



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

Luiz Gabriel Xavier Botelho

**Contribuições metabólicas de vesículas extracelulares liberadas por pré-adipócitos obesos sob células tumorais de mama MDA-MB-231**

Rio de Janeiro

2024

Luiz Gabriel Xavier Botelho

**Contribuições metabólicas de vesículas extracelulares liberadas por pré-adipócitos obesos sob células tumorais de mama MDA-MB-231**

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

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Mariana Renovato Martins

Rio de Janeiro

2024

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

B748 Botelho, Luiz Gabriel Xavier.  
Contribuições metabólicas de vesículas extracelulares liberadas por pré-  
adipócitos obesos sob células tumorais de mama MDA-MB-231 / Luiz Gabriel  
Xavier Botelho. - 2024.  
82f.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra, Mariana Renovato Martins

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

1. Obesidade - Teses. 2. Neoplasias da mama. 3. Vesículas extracelulares. I.  
Martins, Mariana Renovato. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto  
de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 539.216

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira  
CRB7/6382

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

---

Assinatura

---

Data

Luiz Gabriel Xavier Botelho

**Contribuições metabólicas de vesículas extracelulares liberadas por pré-adipócitos  
obesos sob células tumorais de mama MDA-MB-231**

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

Aprovada em 09 de agosto de 2024.

Orientadora Prof.<sup>a</sup> Dra. Mariana Renovato Martins

Universidade Federal Fluminense

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr David Majerowicz

Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Vanessa de Souza Mello

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Dra. Sheila Coelho Soares

Instituto Nacional do Câncer

Rio de Janeiro

2024

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a todos que acreditaram em mim e me inspiraram ao longo desta jornada.

## AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho não seria possível sem o apoio incansável e a orientação da minha orientadora, Mariana, cuja dedicação, paciência estoica e expertise não apenas guiaram este projeto, mas também inspiraram a minha jornada acadêmica. A ela, minha profunda gratidão.

Agradeço também aos meus colegas do LIM que compartilharam comigo as longas horas de trabalho e os desafios da pesquisa. O espírito de equipe e a amizade que construímos foram fundamentais para os momentos de superação e sucesso.

À minha família, meu eterno amor e gratidão. Obrigado por entenderem os meus momentos de ausência e por todo o suporte emocional e incentivo. Vocês são a minha base e o motivo pelo qual busco ser melhor a cada dia.

Aos meus amigos próximos, obrigado por estarem sempre lá, pelos momentos de lazer que foram essenciais para recarregar as energias e manter o equilíbrio. Este trabalho é dedicado a todos vocês, que foram essenciais em cada etapa desta jornada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) , Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- Brasil (CNPq), e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro- Brasil (FAPERJ).

Se és capaz de pensar, sem que a isso só te atires; de sonhar ,sem fazer dos sonhos teus senhores; Se encontrando a desgraça e o triunfo conseguires tratar da mesma forma a esses dois impostores;(...)Se a todos podes ser de alguma utilidade, e se és capaz de dar, segundo por segundo, ao minuto fatal, todo o valor e brilho; Tua é a terra com tudo o que existe no mundo, e o que mais - tu serás um homem, ó meu filho!

*Rudyard Kipling*

## RESUMO

BOTELHO, Luiz Gabriel Xavier. **Contribuições metabólicas de vesículas extracelulares liberadas por pré-adipócitos obesos sob células tumorais de mama MDA-MB-231**. 2024. 82 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

A obesidade é um fator de risco conhecido para o câncer de mama, mas os mecanismos por trás desta relação permanecem desconhecidos. Neste cenário, apesar de negligenciados, os pré-adipócitos desempenham um importante papel. Este estudo teve como objetivo desenvolver um modelo *in vitro* para a obtenção de vesículas extracelulares liberadas por pré-adipócitos obesos (VE PAD OB) ou eutróficos (VE PAD EUT) e, em seguida, avaliar seus efeitos funcionais e metabólicos sobre células tumorais de mama MDA-MB-231. Inicialmente, pré-adipócitos humanos de linhagem primária foram expostos ao secretoma da cultura de explantes de tecido adiposo subcutâneo de indivíduos obesos ou eutróficos oriundas de cirurgias de abdominoplastia e mamoplastia realizadas no Hospital Federal de Ipanema (CAAE:36880914.0.0000.5259). Após o processo de educação, as vesículas dos pré-adipócitos foram isoladas e administradas para as células MDA-MB-231 na presença ou ausência de 2-deoxy-d-glicose (2-DG), inibidor do metabolismo glicolítico, e Etomoxir (ETO), inibidor da oxidação de ácidos graxos. Os resultados indicaram que VE PAD OB e VE PAD EUT induzem respostas funcionais e metabólicas distintas nas células MDA-MB-231. VE PAD OB aumentou a capacidade migratória em 3 vezes nas células MDA-MB-231 em comparação às células sem tratamento, e 1,8 vezes em relação às células tratadas com VE PAD EUT. Interessantemente, relatamos a reversão deste aumento na presença de ETO, havendo uma diminuição de 2,3 vezes no grupo tratado com VE PAD OB e 1,5 vezes no grupo tratado com VE PAD EUT, indicando a relevância da oxidação de ácidos graxos para o aumento da capacidade migratória destas células, em especial a mediada por VE PAD OB. Também foi visto que somente VE PAD EUT aumenta os níveis totais de L-Lactato nas células MDA-MB-231, indicando que o perfil metabólico induzido por VE PAD EUT seria mais glicolítico. Na presença de ETO, VE PAD OB aumentou o níveis de L-Lactato e reduziu a atividade da Glicose-6-Fosfato Desidrogenase (G6PDH). Nossos achados demonstram que o condicionamento *in vitro* de pré-adipócitos é uma ferramenta funcional para mimetizar o microambiente do TA nas diferentes condições fisiológicas. Além disso, nossos resultados indicam que VE PAD EUT favorece o metabolismo glicolítico enquanto VE PAD OB favorece o metabolismo oxidativo. Além disso, relatamos que VE PAD EUT e VE PAD OB aumentam a capacidade migratória em diferentes proporções e que isso é devido a alterações em diferentes vias metabólicas que ocorrem nas células MDA-MB 231 em ambas as condições.

Palavras-chaves: obesidade; câncer de mama; vesículas extracelulares; metabolismo tumoral.

## ABSTRACT

BOTELHO, Luiz Gabriel Xavier. **Metabolic contributions of extracellular vesicles released by human obese preadipocytes on MDA-MB-231 tumor cells.** 2024. 82 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

Obesity is a known risk factor for breast cancer, but the mechanisms behind this relationship remain unknown. In this scenario, despite being neglected, pre-adipocytes play an important role. This study aimed to develop an in vitro model to obtain extracellular vesicles released by obese (VE PAD OB) or eutrophic (VE PAD EUT) preadipocytes and then evaluate their functional and metabolic effects on MDA breast tumor cells. -MB-231. Initially, human pre-adipocytes of primary lineage were exposed to the secretome from cultured subcutaneous adipose tissue explants from obese or eutrophic individuals from abdominoplasty and mammoplasty surgeries performed at the Federal Hospital of Ipanema (CAAE:36880914.0.0000.5259). After the education process, preadipocyte vesicles were isolated and administered to MDA-MB-231 cells in the presence or absence of 2-deoxy-d-glucose (2-DG), an inhibitor of glycolytic metabolism, and Etomoxir ( ETO), inhibitor of fatty acid oxidation. The results indicated that VE PAD OB and VE PAD EUT induce specific and specific metabolic responses in MDA-MB-231 cells. VE PAD OB increased the migratory capacity by 3-fold in MDA-MB-231 cells compared to untreated cells, and 1.8 times compared to cells treated with VE PAD EUT. Interestingly, we reported the reversal of this increase in the presence of ETO, with a 2.3-fold decrease in the group treated with VE PAD OB and 1.5 times in the group treated with VE PAD EUT, highlighting the importance of fatty acid oxidation for the increased migratory capacity of these cells, especially that mediated by VE PAD OB. It was also seen that only VE PAD EUT increases total L-Lactate levels in MDA-MB-231 cells, indicating that the metabolic profile induced by VE PAD EUT would be more glycolytic. In the presence of ETO, VE PAD OB increased L-Lactate levels and prevented Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PDH) activity. Our findings demonstrate that in vitro conditioning of preadipocytes is a functional tool to mimic the AT microenvironment under different physiological conditions. Furthermore, our results indicate that VE PAD EUT favors glycolytic metabolism while VE PAD OB favors oxidative metabolism. Furthermore, we report that VE PAD EUT and VE PAD OB increase migratory capacity in different proportions and that this is due to changes in different metabolic pathways that occur in MDA-MB 231 cells in both conditions.

Keywords: obesity; breast cancer; extracellular vesicles; tumor metabolism.

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Análise da viabilidade celular de MDA-MB-231 através da técnica de MTT após 24 h.....	56
Gráfico 2 –	Análise da viabilidade celular de MDA-MB-231 através da técnica de MTT após 48 h.....	57
Gráfico 3 –	Análise do perfil de VE PAD EUT e OB por NTA.....	60
Gráfico 4 –	Contribuição da oxidação lipídica sobre a migração induzida por VE PAD EUT e VE PAD OB.....	61
Gráfico 5 –	Contribuição da glicólise sobre a migração induzida por VE PAD EUT e VE PAD OB .....	62
Gráfico 6 –	Alterações nos níveis de L-Lactato induzidas por VE PAD EUT e VE PAD OB.....	64
Gráfico 7 –	Avaliação da atividade da enzima G6PDH após estímulo com VE PAD EUT ou VE PAD OB.....	65
Gráfico 8 –	Avaliação da atividade da enzima Piruvato Quinase após estímulo com VE PAD EUT ou VE PAD OB .....	66
Gráfico 9 -	Produção de ATP e atividade da proteína AMPK após estímulo com VE PAD EUT ou VE PAD OB.....	67

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1 -	Tabela de classificação de IMC.....	15
Figura 1 –	Imagem de microscopia óptica do tecido adiposo branco e marrom.....	17
Figura 2 –	Representação do processo de termogênese em adipócitos marrons.....	18
Figura 3 –	Representação esquemática das principais vias de diferenciação dos adipócitos marrons.....	19
Figura 4 –	Representação da cascata lipolítica no adipócito.....	20
Figura 5 –	Distribuição dos principais depósitos de Tecido Adiposo Branco e Tecido Adiposo Marrom no corpo humano.....	21
Figura 6 –	Representação da lipogênese de novo.....	22
Figura 7 –	Regulação transcricional da adipogênese.....	23
Figura 8 –	Processos fisiológicos e metabólicos regulados pelo TA Branco através da secreção de adipocinas.....	25
Figura 9 –	Características de adipócitos hipertróficos e hiperplásicos.....	26
Figura 10 –	Modulação fenotípica do tecido adiposo durante a obesidade.....	27
Figura 11 –	Esquema representativo da composição geral das VE.....	30
Figura 12 -	Os seis hallmarks clássicos do câncer.....	32
Figura 13 -	O microambiente tumoral.....	33
Figura 14 -	Treze tipos de câncer associados à obesidade e sobrepeso.....	34
Figura 15 -	Porcentagem de casos de câncer associados a fatores de risco evitáveis em adultos com idade acima de 30 anos nos EUA .....	35
Figura 16 -	Estrutura da mama.....	36
Figura 17 -	VE derivadas de tecido adiposo modulam a aquisição e manutenção de traços marcantes do câncer.....	37
Figura 18 -	Resumo da interferência entre as VE derivadas de tecido adiposo e vários tipos de câncer.....	38
Figura 19 -	Lactato atua como regulador tumoral.....	39
Figura 20 -	Esquema representativo das vias metabólicas avaliadas no trabalho e dos mecanismos de inibição utilizados.....	52
Figura 21 -	Fluxo de trabalho da metodologia deste trabalho.....	54
Figura 22 -	Linha do tempo da produção de VE PAD.....	58
Figura 23 -	Esquema de conclusão.....	75

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3-PG	3-fosfoglicerato
ACC	Acetil-CoA carboxilase
ACLY	Acetil Coa pela enzima
ACS	Acil-CoA Sintetase
AD-EXOs	exossomos derivados de adipócitos
ADSCs	células-tronco derivadas do tecido adiposo
AGL	ácidos graxos livres
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
ATP	Adenosina trifosfato
BPM	Proteína morfogenética óssea
C/EBPs	Proteínas de ligação ao intensificador de CCAAT
cAMP	AMP cíclico
CPT1	Carnitina Palmitoil Transferase I
DCIS	carcinoma ductal in situ
ER <sup>-</sup>	ausência de receptores de estrogênio
EROs	espécies reativas de oxigênio
FAO	oxidação de ácidos graxos
FASN	Ácido Graxe Sintase
G6PDH	glicose-6-fosfato desidrogenase
GLUT	transportadoras de glicose
GPX-4	glutathione peroxidase 4
GSH	Glutathione
HER2 <sup>-</sup>	ausência de receptor de fator de crescimento epidermal
HSL	Lipase hormônio-sensível
HSP	via das hexosaminas
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina 1
IL-6	interleucina 6
IL-8	interleucina 8
IMC	Índice de Massa Corporal

LCIS	carcinoma lobular <i>in situ</i>
MCP-1	proteína quimioatraente de monócitos-1
MUFAs	ácidos graxos monoinsaturados
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NSCLC	câncer de pulmão de células não pequenas
PHGDH	fosfoglicerato desidrogenas
PK :	Piruvato quinase
PKA	proteína quinase A
PPAR $\gamma$	receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama
PPP	via das pentoses-fosfato
PR -	ausência de receptor de progesterona
Pref-1	Proteína fator de pré-adipócito 1
PSAT	fosfoserina aminotransferase
PSPH	Fosfoserina fosfatase
PUFAs	ácidos graxos poli-insaturados
R5P	ribulose-5-fosfato
RPIA	ribose-5-fosfato isomerase A
SSP	via da produção de serinas
TA	tecido adiposo
TCA	Ciclo do ácido tricarboxílico
TLR- 4	receptor do tipo Toll 4
TNF $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$
Tregs	células T reguladoras
UCP1	proteína desacopadora 1
UDP-GlcNAc	difosfato de uridina N-acetilglucosamina
VE	vesículas extracelulares
VE PAD	Vesículas extracelulares de Pré-adipócitos
VE PAD EUT	Vesículas Extracelulares de Pré-Adipócitos Eutróficos
VE PAD Ob	Vesículas Extracelulares de Pré-Adipócitos Obesos
xCT	transportador de cistina

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
nm	Nanômetro
$\mu\text{m}$	Micrômetro
mM	Milimolar
mg/L	Miligramas por Litro
CO <sub>2</sub>	Molécula de gás carbônico
g	Gravidade
mL	Mililitro
v	Volume
$\mu\text{L}$	Microlitro
°C	Graus celsius
$\mu\text{g/mL}$	Microgramas por mililitro
$\Delta$	Delta
p	Valor p
V	Volt

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
1	<b>OBJETIVOS</b> .....	47
1.1	<b>Geral</b> .....	47
1.2	<b>Específicos</b> .....	47
2	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	48
2.1	<b>Cultura celular</b> .....	48
2.2	<b>Condicionamento dos pré-adipócitos e isolamento das vesículas extracelulares derivadas dos pré-adipócitos</b> .....	49
2.3	<b>Caracterização da distribuição por tamanho das VE PAD EUT e VE PAD OB</b> .....	50
2.4	<b>Avaliação de viabilidade por MTT</b> .....	50
2.5	<b>Ensaio de migração por <i>wound healing</i></b> .....	51
2.6	<b>Ensaio de avaliação metabólica</b> .....	51
2.7	<b>Preparo dos extratos celulares e <i>western blotting</i></b> .....	52
2.8	<b>Análise estatística</b> .....	53
3	<b>RESULTADOS</b> .....	55
3.1	<b>Efeito da inibição da oxidação lipídica e da glicólise sobre a viabilidade de células mda-mb-231</b> .....	55
3.2	<b>Estabelecimento do modelo experimental de Produção de vesículas extracelulares por pré-adipócitos previamente educados com meio condicionado provenientes do ta eutrófico ou obesos</b> .....	57
3.3	<b>O tratamento com vesículas derivadas de pré-adipócitos obesos aumenta a capacidade migratória de células mda-mb-231 de forma dependente da oxidação lipídica</b> .....	61
3.4	<b>Efeito das vesículas extracelulares derivadas de pré-adipócitos sobre a produção de lactato</b> .....	63
3.5	<b>Efeito das vesículas extracelulares derivadas de pré-adipócitos sobre a atividade da enzima glicose-6- fosfato desidrogenase</b> .....	65
3.6	<b>Efeito das vesículas extracelulares derivadas de pré-adipócitos sobre a atividade da enzima piruvato- quinase</b> .....	66
3.7	<b>Efeito das vesículas extracelulares derivadas de pré-adipócitos sobre a produção de ATP e a fosforilação da enzima AMPK</b> .....	67

4	<b>DISCUSSÃO</b> .....	68
	<b>CONCLUSÕES</b> .....	71
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	76

## INTRODUÇÃO

A obesidade é uma condição cada vez mais prevalente no mundo inteiro e está associada a uma série de comorbidades como diabetes tipo II, doenças cardíacas e vários tipos de câncer. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), no ano de 2022 existiam cerca de 2,5 bilhões de adultos com sobrepeso no mundo, dos quais 890 milhões eram obesos (OMS, 2024). A situação tende a se agravar, estimativas indicam que em 2030 cerca de 40% da população mundial possua sobrepeso e que uma a cada cinco pessoas seja obesa (KELLY et al., 2008)

Esta condição é definida como acúmulo excessivo de gordura que causa riscos à saúde do indivíduo. O critério mais utilizado para sua definição é o Índice de Massa Corporal (IMC), uma razão matemática entre peso do indivíduo, em quilogramas, pelo quadrado da sua altura, em metros ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ). Indivíduos adultos com IMC igual ou superior a 25 são considerados com sobrepeso e aqueles com IMC igual ou acima de 30 são considerados obesos; ressalta-se que de acordo com o IMC, a obesidade pode ser ainda estratificada em grau I, grau 2 e grau 3 (Tabela 1). Apesar de não ser a forma mais fidedigna de aferir a adiposidade, tal medida é amplamente utilizada em análises populacionais por ser de fácil aferição e seu resultado ser válido tanto para homens quanto mulheres (OMS, 2024).

Tabela 1 – Tabela de classificação de IMC

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

Legenda: Índice de massa corporal (IMC);  
Fonte: Adaptada de OMS, 2024.

A origem e a prevalência da obesidade é multifatorial e envolve fatores genéticos, psicossociais e culturais. Condições como hábitos alimentares, a alta oferta de alimentos

hiperenergéticos e ultraprocessados, sedentarismo, questões relacionadas ao modelo de trabalho, psicológicas e condições socioeconômicas são alguns exemplos de influência (HEMMINGSSON et al., 2023).

Compreender essa complexidade é essencial para o desenvolvimento de políticas públicas realmente eficazes no combate à obesidade. Apesar da multifatorialidade por trás da obesidade, um enquadramento de trabalho útil é a compreensão da obesidade como o resultado de um desbalanço entre a quantidade de energia consumida e liberada (HALL; GUO, 2017). Este desbalanço energético se manifesta no acúmulo excessivo de gordura no tecido adiposo (TA) e leva, por sua vez, a disfunções sistêmicas relacionadas a várias doenças (PI-SUNYER, 2009).

### **Tecido adiposo: tipos e funções**

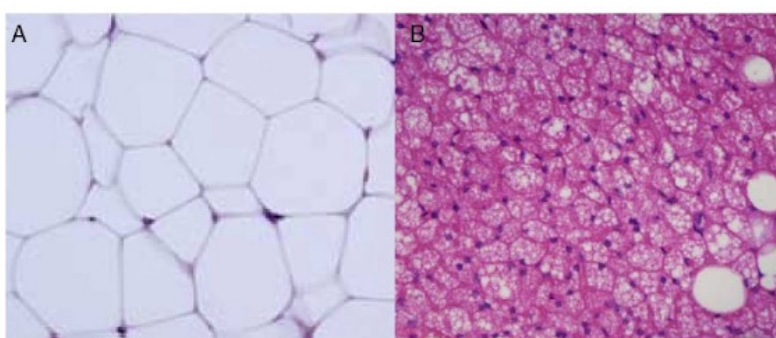
O TA é um tipo de tecido conjuntivo especializado no estoque de lipídios, sob a forma de triacilglicerol, que participa do armazenamento de energia, isolamento térmico, proteção dos órgãos contra choques mecânicos e comunicação endócrina. Sua composição envolve os adipócitos, células especializadas no estoque de triacilgliceróis em estruturas denominadas gotas lipídicas, mas também envolve outros tipos celulares extremamente relevantes para a homeostase do tecido que coletivamente são chamados de fração vascular estromal, sendo alguns exemplos os pré-adipócitos, células imunológicas, endoteliais e tronco (LARGE et al., 2004).

O TA pode ser subdividido em diferentes porções de acordo com suas características histológicas e funcionais. Historicamente, o TA foi classificado em dois tipos principais: o TA Branco que é caracterizado por adipócitos uniloculares, atua no armazenamento energético e na regulação endócrina; e o TA marrom, que é caracterizado por adipócitos multiloculares com uma alta densidade mitocondrial - e isso explica a sua nomenclatura, visto que há abundância de ferro presente na composição das proteínas da cadeia transportadora de elétrons, o que confere uma coloração amarronzada a este tecido- e que atua na termogênese (RÀFOLS, 2014). (Fig. 1).

Contudo, foram descobertos outros perfis de adipócitos com alta plasticidade fenotípica que merecem uma classificação à parte: adipócitos rosa e adipócitos bege. Esses outros tipos de adipócitos encontram-se presentes em determinadas porções do TA Branco e,

sob resposta a determinadas condições e estímulos, são capazes de assumir, de forma transitória, características morfológicas e funcionais completamente diferentes. Por exemplo, os adipócitos rosa foram descobertos em camundongos fêmeas durante os períodos de gestação e lactação, no qual porções do TA subcutâneo mamário destas fêmeas são capazes de produzir e secretar leite. Após o término desta fase há uma reversão ao fenótipo de TA Branco (FÈVE et al., 2024). Já os adipócitos bege são encontrados também em humanos e são assim chamados por serem capazes de assumir um fenótipo intermediário entre adipócitos brancos e marrons (CHENG et al., 2021) .

Figura 1 – Imagem de microscopia óptica do tecido adiposo branco e marrom



Legenda: Imagem de microscopia óptica do tecido adiposo branco e marrom .A) Tecido adiposo brancoB) Tecido adiposo marrom

Nota: Observar que o tecido adiposo branco (A) possui adipócitos com gotas lipídicas maiores e uma menor concentração de mitocôndrias que os adipócitos do tecido adiposo marrom (B).

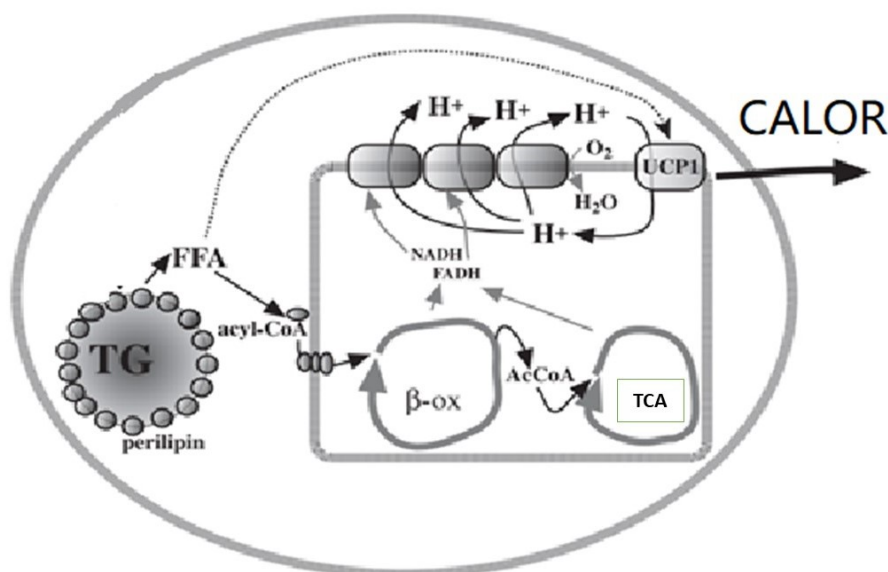
Fonte: Reproduzido de RÀFOLS, 2014.

### TA marrom

A distribuição do TA Marrom é muito mais restrita em humanos do que o TA Branco, apresentando depósitos em pequenas porções escapulares e torácicas. Acreditava-se que este tipo de tecido estava presente apenas em estágio iniciais do desenvolvimento, porém já foi relatada sua presença em adultos. Seu papel termogênico é devido à presença da proteína desacopadora 1 (UCP1) também conhecida como termogenina, em suas mitocôndrias. Esta proteína permite que os prótons acumulados no espaço intermembrana durante o processo da cadeia transportadora de elétrons retornem à matriz mitocondrial sem que ocorra necessariamente a ativação da enzima ATP Sintase (Fig. 2). Isso resulta na liberação de energia pela liberação de calor. A origem desses adipócitos também é diferente, ocorrendo a

partir de progenitores positivos para Myf5, que também dão origem a células musculares (CANNON; NEDERGAARD, 2004)

Figura 2 – Representação do processo de termogênese em adipócitos marrons



Legenda: Esquema representativo do processo de termogênese em adipócitos marrons TG- Triacilglicerol, FFA- Ácido Graxo Livre,  $\beta$ -ox:  $\beta$ - oxidação, AcCoa; Acil CoA; TCA: Ciclo do ácido tricarboxílico; UCP1: Proteína desacopladora 1

Nota: Observar que o processo de termogênese ocorre através do desacoplamento da cadeia respiratória mediado pela proteína UCP1

Fonte: Adaptado de CANNON; NEDERGAARD, 2004.

