

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(IMUNOLOGIA E DOENÇAS INFECTOPARASITÁRIAS/ GENÉTICA E  
BIOTECNOLOGIA)  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Augusto César da Costa**

**OS EFEITOS DA INTERAÇÃO DO TECIDO ADIPOSEO DE  
INDIVÍDUOS COM OBESIDADE SOBRE FIBROBLASTOS  
PULMONARES E SEU PAPEL NO CÂNCER DE MAMA**

JUIZ DE FORA

2023

**AUGUSTO CÉSAR DA COSTA**

**OS EFEITOS DA INTERAÇÃO DO TECIDO ADIPOSEO DE  
INDIVÍDUOS COM OBESIDADE SOBRE FIBROBLASTOS  
PULMONARES E SEU PAPEL NO CÂNCER DE MAMA**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias para obtenção do Título de Mestre Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias.

**Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Jacy Gameiro**  
**Co-Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Ana Cristina Moura Gualberto**

JUIZ DE FORA  
2023

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

da Costa, Augusto César.

Os efeitos da interação do tecido adiposo de indivíduos com obesidade sobre fibroblastos pulmonares e seu papel no câncer de mama / Augusto César da Costa. -- 2023.

112 f.

Orientadora: Jacy Gameiro

Coorientadora: Ana Cristina Moura Gualberto

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2023.

1. Obesidade. 2. Vesículas Extracelulares. 3. Fibroblastos. 4. Câncer de mama. I. Gameiro, Jacy, orient. II. Gualberto, Ana Cristina Moura, coorient. III. Título.

**AUGUSTO CÉSAR DA COSTA**

**OS EFEITOS DA INTERAÇÃO DO TECIDO ADIPOSEDO INDIVÍDUOS COM OBESIDADE SOBRE  
FIBROBLASTOS PULMONARES E SEU PAPEL NO CÂNCER DE MAMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de concentração: Imunologia e Doenças Infecto Parasitárias.

Aprovada em 21 de agosto de 2023.

**BANCA EXAMINADORA**

**Profa. Dra. Jacy Gameiro - Orientador**  
Universidade Federal de Juiz de Fora

**Profa. Dra. Camila Maria Longo Machado**  
Instituto do Câncer do Estado de São Paulo

**Profa. Dra. Kelly Grace Magalhães**  
Universidade de Brasília - UnB

Juiz de Fora, 10/07/2023.



Documento assinado eletronicamente por Jacy Gameiro, Professor(a), em 22/08/2023, às 13:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **KELLY GRACE MAGALHAES, Usuário Externo**, em 22/08/2023, às 13:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Camila Maria Longo Machado, Usuário Externo**, em 24/08/2023, às 14:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Augusto César da Costa, Usuário Externo**, em 25/08/2023, às 15:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf ([www2.ufjf.br/SEI](http://www2.ufjf.br/SEI)) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1360229** e o código CRC **7A8B3BEB**.

Dedico esse trabalho aos meus pais,  
por sempre terem apoiado meus estudos e não medirem  
esforços para que eu pudesse alcançar meus sonhos.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Silvânia e Nelson, por sempre me apoiarem, por todo amor incondicional e confiança.

A minha orientadora Dr<sup>a</sup> Jacy Gameiro, por ter me acolhido tão bem nesses últimos anos, por abrir as portas de seu laboratório, pelas conversas honestas e todo incentivo, mesmo nos momentos difíceis.

A minha co-orientadora Dr<sup>a</sup> Ana Gualberto, por me auxiliar de forma próxima, pelas conversas e incentivos!

Aos companheiros de laboratório, Diego, Letícia, Letícia Venerando, Camila, Sara e Maria Júlia e Victória, que foram parte essencial para que essa pesquisa fosse desenvolvida, seja pelo auxílio nos experimentos, seja nas conversas descontraídas e/ou desabafos. O apoio de vocês foi fundamental para que eu pudesse concluir essa etapa! Obrigado por me acolherem tão bem no laboratório e em Juiz de Fora!

Ao médico Dr. Victor Cangussu, pela parceria e ajuda com a coleta do material biológico utilizado nesse trabalho.

A professora Dr<sup>a</sup> Kézia Scopel por gentilmente fornecer as células Wi-38.

Ao professor Dr. Vinícius Rocha, pelo auxílio no processamento das amostras para a microscopia eletrônica de transmissão, bem como com a aquisição de imagens.

Aos colaboradores do Laboratório de Imunotrombose a UFJF, pelas conversas, ensinamentos e auxílio na execução de experimentos; Professor Dr. Eugênio Hottz, Nathália, Laura, Cecília e, em especial a Paula, por sempre ser solícita, pelas conversas, pelo auxílio durante o ELISA e na citometria.

Aos técnicos do LIP, Bárbara e Rogério, por sempre serem solícitos e auxiliar na utilização dos equipamentos dos laboratórios.

Aos colaboradores do LDNano da UFJF, Professor Dr. Frederico Pittella, Davi e Bia, por auxiliarem na utilização do Zetasizer e disponibilizarem o reagente MTT.

À Leidinha, por sempre ser extremamente solícita!

Aos meus irmãos Sarah e Guilherme, vó Zélia, tios Sérgio e Sandro, e minhas cunhadas Bruna e Franciele, por sempre me apoiarem e sempre estarem presentes na minha vida!

Ao meu companheiro de vida, Vinicius, por ser meu porto, por todo carinho e motivação, além de sempre estar ao meu lado nos momentos felizes e tristes.

Às minhas amigas, pelo apoio, conversas, desabafos, fofocas e jogatinas durante a pandemia, em especial, Ana, Danielly, Iolete, Jessamy, Jéssica, Milady e Renata.

Aos colegas e amigos do HD, em especial, Flávia, Maicon, Patrícia, Simone, Janaína, Joice, Luciana, Iriana, Paula, Paulinho, Joice e Nalu por me apoiarem durante todo o mestrado, por auxiliarem no meu desenvolvimento profissional e pessoal.

A todos àqueles que contribuíram para o meu desenvolvimento e que me apoiaram até aqui, em especial a professora Elisa Aiko Miyasato, que já em meu ensino médio me mostrou as belezas da Biologia e sempre foi minha inspiração para as atividades docentes e de pesquisa.

A UFJF, FAPEMIG e CNPq pelo financiamento dos materiais e produtos utilizados nessa pesquisa.

