



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Isadora Ramos de Andrade

**Caracterização do meio condicionado e das vesículas
extracelulares liberadas pelo tecido adiposo de indivíduos obesos
e seus efeitos sobre a malignidade de células tumorais de mama**

Rio de Janeiro

2022

Isadora Ramos de Andrade

Caracterização do meio condicionado e das vesículas extracelulares liberadas pelo tecido adiposo de indivíduos obesos e seus efeitos sobre a malignidade de células tumorais de mama

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, 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

2022

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

A554

Andrade, Isadora Ramos de.

Caracterização do meio condicionado e das vesículas extracelulares liberadas pelo tecido adiposo de indivíduos obesos e seus efeitos sobre a malignidade de células tumorais de mama / Isadora Ramos de Andrade. - 2022.

124f.

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

Coorientadora: Prof.^a Dra. Mariana Renovato Martins

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

1. Mamas – Câncer– Teses. 2. Obesidade – Teses. 3. Vesículas Extracelulares. 4. Transição Epitelial-Mesenquimal. 5. Tecido adiposo – Teses. 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 tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Isadora Ramos de Andrade

Caracterização do meio condicionado e das vesículas extracelulares liberadas pelo tecido adiposo de indivíduos obesos e seus efeitos sobre a malignidade de células tumorais de mama

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

Aprovada em 03 de junho de 2022.

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Thereza Christina Barja-Fidalgo (Orientadora)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Robson de Queiroz Monteiro

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Rafael Soares Lindoso

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof.^a Dra. Tatiana de Almeida Simão

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2022

DEDICATÓRIA

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

E uma dedicação especial à minha vó Léia, que partiu quando eu tinha 6 anos, mas que sempre me acompanha e eu tenho certeza que ela está muito orgulhosa. E ao meu priminho Matheus, que também não está mais aqui presente, mas estará eternamente no meu coração.

AGRADECIMENTOS

Primeiro eu agradeço a Deus e aos orixás, em especial minha mãe Oxum, meu pai Xangô e a Exu, por abrirem meus caminhos, por me darem força e proteção para seguir a minha jornada. Podem ser muitos os percalços na vida, mas eu sei que Eles sempre serão por mim e nunca me deixarão esmorecer.

A mim, por sempre ter lutado pra conquistar os meus sonhos, por nunca ter desistido, por enfrentar meus medos e inseguranças, por ter chegado onde eu cheguei hoje. Não foi e não é fácil. Mas a garotinha de 15 anos atrás, que um dia sonhou em ser cientista, com certeza está muito orgulhosa da mulher que eu me tornei hoje.

Aos meus pais, Luciano e Cláudia, que são o meu orgulho, o maior amor que eu tenho, meus melhores amigos. As pessoas que nunca mediram esforços pra me dar tudo do melhor, que foram sempre os meus maiores incentivadores, e que além de muito amor me ensinaram a ter princípios. E que se também não fosse por eles, eu não teria chegado até aqui.

Ao meu irmão Lucas, que é meu companheiro desde que eu estava na barriga da mamãe. À minha vó Regina e meu tio Edésio, que são meus avós do coração, sempre presentes e também sempre me apoiando.

Aos meus filhinhos felinos, Pingo e Penélope, que foram adotados em meio a pandemia, e são os meus companheirinhos enquanto eu estou escrevendo ou estudando. Depois de um momento muito difícil que passamos na família, eles vieram pra encher a minha casa de amor e alegria.

À minha co-orientadora Mariana, por me orientar e me aturar desde a iniciação científica, pelo conhecimento compartilhado, por não desistir de tentar sempre me fazer uma pessoa mais madura e independente, buscar soluções para os meus problemas, a me fazer ter o pé no chão e acreditar em mim. Ao meu “coco”-orientador, João (como ele mesmo diz), por todo conhecimento compartilhado também, por todas as dicas e por ser uma ótima pessoa.

À minha orientadora Christina, pela oportunidade de poder fazer parte da equipe do LFCM, pelo conhecimento compartilhado, por acreditar no meu potencial, por também sempre me incentivar, e até por todos os puxões de orelha, que eu sei que sempre foram para o meu crescimento.

Aos meus companheiros e ex-companheiros do LFCM: Mariele, Hayandra, Xúlia, Ágatha, Rafael, Vany, Gabi e Yasmin, que tornam o meu dia-a-dia no laboratório muito mais leve!

Às minhas scisisters Clarinha e Carol, minhas irmãs científicas, grupinho de muita ciência, incentivo, apoio emocional, fofoca e desabafo.

Aos técnicos do LFCM, Genilson e Paulinho, por toda atenção, dedicação e conversas.

Aos amigos que a UERJ me deu, Thayane, Carlos, Cassiana e Orli, e que mesmo apesar da distância são muito importantes pra mim.

Aos meus amigos de escola/infância: Bia, Monica, Mandis, Nandinha, Tatiana, Marcelly, Larissinha, Paty, Tairini, Ana Carolina, Mylena, Kellen e Sergio Luiz, por tudo que já passamos juntos, por todo amor e companheirismo, por também sempre me apoiarem, e por serem muito importantes na minha vida. Algumas morando bem distante, mas sempre presentes.

Todo grande processo da ciência resultou de uma nova audácia da imaginação.

John Dewey

RESUMO

ANDRADE, Isadora Ramos de. *Caracterização do meio condicionado e das vesículas extracelulares liberadas pelo tecido adiposo de indivíduos obesos e seus efeitos sobre a malignidade de células tumorais de mama*. 2022. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

A obesidade é uma doença multifatorial caracterizada por um quadro de metainflamação sustentada pelo tecido adiposo (TA). Evidências mostram que a obesidade está relacionada a um pior prognóstico e um risco aumentado de morte em mulheres com câncer de mama, o tipo de câncer mais comum entre mulheres. O TA de indivíduos obesos além de secretar adipocinas pró-inflamatórias, produz ativamente um maior número de vesículas extracelulares (VEs), que são pequenas vesículas de membrana capazes de transferir sua carga para células-alvo. Mostramos anteriormente que o meio condicionado (MC) e as VEs secretadas pelo TA branco modulam a atividade migratória e proliferativa de células de câncer de mama, sugerindo seu papel na modificação do microambiente tumoral para um perfil mais maligno. Um dos processos relacionados ao aumento da malignidade tumoral é a transição epitelial-mesenquimal (TEM), a qual é definida pela perda de características epiteliais e aquisição do fenótipo mesenquimal, acarretando no aumento na capacidade migratória e invasiva. Neste estudo, objetivamos caracterizar o secretoma (MC e VEs) liberado pelos explantes de TA visceral (TAV) e subcutâneo (TAS) branco de indivíduos magros e obesos, e propor possíveis candidatos relacionados ao aumento da malignidade observada nas linhagens de adenocarcinoma mamário humano: MCF-7 (tipo luminal A) e MDA-MB-231 (tipo basal). O modelo, já estabelecido em nosso laboratório, é realizado a partir da cultura de explantes de TA obtidos de pacientes obesos ou magros que foram submetidos à cirurgia bariátrica ou plástica, respectivamente. No MC, o perfil lipídico foi analisado por cromatografia gasosa; o painel de adipocinas foi avaliado por Milliplex; a carga proteica presente nas VEs foi analisada por proteômica e *Western blotting*; a expressão de marcadores relacionados à TEM nas células tumorais de mama foram avaliadas por *Western blotting*; os fatores de transcrição foram avaliados por q-PCR; o ensaio de migração foi realizado através da técnica de *wound healing*. Nossos resultados demonstraram que comparando o MC oriundo dos explantes de TAS, o TAS obeso apresentou maiores níveis TGF- β 1, apresentando correlação positiva com o IMC. Ao comparar o MC dos explantes de TAV, o TAV obeso apresentou maiores níveis de IL-6, TGF- β 2 e 3, sem correlação com o IMC. Além disso, o TAV obeso apresentou maior liberação de ácidos graxos saturados como os ácidos palmítico, láurico, mirístico e esteárico, além dos ácidos graxos oleico (monoinsaturado) e linoleico (poliinsaturado). Em comparação aos indivíduos magros, as VEs liberadas pelo TA de indivíduos obesos apresentaram aumento de proteínas relacionadas à progressão tumoral, como a S100A4, S100A11, TGF- β e vimentina. O MC e as VEs do TA obeso induziram o aumento na migração das células MCF-7 em comparação ao controle, além de diminuir a expressão do marcador epitelial E-caderina. Nas células MDA-MB-231 não vimos alteração do marcador mesenquimal vimentina entre os grupos. As VEs do TA obeso induziram diminuição de *CDH1*, *Slug* e aumento de *Snail* nas células MCF-7, enquanto nas células MDA-MB-231 também induziram o aumento de *Snail*. As VEs do TA obeso também induziram ativação da via TGF- β /SMAD nas células MCF-7. Em conjunto, nossos dados indicam que as VEs derivadas do TA de indivíduos obesos apresentam proteínas com propriedades pró-tumorais que aumentam a malignidade de células tumorais através diminuição de E-caderina e aumento de migração.

Palavras-chave: Obesidade. Tecido adiposo. Vesículas extracelulares. Câncer de mama.

Transição epitelial-mesenquimal.

ABSTRACT

ANDRADE, Isadora Ramos de. *Characterization of the conditioned medium and extracellular vesicles profile released by the adipose tissue from obese individuals and their effect in breast tumor cells malignancy*. 2022. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

Obesity is a multifactorial disease characterized by a meta-inflammation sustained by adipose tissue (AT). Evidence has shown that obesity is associated with a worse prognosis and an increased risk of death in women with breast cancer, the most common type of cancer among women. In addition to releasing adipokines, the AT also secretes extracellular vesicles (EVs), which are small membrane vesicles capable of transferring several molecules to target cells. We have previously shown that CM and EVs released by white AT modulate the migratory and proliferative activity of breast cancer cells, thus suggesting their role in modifying the tumor microenvironment to a more malignant profile. One of the processes related to the increase in tumor malignancy is the epithelial-mesenchymal transition (EMT), which is defined by losing epithelial characteristics and acquiring the mesenchymal phenotype, increasing migratory and invasive capacity. In this study, we aimed to characterize the secretome (CM and EVs) released by white visceral AT (VAT) and subcutaneous AT (SAT) explants from lean and obese patients and to investigate the content from obese AT secretome that could be related to the increased malignancy of human breast adenocarcinoma lineages: MCF-7 (luminal A-like) and MDA-MB-231 (basal-like). This model, already established in our laboratory, is performed from the culture of AT explants obtained from obese or lean patients who underwent bariatric or plastic surgery, respectively. In the CM, the lipid profile was analyzed by gas chromatography; Milliplex evaluated the adipokine panel; the protein load present in the EVs was analyzed by proteomics and Western blotting; the expression of EMT-related markers in breast tumor cells was evaluated by Western blotting; the migration assay was performed using the wound healing assay. Our results showed that comparing SAT depots, those derived from obese patients presented higher levels of TGF- β 1, showing a positive correlation with BMI. Comparing VAT deposits, obese VAT presented higher levels of IL-6, TGF- β 2, and 3, without correlation with BMI. In addition, obese VAT showed more significant release of saturated fatty acids such as palmitic, lauric, myristic, and stearic, besides oleic (monounsaturated) and linoleic (polyunsaturated) fatty acids. Compared to lean individuals, EVs released by the AT from obese individuals showed proteins related to tumor progression, such as S100A4, S100A11, ANXA, TGF- β , and vimentin. The CM and EVs from obese AT induced an increase in MCF-7 cells migration compared to the control and decreased the expression of the epithelial marker E-cadherin. In MDA-MB-231 cells, we did not observe changes in the mesenchymal marker vimentin between groups. The EVs from obese AT induced a decrease in *CDH1*, *Slug*, and an increase in *Snail* in MCF-7 cells, while in MDA-MB-231 cells, it also induced an increase in *Snail*. Furthermore, EVs from obese AT also induced activation of the TGF- β /SMAD pathway in MCF-7 cells. Our data indicate that ET-derived EVs from obese individuals carry proteins with pro-tumor properties that increase the malignancy of tumor cells through a decrease in E-cadherin expression and increasing migration.

Keywords: Obesity. Adipose tissue. Extracellular vesicles. Breast cancer. Epithelial-mesenchymal transition.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais depósitos de tecido adiposo e as localizações anatômicas em humanos	19
Figura 2 - Componentes do tecido adiposo	20
Figura 3 - Processos metabólicos e fisiológicos regulados pela liberação de adipocinas pelo tecido adiposo branco	21
Figura 4 - Evolução do microambiente do tecido adiposo durante a obesidade.	24
Figura 5 - Fatores que aumentam o risco do desenvolvimento do câncer.....	26
Figura 6 - Os 13 tipos de câncer associados ao sobrepeso/obesidade	27
Figura 7 - <i>Hallmarks</i> envolvidos na progressão tumoral	30
Figura 8 - Biogênese e caracterização das vesículas extracelulares	32
Figura 9 - O microambiente da mama e os principais desencadeadores do câncer de mama na obesidade	36
Figura 10 - Vesículas extracelulares derivadas de tecido adiposo modulam a aquisição e manutenção de <i>hallmarks</i> do câncer	37
Figura 11 - Resumo do crosstalk entre as vesículas extracelulares derivadas do tecido adiposo e diversos tipos de câncer	38
Figura 12 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma.....	41
Figura 13 - Classificações do câncer de mama	43
Figura 14 - Transição epitelial-mesenquimal	45
Figura 15 - Vias de sinalização envolvidas na transição epitelial-mesenquimal ..	48
Figura 16 - Papel duplo do TGF- β	50
Figura 17 - Efeitos do secretoma do TA de pacientes sobre duas diferentes linhagens de câncer de mama	52
Figura 18 - Perfil lipídico do MC oriundo do TAS de indivíduos magros e TAV de indivíduos obesos	66
Figura 19 - Correlação entre o IMC e a adipocina TGF- β 1 no TAS	68
Figura 20 - Correlação entre o IMC e as adipocinas IL-6, TGF- β 2 e TGF-3 no TAV	69
Figura 21 - Análise do tamanho e concentração das VEs liberadas pelo TA	70
Figura 22 - Rede de interação de proteínas encontradas no proteoma qualitativo de VEs liberadas pelo TAS de indivíduos magros	72

Figura 23 - Rede de interação de proteínas encontradas no proteoma qualitativo de VEs liberadas pelo TAV de indivíduos obesos	73
Figura 24 - Avaliação da expressão de TGF- β e vimentina nas VEs	74
Figura 25 - Avaliação da expressão de E-caderina e Claudina-1 nas células MCF-7	76
Figura 26 - Avaliação da expressão de vimentina nas células MDA-MB-231	77
Figura 27 - Efeito das VEs liberadas pelo TA sobre a transcrição gênica de fatores envolvidos na transição epitelial-mesenquimal das células MCF-7....	79
Figura 28 - Efeito das VEs liberadas pelo TA sobre os fatores de transcrição envolvidos na transição epitelial-mesenquimal das células MDA-MB-231	80
Figura 29 - Efeito das VEs liberadas pelo TA sobre a via de sinalização do TGF- β /SMAD nas células MCF-7	81
Figura 30 - Efeito das VEs liberadas pelo TA sobre a via de sinalização da Wnt/ β -catenina nas células MCF-7	82
Figura 31 - Efeito do MC e VEs liberadas pelo TA obeso sobre a migração das células MCF-7	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALIX	<i>ALG-2-interacting protein X</i>
APAF-1	<i>Apoptotic peptidase activator factor 1</i>
ATP	Adenosina trifosfato
CAA	<i>Cancer associated adipocytes</i>
CAF	<i>Carcinoma associated fibroblasts</i>
Casp-3	Caspase 3
CCL2	<i>C-C motif chemokine ligand 2)</i>
CLS	<i>Crown like structures</i>
COLGALT2	<i>Procollagen galactosyltransferase</i>
CREB	<i>cAMP response element binding protein);</i>
DAMPs	<i>Damage-associated molecular pattern</i>
DCIS	<i>Ductal carcinoma in situ</i>
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
dsDNA	<i>Double-stranded DNA)</i>
EGFR1	<i>Epidermal growth factor receptor 1</i>
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FADD	<i>Fas-associated death domain protein</i>
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
FAME	<i>Dried fatty acid methyl esters</i>
FAO	<i>Fatty acid oxidation</i>
FIS-1	<i>Mitochondrial fission protein 1</i>
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
HIF-1 α	<i>Hypoxia-inducible factor 1-alpha</i>
HSP	<i>Heat Shock Protein</i>
hTERT	<i>Human telomerase reverse transcriptase)</i>
IL	Interleucina
ILV	<i>Intraluminal vesicle</i>
JAK	Janus quinase

LCIS	<i>Lobular carcinoma in situ</i>
MC	Meio condicionado
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein 1</i>
miRNA	MicroRNA
MMP	Metaloproteinase
NFκB	<i>Nuclear factor Kappa B</i>
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPA-1	<i>Mitochondrial dynamin-like GTPase</i>
PAI-1	<i>Plasminogen activator inhibitor-1</i>
PCS	<i>Photon Correlation Spectroscopy</i>
PGE2	Prostaglandina 2
PSFs	<i>Phenotypic stability factors</i>
RID1	<i>GTPase-binding protein rid1</i>
RNA-circ	RNA circulante
SOX-9	<i>SRY-box transcription factor 9</i>
ssDNA	<i>Single-stranded DNA</i>
STAT-3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
TA	Tecido adiposo
TAS	Tecido adiposo subcutâneo
TAV	Tecido adiposo visceral
TAZ	Tafazina
TCF/LEF	Fator de células T/Fator potencializador linfóide
TEM	Transição epitelial-mesenquimal
TG	Triacilglicerol
TGF-β	<i>Transforming growth fator beta)</i>
TLR4	<i>Toll-like receptor 4</i>
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor-α</i>
UCP1 -	<i>Uncoupling protein 1</i>
USP-7 -	<i>Ubiquitin-specific-processing protease-7</i>
VEGF -	<i>Vascular endotelial growth fator</i>
VEs	Vesículas extracelulares

VHL *Von-Hippel Lindau tumor suppressor*

YAP *Yes-associated protein*

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	OBJETIVOS	53
1.1	Geral	53
1.2	Específicos	53
1.2.1	Caracterização do secretoma (MC e VEs) do tecido adiposo	53
1.2.2	Avaliação da indução da transição epitelial-mesenquimal nas células	53
2	MATERIAL E MÉTODOS	55
2.1	Linhagens celulares	55
2.2	Cultura de células	55
2.3	Contagem de Células	56
2.4	Pacientes	56
2.5	Obtenção do meio condicionado (MC) liberado pelo TA branco	56
2.6	Isolamento das vesículas extracelulares	57
2.7	Análise de distribuição das VEs	57
2.8	Cromatografia gasosa – espectrometria de massas (GC-MS)	58
2.9	Dosagem de adipocinas	58
2.10	Proteômica	59
2.11	Análise pelo Software STRING	60
2.12	Obtenção de extratos totais	61
2.13	Obtenção de extratos nucleares	61
2.14	Eletroforese e <i>western blotting</i>	62
2.15	RT-qPCR	63
2.16	Ensaio de migração pelo método de lesão de monocamada (<i>wound healing</i>)	64
2.17	Análises estatísticas	64
3	RESULTADOS	65
3.1	O MC proveniente do TAV de indivíduos obesos apresenta grande quantidade de ácidos graxos	65
3.2	O MC proveniente do TAV de indivíduos obesos apresenta níveis aumentados de adipocinas pró-inflamatórias	66
3.3	Perfil das VEs liberadas pelo TA	69

3.4	As VEs liberadas pelo TA de indivíduos obesos apresentam carga proteica específica	71
3.5	As VEs liberadas pelo TA de indivíduos obesos apresentam aumento da expressão de TGF- β e vimentina	74
3.6	Efeito do MC e das VEs liberadas pelo TA de indivíduos obesos sobre marcadores envolvidos na transição epitelial-mesenquimal	75
3.7	Efeito das VEs liberadas pelo TA de indivíduos obesos sobre fatores de transcrição envolvidos na transição epitélio mesenquimal	77
3.8	Avaliação de vias de sinalização envolvidas na transição epitelial-mesenquimal	80
3.9	O MC e as VEs provenientes do TA de indivíduos obesos induzem aumento da migração nas células MCF-7	82
4	DISCUSSÃO	84
	CONCLUSÕES	94
	REFERÊNCIAS	95
	ANEXO – Aprovação do comitê de ética	121

INTRODUÇÃO

Obesidade

Há mais de 2.500 anos, o médico e filósofo grego Hipócrates, popularmente conhecido como pai da medicina, reconheceu que pessoas acima do peso apresentavam um maior risco de sofrer morte súbita (HASLAM, 2007). No século XVIII, o médico Malcolm Flemyng escreveu um dos dois primeiros livros sobre excesso de peso, e afirmou que "corpulência" (ou seja, a obesidade) poderia ser considerada uma doença em alguns casos. A ideia de que a obesidade pode ser adequadamente chamada de doença não é nova, e se repetiu ao longo dos últimos séculos (FLEMYING, 1760; HASLAM, 2007).

A obesidade é considerada um dos problemas mais graves de saúde pública, porque ela é fator de risco para inúmeras doenças como diabetes tipo II (em decorrência da resistência à insulina), hiperglicemia, hipertensão, doenças cardiovasculares, dislipidemia, esteatose hepática não alcoólica, câncer, entre outras (HURSTING; BERGER, 2010; BONOMINI *et al.*, 2015). O diagnóstico do estado nutricional é realizado a partir do índice de massa corporal (IMC), que é medido pela divisão do peso (kg) pela altura ao quadrado (m^2) do indivíduo, estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS). O IMC com valor igual ou superior a $25 \text{ kg}/m^2$ indica o sobrepeso, enquanto o valor maior/igual a $30 \text{ kg}/m^2$ classifica a obesidade (OMS, 2021).

De acordo com a OMS, vivemos uma pandemia de obesidade que afeta milhões de pessoas em todo o mundo; a prevalência da obesidade aproximadamente triplicou nas últimas 4 décadas (OMS, 2021). Segundo a última atualização da OMS, 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 apresentava sobrepeso (39% de homens e 40% das mulheres) e 13% obesidade (11% dos homens e 15% das mulheres) (OMS, 2021).

No século passado, mais particularmente nos últimos 50 anos, a oferta de calorias aumentou em todo o mundo. Na década de 1960, a oferta média global de

calorias (ou seja, a disponibilidade de calorias para os indivíduos consumirem) era de 2200kcal por pessoa por dia, e em 2013, esse número aumentou para 2800kcal. O aumento da ingestão calórica, atrelado a diminuição do gasto energético, devido a inatividade física (sedentarismo), são a principal causa do excesso de peso e obesidade. As mudanças nos padrões de atividade alimentar e física são muitas vezes o resultado de mudanças ambientais e sociais associadas ao desenvolvimento, além da falta de políticas de apoio em setores como saúde, agricultura, transporte, planejamento urbano, meio ambiente, processamento de alimentos, distribuição, marketing e educação (WYATT; WINTERS; DUBBERT, 2006; OMS, 2020).

Segundo a última pesquisa de 2020, realizada pela Vigitel (Pesquisa de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças crônicas por Inquérito Telefônico), do Ministério da Saúde, a prevalência da obesidade voltou a crescer no Brasil. Hoje, no Brasil, mais da metade da população adulta apresenta excesso de peso, cerca de 57,5%. Dentro desse índice, a frequência de adultos obesos é de 21,5%, valor que aproximadamente dobrou comparado há 14 anos (Vigitel, 2020). O percentual de indivíduos obesos é semelhante entre homens (20,3%) e mulheres (22,6%). Quanto maior o nível de escolaridade, menor a frequência da obesidade em mulheres (Vigitel, 2020).

Aproximadamente 2,8 milhões de pessoas morrem por ano por consequências relacionadas ao excesso de peso (OMS, 2021), alcançando a 5ª colocação em risco de mortes globais. Só no Brasil, segundo uma pesquisa realizada por Rabacow e seu grupo, aproximadamente 168 mil mortes por ano são atribuíveis ao excesso de peso e obesidade (RABACOW; AZEREDO; REZENDE, 2019). Segundo um estudo realizado pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), no período desse ano até 2050, o excesso de peso e as doenças relacionadas reduzirão a expectativa de vida em cerca de três anos nos países da OCDE, UE28 e G20. Até 92 milhões de pessoas morrerão prematuramente devido ao excesso de peso nos países da OECD, UE28 e G20 até 2050 (CECCHINI; VUIK, 2019).

Tecido Adiposo

Os mamíferos possuem três diferentes depósitos de tecido adiposo (TA), o branco, o marrom, e o bege, os quais além de terem diferentes funções, também apresentam composição, coloração e localidades diferentes (FRIGOLET; GUTIÉRREZ-AGUILAR, 2020) (Figura 1). Na figura abaixo podemos observar os principais depósitos do TA, o branco e marrom.

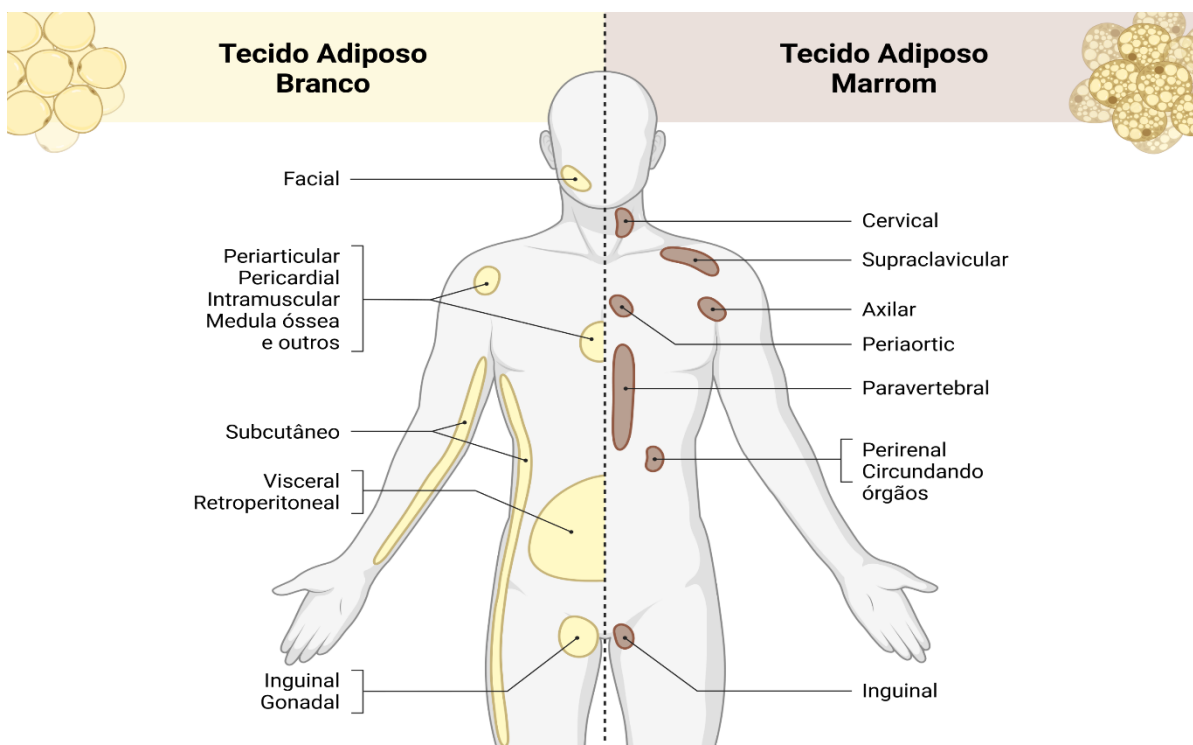
O TA marrom é menos distribuído nos seres humanos; na fase pós-natal é identificado apenas em algumas regiões do corpo, como a cervical, supraclavicular, axilar, periaórtica, inguinal e paravertebral (REDINGER *et al.*, 2009). As células adiposas que compõem o TA marrom são multiloculares e apresentam um alto número de mitocôndrias, responsáveis pela coloração marrom, devido a presença de citocromos e também do heme das hemeproteínas que compõem a cadeia respiratória (FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2006; KIESS *et al.*, 2008). Este tecido é o principal regulador da termogênese em resposta à ingestão de alimentos e ao frio (RÅFOLS, 2014), que ocorre através da proteína de desacoplamento (UCP1) presente na membrana interna mitocondrial (NAKAMURA Y; NAKAMURA K, 2018).

Os adipócitos do TA bege também expressam a proteína UCP1 e mostraram-se suscetíveis ao aparecimento em resposta a certos estímulos, como exercícios, exposição ao frio ou alguns hormônios, como por exemplo norepinefrina, irisina e hormônios tireoidianos (HU; CHRISTIAN; 2017). Embora os adipócitos bege possuam características semelhantes aos marrons, como sua morfologia (eles contêm vários vacúolos lipídicos), eles apresentam diferentes localizações anatômicas. Enquanto os adipócitos bege estão imersos nas regiões subcutâneas do TA branco, os adipócitos marrons são essencialmente encontrados nas regiões superficiais acima mencionadas (HARMS; SEALE, 2013).

O TA branco constitui o principal componente do TA do corpo e encontra-se disperso por diversas partes do corpo. Os principais depósitos do TA branco são os viscerais - que compreendem a região intra-abdominal, ao redor do omento, intestinos e áreas perirenais, e os depósitos subcutâneos - que compreendem as regiões das nádegas, coxas e abdômen, sob a pele, e na mama (em mulheres) (GESTA *et al.*, 2007). Os adipócitos do TA branco são uniloculares e apresentam menos vascularização e inervação do que o TA marrom. Este tecido é

especializado no armazenamento de energia, na forma de triacilglicerol (TG), e libera ácidos graxos via lipólise para manter a homeostase metabólica, além de ser um importante órgão endócrino (REDINGER, 2009).

Figura 1 - Principais depósitos de tecido adiposo e as localizações anatômicas em humanos



Fonte: Figura baseada em Gesta *et al.*, 2007.

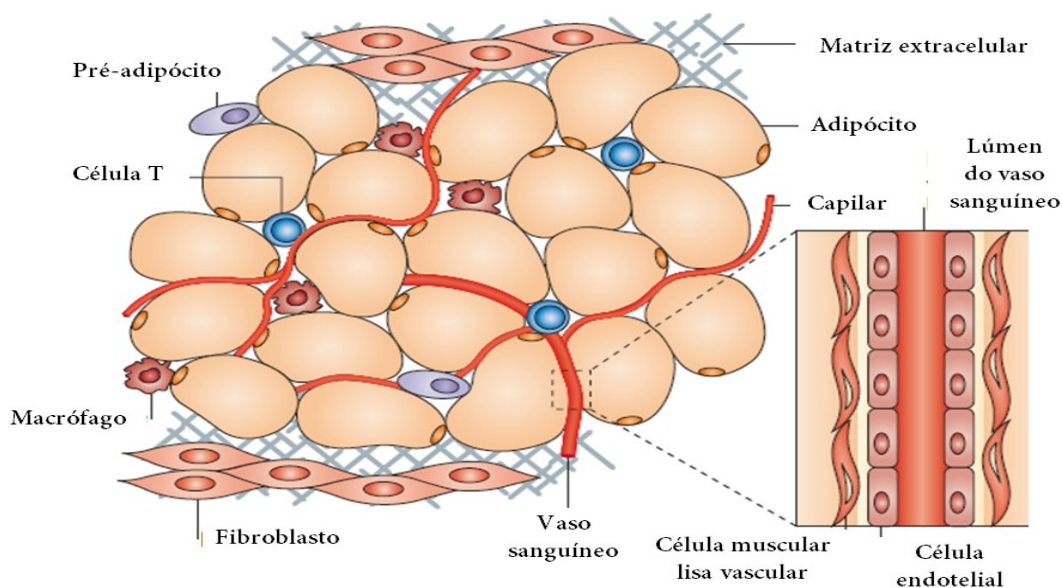
Legenda: Existem dois tipos principais de TA, o TA branco (TAB) - rico em lipídios (armazenamento de energia) e o TA marrom (TAM) - rico em mitocôndrias (queima de energia). Os adipócitos do TAM e do TAB emergem de linhagens distintas do destino celular; no entanto, o TAB pode converter em gordura metabolicamente ativa através do processo de “*browning*” (escurecimento). O TAB é encontrado em muitos locais anatômicos. Os maiores depósitos do TAB são subcutâneos (sob a pele; por exemplo, inguinal, glútea e femoral) e viscerais (dentro da cavidade abdominal, entre os órgãos; por exemplo, omental, mesentérico e epicárdico). Depósitos menores de TAB são encontrados em torno dos vasos sanguíneos (perivasculares, que regulam o tônus vascular), dentro da medula óssea (que regulam a remodelação óssea) ou como depósitos ectópicos em órgãos específicos (por exemplo, doença hepática não alcoólica, pâncreas gorduroso ou gordura intramuscular). Esses depósitos adiposos têm características moleculares únicas; portanto, a distribuição do peso tem importantes consequências biológicas. Por exemplo, a maioria dos adipócitos viscerais tem densidade mitocondrial um pouco mais alta, são mais lipolíticos, são menos sensíveis à insulina, produzem menos leptina e contribuem com mais ácidos graxos livres circulantes em comparação aos adipócitos subcutâneos e, portanto, têm uma associação mais forte com a síndrome metabólica.

Existem ainda os chamados adipócitos rosas, devido a coloração que adquirem durante a gestação e lactação. Estas, são células alveolares secretoras

de leite, que podem surgir a partir da transdiferenciação de adipócitos brancos durante a gravidez e lactação; elas são caracterizadas por gotículas lipídicas abundantes, microvilosidades na superfície apical e grânulos contendo leite (CINTI, 2018).

O TA branco, além dos adipócitos, contém células endoteliais, células nervosas, células do sistema imune (monócitos/macrófagos, linfócitos T e B, células dendríticas, mastócitos, neutrófilos e eosinófilos), além de pericitos, fibroblastos, miócitos, células-tronco derivadas do próprio TA e os pré-adipócitos (células precursoras dos adipócitos), as quais compõem a fração vascular do estroma (WOZNIAK *et al.*, 2009; RÀFOLS, 2014; EXLEY *et al.*, 2014; VIEIRA-POTTER *et al.*, 2014) (Figura 2).