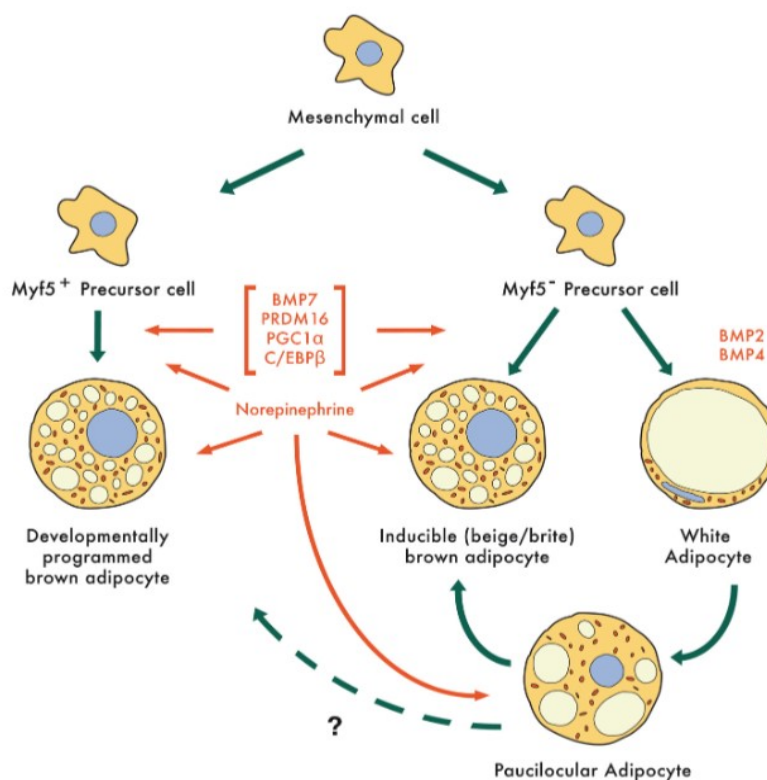
### Adipócitos bege

Durante a década de 1980 foi relatado, que em resposta crônica ao frio, alguns depósitos de TA Branco em camundongos passaram a expressar características de TA Marrom, tais como a proteína UCP1 (YOUNG; ARCH; ASHWELL, 1984). Contudo somente em 2012 a existência de um terceiro tipo de adipócitos em humanos foi amplamente reconhecida. Estudos moleculares sobre a origem desses adipócitos demonstraram que diferentes dos adipócitos marrons, que compartilham uma assinatura genética com células musculares ( $Myf5^+$ ), os adipócitos com características de TA Marrom encontrados nos depósitos de TA

Branco não possuíam esse marcador ( $Myf5^-$ ), sendo gerados a partir dos mesmos progenitores do TA Branco (Fig. 3) (WU et al., 2012).

A literatura relata que moléculas como Norepinefrina, BMPs, PRDM16, PGC-1 $\alpha$  e C/EBP $\beta$  e irisina podem induzir transdiferenciação para o perfil de TA Marrom (*browning*) em adipócitos que apresentavam originalmente um fenótipo do TA Branco; tais células possuem uma maior expressão de UCP1 mas ainda com o perfil de distribuição de gotas lipídicas do TA Branco (GIRALT; VILLARROYA, 2013; WU et al., 2012; (BOSTRÖM et al., 2012; LIU et al., 2022).

Figura 3 – Representação esquemática das principais vias de diferenciação dos adipócitos marrons



Legenda: Esquema representativo das diferentes origens dos adipócitos marrons. Myf5 (Fator Mio gênico 5); BMP7 (Proteína Morfogênica Óssea 7); PRDM16 (Domínio PR Contendo 16); PGC-1 $\alpha$  (Coativador 1 alfa do Receptor Gama Ativado por Proliferadores de Peroxissoma); C/EBP (Proteína de Ligação ao Elemento Realçador de CCAAT); BMP2 (Proteína morfogênica Óssea 2); BMP4 (Proteína morfogênica Óssea 4).

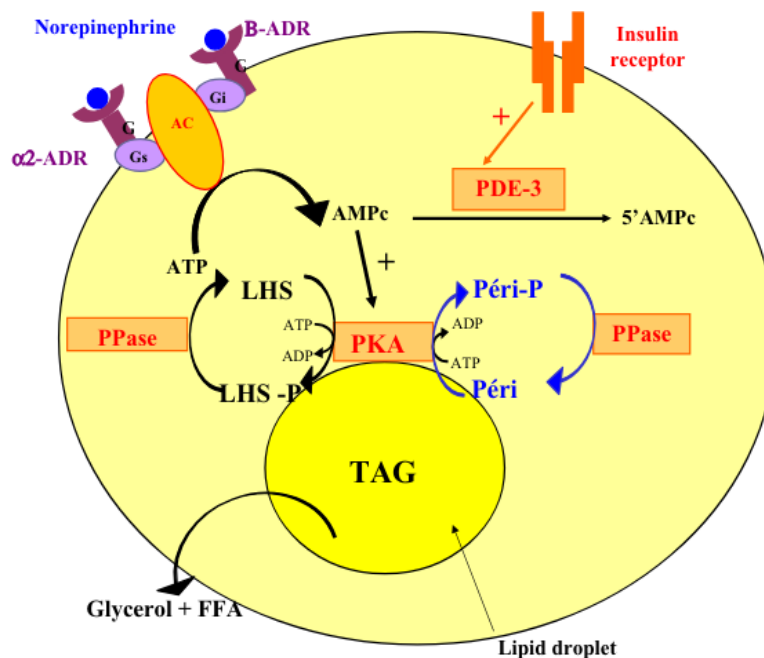
Fonte: Reproduzido de GIRALT; VILLARROYA, 2013.

## TA branco- reservatório energético

O TA Branco é o maior reservatório energético do corpo devido a especializações que o tornam extremamente eficiente para esta função. Seus adipócitos são dotados de uma gota lipídica capaz de ocupar a maior parte do seu volume citoplasmático e dentro dela estão estocadas várias moléculas de triacilglicerol, formadas a partir da esterificação entre uma molécula de glicerol e três ácidos graxos. (LARGE et al., 2004) .

Seu potencial energético é mobilizado através dos processos de lipólise e lipogênese. A lipólise é a quebra dos triacilgliceróis estocados nas gotas lipídicas em moléculas de glicerol e ácidos graxos, tornando assim esses substratos energéticos disponíveis para serem entregues a outros tecidos. Esse processo ocorre em um cenário de demanda energética sinalizado por hormônios como glucagon ou norepinefrina. Os ácidos graxos liberados são transportados na corrente sanguínea ligando-se à albumina e em seguida são internalizados pelos órgãos e tecidos com demanda energética (Fig. 4) (LARGE et al., 2004).

Figura 4 – Representação da cascata lipolítica no adipócito

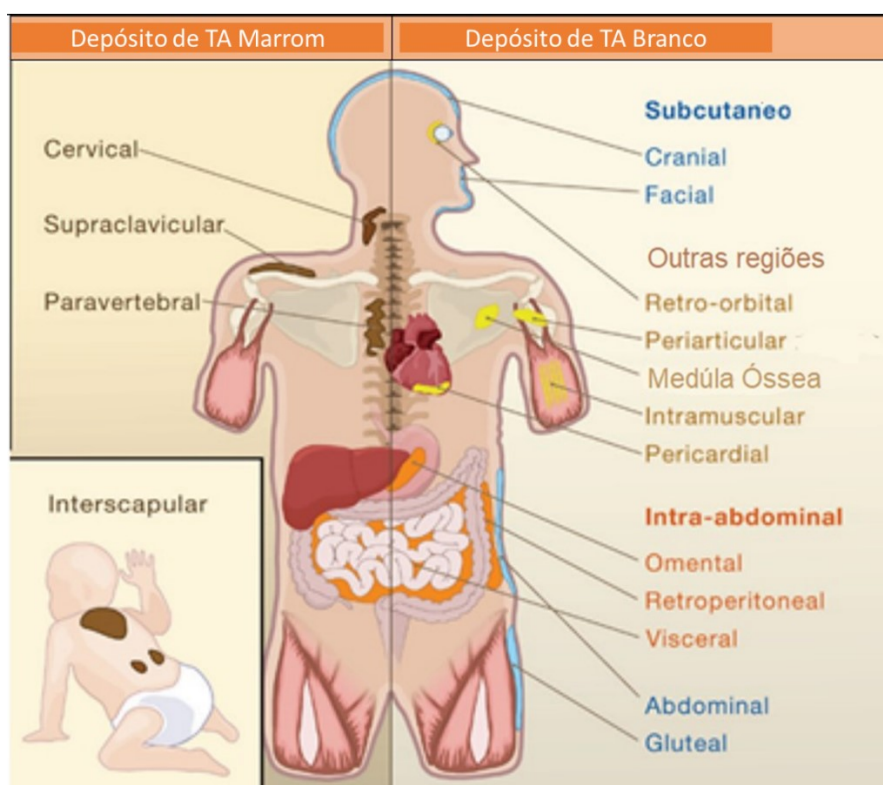


Legenda: Esquema representativo da cascata lipolítica em um adipócito. ADR: adrenoceptor, AC: adenil ciclase, AGL: ácido graxo livre, G: proteína G, LHS: lipase hormônio-sensível, PDE: fosfodiesterase, Peri: perilipina, PKA: proteína quinase A, PPase: proteína fosfatase, TAG: triacilglicerol

Fonte: Reproduzido de LARGE et al.,2004.

Ainda sobre a disponibilização de ácidos graxos, o TA Branco apresenta uma característica que facilita bastante esse processo: sua localização. O TA Branco possui dois depósitos principais: o subcutâneo, presente em camadas abaixo do epitélio, e por isso recobre o corpo inteiro; e o visceral que se localiza no interior das cavidades, recobrando os órgãos. Isso permite uma proximidade física entre o TA Branco e qualquer órgão e tecido que necessita da mobilização de sua reserva energética (Fig. 5) (GESTA et al., 2007).

Figura 5 – Distribuição dos principais depósitos de Tecido Adiposo Branco e Tecido Adiposo Marrom no corpo humano



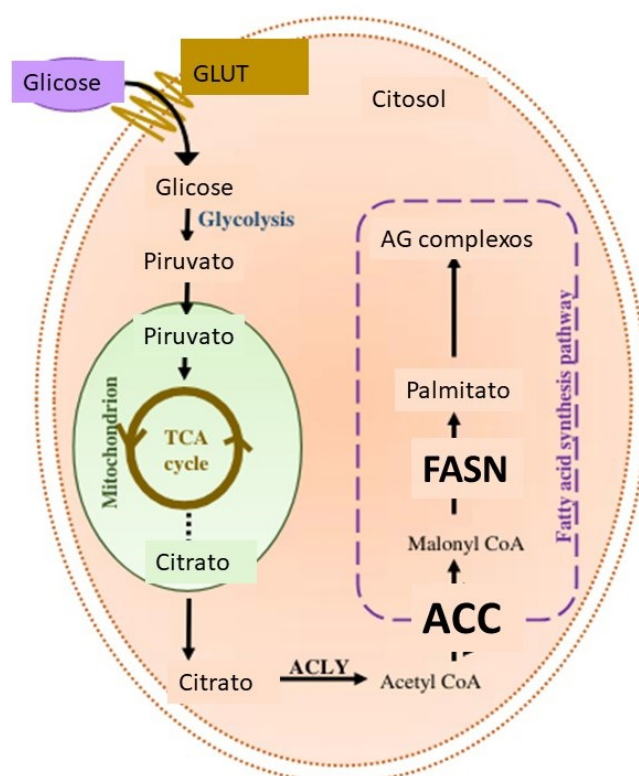
Legenda: Esquema representativo da distribuição dos principais depósitos de tecido adiposo branco e marrom pelo corpo humano. TA: Tecido adiposo

Fonte: Adaptado de GESTA et al., 2007

Já o processo de lipogênese diz respeito à formação do estoque de triacilglicerol, quando há um saldo energético positivo, sinalizado pela insulina. Os ácidos graxos utilizados para esse processo são provenientes tanto da dieta quanto produzidos a partir de outros precursores como os carboidratos, que após serem convertidos à Acetil-coa, podem ser desviados para a via de biossíntese de lipídeos, na qual as enzimas Acetil-CoA carboxilase (ACC) e Ácido Graxo Sintase (FASN) desempenham papel fundamental. Durante a obesidade

esse processo é extremamente exacerbado, causando alterações morfofuncionais significativas neste tecido e impactos metabólicos sistêmicos (Fig. 6) (AMEER et al., 2014) .

Figura 6 – Representação da lipogênese de novo



Legenda: Esquema representativo do processo lipogênico em um adipócito. GLUT: Transportador de glicose; TCA: Ciclo do ácido tricarboxílico; ACLY: ATP-citrato liase; ACC: Acetil-CoA carboxilase; FASN: Ácido graxo sintase.

Fonte: Adaptado de AMEER et al., 2004.

### Adipócitos, pré-adipócitos e outros componentes celulares do TA

Apesar do destaque dos adipócitos, eles não compõem a maioria numérica de células do tecido adiposo. É estimado que 60% das células do TA Branco presentes em depósitos subcutâneos e 80% em depósitos viscerais sejam pertencentes à classe das células vasculares estromais, que compreende pré-adipócitos, células-tronco, células endoteliais e células do sistema imunológico (TCHOUKALOVA; SARR; JENSEN, 2004) .

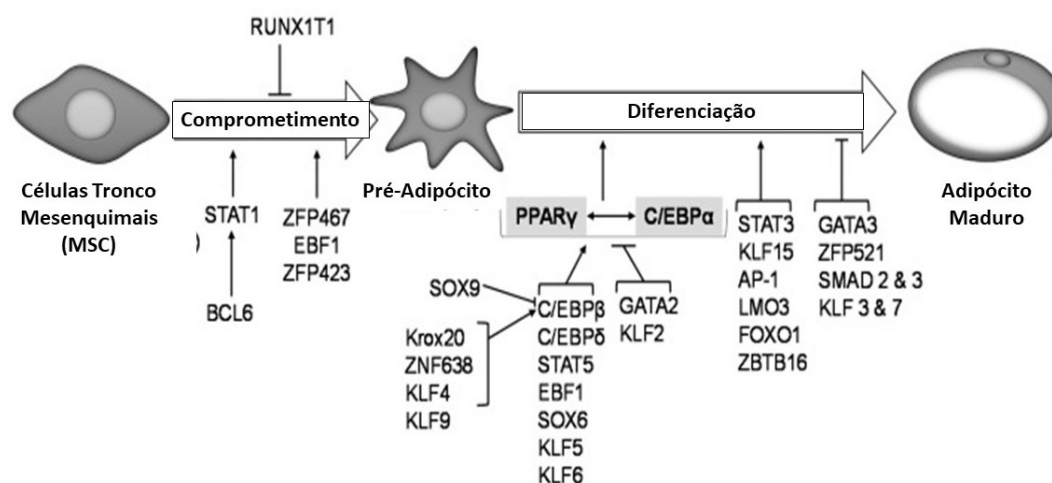
Os componentes do sistema imunológico presentes no TA são macrófagos, eosinófilos, neutrófilos, células T reguladoras (Tregs), células dendríticas, células Natural Killer (NK) e Mastócitos, que são importantes reguladores da homeostase inflamatória do tecido. A

quantidade e perfil das populações de células imunes também reflete o estado fisiológico do tecido, encontrando-se alterado em situações de obesidade (MRAZ; HALUZIK, 2014).

As células-tronco derivadas do tecido adiposo (ADSCs) são assim chamadas pela sua multipotência, ou seja, sua capacidade de se diferenciar em vários outros tipos celulares tais como adipócitos, células ósseas, cartilaginosas, musculares, nervosas e endoteliais (GIMBLE; KATZ; BUNNELL, 2007). Elas atuam na homeostase do TA através da regeneração tecidual e da angiogênese, mas também na liberação de fatores tróficos e imunomodulatórios (ÜÇAL et al., 2021). Elas também são de grande interesse na área da medicina regenerativa devido a sua fácil obtenção em relação a células-tronco da medula óssea, podendo ser coletadas a partir de procedimentos menos invasivos que a punção lombar, como a lipoaspiração, por exemplo. (GIMBLE; KATZ; BUNNELL, 2007).

A adipogênese é o processo de geração de novos adipócitos. Os adipócitos são células não mitóticas, ou seja, não são originados a partir da duplicação de outros adipócitos, mas sim a partir da diferenciação de células precursoras. Esse processo ocorre em duas grandes etapas, a primeira é o comprometimento adipogênico e a segunda é a diferenciação terminal. O comprometimento adipogênico diz respeito à diferenciação de células tronco em pré-adipócitos, já o segundo diz respeito a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos maduros. Esse processo é regulado pela ativação de vias de sinalização, fatores epigenéticos e por fatores de transcrição (Fig. 7) (AMBELE et al., 2020).

Figura 7 – Regulação transcricional da adipogênese



Legenda: Esquema representativo do processo de diferenciação adipogênica. RUNX1T1: Fator de Transcrição Relacionado a Runt Translocado para 1; STAT1: Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 1; BCL6: Linfoma/Leucemia de Células B 6; ZFP467: Proteína de Dedos de Zinco 467; EBF1: Fator de Ligação ao Elemento Precoce 1; ZFP423: Proteína de Dedos de Zinco 423; PPAR $\gamma$ : Receptor Gama Ativado por Proliferador de Peroxissoma; C/EBP $\alpha$ : Proteína de Ligação ao Elemento Realçador de CCAAT Alfa; C/EBP $\beta$ : Proteína de Ligação ao Elemento Realçador de CCAAT Beta; C/EBP $\delta$ :

Proteína de Ligação ao Elemento Realçador de CCAAT Delta; SOX9: Gene Sry-related HMG-box 9; Krox20: Proteína de Dedo de Zinco Krox20; ZNF638: Fator de Dedos de Zinco 638; KLF4: Fator de Transcrição Tipo Kruppel 4; KLF9: Fator de Transcrição Tipo Kruppel 9; STAT5: Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 5; SOX6: Gene Sry-related HMG-box 6; KLF5: Fator de Transcrição Tipo Kruppel 5; KLF6: Fator de Transcrição Tipo Kruppel 6; GATA2: Fator de Transcrição GATA2; GATA3: Fator de Transcrição GATA3; ZFP521: Proteína de Dedos de Zinco 521; SMAD2: Proteína Smad 2; SMAD3: Proteína Smad 3; KLF3: Fator de Transcrição Tipo Kruppel 3; KLF7: Fator de Transcrição Tipo Kruppel 7; STAT3: Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 3; AP-1: Ativador de Proteína 1; LMO3: Proteína Ligadora de Motivos de Linfoma 3; FOXO1: Forkhead box O1; ZBTB16: Proteína com Dedos de Zinco BTB 16..

Nota: Observar que o processo de diferenciação adipogênica consiste em duas etapas extremamente reguladas  
Fonte: Adaptado de AMBELE et al.,2020.

### Pré-adipócitos: além da adipogênese

Além de seu papel crucial na regulação da adipogênese, os pré-adipócitos, dado o seu fenótipo intermediário entre adipócitos maduros e células-tronco, apresentam, mesmo que de forma limitada, funções de ambos os tipos celulares. Por exemplo, eles expressam (de forma crescente ao longo do processo de diferenciação) genes relacionados ao metabolismo lipídico, podendo então contribuir, de forma reduzida, para esse processo. (KRATCHMAROVA et al., 2002)

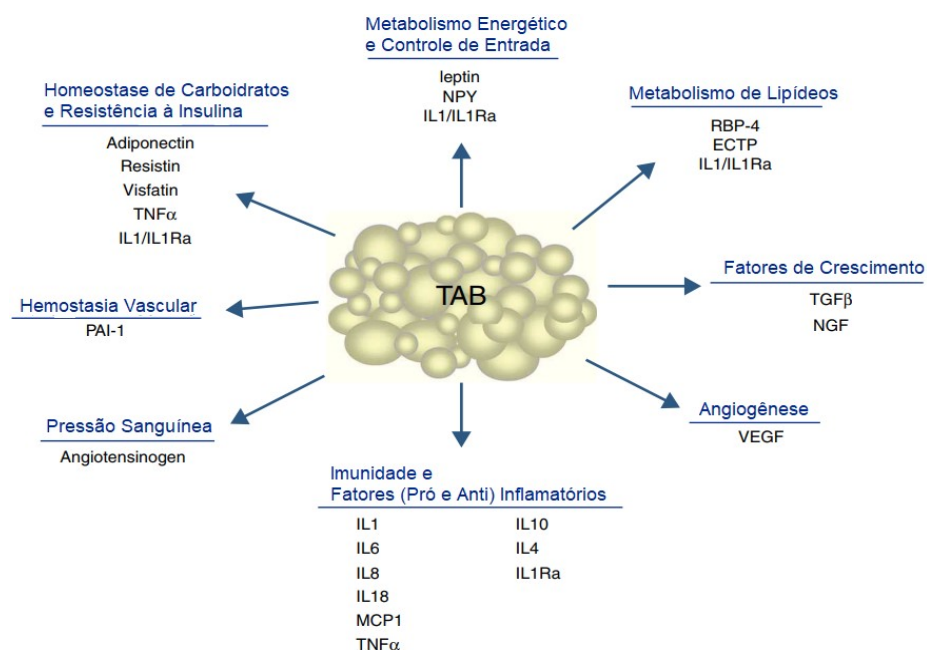
Eles também apresentam propriedades fibroblásticas que se perdem ao longo da diferenciação, como a expressão de colágeno do tipo I, III em estágios iniciais e colágeno do tipo IV, laminina, entactina e glicosaminoglicanos em estágios intermediários de diferenciação, contribuindo de forma importante para a formação da matriz extracelular e da arquitetura do tecido adiposo. (ABDERRAHIM-FERKOUNE et al., 2004) Outro potencial surpreendente dos pré-adipócitos diz respeito a sua função imunológica, podendo assumir um fenótipo com funções fagocíticas semelhantes aos macrófagos (CHARRIÈRE et al., 2003).

### TA branco- regulador endócrino

O TA Branco também possui importantes funções endócrinas, liberando importantes moléculas regulatórias chamadas de adipocinas. A primeira adipocina a ser descrita foi a Leptina, uma proteína de 167 aminoácidos secretada pelo tecido adiposo e que atua diretamente no hipotálamo como um fator de saciedade (FRIEDMAN; HALAAS, 1998;

ZHANG et al., 1994). Desde então foram descobertas várias adipocinas que regulam diversos processos (RÀFOLS, 2014), conforme pode ser observado na Figura 8.

Figura 8 – Processos fisiológicos e metabólicos regulados pelo TA Branco através da secreção de adipocinas



Legenda :Representação de adipocinas liberadas pelo tecido adiposo branco e suas funções.TNF $\alpha$ : Fator de Necrose Tumoral Alfa; IL1/IL1Ra: Interleucina 1/Receptor Antagonista de Interleucina 1; NPY: Peptídeo Y Neuropeptídeo; RBP-4: Proteína de Ligação ao Retinol 4; ECTP: Proteína de Transporte de Éster de Colesterol; PAI-1: Inibidor do Ativador de Plasminogênio 1; IL6: Interleucina 6; IL8: Interleucina 8; IL18: Interleucina 18; MCP1: Proteína Quimiotática de Monócitos 1; IL10: Interleucina 10; IL4: Interleucina 4; TGF $\beta$ : Fator de Crescimento Transformador Beta; NGF: Fator de Crescimento Nervoso; VEGF: Fator de Crescimento Endotelial Vascular.

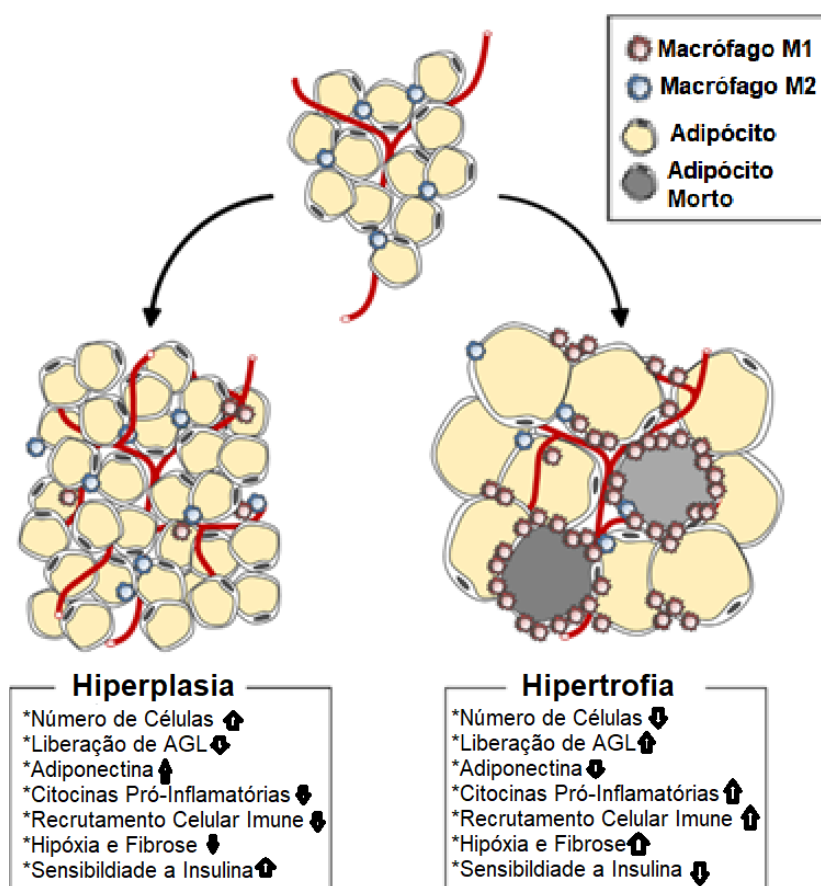
Nota: Observar a diversidade de processos biológicos regulados por adipocinas

Fonte: Adaptado de RÀFOLS,2014

### TA branco- regulador endócrino

A obesidade leva alterações morfofuncionais do TA, afetando sua arquitetura, dinâmicas de interação entre as células, de liberação de moléculas e vesículas extracelulares (VE), gerando impactos sistêmicos que relacionam esta condição a uma série de doenças, inclusive o câncer. A primeira alteração diz respeito ao aumento do volume ou da quantidade de adipócitos presentes no TA Esses dois modelos de expansão do TA são chamados, respectivamente, de hipertrófico e hiperplásico e são formas de aumentar o estoque energético (Fig. 9) (CHOE et al., 2016).