*“Ninguém nasce feito,  
é experimentando-nos no mundo que nós nos fazemos”.*

Paulo Freire

## RESUMO

A obesidade está relacionada com a gênese e/ou agravamento de diversas doenças, como o câncer de mama. O desenvolvimento da doença metastática nessa neoplasia está relacionado com pior prognóstico. Todavia, ainda permanece a ser melhor compreendido se e como o tecido adiposo de indivíduos com obesidade (TAO) pode modular células estromais em sítios secundários, como os fibroblastos, e contribuir, dessa forma, para a disseminação das células malignas e metástase. Aqui, investigamos se fatores solúveis e pequenas vesículas extracelulares (pVEs) derivadas do TAO (pVEsOb) poderiam influenciar alterações funcionais nos fibroblastos, bem como se essas possíveis alterações poderiam aumentar a migração de células tumorais mamárias triplo-negativas MDA-MB-231 *in vitro*. O tecido adiposo foi obtido de voluntários eutróficos e com obesidade e cultivado em meio de cultura. O sobrenadante foi recolhido e ultracentrifugado para a obtenção de meios depletados de pVEs do TA de indivíduos eutróficos (MdEu) e com obesidade (MdOb) e as pVEsOb. As pVEs isoladas foram caracterizadas por espalhamento dinâmico da luz (DLS) e microscopia eletrônica de transmissão. Fibroblastos pulmonares Wi-38 foram tratados com MdEu, MdOb ou pVEsOb e ensaios de internalização das pVEs, viabilidade, proliferação, formação de colônias e cicatrização *in vitro* foram realizados. Ademais, foram investigados mediadores solúveis pró-inflamatórios no sobrenadante de fibroblastos tratados, além da expressão gênica de genes associados com a ativação de fibroblastos. Os fibroblastos tratados também foram co-cultivados com células MDA-MB-231, utilizando inserto Transwell, para verificar a migração das células tumorais. Isolamos pVEs com diâmetro hidrodinâmico médio de 122,4 nm e morfologia de prato típica de pVEs. Ademais, essas nanovesículas foram internalizadas com sucesso por fibroblastos pulmonares. Nenhum dos tratamentos alterou a proliferação celular e a viabilidade avaliada por método de exclusão por azul de tripan. Todavia, a viabilidade metabólica, avaliada por MTT, foi aumentada em células tratadas com MdEu e diminuída em células tratadas com MdOb, após 48 horas do tratamento. Além disso, pVEsOb diminuíram a viabilidade metabólica 24 e 48h após o tratamento. Observamos que o MdEu, mas não o MdOb, favoreceu a formação de colônias após 14 dias de tratamento. Somente MdEu aumentou a migração coletiva no ensaio de cicatrização *in vitro* 24 horas após o tratamento. Ademais, observamos o aumento dos mediadores solúveis Ang1, IL1- $\beta$ , IL-6, RANTES, MIF e TNF- $\alpha$  em fibroblastos tratados com MdOb 24 e 48 horas após o tratamento. pVEsOb induziram apenas a secreção de Ang1 por fibroblastos pulmonares. Não observamos diferença na expressão dos genes S100A4 e CCL2 entre os diferentes grupos. Por fim, não observamos aumento da migração de células MDA-MB-231 co-cultivadas com fibroblastos tratados. Os fibroblastos pulmonares sofrem alterações funcionais no contexto da obesidade, mas nessas condições, *in vitro*, não estão relacionados no aumento da migração de células tumorais. Entretanto, mais investigações são necessárias para verificar se a comunicação endócrina entre o TAO e fibroblastos pode ser importante para outras fisiopatologias do sistema respiratório, bem como para a quimioatração e ativação de leucócitos que, em conjunto, podem potencializar respostas pró-metastáticas no câncer de mama.

**Palavras chaves:** Fibroblastos. Obesidade. Metástase. Câncer de mama.

## ABSTRACT

Obesity is related to the genesis and/or worsening of several diseases, such as breast cancer. The development of metastatic disease in this neoplasm is related to a worse prognosis. However, it remains to be better understood whether and how adipose tissue from individuals with obesity (OAT) can modulate stromal cells in secondary sites, such as fibroblasts, and thus contribute to the spread of malignant cells and metastasis. Here, we investigated whether soluble factors and small extracellular vesicles (sEVs) derived from OAT (sEVsOb) could influence functional changes in fibroblasts, as well as whether these possible changes could increase the migration of triple-negative breast tumor cells MDA-MB-231 in vitro. Adipose tissue was obtained from eutrophic and obese volunteers and cultivated in culture medium. The supernatant was collected and ultracentrifuged to obtain media depleted of sEVs from the TA of eutrophic (MdEu) and obese (MdOb) individuals and the sEVsOb. Isolated sEVs were characterized by dynamic light scattering (DLS) and transmission electron microscopy. Wi-38 lung fibroblasts were treated with MdEu, MdOb or sEVsOb and sEVs internalization, viability, proliferation, colony formation and in vitro wound healing assays were performed. Furthermore, soluble pro-inflammatory mediators were investigated in the supernatant of treated fibroblasts, in addition to gene expression of genes associated with fibroblast activation. The treated fibroblasts were also co-cultured with MDA-MB-231 cells, using Transwell insert, to verify tumor cell migration. We isolated sEVs with an average hydrodynamic diameter of 122.4 nm and dish morphology typical of sEVs. Furthermore, these nanovesicles were successfully internalized by lung fibroblasts. None of the treatments changed cell proliferation and viability assessed by the trypan blue exclusion method. However, metabolic viability, assessed by MTT, was increased in cells treated with MdEu and decreased in cells treated with MdOb, after 48 hours of treatment. Furthermore, sEVsOb decreased metabolic viability 24 and 48h after treatment. We observed that MdEu, but not MdOb, favored colony formation after 14 days of treatment. Only MdEu increased collective migration in the in vitro healing assay 24 hours after treatment. Furthermore, we observed an increase in the soluble mediators Ang1, IL1- $\beta$ , IL-6, RANTES, MIF and TNF- $\alpha$  in fibroblasts treated with MdOb 24 and 48 hours after treatment. sEVsOb only induced Ang1 secretion by lung fibroblasts. We did not observe any difference in the expression of the S100A4 and CCL2 genes between the different groups. Finally, we did not observe increased migration of MDA-MB-231 cells co-cultured with treated fibroblasts. Lung fibroblasts undergo functional changes in the context of obesity, but under these conditions, in vitro, they are not involved in increased tumor cell migration. However, further investigations are needed to verify whether endocrine communication between the OAT and fibroblasts may be important for other pathophysiology of the respiratory system, as well as for the chemoattraction and activation of leukocytes which, together, may potentiate pro-metastatic responses in breast cancer.

