKER et al., 2007; ZHA et al., 2009), IL-6 (ANTUNES et al., 2006), e não apresentaram diferenças para a expressão de IL-1 β , IL-8, TNF- α e MIP1- α (SAMARAS et al., 2010).

É bem estabelecido que a obesidade é caracterizada como uma inflamação de baixo grau do TA, mediada principalmente por macrófagos pró-inflamatórios do tipo M1 (OSBORN e OLEFSKY, 2012). Histologicamente, estes macrófagos se encontram ao redor dos adipócitos formando estruturas em forma de coroa, que nada mais são do que adipócitos em processo de morte celular circundados por macrófagos (CANCELLO et al., 2005). Esses macrófagos, eram inicialmente, observados apenas nos depósitos de TA visceral e subcutâneo, porém, recentemente, já foram observados no TA mamário de mulheres e camundongos

fêmeas obesas (MORRIS et al., 2011; SUBBARAMAIAH et al., 2011; SUBBARAMAIAH et al., 2012).

Nosso grupo caracterizou o perfil de mediadores inflamatórios secretados por explantes do TA obeso, em comparação com amostras do TA de indivíduos eutróficos. Nossos resultados demonstraram que houve um aumento significativo na liberação de adipocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , leptina e MIP1- α , e também nos níveis de VEGF e IL-10 secretados pelo TA obeso (RENOVATO-MARTINS et al., 2017), corroborando os dados presentes na literatura. Tais mediadores são contribuidores conhecidos para a progressão tumoral, podendo interferir na proliferação, migração, diferenciação e sobrevivência de células tumorais e na angiogênese (BROWN, 1999; RODMAN; CHOI, 2004; BALKWILL, 2009; GOEL ARTAC e ALTUNDAG, 2012; MERCURIO, 2013).

De maneira interessante, também observamos que além dos pacientes obesos apresentarem maiores níveis de MPs na circulação, o TA desses pacientes também libera grandes quantidades de MPs. Tais MPs têm origem de diferentes tipos celulares, como as células endoteliais, leucócitos e pré-adipócitos, entretanto, em comparação com o TA de indivíduos magros, o TA obeso secreta mais MPs originadas a partir dos leucócitos e dos pré-adipócitos, sugerindo um perfil mais inflamado e adipogênico de MPs secretadas pelo TA durante a obesidade. Outros dados do nosso grupo demonstraram que MPs liberadas pelo TA obeso transportam receptores, como o TLR8, que apresenta um papel importante na polarização de monócitos humanos em direção a um perfil pró-inflamatório (CD14⁺CD16⁺) (RENOVATO-MARTINS et al., 2017).

No presente estudo, demonstramos que o tratamento com a secreção liberada pelo TA obeso (MC e MPs) foi capaz de induzir o aumento da proliferação das células MCF-7, mesmo apesar das mesmas não possuírem um caráter de alta proliferação. Como tais efeitos não foram observados nas células MDA-MB-231, concluímos que, por se tratar de uma linhagem altamente proliferativa, as mesmas tivessem atingido sua capacidade máxima de proliferação no tempo estudado, não apresentando alteração mediante algum estímulo. Entretanto, de maneira interessante, o tratamento com a secreção liberada pelo TA obeso foi capaz de potencializar a sua capacidade migratória e invasiva nessas células, enquanto nas células MCF-7 não provocou nenhuma alteração.

Sabe-se que as células normais controlam adequadamente a produção e liberação de sinais através do crescimento celular e divisão, garantindo a homeostase do número de células e a manutenção funcional do tecido (HANAHAN e WEINBERG, 2011). Entretanto, as células cancerosas possuem uma desregulação desses sinais, podendo adquirir a capacidade de sustentar a sinalização proliferativa, migratória e invasiva por diferentes fatores de crescimento e vias de sinalização. As mesmas são capazes de produzirem fatores de crescimento, os quais podem responder através da expressão de receptores cognatos, resultando numa estimulação autócrina proliferativa, ou mesmo através da sinalização via receptores, aumentando seus níveis, indicando assim a necessidade do estímulo dessas vias. (WITSCH et al., 2010).

Existem algumas vias de sinalização clássicas que na maioria das vezes encontram-se modificadas no câncer, e que possuem relação com o desenvolvimento do tumor por atuarem diretamente sobre o crescimento e motilidade das células, como a via da MAPK/ERK, que, nas células MCF-7, foi ativada mediante o tratamento com a secreção derivada do TA obeso, o que poderia estar relacionado ao aumento da proliferação das mesmas. Embora um estudo realizado por Li e colaboradores tenha demonstrado que estas células além de proliferarem por meio dessa via, também são capazes de migrarem e invadirem (LI et al., 2017), não observamos tal comportamento. Já nas células MDA-MB-231, vimos que as MPs liberadas pelo TA aumentam, consideravelmente, a ativação da via da PI3K/AKT, o que poderia estar atrelado ao aumento da migração e invasão dessas células.

A fim de complementar os resultados supracitados utilizamos inibidores específicos das vias de sinalização MAPK/ERK (PD98059) e PI3K/AKT (LY294002). A partir destes resultados confirmamos o envolvimento da via da MAPK/ERK no aumento da proliferação das células MCF-7 e o envolvimento da via da PI3K/AKT no aumento da migração e da invasão das células MDA-MB-231, ressaltando a importância dessas vias canônicas no contexto da obesidade. Tais resultados são corroborados por outros trabalhos que demonstram que células MDA-MB-231 são capazes de migrar a partir da sinalização de PI3K/AKT (WANG, 2009).

Sabe-se que a sinalização celular disparada por estrógenos contribui de forma crucial para o estabelecimento do câncer de mama associado à obesidade (MORRIS et al., 2011; SUBBARAMAIAH et al., 2011; SUBBARAMAIAH et al., 2012)

e que por exemplo, níveis circulantes aumentados de TNF- α e IL-6, em mulheres obesas, têm sido associados com o desenvolvimento e a progressão do câncer de mama (VOZARIVA et al., 2001; BACHELOT et al., 2003). A correlação do alto IMC com o risco para tumores de mama, pós-menopausa, que respondem a hormônios, já é bem estabelecida (SUZUKI et al., 2009), porém, quanto as células que não respondem a fatores hormonais, conhecidas como triplo negativas, os estudos são mais recentes. Evidências de estudos observacionais e laboratoriais sugeriram que a obesidade poderia contribuir para a progressão de cânceres triplo negativos através da resistência à insulina, secreção de adipocinas pró-angiogênicas, como a leptina e da inflamação crônica deflagrada pelo TA (PHIPPS et al., 2008). Devido à prevalência cada vez maior de obesidade e à agressividade associada a esse tipo de câncer, a compreensão da intrínseca ligação entre estas duas condições médicas ajudará na identificação de indivíduos com maior risco de desenvolver essa forma agressiva de câncer de mama. Um estudo de meta-análise feito no ano de 2012 por Pierobon e Frankenfeld relatou que mulheres obesas têm 20% mais chances de desenvolverem câncer de mama triplo negativo do que mulheres não obesas, e que a menopausa seria um fator atenuante (PIEROBON; FRANKENFELD, 2012). Estes estudos de coorte corroboram nossos resultados, *in vitro*, com as células MDA-MB-231, uma vez que a secreção do TA obeso foi capaz de potencializar a capacidade migratória e invasiva dessas células.