Figura 9 – Características de adipócitos hipertróficos e hiperplásicos



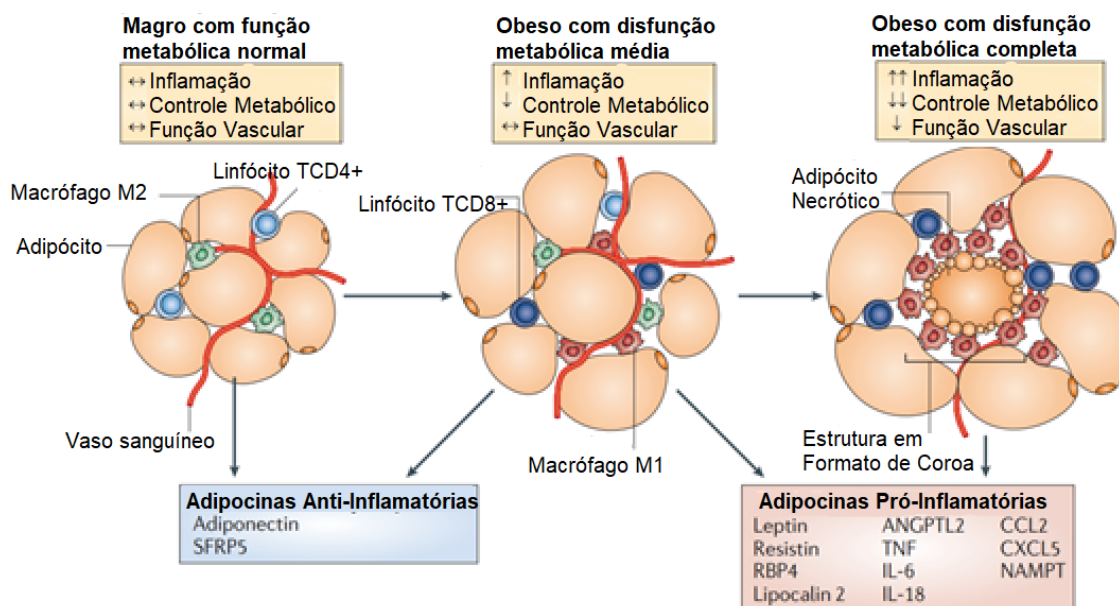
Legenda: Esquema representativo dos modelos hipertrófico e hiperplásico de expansão do tecido adiposo. AGL: Ácidos graxos livres..

Nota: Observar a diferença de perfil inflamatório nos diferentes modelos de expansão.

Fonte: Adaptado de CHOE et al., 2016

O nível de disfunção do tecido é proporcional ao grau de hipertrofia dos adipócitos, que ocorre de forma gradual desde o fenótipo saudável, passando por adipócitos com grau de disfunção metabólica média até adipócitos com um grau de disfunção metabólica completa (Fig. 10) Este aumento do celular excessivo está relacionado à morte por necrose, que por sua vez promove o recrutamento constante de macrófagos com características inflamatórias (M1) para estes sítios, contribuindo para a manutenção do estado inflamatório crônico de baixo grau durante a obesidade (OUCHI et al., 2011).

Figura 10 – Modulação fenotípica do tecido adiposo durante a obesidade



Legenda: Esquema representativo das alterações do tecido adiposo durante o estabelecimento da obesidade. SFRP5: Proteína 5 secretada relacionada ao frizzled; ANGPTL2: Proteína 2 Ligada a Angiopoetina; CCL2: Ligante de Quimiocina 2; CXCL5: Ligante de Quimiocina 5; NAMPT: Nicotinamida Fosforibosiltransferase; TNF: Fator de Necrose Tumoral; RBP4: Proteína de Ligação ao Retinol 4; IL-6: Interleucina 6; IL-18: Interleucina 18.

Nota: Observar a presença de três estágios estruturais e funcionais distintos do tecido adiposo de acordo com o grau de hipertrofia de seus adipócitos: Eutrófico com função metabólica normal; Obeso com disfunção metabólica média; Obeso com disfunção metabólica completa. A transição entre esses estágios é gradual e é caracterizada pelo aumento da inflamação e perda de controle metabólico e da função vascular.

Fonte: Adaptado de OUCHI et al., 2011

É estimado que a população de macrófagos constitua de 5% a 10% do número de células do tecido adiposo no estado magro e chegue até a 50% na condição de obesidade extrema, tanto em humanos quanto em camundongos (WEISBERG et al., 2003).

Além do recrutamento, a obesidade também promove a re-polarização, *in situ*, dos macrófagos. em resposta a estímulos microambientais. Em condições fisiológicas, a maioria dos macrófagos apresenta o perfil M2 (anti inflamatório), mas durante a obesidade o perfil preponderante é o M1 (pró-inflamatório) (YAO; WU; QIU, 2022).

Os próprios adipócitos também alteram seu perfil de liberação de adipocinas durante a obesidade. À medida que seu grau de hipertrofia aumenta, ocorre o aumento da secreção de Fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleucina 6 e 8 (IL-6 e IL-8) e a proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1). O aumento da secreção dessas moléculas reforça o quadro inflamatório do tecido adiposo obeso (JERNÅS et al., 2006).

O crescimento desordenado leva ao comprometimento da vasculatura tecidual, ocasionando em regiões de hipóxia, que por sua vez reforçam o quadro de resistência à insulina e inflamação. (YE, 2009). Adipócitos hipertróficos também apresentam um aumento de sua taxa lipolítica basal, resultando na liberação de ácidos graxos livres (AGL), os quais podem se acumular de forma ectópica (como em músculos e no fígado), induzir lipotoxicidade através do estresse do retículo endoplasmático e do aumento de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (SLAWIK; VIDAL-PUIG, 2006); e também ativar diretamente vias inflamatórias, através do receptor do tipo Toll 4 (TLR-4) (LEE et al., 2003).

### Hiperplasia e outras alterações nos pré-adipócitos durante a obesidade

Outra forma de expansão do tecido adiposo é através da hiperplasia. Há uma relação interessante entre este modelo e as condições de saúde do indivíduo. Indivíduos obesos que apresentam adipócitos em maiores quantidades, porém com menores volumes tendem a ser considerados metabolicamente saudáveis (STEFAN et al., 2013).

A associação entre a adiposidade proveniente de um aumento numérico de adipócitos com menor risco associado às comorbidades da obesidade levou o interesse em desenvolver estratégias terapêuticas com enfoque na diferenciação de pré-adipócitos em indivíduos obesos. A administração do fármaco Rosiglitazona a camundongos obesos promoveu um aumento da sensibilidade à insulina e remodelou o tecido adiposo, levando à diferenciação de pré-adipócitos em novos adipócitos menores e diminuiu a quantidade de adipócitos hipertróficos (KOH et al., 2009). Apesar dos resultados aparentemente positivos, ainda é necessário uma maior investigação sobre os efeitos colaterais da indução de hiperplasia em indivíduos obesos.

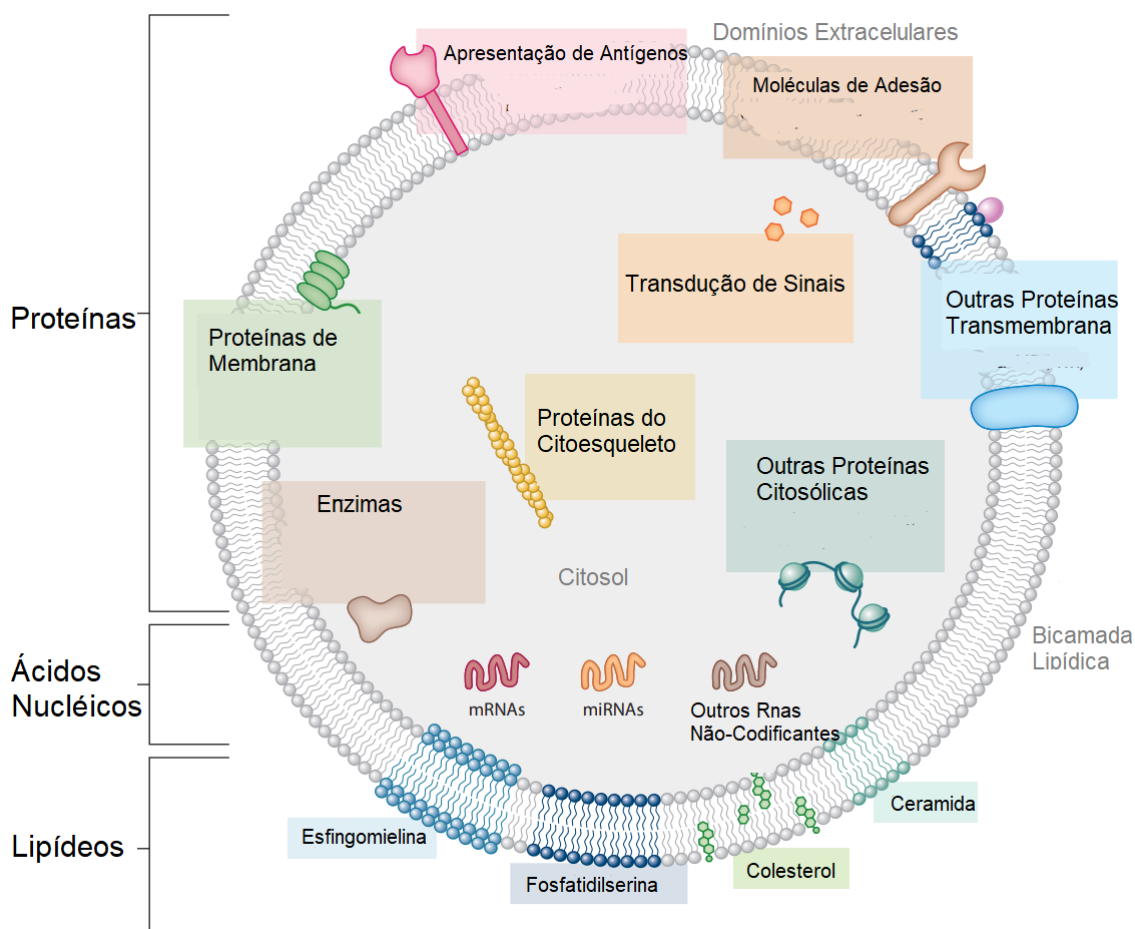
Contudo os pré-adipócitos também podem contribuir diretamente para a manutenção do quadro inflamatório, liberando citocinas pró-inflamatórias. Foi demonstrado que pré-adipócitos 3T3-L1 tratados com o meio condicionado de tecido adiposo obeso, apresentavam um aumento da ativação do Receptor do tipo Toll-4 (TLR4) em resposta aos altos níveis de AGL, levando à produção e secreção de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ . (RENOVATO-MARTINS et al., 2020a).

Foi relatado que em indivíduos obesos com diabetes tipo 2, a diferenciação dos pré-adipócitos se encontra prejudicada devido a alterações no processo de *splicing* de mRNA, a indução de estresse do retículo endoplasmático- afetando a síntese, dobramento e degradação proteica, desregulando a adipogênese (SÁNCHEZ-CEINOS et al., 2021). Além disso, também foi visto, em camundongos obesos, o aumento da expressão da translocase de ácidos graxos CD36 nos pré-adipócitos, levando à disfunção lisossomal e reforçando o estado de inflamação do tecido adiposo. Essas descobertas ressaltam a complexa interação de mecanismos moleculares e interações celulares que contribuem para o estado alterado dos pré-adipócitos no contexto da obesidade (LUO et al., 2020).

#### VE- componentes do secretoma

Além das moléculas que podem ser liberadas de forma solúvel, o TA, assim como outros, é capaz de secretar moléculas de forma compartimentalizada através de VE. O conteúdo das VE pode incluir os mais diversos tipos de biomoléculas como lipídios, açúcares, proteínas e ácidos nucleicos (Figura 11). Estas biomoléculas por sua vez podem atuar como substrato energético, segundos mensageiros, hormônios, enzimas, transportadores, moduladores da transcrição gênica e assim alterar o fenótipo da célula alvo. Vale ressaltar que o conteúdo das vesículas também é um reflexo das condições e do tipo celular que as origina, e que a comunicação por elas mediada é essencial para eventos fisiológicos e patológicos (COLOMBO et al., 2014) .

Figura 11 – Esquema representativo da composição geral das VE



Legenda: Esquema representativo da diversidade de conteúdo presente em vesículas extracelulares. mRNAs: RNAs mensageiros; miRNAs: microRNAs de interferência.

Nota: Observar a diversidade de biomoléculas que podem ser transportadas através de vesículas extracelulares

Fonte: Adaptado de COLOMBO et al., 2014

Além de classes gerais de moléculas, o tecido adiposo é capaz de secretar adipocinas específicas através de VE, as chamadas exoadipocinas relatadas por Hartwig e colaboradores, o que reforça a noção das VE como parte essencial do secretoma do tecido adiposo (HARTWIG et al., 2019).

A classificação das VE, assim como estabelecimento de métodos padronizados, ainda é não há consenso na literatura, apesar dos esforços da Sociedade Internacional de VE (ISEV) nesta direção. Até pouco tempo atrás as vesículas eram classificadas em 3 grupos, a depender de sua biogênese e tamanho: microvesículas, exossomos e corpúsculos apoptóticos (COLOMBO et al., 2014).

Os corpúsculos apoptóticos são originados durante o processo de apoptose, no qual há fragmentação da célula em partes menores, e não atuam diretamente sobre a comunicação intercelular. Os exossomos são pequenos em tamanho- até 150 nm- e são originados por corpúsculos multivesiculares da membrana endossomal (MENU; VANDERKERKEN, 2022). Por fim as microvesículas apresentam um tamanho relativamente maior, chegando no máximo a 1000 nm, e são originadas por brotamento da membrana plasmática. Esta classificação ainda é válida porém na ausência de marcadores de biogênese para comprovar suas origens, a nomenclatura mais adequada seria VE Menores e VE Maiores (WELSH et al., 2024).

Além da nomenclatura, outro ponto importante de padronização diz respeito a metodologia de estudo das VE, principalmente aos processos de Isolamento e Caracterização. A técnica mais utilizada para a concentração e coleta das VE é a Centrifugação Diferencial, no qual é aplicada força centrífuga de forma crescente ao líquido contendo as VE (que pode ser o sobrenadante da cultura de células e tecidos ou outros fluídos biológicos como sangue, leite, saliva), separando-as por densidade. Vale ressaltar que o isolamento perfeito de uma subpopulação de VE não é possível, de forma que é possível minimizar mas não abolir a sobreposição de diferentes faixas de tamanho dentro dos protocolos (WELSH et al., 2024)

### Alterações em VE durante a obesidade

Além das alterações nos diferentes componentes celulares do tecido adiposo, a obesidade também promove alteração no perfil de secreção de VE. Em trabalhos prévios de nosso grupo, foi descrito que indivíduos obesos apresentam um aumento na quantidade de VE circulantes em relação aos eutróficos, em especial a partir dos leucócitos e pré-adipócitos (RENOVATO-MARTINS et al., 2017). No mesmo sentido, após a perda de peso, seja pela aplicação de dieta combinada exercício ou por procedimento cirúrgico, ocorre uma redução significativa do nível plasmático de VE, porém sem haver a reversão ao nível de indivíduos que não foram obesos (CAMPELLO et al., 2016).

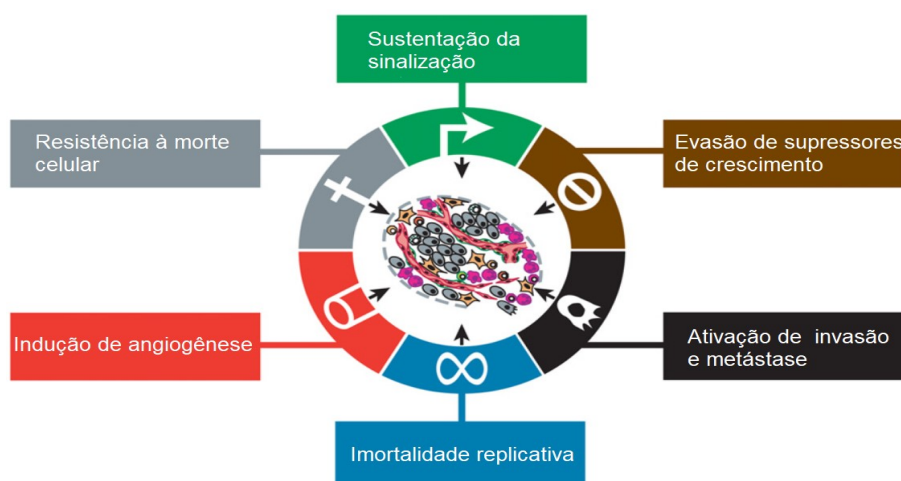
Além de alterações na quantidade, também foi relatado alterações significativas na carga das VE durante a obesidade, principalmente através de análises proteômicas e de microRNAs. (FERRANTE et al., 2015; LEE et al., 2015). Elas também promovem alterações funcionais nas células-alvo relevantes para diversas doenças. Em outro trabalho de nosso

grupo, vimos que VE liberados pelo tecido adiposo obeso amplificaram parâmetros malignos de linhagens tumorais de mama como migração e invasão (RAMOS-ANDRADE et al., 2020).

### O câncer e seus *hallmarks*

Um referencial teórico muito importante para a compreensão do câncer são os chamados “*Hallmarks* do câncer”. Inicialmente propostos por Hanahan e Weinberg nos anos 2000, eles consistam em 6 características básicas compartilhadas por quase todos os tipos de tumores. São eles: sustentação de sinalização proliferativa; evasão de supressores de crescimento; ativação de invasão e metástase; resistência à morte celular; imortalidade replicativa e indução de angiogênese (Fig. 13) (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

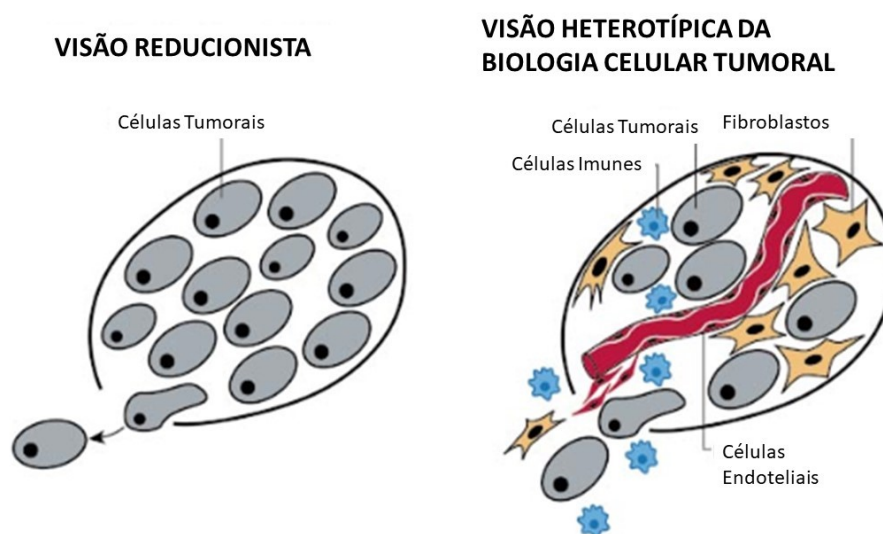
Figura 12 – Os seis *hallmarks* clássicos do câncer



Legenda: Diagrama representativo dos seis hallmarks clássicos do câncer. .  
Fonte: Adaptado de HANAHAN; WEINBERG,2000.

Além disso, outra perspectiva conceitual defendida neste trabalho foi a compreensão da existência e relevância do microambiente tumoral. Ela se dá em oposição à visão reducionista, na qual tumores são uma massa homogênea de células; e a visão heterotípica da biologia celular tumoral concebe um tumor como um tecido complexo formado por vários tipos celulares diferentes, incluindo células estromais não-modificadas (Fig. 13). Esta visão dá destaque à relação bidirecional de regulação fenotípica entre as células tumorais e os outros tipos celulares que constituem o microambiente tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Figura 13 – O microambiente tumoral



Legenda: Representação da evolução conceitual da visão reducionista para visão heterotípica da biologia celular tumoral,

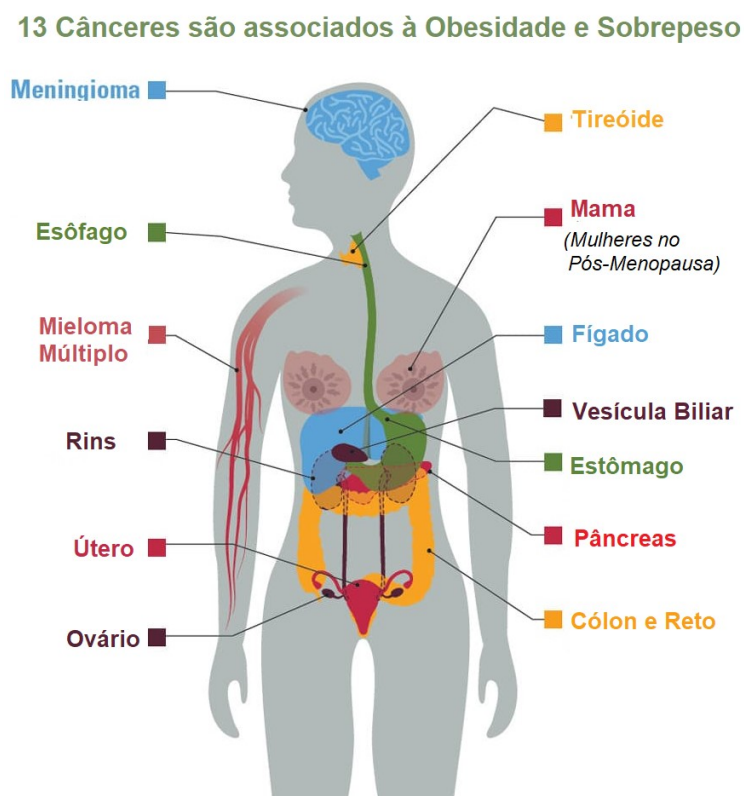
Nota: Observar que na visão heterotípica as células não transformadas passam a ser representadas e constituem o chamado microambiente tumoral.. .

Fonte: Adaptado de HANAHAN; WEINBERG,2000.

A partir de então houve mais duas atualizações em 2011 e em 2022, com advento de mais *hallmarks*: reprogramação do metabolismo energético, evasão da destruição imunológica como a indução de plasticidade fenotípica- associada à capacidade de desdiferenciação, reprogramação epigenética e o microbioma. Além disso, também foram reconhecidos dois fatores como potencializadores para a aquisição dos *hallmarks*: instabilidade genômica e inflamação (HANAHAN, 2022; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

A obesidade é uma condição capaz de promover o câncer como é demonstrado por diversos estudos epidemiológicos. Ao menos treze tipos de câncer são associados: adenocarcinoma do esôfago, mama, cólon e reto, útero, vesícula biliar, estômago, rins, fígado, ovários, pâncreas, tireoide, meningioma e mieloma múltiplo (Fig. 14) (CDC,2023). Ela é considerada o segundo maior fator de risco evitável para o câncer de acordo com a Associação Americana de Pesquisa do Câncer, atrás apenas do fumo de tabaco (Fig.15) (AACR, 2021).

Figura 14 – Treze tipos de câncer associados à obesidade e sobrepeso



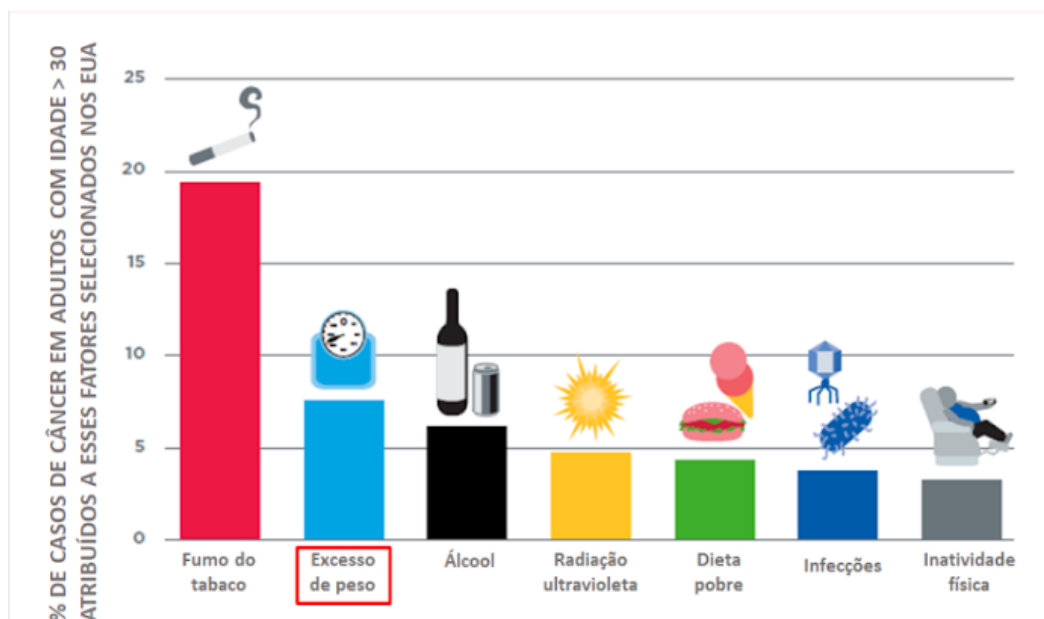
Legenda: Esquema representativo de 13 tipos de câncer associados à obesidade e sobrepeso.

Nota: Observar que o câncer de mama está incluso nessa lista.

Fonte: Adaptado de CDC, 2023

Quase 20% dos diagnósticos, e 16% das mortes, por câncer nos EUA no ano de 2014 estavam relacionados ao excesso de peso corporal, ingestão de álcool, dieta inadequada e inatividade física (ISLAMI et al., 2018). É importante notar que os fatores de risco não são excludentes, sendo muitas das vezes concomitantes dentro de um determinado estilo de vida. Além disso são evitáveis, o que implica que vários casos de câncer poderiam ser prevenidos através de mudanças comportamentais.

Figura 15 - Porcentagem de casos de câncer associados a fatores de risco evitáveis em adultos com idade acima de 30 anos nos EUA



Legenda: Esquema representativo da porcentagem de casos de câncer associados a fatores de risco evitáveis em adultos acima de 30 anos nos EUA.

Nota: Observar que o excesso de peso é o segundo maior fator de risco evitável para o câncer.

Fonte: Adaptado de AACR, 2021.