**Keywords:** Fibroblasts. Obesity. Metastasis. Breast cancer.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Arquitetura do tecido adiposo .....	21
<b>Figura 2.</b> Principais depósitos de tecido adiposo branco no corpo humano e suas divisões .....	22
<b>Figura 3.</b> Desenvolvimento e remodelação do tecido adiposo na saúde e no desenvolvimento da obesidade .....	24
<b>Figura 4.</b> Breve classificação histológica das neoplasias mamárias .....	28
<b>Figura 5.</b> Biogênese e secreção de exossomos .....	40
<b>Figura 6.</b> Esquema do delineamento experimental. ....	48
<b>Figura 7.</b> Processo de centrifugação e ultracentrifugação para a obtenção do meio condicionado livre de vesículas extracelulares.....	51
<b>Figura 8.</b> Diâmetro das pVEs obtidas do tecido adiposo de indivíduos com obesidade.....	63
<b>Figura 9.</b> Microscopia eletrônicas das pVEs isoladas do TAV de indivíduos com obesidade. Setas vermelhas indicam as pequenas VEs .....	63
<b>Figura 10.</b> Internalização das pVEsOb coradas com PKH26 por células Wi-38.....	64
<b>Figura 11.</b> Avaliação da viabilidade celular pelo método de exclusão de azul de Tripán, de fibroblastos pulmonares Wi-38 tratados com os meios condicionados depletados de VEs derivados do tecido adiposo de indivíduos com obesidade ou eutrófico, e pVEsOb, em diferentes tempos .....	65
<b>Figura 12.</b> Avaliação da viabilidade celular pelo método de redução do MTT, de fibroblastos pulmonares Wi-38 tratados com os meios condicionados depletados de VEs derivados do tecido adiposo de indivíduos com obesidade ou eutrófico, e pVEsOb, em diferentes tempos.....	66
<b>Figura 13.</b> Avaliação da proliferação de fibroblastos pulmonares Wi-38 tratados com os meios condicionados depletados de VEs derivados do tecido adiposo de indivíduos com obesidade ou eutrófico, e pVEsOb, em diferentes tempos.....	67
<b>Figura 14.</b> Avaliação do potencial de membrana mitocondrial de fibroblastos pulmonares Wi-38 tratados com pVEsOb, em diferentes tempos .....	67
<b>Figura 15.</b> Efeitos do MdEu e MdOb sobre a formação de colônias de fibroblastos pulmonares (Wi-38).....	68
<b>Figura 16.</b> Avaliação dos efeitos dos meios condicionados depletados de VEs derivados do tecido adiposo de indivíduos com obesidade ou eutróficos, e pVEsOb, sobre fibroblastos pulmonares Wi-38, em diferentes tempos.....	69
<b>Figura 17.</b> Avaliação dos fatores solúveis no sobrenadante de fibroblastos tratados com os meios condicionados depletados de VEs derivados do tecido adiposo de indivíduos com obesidade ou eutróficos, e pVEsOb, em diferentes tempos .....	71
<b>Figura 18.</b> Expressão relativa dos genes CCL2 e S100A4 por fibroblastos pulmonares tratados em diferentes condições. ....	72
<b>Figura 19.</b> Avaliação da migração relativa das células tumorais MDA-MB-231 pela membrana do inserto, por absorbância, após 48 horas de tratamento dos fibroblastos pulmonares. ....	73

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

<b>Quadro 1</b> – Grupos e tratamentos experimentais.....	49
<b>Quadro 2</b> – Grupos e tratamentos experimentais realizados para avaliar a internalização de pVEsOb por fibroblastos pulmonares.....	53
<b>Quadro 3</b> – Primers que foram utilizados para avaliar a expressão de genes alvos do estudo.....	59
<b>Tabela 1</b> – Dados dos voluntários cujos tecidos adiposos foram utilizados para recolher o meio condicionado e isolar pequenas VEs.....	62
<b>Tabela 2</b> – Dados adicionais dos voluntários com obesidade cujos tecidos adiposos foram utilizados para isolar pVE.....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\alpha$ -SMA	$\alpha$ -actina de músculo liso
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
$\mu\text{m}$	Micrômetro
Ang1	Angiopietina 1
ATP	Trifosfato de adenosina
CCL	do inglês <i>CC chemokine ligand</i>
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CMTN	Câncer de mama triplo negativo
CTGF	Fator de crescimento do tecido conjuntivo
COL1A1	Colágeno alfa-1 tipo I
CPA4	Carboxipeptidase A4
CXCL	do inglês <i>Chemokine (C-X-C motif) ligand</i>
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	do inglês <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
FACs	Fibroblastos associados ao câncer
FAMs	Fibroblastos associados à metástase
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GLI1	Oncogene homólogo associado ao glioma 1
GLOBOCAN	do inglês <i>Global Cancer Observatory</i>
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
HBSS	Solução balanceada de Hank's
HER2	Receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IL	Interleucina
IMC	Índice de Massa Corporal
INCA	Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva
MCP-1	Proteína quimioatraente de monócito 1
MdEu	Meio depletado de pequenas vesículas extracelulares derivado do tecido adiposo de indivíduos eutróficos
MdOb	Meio depletado de pequenas vesículas extracelulares derivado do tecido adiposo de indivíduos com obesidade

MDSC	Células supressoras derivadas de linhagem mieloide
MEC	Matriz extracelular
MIF	Fator inibidor da migração de macrófagos
MMPs	Metaloproteinases de matriz
mRNA	RNA mensageiro
miRs	Micro-RNAs
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear kappa B
nm	Nanômetros
NPMs	Nichos pré-metastáticos
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAF	Fator ativador de plaquetas
PBS	Tampão fosfato-salino
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PGC-1 $\alpha$	Coativador 1-alfa do receptor gama ativado por proliferador de peroxissomo
pVEs	Pequenas vesículas extracelulares
pVEsOb	Pequenas vesículas extracelulares derivadas do tecido adiposo de indivíduos com obesidade
RE	Receptor de estrogênio
RH	Receptor de hormônio
RNA	Ácido ribonucleico
RP	Receptor de progesterona
RPMI	do inglês <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
SFB	Soro fetal bovino
TA	Tecido adiposo
TAB	Tecido adiposo branco
TAM	Tecido adiposo marrom
TAV	Tecido adiposo visceral
TGF- $\beta$	Fator de crescimento transformador-beta
TMRE	Tetrametilrodamina etílico éster
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral-alfa
UCP1	Proteína de desacoplamento 1