Figura 2 - Componentes do tecido adiposo

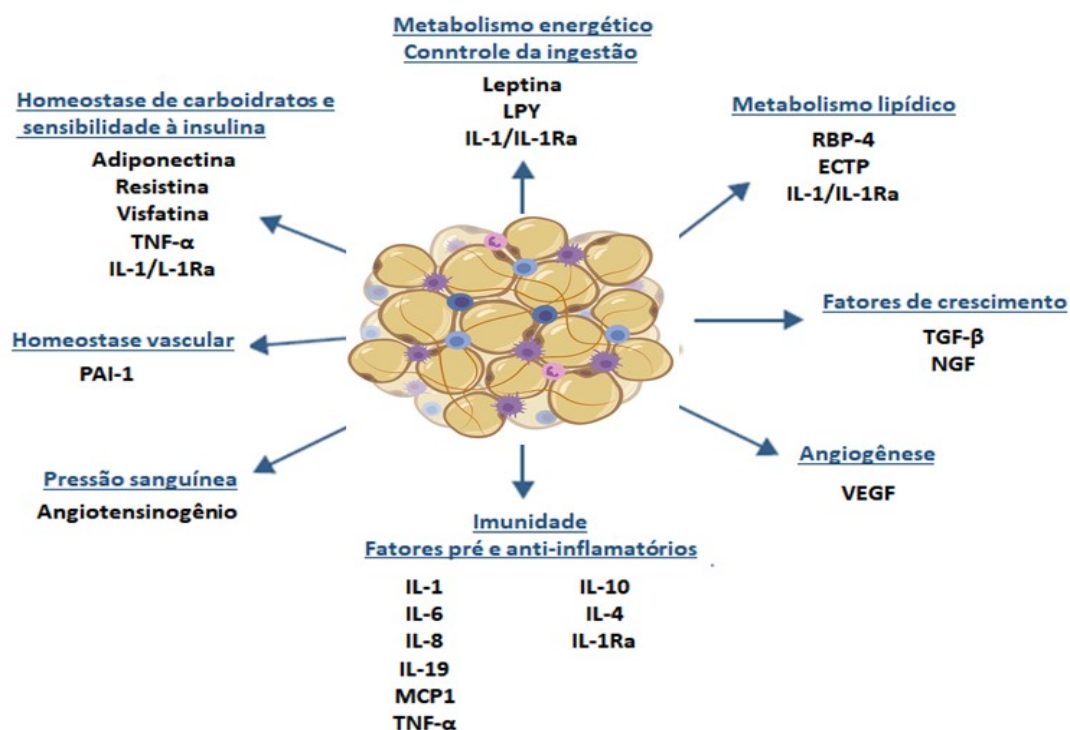


Fonte: Adaptado de Ouchi, 2011.

Legenda: Os adipócitos são os principais componentes do TA, e são cruciais para o armazenamento de energia e atividade endócrina. Há também as células precursoras (pré-adipócitos), fibroblastos, células vasculares (células endoteliais e musculares lisas) e células do sistema imune, as quais juntas constituem a fração vascular estromal do TA. Os vasos sanguíneos no TA 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 TA. Outros componentes do TA incluem macrófagos e células T, que têm papéis principais na determinação do seu estado imune. 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 TA e o corpo.

A transformação conceitual do TA como um órgão passivo de armazenamento de energia para um participante ativo da regulação hormonal da homeostase ocorreu em 1994, quando foi identificado como fonte do hormônio leptina (ZHANG *et al.*, 1994). 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. O termo adipocina inclui 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 3). 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 3 - Processos metabólicos e fisiológicos regulados pela liberação de adipocinas pelo tecido adiposo branco



Fonte: Adaptado de Esteve Ràfols, 2014.

Legenda: O tecido adiposo tem um papel endócrino muito importante para a homeostase.

Inflamação Crônica de Baixo Grau do Tecido Adiposo Causada pela Obesidade

O desbalanço energético causado pelo aumento da ingestão calórica em detrimento do gasto energético leva ao aumento da quantidade de ácidos graxos livres, os quais são esterificados com o glicerol, produzindo triacilglicerol, que se acumula nos adipócitos, resultando em sua hipertrofia (GUH *et al.*, 2009). A expansão do TA na obesidade também se caracteriza pelo aumento do número de adipócitos através da diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos (hiperplasia ou adipogênese) (ARNER; SPALDING, 2010). Durante o processo de expansão do TA, no decorrer do desenvolvimento da obesidade, ocorre um quadro de alterações metabólicas, como mostrada na Figura 4, e que será discutida nesta seção.

Enquanto o TA ocupa de 20 a 28% da massa corporal de indivíduos saudáveis, nos indivíduos obesos, pode ocupar até 80% da massa corporal (THOMAS *et al.*, 1998). A hipertrofia dos adipócitos *per se* gera uma mudança no perfil metabólico dos adipócitos (UNGER *et al.*, 2010). O excesso de ácidos graxos produzidos pelos adipócitos disfuncionais pode romper membranas celulares de células adjacentes, podendo estimular 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), interleucina (IL)-6, IL-1, prostaglandina 2 (PGE2) (FAIN, 2006; OUCHI *et al.*, 2011). O palmitato, por exemplo, pode desempenhar um papel na ativação do receptor do tipo Toll (TLR4) (GLASS e OLEFSKY, 2012), também podendo levar a ativação de NF κ B (MALONEY *et al.*, 2009).

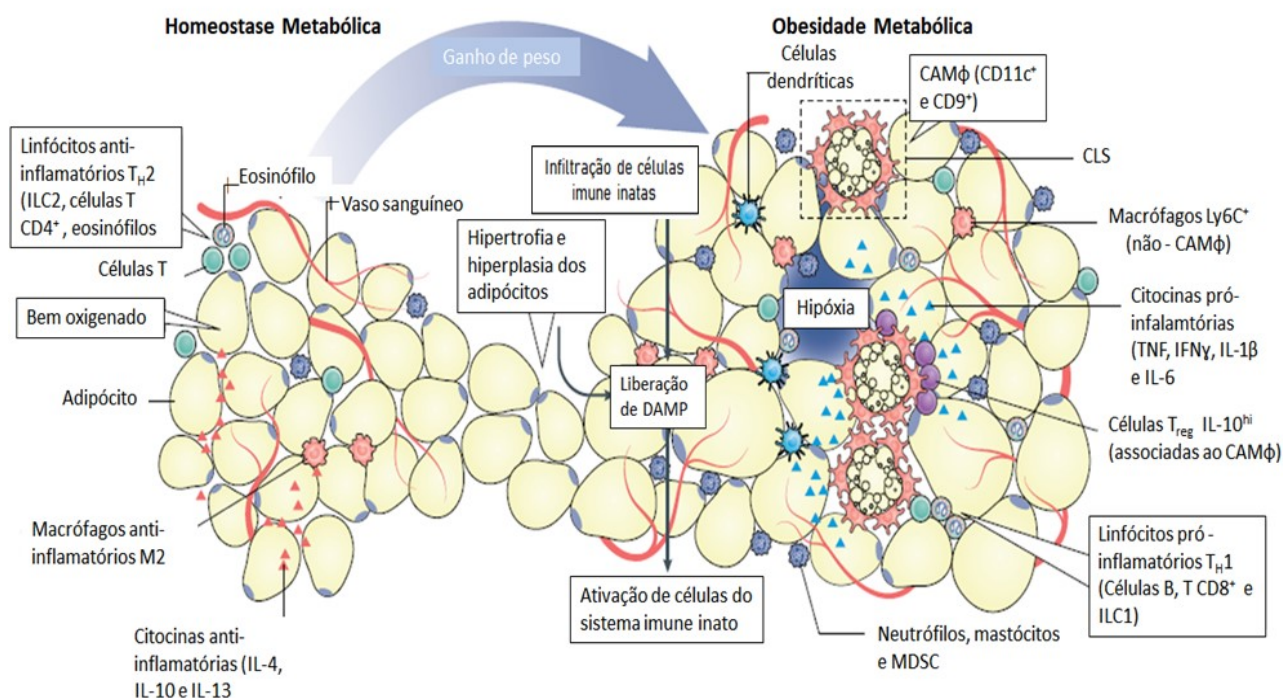
A hipertrofia dos adipócitos também pode desencadear a morte celular por necrose (CINTI *et al.*, 2005), que envolve a ruptura da membrana celular e a liberação do conteúdo celular no microambiente, como lipídios, citocinas e padrões moleculares associados a danos (DAMPs), ácidos graxos, adenosina trifosfato (ATP), espécies reativas de oxigênio (EROS), colesterol e ácidos nucleicos (ZHOU *et al.*, 2010; MARIATHASAN *et al.*, 2011; WEN *et al.*, 2011). Esses sinais são os principais estímulos para o acúmulo de macrófagos fagocitários no TA (WEISBERG *et al.*, 2003). Mais de 90% dos macrófagos presentes no TA de indivíduos obesos estão diretamente associados com os adipócitos hipertróficos, onde circundam os

adipócitos, formando as chamadas estruturas em forma de coroa (CLS) (CINTI *et al.*, 2005). Células inflamatórias, principalmente os macrófagos, podem compreender até 50% das células presentes no TA de indivíduos obesos, quando normalmente constituem cerca de 5-10% das células presentes no TA de indivíduos magros (WEISBERG *et al.*, 2003). Essa infiltração maciça dos macrófagos no TA exacerba o quadro de inflamação crônica, que não só modifica o metabolismo local, como também desequilibra a homeostase de forma sistêmica (BERG e SCHERER, 2005; KANDA *et al.*, 2006; MAURY *et al.*, 2007).

Os macrófagos são células altamente plásticas, a caracterização dos macrófagos dentro do paradigma linear 'M1-M2' tem sido reavaliada, pois agora se sabe que os macrófagos podem adotar uma grande quantidade de estados de ativação. Os macrófagos presentes no TA obeso, são na sua maioria, classificados como M1 ou pró-inflamatórios, hoje também podem ser funcionalmente subdivididos pela expressão do *cluster* de diferenciação 11c (CD11c), também conhecido como integrina alfa X), um marcador clássico de células dendríticas. Essa fração CD11c+ está diretamente relacionada a resistência à insulina e às CLS (NGUYEN *et al.*, 2007; PATSOURIS *et al.*, 2008; SHAUL *et al.*, 2010; QUAIL; DANNENBERG, 2019). A secreção de quantidades aumentadas de adipocinas pró-inflamatórias pelos adipócitos hipertróficos, como a proteína 1 quimioatraente de monócitos (MCP-1), TNF- α , IL-6, IL-8, inibidor do fator do plasminogênio tipo 1 (PAI-1) e leptina (OUCHI *et al.*, 2011), levam não só a infiltração de macrófagos, mas também linfócitos B, T CD8, alterando significativamente o microambiente do TA (QUAIL; DANNENBERG, 2019).

Outra consequência da hipertrofia dos adipócitos é a hipóxia, diminuição do aporte de oxigênio, causada pela limitação física dos vasos sanguíneos presentes no TA, responsáveis pelo suprimento desses grandes adipócitos (YE, 2009). Esta, por sua vez, está associada à manutenção da expressão do fator induzido por hipóxia (HIF-1 α) por esses adipócitos, cujo aumento está associado a inibição da síntese de adiponectina e aumento de PAI-1 (CHEN *et al.*, 2006), indução do aumento da produção de leptina, expressão de metaloproteinasas (MMP) 2 e 9 e do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (LOLMÈDE *et al.*, 2003; YE, 2007; HOSOGAI *et al.*, 2007; HURSTING e BERGER, 2010; BONOMINI *et al.*, 2015).

Figura 4 - Evolução do microambiente do tecido adiposo durante a obesidade



Fonte: Adaptado de Quail e Dannenberg, 2019.

Legenda: Durante condições saudáveis de peso corporal (homeostase metabólica), o microambiente do tecido adiposo é bem vascularizado e rico em citocinas anti-inflamatórias (como IL-4, IL-10 e IL-13) e, como consequência, hospeda uma variedade de células imunes do tipo 2, incluindo macrófagos do tipo M2, células linfóides inatas do tipo 2, células T auxiliares do tipo 2 (T_H2) e eosinófilos produtores de IL-4. Em resposta ao ganho de peso corporal ou obesidade metabólica, os adipócitos sofrem hipertrofia e hiperplasia; a medida que o suprimento vascular se torna limitado, essas células ficam estressadas ou morrem. Isso libera DAMPs no microambiente, que acionam a infiltração e a ativação de células do sistema imune inato (por exemplo, células dendríticas, macrófagos e granulócitos). Esses efeitos promovem o desenvolvimento CLS e respostas imunes do tipo 1 (pró-inflamatórias). Essa resposta inclui acúmulo de citocinas do tipo 1 (por exemplo, TNF, IFNγ, IL-1β e IL-6) e células imunes pró-inflamatórias, incluindo vários granulócitos, células linfóides inatas do tipo 1, células B e células T CD8⁺, que perpetuam a resposta inflamatória crônica. Macrófagos são altamente diversificados dentro do microambiente do tecido adiposo obeso; aqueles associados à CLS (macrófago associado ao CLS, CAMφ) proliferam e expressam os marcadores de superfície celular CD11c e CD9, enquanto aqueles que estão mais distantes (não - CAMφ) expressam o antígeno linfocitário 6C (Ly6C). Essas alterações inflamatórias coincidem com fibrose crônica e inflamação vascular, que se alimentam para sustentar a inflamação (Células T_{reg} IL-10^{hi}, células reguladoras T produzindo altos níveis de IL-10; ILC1, células linfóides inatas do tipo 1; MDSC, células mielóide supressoras).

Obesidade e a Incidência de Câncer

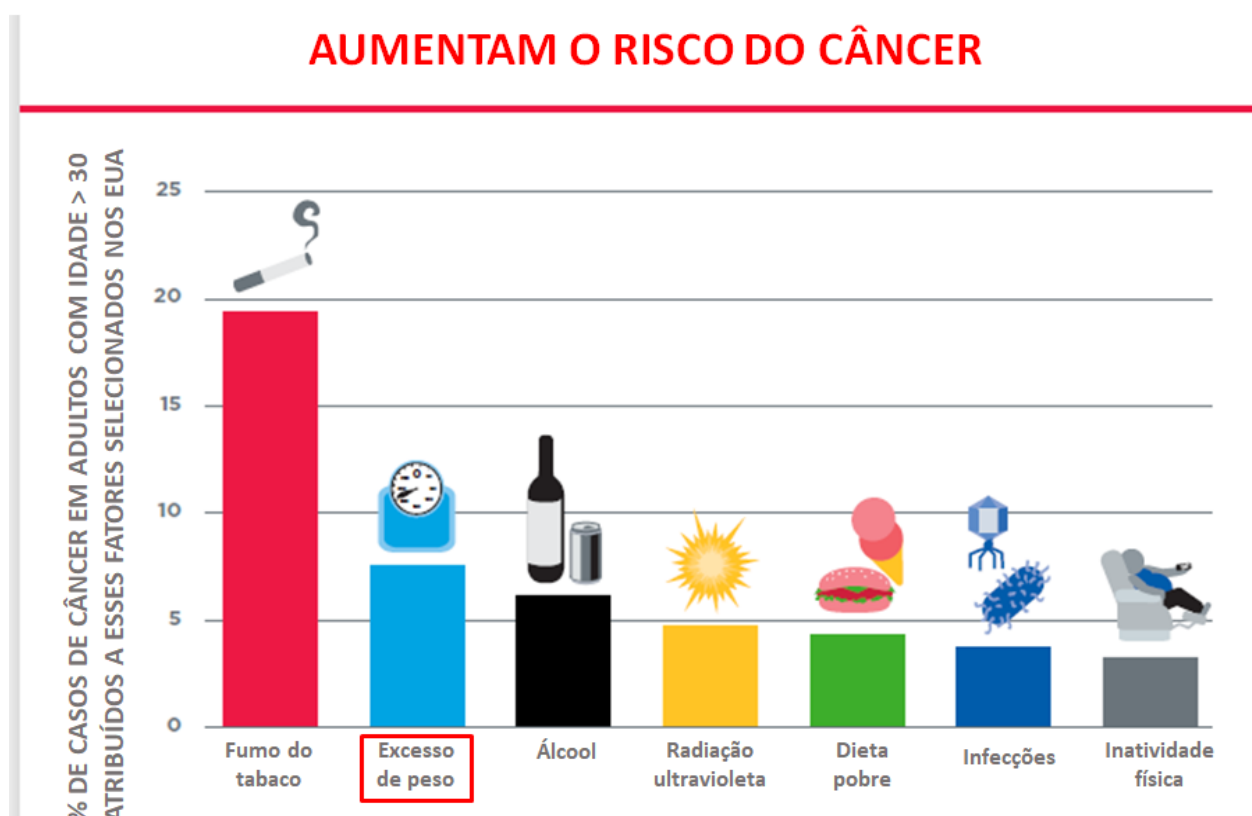
O câncer pode ser causado tanto por fatores externos quanto internos. Os fatores externos incluem o meio ambiente, exposição à radiação e agentes infecciosos, estilo de vida do indivíduo - tabagismo, alcoolismo, má alimentação, obesidade, sedentarismo, entre outros - (BLOT e TARONE, 2015). Os fatores internos são, na maioria das vezes, 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 (TORRE *et al.*, 2015; *American Association for Cancer Research*, 2019). Nos Estados Unidos, por exemplo, o excesso de peso/obesidade é o segundo principal desencadeador do câncer, perdendo apenas para o tabagismo o (ISLAM *et al.*, 2018; *American Association for Cancer*, 2019) (Figura 5).

Diversos estudos epidemiológicos já relataram que a obesidade e o sobrepeso são fatores de risco para o desenvolvimento de até 13 tipos de câncer, como o de cólon, endométrio, mama, pulmão, rins, esôfago, pâncreas, vesícula biliar, fígado, entre outros (Figura 6) (CALLE; KAAKS, 2004; WISEMAN, 2008; LICHTMAN, 2010; BRAY *et al.* 2018, CDC, 2021). No mundo, o excesso de peso é responsável por até 4% de todos os casos de câncer (SIEGEL; MILLER, 2017).

Um estudo realizado por Rezende e colaboradores calculou a incidência de câncer atribuído ao IMC elevado, no Brasil. De todos os novos casos de câncer no Brasil em 2012, 3,8% foram atribuíveis ao IMC elevado, com uma maior incidência em mulheres (5,2%) do que em homens (2,6%). A projeção para o ano de 2025 é de um aumento para 4,6% dos casos de câncer atribuíveis ao IMC elevado, permanecendo-se com uma maior incidência entre as mulheres (DE REZENDE *et al.*, 2018). Um outro estudo realizado 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). Corroborando tais achados, estimou-se 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).

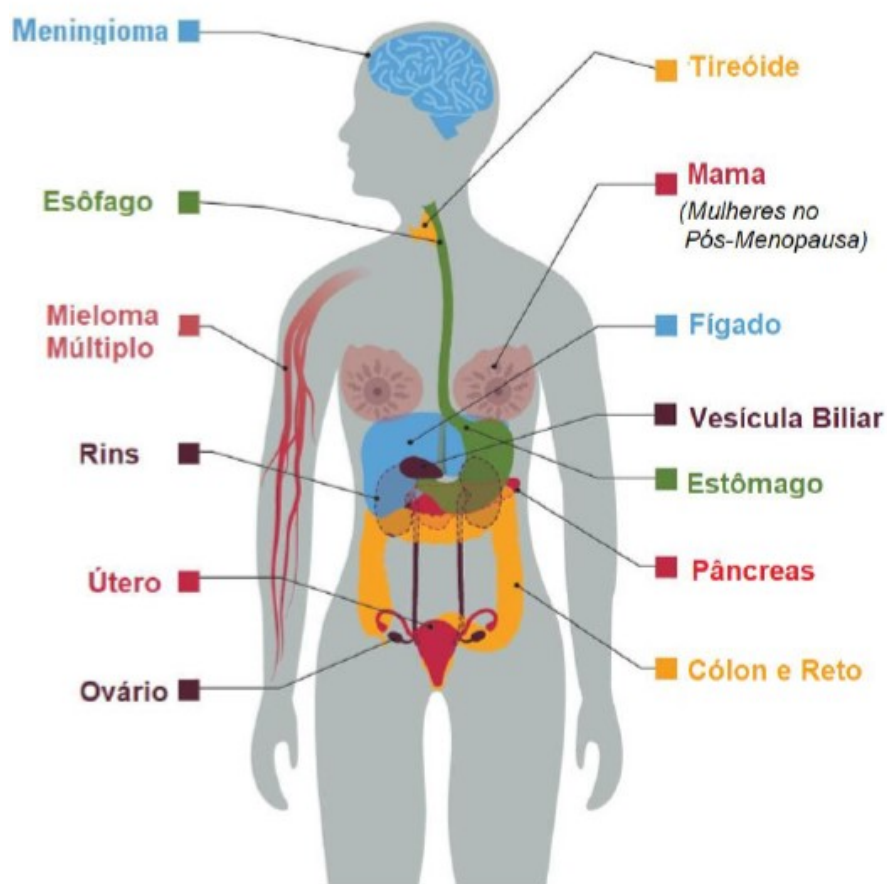
Figura 5 – Fatores que aumentam o risco do desenvolvimento do câncer



Fonte: Adaptado de *American Association for Cancer Research*, 2019.

Legenda: Diversos fatores que levam ao aumento do risco do desenvolvimento de diferentes tipos de câncer

Figura 6 – Os 13 tipos de câncer associados ao sobrepeso/obesidade



Fonte: Adaptado de Centro para Controle de Doenças e Prevenção (do inglês, Centers for Disease Control and Prevention – CDC), 2021.

Legenda: Os 13 tipos de câncer associados ao sobrepeso/obesidade e inatividade física. Os cânceres associados à obesidade são mostrados em vermelho; os cânceres associados à inatividade física são mostrados em azul claro; os cânceres associados a ambos são mostrados em azul escuro.

Câncer

Câncer é o termo dado a um conjunto amplo de mais de 100 doenças que pode afetar qualquer parte do corpo (HANAHA; WEINBERG, 2000). A carcinogênese é um processo que ocorre em etapas (MARTÍN DE CIVETTA; CIVETTA, 2011), as quais refletem alterações genéticas que levam à transformação progressiva de células normais em malignas (BALMAIN, 1993). De acordo com observações experimentais, foram estabelecidos três princípios básicos para a iniciação do processo de carcinogênese (COHEN; 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; 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; DOVER, 1994; CAHILL *et al.*, 1999; FRANK; NOWAK, 2004).

Além da etapa de iniciação, foram estabelecidas mais três etapas no desenvolvimento tumoral: promoção, conversão maligna, e progressão (WESTON; HARRIS, 2003; MARTÍN DE CIVETTA; CIVETTA, 2011). A etapa de promoção compreende a expansão clonal de células iniciadas, geneticamente alteradas. Os promotores tumorais (oncopromotores) não são carcinogênicos *per se*, eles são caracterizados por sua capacidade de reduzir o período de latência para a formação do tumor após a exposição de um tecido a um iniciador de tumor, ou de aumentar o número de tumores formados nesse tecido. Além disso, eles induzem a formação de tumores em conjunto com uma dose de um iniciador, que é muito baixa para ser carcinogênico sozinho. Entretanto, o aumento do número de células devido a expansão clonal propicia o risco de novas alterações genéticas e malignidade (WESTON; HARRIS, 2003). A etapa de conversão maligna consiste na transformação de uma célula pré-neoplásica no fenótipo maligno, que requer mais alterações genéticas. Essas alterações adicionais podem resultar da infidelidade da síntese de DNA e também podem ser mediadas pela ativação de protooncogenes e inativação de genes supressores de tumor. (ORDMAN *et al.*, 1985; MARTÍN DE CIVETTA; CIVETTA, 2011). A última etapa, de progressão, caracteriza-se pela multiplicação descontrolada e irreversível dessas células, as quais apresentam características cada vez mais agressivas, com a capacidade de invadir outros

tecidos e órgãos, gerando o quadro de metástase (MAREEL e LEROY, 2003; MARTÍN DE CIVETTA e CIVETTA, 2011).

As células tumorais não inventam novos mecanismos para progredirem, mas manipulam moléculas e células já existentes, a fim de contornar os mecanismos de proteção que atuam para impedir a formação de um tumor. Os *hallmarks* (marcas) do câncer foram propostos como um conjunto de capacidades adquiridas pelas células à medida que passam de estados de normalidade para estados de crescimento neoplásicos, os quais são cruciais para a formação de tumores malignos (HANAHAHAN e WEINBERG, 2000). 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 (HANAHAHAN e WEINBERG, 2000).

Com o avanço das pesquisas na área do câncer, foram caracterizados outros *hallmarks* envolvidos na progressão tumoral, como inflamação, instabilidade genômica, mutação, escape do sistema imune e o desbalanço energético (HANAHAHAN e WEINBERG, 2011). E 11 anos depois, no presente ano de 2022, foram adicionados mais quatro *hallmarks*, como o desbloqueio da plasticidade fenotípica, células senescentes, reprogramação epigenética não mutacional e microbiomas polimórficos, totalizando 14 *hallmarks* descritos por estarem envolvidos na progressão tumoral (Figura 7) (HANAHAHAN, 2022). Estes, em conjunto, constituem uma organização essencial para a compreensão das doenças neoplásicas (HANAHAHAN, 2022).

As células tumorais são capazes de controlar os *hallmarks* do câncer por meio de pequenas vesículas de membranas chamadas vesículas extracelulares (VEs). As VEs são capazes de modular o microambiente tumoral, bem como as VEs liberadas pelo microambiente podem modular as células tumorais (WEBBER, YEUNG; CLAYTON, 2015; DOS ANJOS PULTZ *et al.*, 2017; GOPAL *et al.*, 2017). No tópico a seguir focaremos nas VEs.

Figura 7 – *Hallmarks* envolvidos na progressão tumoral



Fonte: Adaptado de Hanahan, 2022.

Legenda: Os *hallmarks* (marcas) do câncer foram propostos como um conjunto de capacidades funcionais adquiridas pelas células à medida que avançam da normalidade para estados de crescimento neoplásico, mais especificamente capacidades que são cruciais para sua capacidade de formar tumores malignos. Inicialmente, no ano 2000, foram propostos seis *hallmarks* que estariam relacionados ao processo de progressão tumoral - 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. Em 2011 foram adicionados mais cinco *hallmarks* - inflamação, instabilidade genômica, mutação, escape do sistema imune e o desbalanço energético. No presente ano de 2022, foram adicionados mais quatro *hallmarks*, como o desbloqueio da plasticidade fenotípica, células senescentes, reprogramação epigenética não mutacional e microbiomas polimórficos, totalizando 14 *hallmarks* descritos por estarem envolvidos na progressão tumoral.

Assim como a obesidade, o câncer atualmente é um dos principais problemas de saúde pública no mundo. Globalmente, no ano de 2012, houve 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.*, 2015). Segundo a sociedade Americana do Câncer (do inglês, *American Cancer Society*) Unidos, foi estimado para o ano de 2021, 1,9 milhões de novo casos diagnosticados de câncer, com aproximadamente 610 mil mortes. Para o Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), a estimativa é de que para

cada ano do triênio 2020-2022 ocorrerão cerca de 625 mil novos casos de câncer. O câncer de pele não melanoma será o mais incidente (177 mil), seguido pelos cânceres de mama e próstata (66 mil cada), cólon e reto (41 mil), pulmão (30 mil) e estômago (21 mil).

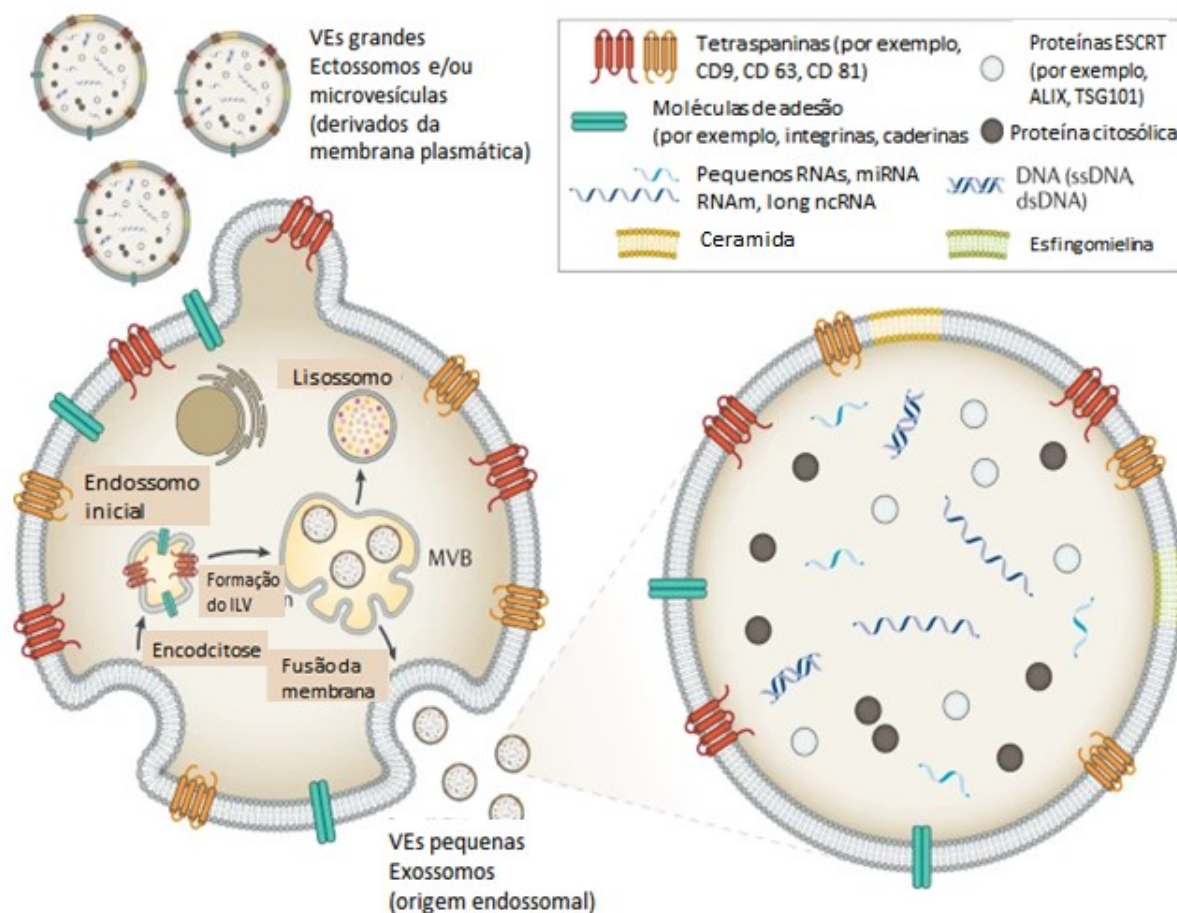
Vesículas Extracelulares

As VEs são pequenas vesículas de membrana liberadas por todos os tipos celulares, que apresentam papel primordial na comunicação celular, atuando de forma parácrina ou sistêmica (COLOMBO; RAPOSO; THÉRY, 2014; TUAL-CHALOT *et al.*, 2011). 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 dificuldade de definição entre os diferentes tipos de VEs ainda são observáveis na literatura. As principais VEs estudadas são os exossomos e as micropartículas (MPs) ou microvesículas (MVs), que se diferem em termos de biogênese, morfologia, tamanho e via de secreção (TUAL-CHALOT *et al.*, 2011; GACEB *et al.*, 2014) (Figura 8).

Os exossomos apresentam aproximadamente entre 10 a 100 nm de diâmetro, são originados a partir de compartimentos endossomais celulares, através da invaginação mediada por endocitose de fragmentos de membrana que se fundem para formarem os corpos multivesiculares (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013; MILBANK *et al.*, 2016). Já as MPs são as vesículas maiores, apresentando aproximadamente 0,1 a 1 µm de diâmetro, (WOLF, 1967), sendo 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; YAN *et al.*, 2009). Esse aumento também induz mudanças na atividade de transportadores de fosfolípidos, induzindo a externalização da fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina (LARSON *et al.*, 2012), as quais estão localizadas naturalmente na parte interna da membrana plasmática. Como resultado do excesso de carga negativa devido a

exposição desses fosfolipídios, também ocorre a ruptura da membrana para posterior liberação de MPs (PANATALA; HENNRICH; HOLTHUIS, 2015).

Figura 8 – Biogênese e caracterização das vesículas extracelulares



Fonte: Adaptado de Linxweiler e Junker, 2020.

Legenda: As microvesículas ou micropartículas (Evs grandes, 100–1.000 nm) são secretadas por brotamento da membrana plasmática; exossomos (pequenas VEs, 50-150 nm) são formados por brotamento interno de vesículas intraluminais endocíticas tardias chamadas corpos multivesiculares (MVBs), que se fundem com a membrana plasmática para liberar os exossomos no espaço extracelular. Estrutura e conteúdo dos exossomos (pequenos EVs). Os exossomos são caracterizados por marcadores de superfície específicos, como tetraspaninas, complexo de classificação endossomal necessário para proteínas de transporte (ESCRT) e moléculas de adesão, e contêm RNAs e DNA codificadores e não codificantes (nc), bem como proteínas. ALIX, proteína X que interage com ALG-2; dsDNA, DNA de fita dupla; ILV, vesícula intraluminal; miRNA, microRNA; ssDNA, DNA de fita simples.

A fosfatidilserina, inclusive, é um dos marcadores utilizados para identificação de MPs, no entanto, apenas aproximadamente 50% das MPs a expõe 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, as EROS (BURGER *et al.*, 2011), Rho associado a quinase (ROCK-1) (SEBBAGH *et al.*, 2001) e a quinase regulada por sinal extracelular (ERK) (KUNZELMANN-MARCHE; FREYSSINET; MARTÍNEZ, 2002) são alguns dos possíveis mecanismos moleculares na indução da liberação das MPs.

As VEs medeiam a comunicação celular através do carreamento de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (como miRNA e RNAm). Seu conteúdo depende do estímulo e da célula de origem, apresentando um perfil altamente heterogêneo (COLOMBO; RAPOSO; THÉRY, 2014). Uma vez liberadas, as VEs assumem as suas funções de comunicação célula-célula através da interação com suas células receptoras, que pode ser realizada de diferentes formas, como por exemplo através da fusão com a membrana ou ligação a receptores presentes na superfície da membrana (VAN NIEL; D'ANGELO; RAPOSO, 2018).

As VEs apresentam ação sistêmica e desempenham um papel importante na homeostase (MARTINES e ANDRIANTSITOHAINA, 2011; DEL CONDE *et al.*, 2005; COLOMBO; RAPOSO, 2014), como também em inúmeras doenças inflamatórias, nas quais encontra-se aumentada na circulação, como artrite reumatoide, lúpus eritematoso (KNIJFF-DUTMER *et al.*, 2002; PEREIRA *et al.*, 2006) e diferentes tipos de câncer (KANAZAWA *et al.*, 2003; KIM *et al.*, 2003). Há cada vez mais estudos relacionando o papel das VEs no câncer, e mais recentemente, o papel das VEs liberadas pelo TA na progressão tumoral (MORAES *et al.*, 2021), como focaremos na próxima seção. Hoje já se sabe que as VEs liberadas por células tumorais são capazes de modular o microambiente tumoral a seu favor, por meio de diferentes mecanismos, promovendo assim a progressão tumoral. E de forma bidirecional, as células presentes no microambiente tumoral também podem liberar VEs e facilitarem o desenvolvimento do tumor (WEBBER, YEUNG; CLAYTON, 2015; DOS ANJOS PULTZ *et al.*, 2017; GOPAL *et al.*, 2017).

Obesidade e o Microambiente Tumoral

O TA serve como reservatório de adipocinas pró-inflamatórias na obesidade, que funcionam não apenas de maneira parácrina, mas também têm um efeito

sistêmico ao permitir a comunicação com locais distantes. Diversas adipocinas e hormônios como leptina, insulina, TNF- α , IL-6, IL-8 IL-1 β , CCL2, desempenham um papel importante na progressão do tumor (CALLE; KAAKS, 2004; IYENGAR *et al.*, 2013; NIEMAN *et al.*, 2013; SIMPSON e BROWN, 2013). Tais adipocinas são capazes de ativar diferentes vias de sinalização relacionadas à proliferação, sobrevivência e invasão como a PI3K/Akt, ERK/MAPK, JAK/STAT3, entre outras, que possibilitam a progressão tumoral (BOOTH *et al.*, 2015; HOPKINS, GONÇALVES, CANTLEY, 2016; QUAIL, DANNENBERG, 2019).