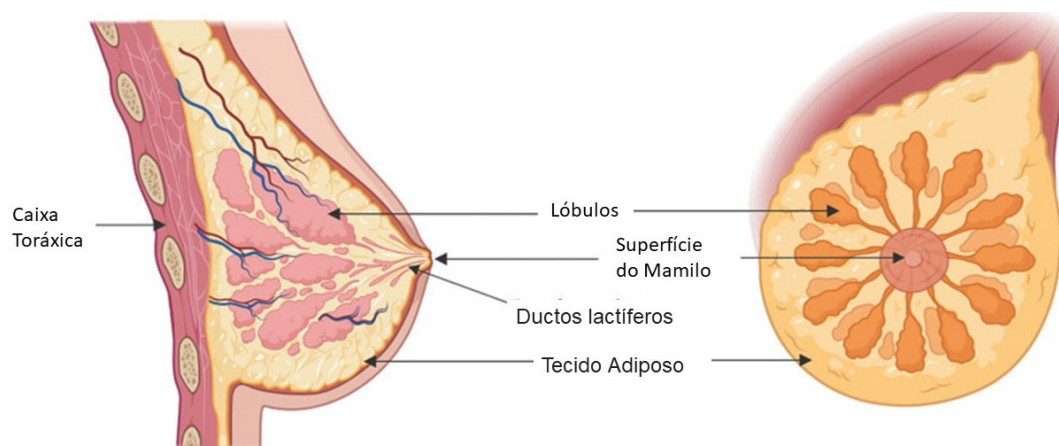
### Câncer de mama

De acordo com a organização mundial da saúde, em 2022 foram diagnosticadas 2,3 milhões de mulheres com câncer de mama e ocorreram 670 mil mortes em todo o mundo. (OMS, 2024). Este tipo de tumor ocorre predominantemente em mulheres, porém homens também podem ser afetados. Assim como outros tipos de câncer, o prognóstico tende a ser melhor quanto mais cedo diagnosticado. Em estágios iniciais, não costuma apresentar sintomas claros, sendo o indicativo mais comum a presença de nódulos estranhos na mama. Na maioria dos casos os nódulos não são malignos, mas caso forem, eles podem aumentar de tamanho e o tumor pode se espalhar para outros órgãos e tecidos, como os linfonodos, pulmões, fígado e cérebro (OMS,2024).

A mama é composta por diversos tipos de células e é organizada em 3 grandes estruturas: lóbulos, que são glândulas produtoras de leite; ductos, que são pequenos tubos que

transportam o leite dos lóbulos ao mamilo; e estroma, constituído por tecido adiposo e conjuntivo que envolve os ductos, lóbulos, vasos sanguíneos e linfáticos (Fig. 16). (ORRANTIA-BORUNDA; ACUÑA-AGUILAR; RAMÍREZ-VALDESPINO, 2022)

Figura 16 - Estrutura da mama



Legenda: Esquema representativo da estrutura da mama.  
Fonte: Adaptado de ORRANTIA-BORUNDA et al., 2022.

O câncer de mama pode se desenvolver a partir de qualquer célula presente na mama, geralmente iniciando-se nas células epiteliais, conhecidas como carcinomas. Quando o câncer começa no tecido epitelial glandular, é chamado de adenocarcinoma. Os principais tipos de adenocarcinoma são o carcinoma ductal *in situ* (DCIS) e o carcinoma lobular *in situ* (LCIS). A classificação do câncer de mama é feita com base no fenótipo microscópico das células e é menos comum que o câncer se desenvolva nos tecidos estromais (ORRANTIA-BORUNDA et al., 2022).

### Linhagem MDA-MB-231

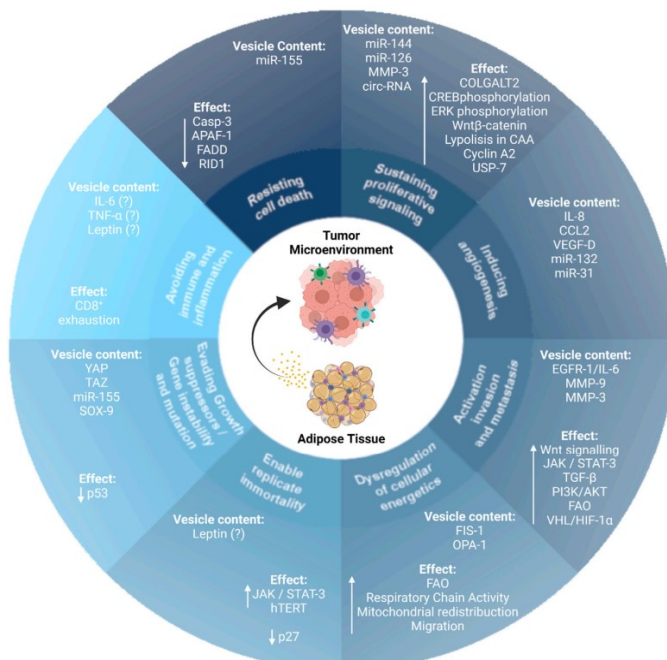
Uma linhagem tumoral muito utilizada na pesquisa é a MDA-MB-231. A linhagem celular MDA-MB-231 possui caráter altamente invasivo tem como característica a ausência de receptores de estrogênio (ER<sup>-</sup>), progesterona (PR<sup>-</sup>) e fator de crescimento epidermal (HER2<sup>-</sup>), sendo conhecida como triplo negativa (HOLLIDAY; SPEIRS, 2011). Estas assinaturas moleculares, além de servirem para sua identificação, possuem relevância clínica pois a ausência de responsividade a hormônios limita bastante as opções terapêuticas, de forma que pacientes com cânceres de mama do tipo triplo negativo apresentam um pior prognóstico em relação a outros subtipos (BIANCHINI et al., 2016)

## Elos entre obesidade e câncer.

O estado de obesidade e os processos de carcinogênese, progressão e metástase apresentam características compartilhadas. Alguns exemplos são: alteração na secreção e metabolismo de ácidos graxos, remodelamento da matriz extracelular, secreção de hormônios anabólicos e sexuais, desregulação imunológica, inflamação crônica e alterações no microbioma intestinal (LIU; PEDERSEN; HALBERG, 2021). Os vários mecanismos moleculares por trás desta relação e suas complexas interações ainda não foram completamente elucidados, porém o papel das VE vem se mostrando cada vez mais relevante.

Em um trabalho recente de revisão do nosso grupo, trouxemos evidências de como as VE liberadas pelo tecido adiposo obeso atuam sobre cada um dos *hallmarks* do câncer (Fig. 17) em diferentes modelos como: mama, melanoma, hepatocarcinoma, pulmão, próstata e ovário (Fig. 18). (MORAES et al., 2021).

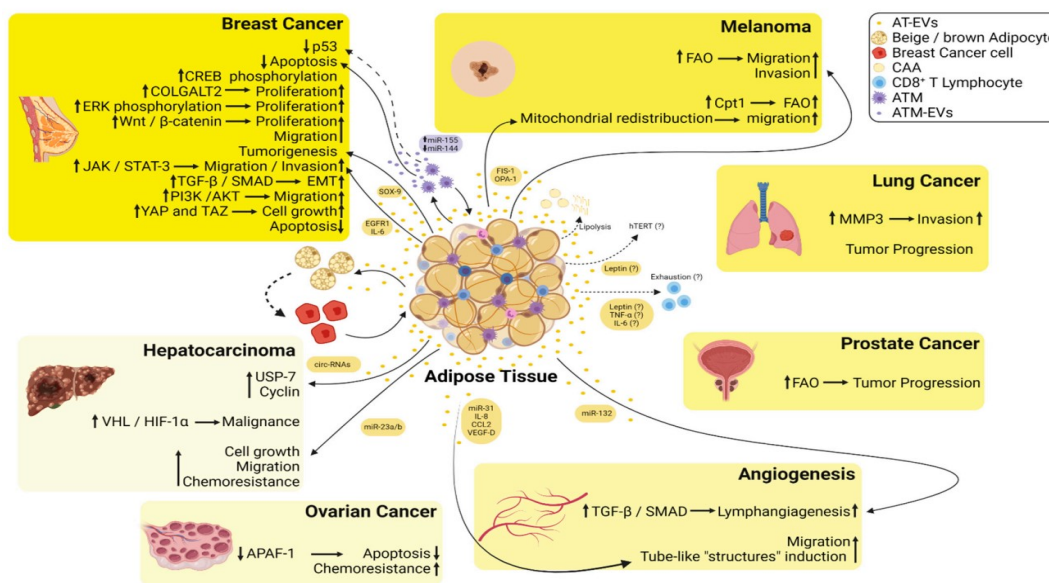
Figura 17 - VE derivadas de tecido adiposo modulam a aquisição e manutenção de traços marcantes do câncer



Legenda: Esquema representativo do conteúdo e efeito de VE libertadas pelo tecido adiposo sobre a aquisição e manutenção de traços marcantes do câncer.

Fonte: Reproduzido de MORAES et al., 2021.

Figura 18 - Resumo da interferência entre as VE derivadas de tecido adiposo e vários tipos de câncer



Legenda: Esquema representativo da interferência entre as VE derivadas de tecido adiposo e vários tipos de câncer.

Fonte: Reproduzido de MORAES et al.,2021.

## Metabolismo tumoral

Como destacado, alterações no metabolismo energético constituem uma característica chave para desenvolvimento tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Essas adaptações metabólicas ocorrem através tanto da otimização da captura de diferentes substratos energéticos como glicose, ácidos graxos e aminoácidos, quanto de sua metabolização, pelo aumento da eficiência de determinadas enzimas metabólicas que assim irão determinar a direção e taxa de funcionamento de determinadas vias (PAVLOVA; THOMPSON, 2016).

## Efeito Warburg

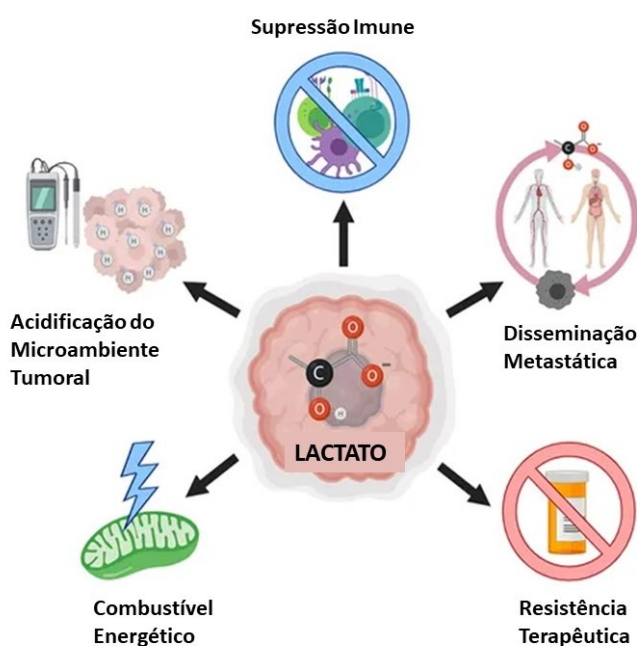
No meio da década de 1920, Otto Warburg publicou um conjunto de trabalhos que seriam um importante marco para o campo do estudo de metabolismo tumoral. Nestes trabalhos foi relatado um comportamento peculiar nas células tumorais: uma alta dependência do metabolismo glicolítico em detrimento do metabolismo oxidativo, mesmo na presença de

oxigênio (LIBERTI; LOCASALE, 2016). Este fenômeno de glicólise aeróbica em células tumorais foi nomeado em sua homenagem, o chamado Efeito Warburg.

Apesar de um aparente contrassenso, visto que a glicólise é uma via metabólica menos eficiente para produção de energia, ela apresenta algumas vantagens no contexto tumoral. A via glicolítica é uma via de produção de ATP mais rápida que a fosforilação oxidativa e apesar de produzir menos moléculas de ATP, as células tumorais apresentam formas de contornar essa desvantagem como o aumento da captação da glicose e da atividade enzimas glicolíticas. O aumento da glicólise também permite o desvio de seus intermediários para importantes vias de biossíntese e produz cofatores importantes para a manutenção e regulação de outras vias metabólicas (LIBERTI; LOCASALE, 2016).

O aumento da captação e metabolização de glicólise fornece vantagens competitivas para essas células no microambiente tumoral. Em condições de privação de nutrientes, as células tumorais que apresentam uma maior captação de glicose prevalecem em relação às células estromais não alteradas. O lactato, um subproduto da glicólise, também é capaz de alterar o pH do microambiente tumoral, acidificando-o (Fig. 19). Essa acidez está relacionada a uma diminuição da atividade de células T e de Leucócitos, indução de angiogênese, remodelação da matriz extracelular e autofagia. (DE LA CRUZ-LÓPEZ et al., 2019).

Figura 19 - Lactato atua como regulador tumoral



Legenda: Esquema representativo da regulação tumoral pelo lactato  
 Fonte: Adaptado de DE LA CRUZ-LÓPEZ et al.,2019

### Coexistência do metabolismo oxidativo

Warburg atribuiu essa alteração metabólica a lesões mitocondriais. Ele não apenas considerava que a disfuncionalidade mitocondrial fosse uma característica universal no desenvolvimento do câncer, como também a própria causa dele (WARBURG, 1956). No entanto, durante a década de 1950 sua interpretação sobre a disfunção mitocondrial foi questionada. Chance e colaboradores demonstraram que os citocromos, componentes da cadeia respiratória, estavam intactos e funcionais em células tumorais, indicando que não havia disfunção mitocondrial esperada (CHANCE; HESS, 1956). Isso significa que o aumento da glicólise em tumores não se dá pela incapacidade da fosforilação oxidativa, mas sim por uma desregulação da própria glicólise.

Contudo, é possível a coexistência do metabolismo glicolítico com o metabolismo oxidativo em células tumorais. Hensley e colaboradores utilizaram marcação de glicose com isótopo radioativo de carbono 13 e metabolômica para analisar amostras de 9 pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC). Foi relatado um aumento tanto da glicólise quanto do TCA em NSCLC em relação ao tecido pulmonar saudável adjacente, contrariando a interpretação clássica de que células com alto metabolismo glicolítico encontram-se necessariamente com o metabolismo oxidativo suprimido (HENSLEY et al., 2016).

Além da diferença entre células tumorais e estromais, também foi relatado a diferença intratumoral. Áreas com alta perfusão sanguínea apresentaram uma menor contribuição da glicose para seu metabolismo oxidativo, enquanto áreas de baixa perfusão apresentaram uma maior dependência da glicose para o seu metabolismo oxidativo. Ademais, em outro estudo, foi evidenciado o potencial terapêutico desta característica metabólica, no qual o reposicionamento farmacológico – uso de um composto inibidor da enzima trifuncional, que atua na oxidação de ácidos graxos- promoveu a redução do volume tumoral na população de células NSCLC com perfil oxidativo (AMOEDO et al., 2021). Em conjunto, estes dados trazem luz a duas questões importantes: a relevância do metabolismo oxidativo para células tumorais e sua heterogeneidade metabólica, tanto entre quanto dentro dos tumores.

## Regulação do metabolismo tumoral

O metabolismo tumoral apresenta alterações principalmente sobre os processos de captação e transformação de glicose, ácidos graxos e glutamina. Os mecanismos que regulam essas alterações ocorrem tanto por fatores extrínsecos quanto intrínsecos. Fatores extrínsecos dizem respeito as condições do microambiente tumoral tais como a vascularização, relacionada ao aporte de nutrientes e oxigênio, e também sobre relações de cooperação e competição com outras células estromais (CAIRNS; HARRIS; MAK, 2011).

Já fatores intrínsecos dizem respeito ao oncogenótipo, ou seja, o perfil de mutações em oncogenes e genes supressores de tumor que essas células apresentam. A ativação desregulada de vias oncogênicas é capaz de aumentar ou diminuir os níveis de transcrição de diversas enzimas metabólicas (PARK; PYUN; PARK, 2020). Alterações em vias oncogênicas também podem coordenar indiretamente processos metabólicos ao regular modificações pós-traducionais nestas enzimas que implicam em sua localização, estabilidade, atividade ou preferência de substrato (SUN; LV; SONG, 2021).

## Metabolismo da glicose

Os destinos metabólicos da glicose são variados. Após sua entrada na célula tumoral, ela pode ser utilizada para geração de energia, principalmente através da glicólise, ou para vias de biossíntese como a via das hexosaminas (HSP), das pentoses-fosfato (PPP) ou para produção de serinas (SSP). Essas rotas metabólicas permitem a produção de importantes precursores e intermediários a partir da glicose que se conectam a outras vias metabólicas como nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), nucleotídeos, piruvato, aminoácidos e grupos metil (PARK; PYUN; PARK, 2020).

No que tange ao destino glicolítico, a glicose é convertida em piruvato através de um conjunto de 10 reações catalisadas por enzimas livres no citoplasma, gerando ATP e NADH no processo. A entrada da glicose no citoplasma é mediada por proteínas transportadoras de glicose (GLUT) e logo após sua internalização, essa molécula é fosforilada pelas hexoquinases. Essa fosforilação é o primeiro passo da glicólise e impede a sua saída para o meio extracelular (PARK; PYUN; PARK, 2020).

Mutações em oncogenes como c-MYC, KRAS e YAP regulam positivamente a expressão de GLUT1 em células tumorais. (COX et al., 2018; OSTHUS et al., 2000; YING et al., 2012). A via da fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K) /AKT, que se encontra comumente hiperativa em diversas linhagens tumorais, aumenta a atividade da Hexoquinase-2 (HK2), importante para a mobilização glicolítica (ROBERTS et al., 2013).

O piruvato gerado pela glicólise pode ser convertido à lactato pela enzima lactato desidrogenase (LDH). Esta conversão é importante para a manutenção da glicólise através da regeneração de NAD<sup>+</sup>, constituindo-se em um importante mecanismo para a manutenção da glicólise nas células tumorais (PARK; PYUN; PARK, 2020).

### Via das PPP

Outro destino para a glicose é a via das PPP, uma via metabólica que produz NADPH e ribulose-5-fosfato (R5P). Esta via é importante para a replicação celular pois a R5P é um precursor para a síntese de nucleotídeos, um processo que se encontra aumentado durante a duplicação do material genético. Já NADPH é importante para a síntese de ácidos graxos e para proteção do estresse oxidativo. Dado o seu potencial redutor, NADPH fornece os elétrons necessários para o alongamento da cadeia de ácidos graxos e também é capaz de regenerar glutatona (GSH), um tripeptídeo-chave para a homeostase redox a partir de dissulfeto de glutatona e assim proteger as células tumorais do estresse oxidativo (STINCONE et al., 2015).

Células tumorais com ativação aberrante de mTORC1 apresentam um aumento de expressão de enzimas limitantes da PPP, como a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e a ribose-5-fosfato isomerase A (RPIA) (DÜVEL et al., 2010). Outra mutação com papel regulatório positivo sobre a PPP diz respeito à perda de função da proteína supressora de tumor p53, visto que p53 é capaz de inibir a G6PD. A ausência deste mecanismo de inibição também é uma forma de manter alta a atividade da PPP (JIANG et al., 2011).

### Metabolismo de lipídeos

A reprogramação do metabolismo lipídico em células tumorais é uma característica cuja relevância se torna cada vez mais evidente. Lipídeos constituem um grupo diverso de

moléculas insolúveis em água e são relevantes para fins energéticos, estruturais e de sinalização celular. Para suprir sua alta demanda lipídica, as células tumorais são capazes de adotar duas estratégias: o aumento da síntese de novo de lipídios ou o aumento da captação de ácidos graxos presentes no meio extracelular (TORCASIO et al., 2023)

### Síntese de ácidos graxos

A síntese de novo é um processo anabólico que envolve várias enzimas e elementos regulatórios. A depender da presença ou ausência de insaturação, os ácidos graxos podem apresentar diferentes origens de biossíntese: tanto ácidos graxos saturados quanto monoinsaturados (MUFAs) têm como ponto de partida a molécula de Acetil CoA, enquanto os poli-insaturados (PUFAs) são sintetizados a partir de ácido linoleico e ácido  $\alpha$ -linoleico, ácidos graxos essenciais adquiridos pela dieta (BISHOP et al., 2015).

Lee e colaboradores relataram o aumento de expressão de ELOVL5 e FADS1 em células de câncer gástrico do tipo mesenquimal. Essas enzimas estão envolvidas na biossíntese de PUFA e seu aumento de expressão foi relacionado ao aumento de sensibilização à ferroptose. Em contraste estas enzimas encontram-se silenciadas em células de câncer gástrico do tipo intestinal, tornando-as mais resistentes à ferroptose. 1 (LEE et al., 2020).

Zhang e colaboradores também relataram a modulação metabólica de PUFA como uma estratégia de resistência à ferroptose explorada por células tumorais, só que evidenciando o papel de VE como importantes agentes nesta dinâmica. Foi visto que exossomos derivados de adipócitos (AD-EXOs) promovem, in vitro, quimiorresistência à oxiplatina em linhagens de células câncer de colo retal humanas (HCT116 e SW480) através da transferência da enzima MTTP, altamente presente nos AD-EXOs, resultando na inibição da expressão da enzima Acil-CoA sintetase 4 (ACSL4), aumento da expressão do transportador de cistina (xCT) e da enzima glutationa peroxidase 4 (GPX-4). Juntas, tais alterações desencadearam menor proporção de PUFA e de peroxidação lipídica, diminuindo também a ferroptose induzida pela Oxaliplatina nestas células tumorais (ZHANG et al., 2022).

Já ácidos graxos saturados e MUFAs são originados a partir de Acetil-Coa. Em excesso na mitocôndria, o citrato é transportado para o citoplasma, onde é convertido em Acetil Coa pela enzima ATP-citrato-Liase (ACLY). Posteriormente, o Acetil-CoA é convertido em Malonil-CoA pela enzima acetil-CoA carboxilase (ACC). Em seguida a enzima ácido graxo sintase (FASN) utiliza como substrato este Malonil- CoA adicionando 2 unidades de carbono a uma cadeia crescente até dar origem ao Palmitato, um ácidos graxos de 16 carbonos com

papel central. O palmitato pode então passar por diferentes reações de alongamento ou dessaturações para gerar ácidos graxos bioativos com diferentes comprimentos e graus de saturação, como o ácido esterárico ou o ácido oleico (BISHOP et al., 2015).

Algumas células tumorais apresentam o aumento dos níveis de enzimas envolvidas na síntese de ácidos graxos. Um exemplo é ACLY, cuja superexpressão em adenocarcinoma pulmonar e leucemia mieloide aguda está diretamente relacionada a um pior prognóstico (ICARD et al., 2020). Foi relatado que a estabilização dos níveis de ACLY é um mecanismo necessário para manutenção da viabilidade de células tumorais de pulmão e que quando essa estabilização era perturbada através da administração de CUL 3, uma proteína que regula a ubiquitinação de ACLY, houve a redução da síntese lipídica, da proliferação celular e do crescimento tumoral de xenoinxerto em camundongos (ZHANG et al., 2016).

### Disponibilização de ácidos graxos

Outras células tumorais suprem sua alta demanda lipídica aumentando a captação de AGL, através da superexpressão de transportadores como CD36, proteína transportadora de ácidos graxos (FATP) e proteínas auxiliares como proteína de ligação á ácidos graxos (FABP). Bensaad e colaboradores relataram o aumento de absorção de ácidos graxos em células de câncer de mama através do aumento de expressão das proteínas FABP3, FABP7 e ADRP de forma dependente de HIF-1 $\alpha$  (BENSAAD et al., 2014). Nath e colaboradores relataram que o aumento da captação de ácidos graxos livres via CD36 promove a transição epitelial-mesenquimal no carcinoma hepatocelular (NATH et al., 2015).

Em outro estudo foi relatado o aumento da atividade de ACSL3, um subtipo de Acil-Coa-Sintetase, em células tumorais pulmonares com alterações no oncogene KRAS. Esta enzima é responsável pela ativação de ácidos graxos, e sua inibição foi associada a diminuição da oxidação lipídica, da proliferação e viabilidade dessas células (PADANAD et al., 2016).

### Catabolismo de lipídeos

A oxidação de lipídeos (FAO) se encontra alterada em células tumorais. Foram relatados aumentos de 3 a 4 vezes na expressão da enzima Carnitina-Palmitoil-Transferase (CPT)-1A1B e -2 em células de leucemia linfocítica crônica em comparação com células

estromais normais (LIU et al., 2016). A superexpressão de algumas enzimas da FAO, como CPT1A, correlaciona-se fortemente com o aumento de malignidade de cânceres como leucemia mieloide aguda e câncer de ovário (SHAO et al., 2016; SHI et al., 2016)

Camarda e colaboradores conduziram um estudo metabolômico para compreender as alterações metabólicas em células de câncer de mama triplo-negativo que superexpressam o fator de transcrição oncogênico c-Myc. Neste estudo foi relatado o aumento de enzimas e intermediários metabólicos da FAO em HS578T, HCC1143, BT549 e SUM159PT. Também foi visto que o bloqueio de FAO por etomoxir inibiu seu potencial tumorigênico indicando o papel crucial de FAO para células de câncer de mama triplo negativas (CAMARDA et al., 2016).

Outro exemplo de células de câncer de mama sendo influenciadas pela FAO foi relatado por Wang e colaboradores. Em seu estudo foi demonstrado que a liberação de leptina por adipócitos é capaz de ativar a via JAK/STAT3, levando ao aumento da transcrição de CPT1B, e conseqüentemente de FAO por células tumorais de mama das linhagens BBM2 e BBM3. Também foi relatado que a inibição de FAO eliminou seletivamente as células-tronco do câncer de mama e aumentou a sensibilidade das células à quimioterapia por paclitaxel, sendo um mecanismo importante para quimioressistencia (WANG et al., 2018).

Lazar e Clement demonstraram que VE de adipócitos estimulam FAO em células de melanoma humano. Esse processo ocorre através da transferência tanto de substrato quanto de enzimas da oxidação de ácidos graxos como ECHA (uma subunidade da proteína trifuncional) e HCDH (hidroxiacil-coenzima A desidrogenase). A indução da oxidação de ácidos graxos pelas VE está diretamente relacionada à redistribuição mitocondrial para as protrusões da membrana e a capacidade de migração. Este processo se encontra particularmente aumentado na obesidade, sendo o diferencial não a quantidade de conteúdo lipídico transferido pelas VE, mas sim os níveis de enzimas transferidas entre as duas condições (CLEMMENT et al., 2020; LAZAR et al., 2016).