VEs

Vesículas extracelulares

VEGF

Fator de crescimento endotelial vascular

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	19
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	21
2.1 TECIDO ADIPOSO E OBESIDADE .....	21
2.2 CÂNCER, CÂNCER DE MAMA E METÁSTASE .....	25
2.3 FIBROBLASTOS .....	32
2.4 FIBROBLASTOS E O CÂNCER.....	35
2.5 PEQUENAS VESÍCULAS EXTRACELULARES .....	39
2.6 JUSTIFICATIVA .....	44
3 OBJETIVOS .....	46
3.1 OBJETIVO GERAL .....	46
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	46
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
4.1 MATERIAIS .....	47
4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	48
4.3 CULTURA CELULAR.....	49
4.4 OBTENÇÃO DO MEIO CONDICIONADO DERIVADO DO TECIDO ADIPOSO E ISOLAMENTO DAS PEQUENAS VEs .....	50
4.5 CARACTERIZAÇÃO DAS PEQUENAS VEs.....	51
4.5.1 ANÁLISE DO TAMANHO DAS PEQUENAS VEs POR ESPALHAMENTO DINÂMICO DA LUZ.....	51
4.5.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO .....	51
4.5.3 QUANTIFICAÇÃO PROTEICA DAS pVEsOb .....	52
4.5.4 INTERNALIZAÇÃO DAS pVEsOb PELOS FIBROBLASTOS PULMONARES	52
4.6 EFEITOS DO TECIDO ADIPOSO NA VIABILIDADE DE FIBROBLASTOS PULMONARES .....	53
4.6.1 ENSAIO DE EXCLUSÃO POR AZUL DE TRIPAN .....	53
4.6.2 ENSAIO DE MTT .....	54
4.7 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	55
4.8 ATIVIDADE MITOCONDRIAL .....	55
4.9 ENSAIO DE CLONOGENICIDADE.....	56
4.10 ENSAIO DE CICATRIZAÇÃO ( <i>WOUND HEALING</i> ) .....	56
4.11 DOSAGEM DE MEDIADORES SOLÚVEIS .....	57
4.12 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA .....	57

4.12.1 EXTRAÇÃO DE RNA.....	57
4.12.2 SÍNTESE DO DNA COMPLEMENTAR (cDNA) .....	58
4.12.3 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS mRNAs .....	59
4.13 ENSAIO DE MIGRAÇÃO .....	60
4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	60
5 RESULTADOS .....	62
5.1 VOLUNTÁRIOS.....	62
5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS PEQUENAS VEs.....	62
5.3 INTERNALIZAÇÃO DAS pVEsOb PELOS FIBROBLASTOS PULMONARES ...	64
5.4 VIABILIDADE CELULAR.....	65
5.5 PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	66
5.6 ATIVIDADE MITOCONDRIAL .....	67
5.7 ENSAIO CLONOGÊNICO .....	68
5.8 CICATRIZAÇÃO.....	68
5.9 SECREÇÃO DE MEDIADORES SOLÚVEIS .....	69
5.10 EXPRESSÃO GÊNICA.....	72
5.11 MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS MDA-MB-231.....	72
6 DISCUSSÃO.....	74
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	92

## 1 INTRODUÇÃO

Para além de um órgão responsável por armazenar lipídios, o tecido adiposo (TA) atua como um verdadeiro órgão endócrino, secretando uma série de mediadores solúveis, as adipocinas, que possuem importantes efeitos sistêmicos (FASSHAUER; BLÜHER, 2015; CHOE et al., 2016; KAHN; WANG; LEE, 2019). Entretanto, causas multifatoriais, como a ingestão crônica de uma dieta hipercalórica, podem levar a expansão não sadia do TA, acúmulo excessivo de lipídios nos adipócitos, alteração da população de células imunes locais, bem como a maior produção e secreção de adipocinas pró-inflamatórias que culminam em um quadro inflamatório sistêmico de baixo grau (STOLARCZYK, 2017; KAHN; WANG; LEE, 2019). Esse quadro, conhecido como obesidade, é um importante problema de saúde pública no Brasil e no mundo e está relacionado principalmente com a geração de doenças cardiometabólicas que podem levar o indivíduo ao óbito (PAN et al., 2019).

Além disso, a obesidade é um importante fator de risco para o desenvolvimento do câncer, como o de mama (NEUHOUSER et al., 2015; BARONE et al., 2020). Esse tipo de neoplasia é a que mais acomete e leva a óbito mulheres em todo mundo (SUNG et al., 2021). O câncer de mama é uma doença heterogênea e apresenta vários subtipos. Dentre eles, podemos destacar a o câncer de mama triplo-negativo, que caracteriza-se por apresentar células que não apresentam receptores hormonais e o receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (GODOY-ORTIZ et al., 2019; HARBECK et al., 2019).

O mau prognóstico no câncer de mama, assim como em outros tipos de neoplasia, está ligado a disseminação das células do tumor primário para sítios secundários, onde ocorre o desenvolvimento de novos tumores (WELCH; HURST, 2019). Esse processo é denominado metástase (LIU; CAO, 2016). No câncer de mama os principais sítios metastáticos são os ossos, cérebro, pulmões e fígado (BARONE et al., 2020). Nos pulmões, por exemplo, a geração da doença metastática pode comprometer a arquitetura e fisiologia do órgão, levando a disfunção orgânica e óbito (MEDEIROS; ALLAN, 2019).