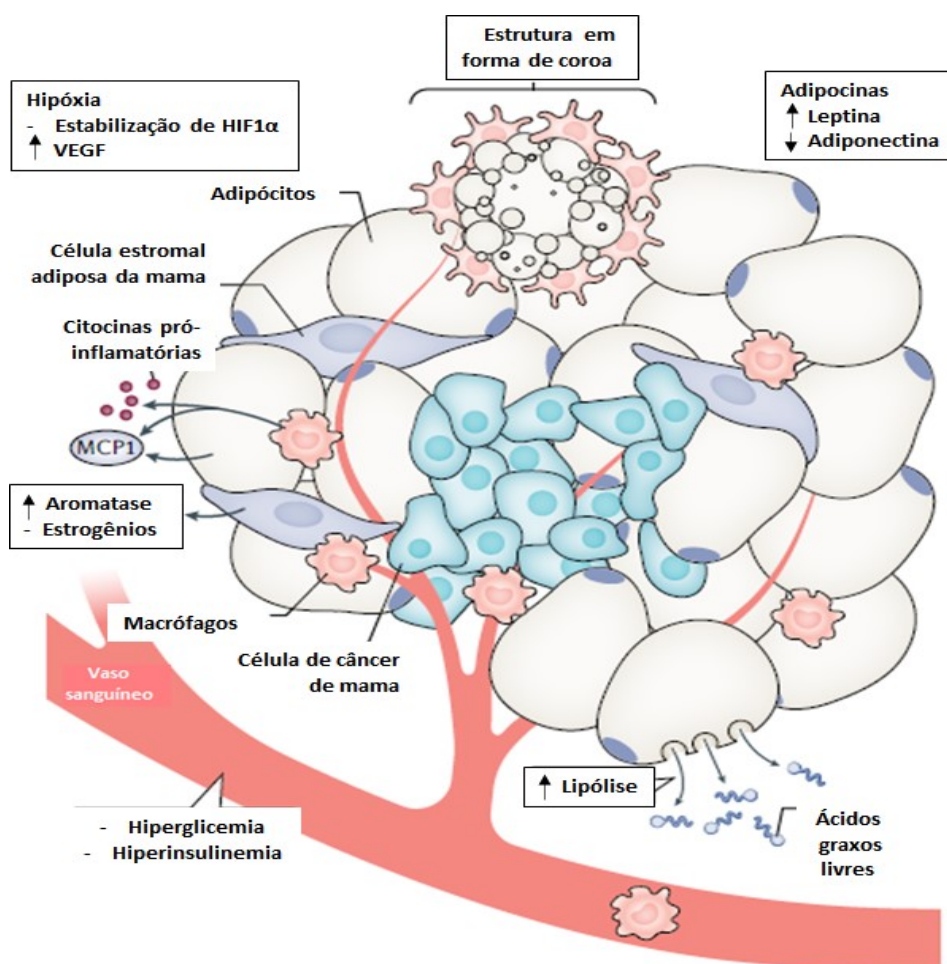
O excesso de ácidos graxos circulantes na obesidade (BODEN, 2008), também tem sido correlacionado com a progressão tumoral (NIEMAN *et al.*, 2011; BALABAN *et al.*, 2017; BINKER-COSEN *et al.*, 2017). O fenótipo lipogênico é um dos *hallmarks* metabólicos do câncer, as células cancerígenas em rápido crescimento requerem quantidades relativamente grandes de ácidos graxos para suportar diferentes processos celulares. As células tumorais liberam sinais lipolíticos, como por exemplo, catecolaminas, citocinas pró-inflamatórias, que são capazes de estimular a lipólise nos adipócitos adjacentes para prover energia para o seu crescimento (ATTANÉ; MULLER, 2020). Além disso, muitas enzimas lipogênicas estão superexpressas em células tumorais para permitir a lipogênese (KUO; ANN, 2018). Já foi demonstrado que células de câncer de mama e de ovário, por exemplo, podem utilizar os ácidos graxos liberados pelos adipócitos vizinhos como fonte para a sua progressão tumoral (NIEMAN *et al.*, 2011; BALABAN *et al.*, 2017) (Figura 9).

Antigamente acreditava-se que a comunicação entre os adipócitos, outras células do TA, e outros tecidos, ocorriam apenas através das citocinas e de fatores solúveis. Entretanto, as VEs foram identificadas como novas formas de comunicação entre o TA, outros tecidos, e também com as células tumorais (HARTWIG *et al.*, 2019; MORAES *et al.*, 2021). Nosso grupo já demonstrou que pacientes obesos apresentam uma maior quantidade de VEs na circulação, bem como uma maior liberação destas pelo TA, o que poderia ser responsável por esse aumento observado na circulação (RENOVATO-MARTINS *et al.*, 2017). Além disso, também demonstramos que o TA de indivíduos obesos secreta VEs ricas em leptina e MMP-9, as quais foram capazes de modificar as capacidades biológicas *in vitro* de células de câncer de mama em direção a um fenótipo mais agressivo por

meio de modificações de sinalização intracelular sustentadas pela comunicação célula-célula (RAMOS-ANDRADE *et al.*, 2020).

Tendo em vista o papel crescente das VEs na obesidade e seu envolvimento com a progressão tumoral, nosso grupo realizou uma revisão bibliográfica discutindo de que maneira as VEs derivadas do TA são capazes de modular os *hallmarks* do câncer para a progressão tumoral (figuras 10 e 11) (MORAES *et al.*, 2021). Clement e colaboradores demonstraram que exossomos derivados de adipócitos são capazes de transferir tanto enzimas necessárias para a fosforilação oxidativa, quanto o próprio substrato, para células de melanoma, aumentando o seu potencial migratório (CLEMENT *et al.*, 2020). Além disso, já foi demonstrado que exossomos derivados de adipócitos maduros apresentam alta expressão de miRNA 23 a/b, os quais induziram em células de hepatocarcinoma aumento de proliferação e migração, via diminuição do supressor tumoral VHL e aumento de HIF-1 α , via miRNA 23a/b (LIU *et al.*, 2019). La Camera e colaboradores demonstraram que exossomos derivados de adipócitos diferenciados a partir de pré-adipócitos aumentaram a malignidade de células tumorais de mama através do aumento da atividade de HIF-1 α , que promoveu a TEM e aumento de migração e invasão dessas células (LA CAMERA, 2021). É importante ressaltar que essa comunicação ocorre de forma bidirecional, tanto as células do tecido adiposo quanto as células tumorais podem liberar e receber vesículas e, assim, modular o fenótipo uma da outra para um perfil pró-tumoral (LAZAR *et al.*, 2016).

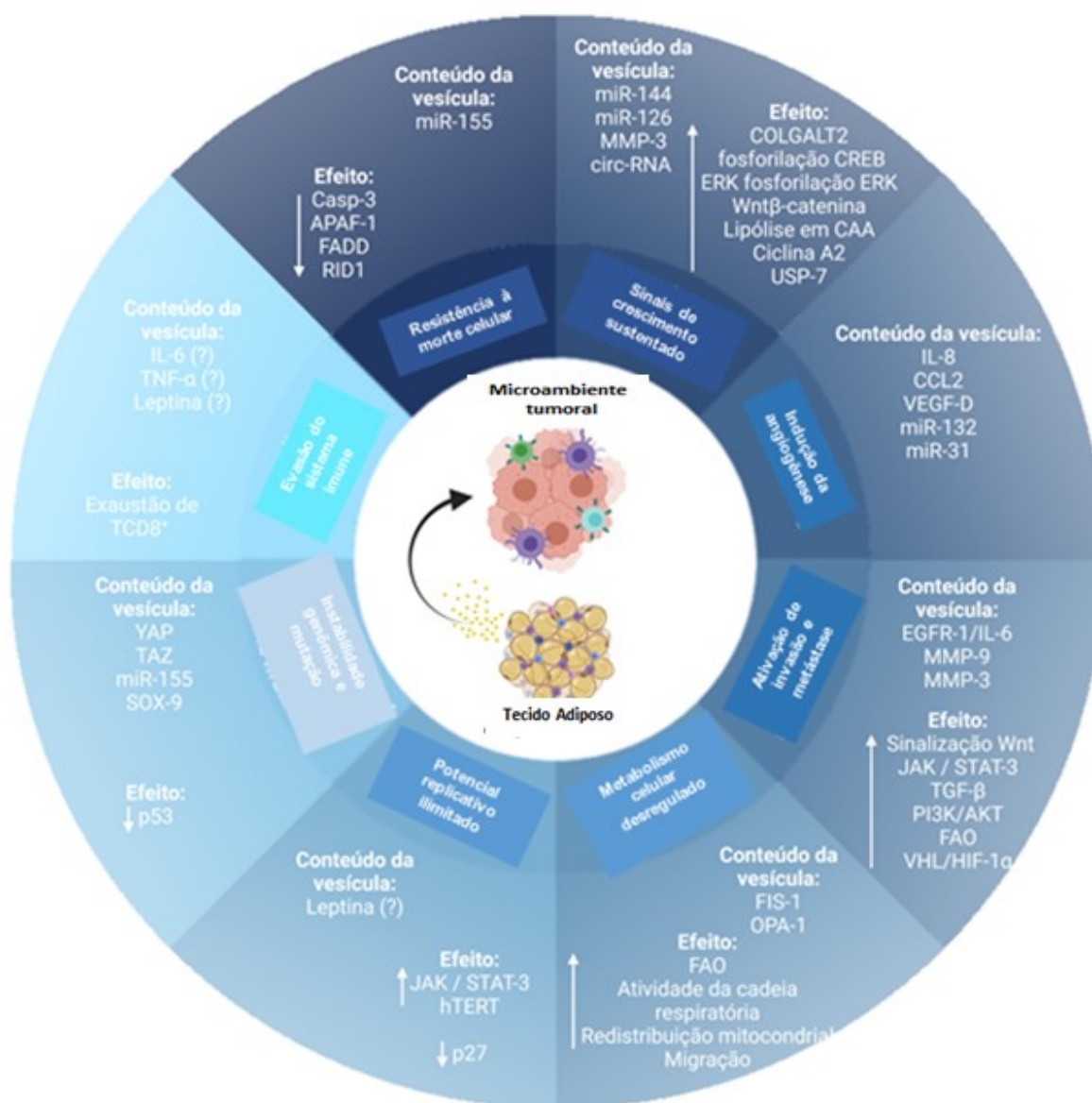
Figura 9 - O microambiente da mama e os principais desencadeadores do câncer de mama na obesidade



Fonte: Adaptado de Brown, 2021.

Legenda: Os tumores de mama são cercados, e às vezes infiltrados, por células adiposas da mama, incluindo adipócitos, células do estroma adiposo e células imunes. A obesidade está associada à expansão do TA e aumento da liberação de adipocinas, bem como à disfunção dos adipócitos e morte celular, que levam ao recrutamento de células imunes e à liberação de mediadores inflamatórios. As células estromais adiposas produtoras de estrogênio respondem a mudanças no microambiente tumoral aumentando sua expressão de aromatase, levando ao aumento da produção de estrogênio. O aumento da biomassa tecidual também está associado tanto à hipóxia quanto à angiogênese. A hiperglicemia e a hiperinsulinemia relacionadas à obesidade fornecem estímulos adicionais para o crescimento das células do câncer de mama. HIF-1α, fator 1α induzido por hipóxia; MCP1, proteína quimioatraente de monócitos 1; VEGF, fator de crescimento endotelial vascular.

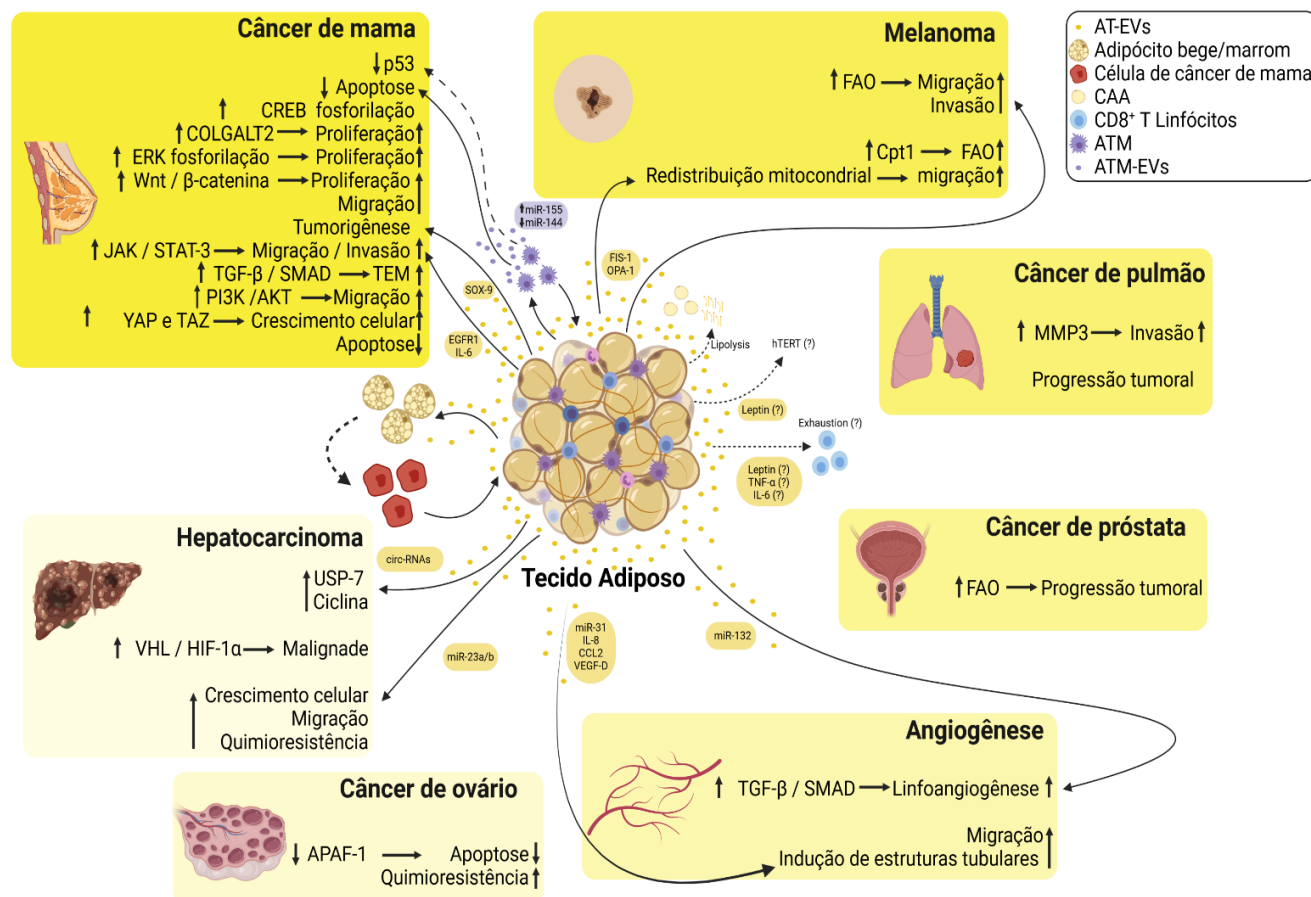
Figura 10 - Vesículas extracelulares derivadas de tecido adiposo modulam a aquisição e manutenção de *hallmarks* do câncer



Fonte: Adaptado de Moraes *et al.*, 2021.

Legenda: microRNA (miR); RNA circulante (ARN-circ); pró-colágeno galactosiltransferase 2 (COLGALT2); proteína ligante ao elemento responsivo de AMPc (CREB); adipócitos associados ao câncer (CAA); protease 7 de processamento específico de ubiquitina (USP-7); interleucina-8 (IL-8), ligante 2 de quimiocina de motivo C-C (CCL2) e fator de crescimento endotelial vascular D (VEGF-D); receptor 1 do fator de crescimento epidérmico (EGFR1); interleucina 6 (IL-6); metaloproteinase 3 (MMP-3); metaloproteinase 9 (MMP-9); fator de crescimento transformante β (TGF- β); janus quinase (JAK); transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (STAT-3); fator-1 α induzido por hipóxia (HIF-1 α); supressor tumoral von-Hippel Lindau (VHL); proteína de fissão mitocondrial 1 (FIS-1); GTPase mitocondrial tipo dinamina (OPA-1); oxidação de ácidos graxos (FAO); transcriptase reversa da telomerase humana (hTERT); proteína 1 Sim-associada (YAP); tafazina (TAZ); caspase 3 (Casp-3); fator 1 ativador da peptidase apoptótica (APAF-1); proteína de domínio de morte associada a Fas (FADD); proteína de ligação a GTPase rid1 (RID1); fator de transcrição SRY-box 9 (SOX-9).

Figura 11 - Resumo do crosstalk entre as vesículas extracelulares derivadas do tecido adiposo e diversos tipos de câncer



Fonte: Adaptado de Moraes *et al.*, 2021.

Legenda: As VEs liberadas pelos macrófagos do TA são enriquecidas em miR-155, enquanto o miR-144 é regulado negativamente, induzindo a inibição de p53 e diminuindo a apoptose em células de câncer de mama. VEs-TA aumentam a fosforilação de CREB, aumentando a proliferação de células de câncer de mama. VEs-TA aumentam a proliferação de células de câncer de mama através da indução COLGALT2. VEs-TA aumentam as vias de sinalização da quinase regulada por ERK e Wnt/β-catenina, induzindo um aumento da proliferação de células de câncer de mama. VEs-TA enriquecidos do fator de transcrição SRY-box 9 (SOX-9) induzem tumorigênese em células de câncer de mama. As VEs-TA de pacientes diabéticos são enriquecidas de EGFR1/IL-6, e induzem um aumento na migração e invasão de células de câncer de mama via JAK/STAT-3. VEs-TA aumentam a via de sinalização TGF-/SMAD desencadeando a transição mesenquimal epitelial (TEM) em células de câncer de mama não metastático. VEs-TA induzem a sinalização PI3K/AKT em células MDA-MB-231, aumentando assim sua capacidade migratória. As VEs-TA induzem as proteínas YAP e a tafazina, induzindo o crescimento células tumorais de mama. VEs-TA diminuem a apoptose em células de câncer de mama. VEs-TA enriquecidas de proteínas mitocondriais FIS-1 e OPA-1 induzem redistribuição mitocondrial em direção à borda das células de melanoma aumentando sua capacidade migratória. VEs-TA e VEs derivadas de adipócitos associados ao câncer (CAA) fornecem ácidos graxos livres para células de melanoma e aumentam a oxidação de ácidos graxos (FAO), aumentando suas capacidades migratórias e invasivas. VEs-TA aumentam a MMP-3 em células de câncer de pulmão, aumentando sua invasividade. VEs-TA aumentam a progressão tumoral do câncer de pulmão. VEs-TA aumentam a FAO e induzem a progressão tumoral no câncer de próstata. VEs-TA

enriquecidas em RNAs circulantes (circ-RNAs) induzem a hipofosforilação da USP-7 e um aumento de ciclina em células de hepatocarcinoma. VEs-TA induzem a malignidade de células de hepatocarcinoma através da ligação do HIF-1- α ao supressor tumoral von-Hippel Lindau (VHL). As VEs-TA diminuem a apoptose e aumentam a quimiorresistência em células de câncer de ovário através da inibição do fator 1 ativador da peptidase apoptótica (APAF-1). VEs-TA enriquecidas em miR-31, IL-8, CCL2, e VEGF-D induzem a formação de estruturas tubulares pelas células endoteliais. VEs-TA enriquecidas em miR-132 induzem linfangiogênese via TGF- β /Smad. Os CAA sofrem aumento da lipólise e diferenciam-se em direção ao fenótipo de adipócitos bege/marrom alimentando células tumorais com VEs. A leptina liberada do TA possivelmente está dentro dos EVs e induz um aumento na atividade da hTERT, induzindo resistência à apoptose e senescência. Leptina, TNF- e IL-6 podem ser liberados de VEs-TA, induzindo a exaustão das células T CD8+.

Obesidade e o 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 (FERLAY *et al.*, 2015). 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 são mais propensas a um diagnóstico com tumores maiores, maior incidência de metástases nos linfonodos, e um elevado risco de recorrência, do que mulheres magras (RENEHAN *et al.*, 2008).

Um estudo realizado por Blair e colaboradores analisou o efeito da obesidade na sobrevida e mortes de pacientes com câncer de mama. Mulheres obesas tiveram um risco aumentado de 1,7 e 1,8 vezes de doença em estágio III/IV e tumores de grau 3/4, respectivamente, e maior incidência de metástases. Mulheres obesas com câncer de mama tipo Luminal A e Luminal B foram 1,8 e 2,2 vezes mais propensas a morrer de câncer em comparação com mulheres com peso normal. (BLAIR *et al.*, 2019). Estudos demonstraram que pacientes obesas com câncer de mama apresentam risco significativamente maior de complicações médicas e cirúrgicas, como infecções, deiscência de feridas e tromboembolismo venoso sistêmico (DISIPIO *et al.*, 2013; FISCHER *et al.*, 2013). Além disso, quando as doses de quimioterapia são calculadas com base no peso corporal real dos pacientes, os médicos geralmente reduzem as doses para pacientes com câncer

esobrepeso ou obesidade para evitar os riscos de toxicidade de overdose (GRIGGS *et al.*, 2003; LYMAN *et al.*, 2003). Pacientes com câncer de mama severamente obesas têm risco quatro vezes maior de receber uma dose reduzida de quimioterapia em comparação à pacientes com IMC normal (GRIGGS *et al.*, 2007). As reduções da dose de quimioterapia frequentemente resultam em subtratamento em pacientes obesas com câncer de mama e contribuem para o pior prognóstico e baixa sobrevida (GRIGGS *et al.*, 2005).

Câncer de Mama

O câncer de mama é o mais incidente entre as mulheres no mundo, independentemente da posição socioeconômica de cada país. Só no ano de 2018, ocorreram 2,1 milhões de novos casos, aproximadamente 1 novo caso a cada 18 segundos, o equivalente a 11,6% de todos os cânceres estimados (BRAY *et al.*, 2018; FERLAY *et al.*, 2019). 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). Para o Brasil, o INCA estimou para cada ano do triênio 2020-2022 um aumento de 66.280 novos casos (Figura 12), correspondente a um risco estimado de 61,61 casos novos a cada 100 mil mulheres. Com exceção do câncer de pele não melanoma, o câncer de mama feminino ocupa a primeira posição mais frequente em todas as regiões brasileiras (INCA, 2020).

Além da obesidade influenciar o desenvolvimento do câncer de mama, a predisposição genética também é um fator de risco confirmado para o seu desenvolvimento. Aproximadamente 10% dos cânceres de mama são herdados e associados a um histórico familiar (SHIOVITZ; KORDE, 2015). Mutações patogênicas na linhagem germinativa em genes envolvidos no reparo do DNA, ciclo celular e controle da apoptose, como o gene do câncer de mama (BRCA) 1, BRCA2, fosfatase 21 (p21) e homólogo da tensina (PTEN) e proteína tumoral p53 (TP53), aumentam significativamente o risco de câncer de mama (SHIOVITZ *et al.*, 2016).

Figura 12 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma

Localização Primária	Casos	%		Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	Homens	Mulheres	Mama feminina	66.280 29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470 9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590 7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440 5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950 5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870 3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650 3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540 2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450 2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220 2,3%

Fonte: Adaptado de INCA, 2020.

Classificação do Câncer de Mama

A mama é composta por diferentes células, sendo estruturada em lóbulos (glândulas produtoras de leite), 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 lóbulos, vasos sanguíneos e linfáticos (Figura 13) (*American Cancer Society*, 2015). O câncer de mama pode se originar a partir de qualquer célula que a compõe, entretanto, geralmente, inicia-se nas células epiteliais - os chamados carcinomas-, quando iniciados 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 (BRAY *et al.*, 2018; FERLAY *et al.*, 2019; *American Cancer Society*, 2015). Os mesmos são menos frequentes nos tecidos estromais; Tumores filódicos e angiossarcoma, são menos comuns (*American Cancer Society*, 2020).

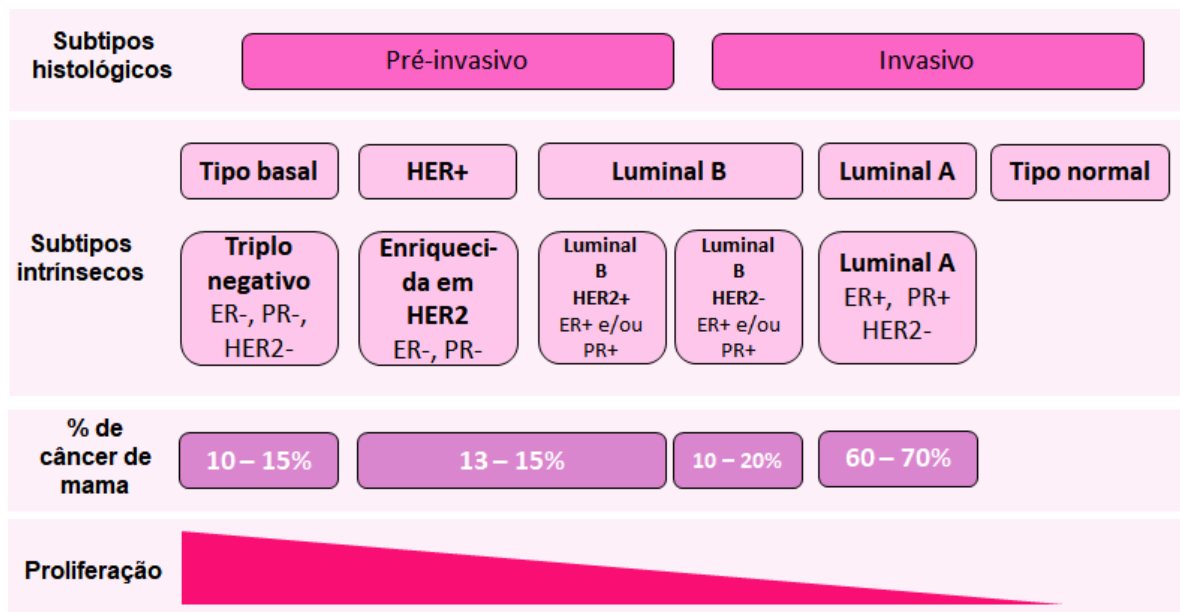
A classificação do câncer de mama é realizada de acordo com as características histológicas e padrões de crescimento do tumor. O carcinoma pré-invasivo (*in situ*) e o carcinoma invasivo (MALHOTRA *et al.*, 2010) são as duas

principais classificações do câncer de mama. De acordo com a classificação da OMS, o carcinoma de mama invasivo pode ser dividido em mais de 10 subtipos (SINN; KREIPE, 2013). Dentre esses subtipos, o carcinoma ductal infiltrante e o carcinoma lobular invasivo são as lesões mais frequentemente diagnosticadas, representando mais de 70% de todas as lesões invasivas (MALHOTRA *et al.*, 2010; WEIGELT; GEYER; REIS-FILHO, 2010)

Com o desenvolvimento de técnicas de análise molecular, diversas classificações moleculares foram desenvolvidas, que se tornaram cada vez mais importantes para ditar as estratégias de tratamento do câncer de mama (PEROU *et al.*, 2000). Um painel de quatro marcadores substitutos, incluindo receptores de estrogênio (ER), receptores de progesterona (PR), receptor 2 do fator de crescimento epidermal humano (HER2) e o marcador de proliferação Ki67 (CHEANG *et al.*, 2009), são amplamente aceitos para a classificação dos cânceres de mama. Atualmente foram descritos cinco subtipos intrínsecos: luminal A, luminal B, HER2 positivo, tipo basal e tipo mama normal (HARBECK *et al.*, 2019) (Figura 13).

O subtipo basal é conhecido como triplo negativo, por não apresentar os receptores hormonais ER, PR e HER2, representando cerca de 10-15% dos casos de carcinoma mamário, apresenta alta marcação para Ki67, indicando alta capacidade proliferativa. É o subtipo de tumor de mama mais agressivo, e com tratamentos menos eficazes (PEROU *et al.*, 2000; PARKER *et al.*, 2009; PRAT *et al.*, 2015). O subtipo molecular HER2 representa 13-15% dos casos de carcinoma mamário, não apresenta ER e PR, é positivo para Ki67 e possui elevada expressão de HER2. O subtipo luminal B apresenta o mesmo percentual de incidência que o HER2+, podendo apresentar ou não positividade para HER2, e é positivo para Ki67. O subtipo luminal A possui os receptores ER, PR e é negativo para HER2, é o mais incidente, representando cerca de 60 a 70% dos casos. Entretanto, são os subtipos mais responsivos à terapias hormonais (HARBECK *et al.*, 2019, POUDEL *et al.*, 2019).

Figura 13 – Classificações do câncer de mama



Fonte: Figura baseada no artigo de Harbeck *et al.*, 2019.

Legenda: Cinco subgrupos de câncer de mama foram identificados pela assinatura molecular intrínseca, que são altamente sobrepostas com classificações substitutas de imunohistoquímica.

Transição Epitelial-Mesenquimal

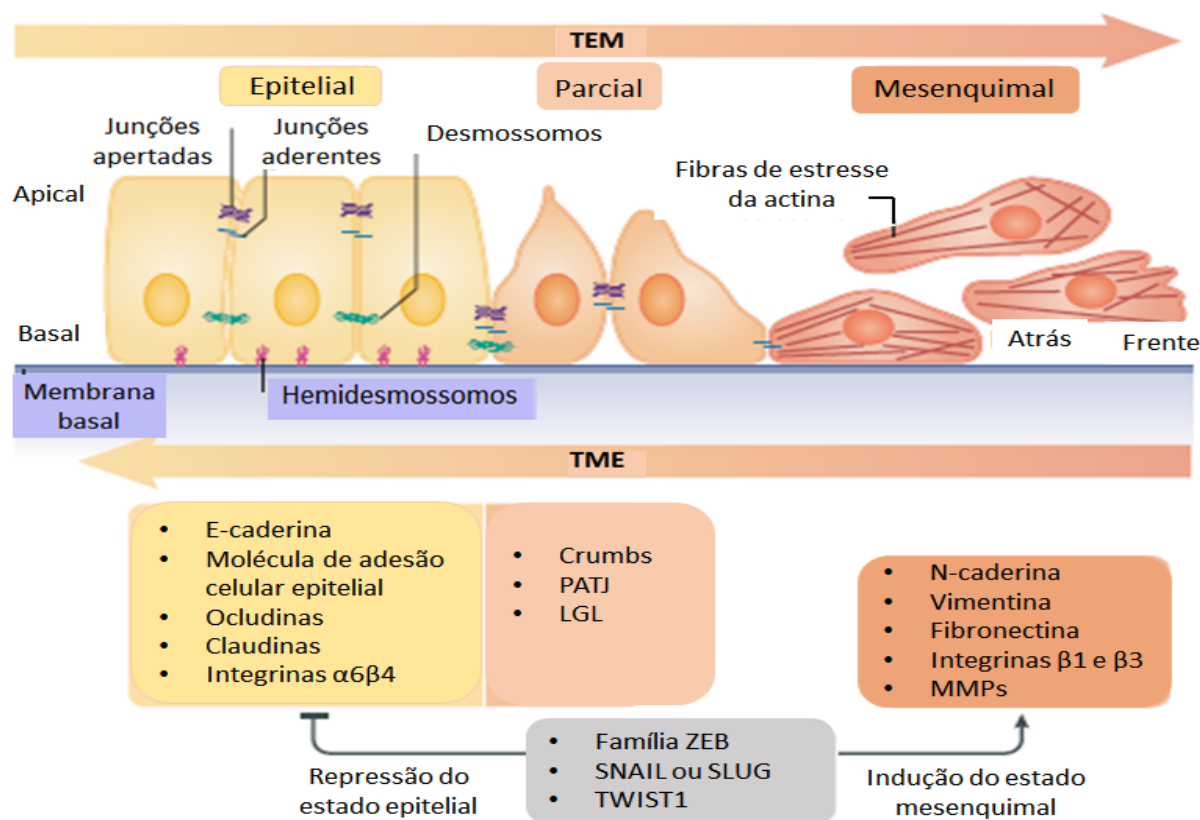
A progressão maligna de muitos tipos de carcinoma, possivelmente todos eles, dependem da ativação da TEM nas células neoplásicas (RHIM *et al.*, 2012; YE *et al.*, 2015; KREBS *et al.*, 2017). Durante o curso da progressão do tumor, esse programa pleiotrópico confere às células individuais do carcinoma múltiplas características associadas à malignidade de alto grau (MANI *et al.*, 2008; MOREL *et al.*, 2008; SING, SETTLEMAN, 2010). As células de carcinoma raramente executam um programa completo da TEM que as leva a um estado totalmente mesenquimal (GRANDE *et al.*, 2015; NIETO *et al.*, 2016; BIERIE *et al.*, 2017). A TEM também pode ser orquestrada como um processo epigenético que não depende de alterações concomitantes da sequência de DNA em células normais e neoplásicas (TAM; WEINBERG, 2013).

A TEM é um programa celular reversível que transitoriamente torna as células epiteliais em estados celulares mesenquimais. Durante esse processo, as células epiteliais perdem progressivamente seu fenótipo epitelial em forma de

cubóides para adotar uma morfologia mesenquimal em forma de fuso. As células mesenquimais resultantes podem retornar a um estado epitelial no processo reverso, conhecido como transição mesenquimal-epitelial (TME) (Figura 14) (NIETO *et al.*, 2009; THIERRY *et al.*, 2009; KALLURI *et al.*, 2009; NIETO *et al.*, 2016). A TEM ocorre durante alguns processos biológicos e também patológicos, e são classificadas em três tipos, o primeiro tipo ocorre durante o desenvolvimento embrionário, o segundo tipo está associado a regeneração do tecido adulto e o terceiro tipo ocorre na progressão do câncer (SAVAGNER *et al.*, 1994; KALLURI *et al.*, 2009; ZEISBERG; NEILSON, 2009).

As células epiteliais são normalmente mantidas juntas por junções célula-célula laterais (junções de oclusão, junções aderentes, junções de *gap* e desmossomos). As junções de oclusão são fusões de membrana no lado lateral, próximas à superfície apical, que fornecem vedação intercelular, protegem contra a difusão paracelular, e também separam as funções distintas das superfícies apical e basolateral, como as claudinas e ocludinas (TSUKITA; FURUSE; ITOH *et al.*, 2001). As junções aderentes estão localizadas adjacentes às junções de oclusão nos compartimentos superficiais basolaterais das células epiteliais, e conectam-se aos microfilamentos do citoesqueleto. Similarmente às junções de oclusão, as junções aderentes formam uma estrutura semelhante à um cinto na interface lateral das células epiteliais (NIESSEN; GOTTARDI, 2003). O receptor de adesão transmembrana E-caderina, o qual caracteriza esse tipo de junção epitelial, se envolve em interações homotípicas através de seu ectodomínio, permitindo assim que as proteínas E-caderina abranjam o espaço intercelular entre as células vizinhas nas junções aderentes opostas (WHEELLOCK; JOHSON, 2003; NIESSEN; GOTTARDI, 2008). Também localizados no lado lateral estão os desmossomos, que fornecem força adicional para a adesão intercelular. Os desmossomos são estruturalmente semelhantes às junções aderentes, contendo caderinas transmembranares e proteínas ligantes que conectam as caderinas ao citoesqueleto do filamento intermediário. Entretanto, de maneira diferente das junções aderentes, eles são organizadas como fragmentos individuais e não como um cinto (YIN; GREEN, 2004; GARROD; CHIDGEY, 2008).