Sabe-se que sem um suprimento sanguíneo adequado, os tumores sólidos só conseguem crescer no máximo cerca de 1-2 mm. Durante esse crescimento, as células do interior da massa tumoral aumentam sua distância dos vasos, o que torna hipóxico o ambiente do “core” tumoral (SHWEIKI et al., 1992; BROWN et al., 1999). A hipóxia regula positivamente a neovascularização nessas células tumorais (através da indução de HIF-1 α), o qual vai suprir suas necessidades de nutrientes e oxigênio (BROWN et al, 1999). O processo de neovascularização é dependente de fatores de crescimento como o VEGF que estimula o crescimento de novos vasos sanguíneos a partir de capilares mais próximos, permitindo assim o acesso do tumor ao oxigênio e nutrientes necessários para seu crescimento (BERGERS e BENJAMIN, 2003). A expressão de VEGF é mediada pelas próprias células tumorais, e pode ser potencializada por eventos genéticos comuns, que levam a uma transformação maligna (RAK et al., 2000). Alguns estudos demonstraram que as

células MDA-MB-231 e MCF-7 são capazes de expressarem o receptor para o VEGF (TANG et al., 2006; LEE et al., 2007).

Uma vez que sabemos o papel fundamental do VEGF sobre a neovascularização, e que os níveis do mesmo encontram-se aumentados na secreção liberada pelo TA obeso, avaliamos o efeito da secreção do TA sobre a modulação das células MDA-MB-231 na indução do processo de formação de novos vasos a partir de células endoteliais (HMEC-1). Nossos resultados demonstraram aumento na capacidade tubulogênica das células HMEC-1 tratadas com o sobrenadante das células MDA-MB-231 (previamente estimuladas com o MC oriundo do TA obeso). Observamos tanto o aumento no número de túbulos formados quanto o aumento do tamanho dessas estruturas, o que poderia indicar uma maior funcionalidade dos vasos formados. Entretanto, não observamos modificação do perfil fenotípico das células HMEC-1 tratadas com o sobrenadante das células MDA-MB-231 (previamente estimuladas com as MPs oriundas do TA obeso). Surpreendentemente, mesmo apesar de o MC oriundo do TA obeso apresentar níveis significativos de VEGF, o mesmo não foi capaz de induzir tubulogênese nas células HMEC-1 no tempo observado. Além disso, observamos que as células MDA-MB-231 *per se* também não apresentaram tal capacidade. Estes resultados demonstram a importância e força da associação de ambos fatores, provavelmente porque seus efeitos sinergizam ativando diferentes vias de sinalização.

É sabido que a angiogênese suporta o processo de invasão (TALMADGE e FIDLER, 2010), além de desempenhar um papel importante no crescimento tumoral, protegendo a neovasculatura da apoptose através a indução de proteínas anti-apoptóticas (TRAN et al., 1999; HARMEY e BOUCHIER-HAYES, 2002). Além disso, medeia a secreção e ativação de enzimas envolvidas na degradação da matriz extracelular, como MMPs, permitindo o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos (UNEMORI et al., 1992). A atividade proteolítica das MMPs é de extrema importância, pois, no câncer, são as principais proteínas responsáveis pela proteólise da matriz extracelular. Logo, para que ocorra o processo de invasão, a atividade dessas enzimas é fundamental, permitindo que as células tumorais sejam capazes de atravessar a membrana basal epitelial do tecido adjacente, e assim, invadir o estroma intersticial (AZNAVOORIAN et al., 1993). Dessa forma, adquirem capacidade de penetrar na corrente sanguínea e linfática, podendo então invadir outros tecidos e órgãos (HANAHAN e WEINBERG, 2011). Segundo Talmadge e

Fidler, o processo de invasão e metástase ocorre em múltiplos passos discretos, frequentemente denominado de cascata de invasão de metástases, a qual começa pela sucessão de alterações celulares e invasão local, entrada de células cancerosas em vasos sanguíneos e linfáticos próximos, seguido do extravasamento dessas células do lúmen dos vasos para o parênquima de tecidos distantes, formando pequenos nódulos (micrometástases), e então o crescimento de lesões metastáticas micro em macroscópicas, denominado de “colonização” (TALMADGE e FIDLER, 2010).

Uma vez que as células MDA-MB-231 invadiram mais mediante a secreção do TA obeso, avaliamos qual MMP poderia estar envolvida nesse processo. De acordo com nossos dados, apenas as MPs oriundas do TA obeso foram capazes de induzir a expressão de RNAm para MMP-9 nas células MDA-MB-231. Embora tenhamos observado que o MC do TA obeso induziu um aumento no perfil invasivo das células MDA-MB-231, nós não vimos um aumento na indução da expressão de RNAm para MMP-9 nessas células, talvez porque as MPs apresentariam uma concentração de fatores capazes de promover o aumento da expressão do RNAm, os quais se encontrariam diluídos no MC total. De maneira interessante, vimos que as MPs oriundas do TA de pacientes obesos não só expressam MMP-2 e 9, como as mesmas apresentam atividade proteolítica aumentada, como pudemos observar no ensaio de zimografia, corroborando dados presentes na literatura que relatam a relação dessas MMPs com a obesidade (BELO et al., 2013; ALLOTT et al., 2013; LEE et al., 2014). É importante ressaltar que, no melhor do nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo a demonstrar que o TA obeso é capaz de secretar MPs que induzem o aumento da malignidade em células tumorais de mama, além de expressarem MMPs bioativas.

A comunicação célula-célula é vital durante o desenvolvimento em uma multiplicidade de fatores fisiológicos e processos patológicos (QUAIL e JOYCE, 2013) os quais podem ser mediados por vesículas extracelulares (VEs) (COLOMBO et al., 2014; YOON et al., 2014). Assim, como vimos nos nossos resultados, diversos estudos têm demonstrado o papel primordial das VEs no câncer, as quais são capazes de transferirem proteínas oncogênicas e ácidos nucleicos que modulam as células-alvo e desempenham papéis decisivos na tumorigênese, crescimento, progressão, resistência à drogas e metástase (FRIEDL e WOLF, 2003; BIGAGLI et al., 2016; HOOD, 2016; KIM et al., 2016; WANG et al., 2016; LI et al., 2016). Ou

seja, as VEs participam de cada etapa do desenvolvimento do câncer, sendo um importante alvo de estudo.