A geração da doença metastática é complexa, pois múltiplos eventos e fatores são requeridos para a sua gênese (LIU; CAO, 2016; FARES et al., 2020). Locais propensos ao desenvolvimento de metástases são previamente modulados pelos fatores solúveis e vesículas extracelulares (VEs) secretados principalmente pelas

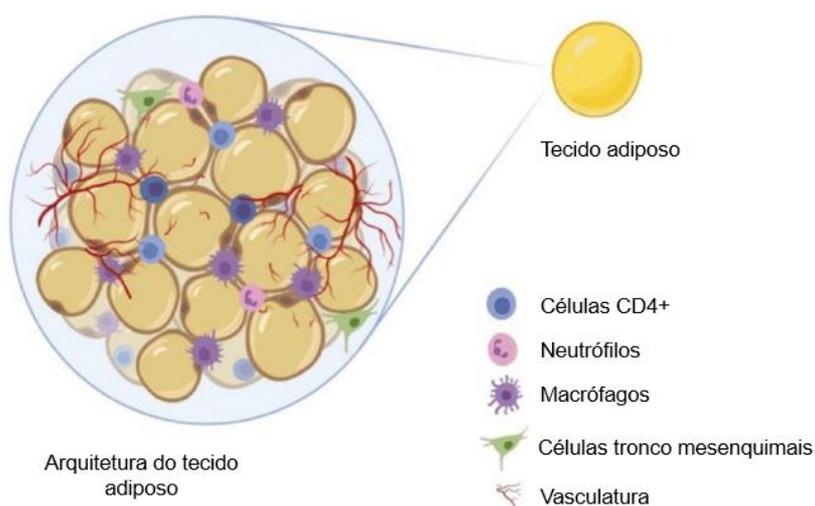
células do tumor primário e são conhecidos como nichos pré-metastáticos (NPMs) (GUO et al., 2019; FARES et al., 2020). Nos NPMs ocorrem o acúmulo de células imunes, remodelação da matriz extracelular, ativação de células estromais, angiogênese, aumento da permeabilidade vascular e imunossupressão (LIU; CAO, 2016; AGUADO et al., 2017; WANG et al., 2019c). Dentre as células estromais importantes na geração dos NPMs e da doença metastática, destacam-se os fibroblastos residentes no estroma local, que podem ser ativados de maneira anormal por produtos derivados do tumor e assim exibirem atividade anômala na deposição e remodelação da matriz extracelular (MEC), bem como secreção de mediadores, garantindo, dessa forma, condições propícias para a migração e desenvolvimento das células tumorais (DE WEVER et al., 2014; WANG et al., 2021c).

Embora o TA possa influenciar de maneira sistêmica o funcionamento de vários órgãos do corpo (MORAES et al., 2021), ainda é necessário ser melhor elucidado como ele pode modular a atividade de células em sítios distantes do tumor primário e atuar de maneira sinérgica com o tumor para o desenvolvimento de NPMs, seja pela secreção de fatores solúveis, seja pela secreção de VEs. Dessa forma, esse estudo busca investigar as possíveis interações entre o TA de indivíduos com obesidade, fibroblastos pulmonares e as células do câncer de mama triplo negativo, como forma de melhor compreender as interações que possibilitam a progressão desse tipo de câncer.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 TECIDO ADIPOSEO E OBESIDADE

O tecido adiposo (TA) é um órgão complexo que está envolvido diretamente na homeostase energética do organismo. Suas principais células, os adipócitos, estão envolvidos no armazenamento de calorías excedentes na forma de lipídios que, em condições de déficit nutricional, são catabolizados e utilizados como suprimento energético por outros tecidos corporais (CHOE et al., 2016). Além dos adipócitos, o tecido adiposo apresenta uma constituição celular bem diversa, como leucócitos, fibroblastos, células endoteliais, células tronco mesenquimais e pré-adipócitos (Figura 1). Essa variedade de células se altera em condições fisiológicas e patológicas (KAHN; WANG; LEE, 2019).

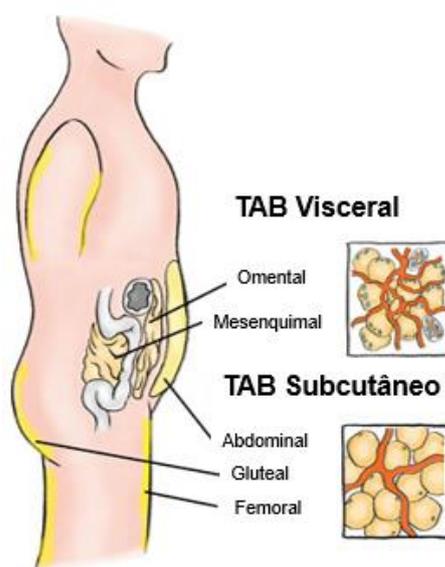


**Figura 1. Arquitetura do tecido adiposo.** Fonte: Imagem adaptada de SHARMA et al. 2021, p. 1363. Esta imagem está disponível sob licença Creative Commons 4.0 (CC BY-NC 4.0). Esta licença está disponível em: <<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>>

De acordo com a histofisiologia, o tecido adiposo pode ser dividido em três tipos: tecido adiposo branco, marrom, bege (KAHN; WANG; LEE, 2019).

O tecido adiposo marrom (TAM) é caracterizado por possuir adipócitos com múltiplas gotículas lipídicas dispersas em seus citoplasmas (multilocular), bem como certa abundância de mitocôndrias, cujas membranas internas são ricas em proteína de desacoplamento 1 (UCP1) (WANG; SEALE, 2016). Essa proteína desacopla a respiração celular da síntese de ATP de forma que ocorra dissipação da energia na forma de calor, com consequente estímulo da oxidação de lipídios (RICQUIER, 2011).

A maior parte do tecido adiposo em humanos é conhecido como tecido adiposo branco (TAB). Os maiores depósitos de TAB em humanos são encontrados abaixo da pele (TAB subcutâneo) e entre os órgãos (TAB visceral) (Figura 2). Esses diferentes depósitos anatômicos de TAB desempenham importantes funções em contextos fisiológicos e patológicos, principalmente em relação à obesidade. Os adipócitos presentes no TAB possuem uma única e grande gotícula lipídica (unilocular). Além disso, esses adipócitos apresentam bem menos mitocôndrias quando comparados aos do TAM. Fisiologicamente, esse tipo de tecido adiposo é comumente associado ao armazenamento lipídico, com consequente controle da homeostase energética (ZWICK et al., 2018).