Porém nem sempre o aumento de FAO se reflete na produção de ATP. Wang e colaboradores realizaram a co-cultura de adipócitos com as linhagens tumorais de mama invasivas ZR-75-1 e SUM159PT e viram aumento da delipidação dos adipócitos, transferência de AGL para as células tumorais e aumento da  $\beta$ -oxidação. Surpreendentemente o aumento da FAO foi relacionado ao aumento da capacidade invasiva destas células, mas não foi acoplado à produção de ATP. O mecanismo molecular foi a ativação dos fatores de transcrição PPAR $\alpha/\delta$  e PGC1 $\alpha$  que regulam a expressão de genes envolvidos no metabolismo de ácidos graxos e na biogênese mitocondrial, como a proteína desacopladora 2 (UCP2), que dispersa a

força próton-motriz, de forma que a energia gerada não foi aplicada ao aumento da produção de ATP. Apesar de não ser responsável pelo aumento dos níveis de ATP, a FAO se demonstrou essencial para o aumento do perfil invasivo destas células pois quando inibida houve a reversão do seu aumento invasivo. (WANG et al., 2017). Uma possível vantagem deste desacoplamento seria a possibilidade de oxidação de ácidos graxos contínua em um meio abundante de lipídeos, que aumenta sua capacidade migratória, porém sem despertar a resposta inibitória pelo acúmulo de ATP.

### **Justificativa**

Apesar da relevância da obesidade sobre o câncer de mama ser reconhecida por diversos estudos epidemiológicos, os mecanismos moleculares por trás dessa relação ainda não são completamente conhecidos e essa lacuna ocasiona em limitações terapêuticas. No que tange ao estado da arte, percebe-se a emergência de dois grandes temas de pesquisa na área do câncer: o metabolismo tumoral e o papel modulador das VE.

Sabe-se que os pré-adipócitos sofrem alterações durante a obesidade, que se relacionam ao câncer como o aumento da liberação de citocinas como IL-6, TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e que contribuem para a manutenção do estado de inflamação crônica (RENOVATO-MARTINS et al., 2020b). Além disso, o perfil das VE circulantes derivadas por pré-adipócitos encontra-se aumentado em indivíduos obesos sugerindo um potencial impacto sobre a malignidade tumoral (RENOVATO-MARTINS et al., 2017).

No entanto, ainda são escassos os estudos que exploram o efeito dessas VE sobre a malignidade das células de câncer de mama, especialmente no que diz respeito às alterações no metabolismo tumoral induzidas por VE liberadas por pré-adipócitos em condições de obesidade.

## 1 OBJETIVOS

### 1.1 Objetivo geral

Avaliar alterações metabólicas e funcionais em células MDA-MB-231 em resposta ao estímulo com VE liberadas por pré-adipócitos previamente condicionados com o secretoma da cultura de explantes de TA de indivíduos obesos (VE PAD OB) ou eutróficos (VE PAD EUT).

#### 1.1.1. Objetivos específicos

- a) Obter as VE liberadas por pré-adipócitos humanos subcutâneos previamente educados com o secretoma de explantes de tecido adiposo de indivíduos obesos (VE-PA-OB) ou eutróficos (VE-PA-EUT);
- b) Avaliar o efeito da inibição da glicólise e da oxidação de lipídeos sobre a viabilidade de células MDA-MB-231;
- c) Avaliar a capacidade migratória de células tumorais MDA-MB-231 estimuladas com VE-PAD-OB ou VE-PAD-EUT na presença e na ausência dos inibidores metabólicos Etomoxir ou 2-Deoxi-d-glicose (2-DG);
- d) Avaliar a produção de lactato e a produção de ATP em células tumorais MDA-MB-231 estimuladas com VE-PAD-OB ou VE-PAD-EUT na presença e na ausência dos inibidores metabólicos Etomoxir ou 2-Deoxi-d-glicose;
- e) Avaliar a atividade de G6PDH e PK em células tumorais MDA-MB-231 estimuladas com VE-PAD-OB ou VE-PAD-EUT na presença e na ausência dos inibidores metabólicos Etomoxir ou 2-Deoxi-d-glicose;
- f) Avaliar produção de ATP e a ativação de AMPK em células tumorais MDA-MB-231 estimuladas com VE-PAD-OB e VE-PAD-EUT na presença e na ausência do inibidor metabólico Etomoxir.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Cultura celular

A linhagem celular de adenocarcinoma mamário humano MDA-MB-231, do tipo invasivo e triplo negativa, foi obtida do Banco de células American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Virgini, USA) e descongelada em meio DMEM High Glucose GlutaMAX™ (Thermo Fisher Scientific, #10566016) suplementado com solução de Penicilina-Estreptomicina (1:100 V/V; Thermo Fisher Scientific, #15140122) e com 10% de soro fetal bovino (SFB) em pH 7,2. Para a manutenção, as células MDA-MB-231 foram cultivadas em mistura de meio DMEM High Glucose GlutaMAX™ (Thermo Fisher Scientific, #10566016) / DMEM F-12 HyClone™ (Cytiva Life Sciences, #SH30023.01) em partes iguais – referido como DMEM HG/F12- e suplementado com solução de Penicilina-Estreptomicina (1:100 V/V; Thermo Fisher Scientific, #15140122) e com 10% de soro fetal bovino (SFB) em pH 7,2. As culturas foram mantidas a 37°C em uma atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> sendo armazenadas em garrafas de cultura. O meio de cultura foi renovado ou as células foram repicadas, quando confluentes, a cada 2-3 dias. O processo de repique consistiu na soltura das células através da incubação com TrypLE (Gibco; Thermo Fisher Scientific, #12605028) por 5 minutos a 37°C, seguido de centrifugação à 400 x g, a 20°C, por 10 minutos, descarte do sobrenadante, sendo as células ressuspensas em meio de cultura e transferidas para a nova garrafa. As células foram utilizadas no máximo até a 10ª passagem.

A linhagem de pré-adipócitos humanos subcutâneos (Lonza, # PT-5020) cultivadas em mistura de meio DMEM HG/F12 em partes iguais, suplementado com solução de Penicilina-Estreptomicina (1:100 V/V) e 15% de SFB misturado com soro de bezerro (CS), em partes iguais (SFB+CS), em pH 7,2. As garrafas e as placas nas quais os pré-adipócitos foram cultivados foram previamente recobertas com uma matriz extracelular característica de tecido adiposo (TissueCoat™; Tissue Labs; SKU: #TSCO-AD-50) sob sua superfície. As culturas foram mantidas a 37°C em uma atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi renovado ou as células foram repicadas, quando confluentes, a cada 4-6 dias. O processo de repique consistiu na soltura das células através da incubação com TrypLE por 5 minutos a 37°C, seguido de centrifugação à 400 x g, a 20°C, por 10 minutos, descarte do sobrenadante,

sendo as células ressuspensas em meio de cultura e transferidas para a nova garrafa. As células foram utilizadas no máximo até a 5ª passagem.

## **2.2 Condicionamento dos pré-adipócitos e isolamento das vesículas extracelulares derivadas dos pré-adipócitos**

O procedimento de coleta de explantes de tecido adiposo subcutâneo de indivíduos eutróficos e obesos foi realizado no Hospital Federal de Ipanema ou Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE) e aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa (CAAE: 36880914.0.0000.5259). As amostras foram coletadas em tubos do tipo Falcon em PBS (-Ca/-Mg) e diretamente acondicionados em gelo. Posteriormente, foram divididas e cultivadas em meio M199, por 24 horas, em estufa, suplementado com 1% de SFB (37° C, 5% CO<sub>2</sub>). Após 24h, o meio condicionado foi coletado e estocado no à -80° C.

O tratamento dos pré-adipócitos foi feito em placas de cultura de 6 poços (KASVI); ao atingirem confluência administrou-se o meio condicionado coletado da cultura de explantes de TA subcutâneo oriundo indivíduos eutróficos ou obesos durante 24h na proporção de 20% do volume final (V/V). Após o intervalo de 24 horas, as células foram lavadas, sendo posteriormente mantidas em DMEM HG/F12 suplementado com 1% de SFB pr depletado de VE, durante 24h. A depleção das VE do soro ocorreu por separação por centrifugação à 20.000 x g por 70 minutos à 4°C. Em seguida, foi coletado o sobrenadante da cultura de pré-adipócitos tratados, em tubos de análise estéreis do tipo eppendorfs, sendo os mesmos submetidos a duas rodadas de centrifugação. A primeira rodada ocorreu por 10 minutos a 4°C, a 2.000 x g, para remoção de debris celulares; e a segunda rodada ocorreu por 70 minutos a 4°C, a 20.000 x g para o isolamento das VE. Após esse procedimento, o sobrenadante foi descartado e as vesículas foram ressuspensas em meio de cultura DMEM F-12 HyClone™ na metade do volume original.

### 2.3 Caracterização da distribuição por tamanho das VE PAD EUT e VE PAD OB

Após o isolamento, as VE derivadas de pré-adipócitos eutróficos (VE PAD EUT) e as VE derivadas de pré-adipócitos obesos (VE PAD OB) foram caracterizadas quanto a sua distribuição por tamanho através do aparelho NanoSight (Malvern Panalytical). Este aparelho é composto por um sistema óptico com lentes de alta resolução acoplada a lasers e câmeras que registram a movimentação e tamanho das VE através do princípio de Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA). As amostras de VE PAD EUT e VE PAD OB foram organizadas em 2 “pools” cada, onde cada “pool” consistiu em um conjunto de 6 amostras derivadas de indivíduos diferentes.

### 2.4 Avaliação da viabilidade por MTT

As células MDA-MB-231 foram semeadas em placas de 96 poços, na densidade de  $8 \times 10^3$  células por poço, em meio DMEM F12 10% SFB. Após a aderência das células, foi realizada do meio de cultura para DMEM F12 incompleto, o qual foi mantido durante a noite “overnight”. No dia seguinte foi realizada a troca do meio cultura para DMEM F12-1% SFB na presença e ausência dos inibidores Etomoxir (50  $\mu$ M; Sigma-Aldrich; #E1905) ou 2-deoxy-D-Glicose (5 mM; Sigma-Aldrich; #D3179); como controle positivo da indução de  $\beta$ -oxidação também foi utilizado o Palmitato (1 mM; Supelco; #90930). A viabilidade celular foi aferida após os intervalos de 24h e 48h através do ensaio de Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazólio, também conhecido como MTT. Foram adicionados 10  $\mu$ l de solução de MTT diluída em PBS (5mg/ml) por poço 4 horas antes do final de cada intervalo. O MTT é absorvido e metabolizado à cristais de Formazan através de enzimas oxidorreduzases dependentes de NAD(P)H presentes em células viáveis. Após 4 horas, os cristais foram dissolvidos em 100  $\mu$ l de álcool isopropílico, formando uma solução de coloração arroxeadada. A intensidade colorimétrica de cada poço é proporcional a sua viabilidade e foi quantificada através de um leitor de placas (DR-200BS-NM-BI; KASUAKI) no comprimento de onda de 570 nm.

## 2.5 Ensaio de migração por *wound healing*

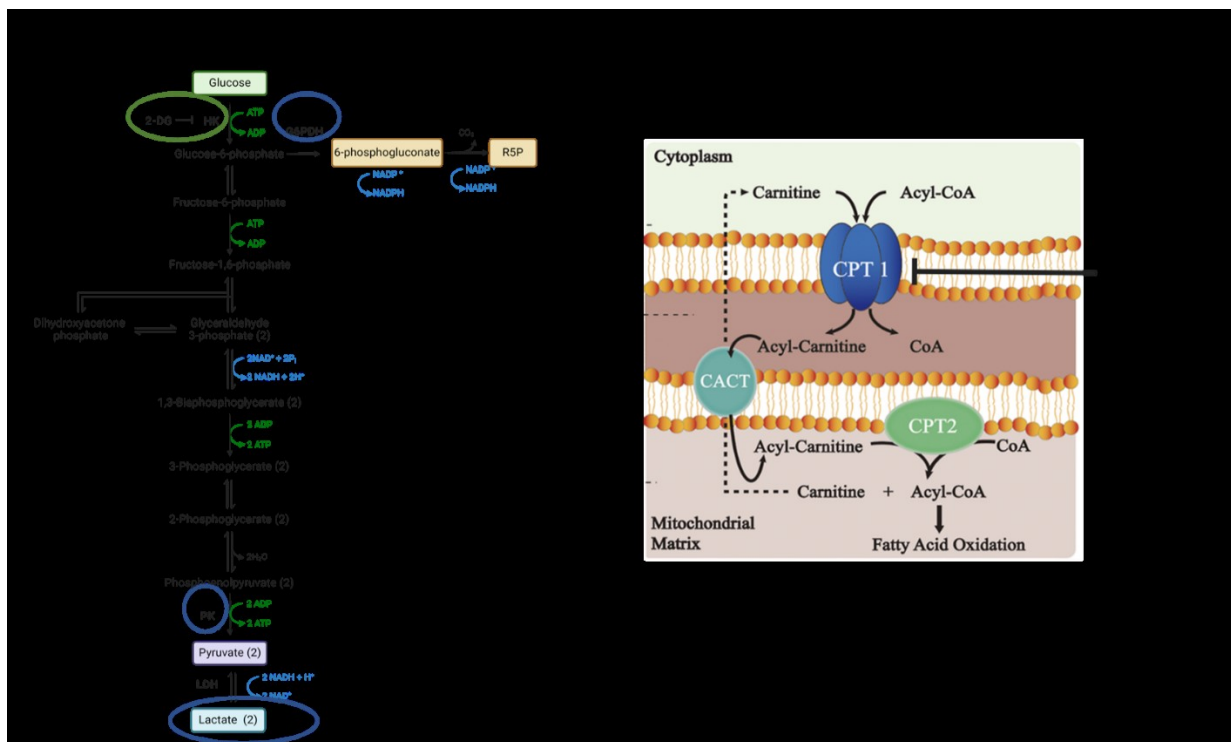
As células MDA-MB-231 foram semeadas na densidade de  $1,5 \times 10^5$  células/ poço, em placas de 24 poços e incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, em meio DMEM F12 suplementado com 10% de SFB até atingirem 95% de confluência. Posteriormente, as células foram lavadas e tratadas com mitomicina (5 µg/mL) em DMEM F12 incompleto, por 2 horas. Posteriormente, com o auxílio de uma ponteira de pipeta de 200 µL, foi feito um risco na placa, na posição vertical, para a remoção das células. Em seguida, o meio foi trocado por DMEM F-12 suplementado com 1% SFB e as células tratadas com as VE PAD OB ou VE PAD EUT na presença ou ausência de Etomoxir (50 µM) ou 2-DG (5 mM); como controle positivo da indução de β-oxidação, utilizou-se o Palmitato (1 mM). A região do risco foi fotografada utilizando-se uma câmera acoplada ao microscópio invertido (IV5100-Series Inverted Biological Microscope) no aumento de 10X, foram tiradas duas fotos por campo, acima e abaixo da linha média horizontal dos poços, nos tempos de 0h e 24h. O fechamento foi avaliado através da utilização do Software Photoshop®, no qual foram escolhidos 5 pontos aleatórios de cada foto e esses foram medidos através da ferramenta régua.

## 2.6 Ensaio de avaliação metabólica

As células MDA-MB-231 foram semeadas em placas 12 poços na densidade de  $2,5 \times 10^5$  células/ poço, em meio DMEM F12 10% SFB até atingirem 90% de confluência. Em seguida o meio foi trocado para DMEM F-12 suplementado com 1% SFB e as células foram tratadas com as VE PAD OB ou VE PAD EUT na presença ou ausência de Etomoxir (50 µM) ou 2-DG (5 mM); Como controle positivo da indução de β-oxidação utilizou-se o palmitato (1 mM). O tempo de estímulo para todos os ensaios foi de 24h, exceto para a produção de ATP, há qual foi avaliada depois de 1 hora.

A produção de ATP (Sigma-Aldrich, MAK190) e de L-Lactato (Sigma-Aldrich, MAK 329), assim como a atividade de G6PD (Sigma-Aldrich, MAK015) e de Piruvato Quinase (Sigma-Aldrich, MAK072) foram avaliadas através de kits comerciais de acordo com instruções do fabricante. A leitura das absorbâncias foi realizada em leitor de microplacas (DR-200BS-NM-BI; KASUAKI).

Figura 20 - Vias metabólicas avaliadas no trabalho e dos mecanismos de inibição utilizados



Legenda: Esquema representativo das vias metabólicas avaliadas no trabalho e dos mecanismos de inibição utilizados HK: Hexoquinase, PK: Piruvato Quinase, G6PDH: Glicose-6-Fosfato-Desidrogenase, CPT1: Carnitina-Palmitoil-Transferase 1.

Nota: Destaca-se o uso de 2-DG (A) como inibidor da primeira reação da glicólise, atuando como inibidor competitivo da HK; e ETOMOXIR (B) como inibidor da oxidação de ácidos graxos, impedindo a translocação de moléculas de Acil-CoA de cadeia longa para a matriz mitocondrial. Também se encontram destacados as enzimas cujas atividades foram medidas: PK e G6PDH; e os níveis de Lactato

Fonte: O autor, 2024

## 2.7 Preparo dos extratos celulares e *immunoblotting*

Os extratos celulares das células MDA-MB-231 previamente tratadas com VE PAD OB ou VE PAD EUT na presença ou ausência de Etomoxir (50  $\mu$ M), foram obtidos em tampão RIPA (Sigma Aldrich; #R0278) acrescido de Coquetel inibidor de protease (Sigma Aldrich; #P2714) e em seguida foram submetidos a homogeneização ultrassônica em 3 pulsos de 10 segundos na amplitude 20 (Q55 Sonicator®; QSONICA).

A dosagem do conteúdo proteico das amostras foi realizada através do Método do Ácido Bicinonínico através da utilização do Kit BCA Pierce (ThermoFisher Scientific; #A65453) seguindo as instruções do fabricante. A leitura das absorbâncias ocorreu em leitor de microplacas (DR-200BS-NM-BI; KASUAKI) à 570 nm. A partir da dosagem de proteínas,

foi calculado o volume ideal de cada amostra para que contivessem a mesma quantidade de proteínas (20 µg). Foi adicionado tampão de amostra concentrado (Glicerol, Hidróxido de Sódio, β-Mercaptoetanol e azul de bromofenol) na proporção 1:1 (para um tampão 5 x concentrado foi utilizado o equivalente a 20% do volume de amostra). Por fim, as amostras foram fervidas em banho-seco a 90°C por 3 minutos e guardadas no congelador à -20°C.

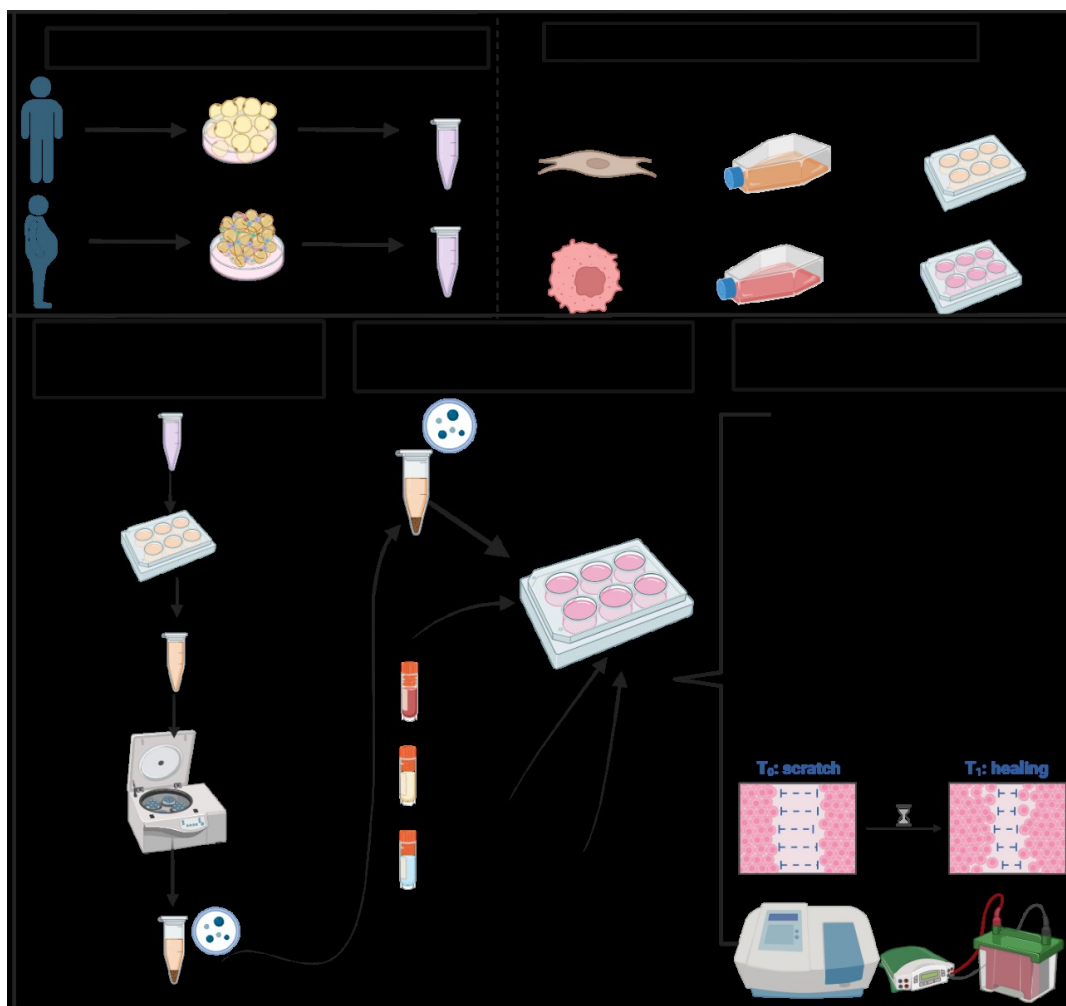
Após o final do preparo, as amostras foram pipetadas em géis de Poliacrilamida SDS-PAGE (10%), em volumes com a mesma equivalência de quantidade de proteínas, e submetidas à eletroforese por 90 minutos a 150 V. As proteínas presentes nos géis foram transferidas para membranas de PVDF, previamente ativadas com metanol, por 30 minutos a 25 V e 1.0 A no equipamento Trans-Blot<sup>®</sup> TurboTM (Transfer System, Bio-Rad).

Após a transferência, as membranas foram coradas com *Ponceau Rouge* 0,2% para confirmação da transferência, lavadas com água destilada para a remoção do corante e bloqueadas com leite desnatado 5% ou BSA 5% em TTBS 0,1% por 1 hora. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas overnight a 4°C sob agitação com os anticorpos primários para fosfo-AMPK (Thr172) (1:500; Sigma Aldrich 07-681) e AMPK (1:1.000; Sigma Aldrich; SAB5600112). Após a incubação, as membranas foram lavadas com T-TBS (3x, 10 minutos), e incubadas com o anticorpo secundário conjugado à peroxidase (1:10.000; Abcam; ab205718), por 1 hora. Por fim, após a incubação com anticorpo secundário, as membranas foram lavadas novamente com T-TBS (3x, 10 minutos) e reveladas utilizando-se o Kit SuperSignal<sup>®</sup> West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher; 34096) no leitor C-DiGit<sup>®</sup> Blot Scanner (LI-COR). A densitometria das bandas foi quantificada utilizando-se o *software Image J*.

## 2.8 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism versão 8.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Os dados foram representados através dos valores de Média e Erro padrão. Foram realizados os testes de Shapiro-Wilk para avaliação de normalidade e ANOVA unidirecional com pós-teste de Sidak para avaliação de diferenças entre os grupos. Em todas as análises, o valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

Figura 21 - Sequência de atividades deste trabalho



Legenda: Esquema representativo da sequência de atividades deste trabalho. MC: meio condicionado; VE: vesículas extracelulares; EUT: eutrófico; OB: obeso; 2-DG: 2-deoxy-d-glicose; G6PD: glicose-6-Fosfato-Desidrogenase; PK: piruvato quinase.

Nota: Destaca-se que a primeira etapa diz respeito a coleta do meio condicionado da cultura de explantes de tecido adiposo obeso e eutrófico. A segunda etapa é sobre a manutenção e expansão das linhagens celulares MDA-MB-231 e de pré-adipócitos humanos. A terceira etapa diz respeito ao condicionamento dos pré-adipócitos com o meio condicionado obtido na primeira etapa e ao isolamento das vesículas. A quarta etapa diz respeito ao tratamento da célula MDA-MB-231 com os diferentes estímulos e inibidores. A última etapa diz respeito a execução dos ensaios realizados

Fonte: O autor, 2024

### 3 RESULTADOS

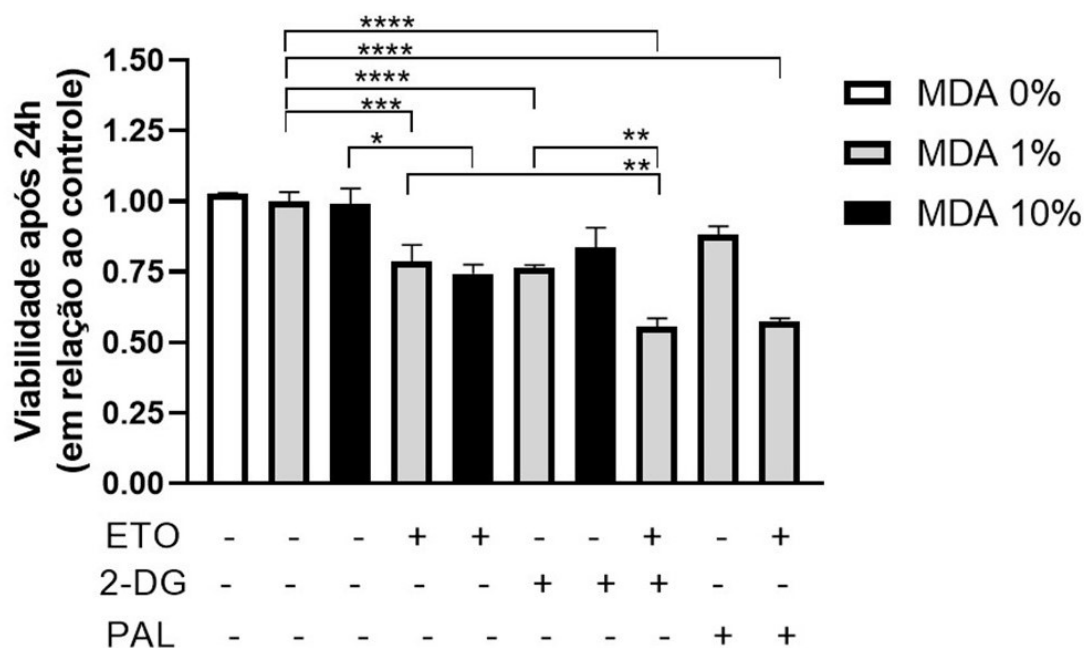
#### 3.1 Efeito da inibição da oxidação lipídica e da glicólise sobre a viabilidade de células MDA-MB-231

De formar a tentar entender preliminarmente o envolvimento da glicólise e da oxidação lipídica na manutenção da viabilidade celular, ambas vias foram inibidas, respectivamente, com 2-DG e etomoxir. Posteriormente o metabolismo mitocondrial foi avaliado através da técnica de MTT nos tempos de 24h e 48h. Além da variável tempo, também foi avaliado o efeito dos inibidores em células cultivadas com diferentes concentrações de SFB (10%, 1% e 0%) para simular as condições de maior e menor disponibilidade de nutrientes.