Figura 14 -Transição epitelial-mesenquimal



Fonte: Adaptado de Dongre e Weinberg, 2019.

Legenda: As células epiteliais, que exibem polaridade apical-basal, são mantidas juntas por junções apertadas, junções aderentes e desmossomos, e são amarradas à membrana basal subjacente por hemidesmossomos. Essas células expressam moléculas associadas ao estado epitelial e ajudam a manter a polaridade celular (listadas nas caixas amarela e laranja clara, respectivamente). A indução da transição epitélio-mesenquimal (TEM) leva à expressão dos fatores de transcrição indutores da TEM (TEM-FTs) ZEB, SNAIL e TWIST1, que inibem a expressão de genes associados ao estado epitelial (listados na caixa amarela) e concomitantemente ativam a expressão de genes associados ao estado mesenquimal (listados na caixa laranja escura). Essas alterações na expressão gênica resultam em alterações celulares que incluem a desmontagem das junções epiteliais célula-célula e a dissolução da polaridade apical-basal via repressão de *crumbs*, proteína de junção apertada (PATJ) associada a PALS1 e larvas gigantes letais (LGL), que são proteínas que regulam especificamente a formação de junções apertadas e a polaridade apical-basal. Essa perda progressiva das características epiteliais é acompanhada pela aquisição de um conjunto parcial de características mesenquimais com retenção de certas características epiteliais; em certas circunstâncias, um conjunto completo de características mesenquimais pode ser adquirido. As células mesenquimais apresentam polaridade de frente para trás e um citoesqueleto amplamente reorganizado, além de expressarem um conjunto distinto de moléculas e TEM-FTs que promovem e mantêm o estado mesenquimal. Durante a TEM, as células se tornam móveis e adquirem capacidades invasivas. A TEM é um processo reversível, e as células mesenquimais podem reverter para o estado epitelial, passando pela transição mesenquimal-epitelial (TME). A TEM e a TME ocorrem durante o desenvolvimento normal e durante a progressão do câncer. Deve-se notar, no entanto, que as células de carcinoma em tumores que ocorrem espontaneamente apenas raramente avançam para um estado completamente mesenquimal. E-caderina, caderina epitelial; MMP, metaloproteinase da matriz; N-caderina, caderina neural.

Transição epitelial-mesenquimal parcial

A TEM e a MET, seja em contextos fisiológicos ou patológicos, não são processos binários (KALLURI *et al.*, 2009, NIETO, 2013). Algumas células podem atingir um fenótipo híbrido epitelial/mesenquimal (E/M), também referido como TEM parcial, intermediário ou incompleto (REVENU; GILMOUR, 2009; MICALIZZI *et al.*, 2010) – tal fenótipo pode ser mais parecido com “células tronco”, metastáticas e agressivas do que os estados epiteliais ou mesenquimais completos (JOLLY *et al.*, 2015; PASTUSHENKO *et al.*, 2018). As células com fenótipo híbrido E/M coexpressam marcadores epiteliais e mesenquimais (YU *et al.*, 2013), apresentando ambas as características de adesão célula-célula e migração, o que permite a migração coletiva das células, levando à formação de grupos de células tumorais circulantes (CTCs) (CHRISTIANSEN; RAJASEKARAN, 2006). As CTCs podem sair da corrente sanguínea com mais eficiência (JOOSSE *et al.*, 2015), são resistentes à apoptose e podem ser até 50 vezes mais metastáticas do que CTCs que migram individualmente (ACETO *et al.*, 2014). Portanto, a capacidade das células metastáticas de atingir esse fenótipo híbrido E/M, representa um risco metastático maior aos pacientes (GROSSE-WILDE *et al.*, 2015; CHEUNG, EWALD, 2016; JIA *et al.*, 2019).

Os mecanismos que permitem que as células cancerígenas mantenham os fenótipos híbridos E/M, no entanto, ainda não são muito bem esclarecidos. Estudos experimentais e computacionais recentes sugeriram que um conjunto conhecido como 'fatores de estabilidade fenotípica' (PSFs) como GRHL2, OVOL2, Δ Np63 α , NUMB e NFR2 podem ajudar as células a manter esse fenótipo híbrido E/M. Dessa forma, os PSFs evitam que as células que ganharam plasticidade parcial sejam submetidas a uma TEM completa, permitindo a migração celular coletiva. (WATANABE *et al.*, 2014; DANG *et al.*, 2015; HONG *et al.*, 2015; JOLLY *et al.*, 2016; BOCCI *et al.*, 2017 JOLLY, *et al.*, 2017; JOLLY *et al.*, 2019). Já foi demonstrado que o silenciamento do PSF OVOL levou as células a uma TEM completa *in vitro* e *in vivo*, enquanto a superexpressão exógena pode conduzir a transição mesenquimal-epitelial (TME), o inverso da TEM (ROCA *et al.*, 2013).

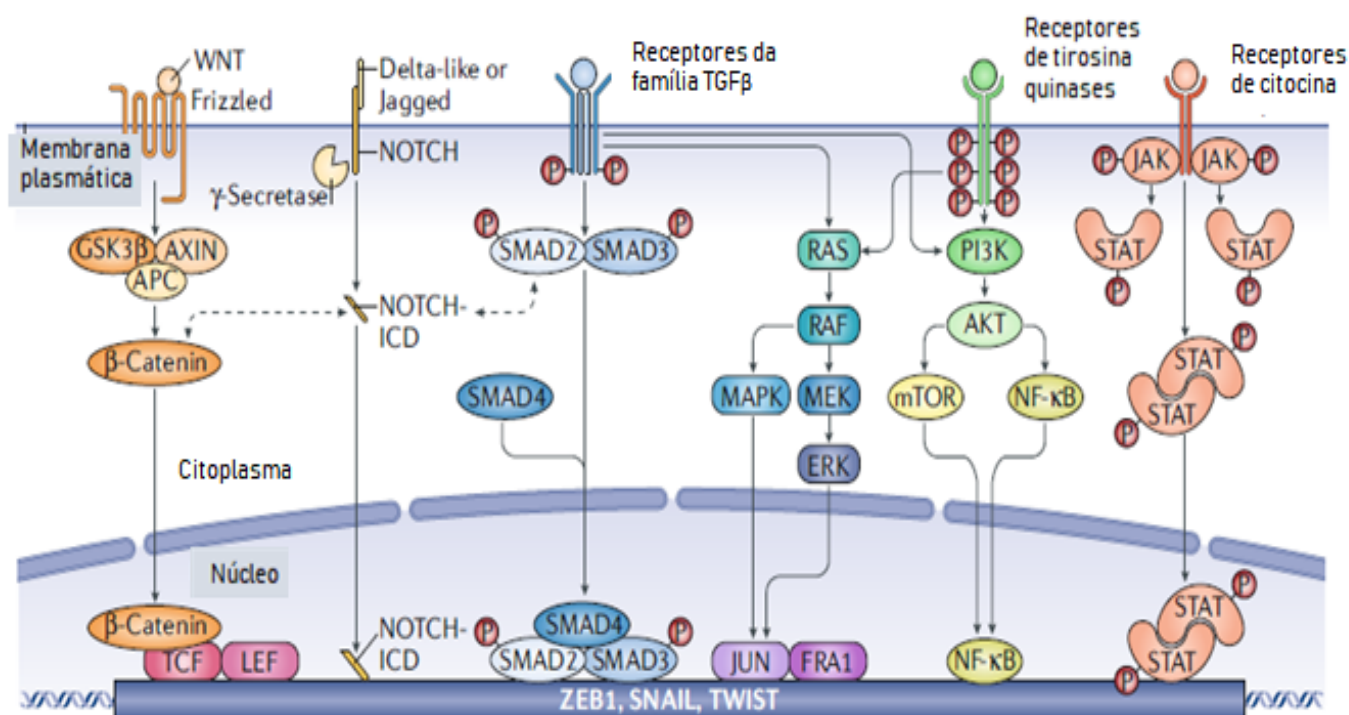
Vias de sinalização envolvidas na transição epitelial-mesenquimal

A TEM pode ser induzida por diversas vias de sinalização intracelulares como as vias do fator de crescimento transformador beta (TGF- β), WNT, NOTCH, PI3K/AKT, JAK/STAT (KLAUS; BIRCHMEIER, 2008; LAMOUILLE; XU; DERYNCK, 2014; BAO *et al.*, 2011; DONGRE; WEINBERG, 2019) (Figura 15). Focaremos a seguir nas vias do TGF/SMAD e WNT/b-catenina.

TGF- β /SMAD

O TGF- β é uma citocina multifuncional pertencente à superfamília dos fatores de crescimento transformante β , cujos membros regulam um conjunto diversificado de processos celulares, incluindo proliferação celular, reconhecimento, diferenciação, apoptose e diversas etapas da embriogênese (MASSAGUÉ, 2000; XU; LAMOUILLE; DERYNCK, 2009). O TGF- β apresenta três isoformas: TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3 - os quais são polipeptídeos homodiméricos de 25 kDa. Eles compartilham elementos estruturais comuns, mas mostram diferentes afinidades de ligação pelo receptor T β RII. TGF- β 1 e - β 3 se ligam ao T β RII com alta afinidade, enquanto TGF- β 2 se liga ao T β RII com baixa afinidade (DE CRESCENZO *et al.*, 2006; BAARDSNES *et al.*, 2009; HINCK; MULLER; SPRINGER, 2016). Estudos anteriores sugerem que os epítomos de ligação dos receptores TGF- β dentro de cada monômero dos ligantes da superfamília TGF- β são únicos e que suas funções são amplamente independentes umas das outras (DE CRESCENZO *et al.*, 2006; HINCK, 2018).

Figura 15 - Vias de sinalização envolvidas na transição epitélio mesenquimal



Fonte: Adaptado de Dongre and Weiberg, 2019.

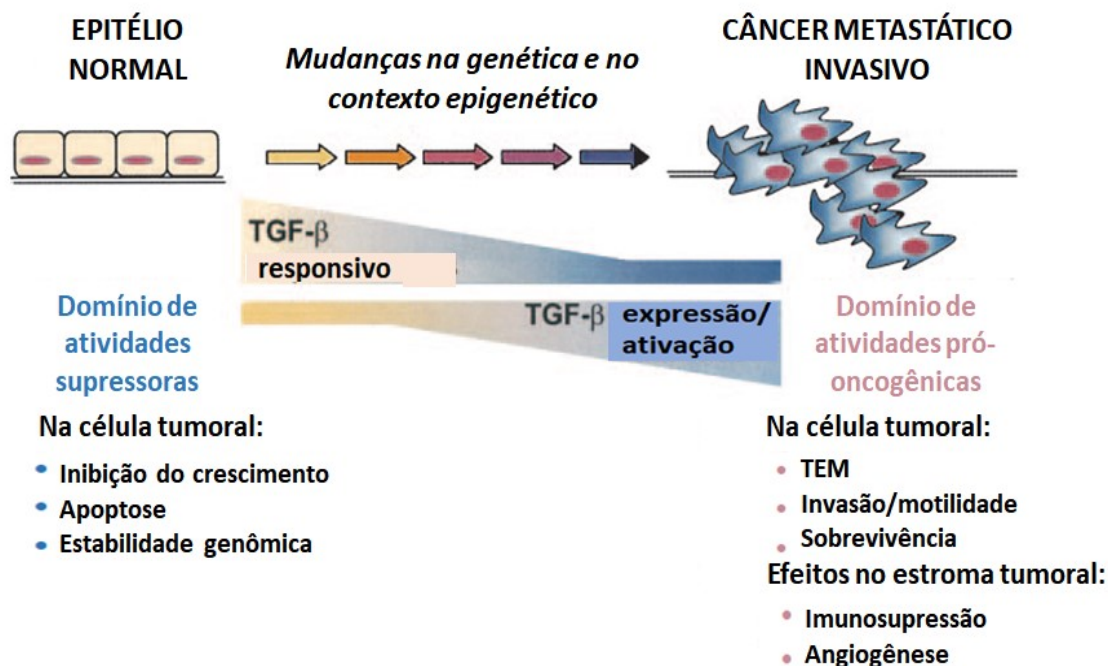
Legenda: Diversas vias de sinalização celulares intrínsecas cooperam para induzir a expressão de fatores de transcrição indutores TEM (ZEB, *SNAIL* e *TWIST*) que atuam pleiotropicamente para induzir a transição para o estado de célula mesenquimal ou parcialmente mesenquimal. A via canônica da WNT é ativada após a ligação de ligantes canônicos da WNT à família de receptores de membrana Frizzled. Isso leva à liberação de β-catenina da GSK3β-AXIN-APC, que então transloca para o núcleo, onde se liga aos fatores de transcrição TCF e LEF para ativar os genes que conduzem a TEM. A via NOTCH é ativada após a ligação de ligantes da família Delta-like ou Jagged ao receptor NOTCH. Essa ligação desencadeia uma série de eventos de clivagem proteolítica que culminam na liberação do domínio intracelular ativo do receptor NOTCH (NOTCH-ICD), que entra no núcleo para funcionar como coativador transcricional. A ligação das proteínas TGFβ à família de receptores TGFβ leva à fosforilação do receptor e ativação de complexos SMAD, que ativam a TEM. As proteínas SMAD também interagem com β-catenina e NOTCH-ICD (setas tracejadas), servindo como nós centrais para crosstalk entre as vias TGFβ, WNT e NOTCH. A via TGFβ também colabora com a via PI3K-AKT, que por sua vez desencadeia a ativação do complexo mTOR e do fator nuclear-κB (NF-κB), da via MAPK p38 e do eixo de sinalização RAS-RAF-MEK-ERK. As vias acima mencionadas também são desencadeadas após a ligação de fatores de crescimento aos seus receptores cognatos. Além disso, a ligação de várias citocinas aos seus receptores desencadeia a fosforilação e ativação de Janus quinases (JAKs) e transdutor e ativador de proteínas de transcrição (STATs); Os dímeros STAT ativam a transcrição de genes que codificam fatores de transcrição da TEM.

A via do TGF-β pode transduzir diretamente sinais extracelulares dos receptores transmembranares da superfície celular para o núcleo através de mediadores intracelulares, conhecidos como Smads. As proteínas Smad são funcionalmente divididas em três classes distintas: (1) o co-mediador Smads (co-

Smads), as Smad4 e Smad10; (2) as Smads reguladas por receptores (R-Smads), incluindo Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 e Smad8, cada Smad está envolvida em uma via de sinalização específica do ligante; (3) as Smads antagonistas ou inibidoras (I-Smads), incluindo a Smad6 e Smad7, que regulam negativamente essas vias, impedindo a fosforilação mediada por receptores das R-Smads ou a formação de um complexo funcional entre R-Smads e Co-Smads (MASSAGUÉ; CHEN, 2000). As 3 isoformas do TGF- β se ligam aos seus receptores TGF β R2 e TGF β R1, levando à fosforilação da SMAD2 e SMAD3, que formam um complexo com SMAD4 e migram para o núcleo, onde atuam como fatores de transcrição para regular a expressão de genes envolvidos na TEM (XU; LAMOUILLE; DERYNCK, 2009).

Todas as isoformas do TGF- β compartilham a capacidade de induzir a TEM (MIETTINEN *et al.*, 1994; PIEK *et al.*, 1999; VALCOURT *et al.*, 2005). No epitélio normal ou no início do processo da tumorigênese, a via do TGF- β tem papel importante na supressão tumoral, tentando manter a estabilidade genômica, inibição da proliferação e indução da apoptose (WAKEFIELD; SPORN, 1990; DE CAESTECKER; PIEK; ROBERTS, 2000; WAKEFIELD; ROBERTS, 2002). Entretanto, quando o tumor está estabelecido, o TGF- β passa a ter uma atividade pró-oncogênica, induzindo a TEM e consequentemente aumento da motilidade e invasão das células tumorais, além de induzir no microambiente tumoral angiogênese e imunossupressão (Figura 16) (AKHURST; DERYNCK, 2001; XU; LAMOUILLE; DERYNCK, 2009.; LAMOUILLE; DERYNCK, 2014). A via do TGF- β também pode colaborar com outras vias de sinalização como ERK, p38 MAPK, PI3K-AKT e RHOlike GTPases, que também contribuem de diversas formas para a expressão dos programas de TEM (DERYNCK; MUTHUSAMY; SAETEURN; 2014; LAMOUILLE; DERYNCK, 2014).

Figura 16 – Papel duplo do TGF- β



Fonte: Adaptado de Roberts e Wakefield, 2003.

Legenda: O TGF- β muda de supressor de tumor nos estágios pré-malignos da tumorigênese para pró oncogene nos estágios posteriores da doença, levando à metástase. A progressão para doença metastática é geralmente acompanhada por responsividade diminuída ou alterada ao TGF- β e aumento da expressão ou ativação do ligante TGF- β . Essas perturbações, juntamente com outras alterações no contexto genético ou epigenético da célula tumoral e seu ambiente estromal, combinam-se para alterar o espectro das respostas biológicas ao TGF- β .

WNT/ β -catenina

Três vias de sinalização WNT operam em resposta à ligação de 19 ligantes WNT distintos à família Frizzled de receptores de superfície celular. Essas vias incluem a via de sinalização WNT canônica, e as vias não canônicas WNT-cálcio e a via de polaridade celular planar (KLAUS *et al.*, 2008; ZHAN, RINDTORFF, BOUTROS, 2017). A via canônica WNT/ β -catenina é iniciada por uma coorte de ligantes WNT que se ligam aos receptores cognatos da família transmembrana de sete passagens Frizzled (Fz) e seu co-receptor, o receptor de lipoproteína de baixa densidade relacionado à proteína 6 (LRP6) ou seu parente próximo LRP5. A formação do complexo Wnt-Fz-LRP6, juntamente com o recrutamento da proteína de ancoramento Disheveled (Dvl), resulta na fosforilação e ativação de LRP6 e no recrutamento do complexo Axin para os receptores. Esses eventos levam à inibição da fosforilação de β -catenina mediada por axina e, assim, à estabilização da β -

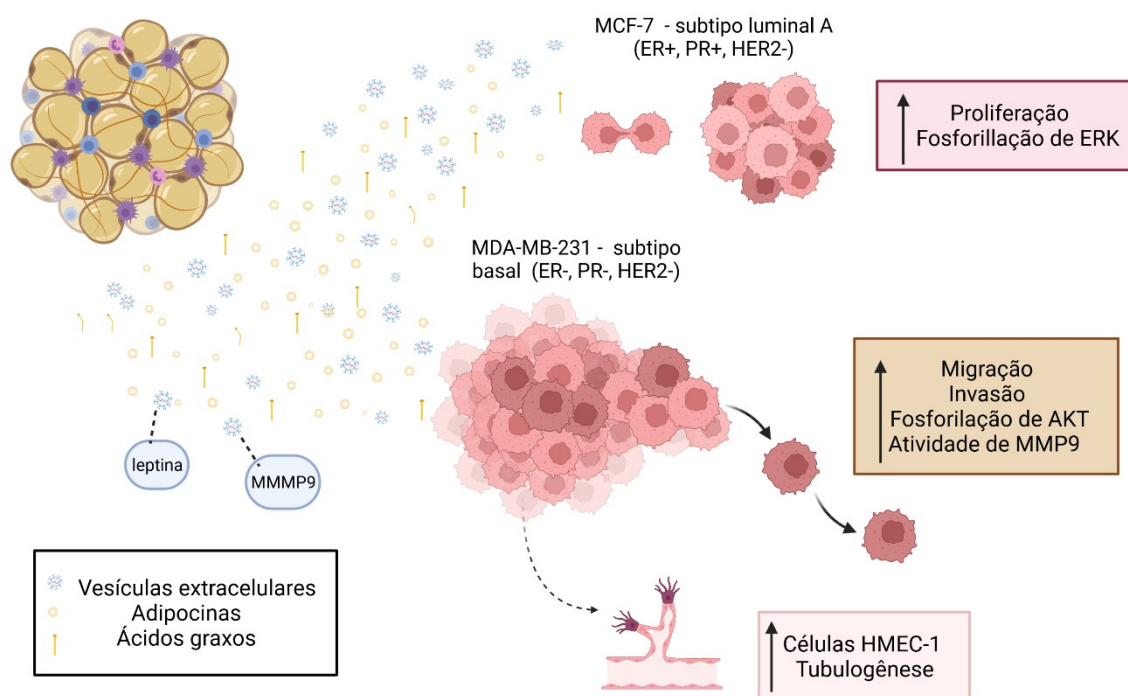
catenina, que se acumula e viaja para o núcleo para formar complexos com o fator de células T/fator potencializador linfóide (TCF/LEF) e ativa a expressão do gene alvo WNT (HUANG *et al.*, 2008).

Na ausência de Wnt, a proteína β -catenina citoplasmática é constantemente degradada pela ação do complexo Axin, que é composto pela proteína de ancoramento Axin, o produto do gene supressor tumoral da polipose adenomatosa coli (APC), caseína quinase 1 (CK1) e glicogênio sintase quinase 3 (GSK3). CK1 e GSK3 fosforilam sequencialmente a região amino-terminal de β -catenina, resultando no reconhecimento de β -catenina por β -Trcp, uma subunidade E3 ubiquitina ligase, e subsequente ubiquitinação de β -catenina e degradação proteassomal (He *et al.*, 2004). Essa eliminação contínua de β -catenina impede que a β -catenina atinja o núcleo, e os genes-alvo Wnt são, assim, reprimidos pelo TCF/LEF (HUANG *et al.*, 2008).

Contextualização

Recentemente, demonstramos que tanto o MC quanto a fração de VEs liberados pelo TA de pacientes obesos aumentaram o potencial proliferativo das células tumorais de mama MCF-7 (luminal A) via MAPK/ERK, e potencializaram as propriedades migratórias e invasivas das células MDA-MB-231 (basal, triplo negativa), via PI3K/Akt. Também detectamos que as VEs derivadas do TA obeso são enriquecidas em leptina e MMP-9, e ao estimularmos as células MDA-MB-231 com estas VEs observamos uma potencialização da liberação de MMP-9 pelas mesmas. Evidenciamos assim, um papel importante das VEs secretadas pelo TA obeso no microambiente tumoral (Figura 17) (RAMOS-ANDRADE *et al.*, 2020). É cada vez mais estudado o papel da obesidade na progressão de diferentes tipos de câncer, como o de mama, entretanto o papel das VEs nesse diálogo ainda não é muito bem elucidado, sendo necessário investigar o conteúdo presente nas VEs e como eles podem aumentar a malignidade de células tumorais de mama. A hipótese é de que as VEs liberadas pelo TA obeso são ricas em proteínas relacionadas à progressão tumoral, as quais podem induzir a TEM de células de câncer de mama.

Figura 17 – Efeitos do secretoma do TA de pacientes sobre duas diferentes linhagens de câncer de mama



Fonte: Figura baseada no artigo de Ramos-Andrade *et al*, 2020.

Legenda: O MC e VEs do tecido adiposo de pacientes obesos aumentam a proliferação das células MCF-7 via ERK, enquanto aumentaram a migração, invasão e atividade de MMP9 nas células MDA-MB-231 via AKT. Além desses fatores, o MC do TA obeso induziu nas células MDA-MB-231 propriedades pró-angiogênicas sobre células endoteliais. Ademais, as VEs do TA obeso são ricas em leptina e MMP9.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo Geral

Caracterização do secretoma (MC e VEs) dos explantes de tecido adiposo visceral (TAV) e subcutâneo (TAS) de indivíduos magros e obesos, e possíveis moléculas candidatas para o aumento da malignidade de células tumorais de mama. Além disso, pretende-se avaliar por meio de quais mecanismos ocorre o aumento da malignidade das células tumorais de mama, com foco na transição epitelial-mesenquimal (TEM).

1.2 Objetivos específicos

1.2.1 Caracterização do secretoma (MC e VEs) do tecido adiposo

- a) Análise do perfil do MC liberado pelo TA de indivíduos magros e obesos a fim de avaliar o perfil de ácidos graxos;
- b) Análise do painel de adipocinas presentes no MC liberado pelo TA de indivíduos magros e obesos
- c) Análise do tamanho e concentração das VEs liberadas pelo TA de pacientes magros e obesos.
- d) Análise do painel de proteínas presentes nas VEs liberadas pelo TA de pacientes magros e obesos.

1.2.2 Avaliação da indução da transição epitelial-mesenquimal nas células

- a) Avaliação do potencial migratório das células MCF-7 estimuladas com o MC ou VEs liberadas pelo TA;

- b) Análise do efeito do estímulo das células MCF-7 e MDA-MB-231 com o MC ou VEs liberadas pelo TA sobre marcadores celulares envolvidos na TEM (E-caderina, claudina-1, vimentina);
- c) Análise do efeito do estímulo das células MCF-7 e MDA-MB-231 com as as VEs liberadas pelo TA sobre os fatores de transcrição envolvidos na TEM.
- d) Análise da via de sinalização do TGF- β /SMAD
- e) Análise da via de sinalização da Wnt/ β -catenina nas células MCF-7 estimuladas com o MC ou VEs liberadas pelo TA;

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Linhagens celulares

As linhagens celulares de adenocarcinoma mamário MCF-7 (luminal A) e MDA-MB-231 (basal) 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, CA, EUA. O meio foi suplementado com 3,7 g/L de NaHCO_3 (Merck), 5,2 g/L de HEPES (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 60 mg/L de penicilina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 100 mg/L de estreptomicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e com 10% SFB (Cultilab, Campinas, SP, BR), em pH 7,2. As culturas foram mantidas a 37°C em uma atmosfera com 5% de CO_2 , 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, MO, USA) (5mM), a qual desfaz as ligações adesivas dependentes de cátions (Ca^{+2} e Mg^{+2}), facilitando a atuação da tripsina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) na soltura das células da garrafa. Depois de soltas, as células foram centrifugadas a 400 x g, (20°C, por 10 minutos) (Beckman GS-15R Centrifuge, Indianapolis, IN, USA). 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 Pacientes

Os pacientes participantes deste estudo foram atendidos no Hospital Federal de Ipanema (HFI) ou no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF), pertencente à Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UFRJ). Para o grupo controle foram selecionados pacientes com o IMC $20 \geq 24,9$ e sem comorbidades; para o grupo obeso foram selecionados pacientes com o IMC ≤ 30 que não apresentassem síndrome metabólica ou diabetes. O estudo foi realizado com o consentimento assinado de todos os pacientes e aprovado pelos comitês de ética do Hospital Universitário Pedro Ernesto (CAAAE 36880914.0.0000.5259) e Hospital e Hospital Federal de Ipanema (CAAE 03769618.3.0000.5646), com a participação de 35 pacientes.

2.5 Obtenção do meio condicionado (MC) liberado pelo TA branco

Os fragmentos de tecido adiposo subcutâneo (TAS) de indivíduos magros foram obtidos a partir de pacientes que foram submetidos à cirurgia plástica (mamoplastia redutora ou abdominoplastia). Como não era possível acessar os fragmentos de tecido adiposo visceral (TAV) dos indivíduos magros durante a cirurgia plástica, tais fragmentos foram obtidos durante colecistectomia. Já os fragmentos de TAS e TAV de pacientes obesos foram obtidos durante a cirurgia bariátrica. Resumidamente, menos de 2 horas após a cirurgia, os fragmentos de TA foram lavados e limpos com solução salina tamponada com fosfato (PBS), em

seguida, os explantes de TA foram incubados em meio 199 (M199) contendo 1% de SFB, sempre na proporção de 1 mL para cada 100 mg de TA, a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, os sobrenadantes de cultura (MC) foram centrifugados a 350 x g, durante 10 min, a 4°C, para a remoção de debris celulares, sendo armazenados a -80°C, para posteriores análises (RENOVATO-MARTINS *et al.*, 2017).

2.6 Isolamento das vesículas extracelulares

As VEs foram isoladas a partir do MC oriundo do TAS ou TAV de indivíduos eutróficos e obesos. Inicialmente, as amostras foram centrifugadas a 2000 x g, durante 10 minutos, a 4°C, para a remoção de restos celulares (Eppendorf 5415R, Hamburgo, GER). Este protocolo de isolamento é para a obtenção das micropartículas, que são as vesículas maiores. Em seguida, o sobrenadante obtido foi centrifugado novamente, a 20.000 x g, por 70 minutos, a 4°C (Beckman GS-15R Centrifuge, Indianapolism, IN, EUA). O *pellet* obtido após a última centrifugação foi ressuspensionado em M199, sem vermelho de fenol, suplementado com 1% de SFB (mantendo-se, exatamente, o mesmo volume de meio que havia antes da centrifugação). As amostras contendo as VEs foram armazenadas a -4°C para posteriores análises (RENOVATO-MARTINS *et al.*, 2017).

2.7 Análise de distribuição das VEs

Após o isolamento das VEs, as amostras foram submetidas no aparelho Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Panalytical, WORCS, UK), que apresenta o Laser HeNe. Esta técnica consiste no espalhamento dinâmico de Luz, também chamada de Espectroscopia de Correlação de Fótons (PCS), é amplamente utilizada para a avaliação das dimensões de partículas em suspensão. Quando uma partícula é iluminada pelo laser, ela irá espalhar luz em todas as direções. A técnica de DLS consiste na análise das flutuações de intensidade da luz espalhada em um determinado ângulo.

2.8 Cromatografia gasosa – espectrometria de massas (GC-MS)

O conteúdo de ácidos graxos de cadeia longa presentes no MC foi analisado utilizando o GC-MS, como descrito anteriormente por Christie, (CHRISTIE, 1989). Cada amostra lipídica foi dissolvida em 1 ml de tolueno e foram adicionados 2 ml de ácido sulfúrico a 1% em metanol. A mistura foi deixada *overnight* em um tubo rolhado a 50 ° C, em seguida, foi adicionado 1 ml de NaCl (cloreto de sódio) a 5% e os ésteres necessários foram extraídos duas vezes com 2 ml de hexano, o qual foi removido numa corrente de nitrogênio. Os ésteres metílicos de ácidos graxos secos (FAME) foram ressuspensos em 100 µl de heptano. Os FAME foram ressuspensos em 100 µl de heptano. As análises de GC/MS foram carreadas em um sistema Shimadzu GCMS-QP2010 Plus, usando um HP Ultra 2 (5% de fenilmetilpolisiloxano), Agilent (25 m × 0,20 mm × 0,33 µm). O injetor foi ajustado a 250°C sem divisão. A temperatura da coluna foi programada de 40 a 160°C a 30°C/min, 160-233°C a 1°C/min, 233-300°C a 3°C/min e mantida a 300°C por 10 min. O hélio foi utilizado como gás de arraste com velocidade linear de 36,0 cm s⁻¹. Um volume de 2 ml de amostra foi injetado no cromatógrafo. Os componentes foram identificados comparando-se seus espectros de massa com os da biblioteca NIST05 contida no espectrômetro de massa do computador. Foram utilizados índices de retenção para confirmar a identidade dos picos no cromatograma pelo Mix Componente FAME Supelco 37 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Os ácidos graxos foram quantificados através da determinação da razão da área de pico com os padrões internos de 9:0 e 19:0.

2.9 Dosagem de adipocinas

Para avaliar o painel de adipocinas presentes no MC liberado pelo TAS e TAV dos indivíduos magros e obesos, as amostras de MC foram analisadas em triplicatas seguindo as instruções de uso do fabricante. Para a dosagem de IL-6 (limite de detecção: 13 pg/mL) e TNF-α (limite de detecção: 0,5 pg/mL) foi utilizado o *kit Human Metabolic Hormone Bead Panel* (Cat. #HMHEMAG-34K). Para a dosagem de IL-1β (limite de detecção: 0,8 pg/mL) e MCP-1 (limite de detecção: 1,9

pg/mL) foi utilizado o kit *Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel* (Cat. #HCYTOMAG-60K). Para a dosagem de TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3 (limite de detecção: 6,0; 6,6; 2,2 pg/mL; respectivamente) foi utilizado o kit *TGF- β 1,2,3 Magnetic Bead Kit* (Cat. #TGFBMAG-64K-03).

2.10 Proteômica

As amostras de VEs isoladas do TA oriundas dos indivíduos magros e obesos foram ressuspensas em 200 μ L de um tampão de extração (uréia 7m, tiourea 2m, DTT 30mM, TEAB 50mM, sódio deoxicolato 1%, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 10mM, EDTA 10mM). Cada amostra foi submetida ao homogeneizador ultrassônico. Neste estudo, utilizamos uma abordagem de *bottom-up* sem gel. Para isso, 300 μ g de proteína foram ressuspensas em 45 μ L de uma solução de 7 M de ureia/2 M e reduzidas com ditioneitol 100 mM (concentração final de 10 mM) a 35°C por 1 hora sob agitação constante (500 RPM). As amostras foram então alquiladas por adição de iodoacetamida 40 mM, que foi ainda homogeneizada por 30 minutos a 35°C (500 RPM), no escuro. Ao volume final (60 μ L), foram adicionados 480 μ L de água para diluir a uréia (<1 M). As proteínas foram então hidrolisadas com 3,0 μ g de tripsina (0,1 mg/L, Promega). O processo de digestão ocorreu por 16 horas a 35°C (500 RPM), depois foi interrompido com a adição de ácido trifluoroacético (TFA) a uma concentração final de 0,1%. As amostras foram dessalinizadas e concentradas por cromatografia de fase reversa com uma coluna de resina POROS 20 R2 (*Applied Biosystems, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA*), eluída com 60% de acetonitrila/0,05% de TFA. Os peptídeos foram secos, ressuspensos em ácido fórmico a 0,1%, quantificados (kit de ensaio de proteína Qubit, *Thermo Scientific, Rockford, IL, USA*) e analisados com um sistema de cromatografia líquida *Easy1000-nano* acoplado a um espectrômetro de massa *nESI-Q-Exactive Plus* (ambos da *Thermo Scientific, Rockford, IL, USA*). Três replicatas biológicas foram analisadas duas vezes (duas replicatas técnicas). Dois microgramas de peptídeos foram analisados em duplicata técnica após 2 horas de gradiente (5% a 40% B/100 minutos; 40% a 95% B/3 minutos; 95% B/17 minutos). O solvente nanoLC A consistia em (95% H₂O/5% de acetonitrila [ACN]/0,1% de

ácido fórmico) e solvente B de (95% ACN/5% de H₂O/0,1% de ácido fórmico). O comprimento da coluna de captura foi de 3 cm com 200 µm ID (esferas de 5 µm - Reprosil Pur C18, Dr. Maish) e coluna analítica de 20 cm e 75 µm ID (esferas de 3µm - Reprosil PurC18, Dr. Maish). O *Q-Exactive Plus* no modo *FullScan-DDA MS2* usou a lista de exclusão dinâmica de 45 segundos e a tensão de pulverização a 2,7 kV. O Fullscan foi adquirido com uma resolução de 70000 a 200m/z, com intervalo de 350 a 2000, AGC de 1×10^6 e tempo de injeção de 50 milissegundos. A seleção dos 20 íons mais intensos para fragmentação de HCD usou uma energia de colisão normalizada de 30, janela de isolamento precursor de 1,2 m/z e deslocamento de 0,5, uma resolução de 17500 a 200 m/z, AGC em 5×10^5 e tempo de injeção de 100 milissegundos.