**Figura 2. Principais depósitos de tecido adiposo branco no corpo humano e suas divisões.** Fonte: Imagem adaptada de BORGESON; BOUCHER; HAGBERG, 2022, p. 2. Esta imagem está disponível sob licença Creative Commons 4.0 (CC BY 4.0). Esta licença está disponível em: <<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>>

Entretanto, embora seja comum associar o TAB apenas ao armazenamento de gordura, pesquisas nas últimas décadas vêm demonstrando que esse tecido é muito mais que um mero estoque de energia, mas sim, um tecido capaz de produzir e secretar uma série de moléculas bioativas capazes de não só regular as atividades do próprio tecido adiposo e tecido adjacentes, mas também, atuar em órgãos distantes, possuindo assim, função endócrina (FISMAN; TENENBAUM, 2014). Essa coletânea de biomoléculas produzidas e secretadas pelo tecido adiposo são, em conjunto, denominadas adipocinas. Dentre essas adipocinas, destacam-se as citocinas, quimiocinas, fatores vasoativos de coagulação e proteínas do próprio tecido adiposo como a leptina e a adiponectina (FASSHAEUER; BLÜER, 2015; KAHN; WANG; LEE,

2019). Além de manter a comunicação intercelular por intermédio de diversas moléculas bioativas, o TA também mantém a comunicação com diversas células localmente e por diversos sítios do organismo por intermédio de vesículas extracelulares (VEs) (ZHOU et al., 2021), que exercem atividades biológicas locais e sistêmicas modulando respostas imunes, a sensibilidade sistêmica à insulina, o metabolismo de carboidratos e lipídios e regulando a ingestão de alimentos (HUANG; XU, 2021).

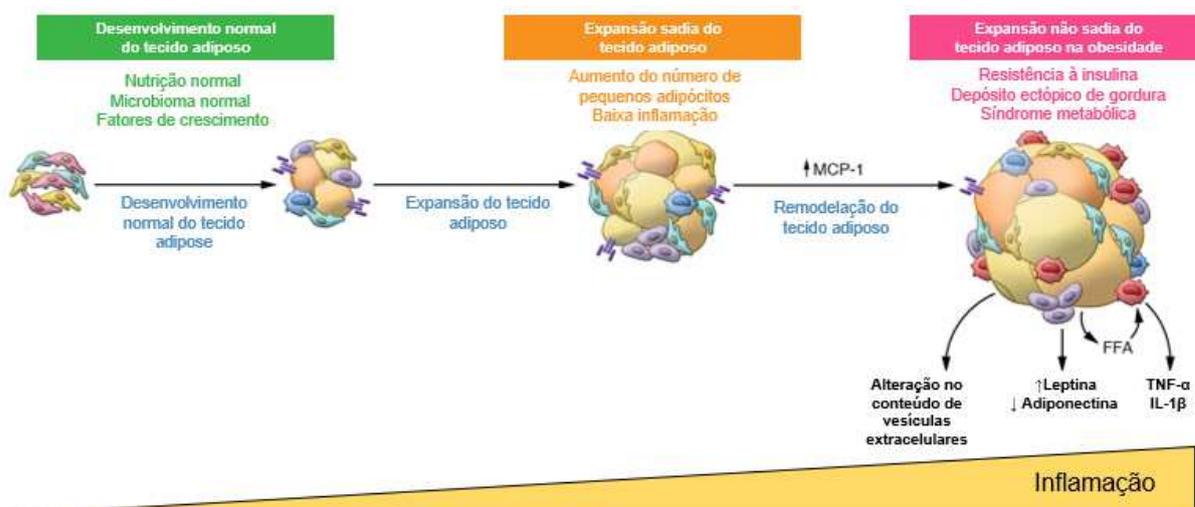
Nesse contexto, uma dieta altamente calórica faz com que as vias lipogênicas no TA sejam ativadas, fazendo com que a energia excedente seja armazenada em triglicerídeos neutros nos adipócitos. A cronicidade dessa situação faz com ocorra o aumento da quantidade de lipídios armazenadas nos adipócitos, com consequente expansão do TA, o que pode levar ao sobrepeso e obesidade (TAN; VIDAL-PUIG, 2008)

Atualmente, o mundo é assolado por uma verdadeira e crescente pandemia de sobrepeso e obesidade, cujas projeções indicam um agravamento desse problema (ARBEX et al., 2014; SALTIEL; OLEFSKY, 2017). A prevalência do sobrepeso e da obesidade aumentou nas últimas décadas em todo mundo, inclusive, no Brasil (ARBEX et al., 2014; GOMES et al., 2019). Atualmente, mais da metade da população brasileira encontra-se em sobrepeso e cerca de vinte por cento é considerada obesa (BRASIL, 2019). Ademais, o sobrepeso e a obesidade acometem todas as populações, independente da fase da vida e das condições socioeconômicas (LEAL et al., 2012).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define a obesidade como o acúmulo anormal e excessivo de gordura corporal que possa trazer prejuízos à saúde do indivíduo. Dessa forma, sobrepeso e a obesidade podem ser facilmente diagnosticados utilizando métodos pouco invasivos, como o cálculo do índice de massa corporal (IMC), que leva em consideração parâmetros como a altura e o peso. Indivíduos cujos valores de  $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$  são considerados obesos (O'ROURKE, 2018).

Entretanto, a gênese da obesidade é complexa, pois pode ser decorrente da soma de múltiplos fatores individuais, comportamentais, ambientais e sociais. Notavelmente, o aumento da prevalência de indivíduos em sobrepeso e com obesidade, em tempos atuais, podem estar diretamente relacionados com o aumento

ingestão exacerbada de alimentos altamente calóricos, associada ao sedentarismo, o que, em conjunto, levam a ativação das vias lipogênicas (HRUBY et al., 2016; LIN; LI, 2021). Dessa forma, o desbalanço entre ingestão excessiva de nutrientes e desequilíbrio entre armazenamento e gasto energético, leva a uma desorganização da arquitetura do TAB, provocando profundas modificações nesse órgão (GALIC; OAKHILL; STEINBERG, 2010; STOLARCZYK, 2017; KAHN; WANG; LEE, 2019). No quadro de obesidade ocorre uma reestruturação da composição celular do TA (Figura 3). Enquanto o TA sadio é composto principalmente por adipócitos, pré-adipócitos, predominantemente macrófagos do perfil M2, células do estroma vascular, o tecido adiposo de indivíduos com obesidade é infiltrado por várias células da imunidade inata e adaptativa que desenvolvem uma resposta inflamatória crônica local com comprometimento sistêmico que pode levar ao desenvolvimento de doenças cardiometabólicas (PAN et al., 2019).