Neste estudo mostramos que as MPs também apresentam um papel primordial na interação entre o estroma do TA obeso e as células cancerígenas. Em conjunto, nossos dados indicaram claramente que o TA pacientes obesos libera mediadores inflamatórios e MPs, que podem modular funções primordiais em células de câncer de mama, promovendo potencialmente o desenvolvimento do tumor, aumentando sua agressividade. É importante enfatizar que esses dados são os primeiros a mostrarem o papel fundamental das MPs do TA na obesidade, o que pode ser considerado como uma nova forma de comunicação entre o TA e as células cancerígenas, em um circuito parácrino, capaz de interferir na progressão do tumor. No entanto, é necessário compreender melhor os papéis multifacetados das VEs e como elas podem interagir com o microambiente, a fim do desenvolvimento de abordagens terapêuticas, levando a um tratamento efetivo contra o câncer.

CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo corroboram a relação entre a obesidade e o câncer de mama, contribuindo para um pior prognóstico, demonstrando um papel importante de fatores pró-inflamatórios secretados pelo TA na obesidade, em especial as MPs, sobre as funções primordiais das células tumorais de mama, induzindo aumento na sua proliferação, migração, invasão e angiogênese, através da modulação de vias de sinalização, aumentando a sua malignidade.

REFERÊNCIAS

- AGOUNI, Abdelali et al. Microparticles from patients with metabolic syndrome induce vascular hypo-reactivity via Fas/Fas-ligand pathway in mice. **PLoS one**, v. 6, n. 11, p. e27809, 2011.
- AHIMA, Rexford S.; FLIER, Jeffery S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 11, n. 8, p. 327-332, 2000.
- ALLRED, D.C. 2010. Ductal carcinoma in situ: terminology, classification, and natural history. *Journal of the National Cancer Institute*; (41): 134-138.).
- ALLOTT, Emma H. et al. MMP9 expression in oesophageal adenocarcinoma is upregulated with visceral obesity and is associated with poor tumour differentiation. **Molecular carcinogenesis**, v. 52, n. 2, p. 144-154, 2013.
- American Cancer Society. Cancer Facts & Figure 2015. Disponível em: <http://www.cancer.org/research/cancerfactsstatistics/cancerfactsfigures2015/>.
- American Cancer Society. Types of breast cancer. Disponível em: <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-breast-cancer-types>.
- American Cancer Society. What is breast cancer. Disponível em: <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-what-is-breast-cancer>.
- American Medical Association House of Delegates (2013). Recognition of Obesity as a Disease. Resolution pp. 2 Accessed October 2013 from <http://media.npr.org/documents/2013/jun/ama-resolution-obesity.pdf>
- ANDRIANTSITOHAINA, Ramaroson et al. Microparticles as regulators of cardiovascular inflammation. **Trends in cardiovascular medicine**, v. 22, n. 4, p. 88-92, 2012.
- ANTUNES, T. T. et al. Interleukin-6 release from human abdominal adipose cells is regulated by thyroid-stimulating hormone: effect of adipocyte differentiation and anatomic depot. **American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, v. 290, n. 6, p. E1140-E1144, 2006.
- AOKI, Naohito et al. Adipocyte-derived microvesicles are associated with multiple angiogenic factors and induce angiogenesis in vivo and in vitro. **Endocrinology**, v. 151, n. 6, p. 2567-2576, 2010.

AOKI, Naohito et al. Identification and characterization of microvesicles secreted by 3T3-L1 adipocytes: redox-and hormone-dependent induction of milk fat globule-epidermal growth factor 8-associated microvesicles. **Endocrinology**, v. 148, n. 8, p. 3850-3862, 2007.

ARNOLD, Melina et al. Global burden of cancer attributable to high body-mass index in 2012: a population-based study. **The Lancet Oncology**, v. 16, n. 1, p. 36-46, 2015.

ARRAUD, Nicolas et al. Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 12, n. 5, p. 614-627, 2014.

ARTAC, Mehmet; ALTUNDAG, Kadri. Leptin and breast cancer: an overview. **Medical oncology**, v. 29, n. 3, p. 1510-1514, 2012.

AUPEIX, Karine et al. The significance of shed membrane particles during programmed cell death in vitro, and in vivo, in HIV-1 infection. **The Journal of clinical investigation**, v. 99, n. 7, p. 1546-1554, 1997.

AZNAVOORIAN, Sadie et al. Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis. **Cancer**, v. 71, n. 4, p. 1368-1383, 1993.

BACHELOT, T. et al. Prognostic value of serum levels of interleukin 6 and of serum and plasma levels of vascular endothelial growth factor in hormone-refractory metastatic breast cancer patients. **British journal of cancer**, v. 88, n. 11, p. 1721, 2003.

BAHIA, Luciana et al. The costs of overweight and obesity-related diseases in the Brazilian public health system: cross-sectional study. **BMC public health**, v. 12, n. 1, p. 440, 2012.

BALKWILL, Frances. Tumour necrosis factor and cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 5, p. 361, 2009.

BALMAIN, Allan et al. How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. **Molecular carcinogenesis**, v. 7, n. 3, p. 139-146, 1993.

BALOG, Joseph E. Economic disruption and childhood obesity: Distraction, disconnection, displacement of children's health, and a need for social change. **Health Education & Behavior**, v. 42, n. 1_suppl, p. 67S-75S, 2015.

BARRY, Orla P.; FITZGERALD, Garret A. Mechanisms of cellular activation by platelet microparticles. **Thrombosis and haemostasis**, v. 82, n. 02, p. 794-800, 1999.

BELO, Vanessa A. et al. Effect of metabolic syndrome risk factors and MMP-2 genetic variations on circulating MMP-2 levels in childhood obesity. **Molecular biology reports**, v. 40, n. 3, p. 2697-2704, 2013.

BERCKMANS, René J. et al. Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. **Thrombosis and haemostasis**, v. 86, n. 04, p. 639-649, 2001.

BERCKMANS, René J. et al. Cell-derived microparticles in synovial fluid from inflamed arthritic joints support coagulation exclusively via a factor VII-dependent mechanism. **Arthritis & Rheumatology**, v. 46, n. 11, p. 2857-2866, 2002.

BERENBLUM, I. Carcinogenesis and tumor pathogenesis. In: **Advances in cancer research**. Academic Press, 1954. p. 129-175.

BERENBLUM, Isaac; SHUBIK, Philippe. A new, quantitative, approach to the study of the stages of chemical carcinogenesis in the mouse's skin. **British journal of cancer**, v. 1, n. 4, p. 383, 1947.

BERG, Anders H.; SCHERER, Philipp E. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. **Circulation research**, v. 96, n. 9, p. 939-949, 2005.

BERGERS, Gabriele; BENJAMIN, Laura E. Angiogenesis: tumorigenesis and the angiogenic switch. **Nature reviews cancer**, v. 3, n. 6, p. 401, 2003.

BIANCHINI, Giampaolo et al. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. **Nature reviews Clinical oncology**, v. 13, n. 11, p. 674, 2016.

BIGAGLI, Elisabetta et al. Exosomes secreted from human colon cancer cells influence the adhesion of neighboring metastatic cells: Role of microRNA-210. **Cancer biology & therapy**, v. 17, n. 10, p. 1062-1069, 2016.

BISHOP, J. Michael. Molecular themes in oncogenesis. **Cell**, v. 64, n. 2, p. 235-248, 1991.