2.11 Análise pelo Software STRING

Para a análise de interações entre proteína-proteína foi utilizada a ferramenta de pesquisa STRING (<https://string-db.org/>). O STRING é uma base de dados biológica, um recurso de web, onde é possível identificar interações proteína-proteína conhecidas e previstas. A seleção de proteínas foi realizada de acordo com os dados da proteômica. Inicialmente, foi utilizado um filtro para selecionar as proteínas que estavam presentes em pelo menos duas das triplicatas técnicas. O segundo filtro, aplicado em cima do primeiro filtro, selecionou as proteínas que estavam presentes em pelo menos três de cinco replicatas biológicas. As proteínas remanescentes desses filtros que foram aplicadas no STRING.

2.12 Obtenção de extratos totais

As células MCF-7 ($1,0 \times 10^5$ células/poço) e MDA-MB-231 (6×10^4 células/poço) foram semeadas em placas de 6 poços previamente tratadas com gelatina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) na concentração de 0,2% e incubadas

a 37°C e 5% de CO₂, em meio DMEM suplementado com 10% de SFB. As células foram estimuladas ou não com o TGF-β [10 ng/mL] (Peprotech, Cranbury, NJ, USA)- controle positivo da TEM-, com o MC (20%v/v) ou com as VEs (20% v/v) oriundos do de TAS de indivíduos magros ou do TAS e TAV de indivíduos obesos. Todos os estímulos foram diluídos em DMEM suplementado com 5% de SFB, os quais foram utilizados para todos os ensaios posteriores, seguindo as mesmas condições. Ao 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; PMSF 1 mM; coquetel de inibidores (aprotininina 1 μM e leupeptina 1μM) e inibidor de tripsina (SBTI) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). A obtenção do extrato total das VEs *per se*, foi obtida através do isolamento das VEs a partir de uma quantidade inicial de 1,5 mL do MC do TAS ou TAV de cada paciente, individualmente. Após o isolamento, as VEs foram ressuspensas diretamente em 50 μL de tampão de lise RIPA. O conteúdo de proteínas do extrato total foi determinado através do método do ácido bicinconínico (BCA) (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA); após a determinação do conteúdo proteico, foram adicionados aos extratos 20% do de tampão de amostra 5x concentrado (v/v) (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.

2.13 Obtenção de extratos nucleares

As células MCF-7 (6,5 x 10⁵ células/poço) foram semeadas em placas de 6 poços e estimuladas por 24 horas como descrito anteriormente. Em seguida, os poços foram lavados com PBS 1x e as células lisadas em 900 μL do tampão A (HEPES 10 mM; KCl 10 mM; EDTA 0,1mM; EGTA 0,1 mM; DTT 1 mM, pH 7,9) e incubadas no gelo por 15 minutos; após esse tempo adicionou-se NP40 5% e as amostras foram homogeneizadas. As amostras foram então centrifugadas a 12.000 x g, por 5 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* contendo as células foi ressuspensado em 50 μL do tampão C (HEPES 20 mM; NaCl 0,4 M;

EDTA 1 mM; EGTA 1mM; DTT 1 mM), sendo incubado no gelo por 30 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas novamente, a 12.000 x g, por 10 minutos, a 4°C; posteriormente o sobrenadante foi coletado. Tanto o tampão A quanto o tampão C tiveram a adição de fluoreto de PMSF 1 mM; coquetel de inibidores (aprotininina 1 µM e leupeptina 1µM) e inibidor de tripsina (SBTI) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) no momento de uso. O conteúdo de proteínas do extrato nuclear foi determinado pelo método de BCA (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA), e após a determinação do conteúdo proteico, foram adicionados aos extratos 20% de tampão de amostra 5x concentrado (v/v) (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 3 minutos para a sua desnaturação.

2.14 Eletroforese e *western blotting*

O volume dos extratos celulares correspondentes a 20 µg de proteína foram fracionados por eletroforese em gel de poliácridamida (SDS-PAGE) desnaturante. O padrão de peso molecular correu em paralelo para estimar o peso molecular das amostras. Após 90 minutos de eletroforese a 150 V e 25 mA, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose, por 30 minutos, 25V-1.0A, no equipamento Trans-Blot® Turbo™ (Transfer System, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). A eficiência da transferência foi avaliada pela coloração da membrana com o vermelho de *Ponceau*. 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 por 2 horas, sendo incubadas *overnight* com os determinados anticorpos primários: E-caderina (rabbit - 1:1000, cat. 24E10) da *Cell Signaling*, Danvers, MA, USA; Vimentina (mouse - 1:500, cat.:v5255) da Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA; Actina (mouse - 1:1000, cat. MAB1501), pSMAD2 (rabbit - 1:1000; cat. 04-953) e SMAD2/3 (rabbit - 1:1000, cat. 07-408) são da *Millipore*, Burlington, MA, USA; Claudina-1 (mouse - 1:100, cat. sc81796) e TGF-β (rabbit - 1:500, cat. sc7892) são da Santa Cruz, Dallas, TX, USA. Após 3 lavagens de 10 minutos com o *Tween*-TBS, as membranas foram incubadas com os anticorpos secundários anti-IgG específicos conjugados à peroxidase (1:10.000) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA),

em temperatura ambiente e sob agitação, durante 2 horas. Para a detecção das bandas foi utilizado o kit de revelação por quimioluminescência (ECL) (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA). As membranas foram fotografadas utilizando-se o ChemiDoc® Imaging System (Bio-RAD, Hercules, CA, USA) e a densitometria foi analisada pelo Image Lab Software.

2.15 RT-qPCR

As células MCF-7 ($3,5 \times 10^5$ células/poço) e MDA-MB-231 ($2,5 \times 10^5$ células/poço) foram semeadas em placas de 6 poços e estimuladas por 24 horas como descrito anteriormente. O RNA total foi extraído pelo método de separação por coluna através do kit RNAeasy Mini Spin Column (Qiagen, Hilden, NRW, GR), 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, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA), que contém tampão de magnésio contendo H₂O, dNTPs, primers randômicos e a enzima transcriptase reversa. As amostras de DNA complementar foram estocadas em freezer -80°C até o momento de uso. Foram avaliados os seguintes genes: *CDH1* (cat. QT00080143), *SNAI1* (*Snail*, cat. QT00010010), *SNAI2* (*Slug*, cat. QT00044128) e *CLDN7* (cat. QT00235061). O nível da expressão do gene analisado foi normatizado em relação à β -actina (cat. QT01680476), todos os primers foram comprados da empresa Qiagen (Hilden, NRW, GR). A expressão relativa foi determinada pela análise do $2^{-\Delta\Delta C_t}$, que representa o valor da expressão do gene analisado em relação ao seu calibrador, em relação ao controle sem estímulo. 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.

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

As células MCF-7 ($2,0 \times 10^5$ células/poço) foram semeadas em placas de 24 poços até atingirem 100% de confluência. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e as células foram tratadas com mitomicina ($5\mu\text{g/mL}$) diluída em DMEM sem SFB, por 2 horas. Em seguida, com o auxílio de uma ponteira de pipeta, foi feito um risco na placa, na posição vertical, para a remoção das células e o sobrenadante foi retirado. As células foram então estimuladas, como descrito anteriormente, durante o tempo de 48 horas de ensaio. Na parte inferior da placa foi feita uma linha horizontal com caneta permanente para guiar a realização das fotos. Tais regiões (um campo acima da linha da caneta e um campo abaixo) foram fotografadas nos tempos de 0, 24 e 48 horas, em microscópio invertido (Olympus IX71, Waltham, MA, USA), no aumento de 10x. As análises do fechamento foram realizadas com auxílio do software *photoshop CS5*.

2.17 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 de Bonferroni. Para toda análise, um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. A avaliação estatística foi realizada utilizando-se o software *GraphPad Prism* versão 7.0 (*GraphPad Software*, La Jolla, CA, USA).

3 RESULTADOS

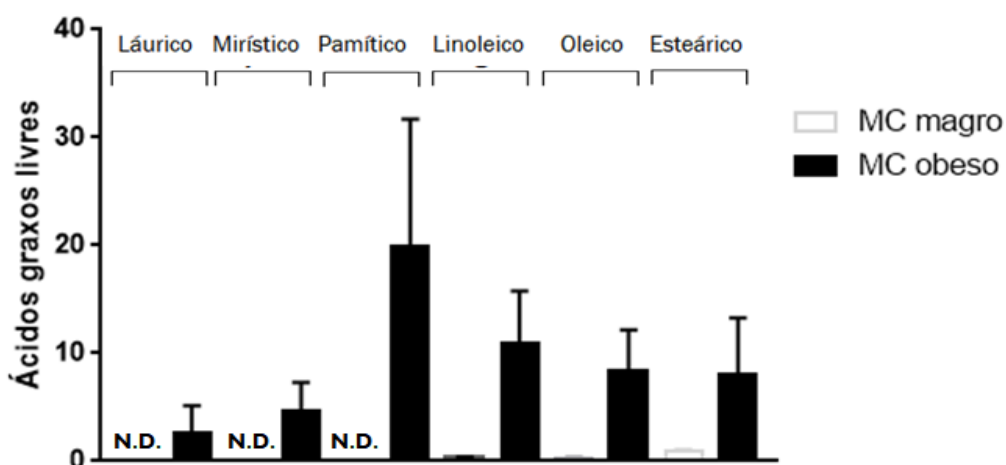
3.1 O MC proveniente do TAV de indivíduos obesos apresenta grande quantidade de ácidos graxos

Como já foi descrito na introdução, a obesidade desencadeia um quadro inflamatório no TA, além do aumento da liberação de ácidos graxos livres, VEs e disfunção metabólica; tais fatores podem atuar diretamente nas células tumorais levando ao aumento da malignidade (QUAIL; DANNENBERG, 2019; MORAES *et al.*, 2021). A partir de nossos resultados anteriores, o nosso objetivo foi caracterizar o secretoma (MC e VEs) liberado pelo TA de pacientes magros e obesos, de forma a possibilitar a compreensão sob o aumento da malignidade de células tumorais de mama.

Pacientes obesos apresentam uma maior quantidade de ácidos graxos circulantes, devido à disfunção dos adipócitos (BODEN, 2008; KUO; ANN, 2018); vale ressaltar que os mesmos apresentam um importante papel na promoção do tumor (NIEMAN *et al.*, 2011; BALABAN *et al.*, 2017; BINKER-COSEN *et al.*, 2017, KUO; ANN, 2018).

Dessa forma, caracterizamos por cromatografia gasosa o perfil de ácidos graxos de cadeia longa presentes no MC proveniente do TA de pacientes magros e obesos. Nas amostras de MC provenientes do TAS de pacientes magros foram detectados apenas os ácidos graxos oleico (monoinsaturado), linoleico (poliinsaturado) e esteárico (saturado), cujas quantidades foram inferiores às liberadas pelo TAV de indivíduos obesos (Figura 18). Além disso, observamos que o TAV de indivíduos obesos liberou níveis aumentados dos ácidos graxos insaturados linoleico, oleico e dos ácidos graxos saturados palmítico, láurico, mirístico e esteárico (Figura 19).

Figura 18 - Perfil lipídico do MC oriundo do TAS de indivíduos magros e TAV de indivíduos obesos



Fonte: A autora, 2022.

Legenda: O conteúdo de ácidos graxos de cadeia longa no MC foi analisado usando GC-MS. Os componentes foram identificados comparando seus espectros de massa com os da biblioteca NIST05 contida no espectrômetro de massa do computador. Foram utilizados índices de retenção para confirmar a identidade dos picos no cromatograma. Os ácidos graxos foram quantificados através da determinação da razão da área de pico com os padrões internos de 9:0 e 19:0. Os resultados são representativos de 3 diferentes pacientes de cada grupo.

3.2 O MC proveniente do TAV de indivíduos obesos apresenta níveis aumentados de adipocinas pró-inflamatórias

Indivíduos saudáveis apresentam um perfil de liberação de adipocinas antiinflamatórias pelo TA, as quais fazem parte da regulação da homeostase; entretanto, durante o desenvolvimento da obesidade ocorre uma mudança nesse perfil, caracterizando a liberação de adipocinas pró-inflamatórias (OUCHI *et al.*, 2011). Algumas dessas adipocinas pró-inflamatórias já foram descritas por terem uma relação com a progressão tumoral. Desta forma, avaliamos o perfil de citocinas liberadas pelos explantes de TAS e TAV, através de um ensaio de Milliplex. Comparando os explantes de TAS dos pacientes magros e obesos observamos aumento da adipocina TGF- β 1 no MC dos pacientes obesos (tabela 1A). Ao

compararmos os explantes de TAV dos pacientes magros e obesos, observamos aumento das adipocinas IL-6, TGF- β 2 e TGF- β 3 (tabela 1B).

Em seguida, avaliamos se o IMC teria alguma correlação com a liberação de tais adipocinas pelo TA. No TAS o TGF- β 1 apresentou correlação positiva com o IMC (Figura 19). Entretanto, no TAV, as adipocinas IL-6, TGF- β 2 e 3 não apresentam correlação com o IMC (Figura 20 A, B e C), respectivamente.

Tabela 1 - Análise do perfil de liberação de adipocinas dos explantes de TAS de pacientes magros e obesos

A

Adipocinas	TAS magro $\pm$ (SD)	TAS obeso $\pm$ (SD)
MCP-1 (ng/mL)	6,42 $\pm$ 1,62	7,04 $\pm$ 0,47
IL-1 β (pg/mL)	4,42 $\pm$ 2,83	4,07 $\pm$ 1,32
TNF- α (pg/mL)	0,7 $\pm$ 0,47	0,63 $\pm$ 0,23
IL-6 (ng/mL)	1,89 $\pm$ 0,99	1,94 $\pm$ 0,68
TGF- β 1 (pg/mL)	113,04 $\pm$ 16,1	188,7 $\pm$ 60,03 #
TGF- β 2 (pg/mL)	0,49 $\pm$ 0,39	0,17 $\pm$ 0,07
TGF- β 3 (pg/mL)	35,69 $\pm$ 6,38	36,01 $\pm$ 2,22

Fonte: A autora, 2022.

Legenda: As adipocinas foram dosadas no MC do TAS e TAV dos indivíduos magros e obesos seguindo as instruções de uso de acordo com o protocolo dos kits da Millipore, cada amostra foi aplicada em triplicata. Os resultados são representativos de 8 diferentes pacientes para MC TAS magro, 7 para MC TAS. O teste t de *Student* foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos. Os resultados foram representados como média $\pm$ desvio padrão (# p < 0,05).

Tabela 2 - Análise do perfil de liberação de adipocinas dos explantes de TAV de pacientes magros e obesos.

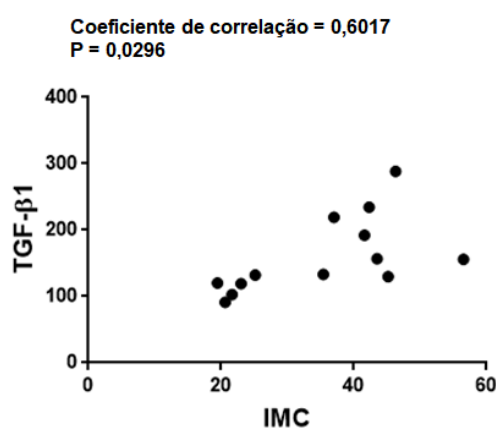
B

Adipocinas	TAV magro ± (SD)	TAV obeso ± (SD)
MCP-1 (ng/mL)	6,44 ± 1,3	6,46 ± 0,83
IL-1 β (pg/mL)	5,53 ± 1,17	5,69 ± 0,93
TNF- α (pg/mL)	0,83 ± 0,34	1,73 ± 0,89
IL-6 (ng/mL)	2,79 ± 0,29	8,35 ± 2,53 #
TGF- β 1 (pg/mL)	130,85 ± 29,5	242,1 ± 102,4
TGF- β 2 (pg/mL)	2,04 ± 0,78	4,46 ± 1,63 #
TGF- β 3 (pg/mL)	38,22 ± 7,05	72,1 ± 24,1 #

Fonte: A autora, 2022.

Legenda: As adipocinas foram dosadas no MC do TAS e TAV dos indivíduos magros e obesos seguindo as instruções de uso de acordo com o protocolo dos kits da Millipore, cada amostra foi aplicada em triplicata. Os resultados são representativos de 3 diferentes pacientes para MC TAV magro, 7 para MC TAV obeso. O teste t de *Student* foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos. Os resultados foram representados como média ± desvio padrão (# p < 0,05).

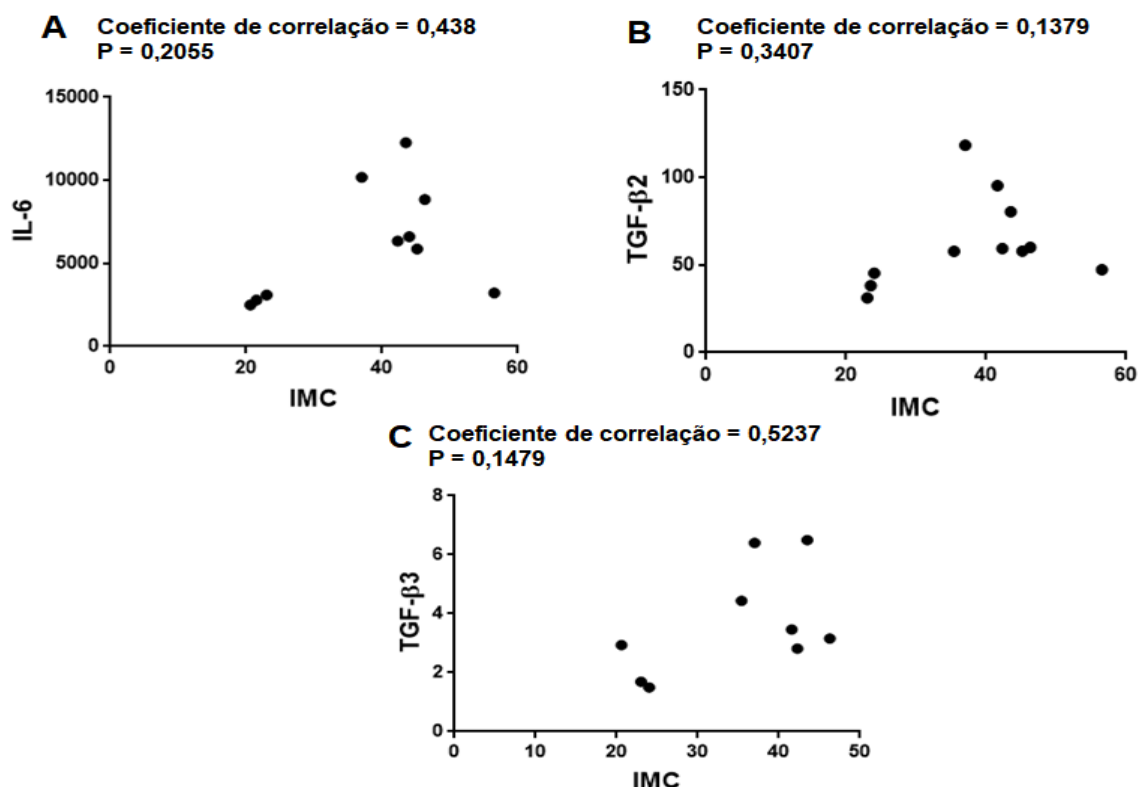
Figura 19 – Correlação entre o IMC e a adipocina TGF- β 1 no TAS



Fonte: A autora, 2022.

Legenda: Foi avaliada a correlação entre o IMC dos pacientes e a adipocina TGF- β 1 no TAS através do coeficiente de correlação de Pearson.

Figura 20 - Correlação entre o IMC e as adipocinas IL-6, TGF- β 2 e TGF-3 no TAV



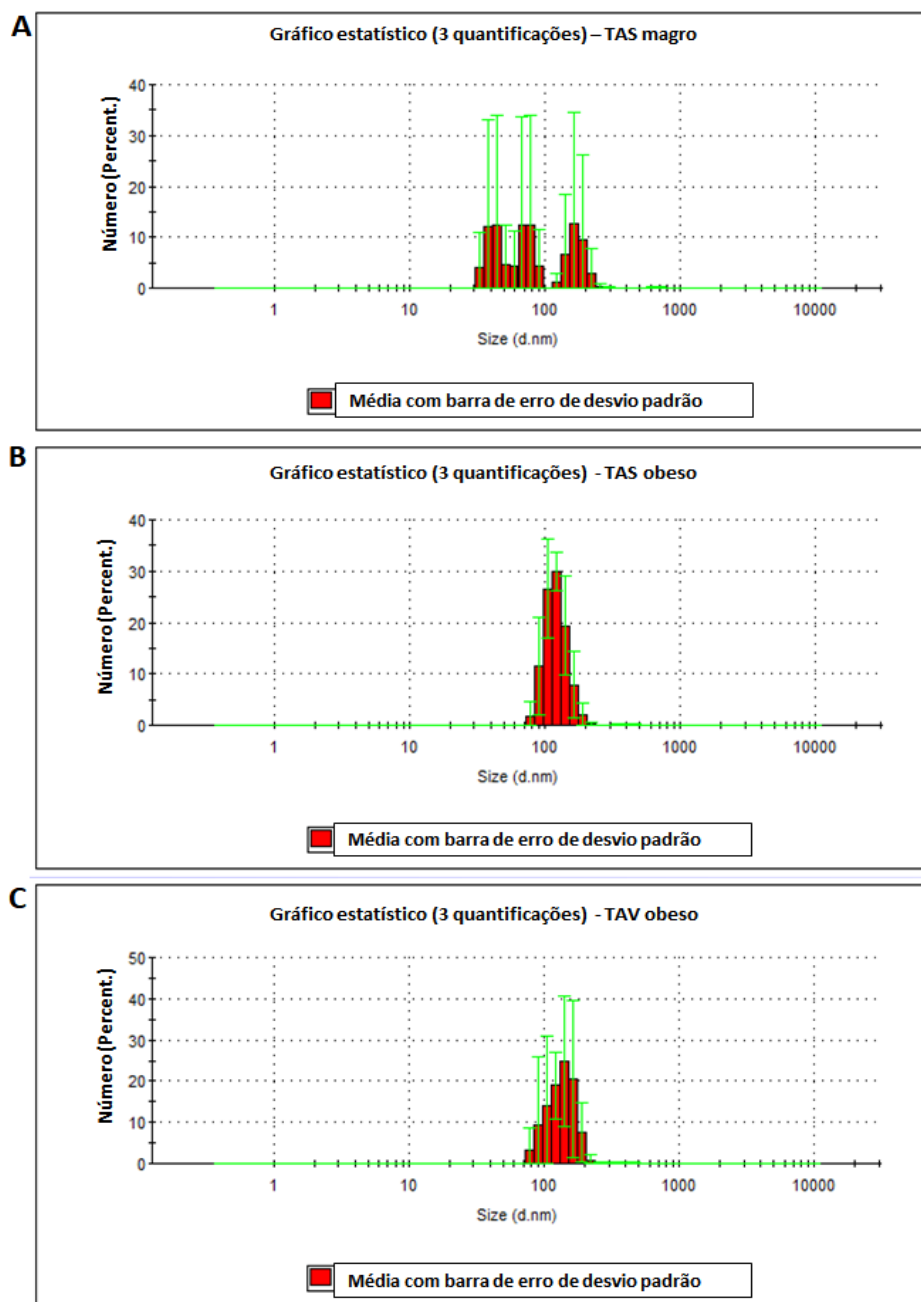
Fonte: A autora, 2022.

Legenda: Foi avaliada a correlação entre o IMC dos pacientes e a adipocina TGF- β 1 no TAS através do coeficiente de correlação de Pearson, (A) IL-6, (B) TGF- β 2, (C) TGF- β 3.

3.3 Perfil das VEs liberadas pelo TA

Uma vez que o termo VEs engloba um grande grupo de vesículas, compreendido principalmente por exossomos e MPs, as quais apresentam tamanhos diferentes, avaliamos o perfil das VEs secretadas pelo TA, através do *Zetasizer*. Observamos que tanto o TAS de indivíduos magros quanto o TAS e TAV de indivíduos obesos secretam populações de MPs, principalmente na faixa de 200 nm (Figura 21). Embora o nosso protocolo de isolamento seja para as VEs maiores, também observamos populações de exossomos, principalmente na faixa de 75 e 100 nm para os exossomos derivados do TAS magro (Figura 21 A) e na faixa de 100 nm para os exossomos derivados do TAS TAV obeso (Figura 21 B e C).

Figura 21 - Análise do tamanho e concentração das VEs liberadas pelo TA



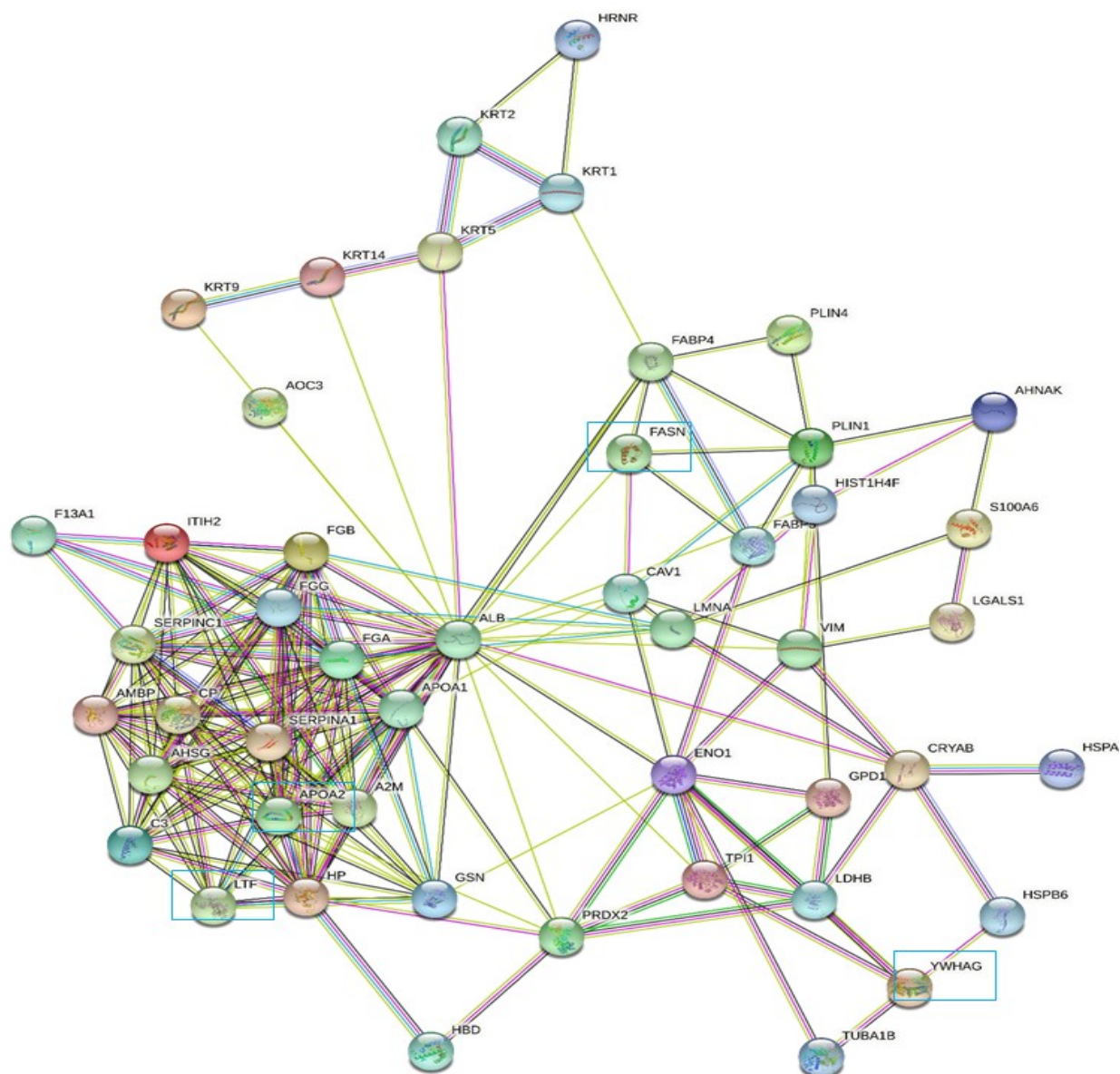
Fonte: A autora, 2022.

Legenda: As VEs isoladas a partir do MC foram ressuspensas em PBS, e submetidas ao equipamento Zetasizer para a caracterização do padrão de distribuição do tamanho e percentual das VEs. Os resultados são representativos de um pool de 3 diferentes pacientes de cada grupo.

3.4 As VEs liberadas pelo TA de indivíduos obesos apresentam carga proteica específica

Além da identificação das proteínas presentes nas VEs liberadas pelo TA, é importante avaliar como essas proteínas podem interagir entre si. Para determinar o interatoma entre as proteínas, utilizamos a ferramenta STRING. De acordo com os dados qualitativos obtidos na proteômica, as VEs do TA obeso apresentam uma maior diversidade de proteínas em comparação às VEs do TA magro, e consequentemente uma maior probabilidade de rede de interação de proteínas (Figuras 22 e 23). Além disso, muitas das proteínas presentes nas VEs do TA obeso apresentam proteínas relacionadas à progressão tumoral, que podem interagir umas com as outras, como por exemplo, as proteínas S100A4, S110A11, anexinas (ANXA) A1, A5 e A6 (WANG *et al.*, 2008; LO *et al.*, 2011; OKANO *et al.*, 2015; LECA *et al.*, 2016; SUN *et al.*, 2018).

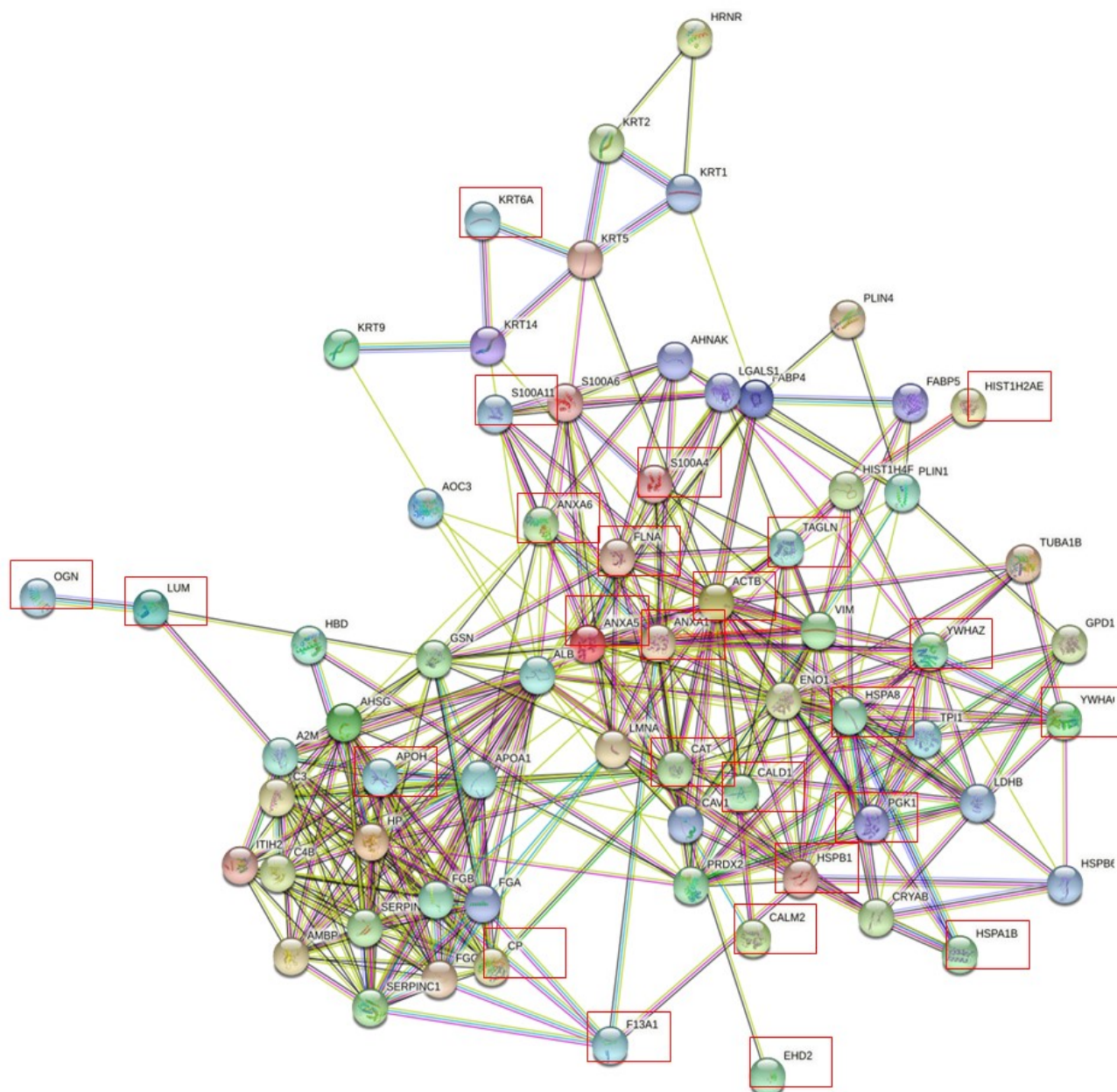
Figura 22 - Rede de interação de proteínas encontradas no proteoma qualitativo de VEs liberadas pelo TAS de indivíduos magros



Fonte: A autora, 2022.

Legenda: A rede de interação das proteínas encontradas no proteoma qualitativo foi analisada utilizando a ferramenta de pesquisa STRING, de acordo com os filtros descritos na seção de metodologia. As proteínas envolvidas em azul estão presentes apenas nas VEs do TAS dos pacientes magros.

Figura 23 - Rede de interação de proteínas encontradas no proteoma qualitativo de VEs liberadas pelo TAV de indivíduos obesos



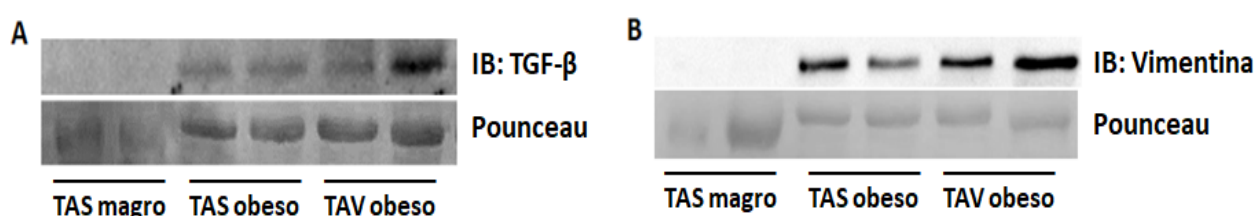
Fonte: A autora, 2022.

Legenda: A rede de interação das proteínas encontradas no proteoma qualitativo foi analisada utilizando a ferramenta de pesquisa STRING, de acordo com os filtros descritos na seção de metodologia. As proteínas envolvidas em vermelho estão presentes apenas nas VEs do TAV dos pacientes obesos.

3.5 As VEs liberadas pelo TA de indivíduos obesos apresentam aumento da expressão de TGF- β e vimentina

É sabido que as VEs têm um importante papel na progressão tumoral, como na TEM, por serem capazes de carrear inúmeras moléculas, como RNAm, miRNA, citocinas, integrinas, que podem ser internalizados pelas células e assim desencadear a TEM. (GREENING *et al.*, 2015). Demonstramos que o TAS obeso secreta níveis aumentados do TGF- β 1 e o TAV obeso níveis aumentados de TGF- β 2 e 3, com isso, avaliamos se o TGF- β poderia estar presente nas VEs. Como podemos observar na Figura 24 A, tanto as VEs liberadas pelo TAS quanto pelo TAV de indivíduos obesos apresentaram expressão de TGF- β total, o que não foi observado nas VEs liberadas pelo TAS de indivíduos magros. Além disso, observamos que as VEs liberadas pelo TAS e TAV obeso também apresentam expressão de vimentina, o que não foi observado nas VEs liberadas pelo TAS de indivíduos magros (Figura 24 B).