**Figura 3. Desenvolvimento e remodelação do tecido adiposo na saúde e no desenvolvimento da obesidade. Fonte: Imagem adaptada de KAHN; WANG; LEE, 2019, p.3992. Esta imagem está disponível sob licença Creative Commons 4.0 (CC BY 4.0). Esta licença está disponível em: <<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>>**

Ademais, não somente a fração celular é alterada no tecido adiposo de indivíduos com obesidade, mas também a porção secretória (Figura 3). Os níveis circulantes de leptina, por exemplo, estão correlacionados com a porcentagem de gordura corporal (CONSIDINE et al., 1996) e, dessa forma, indivíduos com obesidade secretam elevadas quantidades dessa adipocina (Figura 3). Esse fato está intimamente ligado a duas importantes complicações na obesidade. Em primeiro lugar, embora a leptina exerça efeitos anorexígenos, quadros de hiperleptinemia são acompanhados por resistência do indivíduo com obesidade à leptina (IZQUIERDO et al., 2019).

Embora esse fato pareça paradoxal, os mecanismos envolvidos nesse processo ainda permanecem por serem melhor esclarecidos (IZQUIERDO et al., 2019). Em segundo lugar, é bem conhecida a ação da leptina em diferentes tipos de células imunes, uma vez que essas células apresentam receptores para essa adipocina. Dessa forma, a leptina é capaz de modular respostas imunes tanto inatas, quanto adaptativas, a saber: o aumento da citotoxicidade de células *natural killer*; indução da ativação de granulócitos, macrófagos e células dendríticas; proliferação de células T *naive* e B; diminuição do número de células T reguladoras; dentre outras atividades (ABELLA et al., 2017). O fato de o níveis circulantes de leptina em indivíduos com obesidade estarem elevados, está associado diretamente com a inflamação associada à obesidade (ABELLA et al., 2017; KIERNAN; MACIVER, 2021)

Além disso, foi demonstrado que a leptina está associada ao aumento da produção de citocinas e quimiocinas por fibroblastos pulmonares (WATANABE et al., 2019). Ademais, citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), a interleucina 6 (IL-6), IL-1 $\beta$ , fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ) também são secretadas em condições de obesidade e contribuem para a inflamação de baixo grau em indivíduos com obesidade (GALIC; OAKHILL; STEINBERG, 2010; ZATTERALE et al., 2020).

Além de estar classicamente associada ao desenvolvimento de doenças cardiometabólicas, a obesidade também é um fator de risco para outras patologias, dentre elas, o câncer de mama (BARONE et al., 2020). Um estudo revelou que mulheres em sobrepeso e obesas apresentavam maiores riscos de desenvolverem câncer de mama invasivo em relação as mulheres de peso normal. Ainda, revelaram que quanto maior o grau de obesidade, maiores os riscos de desenvolverem a doença e aumento do tamanho do tumor (NEUHouser et al., 2015). Além disso, um estudo demonstrou que as terapias contra o câncer de mama têm eficácia reduzida em pacientes obesas (EWERTZ et al., 2011). Dessa forma, a obesidade pode impactar negativamente na progressão da doença e conduzir a piores desfechos clínicos.

## **2.2 CÂNCER, CÂNCER DE MAMA E METÁSTASE**

Tumores podem ser definidos como uma formação anormal do tecido, no qual as células exibem taxas proliferativas elevadas, levando a formação de massas celulares. De maneira geral, os tumores podem ser divididos em dois grandes grupos:

(a) tumores benignos: são aqueles formados por células que exibem altas taxas proliferativas, evasão de mecanismos supressores de crescimento e de apoptose, mas essas células são incapazes de invadir tecidos adjacentes e formam uma massa tumoral bem delimitada (MARINO-ENRIQUEZ; FLETCHER, 2014); (b) tumores malignos ou câncer: são formados por células que proliferam de maneira rápida e anormal, possuindo capacidade de invadir tecidos adjacentes ao tumor primário, bem como se espalhar para outros tecidos e órgãos distantes, gerando a doença metastática (HANAHAN; WEINBERG, 2011; MARINO-ENRIQUEZ; FLETCHER, 2014).

Dessa forma, o termo câncer é utilizado para agrupar um conjunto de doenças que se caracterizam, conforme descreveram Hanahan e Weinberg (2011) e Hanahan (2022), por apresentarem células que adquirem capacidades biológicas que as conduzem a um fenótipo maligno ao longo do seu desenvolvimento, culminando, assim, com a capacidade de provocar doença local e/ou disseminada que pode levar, em muitos casos, o indivíduo ao óbito. Essas capacidades biológicas adquiridas incluem a instabilidade genética e mutação, resistência à morte celular, evasão a supressores de crescimento, autossuficiência em fatores proliferativos, replicação descontrolada, instabilidade genética, desregulação do metabolismo energético, evasão da resposta imune, inflamação, indução da angiogênese e ativação da invasão e metástase, plasticidade fenotípica, reprogramação epigenética não mutacional, associação com microbiomas polimórficos e células senescentes.

A aquisição dessas capacidades biológicas alteradas pelas células cancerosas está associada a diversos fatores ambientais, comportamentais, hereditários e intrínsecos (WU et al., 2018; SAUER et al., 2019). Dentre esses fatores, destacam-se a exposição à radiação ultravioleta, consumo e exposição a agentes químicos, hábitos alimentares, sedentarismo, excesso de peso, exposição a determinados organismos patogênicos (SAUER et al., 2019), bem como fatores intrínsecos relacionados com mutações inevitáveis do DNA (WU et al., 2018). Esses múltiplos fatores associados interagem entre si na evolução do tumor (WU et al., 2018) e, em última análise, provocam alterações na expressão gênica de células saudáveis que adquirem posteriormente características de malignidade (HASSANPOUR; DEHGhani, 2017). Ademais, já é bem descrito que alterações epigenéticas do genoma, como a hipo e hipermetilação de sequências do DNA, estão envolvidas durante o processo de transformação maligna das células saudáveis (GARCIA-MARTINEZ et al., 2021). Dessa

forma, o câncer pode ser considerado uma doença genômica, resultante de profundas modificações na expressão gênica que conduzem uma célula sadia a transformação em uma célula cancerosa (HANAHAN; WEINBERG, 2011; HASSANPOUR; DEHGhani, 2017; GARCIA-MARTINEZ et al., 2021).