BLOT, William J.; TARONE, Robert E. Doll and Peto's quantitative estimates of cancer risks: holding generally true for 35 years. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 107, n. 4, 2015.

BONOMINI, Francesca; RODELLA, Luigi Fabrizio; REZZANI, Rita. Metabolic syndrome, aging and involvement of oxidative stress. **Aging and disease**, v. 6, n. 2, p. 109, 2015.

BOULANGER, Chantal M. et al. Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction. **Circulation**, v. 104, n. 22, p. 2649-2652, 2001.

BOVERI, Th. Zur frage der entwicklung maligner tumoren. **Jena, Germany: Gustav Fischer-Verlag**, 1914.

BRAY, G. A.; BOUCHARD, C. Handbook of obesity: etiology and pathophysiology 2004. 2004.

BRAY, George A. Medical consequences of obesity. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, n. 6, p. 2583-2589, 2004.

BROWN, Lawrence F. et al. Vascular stroma formation in carcinoma in situ, invasive carcinoma, and metastatic carcinoma of the breast. **Clinical Cancer Research**, v. 5, n. 5, p. 1041-1056, 1999.

BROWN, Lawrence F. et al. Vascular stroma formation in carcinoma in situ, invasive carcinoma, and metastatic carcinoma of the breast. **Clinical Cancer Research**, v. 5, n. 5, p. 1041-1056, 1999.

BURDALL, Sarah E. et al. Breast cancer cell lines: friend or foe?. **Breast cancer research**, v. 5, n. 2, p. 89, 2003.

BURGER, Dylan et al. Endothelial microparticle formation by angiotensin II is mediated via Ang II receptor type I/NADPH oxidase/Rho kinase pathways targeted to lipid rafts. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 31, n. 8, p. 1898-1907, 2011.

CAHILL, Daniel P. et al. Genetic instability and darwinian selection in tumours. **Trends in cell biology**, v. 9, n. 12, p. M57-M60, 1999.

CALLE, Eugenia E. et al. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of US adults. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 17, p. 1625-1638, 2003.

CALLE, Eugenia E.; KAAKS, Rudolf. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 8, p. 579, 2004.

CAMPELLO, Elena et al. Hypercoagulability in overweight and obese subjects who are asymptomatic for thrombotic events. **Thrombosis and haemostasis**, v. 113, n. 01, p. 85-96, 2015.

CANCELLO, Raffaella et al. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. **Diabetes**, v. 54, n. 8, p. 2277-2286, 2005.

CANTLEY, Lewis C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. **Science**, v. 296, n. 5573, p. 1655-1657, 2002.

CAWLEY, John; MEYERHOEFER, Chad. The medical care costs of obesity: an instrumental variables approach. **Journal of health economics**, v. 31, n. 1, p. 219-230, 2012.

CHAN, D. S. M. et al. Body mass index and survival in women with breast cancer—systematic literature review and meta-analysis of 82 follow-up studies. **Annals of Oncology**, v. 25, n. 10, p. 1901-1914, 2014.

CHANG, Fumin et al. Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway. **International journal of oncology**, v. 22, n. 3, p. 469-480, 2003.

CHEN, Baoying et al. Hypoxia dysregulates the production of adiponectin and plasminogen activator inhibitor-1 independent of reactive oxygen species in adipocytes. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 341, n. 2, p. 549-556, 2006.

CHUBA, Paul J. et al. Bilateral risk for subsequent breast cancer after lobular carcinoma-in-situ: analysis of surveillance, epidemiology, and end results data. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 24, p. 5534-5541, 2005.

CINTI, Saverio et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. **Journal of lipid research**, v. 46, n. 11, p. 2347-2355, 2005.

CINTI, Saverio. Adipocyte differentiation and transdifferentiation: plasticity of the adipose organ. **Journal of endocrinological investigation**, v. 25, n. 10, p. 823-835, 2002.

COHEN, Samuel M.; ELLWEIN, Leon B. Genetic errors, cell proliferation, and carcinogenesis. **Cancer research**, v. 51, n. 24, p. 6493-6505, 1991.

COLEMAN, Mathew L. et al. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. **Nature cell biology**, v. 3, n. 4, p. 339, 2001.

COLOMBO, Marina; RAPOSO, Graça; THÉRY, Clotilde. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 30, p. 255-289, 2014.

COMBES, Valéry et al. In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. **The Journal of clinical investigation**, v. 104, n. 1, p. 93-102, 1999.

COUSSENS, Lisa M.; WERB, Zena. Matrix metal loproteinases and the development of cancer. **Chemistry & biology**, v. 3, n. 11, p. 895-904, 1996.

DALMAS, Elise; CLÉMENT, Karine; GUERRE-MILLO, Michèle. Defining macrophage phenotype and function in adipose tissue. **Trends in immunology**, v. 32, n. 7, p. 307-314, 2011.

DAS, Riku et al. Osteopontin: It's Role in Regulation of Cell Motility and Nuclear Factor κ B-mediated Urokinase Type Plasminogen Activator Expression. **IUBMB life**, v. 57, n. 6, p. 441-447, 2005.

D'ASTI, Esterina et al. Oncogenic extracellular vesicles in brain tumor progression. **Frontiers in physiology**, v. 3, p. 294, 2012.

DEL CONDE, Ian et al. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. **Blood**, v. 106, n. 5, p. 1604-1611, 2005.

DIAMANT, Michaela et al. Elevated numbers of tissue-factor exposing microparticles correlate with components of the metabolic syndrome in uncomplicated type 2 diabetes mellitus. **Circulation**, v. 106, n. 19, p. 2442-2447, 2002.

EUSEBI, Vincenzo et al. Long-term follow-up of in situ carcinoma of the breast. In: **Seminars in diagnostic pathology**. 1994. p. 223-235.

EXLEY, Mark A. et al. Interplay between the immune system and adipose tissue in obesity. **Journal of Endocrinology**, v. 223, n. 2, p. R41-R48, 2014.

FAIN, John N. Release of interleukins and other inflammatory cytokines by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily due to the nonfat cells. **Vitamins & Hormones**, v. 74, p. 443-477, 2006.

FERLAY, J. et al. GLOBOCAN 2012 v1. 0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. 2014.

FOLKMAN, Judah. Clinical applications of research on angiogenesis. **New England Journal of Medicine**, v. 333, n. 26, p. 1757-1763, 1995.

FONSECA-ALANIZ, Miriam H. et al. The adipose tissue as a regulatory center of the metabolism. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 216-229, 2006.

FONSECA-ALANIZ, Miriam Helena et al. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. **Jornal de pediatria**, v. 83, n. 5, p. S192-S203, 2007.

FORD, Nikki A. et al. Deconvoluting the obesity and breast cancer link: secretome, soil and seed interactions. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v. 18, n. 3-4, p. 267-275, 2013.

FRANK, Steven A.; NOWAK, Martin A. Problems of somatic mutation and cancer. **Bioessays**, v. 26, n. 3, p. 291-299, 2004.

FREYSSINET, Jean-Marie; TOTI, Florence. Formation of procoagulant microparticles and properties. **Thrombosis research**, v. 125, p. S46-S48, 2010.