Figura 24 - Avaliação da expressão de TGF- β e vimentina nas VEs



Fonte: A autora, 2022.

Legenda: As VEs 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 e em seguida foi realizado o immunoblotting para detecção de (A) TGF- β e (B) vimentina. Os resultados são representativos de 4 diferentes pacientes para cada grupo.

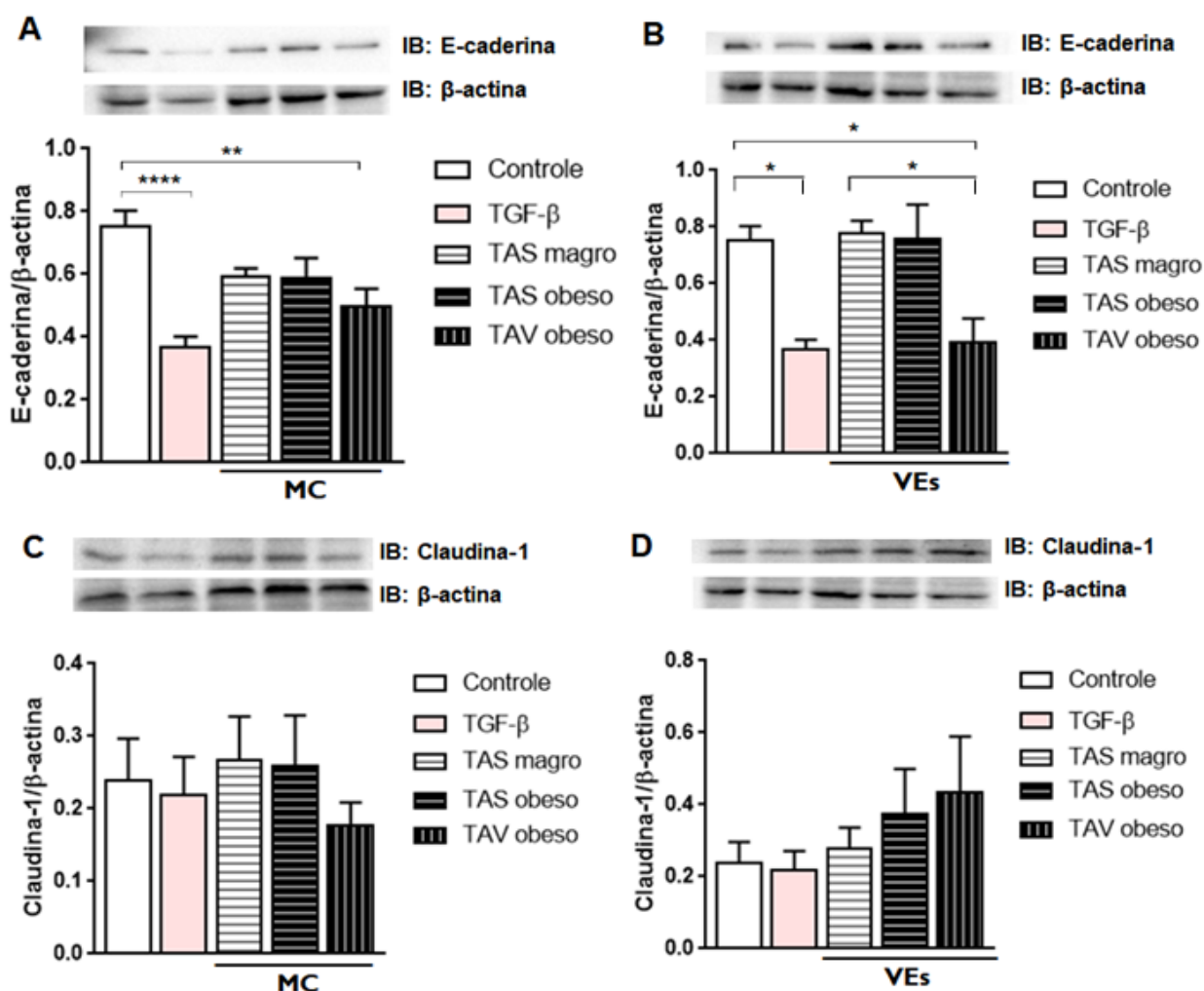
3.6 Efeito do MC e das VEs liberadas pelo TA de indivíduos obesos sobre marcadores envolvidos na transição epitelial-mesenquimal

A principal característica da TEM é a perda da morfologia epitelial e aquisição do fenótipo mesenquimal (DONGRE; WEINBERG, 2019). Para determinar se o estímulo proveniente do TA obeso induziria a TEM, avaliamos marcadores celulares relacionados a TEM. Utilizamos um grupo estimulado com o TGF- β como o controle positivo da TEM do nosso ensaio. Como esperado, nosso grupo controle diminuiu a expressão de E-caderina nas células MCF-7 (Figura 25 A), entretanto não induziu diferença na expressão de claudina-1 (Figura 26 C e D).

Observamos que o MC do TAV de indivíduos obesos induziu a diminuição dos níveis do marcador epitelial E-caderina nas células MCF-7 em comparação ao controle (sem estímulo) (Figura 25 A), enquanto as VEs do TAV obeso induziram a diminuição dos níveis de E-caderina nas células MCF-7 tanto em comparação ao controle (sem estímulo) quanto em comparação às VEs do TAS magro (Figura 26 B). O grupo de MC ou VEs do TAS obeso não induziu diferença significativa nos níveis de E-caderina (Figura 25 A e B).

A claudina é uma família de proteínas de membrana envolvidas na formação das junções de oclusão, sendo portanto considerada um marcador epitelial (FURUSE *et al.*, 2002). Entretanto, a claudina-1 tem sido descrita por realizar um papel dúbio, apresentando tanto um papel anti-tumoral quanto pró-tumoral (BHAT *et al.*, 2020). Com isto, avaliamos os níveis de claudina-1 nas células MCF-7 estimuladas com o MC ou VEs do TA. Nossos resultados não demonstraram diferença significativa nos níveis de claudina-1 entre os diferentes grupos observados, tampouco com relação ao nosso controle positivo da TEM, o TGF- β (Figura 25 C e D).

Figura 25 - Avaliação da expressão de E-caderina e Claudina-1 nas células MCF-7



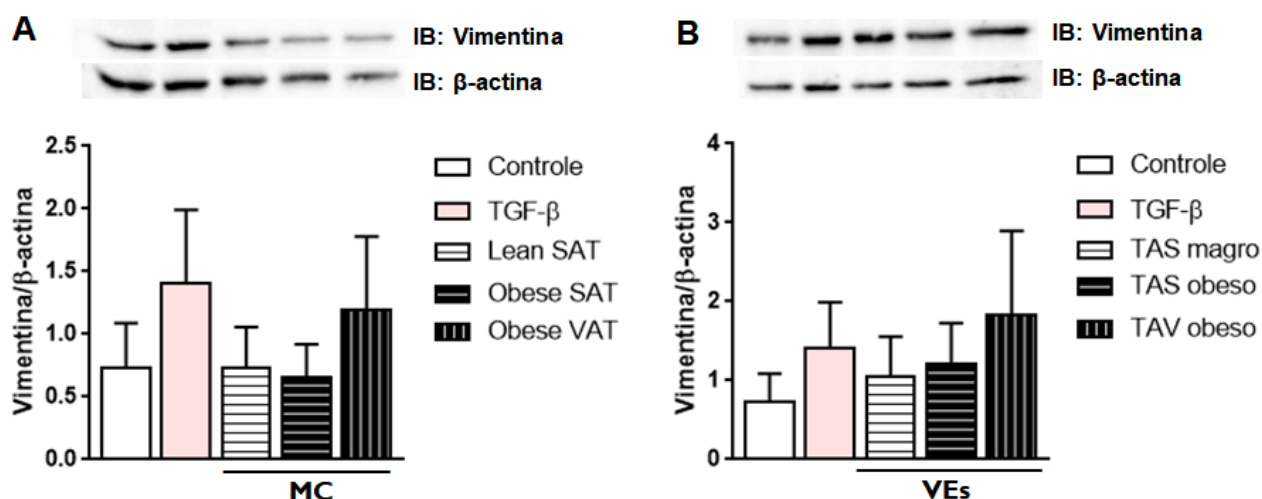
Fonte: A autora, 2022.

Legenda: As células MCF-7 foram estimuladas por 72 horas com O MC (20% v/v) ou com as VEs (20% v/v). O extrato total foi submetido ao SDS-PAGE e posterior imunoblotting para detecção dos marcadores celulares epiteliais (A e B) E-caderina, (C e D) claudina-1. Os resultados foram quantificados pelo Software Image Lab, a partir do cálculo da razão entre os níveis de E-caderina ou claudina-1 e a β-actina. Os resultados são representativos de 7 diferentes experimentos. O teste one-way- anova com pós-teste de Bonferroni foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos (*p < 0,05, **p < 0,01, ****p < 0,001). Os resultados foram representados como média ± erro padrão.

Embora as células MDA-MB-231 já apresentem um fenótipo mesenquimal e um caráter invasivo, os marcadores relacionados à transição epitelial-mesenquimal são avaliados para descrever o aumento ou diminuição da malignidade dessas células. Com isso, avaliamos os níveis de vimentina, um marcador mesenquimal, uma vez que recentemente demonstramos que tanto o MC quanto as VEs derivadas do TA obeso foram capazes de induzir tanto o aumento da migração quanto sua capacidade de invasividade (RAMOS-ANDRADE *et al.*, 2020). Na figura 26 A e B, podemos observar que não houve diferença estatística nos níveis de

vimentina nas células MDA-MB-231 estimuladas tanto pelo MC ou pelas VEs derivadas dos diferentes explantes de TA, nem no próprio grupo do controle positivo.

Figura 26 - Avaliação da expressão de vimentina nas células MDA-MB-231



Fonte: A autora, 2022.

Legenda: As células MDA-MB-231 foram estimuladas por 72 horas com O MC (20% v/v) (A) ou com as VEs (20% v/v) (B). O extrato total foi submetido ao SDS-PAGE e posterior imunoblotting para detecção do marcador mesenquimal (A e B) vimentina. Os resultados foram quantificados pelo Software Image Lab, a partir do cálculo da razão entre os níveis de vimentina e β -actina. Os resultados são representativos de 4 diferentes experimentos. O teste one-way- anova com pós-teste de Bonferroni foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos. Os resultados foram representados como média $\pm$ erro padrão.

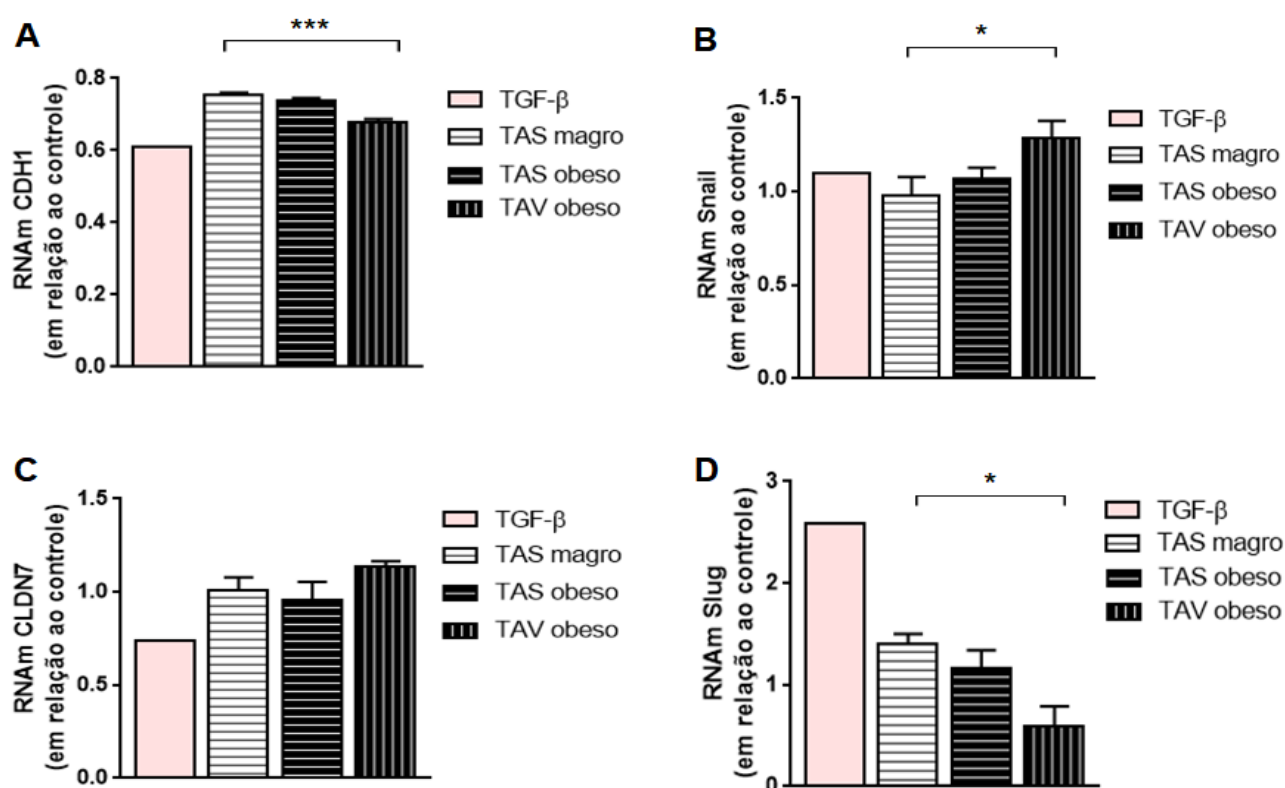
3.7 Efeito das VEs liberadas pelo TA de indivíduos obesos sobre fatores de transcrição envolvidos na transição epitelial-mesenquimal

Os fatores de transcrição têm um papel muito importante na TEM, pois eles regulam a expressão dos marcadores epiteliais e mesenquimais. Fatores de transcrição como *ZEB*, *Snail*, *Slug* e *Twist* induzem a expressão de centenas de genes associados ao estado mesenquimal e reprimem os genes associados ao estado epitelial, como por exemplo o gene *CDH1*, que codifica a E-caderina (BATTLE *et al.*, 2000; CANO *et al.*, 2000; SANCHEZ-TILLO *et al.*, 2010). Portanto, analisamos se o nosso estímulo proveniente do TA obeso regula os fatores de transcrição envolvidos na TEM.

Observamos que as VEs derivadas do TAV obeso induziram a diminuição da expressão do gene *CDH1* comparado às VES do TAS magro (Figura 27 A), corroborando o dado da diminuição da expressão de E-caderina visto anteriormente. Além disso as VEs do TAV obeso induziram o aumento da expressão de *Snail* (Figura 27 B) e diminuíram a expressão de *Slug* (Figura 27 C). Como não vimos diferença na expressão de claudina-1 anteriormente, avaliamos a expressão do RNA mensageiro para claudina-7, entretanto, não observamos diferença significativa ao compararmos os grupos.

Avaliamos também a expressão dos fatores de transcrição *Slug* e *Snail* nas células MDA-MB-231. As VEs do TA obeso não induziram diferença na expressão de *Slug* (Figura 28 A), entretanto tanto as VEs do TAS e do TAV obeso induziram aumento de *Snail* em tais células.

Figura 27 – Efeito das VEs liberadas pelo TA sobre a transcrição gênica de fatores envolvidos na transição epitelial-mesenquimal das células MCF-7

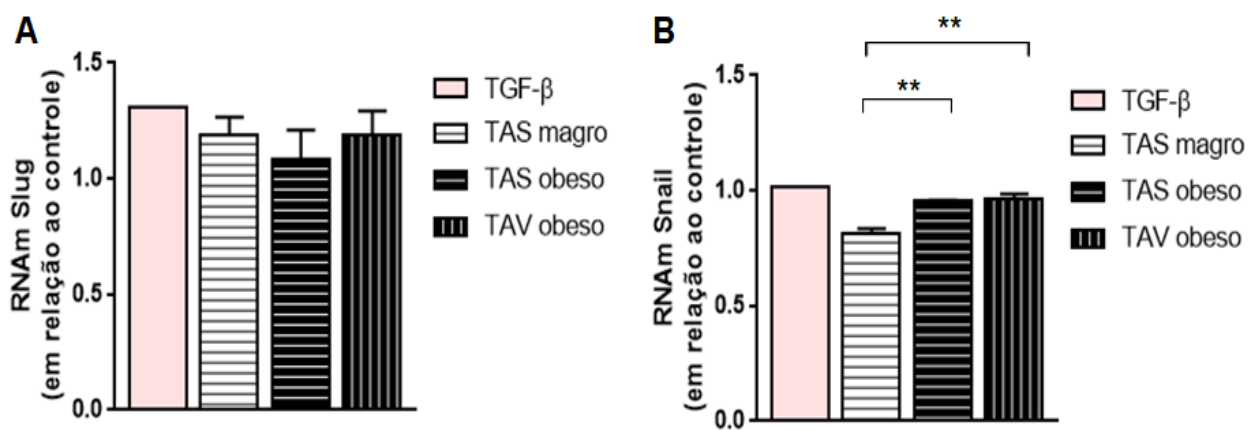


Fonte: A autora, 2022.

Legenda: As células MCF-7 foram estimuladas durante 24 horas com as VEs (20% v/v) em DMEM suplementado com 5% de SFB. Após esse tempo foi extraído o RNA das células e as amostras foram então retrotranscritas em DNA complementar (cDNA). O nível da expressão dos genes *CDH1* (A), *Snail* (B), *CLDN7* (C) e *Slug* (D) analisados foram normalizados em

relação a β -actina. A expressão relativa foi determinada pela análise do $2^{-\Delta\Delta Ct}$, que representa o valor da expressão do gene analisado em relação ao controle sem estímulo. Os resultados são representativos de um n de 6 para *Snail* e n de 3 para *CDH1*, *Snail* e *Slug*. O teste one-way- anova com pós-teste de Bonferroni foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos (* $p < 0,05$; *** $p < 0,005$). Os resultados foram representados como média $\pm$ erro padrão.

Figura 28 - Efeito das VEs liberadas pelo TA sobre os fatores de transcrição envolvidos na transição epitelial-mesenquimal das células MDA-MB-231



Fonte: A autora, 2022.

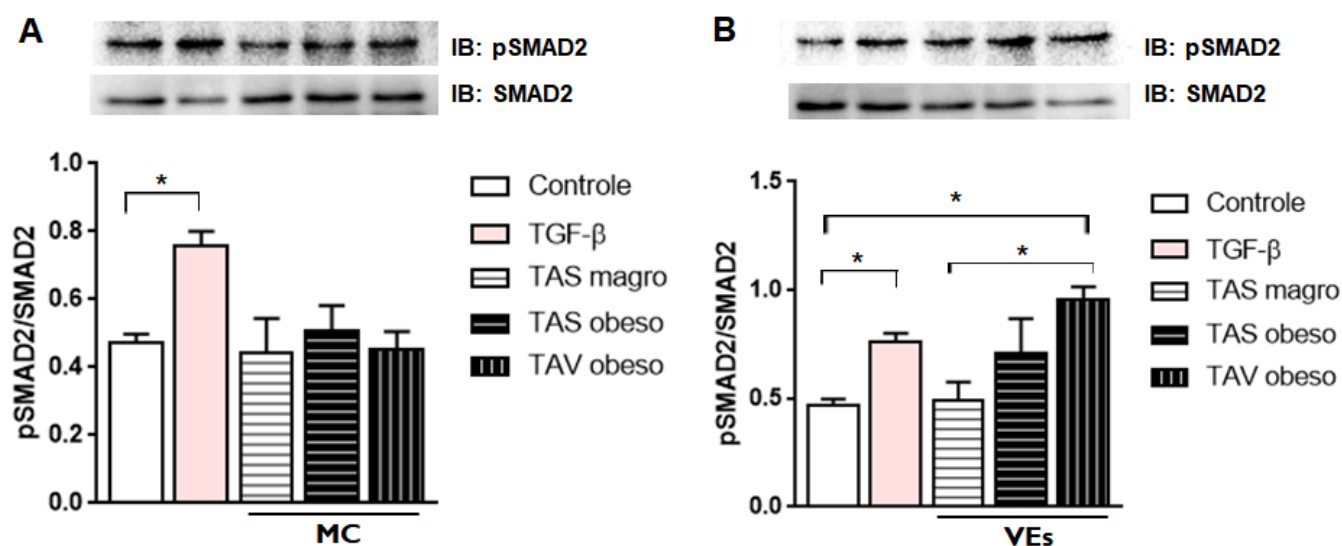
Legenda: As células MDA-MB-231 foram estimuladas durante 24 horas com as VEs (20% v/v) em DMEM suplementado com 5% de SFB. Após esse tempo foi extraído o RNA das células e as amostras foram então retrotranscritas em DNA complementar (cDNA). O nível da expressão dos genes *Slug* (A) e *Snail* (B) analisados foram normalizados em relação a β -actina. A expressão relativa foi determinada pela análise do $2^{-\Delta\Delta Ct}$, que representa o valor da expressão do gene analisado em relação ao controle sem estímulo. Os resultados são representativos de um n de 3 para *Snail* e *Slug*. O teste one-way- anova com pós-teste de Bonferroni foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos (* $p < 0,05$; *** $p < 0,005$). Os resultados foram representados como média $\pm$ erro padrão.

3.8 Avaliação de vias de sinalização envolvidas na transição epitelial-mesenquimal

A via do TGF- β /Smad é uma das principais indutoras da TEM pela regulação positiva dos fatores de transcrição relacionados a esse processo (XU; LAMOUILLE; DERYNCK, 2009). Uma vez que observamos que tanto o TAS quanto o TAV de indivíduos obesos secretam uma maior quantidade de TGF- β , o qual está presente em grandes quantidades nas VEs, avaliamos se esta via poderia estar sendo

ativada. Como podemos observar na figura 29, o MC do TAS ou TAV obeso não induziu diferença na ativação desta via entre os grupos (Figura 28 A), entretanto, as VEs do TAV obeso induziram o aumento da fosforilação da proteína SMAD2 tanto em comparação ao grupo controle (sem estímulo) quanto às VEs do TAS magro (Figura 29 B).

Figura 29 - Efeito das VEs liberadas pelo TA sobre a via de sinalização do TGF- β /SMAD nas células MCF-7

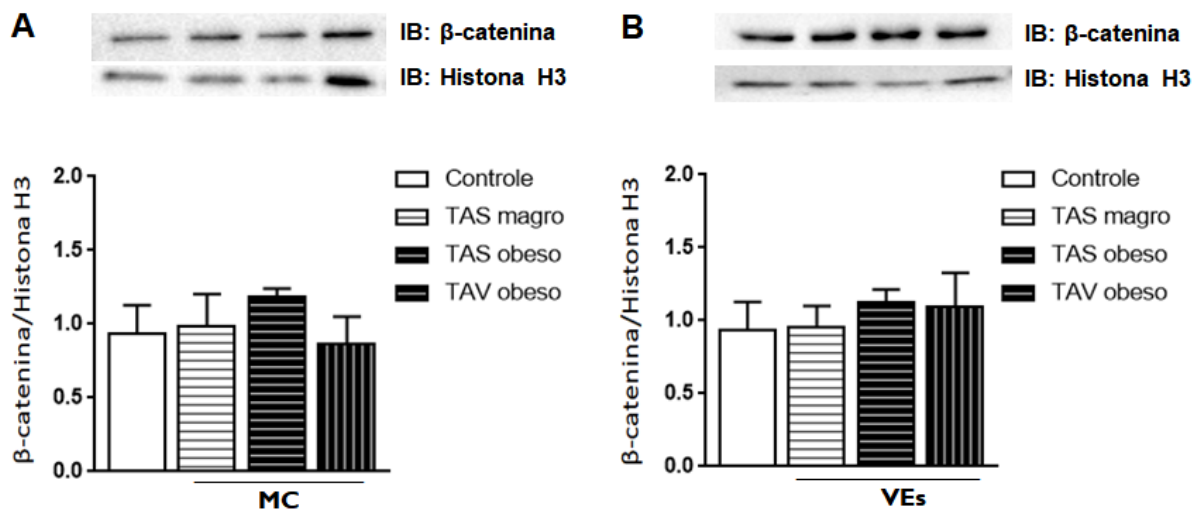


Fonte: A autora, 2022.

Legenda: As células MCF-7 foram estimuladas por 24 horas com o MC (20% v/v) (A) ou com as VEs (20% v/v) (B). O extrato total foi submetido ao SDS-PAGE e posterior imunoblotting para a detecção de pSMAD2 e SMAD2. Os resultados foram quantificados pelo Software ImageLab, a partir do cálculo da razão entre os níveis de pSMAD2 e SMAD2. Os resultados são representativos de 4 diferentes experimentos. O teste one-way- anova com pós-teste de Bonferroni foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos (*p < 0,05). Os resultados foram representados como média $\pm$ erro padrão.

A via da WNT/ β -catenina é uma outra via relacionada à TEM; quando esta via é ativada, a β -catenina não é ubiquitinada e degradada, translocando-se para o núcleo (HUANG *et al.*, 2008). Uma vez que esta via já foi descrita por estar ativada na obesidade (DAS *et al.*, 2021), avaliamos se o MC ou VEs do TA estariam influenciando na ativação dessa via. Como podemos observar, nem o MC (Figura 30 A) e nem as VEs (Figura 30 B) induziram diferença na expressão de β -catenina nuclear entre os grupos.

Figura 30 - Efeito das VEs liberadas pelo TA sobre a via de sinalização da Wnt/ β -catenina nas células MCF-7



Fonte: A autora, 2022.

Legenda: As células MCF-7 foram estimuladas por 24 horas com o MC (20% v/v) (A) ou com as VEs (20% v/v) (B). O extrato nuclear foi submetido ao SDS-PAGE e posterior imunoblotting para a detecção de β -catenina e histona H3. Os resultados foram quantificados pelo Image Lab Software, a partir do cálculo da razão entre os níveis de β -catenina e histona H3. Os resultados são representativos de 3 e 4 diferentes experimentos, respectivamente. O teste one-way- anova com pós-teste de Bonferroni foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos (* $p < 0,05$). Os resultados foram representados como média $\pm$ erro padrão.

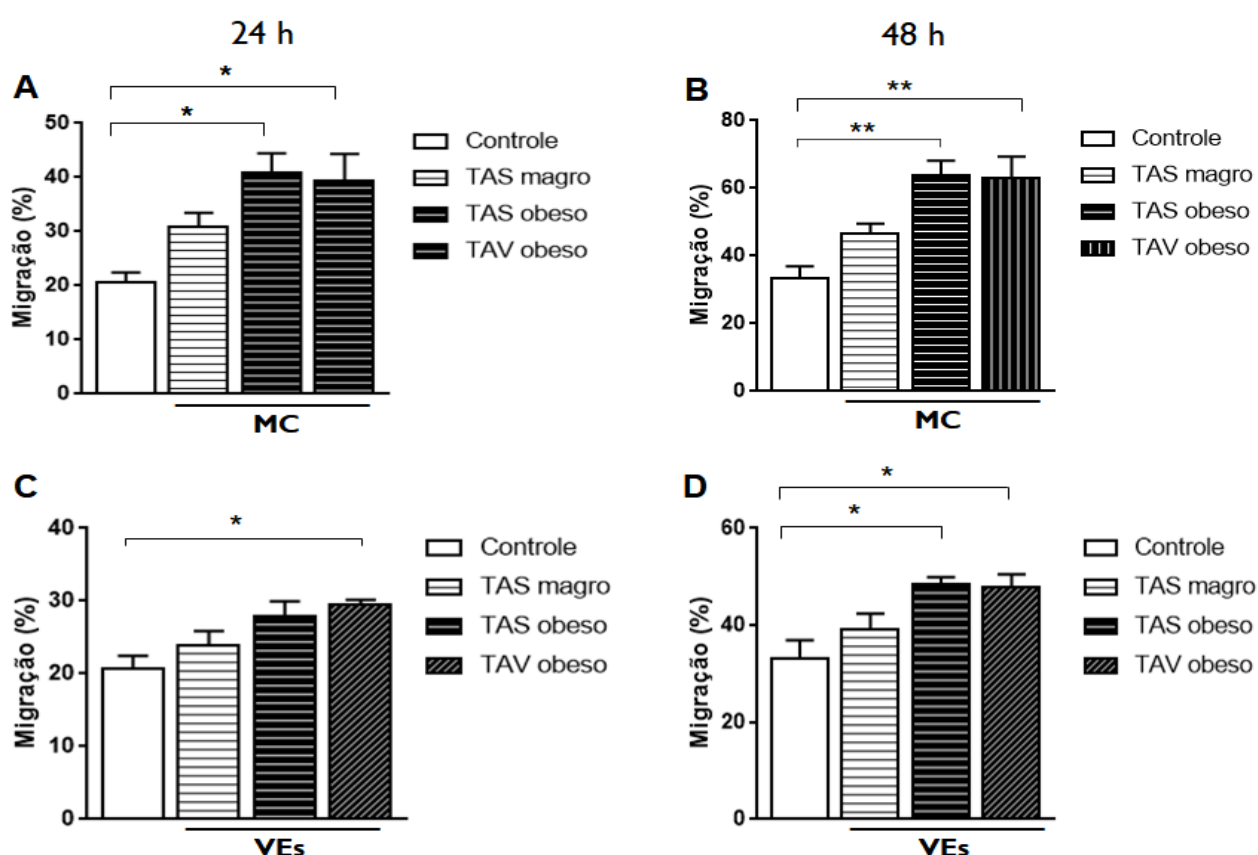
3.9 O MC e as VEs provenientes do TA de indivíduos obesos induzem aumento da migração nas células MCF-7

Em nosso trabalho anterior, mostramos que o MC e as VEs provenientes do TA derivado de indivíduos obesos aumentaram a capacidade proliferativa das células tumorais de mama MCF-7 através da via de sinalização ERK/MAPK. Já nas células MDA-MB-231, o MC e VEs do TA obeso potencializaram ainda mais as propriedades migratórias e invasivas destas células, efeitos dependentes da ativação da via PI3K/Akt (RAMOS-ANDRADE *et al.*, 2020).

A migração celular é um mecanismo muito importante utilizado pelas células tumorais para a progressão do tumor, sendo considerada um dos *hallmarks* que está diretamente relacionado a uma maior malignidade e pior prognóstico (HANAHA e WEINBERG, 2011). Nossos resultados anteriores demonstraram que o pré-tratamento das células MCF-7 com o MC ou as VEs provenientes do TA obeso, não aumentou sua capacidade migratória (dados não mostrados), como

observado nas células MDA-MB-231. Entretanto, tais estímulos durante todo o tempo de ensaio induziram o aumento da migração das células MCF-7 no tempo de 24 horas (Figura 31 A e C, respectivamente), que se manteve sustentado durante o tempo de 48 horas (Figura 31 B e D, respectivamente).

Figura 31 - Efeito do MC e VEs liberadas pelo TA obeso sobre a migração das células MCF-7



Fonte: A autora, 2022.

Legenda: Após as células MCF-7 plaqueadas terem atingido 100% da confluência elas foram tratadas por 2 horas com mitomicina (5µg/mL). Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células foram estimuladas com o MC (20%v/v) ou VEs (20% v/v) provenientes do TAS de indivíduos magros ou do TAS e TAV de indivíduos obesos, diluídos em DMEM suplementado com 5% de SFB. A migração celular foi avaliada pelo método de *Wound Healing*, no tempo de 24 e 48 horas (comparado ao tempo 0 hora). As fotos foram retiradas no microscópio invertido, em um aumento de 10x (2 fotos por campo). Os resultados são representativos de 4 diferentes pacientes para cada grupo. O teste one-way- anova com pós-teste de LSD foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos (*p < 0.05, *p<0.01). Os resultados foram representados como média ± erro padrão.

4. DISCUSSÃO

Diversos estudos têm demonstrado a estreita relação entre a obesidade e o aumento do risco de vários tipos de câncer. No câncer de mama, evidências demonstram uma forte associação entre o IMC elevado, o aumento de sua incidência (WOLIN *et al.*, 2010) e um pior prognóstico (CALLE e KAAKS, 2004; PROTANI *et al.*, 2010; FORD *et al.*, 2013). Para entender melhor esta relação entre a obesidade e o câncer de mama nosso grupo desenvolveu um modelo *in vitro* que mimetiza o contato das células tumorais de mama com as moléculas solúveis e as VEs secretadas pelo TA. Através deste modelo, demonstramos anteriormente que tanto o MC quanto a fração de VEs liberados *in vitro* pelo TA de indivíduos obesos aumentaram o potencial proliferativo das células tumorais de mama MCF-7 via MAPK/ERK, e potencializaram as propriedades migratórias e invasivas das células MDA-MB-231, via PI3K/Akt. Também detectamos que as VEs derivadas do TA obeso são enriquecidas em leptina e MMP-9, e ao estimularmos as células MDA-MB-231 com estas VEs observamos uma potencialização da liberação de MMP-9 pelas mesmas. Evidenciamos assim, um papel importante das VEs secretadas pelo TA obeso no microambiente tumoral (RAMOS-ANDRADE *et al.*, 2020).

No presente trabalho, ao realizarmos o ensaio de migração com as células MCF-7, utilizando o MC ou as VEs durante todo o tempo de migração, nós vimos aumento da capacidade de migração dessas células nos tempos de 24 e 48 horas; este dado contrasta com o nosso dado anterior, no qual o pré-tratamento com o secretoma do obeso não foi capaz de induzir o aumentando de migração das células MCF-7. Entretanto, essa condição atual de ensaio mimetiza o que acontece fisiologicamente, uma vez que o TA e seu secretoma estão em contato durante todo o tempo com as células tumorais. O aumento da atividade de ERK que observamos anteriormente nas células MCF-7 talvez também pode estar correlacionado com o aumento da migração observado.

A partir de tais achados e dos resultados anteriores, nossos objetivos no presente trabalho foram caracterizar o conteúdo liberado pelo TA branco (MC e VEs) dos pacientes, com o objetivo de identificar possíveis moléculas candidatas que estariam sustentando tais efeitos celulares e, avaliar de que forma o conteúdo

liberado pelo TA levou as células a adquirirem um caráter mais migratório, como por exemplo, na indução da TEM.

Na obesidade, devido à disfunção dos adipócitos, ocorre aumento dos níveis de ácidos graxos circulantes (BODEN, 2008), os quais têm sido correlacionados com a progressão tumoral (NIEMAN *et al.*, 2011; BALABAN *et al.*, 2017; BINKER-COSEN *et al.*, 2017). Neste trabalho demonstramos que o MC do TAV obeso apresentou grandes quantidades dos ácidos graxos saturados láurico, mirístico, esteárico e principalmente o palmítico, o qual foi o mais abundante nas nossas amostras. Essa disponibilidade de ácidos graxos também pode estar relacionada ao aumento de migração que observamos nas células.