Após 24 horas, observamos que a despeito da quantidade de SFB as células não apresentaram variação na viabilidade. Naquelas tratadas com 1% de SFB, condição esta adotada para os demais ensaios apresentados nesta dissertação, vimos uma diminuição da viabilidade celular de mesma magnitude tanto mediante a utilização de etomoxir ou 2-DG (aproximadamente 25% em relação ao controle). Quando combinados, etomoxir e a 2-DG promoveram um efeito aditivo, causando uma redução de cerca de 50% na viabilidade, conforme visto no gráfico 1. Não houve diferença significativa entre as células controle e as tratadas com palmitato, porém quando as células foram tratadas com palmitato na presença de etomoxir observamos uma redução de cerca de 40%.

De maneira interessante, no mesmo período avaliado, observamos que a inibição da oxidação lipídica e da glicólise em células mantidas em 10% de SFB promoveu efeitos diferentes sobre a viabilidade. Enquanto na presença de etomoxir observamos uma redução de aproximadamente 25%, a utilização de 2-DG não impactou a viabilidade celular.

Gráfico 1 - Análise da viabilidade celular de MDA-MB-231 através da técnica de MTT após 24 h



Legenda: Análise da viabilidade celular de MDA-MB-231 através da técnica de MTT após 24 h. Os experimentos foram conduzidos na presença ou ausência de Etomoxir, 2-DG e Palmitato, mediante diferentes concentrações de SFB. N=3-5. Os dados são expressos como médias  $\pm$  SEM. A análise estatística foi realizada no Graphpad Prism 8 usando ANOVA unidirecional com pós-teste de Sidak. \* P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,005, \*\*\*\*P<0,001. ETO: etomoxir; 2-DG: 2-deoxy-d-glicose; PAL: palmitato.

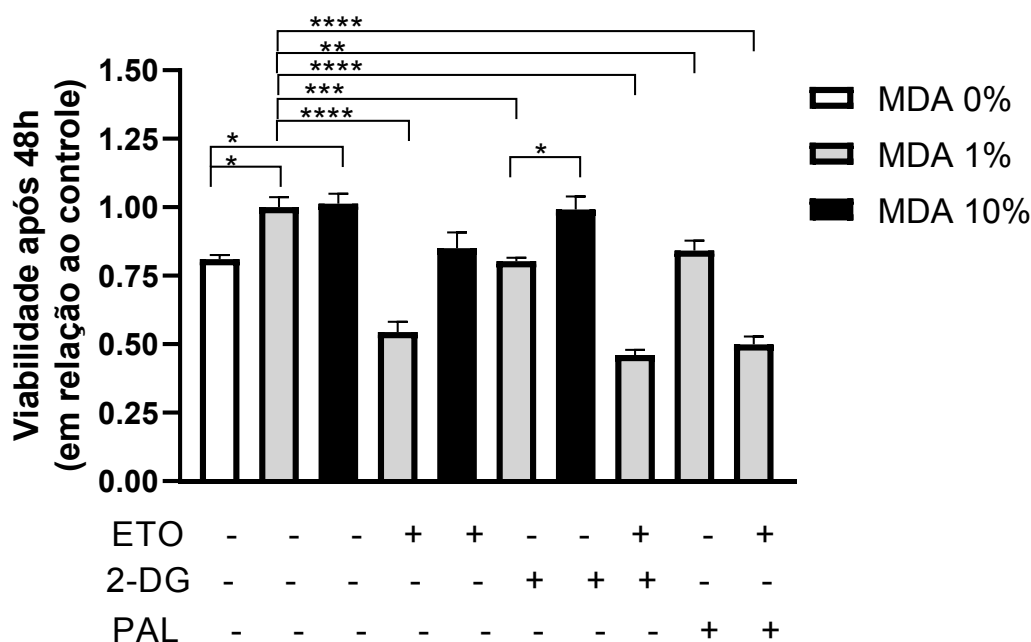
Nota Destaca-se que não há diferença na viabilidade, após 24 h, entre os grupos cultivados com diferentes concentrações de SFB; que a inibição da oxidação de ácidos graxos reduz a viabilidade em aproximadamente 25 % tanto em uma concentração menor ou maior de SFB; que a inibição da glicólise também reduz a viabilidade em 25% na concentração menor porém não maior; por fim que a presença combinada dos inibidores na concentração menor causa um efeito aditivo com uma redução de aproximadamente 50%.

Fonte: O autor, 2024

Já no período de 48 horas, as células cultivadas sem suplementação com SFB apresentaram uma redução da viabilidade de cerca de 25%, em comparação às células suplementadas com 1% e 10% de SFB, como visto no gráfico 2. Já o efeito dos inibidores em relação ao controle apresentou uma redução de diferentes ordens. Enquanto na presença de 2-DG observamos redução de mesmo nível, a presença do etomoxir por 48 horas induziu uma inibição de 50% na viabilidade celular. A combinação com os inibidores apresentou uma redução de mesma ordem daquelas células tratadas apenas com etomoxir. Curiosamente, nas células suplementadas com 10% de SFB, observamos que a variável tempo não impactou de

maneira diferente na redução da viabilidade, pois os percentuais de redução de viabilidade observados foram os mesmos nos tempos de 24h e 48h.

Gráfico 2 - Análise da viabilidade celular de MDA-MB-231 através da técnica de MTT após 48 h



Legenda: Análise da viabilidade celular de MDA-MB-231 através da técnica de MTT após 48 h. Os experimentos foram conduzidos na presença ou ausência de Etomoxir, 2-DG e Palmitato, mediante diferentes concentrações de SFB. N=3-5. Os dados são expressos como médias  $\pm$  SEM. A análise estatística foi realizada no Graphpad Prism 8 usando ANOVA unidirecional com pós-teste de Sidak.\* P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,005, \*\*\*\*P<0,001. ETO: etomoxir; 2-DG: 2-deoxy-d-glicose; PAL: palmitato.

Nota: Destaca-se que, após 48 h, houve uma redução de viabilidade no grupo cultivado sem SFB em relação aos grupos cultivados com menor ou maior concentração de SFB; que a redução da viabilidade em resposta a inibição da oxidação de ácidos graxos foi de aproximadamente 50% no grupo cultivado com menor concentração de SFB em contraste à 25% no grupo cultivado com maior concentração de SFB; que a inibição da glicólise também reduz a viabilidade em 25% na concentração menor porém não maior; por fim que a presença combinada dos inibidores na concentração menor não apresenta mais um efeito aditivo, sendo de mesma ordem da redução oriunda apenas pela inibição da oxidação de ácidos graxos.

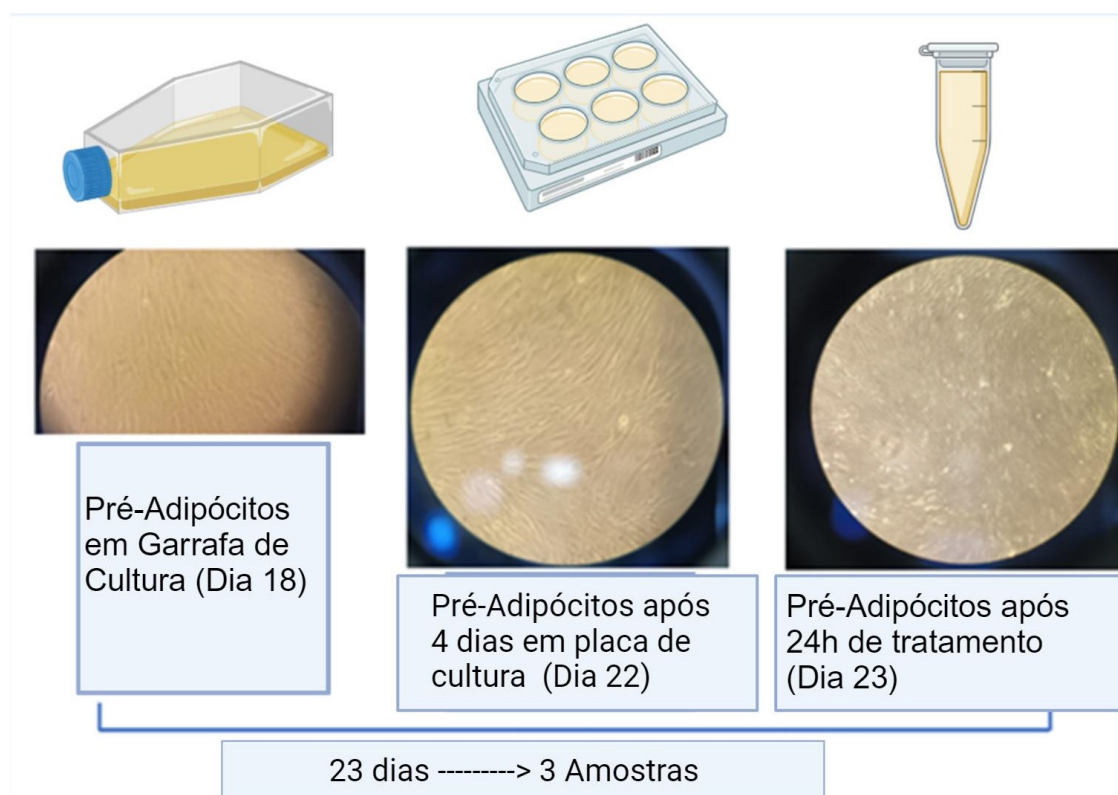
Fonte: O autor, 2024

### 3.2 Estabelecimento do modelo experimental de produção de vesículas extracelulares por pré-adipócitos previamente educados com meio condicionado provenientes do TA eutrófico ou obeso

O processo de educação dos pré-adipócitos e coleta de suas VE é longo. A primeira etapa é a de cultivo dos pré-adipócitos, que pode ser subdividida em dois momentos: a de expansão celular em garrafas de cultura; e o cultivo em placas para serem estimuladas na etapa

seguinte. Por se tratar da cultura de um tipo celular não tumoral, a taxa de crescimento dos pré-adipócitos humanos é consideravelmente mais lenta que as células MDA-MB-231 e torna-se progressivamente mais lenta a cada passagem. Foram utilizados pré-adipócitos até a quinta passagem (P5). Para simular de forma mais fidedigna as condições do TA, a superfície tanto das placas de cultura quanto das garrafas foi revestida com uma matriz extracelular específica para pré-adipócitos (Fig. 22).

Figura 22 - Linha do tempo da produção de VE PAD



Legenda: Esquema representativo da linha temporal da produção de VE PAD.

Nota Destaca-se que são necessários, em média, de 3 a 4 semanas entre o início da cultura dos pré-adipócitos, até e o isolamento de suas VE pós educação.

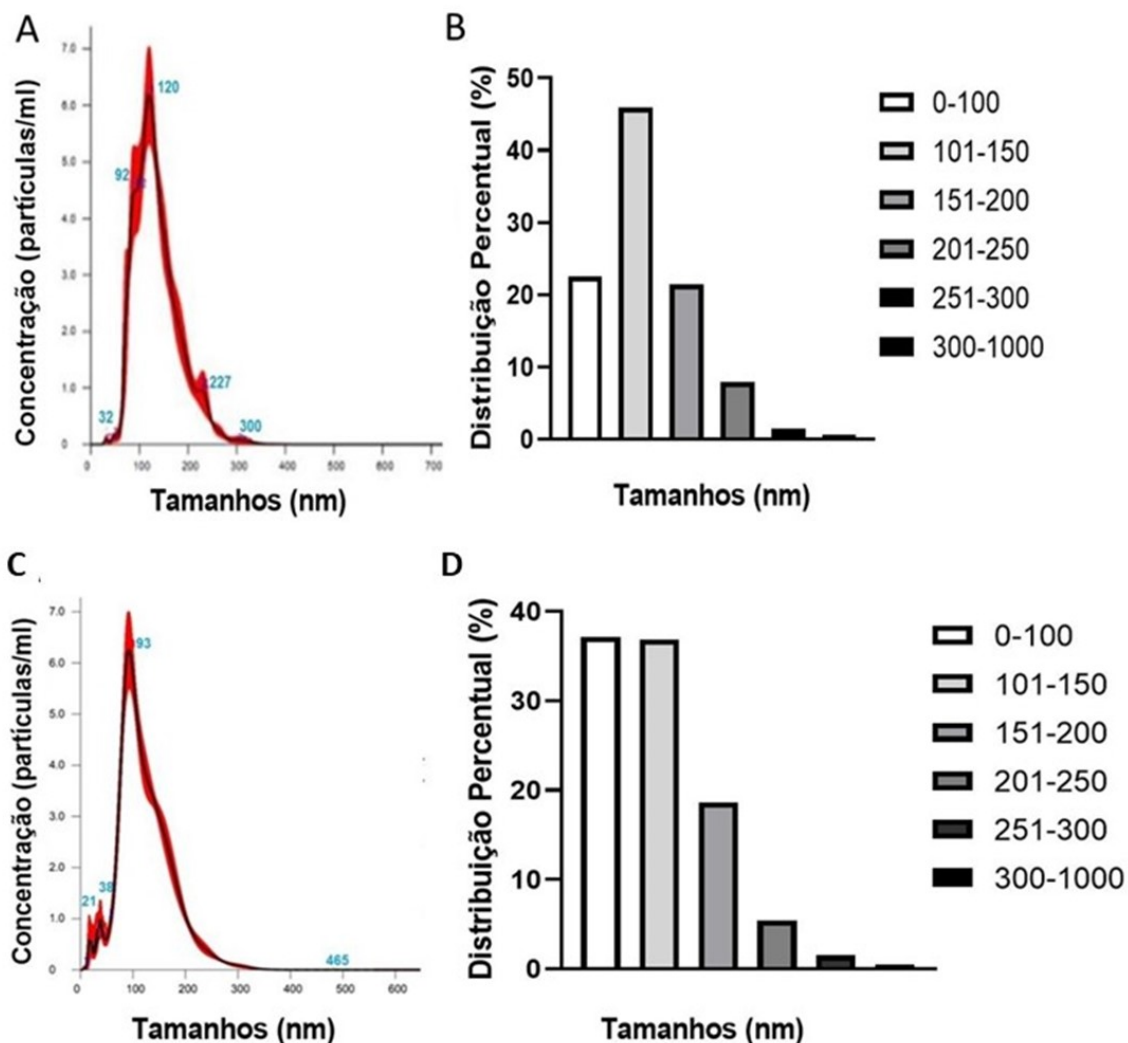
Fonte O autor, 2024.

Em seguida, ocorre a exposição ao secretoma (meio condicionado) do tecido adiposo por 24 horas, seguida da troca do meio de cultura no qual os pré-adipócitos são mantidos por mais 24 horas. Posteriormente, ocorre a coleta do meio condicionado e isolamento das VE PAD através de centrifugação. Entre a primeira e a última etapa levou-se em média cerca de 3 semanas (Fig 22).

Após esse processo, amostras de VE PAD EUT e VE PAD OB foram preparadas para serem caracterizadas através da Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA). Avaliamos amostras em “pool” de cada grupo, sendo cada “pool” formado pela mistura, em

igual volume, de 3 amostras individuais de VE PAD EUT ou VE PAD OB. Esta caracterização inicial revelou que o processo de produção e isolamento de VE é eficiente e que tanto VE PAD EUT (Gráfico 3, A e B) quanto VE PAD OB (Gráfico 3, C e D) apresentavam concentrações totais de partículas semelhantes (aproximadamente  $5,5 \times 10^9$  partículas/ml) e uma predominância de vesículas pequenas a médias. Contudo, ao analisarmos as VE na faixa específica de até 100 nm, percebemos um aumento expressivo, de quase o dobro, no grupo VE PAD OB em relação a VE PAD EUT – frequência de quase 40% em contraste à 20%.

Gráfico 3: Análise do perfil de tamanho e concentração de VE PAD EUT e VE PAD OB por NTA



Legenda: Análise do perfil de VE PAD EUT e VE PAD OB por NTA. A- Concentração (partículas/ml) por tamanho de VE PAD EUT; B- Distribuição percentual por faixas de tamanho em VE PAD EUT; C- Concentração (partículas/ml) por tamanho de VE PAD OB; D- Distribuição percentual por faixas de tamanho em VE PAD OB

Nota Destaca-se que tanto VE PAD EUT quanto VE PAD OB são compostos por vesículas pequenas, com VE PAD EUT apresentando um pico de concentração em torno de 120 nm enquanto VE PAD OB em 93 nm e que ambas apresentam uma concentração total de partículas de aproximadamente  $5,5 \times 10^9$  partículas/mL

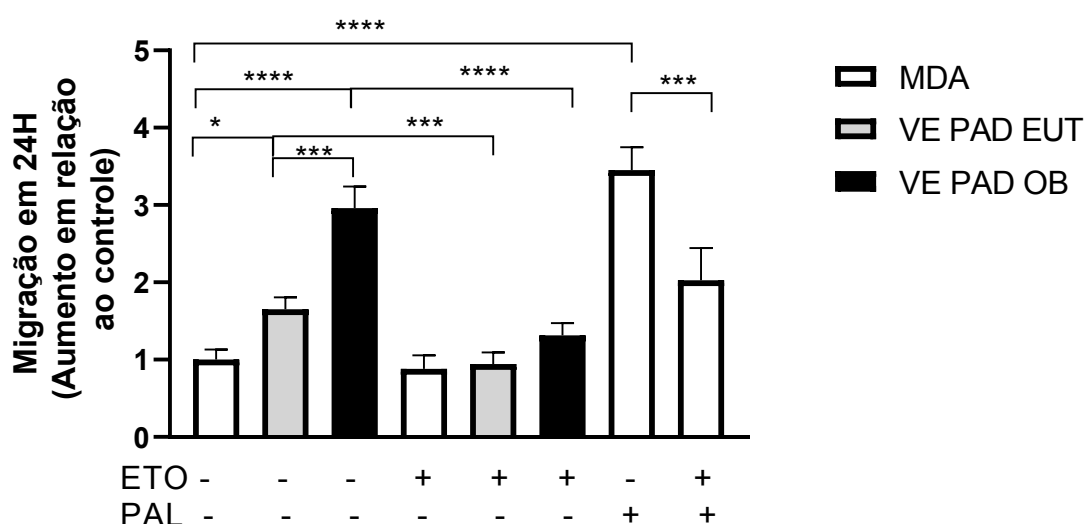
Fonte: O Autor, 2024

### 3.3 O tratamento com vesículas derivadas de pré-adipócitos obesos aumenta a capacidade migratória de células MDA-MB-231 de forma dependente da oxidação lipídica

Inicialmente foi investigado o efeito funcional das VE PAD sobre a capacidade migratória das células MDA-MB-231 através do ensaio de *Wound Healing*. Foi visto que VE PAD OB é capaz de induzir o aumento de até 3 vezes da capacidade migratória em comparação à célula MDA-MB-231 sem tratamento, e de aproximadamente 1,6 vezes maior que as células tratadas com VE PAD EUT (Gráfico 4). Além da magnitude do aumento promovido pelas vesículas de pré-adipócitos nos diferentes estados, também foi analisada a dependência do metabolismo glicolítico e da oxidação de ácidos graxos sobre este aumento.

Observamos que a inibição da oxidação lipídica não alterou o padrão migratório das células sem tratamento; contudo tanto naquelas estimuladas com VE PAD EUT quanto VE PAD OB observamos que inibição da oxidação lipídica induziu respectivamente uma diminuição de 1,8 x ( $p < 0,01$ ) e 2,2 x ( $p < 0,005$ ), onde a capacidade migratória atingiu níveis compatíveis com o observado nas células sem estímulo. Em concordância, vimos que a administração de palmitato induziu um aumento similar ao induzido pelo tratamento com PEV OB, demonstrando a relevância da oxidação lipídica para migração (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Contribuição da oxidação lipídica sobre a migração induzida por VE PAD EUT e VE PAD OB



Legenda: Ensaio de migração de células MDA-MB-231 estimuladas com VE PAD EUT ou VE PAD OB na presença ou ausência de etomoxir após 24h; palmitato utilizado como controle positivo. N=3-7. Os dados são expressos como médias  $\pm$  SEM. A análise estatística foi realizada no Graphpad Prism 8

usando ANOVA unidirecional com pós-teste de Sidak.\* P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,005, \*\*\*\*P<0,001

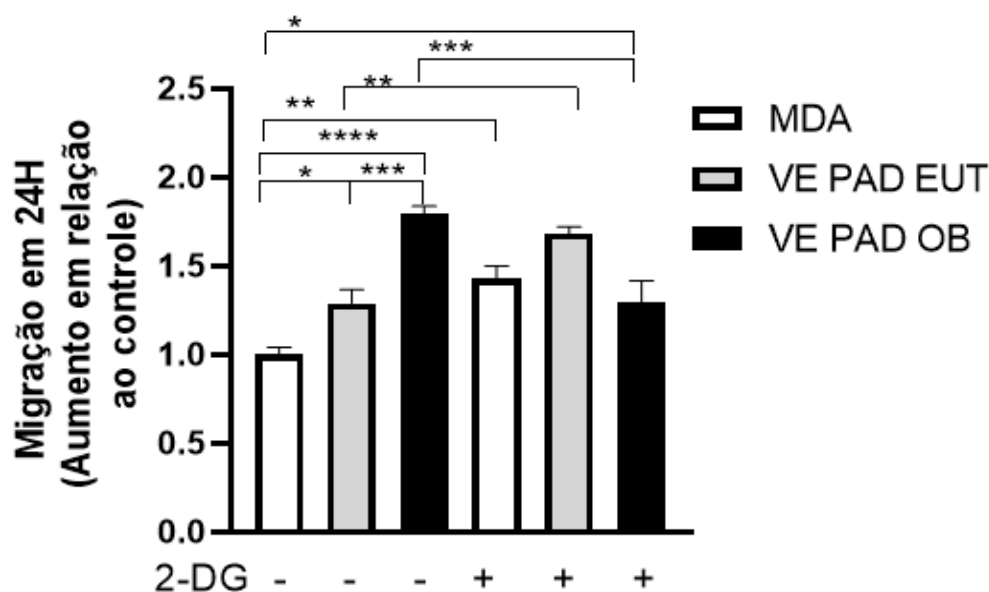
Nota: Destaca-se que VE PAD OB induziu um aumento de aproximadamente 3 vezes em relação a células não tratadas e de aproximadamente 1,6 vezes em relação a VE PAD EUT, e que tal aumento pronunciado foi revertido quando a oxidação de ácidos graxos estava inibida

Fonte: O autor, 2024

Ao avaliarmos o efeito da inibição da glicólise sobre a migração celular, observamos que tanto nas células controle quanto nas tratadas com VE PAD EUT apresentou-se um aumento, respectivo, do seu potencial migratório de 1,4 e 1,3 vezes. Entretanto, a inibição da glicólise nas células tratadas com as VE PAD OB resultou em uma diminuição de 1,4 vezes na migração (Gráfico 5).

Acreditamos que uma possível explicação para o aumento da migração desencadeado pelo tratamento com VE PAD OB mediante à inibição da glicólise seja o desvio da maquinaria metabólica em direção à oxidação lipídica

Gráfico 5 - Contribuição da glicólise sobre a migração induzida por VE PAD EUT e VE PAD OB



Legenda: Ensaio de migração de células MDA-MB-231 estimuladas com VE PAD EUT ou VE PAD OB na presença ou ausência de 2-DG após 24h; N=3-7. Os dados são expressos como médias  $\pm$  SEM. A análise estatística foi realizada no Graphpad Prism 8 usando ANOVA unidirecional com pós-teste de Sidak.\* P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,005, \*\*\*\*P<0,001

Nota: Destaca-se que a inibição da glicólise ocasionou em um aumento da capacidade migratória das células não tratadas e das células tratadas com VE PAD EUT, e uma redução nas células tratadas com VE PAD OB

Fonte: O autor, 2024

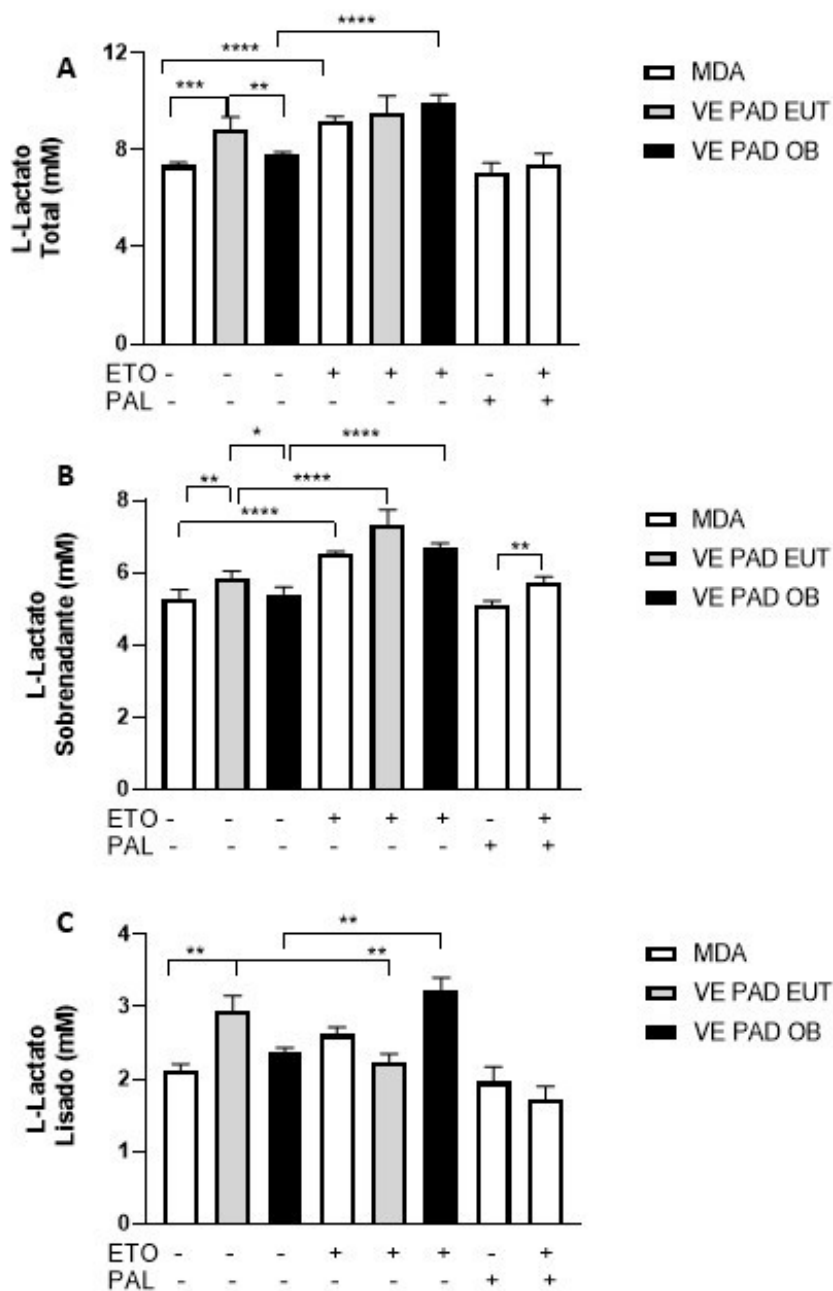
### 3.4 Efeito das vesículas extracelulares derivadas de pré-adipócitos sobre a produção de lactato

De modo a compreender melhor o efeito das VE de pré-adipócitos sobre o metabolismo glicolítico das células MDA-MB-231, quantificamos os níveis totais de lactato, o subproduto final do metabolismo glicolítico, no sobrenadante e no lisado celular mediante o tratamento com as VE PAD EUT e VE PAD OB na ausência ou presença de Etomoxir.