FRIEDL, Peter; WOLF, Katarina. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 5, p. 362, 2003.

GACEB, Abderahim; MARTINEZ, Maria Carmen; ANDRIANTSITOHAINA, Ramaroson. Extracellular vesicles: new players in cardiovascular diseases. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 50, p. 24-28, 2014.

GESTA, Stephane; TSENG, Yu-Hua; KAHN, C. Ronald. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. **Cell**, v. 131, n. 2, p. 242-256, 2007.

GLASS, Christopher K.; OLEFSKY, Jerrold M. Inflammation and lipid signaling in the etiology of insulin resistance. **Cell metabolism**, v. 15, n. 5, p. 635-645, 2012.
GLOBOCAN, 2012. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/obesity/tools-pie>

GOEL, Hira Lal; MERCURIO, Arthur M. VEGF targets the tumour cell. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 12, p. 871, 2013.

GOICHOT, B. et al. Circulating procoagulant microparticles in obesity. **Diabetes & metabolism**, v. 32, n. 1, p. 82-85, 2006.

GOSS, Paul E. et al. Exemestane for breast-cancer prevention in postmenopausal women. **New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 25, p. 2381-2391, 2011.

GREENBERG, Andrew S.; OBIN, Martin S. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism—. **The American journal of clinical nutrition**, v. 83, n. 2, p. 461S-465S, 2006.

GUERRERO, Javier et al. Soluble factors derived from tumor mammary cell lines induce a stromal mammary adipose reversion in human and mice adipose cells. Possible role of TGF- β 1 and TNF- α . **Breast cancer research and treatment**, v. 119, n. 2, p. 497, 2010.

GUH, Daphne P. et al. The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis. **BMC public health**, v. 9, n. 1, p. 88, 2009.

HALL, Ingrid J. et al. Body size and breast cancer risk in black women and white women: the Carolina Breast Cancer Study. **American journal of epidemiology**, v. 151, n. 8, p. 754-764, 2000.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. **cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. The hallmarks of cancer. **cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HARMEY, Judith H.; BOUCHIER-HAYES, David. Vascular endothelial growth factor (VEGF), a survival factor for tumour cells: Implications for anti-angiogenic therapy. **Bioessays**, v. 24, n. 3, p. 280-283, 2002.

HEINRICH, L. F. et al. Long-term high fat feeding of rats results in increased numbers of circulating microvesicles with pro-inflammatory effects on endothelial cells. **British Journal of Nutrition**, v. 113, n. 11, p. 1704-1711, 2015.

HOLLIDAY, Deborah L.; SPEIRS, Valerie. Choosing the right cell line for breast cancer research. **Breast cancer research**, v. 13, n. 4, p. 215, 2011.

HOOD, Joshua L. Melanoma exosome induction of endothelial cell GM-CSF in pre-metastatic lymph nodes may result in different M1 and M2 macrophage mediated angiogenic processes. **Medical hypotheses**, v. 94, p. 118-122, 2016.

HOSOGAI, Naomi et al. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. **Diabetes**, v. 56, n. 4, p. 901-911, 2007.

HUGEL, Bénédicte et al. Membrane microparticles: two sides of the coin. **Physiology**, v. 20, n. 1, p. 22-27, 2005.

HURSTING, Stephen D.; BERGER, Nathan A. Energy balance, host-related factors, and cancer progression. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 26, p. 4058-4065, 2010.

INCA. Câncer de mama. Disponível em:
<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama>.

INCA. Dados apresentados. Disponível em:
<http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/dados-apresentados.pdf>.

INCA. http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2015/inca_estima_quase_600_mil_casos_novos_de_cancer_em_2016.

INOUYE, Karen E. et al. Absence of CC chemokine ligand 2 does not limit obesity-associated infiltration of macrophages into adipose tissue. **Diabetes**, v. 56, n. 9, p. 2242-2250, 2007.

IYENGAR, Neil M. et al. Obesity, inflammation, and breast cancer. In: **Obesity, Inflammation and Cancer**. Springer, New York, NY, 2013. p. 181-217.

JIANG, Bing-Hua et al. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling mediates angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor in endothelial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 4, p. 1749-1753, 2000.

KAIDAR-PERSON, Orit; BAR-SELA, Gil; PERSON, Benjamin. The two major epidemics of the twenty-first century: obesity and cancer. **Obesity surgery**, v. 21, n. 11, p. 1792-1797, 2011.

KANAZAWA, Shigenori et al. Monocyte-derived microparticles may be a sign of vascular complication in patients with lung cancer. **Lung Cancer**, v. 39, n. 2, p. 145-149, 2003.

KANDA, Hajime et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. **The Journal of clinical investigation**, v. 116, n. 6, p. 1494-1505, 2006.

KEOPHIPHATH, Mayoura et al. CCL5 promotes macrophage recruitment and survival in human adipose tissue. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 30, n. 1, p. 39-45, 2010.

KIESS, Wieland et al. Adipocytes and adipose tissue. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 22, n. 1, p. 135-153, 2008.

KIM, H. K. et al. Elevated levels of circulating platelet microparticles, VEGF, IL-6 and RANTES in patients with gastric cancer: possible role of a metastasis predictor. **European Journal of Cancer**, v. 39, n. 2, p. 184-191, 2003.

KIM, Jiyeon et al. Exosome cargo reflects TGF- β 1-mediated epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) status in A549 human lung adenocarcinoma cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 478, n. 2, p. 643-648, 2016.

KRALISCH, S. et al. Adipocyte fatty acid-binding protein is released from adipocytes by a non-conventional mechanism. **International journal of obesity**, v. 38, n. 9, p. 1251, 2014.

KRANENDONK, Mariëtte EG et al. Effect of extracellular vesicles of human adipose tissue on insulin signaling in liver and muscle cells. **Obesity**, v. 22, n. 10, p. 2216-2223, 2014.

KRANENDONK, Mariëtte EG et al. Human adipocyte extracellular vesicles in reciprocal signaling between adipocytes and macrophages. **Obesity**, v. 22, n. 5, p. 1296-1308, 2014.

KUNZELMANN-MARCHE, Corinne; FREYSSINET, Jean-Marie; MARTÍNEZ, M. Carmen. Loss of plasma membrane phospholipid asymmetry requires raft integrity role of transient receptor potential channels and ERK pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 22, p. 19876-19881, 2002.

LEE, Tae-Hee et al. Vascular endothelial growth factor mediates intracrine survival in human breast carcinoma cells through internally expressed VEGFR1/FLT1. **PLoS medicine**, v. 4, n. 6, p. e186, 2007.

LEE, Yeon Ji et al. Serum SPARC and matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 concentrations after bariatric surgery in obese adults. **Obesity surgery**, v. 24, n. 4, p. 604-610, 2014.

LEWIN, Benjamin; DOVER, Gabby. **Genes v**. Oxford: Oxford University Press, 1994.