O palmitato é o ácido graxo saturado mais comum encontrado no corpo humano (CARTA *et al.*, 2017), e o aumento da sua ingestão *in vivo* (FATIMA *et al.*, 2019), bem como adicionado a cultura de células tumorais (*in vitro*) (BINKER-COSEN *et al.*, 2017), está associado a um pior prognóstico do câncer. Em cultura de células de câncer de pâncreas, o ácido palmítico induziu o aumento da invasividade mediado pela via de sinalização TLR4/ROS/NFκB/MMP-9 (BINKER-COSEN *et al.*, 2017). O palmitato também foi descrito por induzir a proliferação de células de melanoma, *in vitro*, através da ativação da via da Akt (KWAN *et al.*, 2014). Liu e colaboradores demonstraram que o palmitato foi capaz de induzir propriedades de células-tronco em células de câncer triplo-negativas, como a MDA-MB-231, promovendo a capacidade de iniciação tumoral (LIU *et al.*, 2022). Um outro estudo mostrou que VEs liberadas por adipócitos podem carrear ácidos graxos e enzimas responsáveis pela oxidação dos ácidos graxos, os quais são transferidos para diferentes linhagens celulares de melanoma, desencadeando dessa forma o aumento da malignidade (CLEMENT *et al.*, 2020).

Ácidos graxos poliinsaturados também já foram descritos por apresentarem relação com a progressão tumoral. (AZRAD; TURGEON, 2013). Já foi demonstrado que o ácido linoleico pode induzir a proliferação e invasão em células de câncer de mama (REYES *et al.*, 2004; YONEZAWA *et al.*, 2008). Foi também demonstrado que o ácido linoleico é capaz de induzir a TEM em células epiteliais mamárias da linhagem celular MCF-10, além induzir a ativação da quinase de adesão focal (FAK), o NFκB e a liberação de MMP-2 e MMP-9 (ESPINOSA-NEIRA *et al.*, 2011). Os ácidos graxos também podem apresentar ação antitumoral, Perez e colaboradores já demonstraram que o ácido gama-linolênico induziu a morte de

células tumorais de uma linhagem humana de fribrossarcoma (PEREZ *et al.*, 2020). Além disso, Hardy e colaboradores demonstraram que o palmitato induziu a morte celular na linhagem tumoral de mama MDA-MB-231 (HARDY *et al.*, 2003), ressaltando o papel dúbio que os ácidos graxos podem exercer.

O aumento de citocinas inflamatórias liberadas pelo TA na obesidade é bem descrito na literatura, bem como seu papel na progressão tumoral (QUAIL; DANNENBERG, 2019). Embora considerados morfológica e funcionalmente diferentes, já foi relatado que os depósitos de TAS e TAV em indivíduos magros secretam níveis similares de TNF- α (WALKER *et al.*, 2007; ZHA *et al.*, 2009), IL-6 (ANTUNES *et al.*, 2006) e não mostraram diferenças na expressão de IL-1 β , IL-8, TNF- α e MIP1- α (SAMARAS *et al.*, 2010). Apesar de alguns trabalhos mostrarem a similaridade de citocinas pró-inflamatórias entre os dois depósitos, nossos resultados demonstraram um perfil menos inflamatório do TAS. Comparando o TAS de indivíduos obesos com o de indivíduos magros, nós observamos o aumento de TGF- β 1, que apresentou correlação positiva com o IMC. Enquanto ao comparar os explantes de TAV, observamos aumento de IL-6 e TGF- β 2 e 3 liberados pelo TAV obeso, os quais não apresentaram relação com o IMC.

O aumento de TGF- β 1 liberado pelo TA de pacientes obesos corrobora dados da literatura (ALESSI *et al.*, 2000; FAIN; TICHANSKY; MADAN, 2005); concentrações séricas elevadas de TGF- β 2 também foram encontradas em camundongos obesos em comparação com camundongos magros (ZHANG *et al.*, 2021). Com relação ao TGF- β 3, não há dados na literatura relatando o aumento de TGF- β 2 e 3 durante a obesidade. Além disso, também detectamos a presença de TGF- β nas VEs do TAS e do TAV de indivíduos obesos; Camino e seu grupo também observaram o aumento de TGF- β nas VEs liberadas pelo TAV obeso (CAMINO *et al.*, 2022).

É descrito na literatura que as três isoformas do TGF- β são capazes de induzir a TEM em diferentes tipos celulares (MIETTINEN *et al.*, 1994; PIEK *et al.*, 1999; VALCOURT *et al.*, 2005). A super-expressão de TGF- β 2 foi descrita por estar associada à TEM, a um pior prognóstico do câncer gástrico (YANG *et al.*, 2020) e outros tipos de câncer (CUI *et al.*, 2014; JIANG *et al.*, 2020). O TGF- β também pode colabora com outras vias de sinalização, como a ERK, p38 MAPK, PI3K/AKT e RHOlike GTPases (DERYNCK; MUTHUSAMY; SAETEURN; 2014; LAMOUILLE; DERYNCK, 2014). Walker e colaboradores demonstraram que a expressão de

TGF- β 3 em células tumorais de próstata foi capaz de aumentar a migração e a invasividade de forma mais potente do que o TGF- β 1, através da via da PI3K/Akt (WALKER *et al.*, 2013). A ativação das vias da PI3K/AKT nas células MDA-MB-231 e da ERK nas células MCF-7, observadas no nosso trabalho anterior (RAMOS-ANDRADE *et al.*, 2020), pode estar relacionada ao aumento de TGF- β que identificamos no presente trabalho. Além disso, essas vias também podem estar relacionadas aos fatores relacionados a TEM observados.

Tem sido reportado que VEs liberadas por diferentes linhagens de células tumorais são capazes de carrear TGF- β ; Goulet e colaboradores demonstraram que exossomos derivados de linhagens celulares de carcinoma de bexiga apresentam um conteúdo rico em TGF- β , capaz de induzir a diferenciação de fibroblastos saudáveis em fibroblastos associados ao tumor (CAFs), por meio da ativação da via de sinalização do TGF- β /SMAD (GOULET *et al.*, 2018). Além disso, estes autores demonstraram que a maior parte do TGF- β presente no sobrenadante das células tumorais estava presente dentro dos exossomos. Já foi descrito também, que exossomos derivados de CAFs de ovário apresentam uma super-expressão de TGF β -1, os quais podem ser capturados por células de câncer de ovário, induzindo a TEM através da ativação da via da SMAD (LI *et al.*, 2017).

As isoformas do TGF- β também estão envolvidas em outras funções biológicas na vida adulta. O TGF- β 2 pode ser liberado pelo TA de camundongos em resposta a prática de exercícios, melhorando a tolerância à glucose e regulando o metabolismo de ácidos graxos (TAKAHASHI *et al.*, 2019). Petrus e colaboradores demonstraram, *in vivo* e *in vitro*, que o TGF- β 3 está envolvido na expansão hiperplásica do TAS, mediada por efeitos nas células precursoras dos adipócitos; além disso, já foi demonstrado que o ganho de peso em camundongos foi acompanhado por um aumento de TGF- β 3 no TAS, e que mesmo após a perda de peso esse aumento foi irreversível, contribuindo para manter o número de adipócitos (PETRUS *et al.*, 2018).

Para que as células adquiram um caráter migratório é necessário que elas diminuam a expressão das proteínas presentes nas junções celulares, diminuindo o contato célula-célula e permitindo a migração (DONGRE; WEINBERG, 2019). A perda de E-caderina é considerada um evento marcante da TEM, que inicia uma série de eventos de sinalização e reorganização do citoesqueleto (LLORENS *et al.*, 1998). No presente trabalho, observamos que tanto o MC quanto as VEs do TAV

obeso induziram diminuição de E-caderina nas células MCF-7 em comparação ao controle (sem estímulo). Apesar de ser uma proteína de junção celular, a claudina-1 (CLDN1) é descrita por ter um papel pró e antitumoral (BHAT *et al.*, 2020). Já foi demonstrado que a CLDN1 é expressa em vários tipos de cânceres humanos (DHAWAN *et al.*, 2005, BLANCHARD *et al.*, 2009, SUH *et al.*, 2013). Em cânceres de mama, a expressão de CLDN1 foi significativamente associada ao subtipo basal de câncer de mama (BLANCHARD *et al.*, 2009). Outras evidências demonstraram que a CLDN1 induz a TEM, aumentando a malignidade no câncer de cólon (DHAWAN *et al.*, 2005) e no de fígado (SUH *et al.*, 2011). Entretanto, não observamos diferença na expressão de claudina-1 entre os grupos estudados.

Um dos mecanismos que pode estar regulando a diminuição da E-caderina nas células MCF-7 estimuladas com as VEs do TA obeso pode ser a ativação da via do TGF- β /SMAD, uma vez que há o aumento de TGF- β tanto no MC quanto nas VEs. Diversos mecanismos podem ter envolvimento com o aumento do TGF- β que observamos no MC e nas VEs liberadas pelo TA de indivíduos obesos, um deles pode ser através do aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs). Jain e colaboradores demonstraram que as EROs mitocondriais induziram TGF- β em fibroblastos de pulmão humano (JAIN *et al.*, 2013). Outros autores demonstraram que o aumento na produção de EROs induziu a ativação da MAPK e aumentou a expressão de precursores do TGF- β e a secreção de TGF- β 1 por queratinócitos humanos normais, que por sua vez também levam a ativação de MAPK, desencadeando a TEM nesses queratinócitos (FUKAWA *et al.*, 2012). Um outro fator que poderia estar aumentando os níveis de TGF- β no TA de indivíduos obesos é a MMP-9, uma vez que já foi demonstrado que esta enzima é capaz de ativar as 3 isoformas do TGF- β latente (YU; STAMENKOVIC, 2000). Demonstramos anteriormente que as VEs secretadas pelo TA de indivíduos obesos são enriquecidas em MMP-9, e que a estimulação das células MDA-MB-231 com essas VEs também secretaram MMP-9 bioativa (RAMOS-ANDRADE *et al.*, 2020). As integrinas, que são proteínas de adesão presentes na membrana celular, responsáveis por mediar comunicação entre a matriz extracelular e o citoplasma, também podem levar à ativação do TGF- β latente (WIPFF, HINZ, 2008). No caso do câncer, onde, normalmente, ocorre o aumento da expressão de integrinas nas células tumorais (MOSCHOS, KIRKWOOD, *et al.*, 2007), as mesmas poderiam

exacerbar a ação do TGF- β que está sendo liberado em alta quantidade pelo TA dos indivíduos obesos.

A via de sinalização do TGF- β é muito bem descrita por induzir a expressão de fatores transcricionais relacionados ao estado mesenquimal (como *Snail*, *Slug*, *Zeb* e *Twist*) e reprimir do estado epitelial (*CDH1*) (BATTLE *et al.*, 2000; CANO *et al.*, 2000; SANCHEZ-TILLO *et al.*, 2010). Nossos resultados demonstram que as VEs do TA obeso levaram a diminuição de *CDH1* nas células MCF-7, o gene responsável pela codificação da E-caderina, corroborando nosso dado de diminuição da expressão proteica de E-caderina, além de aumentar a expressão de *Snail*, responsável por inibir a ação de *CDH1*. Embora o *Slug* seja um fator de transcrição que está aumentando na transcrição, atuando de forma conjunta ao *Snail* e outros fatores para reprimir o estado epitelial, nós observamos a diminuição desse fator de transcrição. Embora este dado contraste com os dados presentes na literatura, a expressão diminuída de *SLUG* já foi associada a uma sobrevida global mais curta no câncer endometrial (SUPERNAT *et al.*, 2013). Uma possibilidade é que a diminuição de *Slug* possa ser uma tentativa de tentar reprimir a ação de *Snail*. Nas células MDA-MB-231 estimuladas com as VEs do TA obeso também observamos aumento de *Snail*; possivelmente, as VEs do TA obeso induzam o aumento de *Snail* por mecanismos diferentes, uma vez que as células MCF-7 e MDA-MB-231 apresentam subtipos diferentes e respondem de maneiras diferentes frente a determinados estímulos. Yang e colaboradores demonstraram que *Snail* aumenta a capacidade da FAO através da diminuição de malonil-CoA, que é um inibidor endógeno da carnitina palmitoil transferase-1 (CPT1), permitindo dessa forma uma maior oxidação de ácidos graxos por células de câncer de mama (YANG *et al.*, 2020).

Embora o MC do TAV obeso tenha induzido a diminuição de E-caderina, não observamos aumento na fosforilação de SMAD2 induzido pelo MC, entretanto observamos um papel das VEs sobre a fosforilação de SMAD2. Vale ressaltar, que a diminuição da E-caderina pode estar ocorrendo por algum outro mecanismo independente da via do TGF- β , talvez por um aumento de CD36 (uma translocase de ácidos graxos), possibilitando uma maior captação de ácidos graxos. Dury e colaboradores demonstraram que no câncer colorretal o aumento de CD36 regula positivamente a expressão de MMP28, que cliva e diminui a expressão de E-caderina, em câncer colorretal (DRURY *et al.*, 2022). Já foi demonstrado também

que o CD36 foi capaz de induzir a TEM de células de hepatocarcinoma através da ativação das vias Wnt/ β -catenina e TGF- β /SMAD (NATH *et al.*, 2015).

Apesar de ver diminuição de E-caderina, não observamos o aumento de proteínas mesenquimais, talvez pela aquisição de fenótipos híbridos epiteliais/mesenquimais (E/M), que podem ser mais parecidos com “células tronco”, metastáticas e agressivas do que os estados epiteliais ou mesenquimais completos (JOLLY *et al.*, 2015; PASTUSHENKO *et al.*, 2018). As células com esse fenótipo híbridos muitas vezes são mais correlacionadas a um pior prognóstico (CHEUNG, EWALD, 2016; JIA *et al.*, 2019). Os mecanismos que permitem que as células cancerosas mantenham os fenótipos híbridos E/M ainda não são muito bem esclarecidos, mas sabe-se que um conjunto de fatores conhecidos como ‘fatores de estabilidade fenotípica’ (PSFs) podem ajudar as células a manter esse fenótipo híbrido E/M, evitando que células que ganharam plasticidade parcial sejam submetidas a uma TEM completa, permitindo a migração celular coletiva. (WATANABE *et al.*, 2014; JOLLY *et al.*, 2016 JOLLY, *et al.*, 2017; JOLLY *et al.*, 2019).

Nós também observamos que as VEs liberadas pelo TAS e TAV de indivíduos obesos apresentam alta expressão de vimentina em comparação com as VEs liberadas pelo TAS de indivíduos magros. Rahman e colaboradores demonstraram que exossomos oriundos de células tumorais de pulmão, ricos em vimentina, induziram a TEM em células normais de brônquios, aumentando sua proliferação, migração e invasão, e que ao silenciar o RNAm para a vimentina nos exossomos atenuou tais efeitos (RAHMAN *et al.*, 2016). A vimentina é capaz de se ligar com alta afinidade à superfície de células tumorais de cólon, mas não às células normais, ativando a via de sinalização da Wnt/ β -catenina, e desencadeando a TEM (SATELLI *et al.*, 2016). A vimentina, assim como o TGF- β , também pode ativar integrinas (BIANCHI, GERVASI, MEGAN, 2010; MORI *et al.*, 2015; DMELLO *et al.*, 2016; KIM *et al.*, 2016), aumentando a agressividade através da inibição da apoptose, aumento da proliferação, indução do remodelamento da matriz extracelular, angiogênese e a TEM (MOSCHOS, KIRKWOOD, *et al.*, 2007; BIANCHI, GERVASI, MEGAN, 2010).

Ao comparar a carga proteica presente nas VEs secretadas pelo TAS de indivíduos magros e o TAV de indivíduos obesos através de análise proteômica. Observamos que algumas proteínas que apresentaram conteúdo aumentado nas

VEs liberadas pelo TAV de indivíduos obesos apresentam relação com a progressão tumoral, como por exemplo proteínas da família S100A, uma superfamília de proteínas ligantes de cálcio S100. Sabe-se que possuem envolvimento em diversas doenças inflamatórias e, no câncer, estando implicadas em funções celulares como angiogênese, diferenciação, celular, apoptose, motilidade, invasão e na TEM (LO *et al.*, 2011; KLINGELHOFER; GRIGORIAN, 2019); além de estarem associada a um pior prognóstico do câncer de mama (ISMAIL *et al.*, 2016). Com relação à proteína S100A4, por exemplo, a mesma pode ser induzida pelo TGF- β , desencadeando a TEM em células tumorais gástricas (LI *et al.*, 2018). O TNF- α é outra adipocina altamente secretada pelo TA que também pode induzir a expressão de S100A4, contribuindo para a TEM e progressão do colangiocarcinoma (TECHASEN *et al.*, 2014). A proteína S100 também já foi demonstrada estar superexpressa em amostras tumorais de pacientes com câncer colorretal e apresentar correlação com a progressão do câncer (WANG *et al.*, 2008); bem como a progressão do câncer colorretal através da ativação da via do TGF- β /SMAD (NIU *et al.*, 2016).

Outra família de proteínas presentes nas VEs do TA obeso é a anexina (ANXA), tais proteínas se ligam à membrana fosfolipídica e são dependentes de cálcio (LAOHAVISIT *et al.*, 2011). Detectamos a presença de ANXA1, ANXA5 e ANXA6, que também são descritas por apresentarem relação com o aumento de malignidade (OKANO *et al.*, 2015; LECA *et al.*, 2016; SUN *et al.*, 2018). Além das VEs do TA obeso apresentarem uma maior diversidade de proteínas relacionadas à progressão tumoral nas VEs do TA obeso, essas proteínas também podem interagir entre si, como por exemplo, as proteínas anexina 1 e caldesmon; já foi demonstrado que a interação entre essas proteínas está associada à resistência ao tamoxifeno em pacientes com câncer de mama (DE MARCHI *et al.*, 2016). A interação de proteínas relacionadas à progressão tumoral podem potencializar ainda mais a malignidade do câncer. As VEs liberadas pelo TA de indivíduos obesos, além de apresentarem aumento de proteínas relacionadas ao estabelecimento da TEM, e conseqüentemente da progressão tumoral, apresentaram também a diminuição proteínas que podem atuar como supressoras tumorais. A lactotransferrina, por exemplo, foi relatada por exercer efeito antitumoral pela inibição da angiogênese em um modelo de câncer de cólon (HUI-YING *et al.*, 2017), e também como supressora no carcinoma de nasofaringe,

através da inibição de AKT por múltiplos mecanismos (DENG *et al.*, 2013). A apolipoproteína A1, principal componente da lipoproteína de alta densidade (HDL), tem ação cardioprotetora e efeito anti-tumorigênico (ZAMANIAN-DARYOUSH *et al.*, 2013). Peng e colaboradores demonstraram que um peptídeo mimético da apolipoproteína A1 exibiu um efeito terapêutico eficaz sobre a progressão do câncer de pâncreas, pela inibição macrófagos associados ao tumor, diminuindo a inflamação (PENG *et al.*, 2017).

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 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 transferir proteínas oncogênicas e ácidos nucleicos que modulam as células-alvo e desempenham papéis decisivos na tumorigênese, TEM, proliferação, migração, resistência às drogas e metástase (FRIEDL e WOLF, 2003; BIGAGLI *et al.*, 2016; KIM *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2016). La Camera e colaboradores demonstraram que VEs derivadas de adipócitos (diferenciados a partir de pré-adipócitos 3T3-L1) aumentaram a proliferação, migração e invasão de células de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231, através da indução de características atreladas à TEM e também características de células-tronco, mediadas pelo fator de transcrição HIF-1 α (LA CAMERA *et al.*, 2021). Uma vez que as VEs podem participar de cada etapa do desenvolvimento do câncer, elas são um importante alvo de estudo.

Recentemente, foi demonstrado que o TA é a principal fonte de miRNAs presentes em exossomos, os quais regulam a expressão gênica em órgãos distantes específicos, como no fígado, mediando um novo meio de comunicação intercelular por VEs, semelhantes aos mecanismos mediados por adipocinas (THOMOU *et al.*, 2017). Sendo assim, é importante determinar se a expressão de moléculas específicas na superfície dos exossomos derivados do TA poderiam estar envolvidos nesse tropismo organotrópico. Por exemplo, foi descrito que exossomos derivados de diferentes modelos de câncer em camundongos conduziram metástases específicas de órgãos durante a formação de nichos pré-metastáticos (HOSHINO *et al.*, 2015). Da mesma forma, foi demonstrado que adipócitos do TAV secretam exossomos com miRNAs específicos envolvidos na

regulação das vias do TGF- β e da Wnt/b-catenina (FERRANTE *et al.*, 2015). Os miRNAs presentes nas VEs também podem estar envolvidos na progressão do câncer mediada pela obesidade, uma vez que já foi demonstrado que o TA é uma das principais fontes de liberação de miRNA presentes em exossomos (THOMOU *et al.*, 2017); além disso, já foi demonstrado que na obesidade ocorre uma mudança no perfil dos miRNAs circulantes e na sua secreção pelo TA, em comparação a indivíduos magros (HENEGHAN *et al.*, 2011). Além disso já é bem estabelecida a participação de miRNA em diferentes tipos de câncer (REDDY *et al.*, 2015).

Neste estudo demonstramos que as VEs liberadas pelo TA de indivíduos obesos apresentam proteínas com ação pró-tumoral, como o TGF- β , vimentina, S100. Além disso, tais VEs aumentaram a migração das células MCF-7, diminuíram a expressão gênica de *CDH1* e consequentemente de E-caderina, e aumentaram a expressão de *Snail*, fatores que estão relacionadas à TEM e aumento da malignidade. Em conjunto, nossos dados demonstraram um papel primordial das VEs liberadas pelo TA, na obesidade, na modulação de células tumorais de mama. Com a caracterização do secretoma do TA de indivíduos obesos fomos capazes de selecionar possíveis moléculas envolvidas na TEM dessas células tumorais de mama. No entanto, ainda se faz necessário compreender melhor os papéis multifacetados das VEs e seu efeito na modulação do microambiente tumoral, indução da TEM e progressão do tumor, a fim de possibilitar o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para tratamentos efetivos contra o câncer.

CONCLUSÕES

Em conclusão, observamos que o TAV obeso libera uma maior quantidade de ácidos graxos, principalmente o palmitato, comparação ao TAS magro. Além disso, o TAV obeso apresentou liberação de maiores níveis de IL-6, TGF β -2 e 3, comparado ao TAV magro, enquanto o TAS obeso apresentou maiores níveis de TGF β -1, em comparação ao TAS magro, positivamente correlacionado ao IMC.

Demonstramos que as VEs do TA obeso apresentam proteínas relacionadas à progressão tumoral, como o TGF β -1, proteínas da família S100 e anexina, as quais foram capazes de induzir a diminuição de E-caderina, *CDH1*, *Slug*, e o aumento de *Snail*, nas células MCF-7, além induzirem a ativação da via do TGF β /SMAD e o aumento da migração. Nas células MDA-MB-231, observamos que as VEs do TA obeso induziram o aumento de *Snail*.

Em conjunto, nossos dados demonstraram que o TA, em condição de obesidade, secreta diversos fatores pró-tumorais, em especial por meio das VEs, as quais parecem serem capazes de induzir a TEM nas células tumorais de mama não-invasivas (MCF-7), através da diminuição de E-caderina, levando ao aumento da migração dessas células, e consequentemente, a sua malignidade.

REFERÊNCIAS

ACETO, Nicola et al. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. **Cell**, v. 158, n. 5, p. 1110-1122, 2014.

AKHURST, Rosemary J.; DERYNCK, Rik. TGF- β signaling in cancer—a double-edged sword. **Trends in cell biology**, v. 11, p. S44-S51, 2001.

ALESSI, Marie-Christine *et al.* Plasminogen activator inhibitor 1, transforming growth factor-beta1, and BMI are closely associated in human adipose tissue during morbid obesity. **Diabetes**, v. 49, n. 8, p. 1374-1380, 2000.

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.

ARNER, Peter; SPALDING, Kirsty L. Fat cell turnover in humans. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 396, n. 1, p. 101-104, 2010.

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.

ATTANÉ, Camille; MULLER, Catherine. Drilling for oil: tumor-surrounding adipocytes fueling cancer. **Trends in Cancer**, v. 6, n. 7, p. 593-604, 2020.

AZRAD, Maria; TURGEON, Chelsea Elizabeth; DEMARK-WAHNEFRIED, Wendy. Current evidence linking polyunsaturated fatty acids with cancer risk and progression. **Frontiers in oncology**, v. 3, p. 224, 2013.

BAARDSNES, Jason *et al.* T β R-II discriminates the high-and low-affinity TGF- β isoforms via two hydrogen-bonded ion pairs. **Biochemistry**, v. 48, n. 10, p. 2146-2155, 2009.

BALABAN, Seher *et al.* Adipocyte lipolysis links obesity to breast cancer growth: adipocyte-derived fatty acids drive breast cancer cell proliferation and migration. **Cancer & metabolism**, v. 5, n. 1, p. 1-14, 2017.

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.

BAO, Bin *et al.* RETRACTED: Notch-1 induces epithelial–mesenchymal transition consistent with cancer stem cell phenotype in pancreatic cancer cells. 2011.

BATLLE, Eduard *et al.* The transcription factor *Snail* is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. **Nature cell biology**, v. 2, n. 2, p. 84-89, 2000.

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.

BHAT, Ajaz A. *et al.* Claudin-1, a double-edged sword in cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 2, p. 569, 2020.

BIANCHI, Anna; GERVASI, Megan E.; BAKIN, Andrei. Role of $\beta 5$ -integrin in epithelial-mesenchymal transition in response to TGF- β . **Cell cycle**, v. 9, n. 8, p. 1647-1659, 2010.

BIERIE, Brian *et al.* Integrin- $\beta 4$ identifies cancer stem cell-enriched populations of partially mesenchymal carcinoma cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 12, p. E2337-E2346, 2017.

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.

BINKER-COSEN, Makena J. *et al.* Palmitic acid increases invasiveness of pancreatic cancer cells AsPC-1 through TLR4/ROS/NF- κ B/MMP-9 signaling pathway. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 484, n. 1, p. 152-158, 2017.

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

BLAIR, Cindy K. *et al.* Obesity and survival among a cohort of breast cancer patients is partially mediated by tumor characteristics. **NPJ Breast Cancer**, v. 5, n. 1, p. 1-7, 2019.

BLANCHARD, Anne A. *et al.* Claudins 1, 3, and 4 protein expression in ER negative breast cancer correlates with markers of the basal phenotype. **Virchows Archiv**, v. 454, n. 6, p. 647-656, 2009.

BLANCHARD, Anne. Gene expression profiling of early involuting mammary gland reveals novel genes potentially relevant to human breast cancer anne blanchard, robert shiu 2, stephanie booth 4, garrett sorensen 4, nicole decorby1, andreea nistor1, paul wong 5, etienne leygue3 and yvonne myal. **Frontiers in Bioscience**, v. 12, p. 2221-2232, 2007.

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.

BOCCI, Federico et al. Numb prevents a complete epithelial–mesenchymal transition by modulating Notch signalling. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 14, n. 136, p. 20170512, 2017.

BODEN, Guenther. Obesity and free fatty acids. **Endocrinology and metabolism clinics of North America**, v. 37, n. 3, p. 635-646, 2008.

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.

BOOTH, Andrea et al. Adipose tissue, obesity and adipokines: role in cancer promotion. **Hormone molecular biology and clinical investigation**, v. 21, n. 1, p. 57-74, 2015.

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

BRAY, Freddie *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.

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

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

CAMINO, Tamara et al. Human obese white adipose tissue sheds depot-specific extracellular vesicles and reveals candidate biomarkers for monitoring obesity and its comorbidities. **Translational Research**, v. 239, p. 85-102, 2022.

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.

cancerprogressreport.org [Internet]. Philadelphia: American Association for Cancer Research; ©2019 [cited 2020 Jul] Available from https://www.cancerprogressreport.org/Documents/AACR_CPR_2019.pdf

CANO, Amparo *et al.* The transcription factor *Snail* controls epithelial–mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. **Nature cell biology**, v. 2, n. 2, p. 76-83, 2000.

CARTA, Gianfranca et al. Palmitic acid: physiological role, metabolism and nutritional implications. **Frontiers in physiology**, v. 8, p. 902, 2017.

CARTER, Jodi M. et al. Macrophagic “crown-like structures” are associated with an increased risk of breast cancer in benign breast disease. **Cancer Prevention Research**, v. 11, n. 2, p. 113-119, 2018.

CAVALLARO, Ugo; CHRISTOFORI, Gerhard. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 2, p. 118-132, 2004.

CECCHINI, Michele; VUIK, Sabine. The heavy burden of obesity. 2019. (OECD (2019), *The Heavy Burden of Obesity: The Economics of Prevention*, OECD Health Policy Studies, OECD Publishing, Paris.

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.

CHEANG, Maggie CU et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 101, n. 10, p. 736-750, 2009.

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.

CHEUNG, Kevin J.; EWALD, Andrew J. A collective route to metastasis: Seeding by tumor cell clusters. **Science**, v. 352, n. 6282, p. 167-169, 2016.

CHRISTIANSEN, Jason J.; RAJASEKARAN, Ayyappan K. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. **Cancer research**, v. 66, n. 17, p. 8319-8326, 2006.

CHRISTIE, William W. **Gas chromatography and lipids**. Oily, 1989.

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. Pink adipocytes. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 29, n. 9, p. 651-666, 2018.

CLEMENT, E. *et al.* Adipocyte extracellular vesicles carry enzymes and fatty acids that stimulate mitochondrial metabolism and remodeling in tumor cells. **The EMBO Journal**, v. 39, n. 3, p. 1–20, 2020.

CLEMENT, Emily *et al.* Adipocyte extracellular vesicles carry enzymes and fatty acids that stimulate mitochondrial metabolism and remodeling in tumor cells. **The EMBO Journal**, v. 39, n. 3, p. e102525, 2020.

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

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.

CUI, Xian-Ping *et al.* HOXA10 promotes cell invasion and MMP-3 expression via TGF β 2-mediated activation of the p38 MAPK pathway in pancreatic cancer cells. **Digestive diseases and sciences**, v. 59, n. 7, p. 1442-1451, 2014.

DANG, Tuyen T. *et al.* Δ Np63 α promotes breast cancer cell motility through the selective activation of components of the epithelial-to-mesenchymal transition program. **Cancer research**, v. 75, n. 18, p. 3925-3935, 2015.

DAS, Bhabajyoti *et al.* The role of Wnt pathway in obesity induced inflammation and diabetes: a review. **Journal of Diabetes & Metabolic Disorders**, v. 20, n. 2, p. 1871-1882, 2021.

DE CAESTECKER, Mark P.; PIEK, Ester; ROBERTS, Anita B. Role of transforming growth factor- β signaling in cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, n. 17, p. 1388-1402, 2000.

DE CRESCENZO, Gregory *et al.* Three key residues underlie the differential affinity of the TGF β isoforms for the TGF β type II receptor. **Journal of molecular biology**, v. 355, n. 1, p. 47-62, 2006.

DE MARCHI, Tommaso *et al.* Annexin-A1 and caldesmon are associated with resistance to tamoxifen in estrogen receptor positive recurrent breast cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 3, p. 3098, 2016.

DE REZENDE, Leandro F3rnias Machado *et al.* The increasing burden of cancer attributable to high body mass index in Brazil. **Cancer Epidemiology**, v. 54, p. 63-70, 2018.

DECKERS, Martine *et al.* The tumor suppressor Smad4 is required for transforming growth factor β -induced epithelial to mesenchymal transition and bone metastasis of breast cancer cells. **Cancer research**, v. 66, n. 4, p. 2202-2209, 2006.

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.

DENG, M. *et al.* Lactotransferrin acts as a tumor suppressor in nasopharyngeal carcinoma by repressing AKT through multiple mechanisms. **Oncogene**, v. 32, n. 36, p. 4273-4283, 2013.

DERYNCK, Rik; MUTHUSAMY, Baby Periyanaayaki; SAETEURN, Koy Y. Signaling pathway cooperation in TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition. **Current opinion in cell biology**, v. 31, p. 56-66, 2014.

DERYNCK, Rik; ZHANG, Ying E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling. **Nature**, v. 425, n. 6958, p. 577-584, 2003.

DHAWAN, Punita *et al.* Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer. **The Journal of clinical investigation**, v. 115, n. 7, p. 1765-1776, 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.

DISIPIO, Tracey *et al.* Incidence of unilateral arm lymphoedema after breast cancer: a systematic review and meta-analysis. **The lancet oncology**, v. 14, n. 6, p. 500-515, 2013.

DMELLO, Crismita *et al.* Vimentin-mediated regulation of cell motility through modulation of beta4 integrin protein levels in oral tumor derived cells. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 70, p. 161-172, 2016.

DONGRE, Anushka; WEINBERG, Robert A. New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 20, n. 2, p. 69-84, 2019.

DOS ANJOS PULTZ, Brunna *et al.* The multifaceted role of extracellular vesicles in metastasis: priming the soil for seeding. **International Journal of Cancer**, v. 140, n. 11, p. 2397-2407, 2017.

DRABOVICH, Andrei P. *et al.* Quantitative analysis of energy metabolic pathways in MCF-7 breast cancer cells by selected reaction monitoring assay. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 11, n. 8, p. 422-434, 2012.

DRURY, James *et al.* Upregulation of CD36, a Fatty Acid Translocase, Promotes Colorectal Cancer Metastasis by Increasing MMP28 and Decreasing E-Cadherin Expression. **Cancers**, v. 14, n. 1, p. 252, 2022.

ESPINOSA-NEIRA, Roberto *et al.* Linoleic acid induces an EMT-like process in mammary epithelial cells MCF10A. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 43, n. 12, p. 1782-1791, 2011.

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.

FAIN, John N.; TICHANSKY, David S.; MADAN, Atul K. Transforming growth factor β 1 release by human adipose tissue is enhanced in obesity. **Metabolism**, v. 54, n. 11, p. 1546-1551, 2005.

FATIMA, Sarwat *et al.* High-fat diet feeding and palmitic acid increase CRC growth in β 2AR-dependent manner. **Cell death & disease**, v. 10, n. 10, p. 1-14, 2019.

FERLAY, J. *et al.* GLOBOCAN 2012 v1. 0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France. 2013. **globocan. iarc. fr**, 2015.

FERLAY, Jacques *et al.* Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **International journal of cancer**, v. 144, n. 8, p. 1941-1953, 2019.

FERNANDO, Romaine I. *et al.* IL-8 signaling plays a critical role in the epithelial–mesenchymal transition of human carcinoma cells. **Cancer research**, v. 71, n. 15, p. 5296-5306, 2011.

FERRANTE, Sarah C. *et al.* Adipocyte-derived exosomal miRNAs: a novel mechanism for obesity-related disease. **Pediatric research**, v. 77, n. 3, p. 447-454, 2015.

FISCHER, John P. et al. Impact of obesity on outcomes in breast reconstruction: analysis of 15,937 patients from the ACS-NSQIP datasets. **Journal of the American College of Surgeons**, v. 217, n. 4, p. 656-664, 2013.

FLEMYNG, Malcolm. **A discourse on the nature, causes and cure of Corpulency. Illustrated by a remarkable case.** 1760.

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.

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.

FORMAN, Michele R.; MAHABIR, Somdat. Saturated fatty acids and cancer. In: **Bioactive Compounds and Cancer**. Humana Press, Totowa, NJ, 2010. p. 213-233.