Observamos que as VE PAD EUT induziram um aumento nos níveis totais de lactato (Gráfico 6 A), tanto na produção (Gráfico 6 B) quanto na liberação de lactato (Gráfico 6 C), em relação às células não tratadas. Em contrapartida, o tratamento com as VE PAD OB não apresentou alteração nos níveis totais de lactato (Gráfico 6 A), tanto no sobrenadante (Gráfico 6 B) quanto no lisado (Gráfico 6 C). Tais resultados indicam que as VE PAD EUT aumentam o metabolismo glicolítico das células MDA-MB-231, o que é potencializado mediante a inibição da oxidação lipídica.

Apesar das VE PAD OB não terem induzido aumento nos níveis totais de lactato (Gráfico 6 A), observamos um efeito oposto mediante inibição da oxidação lipídica, como um possível mecanismo compensatório. Também é interessante ressaltar que o tratamento com palmitato não levou à redução dos níveis de lactato (Gráfico 6 A, B e C), ou seja, mesmo que a célula apresente um maior aporte de substrato lipídico, ela mantém inalterada sua taxa basal de glicólise, demonstrando a relevância dessa via.

Gráfico 6 - Alterações nos níveis de L-Lactato induzidas VE PAD EUT e VE PAD OB



Legenda: Quantificação dos níveis de lactato em células MDA-MB-231 mediante tratamento com VE PAD EUT e VE PAD OB na presença ou ausência de etomoxir após 24 horas de estímulo; palmitato foi utilizado como controle positivo. A- Produção de lactato total; B- Lactato presente no sobrenadante; C- Lactato presente no lisado celular medida. N=3-5. Os dados são expressos como médias  $\pm$  SEM. A análise estatística foi realizada no Graphpad Prism 8 usando ANOVA unidirecional com pós-teste de Sidak. \*  $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,005$ , \*\*\*\* $P < 0,001$

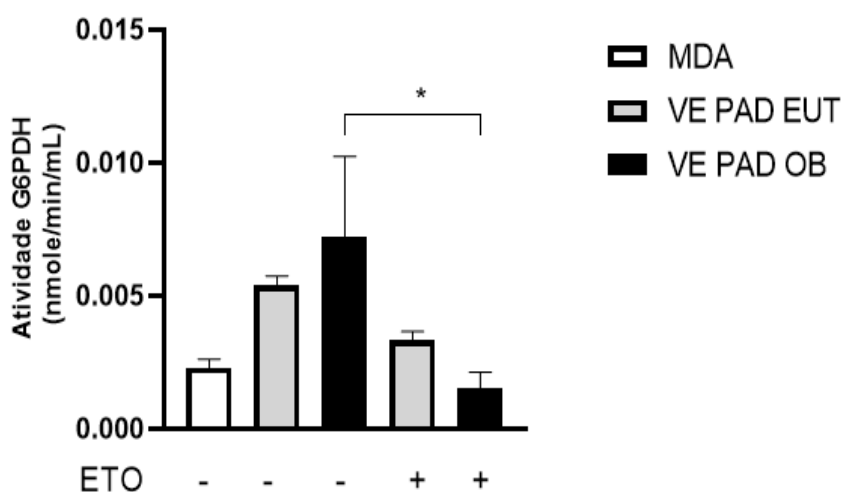
Nota: Destaca-se que VE PAD EUT aumenta significativamente os níveis de lactato total, tanto no lisado quanto no secretado enquanto VE PAD OB não.

Fonte: O autor, 2024.

### 3.5 Efeito das vesículas extracelulares derivadas de pré-adipócitos sobre a atividade da enzima Glicose-6- Fosfato Desidrogenase

A via das pentoses fosfato é uma via de biossíntese que apresenta intermediários comuns com a glicólise (STINCONI et al., 2015). Para o efeito das VE derivadas de pré-adipócitos sobre esta via, avaliamos a atividade da enzima glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PDH). Os resultados demonstraram uma tendência de aumento na atividade da G6PDH tanto nas células estimuladas com VE PAD OB e VE PAD EUT. Além disso, observamos uma redução da atividade de G6PDH nas células tratadas com VE PAD OB mediante a oxidação lipídica (Gráfico 7). Tal achado é um indicativo de que possivelmente as VE PAD OB suportam a via das pentoses fosfato de forma dependente da oxidação lipídica, e quando esta via é inibida observa-se um comprometimento da glicose-6-fosfato com a glicólise, o que corrobora o aumento da produção de lactato apresentada no resultado anterior

Gráfico 7 - Avaliação da atividade da enzima G6PDH após estímulo com VE PAD EUT ou VE PAD OB



Legenda: Avaliação da atividade da enzima Glicose-6-Fosfato-Desidrogenase em resposta ao estímulo com VE PAD EUT ou VE PAD OB após 24h N=3. Os dados são expressos como médias  $\pm$  SEM. A análise estatística foi realizada no Graphpad Prism 8 usando ANOVA unidirecional com pós-teste de Sidak. \*  $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,005$ , \*\*\*\* $P < 0,001$ .

Nota: Destaca-se uma tendência de aumento da atividade de Glicose-6-Fosfato-Desidrogenase nos grupos tratados tanto com VE PAD EUT quanto VE PAD OB, porém no grupo VE PAD OB com inibição da oxidação lipídica houve uma redução significativo

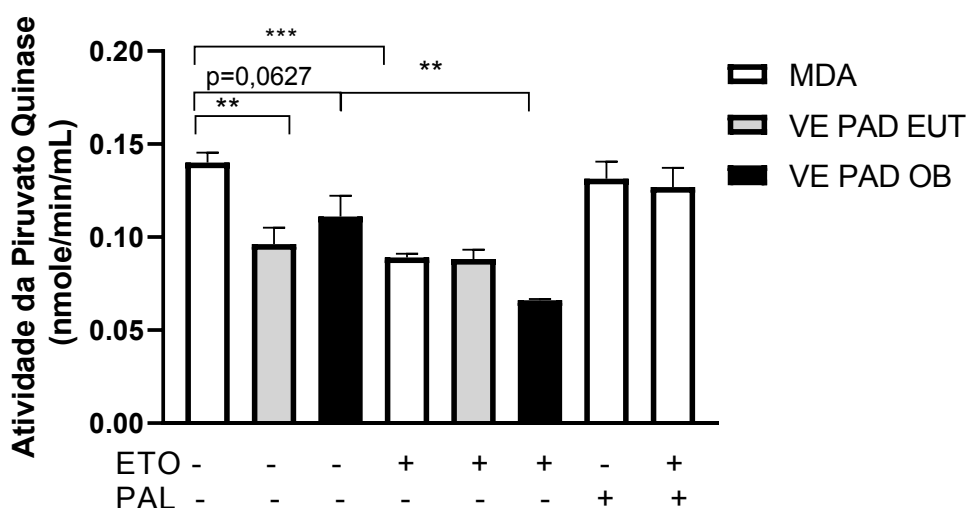
Fonte: O autor, 2024.

### 3.6 Efeito das vesículas extracelulares derivadas de pré-adipócitos sobre a atividade da enzima Piruvato- Quinase

Haja visto que o estímulo com as VE PAD EUT e VE PAD OB modulam de forma diferente a glicólise nas células MDA-MB-231, o que é ainda mais impactado pela inibição da oxidação lipídica, resolvemos avaliar nesse contexto, a atividade da enzima piruvato quinase, responsável pela catálise da última reação da glicólise (Gráfico 8).

De maneira esperada, observamos uma forte tendência de diminuição da atividade da piruvato quinase nas células estimuladas com as VE PAD OB, o que se amplificou mediante a inibição da oxidação lipídica, ao contrário do previsto. Em contrapartida, observamos que o estímulo com as VE PAD EUT inibiu a atividade da piruvato quinase, o que não foi alterado mediante a inibição da oxidação lipídica. Surpreendentemente, observamos que a inibição da oxidação lipídica *per se* induziu a diminuição da atividade da enzima piruvato quinase, o que corrobora os achados relativos ao tratamento com as VE PAD EUT (Gráfico 8).

Gráfico 8 - Avaliação da atividade da enzima Piruvato Quinase após estímulo com VE PAD EUT ou VE PAD OB



Legenda: Avaliação da atividade da enzima Piruvato Quinase em resposta ao estímulo com VE PAD EUT ou VE PAD OB após 24h N=3. Os dados são expressos como médias  $\pm$  SEM. A análise estatística foi realizada no Graphpad Prism 8 usando ANOVA unidirecional com pós-teste de Sidak. \* P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,005, \*\*\*\*P<0,001.

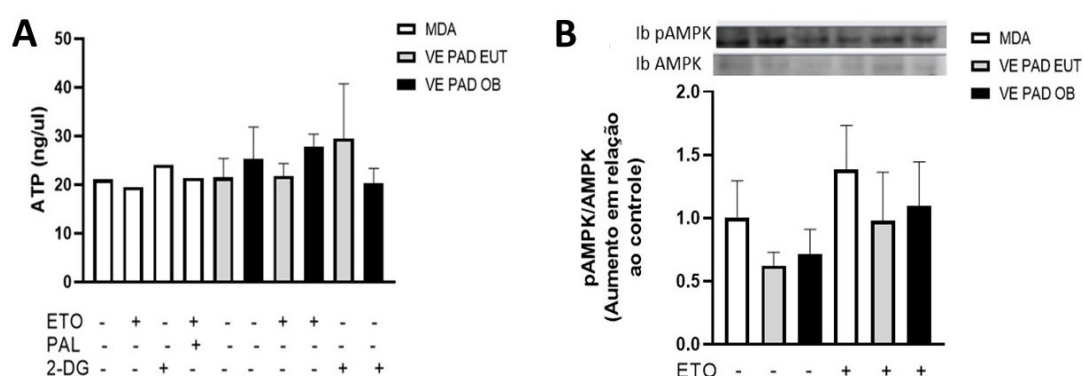
Nota: Destaca-se uma tendência de aumento da atividade de 6GPDH nos grupos tratados tanto com VE PAD EUT quanto VE PAD OB, porém no grupo VE PAD OB com inibição da oxidação lipídica houve uma redução significativo

Fonte: O autor, 2024

### 3.7 Efeito das vesículas extracelulares derivadas de pré-adipócitos sobre a produção de ATP e a fosforilação da enzima AMPK

Sabendo que o tratamento das células MDA-MB-231 com vesículas derivadas de pré-adipócitos eutróficos ou obesos culminou em um remodelamento metabólico, o que por sua vez, impactou em alterações na migração celular, resolvemos avaliar, nesse contexto, a produção inicial de ATP e a atividade da enzima AMPK (1 hora após os estímulos). Observamos que independente do estímulo (VE PAD EUT, VE PAD OB) e a via metabólica inibida (glicólise ou oxidação de lipídeos) não observamos diferença no conteúdo total de ATP (Gráfico 9 A) e uma tendência de redução na ativação da proteína AMPK quando estimulada tanto com VE PAD EUT quanto VE PAD OB, e uma tendência de aumento durante a inibição da oxidação de ácidos graxos (Gráfico 9 B).

Gráfico 9 - Produção de ATP e atividade da proteína AMPK após estímulo com VE PAD EUT ou VE PAD OB



Legenda: Avaliação da produção de ATP e atividade da proteína AMPK em células MDA-MB-231 após 1 h de estímulo com VE PAD EUT ou VE PAD OB. A- Quantificação de ATP; B- Ativação de AMPK. ETO: Etomoxir; PAL: Palmitato; 2-DG: 2-deoxy-d-glicose. N = 3 para a quantificação de ATP; N=3-5 para a quantificação da fosforilação da enzima AMPK. Os dados são expressos como médias  $\pm$  SEM. A análise estatística foi realizada no Graphpad Prism 8 usando ANOVA unidirecional com pós-teste de Sidak. \* P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,005, \*\*\*\*P<0,001.

Fonte: O autor, 2024.

## 4 DISCUSSÃO

As alterações promovidas pela obesidade, em especial a desregulação inflamatória e metabólica, são condições compartilhadas com o processo de formação, progressão e metastização de diversos tipos de câncer. (AVGERINOS et al., 2019). Essas interações podem ser mediadas por VE liberadas pelo TA e impactar na malignidade tumoral (MORAES et al., 2021). Uma vez que VE são estruturas que carregam, de forma estável e a longas distâncias, vários tipos de biomoléculas capazes de alterar o fenótipo de outros tipos celulares, e que seu conteúdo reflete estado fisiológico da célula de origem (VAN NIEL; D'ANGELO; RAPOSO, 2018), faz-se relevante analisar como impactam células-alvo em diferentes contexto patológicos.

Trabalho prévio do nosso grupo demonstrou que VE liberadas pelo TA obeso são capazes de aumentar, *in vitro*, parâmetros relacionadas à malignidade como migração e invasão em linhagens tumorais de mama MDA-MB-231 e proliferação em células MCF-7 (RAMOS-ANDRADE et al., 2020). No entanto, ainda existem lacunas relevantes a serem exploradas, as quais são objetivos do presente estudo. Uma delas diz respeito a alterações no metabolismo energético, uma vez que o metabolismo tumoral tem sido reconhecido como uma característica chave na progressão do câncer, redefinindo-o não apenas como uma doença genética, mas também como uma doença metabólica (GYAMFI; KIM; CHOI, 2022). A relevância do estudo das interações entre obesidade e câncer de mama é amplamente reconhecida, especialmente com o crescente interesse nas VE e sua influência no microambiente tumoral (KHANH et al., 2020; RAMOS-ANDRADE et al., 2020; WANG et al., 2019). Apesar dos avanços significativos nessa área, há uma notável ausência de trabalhos focados especificamente no estudo de como pré-adipócitos, impactam na progressão do câncer de mama. Estudos anteriores, incluindo aqueles realizados pelo nosso grupo de pesquisa, têm se concentrado principalmente em como as VE derivadas do tecido adiposo modulam células tumorais de mama. No entanto, os pré-adipócitos, devido ao seu papel chave na homeostase do tecido adiposo e sua capacidade de manter um estado de inflamação crônica, representam um tipo celular relevante, porém ainda pouco explorado.

Essa lacuna é ainda mais exacerbada pela escassez de modelos experimentais adequados para a investigação do papel dos pré-adipócitos sobre células de mama em um contexto de obesidade. Sendo assim, o presente trabalho propôs um modelo de produção de

VE PAD EU e VE PAD OB, in vitro, baseado na educação de pré-adipócitos primários humanos subcutâneos através da exposição ao meio condicionado da cultura de explantes de tecido adiposo (eutrófico ou obeso). O modelo se mostrou eficaz visto que confirmamos a existência e a distribuição por tamanho das VE PAD- ambas majoritariamente vesículas menores- como também demonstrou efeitos funcionais e metabólicos distintos. Ressalta-se que a despeito da origem metabólica diferente, a concentração das VE eram similares ao compararmos VE-PAD-EUT e VE-PAD-OB. Observamos diferenças na frequência de VE na faixa de até 100 nm entre os grupos. A diferença de tamanho nesta faixa pode ser indicativo de uma biogênese diferencial (maior presença de exossomos em VE PAD OB), que por sua vez está relacionada a alterações de conteúdo, que pode estar relacionado as alterações funcionais e metabólicas induzidas nas células MDA-MB-231 com elas estimuladas.

Dessa forma, tais achados indicam que a maioria das VE utilizadas no presente estudo são constituídas de exossomos, contudo para afirmar-se que se trata de exossomos faz-se necessária a marcação de moléculas biomarcadores características de exossomos, como proteínas da família tetraspanina, CD9, CD63 e CD81.

A influência do metabolismo glicolítico e da oxidação lipídica nas células tumorais MDA-MB-231 foi avaliada através da utilização dos inibidores 2-DG e Etomoxir. Inicialmente, percebeu-se que a influência da inibição da oxidação lipídica e da glicólise em relação à célula sem inibição, eram similares após 24 horas de inibição, porém a inibição sustentada, até em 48 horas, demonstrou a dependência da oxidação lipídica para a viabilidade celular, uma vez que na presença de etomoxir observou-se um aumento de 25% na redução de viabilidade, o que não foi observado na presença de 2-DG que se manteve estável. Tal afirmação pôde ser corroborada pelo fato que na presença de etomoxir e 2-DG à redução na viabilidade se manteve nos mesmos patamares observados mediante a inibição por etomoxir apenas. Sendo assim, apesar da plasticidade metabólica, observou-se que o metabolismo lipídico demonstrou-se crucial para a manutenção da viabilidade de células MDA-MB-231 por longos longos períodos.

Broecker- Preuss et al avaliaram o impacto de 2-DG em células de linfoma com mutação em c-Myc (linhagens BJAB, OCI-LY3 e SUDHL-6) e viram que estas apresentaram redução em cerca de 50% em sua viabilidade após 48 horas em condições de 0,5% de SFB, metade da menor concentração utilizada neste trabalho (BROECKER-PREUSS et al., 2017). A diferença na concentração de SFB entre os estudos destaca a relevância da disponibilidade de nutrientes, em especial de lipídios presentes no soro, que podem oferecer vias alternativas de metabolismo energético e assim conferir uma certa plasticidade metabólica às células

tumorais auxiliando em sua sobrevivência. Na presença de 1% de SFB nós vimos a redução de 25 % nas células tratadas com 2-DG em relação ao controle, porém em 10% de SFB não houve redução significativa, provavelmente devido a uma alteração no perfil metabólico para um perfil oxidativo aliado a alta disponibilidade de lipídeos que permitiu a manutenção da viabilidade celular a despeito da inibição glicolítica.

De maneira interessante, o efeito combinado dos inibidores não resultou em uma redução completa da viabilidade celular, evidenciando a plasticidade metabólica da célula MDA-MB-231. Uma via metabólica que poderia estar aumentada de forma compensatória é a Glutaminólise, a qual não foi observada no presente estudo. Cardoso et al observaram a relevância crucial da glutaminólise para a viabilidade, migração e invasão de células de câncer de próstata (DU145 e PC3). Especificamente quanto a viabilidade, foi relatado que estas células tratadas com .10  $\mu$ M BTPES (inibidor da glutaminólise) apresentaram uma redução de aproximadamente 60% (CARDOSO et al., 2021).

Apesar da similaridade em concentração e tamanho, os efeitos metabólicos e funcionais em células MDA-MB-231 induzidos pelas VE PAD EUT e VE PAD OB diferiram significativamente, refletindo o contexto fisiológico de suas células de origem. A migração das células MDA-MB-231 estimuladas com VE PAD OB foi cerca de 3 vezes maior e a reversão aos níveis basais na presença de etomoxir demonstrou sua dependência da oxidação de ácidos graxos. Resultados similares foram relatados em células de melanoma por Lazar e Clement, que relataram que VE de adipócitos tanto eutróficos quanto obesos aumentaram a migração de duas linhagens de células de melanoma (SKMEL28 e 1205L) sendo a condição de obesidade o aumento mais pronunciado; além disso seus achados relataram que esse aumento da migração foi resultado da disponibilidade e quantidade de substrato lipídico à despeito da quantidade e de enzimas relacionadas à oxidação lipídica transportadas (CLEMENT et al., 2020; LAZAR et al., 2016).

Achados de outros trabalhos também reforçam a relevância da modulação metabólica induzida por VE liberadas pelo TA sobre células tumorais. Liu et al viram que células de câncer de mama (MCF-7) educadas com VE derivadas de TA mamário de mulheres obesas e com sobrepeso apresentaram aumento de sua proliferação, densidade mitocondrial, taxa de consumo de oxigênio e produção de ATP. Também foi visto que o conteúdo destas VE estava enriquecido em miRNAs como miR-155-5p, miR-10a-3p e miR-30a-3p em relação as VE de TA mamário de mulheres eutróficas. Ao silenciar estes miRNAs foi visto uma redução dos efeitos promovidos.

Dessa forma, acreditamos que como células precursoras de adipócitos, os pré-adipócitos apresentam algumas características comuns a esse tipo celular e possam liberar enzimas, substratos ou outros moduladores metabólicos dentro de suas VE; de forma que possivelmente as VE PAD OB devem apresentar uma maior quantidade de enzimas relacionadas à oxidação lipídica do que VE PAD EUT. Connolly et al analisaram diferenças na composição de VE derivadas de células 3T3-L1 antes e depois da adipogênese. Seus resultados demonstraram que apesar do já esperado aumento no conteúdo lipídico nas VE de adipócitos maduros em relação aos pré-adipócitos, a concentração de determinados lipídeos era dependente do estado da célula de origem, no qual palmitato apresentava um aumento expressivo ao longo do processo de diferenciação enquanto outros ácidos graxos como ácido icosatrienóico ou ácido araquidônico encontravam-se mais presentes nos estágios iniciais (CONNOLLY et al., 2015). Haja visto, que no presente estudo analisamos pré-adipócitos em condições metabólicas distintas, e que a literatura é escassa na caracterização do conteúdo molecular de VE derivadas de pré-adipócitos, acreditamos que futuras análises acerca do conteúdo molecular das VE PAD EUT e VE PAD OB são necessárias.

A percepção de que o estímulo das células MDA-MB-231 com as VE PAD EUT mediante inibição da glicólise aumentou seu potencial migratório sugere que as VE PAD EUT induzem o aumento do metabolismo glicolítico nas células tumorais e que mediante sua inibição, houve um desvio metabólico compensatório em direção a um perfil mais oxidativo, favorecendo, portanto, o aumento da migração celular. Em consonância, observamos que o estímulo das células com VE PAD EUT induziu um aumento na produção de lactato, enquanto o estímulo com as VE PAD OB não alterou a produção de lactato em relação ao grupo sem estímulo.

O ensaio de lactato por sua vez levantou a hipótese de que o não aumento da produção de lactato nas células estimuladas por VE PAD OB estaria relacionado a desvios de intermediários glicolíticos para vias de biossíntese como a via das pentoses fosfato. E esta hipótese também foi confirmada, ao ser visto que atividade da enzima G6PDH nas células tratadas com VE PAD OB se encontrava reduzida mediante a inibição da oxidação lipídica, sugerindo que o aumento da oxidação lipídica modula positivamente a atividade de G6PDH. Apesar do achado encontrado apresentar uma característica dual, pois o aumento da atividade de G6PDH é marcadamente aumentado em células que apresentam aumento da síntese de ácidos graxos, o próprio aumento da atividade da G6PDH poderia indicar evidências de um desvio metabólico da glicólise para a via das pentoses-fosfato, o que explicaria a diminuição dos níveis de lactato induzidos pelas VE PAD OB em relação às VE PAD EUT. Uma outra

possibilidade seria o aumento da atividade de G6PDH como mecanismo compensatório anti-oxidante. Rodrigues et al demonstraram que o tratamento de células MDA-MB-231 com butirato de sódio, reduziu a glicólise e aumento da respiração mitocondrial, além de aumentar em até três vezes atividade da G6PDH, se relacionando com um aumento da atividade anti-oxidante em consonância com o aumento de expressão da enzima SOD2 (RODRIGUES et al., 2015).

Ao analisar a atividade da enzima piruvato quinase, a tendência de redução no grupo tratado com VE PAD OB estava congruente com o não aumento de lactato encontrado, porém no grupo VE PAD EUT, no qual esperávamos um aumento de atividade dessa enzima foi registrado uma redução na atividade desta enzima. Esse resultado inesperado pode ser elucidado pela ativação da glutaminólise, uma via metabólica não avaliada no presente trabalho porém fundamental para as células tumorais e intrinsecamente ligada à regulação da glicólise (YANG; VENNETI; NAGRATH, 2017).

A isoforma PKM2 da piruvato quinase, prevalente em células tumorais, pode alternar entre duas configurações: uma forma tetramérica ativa e uma dimérica menos ativa. Li et al., demonstrou que um aumento na forma dimérica de PKM2 estimula o consumo de glutamina e a expressão de RNA mensageiro referente a enzima Glutaminase 1 (GLS-1) em células de adenocarcinoma de cólon (SW480); enquanto a conversão do dímero em tetrâmero causou o efeito oposto (LI et al., 2020). A modulação negativa da atividade de PKM2, portanto, parece ser um mecanismo eficaz para aumentar a glutaminólise.

O aumento da glutaminólise por sua vez poderia explicar o aumento observado na produção de lactato através da atuação da enzima málica, que converte malato, um intermediário do ciclo TCA, em piruvato, alimentando a via glicolítica sem depender diretamente da atividade da piruvato quinase. Em células de glioblastoma esse comportamento foi relatado, no qual até de 60% da glutamina foi metabolizada em lactato. Este desvio metabólico fornece NADPH, importante para síntese sustentada de ácidos graxos (DEBERARDINIS et al., 2007).