LI, Jia et al. AKR1B10 promotes breast cancer cell migration and invasion via activation of ERK signaling. **Oncotarget**, v. 8, n. 20, p. 33694, 2017.

LI, Jing et al. Exosome-derived microRNAs contribute to prostate cancer chemoresistance. **International journal of oncology**, v. 49, n. 2, p. 838-846, 2016.

LICHTMAN, Marshall A. Obesity and the risk for a hematological malignancy: leukemia, lymphoma, or myeloma. **The oncologist**, v. 15, n. 10, p. 1083-1101, 2010.

LOLMEDE, K. et al. Effects of hypoxia on the expression of proangiogenic factors in differentiated 3T3-F442A adipocytes. **International journal of obesity**, v. 27, n. 10, p. 1187, 2003.

MAEKAWA, Midori et al. Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. **Science**, v. 285, n. 5429, p. 895-898, 1999.

MAREEL, Marc; LEROY, Ancy. Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. **Physiological reviews**, v. 83, n. 2, p. 337-376, 2003.

Mapas da prevalência da obesidade para homens e mulheres.

http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_Obesity_2016_Male.png

http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_Obesity_2016_Female.png
http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight_text/en/.

MARTÍN DE CIVETTA, M.T.; CIVETTA, J.D. Carcinogénesis, **Salud Publica de Mexico**, v. 53, n. 5, p. 405-414, 2011.

MARTINEZ, M. Carmen; ANDRIANTSITOHAINA, Ramarason. Microparticles in angiogenesis: therapeutic potential. **Circulation research**, v. 109, n. 1, p. 110-119, 2011.

MAURY, Eleonore et al. Adipokines oversecreted by omental adipose tissue in human obesity. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 293, n. 3, p. E656-E665, 2007.

MENDELSON, Mortimer L. The somatic mutational component of human carcinogenesis. In: **Scientific Issues in Quantitative Cancer Risk Assessment**. Birkhäuser Boston, 1990. p. 22-31.

MIYOSHI, Hideyuki et al. Calpain activation in plasma membrane bleb formation during tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatocyte injury. **Gastroenterology**, v. 110, n. 6, p. 1897-1904, 1996.

MOKDAD, Ali H. et al. Actual causes of death in the United States, 2000. **Jama**, v. 291, n. 10, p. 1238-1245, 2004.

MORRIS, Patrick G. et al. Inflammation and increased aromatase expression occur in the breast tissue of obese women with breast cancer. **Cancer prevention research**, v. 4, n. 7, p. 1021-1029, 2011.

MÜLLER, Günter et al. Induced release of membrane vesicles from rat adipocytes containing glycosylphosphatidylinositol-anchored microdomain and lipid droplet signalling proteins. **Cellular signalling**, v. 21, n. 2, p. 324-338, 2009.

NICKLAS, Theresa A. et al. Eating patterns, dietary quality and obesity. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 20, n. 6, p. 599-608, 2001.

NIEUWLAND, Rienk et al. Platelet-derived microparticles. In: **Platelets (Third Edition)**. 2013. p. 453-467.

NOCI, Maria-Victoria et al. Changes in endothelial microparticles and endothelial progenitor cells in obese patients in response to surgical stress. **JBJS**, v. 97, n. 5, p. 353-358, 2015.

NOMURA, Shosaku et al. Platelet-derived microparticles in patients with arteriosclerosis obliterans: enhancement of high shear-induced microparticle generation by cytokines. **Thrombosis research**, v. 98, n. 4, p. 257-268, 2000.

NOMURA, Shosaku et al. Platelet-derived microparticles may influence the development of atherosclerosis in diabetes mellitus. **Atherosclerosis**, v. 116, n. 2, p. 235-240, 1995.

OLEFSKY, Jerrold M.; GLASS, Christopher K. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. **Annual review of physiology**, v. 72, p. 219-246, 2010.

ORDMAN, Alfred B.; CLEVELAND, Jeffrey S.; BOUTWELL, R. K. 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate promotes tumors prior to initiation in two-stage promotion. **Cancer letters**, v. 29, n. 1, p. 79-84, 1985.

OSBORN, Olivia; OLEFSKY, Jerrold M. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. **Nature medicine**, v. 18, n. 3, p. 363, 2012.

OUCHI, Noriyuki et al. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 2, p. 85, 2011.

PANATALA, Radhakrishnan; HENNRICH, Hanka; HOLTHUIS, Joost CM. Inner workings and biological impact of phospholipid flippases. **J Cell Sci**, v. 128, n. 11, p. 2021-2032, 2015.

PAREKH, Niyati; CHANDRAN, Urmila; BANDERA, Elisa V. Obesity in cancer survival. **Annual review of nutrition**, v. 32, p. 311-342, 2012.

PEETERS, Anna et al. Obesity in adulthood and its consequences for life expectancy: a life-table analysis. **Annals of internal medicine**, v. 138, n. 1, p. 24-32, 2003.

PHIPPS, Amanda I. et al. Body size and risk of luminal, HER2-overexpressing, and triple-negative breast cancer in postmenopausal women. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 17, n. 8, p. 2078-2086, 2008.

PIERI, Andrew; HARVEY, James; BUNDRED, Nigel. Pleomorphic lobular carcinoma in situ of the breast: can the evidence guide practice?. **World journal of clinical oncology**, v. 5, n. 3, p. 546, 2014.

PIEROBON, Mariaelena; FRANKENFELD, Cara L. Obesity as a risk factor for triple-negative breast cancers: a systematic review and meta-analysis. **Breast cancer research and treatment**, v. 137, n. 1, p. 307-314, 2013.

PIMENTEL, E. Oncogenes and cancer. **Oncogenes. CRC, Boca Raton**, p. 157-179, 1986.

POSTE, George; FIDLER, Isaiah J. The pathogenesis of cancer metastasis. **Nature**, v. 283, n. 5743, p. 139, 1980.

PROENÇA, A. R. G. et al. New concepts in white adipose tissue physiology. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 47, n. 3, p. 192-205, 2014.

PROTANI, Melinda; COORY, Michael; MARTIN, Jennifer H. Effect of obesity on survival of women with breast cancer: systematic review and meta-analysis. **Breast cancer research and treatment**, v. 123, n. 3, p. 627-635, 2010.

QUAIL, Daniela F.; JOYCE, Johanna A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nature medicine**, v. 19, n. 11, p. 1423, 2013.

RÀFOLS, Montserrat Esteve. Adipose tissue: cell heterogeneity and functional diversity. **Endocrinología y Nutrición (English Edition)**, v. 61, n. 2, p. 100-112, 2014.

RAK, Janusz et al. Oncogenes and angiogenesis: signaling three-dimensional tumor growth. In: **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**. Elsevier, 2000. p. 24-33.

RAPOSO, Graça; STLOORVOGEL, Willem. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. **J Cell Biol**, v. 200, n. 4, p. 373-383, 2013.

REDINGER, Richard N. Fat storage and the biology of energy expenditure. **Translational Research**, v. 154, n. 2, p. 52-60, 2009.

RENEHAN, Andrew G. et al. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. **The Lancet**, v. 371, n. 9612, p. 569-578, 2008.