FRAME, Margaret C.; INMAN, Gareth J. NCAM is at the heart of reciprocal regulation of E-cadherin-and integrin-mediated adhesions via signaling modulation. **Developmental cell**, v. 15, n. 4, p. 494-496, 2008.

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

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

FRIGOLET, María E.; GUTIÉRREZ-AGUILAR, Ruth. The colors of adipose tissue. **Gaceta Medica de Mexico**, v. 156, n. 2, p. 142-149, 2020.

FUKAWA, Teruhisa et al. Reactive oxygen species stimulates epithelial mesenchymal transition in normal human epidermal keratinocytes via TGF-beta secretion. **Experimental cell research**, v. 318, n. 15, p. 1926-1932, 2012

FURUSE, Mikio et al. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. **The Journal of cell biology**, v. 156, n. 6, p. 1099-1111, 2002.

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

GARROD, David; CHIDGEY, Martyn. Desmosome structure, composition and function. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1778, n. 3, p. 572-587, 2008.

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.

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

GOPAL, Shashi K. *et al.* Extracellular vesicles: their role in cancer biology and epithelial–mesenchymal transition. **Biochemical Journal**, v. 474, n. 1, p. 21-45, 2017.

GOULET, Cassandra Ringuette *et al.* Exosomes induce fibroblast differentiation into cancer-associated fibroblasts through TGF β signaling. **Molecular Cancer Research**, v. 16, n. 7, p. 1196-1204, 2018.

GRANDE, M. Teresa *et al.* *Snail1*-induced partial epithelial-to-mesenchymal transition drives renal fibrosis in mice and can be targeted to reverse established disease. **Nature medicine**, v. 21, n. 9, p. 989-997, 2015.

GREENING, David W. *et al.* Emerging roles of exosomes during epithelial–mesenchymal transition and cancer progression. In: **Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press, 2015. p. 60-71.

GRIGGS, Jennifer J. *et al.* Effect of patient socioeconomic status and body mass index on the quality of breast cancer adjuvant chemotherapy. **Journal of clinical oncology**, v. 25, n. 3, p. 277-284, 2007.

GRIGGS, Jennifer J. *et al.* Racial disparity in the dose and dose intensity of breast cancer adjuvant chemotherapy. **Breast cancer research and treatment**, v. 81, n. 1, p. 21-31, 2003.

GRIGGS, Jennifer J.; SORBERO, Melony ES; LYMAN, Gary H. Undertreatment of obese women receiving breast cancer chemotherapy. **Archives of internal medicine**, v. 165, n. 11, p. 1267-1273, 2005.

GROSSE-WILDE, Anne *et al.* Stemness of the hybrid epithelial/mesenchymal state in breast cancer and its association with poor survival. **PloS one**, v. 10, n. 5, p. e0126522, 2015.

GRÜNERT, Stefan; JECHLINGER, Martin; BEUG, Hartmut. Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 4, n. 8, p. 657-665, 2003.

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. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31-46, 2022.

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.

HARBECK, Nadia et al. Breast cancer. **Nature reviews Disease primers**, v. 5, n. 1, p. 1-31, 2019.

HARDY, Serge et al. Saturated fatty acid-induced apoptosis in mda-mb-231 breast cancer cells a role for cardiolipin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 34, p. 31861-31870, 2003.

HARMS, Matthew; SEALE, Patrick. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. **Nature medicine**, v. 19, n. 10, p. 1252-1263, 2013.

HARTWIG, Sonja et al. Exosomal proteins constitute an essential part of the human adipose tissue secretome. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1867, n. 12, p. 140172, 2019.

HASLAM, David. Obesity: a medical history. **Obesity reviews**, v. 8, p. 31-36, 2007.

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.

HENEGHAN, H. M. *et al.* Differential miRNA expression in omental adipose tissue and in the circulation of obese patients identifies novel metabolic biomarkers. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 96, n. 5, p. E846-E850, 2011.

HINCK, Andrew P. Structure-guided engineering of TGF- β s for the development of novel inhibitors and probing mechanism. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 26, n. 19, p. 5239-5246, 2018.

HINCK, Andrew P.; MUELLER, Thomas D.; SPRINGER, Timothy A. Structural biology and evolution of the TGF- β family. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 8, n. 12, p. a022103, 2016.

HONG, Tian et al. An *Ovol2-Zeb1* mutual inhibitory circuit governs bidirectional and multi-step transition between epithelial and mesenchymal states. **PLoS computational biology**, v. 11, n. 11, p. e1004569, 2015.

HOPKINS, B. D.; GONCALVES, M. D.; CANTLEY, L. C. Obesity and cancer mechanisms: Cancer metabolism. **Journal of Clinical Oncology**, v. 34, n. 35, p. 4277-4283, 2016.

HOSHINO, Ayuko *et al.* Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. **Nature**, v. 527, n. 7578, p. 329-335, 2015.

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

<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/julho/25/vigitel-brasil-2018.pdf>

HU, Jiamiao; CHRISTIAN, Mark. Hormonal factors in the control of the browning of white adipose tissue. **Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation**, v. 31, n. 1, 2017.

HUANG, He; HE, Xi. Wnt/ β -catenin signaling: new (and old) players and new insights. **Current opinion in cell biology**, v. 20, n. 2, p. 119-125, 2008.

HUBER, Margit A.; KRAUT, Norbert; BEUG, Hartmut. Molecular requirements for epithelial–mesenchymal transition during tumor progression. **Current opinion in cell biology**, v. 17, n. 5, p. 548-558, 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.

IMAMICHI, Yukiko; MENKE, Andre. Signaling pathways involved in collagen-induced disruption of the E-cadherin complex during epithelial-mesenchymal transition. **Cells Tissues Organs**, v. 185, n. 1-3, p. 180-190, 2007.

ISLAMI, Farhad *et al.* Proportion and number of cancer cases and deaths attributable to potentially modifiable risk factors in the United States. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 1, p. 31-54, 2018.

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

IYENGAR, Neil M. *et al.* Systemic correlates of white adipose tissue inflammation in early-stage breast cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 22, n. 9, p. 2283-2289, 2016.

JAIN, Manu *et al.* Mitochondrial reactive oxygen species regulate transforming growth factor- β signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 2, p. 770-777, 2013.

JIA, Dongya *et al.* Quantifying cancer epithelial-mesenchymal plasticity and its association with stemness and immune response. **Journal of clinical medicine**, v. 8, n. 5, p. 725, 2019.

JIANG, Xiao-ming *et al.* TGF β 2-mediated epithelial–mesenchymal transition and NF- κ B pathway activation contribute to osimertinib resistance. **Acta Pharmacologica Sinica**, p. 1-9, 2020.

JOLLY, Mohit Kumar et al. Hybrid epithelial/mesenchymal phenotypes promote metastasis and therapy resistance across carcinomas. **Pharmacology & therapeutics**, v. 194, p. 161-184, 2019.

JOLLY, Mohit Kumar et al. Implications of the hybrid epithelial/mesenchymal phenotype in metastasis. **Frontiers in oncology**, v. 5, p. 155, 2015.

JOLLY, Mohit Kumar et al. Inflammatory breast cancer: a model for investigating cluster-based dissemination. **NPJ Breast Cancer**, v. 3, n. 1, p. 1-8, 2017.

JOLLY, Mohit Kumar et al. Stability of the hybrid epithelial/mesenchymal phenotype. **Oncotarget**, v. 7, n. 19, p. 27067, 2016.

JOOSSE, Simon A.; GORGES, Tobias M.; PANTEL, Klaus. Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. **EMBO molecular medicine**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2015.

JUNG, Eun-Jung *et al.* Galectin-1 expression in cancer-associated stromal cells correlates tumor invasiveness and tumor progression in breast cancer. **International journal of cancer**, v. 120, n. 11, p. 2331-2338, 2007.

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.

KALLURI, Raghu *et al.* The basics of epithelial-mesenchymal transition. **The Journal of clinical investigation**, v. 119, n. 6, p. 1420-1428, 2009.

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.

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.

KIM, Jiyeon *et al.* Vimentin filament controls integrin α 5 β 1-mediated cell adhesion by binding to integrin through its Ser38 residue. **Febs Letters**, v. 590, n. 20, p. 3517-3525, 2016.

KLAUS, Alexandra; BIRCHMEIER, Walter. Wnt signalling and its impact on development and cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, n. 5, p. 387-398, 2008.

KNIJFF-DUTMER, E. A. J. et al. Elevated levels of platelet microparticles are associated with disease activity in rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology**, v. 46, n. 6, p. 1498-1503, 2002.

KORU-SENGUL, Tulay et al. Breast cancers from black women exhibit higher numbers of immunosuppressive macrophages with proliferative activity and of crown-like structures associated with lower survival compared to non-black Latinas and Caucasians. **Breast cancer research and treatment**, v. 158, n. 1, p. 113-126, 2016.

KREBS, Angela M. et al. The EMT-activator Zeb1 is a key factor for cell plasticity and promotes metastasis in pancreatic cancer. **Nature cell biology**, v. 19, n. 5, p. 518-529, 2017.

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.

KUO, Ching-Ying; ANN, David K. When fats commit crimes: fatty acid metabolism, cancer stemness and therapeutic resistance. **Cancer Communications**, v. 38, n. 1, p. 47, 2018.

KWAN, Hiu Yee et al. Subcutaneous adipocytes promote melanoma cell growth by activating the Akt signaling pathway role of palmitic acid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 44, p. 30525-30537, 2014.

LA CAMERA, Giusi et al. Adipocyte-derived extracellular vesicles promote breast cancer cell malignancy through HIF-1 α activity. **Cancer Letters**, v. 521, p. 155-168, 2021.

LAOHAVISIT, Anuphon; DAVIES, Julia M. Annexins. **Coding and Decoding of Calcium Signals in Plants**, p. 111-128, 2011.

LAMOUILLE, Samy; XU, Jian; DERYNCK, Rik. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 15, n. 3, p. 178-196, 2014.

LARSON, Michael C. et al. Phosphatidylethanolamine is externalized at the surface of microparticles. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1821, n. 12, p. 1501-1507, 2012.

LAZAR, Ikrame et al. Adipocyte exosomes promote melanoma aggressiveness through fatty acid oxidation: a novel mechanism linking obesity and cancer. **Cancer research**, v. 76, n. 14, p. 4051-4057, 2016.

LECA, Julie et al. Cancer-associated fibroblast-derived annexin A6+ extracellular vesicles support pancreatic cancer aggressiveness. **The Journal of clinical investigation**, v. 126, n. 11, p. 4140-4156, 2016.

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

LO, Jeng-Fan et al. The epithelial-mesenchymal transition mediator S100A4 maintains cancer-initiating cells in head and neck cancers. **Cancer research**, v. 71, n. 5, p. 1912-1923, 2011.

LI, Fengping *et al.* S100A4-MYH9 Axis promote migration and invasion of gastric cancer cells by inducing TGF- β -mediated epithelial-mesenchymal transition. **Journal of Cancer**, v. 9, n. 21, p. 3839, 2018.

LI, Hui-Ying *et al.* Lactoferrin exerts antitumor effects by inhibiting angiogenesis in a HT29 human colon tumor model. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 65, n. 48, p. 10464-10472, 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.

LI, Wenqian *et al.* TGF β 1 in fibroblasts-derived exosomes promotes epithelial-mesenchymal transition of ovarian cancer cells. **Oncotarget**, v. 8, n. 56, p. 96035, 2017.

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.

LINXWEILER, Johannes; JUNKER, Kerstin. Extracellular vesicles in urological malignancies: an update. **Nature Reviews Urology**, v. 17, n. 1, p. 11-27, 2020.

LIU, Xiao-Zheng et al. C/EBPB-dependent adaptation to palmitic acid promotes tumor formation in hormone receptor negative breast cancer. **Nature communications**, v. 13, n. 1, p. 1-17, 2022.

LIU, Yang et al. Adipose-derived exosomes deliver miR-23a/b to regulate tumor growth in hepatocellular cancer by targeting the VHL/HIF axis. **Journal of physiology and biochemistry**, v. 75, n. 3, p. 391-401, 2019.

LLORENS, Ana *et al.* Down-regulation of E-cadherin in mouse skin carcinoma cells enhances a migratory and invasive phenotype linked to matrix metalloproteinase-9 gelatinase expression. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 78, n. 9, p. 1131-1142, 1998.

LO, Jeng-Fan *et al.* The epithelial-mesenchymal transition mediator S100A4 maintains cancer-initiating cells in head and neck cancers. **Cancer research**, v. 71, n. 5, p. 1912-1923, 2011.

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.

LYMAN, Gary H.; DALE, David C.; CRAWFORD, Jeffrey. Incidence and predictors of low dose-intensity in adjuvant breast cancer chemotherapy: a nationwide study of community practices. **Journal of Clinical Oncology**, v. 21, n. 24, p. 4524-4531, 2003.

MALHOTRA, Gautam K. *et al.* Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. **Cancer biology & therapy**, v. 10, n. 10, p. 955-960, 2010.

MALONEY, Ezekiel *et al.* Activation of NF- κ B by palmitate in endothelial cells: a key role for NADPH oxidase-derived superoxide in response to TLR4 activation. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 29, n. 9, p. 1370-1375, 2009.

MANI, Sendurai A. *et al.* The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. **Cell**, v. 133, n. 4, p. 704-715, 2008.

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

MARIATHASAN, Sanjeev *et al.* Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. **Nature**, v. 440, n. 7081, p. 228-232, 2006.

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

MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, Concepción *et al.* *Snail* family members and cell survival in physiological and pathological cleft palates. **Developmental biology**, v. 265, n. 1, p. 207-218, 2004.

MASSAGUÉ, Joan; CHEN, Ye-Guang. Controlling TGF- β signaling. **Genes & development**, v. 14, n. 6, p. 627-644, 2000.

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.

MICALIZZI, Douglas S.; FARABAUGH, Susan M.; FORD, Heide L. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v. 15, n. 2, p. 117-134, 2010.

MIETTINEN, Päivi J. *et al.* TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. **The Journal of cell biology**, v. 127, n. 6, p. 2021-2036, 1994.

MILBANK, Edward; MARTINEZ, M. Carmen; ANDRIANTSITOHAINA, Ramaroson. Extracellular vesicles: pharmacological modulators of the peripheral and central signals governing obesity. **Pharmacology & therapeutics**, v. 157, p. 65-83, 2016.

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.

MORAES, João Alfredo *et al.* Adipose tissue-derived extracellular vesicles and the tumor microenvironment: revisiting the hallmarks of cancer. **Cancers**, v. 13, n. 13, p. 3328, 2021.

MOREL, Anne-Pierre *et al.* Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. **PloS one**, v. 3, n. 8, p. e2888, 2008.

MORI, Seiji *et al.* Enhanced expression of integrin $\alpha v \beta 3$ induced by TGF- β is required for the enhancing effect of fibroblast growth factor 1 (FGF1) in TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) in mammary epithelial cells. **PloS one**, v. 10, n. 9, p. e0137486, 2015.

MOSCHOS, Stergios J.; KIRKWOOD, John M. Integrins and cancer. 2007.

MOUSTAKAS, Aristidis; HELDIN, Carl-Henrik. Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression. **Cancer science**, v. 98, n. 10, p. 1512-1520, 2007.

NAKAMURA, Yoshiko; NAKAMURA, Kazuhiro. Central regulation of brown adipose tissue thermogenesis and energy homeostasis dependent on food availability. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 470, n. 5, p. 823-837, 2018.

NATH, Aritro *et al.* Elevated free fatty acid uptake via CD36 promotes epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 1-19, 2015.

NGUYEN, MT Audrey *et al.* A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. **Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 48, p. 35279-35292, 2007.

NIEMAN, Kristin M. *et al.* Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. **Nature medicine**, v. 17, n. 11, p. 1498, 2011.

NIEMAN, Kristin M. *et al.* Adipose tissue and adipocytes support tumorigenesis and metastasis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1831, n. 10, p. 1533-1541, 2013.

NIESSEN, Carien M.; GOTTARDI, Cara J. Molecular components of the adherens junction. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1778, n. 3, p. 562-571, 2008.

NIETO, M. Angela. Epithelial plasticity: a common theme in embryonic and cancer cells. **Science**, v. 342, n. 6159, p. 1234850, 2013.

NIETO, M. Angela *et al.* EMT: 2016. **Cell**, v. 166, n. 1, p. 21-45, 2016.

NIETO, M. Angela. Epithelial-Mesenchymal Transitions in development and disease: old views and new perspectives. **International Journal of Developmental Biology**, v. 53, n. 8-9-10, p. 1541-1547, 2009.

NILSON, Eduardo Augusto Fernandes *et al.* Custos atribuíveis a obesidade, hipertensão e diabetes no Sistema Único de Saúde, Brasil, 2018. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 44, p. e32, 2020.

NIU, Ya *et al.* LASP1-S100A11 axis promotes colorectal cancer aggressiveness by modulating TGF β /Smad signaling. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2016.

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.

OKANO, Maiko *et al.* Upregulated Annexin A1 promotes cellular invasion in triple-negative breast cancer. **Oncology Reports**, v. 33, n. 3, p. 1064-1070, 2015.

ORDMAN, Alfred B.; CLEAVELAND, 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.

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.

PARKER, Joel S. et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. **Journal of clinical oncology**, v. 27, n. 8, p. 1160, 2009.

PASTUSHENKO, Ievgenia et al. Identification of the tumour transition states occurring during EMT. **Nature**, v. 556, n. 7702, p. 463-468, 2018.

PATSOURIS, David et al. Ablation of CD11c-positive cells normalizes insulin sensitivity in obese insulin resistant animals. **Cell metabolism**, v. 8, n. 4, p. 301-309, 2008.

PENG, Meiyu *et al.* Apolipoprotein AI mimetic peptide 4F suppresses tumor-associated macrophages and pancreatic cancer progression. **Oncotarget**, v. 8, n. 59, p. 99693, 2017

PEREIRA, Jaime et al. Circulating platelet-derived microparticles in systemic lupus erythematosus. **Thrombosis and haemostasis**, v. 95, n. 01, p. 94-99, 2006.

PEREZ, Marcos A. et al. Dietary Lipids Induce Ferroptosis in *Caenorhabditis elegans* and Human Cancer Cells. **Developmental Cell**, 2020

PEROU, Charles M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **nature**, v. 406, n. 6797, p. 747-752, 2000.

PETRUS, Paul *et al.* Transforming growth factor- β 3 regulates adipocyte number in subcutaneous white adipose tissue. **Cell reports**, v. 25, n. 3, p. 551-560. e5, 2018.

PIEK, Ester *et al.* TGF-(β) type I receptor/ALK-5 and Smad proteins mediate epithelial to mesenchymal transdifferentiation in NMuMG breast epithelial cells. **Journal of cell science**, v. 112, n. 24, p. 4557-4568, 1999.

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.

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

POUDEL, Pawan et al. Heterocellular gene signatures reveal luminal-A breast cancer heterogeneity and differential therapeutic responses. **NPJ breast cancer**, v. 5, n. 1, p. 1-10, 2019.

PRAT, Aleix et al. Response and survival of breast cancer intrinsic subtypes following multi-agent neoadjuvant chemotherapy. **BMC medicine**, v. 13, n. 1, p. 1-11, 2015.

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.

QUAIL, Daniela F.; DANNENBERG, Andrew J. The obese adipose tissue microenvironment in cancer development and progression. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 15, n. 3, p. 139-154, 2019.

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

RABACOW, Fabiana M.; AZEREDO, Catarina M.; REZENDE, Leandro FM. Peer Reviewed: Deaths Attributable to High Body Mass in Brazil. **Preventing chronic disease**, v. 16, 2019.

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

RAHMAN, Mohammad A. *et al.* Lung cancer exosomes as drivers of epithelial mesenchymal transition. **Oncotarget**, v. 7, n. 34, p. 54852, 2016.

RAMOS-ANDRADE, Isadora *et al.* Obese adipose tissue extracellular vesicles raise breast cancer cell malignancy. **Endocrine-Related Cancer**, v. 27, n. 10, p. 571-582, 2020.

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

REDDY, Kaladhar B. MicroRNA (miRNA) in cancer. **Cancer cell international**, v. 15, n. 1, p. 1-6, 2015.

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.

REVENU, Céline; GILMOUR, Darren. EMT 2.0: shaping epithelia through collective migration. **Current opinion in genetics & development**, v. 19, n. 4, p. 338-342, 2009.

REYES, Niradiz *et al.* Effect of linoleic acid on proliferation and gene expression in the breast cancer cell line T47D. **Cancer letters**, v. 209, n. 1, p. 25-35, 2004.

RHIM, Andrew D. *et al.* EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. **Cell**, v. 148, n. 1-2, p. 349-361, 2012.

ROBADO DE LOPE, Lucía *et al.* Tumour–adipose tissue crosstalk: fuelling tumour metastasis by extracellular vesicles. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 373, n. 1737, p. 20160485, 2018.

ROCA, Hernan *et al.* Transcription factors OVOL1 and OVOL2 induce the mesenchymal to epithelial transition in human cancer. **PloS one**, v. 8, n. 10, p. e76773, 2013.

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

SAHIN, Suleyman *et al.* The association between body mass index and immunohistochemical subtypes in breast cancer. **The Breast**, v. 32, p. 227-236, 2017.

SANCHEZ-TILLO, E. *et al.* ZEB1 represses E-cadherin and induces an EMT by recruiting the SWI/SNF chromatin-remodeling protein BRG1. **Oncogene**, v. 29, n. 24, p. 3490-3500, 2010.

SATELLI, Arun *et al.* Potential function of exogenous vimentin on the activation of wnt signaling pathway in cancer cells. **Journal of Cancer**, v. 7, n. 13, p. 1824, 2016.

SAVAGNER, Pierre *et al.* Modulations of the epithelial phenotype during embryogenesis and cancer progression. In: **Mammary Tumorigenesis and Malignant Progression**. Springer, Boston, MA, 1994. p. 229-249.

SHAUL, Merav E. *et al.* Dynamic, M2-like remodeling phenotypes of CD11c⁺ adipose tissue macrophages during high-fat diet–induced obesity in mice. **Diabetes**, v. 59, n. 5, p. 1171-1181, 2010.

SHIOVITZ, Stacey; KORDE, Larissa A. Genetics of breast cancer: a topic in evolution. **Annals of Oncology**, v. 26, n. 7, p. 1291-1299, 2015.

SHIRAKIHARA, Takuya; SAITOH, Masao; MIYAZONO, Kohei. Differential regulation of epithelial and mesenchymal markers by δ EF1 proteins in epithelial–mesenchymal transition induced by TGF- β . **Molecular biology of the cell**, v. 18, n. 9, p. 3533-3544, 2007.

SIEGEL, Rebecca L.; MILLER, Kimberly D. Jemal ACancer statistics, 2017. **Ca Cancer J Clin**, v. 67, n. 1, p. 7-30, 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.

SINGH, Anurag; SETTLEMAN, J. E. M. T. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. **Oncogene**, v. 29, n. 34, p. 4741-4751, 2010.

SINN, Hans-Peter; KREIPE, Hans. A brief overview of the WHO classification of breast tumors. **Breast care**, v. 8, n. 2, p. 149-154, 2013.

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

SUH, Y. et al. Claudin-1 induces epithelial–mesenchymal transition through activation of the c-Abl-ERK signaling pathway in human liver cells. **Oncogene**, v. 32, n. 41, p. 4873-4882, 2013.

SULLIVAN, N. J. *et al.* Interleukin-6 induces an epithelial–mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells. **Oncogene**, v. 28, n. 33, p. 2940-2947, 2009.

SUN, Xujuan et al. Annexin A5 regulates hepatocarcinoma malignancy via CRK/II-DOCK180-RAC1 integrin and MEK-ERK pathways. **Cell death & disease**, v. 9, n. 6, p. 1-16, 2018.

SUPERNAT, Anna et al. Epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells in endometrial cancer. **Anticancer research**, v. 33, n. 12, p. 5461-5469, 2013.

TAKAHASHI, Hirokazu *et al.* TGF- β 2 is an exercise-induced adipokine that regulates glucose and fatty acid metabolism. **Nature metabolism**, v. 1, n. 2, p. 291-303, 2019.

TAM, Wai Leong; WEINBERG, Robert A. The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. **Nature medicine**, v. 19, n. 11, p. 1438-1449, 2013.

TECHASEN, Anchalee *et al.* Tumor necrosis factor- α modulates epithelial mesenchymal transition mediators ZEB2 and S100A4 to promote cholangiocarcinoma progression. **Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences**, v. 21, n. 9, p. 703-711, 2014.

TERRY, Stéphane *et al.* New insights into the role of EMT in tumor immune escape. **Molecular oncology**, v. 11, n. 7, p. 824-846, 2017.

THIERY, Jean Paul *et al.* Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. **cell**, v. 139, n. 5, p. 871-890, 2009.

THOMAS, E. Louise *et al.* Magnetic resonance imaging of total body fat. **Journal of Applied Physiology**, v. 85, n. 5, p. 1778-1785, 1998.

THOMOU, Thomas *et al.* Adipose-derived circulating miRNAs regulate gene expression in other tissues. **Nature**, v. 542, n. 7642, p. 450-455, 2017.

TÓKÉS, Anna-Mária et al. Claudin-1,-3 and-4 proteins and mRNA expression in benign and malignant breast lesions: a research study. **Breast Cancer Research**, v. 7, n. 2, p. 1-10, 2005.

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

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.

TSUKITA, Shoichiro; FURUSE, Mikio; ITOH, Masahiko. Multifunctional strands in tight junctions. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 2, n. 4, p. 285-293, 2001.

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

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.

VALCOURT, Ulrich et al. TGF- β and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition. **Molecular biology of the cell**, v. 16, n. 4, p. 1987-2002, 2005.

VAN NIEL, Guillaume; D'ANGELO, Gisela; RAPOSO, Graça. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 19, n. 4, p. 213, 2018.

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

WAKEFIELD, Lalage M.; ROBERTS, Anita B. TGF- β signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. **Current opinion in genetics & development**, v. 12, n. 1, p. 22-29, 2002.

WAKEFIELD, Lalage M.; SPORN, Michael B. Suppression of carcinogenesis: a role for TGF-beta and related molecules in prevention of cancer. **Immunology series**, v. 51, p. 217, 1990.

WALKER, Lindsey et al. Expression of TGF β 3 and its effects on migratory and invasive behavior of prostate cancer cells: involvement of PI3-kinase/AKT signaling pathway. **Clinical & experimental metastasis**, v. 30, n. 1, p. 13-23, 2013.

WANG, Guiyu et al. Colorectal cancer progression correlates with upregulation of S100A11 expression in tumor tissues. **International journal of colorectal disease**, v. 23, n. 7, p. 675-682, 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.

WATANABE, Kazuhide *et al.* Mammary morphogenesis and regeneration require the inhibition of EMT at terminal end buds by Ovol2 transcriptional repressor. **Developmental cell**, v. 29, n. 1, p. 59-74, 2014.

WEBBER, Jason; YEUNG, Vincent; CLAYTON, Aled. Extracellular vesicles as modulators of the cancer microenvironment. In: **Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press, 2015. p. 27-34.

WEIGELT, Britta; GEYER, Felipe C.; REIS-FILHO, Jorge S. Histological types of breast cancer: how special are they?. **Molecular oncology**, v. 4, n. 3, p. 192-208, 2010.

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.

WESTON, A.; HARRIS, C. C. Multistage Carcinogenesis. 2003. **Holland-Frei Cancer Medicine. 6th edition. Hamilton(ON): BC Decker. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13982>.**

WHEELLOCK, Margaret J.; JOHNSON, Keith R. Cadherins as modulators of cellular phenotype. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 19, n. 1, p. 207-235, 2003.

WIDSCHWENDTER, Peter *et al.* The influence of obesity on survival in early, high-risk breast cancer: results from the randomized SUCCESS A trial. **Breast Cancer Research**, v. 17, n. 1, p. 1-11, 2015.

WIPFF, Pierre-Jean; HINZ, Boris. Integrins and the activation of latent transforming growth factor β 1—an intimate relationship. **European journal of cell biology**, v. 87, n. 8-9, p. 601-615, 2008.

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.

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.

WOLF, Peter. The nature and significance of platelet products in human plasma. **British journal of haematology**, v. 13, n. 3, p. 269-288, 1967.

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.

WU, Yadi *et al.* Stabilization of *Snail* by NF- κ B is required for inflammation-induced cell migration and invasion. **Cancer cell**, v. 15, n. 5, p. 416-428, 2009.

WYATT, Sharon B.; WINTERS, Karen P.; DUBBERT, Patricia M. Overweight and obesity: prevalence, consequences, and causes of a growing public health problem. **The American journal of the medical sciences**, v. 331, n. 4, p. 166-174, 2006.

XU, Jian; LAMOUILLE, Samy; DERYNCK, Rik. TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition. **Cell research**, v. 19, n. 2, p. 156-172, 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.

YANG, BoWen *et al.* TGFB2 serves as a link between epithelial-mesenchymal transition and tumor mutation burden in gastric cancer. **International Immunopharmacology**, v. 84, p. 106532, 2020.

YANG, Ji Hye *et al.* *Snail* augments fatty acid oxidation by suppression of mitochondrial ACC2 during cancer progression. **Life science alliance**, v. 3, n. 7, 2020.

YANG, Jing; WEINBERG, Robert A. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. **Developmental cell**, v. 14, n. 6, p. 818-829, 2008.

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.

YE, Xin *et al.* Distinct EMT programs control normal mammary stem cells and tumour-initiating cells. **Nature**, v. 525, n. 7568, p. 256-260, 2015

YIN, Taofei; GREEN, Kathleen J. Regulation of desmosome assembly and adhesion. In: **Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press, 2004. p. 665-677.

YONEZAWA, Tomo *et al.* Unsaturated fatty acids promote proliferation via ERK1/2 and Akt pathway in bovine mammary epithelial cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 367, n. 4, p. 729-735, 2008.

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

YU, Qin; STAMENKOVIC, Ivan. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF- β and promotes tumor invasion and angiogenesis. **Genes & development**, v. 14, n. 2, p. 163-176, 2000.

YU, Min *et al.* Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. **science**, v. 339, n. 6119, p. 580-584, 2013.

ZAMANIAN-DARYOUSH, Maryam *et al.* The cardioprotective protein apolipoprotein A1 promotes potent anti-tumorigenic effects. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 29, p. 21237-21252, 2013.

ZAOU, Maurice *et al.* Breast-associated adipocytes secretome induce fatty acid uptake and invasiveness in breast cancer cells via CD36 independently of body mass index, menopausal status and mammary density. **Cancers**, v. 11, n. 12, p. 2012, 2019.

ZAVADIL, Jiri *et al.* Integration of TGF- β /Smad and Jagged1/Notch signalling in epithelial-to-mesenchymal transition. **The EMBO journal**, v. 23, n. 5, p. 1155-1165, 2004.

ZEISBERG, Michael *et al.* Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. **The Journal of clinical investigation**, v. 119, n. 6, p. 1429-1437, 2009.

ZHAN, Tailan; RINDTORFF, Niklas; BOUTROS, Michael. Wnt signaling in cancer. **Oncogene**, v. 36, n. 11, p. 1461-1473, 2017.

ZHANG, Ling-juan *et al.* Diet-induced obesity promotes infection by impairment of the innate antimicrobial defense function of dermal adipocyte progenitors. **Science translational medicine**, v. 13, n. 577, p. eabb5280, 2021.

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

ZHAO, Yingshe *et al.* The lysyl oxidase pro-peptide attenuates fibronectin-mediated activation of FAK and p130CAS in breast cancer cells. **Journal of Biological Chemistry**, 2008.

ZHOU, Bowen *et al.* Claudin 1 promotes migration and increases sensitivity to tamoxifen and anticancer drugs in luminal-like human breast cancer cells MCF7. **Cancer investigation**, v. 33, n. 9, p. 429-439, 2015.

ZHOU, Rongbin *et al.* Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. **Nature immunology**, v. 11, n. 2, p. 136-140, 2010.

ANEXO– Aprovação do comitê de ética

HOSPITAL FEDERAL DE
IPANEMA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Interação das moléculas secretadas pelo tecido adiposo com células do sistema imune, linhagens celulares primárias e imortalizadas

Pesquisador: Thereza Christina Barja Fidalgo

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 03769618.3.0000.5646

Instituição Proponente: Hospital Universitário Pedro Ernesto

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.125.991

Apresentação do Projeto:

A estrutura do trabalho está adequada.

Objetivo da Pesquisa:

O Objetivo geral foi elaborado e está claro para o leitor.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e benefícios ficaram claros

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

As considerações relatadas no parecer anterior foram atendidas e esclarecidas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de rosto - o pesquisador seguiu as orientações do último parecer.

TCLE - o pesquisador seguiu as orientações do último parecer.

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: RUA ANTONIO PARREIRAS, 67

Bairro: IPANEMA

CEP: 22.411-020

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3111-2311

E-mail: cea.ipanema@gmail.com

HOSPITAL FEDERAL DE IPANEMA



Continuação do Parecer: 3.125.991

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1264009.pdf	26/01/2019 12:53:03		Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRosto.pdf	26/01/2019 12:52:32	Mariana Renovato Martins	Aceito
Outros	Anuencia.pdf	26/01/2019 12:52:18	Mariana Renovato Martins	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	26/01/2019 12:51:47	Mariana Renovato Martins	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	26/01/2019 12:51:35	Mariana Renovato Martins	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 30 de Janeiro de 2019

Assinado por:
Maria Alice Sousa de Araujo
(Coordenador(a))

Endereço: RUA ANTONIO PARREIRAS, 67

Bairro: IPANEMA

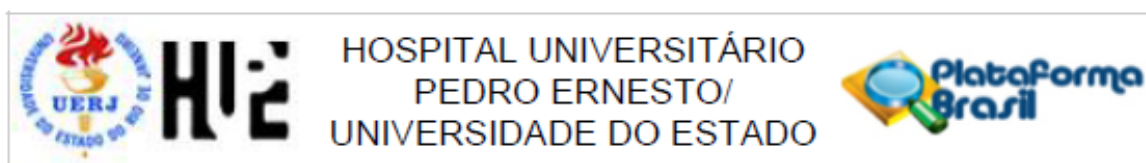
CEP: 22.411-020

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3111-2311

E-mail: cea.ipanema@gmail.com



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 .

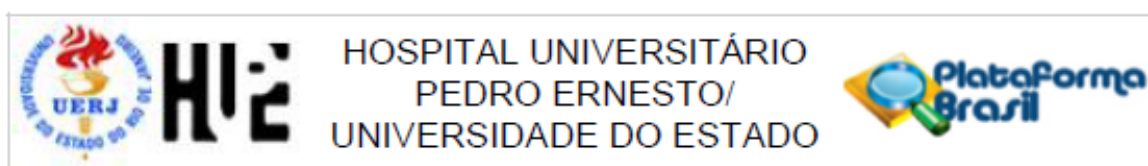
Avaliação dos Riscos e Benefícios:

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

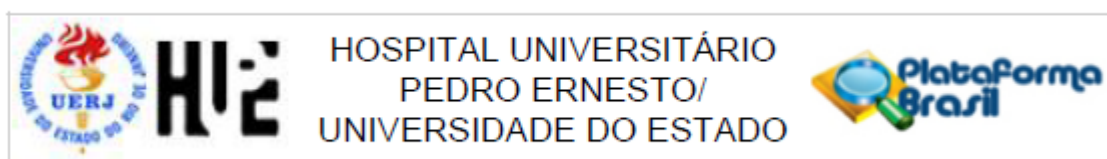
Necessita Apreciação da CONEP:

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)