A glutaminólise também poderia explicar a redução observada na atividade enzimática tanto no grupo controle quanto, de forma mais acentuada, no grupo tratado com VE PAD OB na presença de etomoxir. A interdependência desta via com a oxidação lipídica foi relatada por Camarrda et al., que revelou que em células de câncer de próstata (PC3 e DU145), o tratamento com 10  $\mu$ M de BPTES, um inibidor da glutaminólise, resultou em um aumento de 2 a 3 vezes na expressão de CPT1A (CARDOSO et al., 2021). Isso sugere que o bloqueio da glutaminólise pode promover uma maior dependência do catabolismo lipídico.

Analogamente, é plausível considerar que a inibição da oxidação de ácidos graxos pelo etomoxir possa induzir um aumento compensatório na glutaminólise, de forma a permitir a manutenção do TCA.

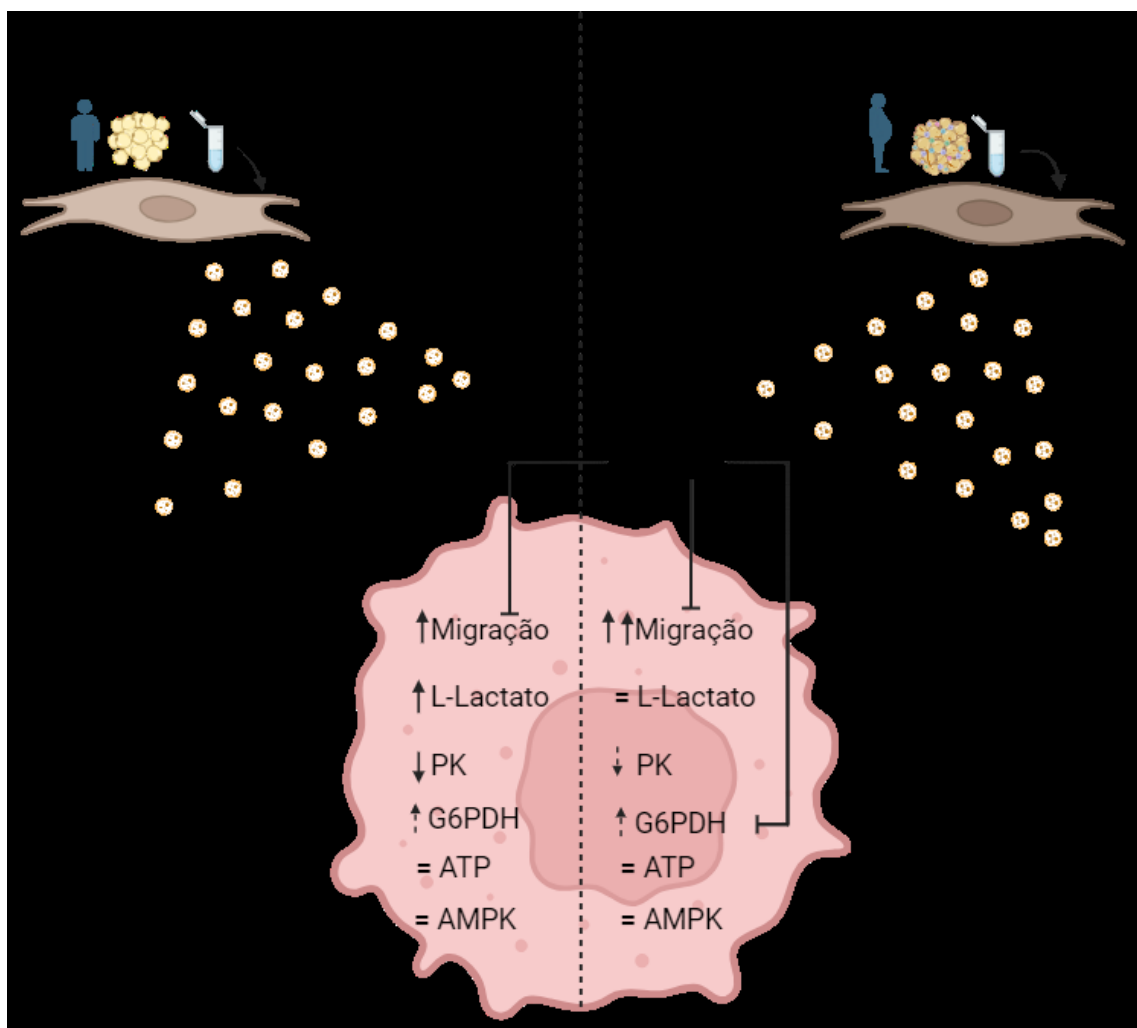
Por fim, a avaliação do estado energético das células pelos níveis de fosforilação de AMPK e pela quantificação de ATP não relevou alteração significativa pelas VE PAD. Algumas explicações são possíveis como limitações do tempo de detecção, que foi realizado após um intervalo de 1 horas e não por um acompanhamento contínuo, como feito em ensaios através da utilização de analisador metabólico em tempo real (Seahorse®). Outra possibilidade é que as alterações metabólicas não reflitam no aumento dos níveis globais de ATP.

Wang et al relatou o aumento da oxidação lipídica em células de câncer de mama co-cultivadas com adipócitos porém este aumento não estava acopladas à produção de ATP devido ao aumento da enzima desacopladora mitocondrial UCP-2 (WANG et al., 2017). Uma explicação possível seria que a desacoplação mitocondrial atuaria impedindo que houvesse um acúmulo de ATP, o que inibiria a manutenção da oxidação de ácidos graxos, que por sua vez está relacionado ao aumento da capacidade migratória.

## CONCLUSÃO

Em conclusão, este estudo destaca a importância dos pré-adipócitos na modulação do microambiente tumoral, especialmente no contexto da obesidade. A criação de um modelo experimental para a produção de VE de pré-adipócitos obesos (VE PAD OB) permitiu uma análise dos efeitos metabólicos e funcionais dessas vesículas em células de câncer de mama MDA-MB-231. Os resultados indicam que, apesar das semelhanças no perfil de tamanho das VE PAD OB e VE PAD EUT, seus impactos nas células tumorais são distintos, refletindo a influência do estado fisiológico das células de origem. A dependência da oxidação de ácidos graxos para a viabilidade celular a longo prazo e para migração celular, como sugere que a obesidade pode exacerbar a progressão tumoral por meio de alterações no metabolismo celular, em especial no lipídico, através dos pré-adipócitos. Além disso, a análise das vias metabólicas, como a produção de lactato e a atividade da via das pentoses fosfato, reforça a complexidade das interações metabólicas mediadas pelas VE PAD (Fig. 23). Estes achados reforçam a necessidade de investigações futuras para melhor compreender os mecanismos subjacentes e potencialmente desenvolver estratégias terapêuticas direcionadas.

Figura 23 - Esquema de conclusão dos efeitos de VE PAD EUT e VE PAD OB sobre células MDA-MB-231



Legenda: Esquema de conclusão dos efeitos de VE PAD EUT e VE PAD OB sobre células MDA-MB-231. PK: Piruvato quinase; G6PDH: Glicose-6-Fosfato-Desidrogenase.

Nota: Notar que vesículas extracelulares liberadas por pré-adipócitos previamente educados com meio condicionado de tecido adiposo obeso (VE PAD OB) ou eutrófico (VE PAD EUT) são capazes de aumentar a malignidade da linhagem tumoral de mama MDA-MB-231 em diferentes proporções e através de diferentes mecanismos metabólicos. A capacidade migratória de MDA-MB-231 foi aumentada de forma mais pronunciada condição de obesidade do que eutrofia, e este aumento demonstrou uma forte dependência da oxidação de ácidos graxos. Também vimos que o perfil metabólico induzido pelas VE PAD EUT e VE PAD OB é diferente, no qual apenas VE PAD EUT induziu aumento nos níveis de L-Lactato enquanto VE PAD OB manteve-se inalterado. Também vimos que na presença de etomoxir a tendência de aumento da atividade da enzima G6PDH foi revertida. Também foi vista uma redução na atividade da Piruvato Quinase (PK) em ambos os grupos e não foi observada alterações nos níveis de ATP e na ativação de AMPK nas condições analisadas.

Fonte: O autor, 2024

## REFERÊNCIAS

- ABDERRAHIM-FERKOUNE, A. et al. Transdifferentiation of preadipose cells into smooth muscle-like cells: role of aortic carboxypeptidase-like protein. **Experimental Cell Research**, v. 293, n. 2, p. 219–228, fev. 2004.
- AMBELE, M. A. et al. Adipogenesis: A Complex Interplay of Multiple Molecular Determinants and Pathways. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 12, p. 4283, 16 jun. 2020.
- AMEER, F. et al. De novo lipogenesis in health and disease. **Metabolism**, v. 63, n. 7, p. 895–902, jul. 2014.
- AMOEDO, N. D. et al. Targeting the mitochondrial trifunctional protein restrains tumor growth in oxidative lung carcinomas. **Journal of Clinical Investigation**, v. 131, n. 1, p. e133081, 4 jan. 2021.
- AVGERINOS, K. I. et al. Obesity and cancer risk: Emerging biological mechanisms and perspectives. **Metabolism**, v. 92, p. 121–135, mar. 2019.
- BENSAAD, K. et al. Fatty Acid Uptake and Lipid Storage Induced by HIF-1 $\alpha$  Contribute to Cell Growth and Survival after Hypoxia-Reoxygenation. **Cell Reports**, v. 9, n. 1, p. 349–365, out. 2014.
- BIANCHINI, G. et al. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 13, n. 11, p. 674–690, nov. 2016.
- BISHOP, K. et al. An Investigation into the Association between DNA Damage and Dietary Fatty Acid in Men with Prostate Cancer. **Nutrients**, v. 7, n. 1, p. 405–422, 8 jan. 2015.
- BROECKER-PREUSS, M. et al. Regulation of glucose uptake in lymphoma cell lines by c-MYC- and PI3K-dependent signaling pathways and impact of glycolytic pathways on cell viability. **Journal of Translational Medicine**, v. 15, n. 1, p. 158, dez. 2017.
- CAIRNS, R. A.; HARRIS, I. S.; MAK, T. W. Regulation of cancer cell metabolism. **Nature Reviews. Cancer**, v. 11, n. 2, p. 85–95, fev. 2011.
- CAMARDA, R. et al. Inhibition of fatty acid oxidation as a therapy for MYC-overexpressing triple-negative breast cancer. **Nature Medicine**, v. 22, n. 4, p. 427–432, abr. 2016.
- CAMPELLO, E. et al. Dynamics of circulating microparticles in obesity after weight loss. **Internal and Emergency Medicine**, v. 11, n. 5, p. 695–702, ago. 2016.
- CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 1, p. 277–359, jan. 2004.
- CARDOSO, H. J. et al. Glutaminolysis is a metabolic route essential for survival and growth of prostate cancer cells and a target of 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone regulation. **Cellular Oncology**, v. 44, n. 2, p. 385–403, abr. 2021.

CHANCE, B.; HESS, B. ON THE CONTROL OF METABOLISM IN ASCITES TUMOR CELL SUSPENSIONS. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 63, n. 5, p. 1008–1016, mar. 1956.

CHARRIÈRE, G. et al. Preadipocyte Conversion to Macrophage. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 11, p. 9850–9855, mar. 2003.

CHENG, L. et al. Brown and beige adipose tissue: a novel therapeutic strategy for obesity and type 2 diabetes mellitus. **Adipocyte**, v. 10, n. 1, p. 48–65, 1 jan. 2021.

CHOE, S. S. et al. Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. **Frontiers in Endocrinology**, v. 7, 13 abr. 2016.

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, 3 fev. 2020.

COLOMBO, M.; RAPOSO, G.; THÉRY, C. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 30, n. 1, p. 255–289, 11 out. 2014.

CONNOLLY, K. D. et al. Characterisation of adipocyte-derived extracellular vesicles released pre- and post-adipogenesis. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 4, n. 1, p. 29159, jan. 2015.

COX, A. G. et al. Yap regulates glucose utilization and sustains nucleotide synthesis to enable organ growth. **The EMBO Journal**, v. 37, n. 22, p. e100294, 15 nov. 2018.

DE LA CRUZ-LÓPEZ, K. G. et al. Lactate in the Regulation of Tumor Microenvironment and Therapeutic Approaches. **Frontiers in Oncology**, v. 9, p. 1143, 1 nov. 2019.

DEBERARDINIS, R. J. et al. Beyond aerobic glycolysis: Transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 49, p. 19345–19350, 4 dez. 2007.

DÜVEL, K. et al. Activation of a Metabolic Gene Regulatory Network Downstream of mTOR Complex 1. **Molecular Cell**, v. 39, n. 2, p. 171–183, 30 jul. 2010.

ESTEVE RÀFOLS, M. Tejido adiposo: heterogeneidad celular y diversidad funcional. **Endocrinología y Nutrición**, v. 61, n. 2, p. 100–112, fev. 2014.

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

FÈVE, B. et al. Pink adipose tissue: A paradigm of adipose tissue plasticity. **Annales d'Endocrinologie**, v. 85, n. 3, p. 248–251, jun. 2024.

FRIEDMAN, J. M.; HALAAS, J. L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. **Nature**, v. 395, n. 6704, p. 763–770, out. 1998.

- GESTA, S.; TSENG, Y.-H.; KAHN, C. R. Developmental Origin of Fat: Tracking Obesity to Its Source. **Cell**, v. 131, n. 2, p. 242–256, out. 2007.
- GIMBLE, J. M.; KATZ, A. J.; BUNNELL, B. A. Adipose-Derived Stem Cells for Regenerative Medicine. **Circulation Research**, v. 100, n. 9, p. 1249–1260, 11 maio 2007.
- GIRALT, M.; VILLARROYA, F. White, Brown, Beige/Brite: Different Adipose Cells for Different Functions? **Endocrinology**, v. 154, n. 9, p. 2992–3000, 1 set. 2013.
- GYAMFI, J.; KIM, J.; CHOI, J. Cancer as a Metabolic Disorder. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1155, 21 jan. 2022.
- HALL, K. D.; GUO, J. Obesity Energetics: Body Weight Regulation and the Effects of Diet Composition. **Gastroenterology**, v. 152, n. 7, p. 1718- 1727.e3, maio 2017.
- HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31–46, 1 jan. 2022.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, jan. 2000.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, mar. 2011.
- HEMMINGSSON, E. et al. The social origins of obesity within and across generations. **Obesity Reviews**, v. 24, n. 1, p. e13514, jan. 2023.
- HENSLEY, C. T. et al. Metabolic Heterogeneity in Human Lung Tumors. **Cell**, v. 164, n. 4, p. 681–694, 11 fev. 2016.
- HOLLIDAY, D. L.; SPEIRS, V. Choosing the right cell line for breast cancer research. **Breast Cancer Research**, v. 13, n. 4, p. 215, ago. 2011.
- ICARD, P. et al. ATP citrate lyase: A central metabolic enzyme in cancer. **Cancer Letters**, v. 471, p. 125–134, fev. 2020.
- ISLAMI, F. 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, jan. 2018.
- JERNÅS, M. et al. Separation of human adipocytes by size: hypertrophic fat cells display distinct gene expression. **The FASEB Journal**, v. 20, n. 9, p. 1540–1542, jul. 2006.
- JIANG, P. et al. p53 regulates biosynthesis through direct inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase. **Nature Cell Biology**, v. 13, n. 3, p. 310–316, mar. 2011.
- KELLY, T. et al. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. **International Journal of Obesity**, v. 32, n. 9, p. 1431–1437, set. 2008.
- KHANH, V. C. et al. Type 2 Diabetes Mellitus Induced Paracrine Effects on Breast Cancer Metastasis Through Extracellular Vesicles Derived from Human Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells and Development**, v. 29, n. 21, p. 1382–1394, 1 nov. 2020.

KOH, Y. J. et al. Activation of PPAR $\gamma$  induces profound multilocularization of adipocytes in adult mouse white adipose tissues. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 41, n. 12, p. 880, 2009.

KRATCHMAROVA, I. et al. A Proteomic Approach for Identification of Secreted Proteins during the Differentiation of 3T3-L1 Preadipocytes to Adipocytes. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 1, n. 3, p. 213–222, mar. 2002.

LARGE, V. et al. Metabolism of lipids in human white adipocyte. **Diabetes & Metabolism**, v. 30, n. 4, p. 294–309, set. 2004.

LAZAR, I. 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, 15 jul. 2016.

LEE, J. Y. et al. Reciprocal Modulation of Toll-like Receptor-4 Signaling Pathways Involving MyD88 and Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT by Saturated and Polyunsaturated Fatty Acids. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 39, p. 37041–37051, set. 2003.

LEE, J.-E. et al. Proteomic Analysis of Extracellular Vesicles Released by Adipocytes of Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) Rats. **The Protein Journal**, v. 34, n. 3, p. 220–235, jun. 2015.

LEE, J.-Y. et al. Polyunsaturated fatty acid biosynthesis pathway determines ferroptosis sensitivity in gastric cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 51, p. 32433–32442, 22 dez. 2020.

LI, L. et al. Pyruvate Kinase M2 Coordinates Metabolism Switch between Glycolysis and Glutaminolysis in Cancer Cells. **iScience**, v. 23, n. 11, p. 101684, nov. 2020.

LIBERTI, M. V.; LOCASALE, J. W. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? **Trends in Biochemical Sciences**, Special Issue: Mitochondria & Metabolism. v. 41, n. 3, p. 211–218, 1 mar. 2016.

LIU, P.-P. et al. Elimination of chronic lymphocytic leukemia cells in stromal microenvironment by targeting CPT with an antiangina drug perhexiline. **Oncogene**, v. 35, n. 43, p. 5663–5673, 27 out. 2016.

LIU, X.-Z.; PEDERSEN, L.; HALBERG, N. Cellular mechanisms linking cancers to obesity. **Cell Stress**, v. 5, n. 5, p. 55–72, 10 maio 2021.

LUO, X. et al. Obesity induces preadipocyte CD36 expression promoting inflammation via the disruption of lysosomal calcium homeostasis and lysosome function. **EBioMedicine**, v. 56, p. 102797, jun. 2020.

MENU, E.; VANDERKERKEN, K. Exosomes in multiple myeloma: from bench to bedside. **Blood**, v. 140, n. 23, p. 2429–2442, 8 dez. 2022.

MORAES, J. A. et al. Adipose Tissue-Derived Extracellular Vesicles and the Tumor Microenvironment: Revisiting the Hallmarks of Cancer. **Cancers**, v. 13, n. 13, p. 3328, 2 jul. 2021.

MRAZ, M.; HALUZIK, M. The role of adipose tissue immune cells in obesity and low-grade inflammation. **Journal of Endocrinology**, v. 222, n. 3, p. R113–R127, set. 2014.

NATH, A. et al. Elevated free fatty acid uptake via CD36 promotes epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 14752, 1 out. 2015.

ORRANTIA-BORUNDA, E.; ACUÑA-AGUILAR, L. E.; RAMÍREZ-VALDESPINO, C. A. Nanomaterials for Breast Cancer. Em: DEPARTMENT OF MEDICAL EDUCATION, DR. KIRAN C. PATEL COLLEGE OF ALLOPATHIC MEDICINE, NOVA SOUTHEASTERN UNIVERSITY, FL, USA; MAYROVITZ, H. N. (Eds.). **Breast Cancer**. [s.l.] Exon Publications, 2022. p. 149–162.

OSTHUS, R. C. et al. Deregulation of Glucose Transporter 1 and Glycolytic Gene Expression by c-Myc. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 29, p. 21797–21800, jul. 2000.

OUCHI, N. et al. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 2, p. 85–97, fev. 2011.

PADANAD, M. S. et al. Fatty Acid Oxidation Mediated by Acyl-CoA Synthetase Long Chain 3 Is Required for Mutant KRAS Lung Tumorigenesis. **Cell Reports**, v. 16, n. 6, p. 1614–1628, ago. 2016.

PARK, J. H.; PYUN, W. Y.; PARK, H. W. Cancer Metabolism: Phenotype, Signaling and Therapeutic Targets. **Cells**, v. 9, n. 10, p. 2308, 16 out. 2020.

PAVLOVA, N. N.; THOMPSON, C. B. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. **Cell Metabolism**, v. 23, n. 1, p. 27–47, jan. 2016.

PI-SUNYER, X. The Medical Risks of Obesity. **Postgraduate Medicine**, v. 121, n. 6, p. 21–33, 1 nov. 2009.

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

RENOVATO-MARTINS, M. 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, jan. 2017.

RENOVATO-MARTINS, M. et al. Obese Adipose Tissue Secretion Induces Inflammation in Preadipocytes: Role of Toll-Like Receptor-4. **Nutrients**, v. 12, n. 9, p. 2828, 16 set. 2020a.

RENOVATO-MARTINS, M. et al. Obese Adipose Tissue Secretion Induces Inflammation in Preadipocytes: Role of Toll-Like Receptor-4. **Nutrients**, v. 12, n. 9, p. 2828, 16 set. 2020b.

ROBERTS, D. J. et al. Akt Phosphorylates HK-II at Thr-473 and Increases Mitochondrial HK-II Association to Protect Cardiomyocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 33, p. 23798–23806, ago. 2013.

RODRIGUES, M. F. et al. Reciprocal Modulation of Histone Deacetylase Inhibitors Sodium Butyrate and Trichostatin A on the Energy Metabolism of Breast Cancer Cells: BREAST CANCER HDACi METABOLIC EFFECTS. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 116, n. 5, p. 797–808, maio 2015.

SÁNCHEZ-CEINOS, J. et al. Impaired mRNA splicing and proteostasis in preadipocytes in obesity-related metabolic disease. **eLife**, v. 10, p. e65996, 21 set. 2021.

SHAO, H. et al. Carnitine palmitoyltransferase 1A functions to repress FoxO transcription factors to allow cell cycle progression in ovarian cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 4, p. 3832–3846, 26 jan. 2016.

SHI, J. et al. High Expression of CPT1A Predicts Adverse Outcomes: A Potential Therapeutic Target for Acute Myeloid Leukemia. **EBioMedicine**, v. 14, p. 55–64, dez. 2016.

SLAWIK, M.; VIDAL-PUIG, A. J. Lipotoxicity, overnutrition and energy metabolism in aging. **Ageing Research Reviews**, v. 5, n. 2, p. 144–164, maio 2006.

STEFAN, N. et al. Metabolically healthy obesity: epidemiology, mechanisms, and clinical implications. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, v. 1, n. 2, p. 152–162, out. 2013.

STINCONE, A. et al. The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. **Biological Reviews**, v. 90, n. 3, p. 927–963, 2015.

SUN, L.; LV, S.; SONG, T. O-GlcNAcylation links oncogenic signals and cancer epigenetics. **Discover. Oncology**, v. 12, dez. 2021.

TCHOUKALOVA, Y. D.; SARR, M. G.; JENSEN, M. D. Measuring committed preadipocytes in human adipose tissue from severely obese patients by using adipocyte fatty acid binding protein. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 287, n. 5, p. R1132–R1140, nov. 2004.

TORCASIO, R. et al. Lipid metabolic vulnerabilities of multiple myeloma. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 23, n. 7, p. 3373–3390, 28 ago. 2023.

ÜÇAL, M. et al. Inflammatory Pre-Conditioning of Adipose-Derived Stem Cells with Cerebrospinal Fluid from Traumatic Brain Injury Patients Alters the Immunomodulatory Potential of ADSC Secretomes. **Journal of Neurotrauma**, v. 38, n. 16, p. 2311–2322, 15 ago. 2021.

VAN NIEL, G.; D'ANGELO, G.; RAPOSO, G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 19, n. 4, p. 213–228, abr. 2018.

WANG, S. et al. Exosomes secreted by mesenchymal stromal/stem cell-derived adipocytes promote breast cancer cell growth via activation of Hippo signaling pathway. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 10, n. 1, p. 117, dez. 2019.

WANG, T. et al. JAK/STAT3-Regulated Fatty Acid  $\beta$ -Oxidation Is Critical for Breast Cancer Stem Cell Self-Renewal and Chemoresistance. **Cell Metabolism**, v. 27, n. 1, p. 136–150.e5, jan. 2018.

- WANG, Y. Y. et al. Mammary adipocytes stimulate breast cancer invasion through metabolic remodeling of tumor cells. **JCI Insight**, v. 2, n. 4, 23 fev. 2017.
- WARBURG, O. On the origin of cancer cells. **Science (New York, N.Y.)**, v. 123, n. 3191, p. 309–314, 24 fev. 1956.
- WEISBERG, S. P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 12, p. 1796–1808, 15 dez. 2003.
- WELSH, J. A. et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 13, n. 2, p. e12404, fev. 2024.
- WU, J. et al. Beige Adipocytes Are a Distinct Type of Thermogenic Fat Cell in Mouse and Human. **Cell**, v. 150, n. 2, p. 366–376, jul. 2012.
- YANG, L.; VENNETI, S.; NAGRATH, D. Glutaminolysis: A Hallmark of Cancer Metabolism. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 19, n. 1, p. 163–194, 21 jun. 2017.
- YAO, J.; WU, D.; QIU, Y. Adipose tissue macrophage in obesity-associated metabolic diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 977485, 2 set. 2022.
- YE, J. Emerging role of adipose tissue hypoxia in obesity and insulin resistance. **International Journal of Obesity**, v. 33, n. 1, p. 54–66, jan. 2009.
- YING, H. et al. Oncogenic Kras Maintains Pancreatic Tumors through Regulation of Anabolic Glucose Metabolism. **Cell**, v. 149, n. 3, p. 656–670, abr. 2012.
- YOUNG, P.; ARCH, J. R. S.; ASHWELL, M. Brown adipose tissue in the parametrial fat pad of the mouse. **FEBS Letters**, v. 167, n. 1, p. 10–14, 13 fev. 1984.
- ZHANG, C. et al. Cullin3–KLHL25 ubiquitin ligase targets ACLY for degradation to inhibit lipid synthesis and tumor progression. **Genes & Development**, v. 30, n. 17, p. 1956–1970, 1 set. 2016.
- ZHANG, Q. et al. Adipocyte-Derived Exosomal MTPP Suppresses Ferroptosis and Promotes Chemoresistance in Colorectal Cancer. **Advanced Science**, v. 9, n. 28, p. 2203357, out. 2022.
- ZHANG, Y. et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, n. 6505, p. 425–432, dez. 1994.