RENOVATO-MARTINS, Mariana et al. Microparticles derived from obese adipose tissue elicit a pro-inflammatory phenotype of CD16+, CCR5+ and TLR8+ monocytes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1863, n. 1, p. 139-151, 2017.

ROMACHO, T. et al. Adipose tissue and its role in organ crosstalk. **Acta physiologica**, v. 210, n. 4, p. 733-753, 2014.

ROUSE, John et al. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. **Cell**, v. 78, n. 6, p. 1027-1037, 1994.

RTVELADZE, Ketevan et al. Health and economic burden of obesity in Brazil. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e68785, 2013.

SAMARAS, Katherine et al. Subcutaneous and visceral adipose tissue gene expression of serum adipokines that predict type 2 diabetes. **Obesity**, v. 18, n. 5, p. 884-889, 2010.

SARTIPY, Peter; LOSKUTOFF, David J. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 12, p. 7265-7270, 2003.

SEBBAGH, Michaël et al. Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. **Nature cell biology**, v. 3, n. 4, p. 346, 2001.

SCHIEMANN, Sabine et al. Molecular analysis of two mammary carcinoma cell lines at the transcriptional level as a model system for progression of breast cancer. **Clinical & experimental metastasis**, v. 16, n. 2, p. 129-139, 1998.

SHWEIKI, Dorit et al. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. **Nature**, v. 359, n. 6398, p. 843, 1992.

SIEGEL, Rebecca L. et al. Colorectal cancer statistics, 2017. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 67, n. 3, p. 177-193, 2017.

SIMPSON, Evan R.; BROWN, Kristy A. Minireview: obesity and breast cancer: a tale of inflammation and dysregulated metabolism. **Molecular endocrinology**, v. 27, n. 5, p. 715-725, 2013.

Society of Actuaries New Society of Actuaries Study Estimates \$300 Billion Economic Cost Due to Overweight and Obesity. 2011. [http://www.soa.org/News-and-Publications/Newsroom/Press-Releases/New-Society-of-Actuaries-Study-Estimates-\\$300-Billion-Economic-Cost-Due-to-Overweight-and-Obesity.aspx](http://www.soa.org/News-and-Publications/Newsroom/Press-Releases/New-Society-of-Actuaries-Study-Estimates-$300-Billion-Economic-Cost-Due-to-Overweight-and-Obesity.aspx)

SPIEGELMAN, Bruce M.; FLIER, Jeffrey S. Obesity and the regulation of energy balance. **Cell**, v. 104, n. 4, p. 531-543, 2001.

STANBRIDGE, Eric J. Human tumor suppressor genes. **Annual review of genetics**, v. 24, n. 1, p. 615-657, 1990.

STEWART, Bernhard W. Wild CP, editors. **World Cancer Report**, 2014.

SUBBARAMAIAH, Kotha et al. Increased levels of COX-2 and prostaglandin E2 contribute to elevated aromatase expression in inflamed breast tissue of obese women. **Cancer discovery**, v. 2, n. 4, p. 356-365, 2012.

SUBBARAMAIAH, Kotha et al. Obesity is associated with inflammation and elevated aromatase expression in the mouse mammary gland. **Cancer prevention research**, v. 4, n. 3, p. 329-346, 2011.

TALMADGE, James E.; FIDLER, Isaiah J. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. **Cancer research**, v. 70, n. 14, p. 5649-5669, 2010.

TANG, Yi et al. Regulation of vascular endothelial growth factor expression by EMMPRIN via the PI3K-Akt signaling pathway. **Molecular Cancer Research**, v. 4, n. 6, p. 371-377, 2006.

TORRE, Lindsey A. et al. Global cancer statistics, 2012. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 65, n. 2, p. 87-108, 2015.

TRAN, Jennifer et al. Marked induction of the IAP family antiapoptotic proteins survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 264, n. 3, p. 781-788, 1999.

TRASANDE, Leonardo et al. Effects of childhood obesity on hospital care and costs, 1999–2005. **Health Affairs**, v. 28, n. 4, p. w751-w760, 2009.

TRAYHURN, Paul; BEATTIE, John H. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 60, n. 3, p. 329-339, 2001.

TUAL-CHALOT, Simon et al. Microvesicles: intercellular vectors of biological messages. **Molecular Interventions**, v. 11, n. 2, p. 88, 2011.

UNEMORI, Elaine N. et al. Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. **Journal of cellular physiology**, v. 153, n. 3, p. 557-562, 1992.

UNGER, Roger H. et al. Lipid homeostasis, lipotoxicity and the metabolic syndrome. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1801, n. 3, p. 209-214, 2010.

VAN KRUIJSDIJK, Rob CM; VAN DER WALL, Elsken; VISSEREN, Frank LJ. Obesity and cancer: the role of dysfunctional adipose tissue. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 18, n. 10, p. 2569-2578, 2009.

VANHAESEBROECK, Bart et al. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 11, n. 5, p. 329, 2010.

VANWIJK, Marja J. et al. Isolated microparticles, but not whole plasma, from women with preeclampsia impair endothelium-dependent relaxation in isolated myometrial arteries from healthy pregnant women. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 187, n. 6, p. 1686-1693, 2002.

VANWIJK, Marja J. et al. Microparticle subpopulations are increased in preeclampsia: possible involvement in vascular dysfunction?. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 187, n. 2, p. 450-456, 2002.

VANWIJK, Marja J. et al. Microparticles in cardiovascular diseases. **Cardiovascular research**, v. 59, n. 2, p. 277-287, 2003.

VASSE, M. et al. Decrease of breast cancer cell invasiveness by sodium phenylacetate (NaPa) is associated with an increased expression of adhesive molecules. **British journal of cancer**, v. 84, n. 6, p. 802, 2001.

VIEIRA-POTTER, Victoria J. Inflammation and macrophage modulation in adipose tissues. **Cellular microbiology**, v. 16, n. 10, p. 1484-1492, 2014.

VOZAROVA, Barbora et al. Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion. **Obesity**, v. 9, n. 7, p. 414-417, 2001.

WALKER, Gillian E. et al. Deep subcutaneous adipose tissue: a distinct abdominal adipose depot. **Obesity**, v. 15, n. 8, p. 1933-1943, 2007.

WANG, Qi et al. The effects of RNA interference mediated VEGF gene silencing on biological behavior of renal cell carcinoma and transplanted renal tumor in nude mice. **Cancer Biomarkers**, v. 16, n. 1, p. 1-9, 2016.

WANG, Shan et al. Suppression of growth, migration and invasion of highly-metastatic human breast cancer cells by berbamine and its molecular mechanisms of action. **Molecular cancer**, v. 8, n. 1, p. 81, 2009.

WANG, Youfa et al. Will all Americans become overweight or obese? Estimating the progression and cost of the US obesity epidemic. **Obesity**, v. 16, n. 10, p. 2323-2330, 2008.

WANG, Zhe et al. CD44v6-competent tumor exosomes promote motility, invasion and cancer-initiating cell marker expression in pancreatic and colorectal cancer cells. **Oncotarget**, v. 7, n. 34, p. 55409, 2016.

WEINSTEIN, I. Bernard. The origins of human cancer: molecular mechanisms of carcinogenesis and their implications for cancer prevention and treatment—twenty-seventh GHA Clowes memorial award lecture. **Cancer Research**, v. 48, n. 15, p. 4135-4143, 1988.

WEISBERG, Stuart P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **The Journal of clinical investigation**, v. 112, n. 12, p. 1796-1808, 2003.

WEN, Haitao et al. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. **Nature immunology**, v. 12, n. 5, p. 408, 2011.

WHO | Overweight and obesity. Disponível em:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>.

WISEMAN, Martin. The Second World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research Expert Report. Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective: Nutrition Society and BAPEN Medical Symposium on 'Nutrition support in cancer therapy'. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 67, n. 3, p. 253-256, 2008.

WITSCH, Esther; SELA, Michael; YARDEN, Yosef. Roles for growth factors in cancer progression. **Physiology**, v. 25, n. 2, p. 85-101, 2010.

WITWER, Kenneth W. et al. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. **Journal of extracellular vesicles**, v. 2, n. 1, p. 20360, 2013.

WOLIN, Kathleen Y.; CARSON, Kenneth; COLDITZ, Graham A. Obesity and cancer. **The oncologist**, v. 15, n. 6, p. 556-565, 2010.

WOLIN, Kathleen Y.; CARSON, Kenneth; COLDITZ, Graham A. Obesity and cancer. **The oncologist**, v. 15, n. 6, p. 556-565, 2010.

WOZNIAK, Susan E. et al. Adipose tissue: the new endocrine organ? A review article. **Digestive diseases and sciences**, v. 54, n. 9, p. 1847-1856, 2009.

YAN, Rong et al. Role of cAMP-dependent protein kinase in the regulation of platelet procoagulant activity. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 485, n. 1, p. 41-48, 2009.

YE, Jianping et al. Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 293, n. 4, p. E1118-E1128, 2007.

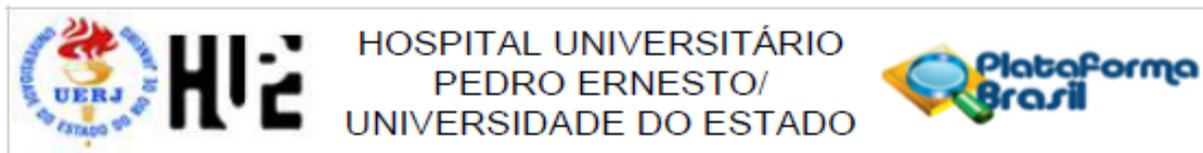
YE, Jianping. Emerging role of adipose tissue hypoxia in obesity and insulin resistance. **International journal of obesity**, v. 33, n. 1, p. 54, 2009.

YOON, Yae Jin; KIM, Oh Youn; GHO, Yong Song. Extracellular vesicles as emerging intercellular comunicasomes. **BMB reports**, v. 47, n. 10, p. 531, 2014.

YUAN, T. L.; CANTLEY, L. C. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. **Oncogene**, v. 27, n. 41, p. 5497, 2008.

ZHA, Juan Min et al. Comparison of gene transcription between subcutaneous and visceral adipose tissue in Chinese adults. **Endocrine journal**, v. 56, n. 8, p. 935-944, 2009.

ZHANG, Yiyong et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, n. 6505, p. 425, 1994.

ANEXO - Aprovação do Comitê de Ética**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Interação de moléculas secretadas pelo tecido adiposo com as funções monocitárias e linhagens celulares imortalizadas

Pesquisador: Thereza Christina Barja Fidalgo

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 36880914.0.0000.5259

Instituição Proponente: Hospital Universitário Pedro Ernesto

Patrocinador Principal: FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ
MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO
MINISTERIO DA EDUCACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 923.929

Data da Relatoria: 16/12/2014

Apresentação do Projeto:

Documentação dentro das boas práticas em pesquisa.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivos em concordância com o projeto .

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

exames coletados durante o procedimento cirurgico. paciente ja com acesso venoso, portanto sem riscos extras.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Todos os documentos de apresentação obrigatória foram enviados a este Comitê, estando dentro das boas práticas e apresentando todas dados necessários para apreciação ética. Foram avaliadas as informações contidas na Plataforma Brasil e as mesmas se encontram dentro das normas

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo

Bairro: Vila Isabel

CEP: 20.551-030

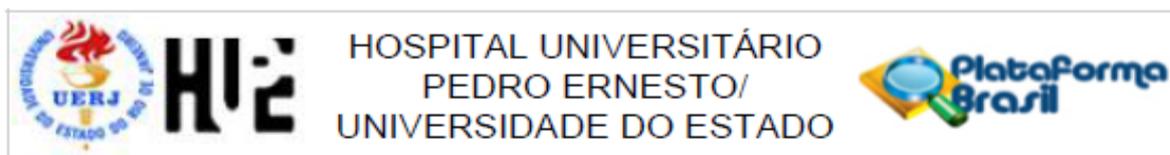
UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2868-8253

Fax: (21)2264-0853

E-mail: cep-hupe@uerj.br



Continuação do Parecer: 923.929

virgentes e sem riscos eminentes ao participante de pesquisa envolvido.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

as modificações foram atendidas.

Recomendações:

Apenas modificar um detalhe (na parte do texto do TCLE que segue retirar "pela sua cirurgia - deixando apenas durante sua cirurgia):

"A coleta de sangue e tecido adiposo será feita pelo médico responsável pela sua cirurgia durante o decorrer da mesma, e por isso é totalmente indolor e sem nenhum risco adicional ao do procedimento cirúrgico para o paciente (já informado no termo de consentimento da cirurgia)."

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS nº466/2012, o projeto pode ser enquadrado na categoria – APROVADO

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista a legislação vigente, o CEP recomenda ao Pesquisador: 1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas. 2. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes. 3. O Comitê de Ética solicita a V. S^a., que encaminhe relatórios parciais e anuais referentes ao andamento da pesquisa ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo

Bairro: Vila Isabel

CEP: 20.551-030

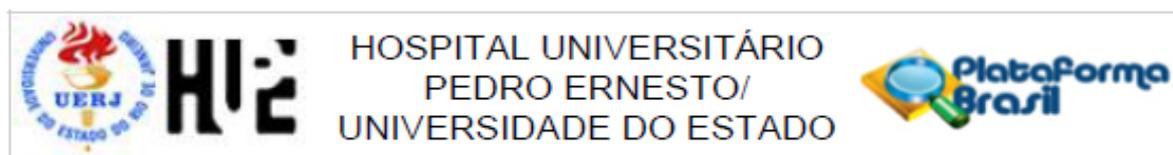
UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2868-8253

Fax: (21)2264-0853

E-mail: cep-hupe@uerj.br



Continuação do Parecer: 923.929

RIO DE JANEIRO, 19 de Dezembro de 2014

Assinado por:
WILLE OIGMAN
(Coordenador)