O câncer é um importante problema de saúde pública no Brasil e no mundo. Dados publicados pelo *Global Cancer Observatory* (GLOBOCAN) estimaram para o ano de 2020 o aparecimento de 19,3 milhões de novos casos e cerca de 10 milhões de óbitos pelo câncer (SUNG et al., 2021). No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) estimou para o triênio 2020-2022 a ocorrência de 625 mil novos casos da doença (INCA, 2019).

Dentre os tumores malignos mais diagnosticados e que mais levam indivíduos ao óbito, destaca-se o câncer de mama. No mundo, as estimativas mostram que o câncer de mama feminino representa cerca de 11,7% de todos os cânceres diagnosticados (SUNG et al., 2021). Além disso, esse tipo de câncer é a quinta principal causa de morte em pacientes acometidos pela doença (6,9% dos óbitos). Ademais, o câncer de mama é malignidade que mais afeta e leva ao óbito as mulheres em todo mundo, sendo considerado a principal causa de morte, por câncer, em pelo menos 110 países (SUNG et al., 2021). No Brasil, os dados do INCA estão de acordo com a tendência observada mundialmente. Para o ano de 2020, essa instituição estimou o câncer de mama feminino como o principal tipo de câncer diagnosticado em mulheres (cerca de 29,7% dos casos), quando não considerado o câncer de pele não melanoma. Ademais, em 2019, o câncer de mama foi o que mais levou a óbito as brasileiras, correspondendo a 16,1% do total de mortes por câncer, em mulheres, naquele ano (INCA, 2021).

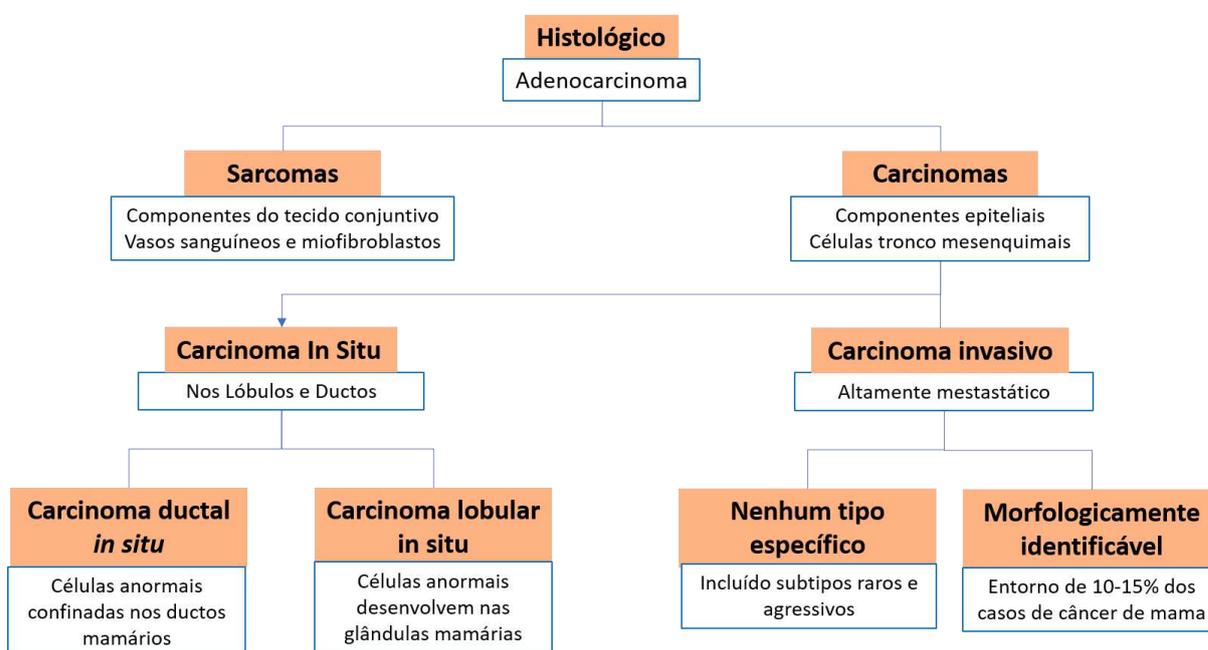
Vários são os fatores relacionados com o desenvolvimento do câncer de mama em indivíduos do sexo feminino, como fatores reprodutivos (idade materna avançada, menarca precoce, falta de amamentação, menopausa tardia), obesidade, sedentarismo, uso de álcool (HARBECK et al., 2019), bem como origem hereditária decorrente de alterações genéticas em genes supressores de tumores (ROY; CHUN; POWELL, 2012; LARSEN et al., 2014; ŁUKASIEWICZ et al., 2021).

O câncer de mama é uma doença heterogênea (ZUBAIR; WANG; ALI, 2021) e a classificação dos diferentes tipos de câncer de mama baseia-se nas características histológicas e moleculares do tecido tumoral (HARBECK et al., 2019). Esse fato é

importante, pois tais classificações refletem em diferentes estratégias terapêuticas a serem adotadas pelo profissional de saúde (ZUBAIR; WANG; ALI, 2021).

Histologicamente, as neoplasias mamárias podem ser classificadas como carcinomas e sarcomas. Carcinomas mamários são originados das células epiteliais da mama, incluindo àquelas encontradas nos lóbulos e ductos mamários, enquanto que os sarcomas são originados a partir dos tecidos conjuntivos e vasos sanguíneos que dão suporte as estruturas mamárias (SINN; KREIPE, 2013; ZUBAIR; WANG; ALI, 2021).

Carcinomas mamários são ainda subdivididos em carcinomas *in situ* e invasivos. Carcinomas *in situ* são àqueles localizados em seus lóbulos e ductos predominantes, enquanto que, os carcinomas invasivos, são aqueles capazes de invadir tecidos adjacentes e possuem grande capacidade de se metastatizar (ZUBAIR; WANG; ALI, 2021). Ainda, carcinomas invasivos podem ser classificados em tipos morfológicamente identificáveis e nenhum tipo especial (ZUBAIR; WANG; ALI, 2021). Um esquema geral da classificação das neoplasias mamárias pode ser observado na figura 4.



**Figura 4. Breve classificação histológica das neoplasias mamárias. Fonte: Imagem adaptada de ZUBAIR; WANG; ALI, 2021, p. 3. Esta imagem está disponível sob licença Creative Commons 4.0 (CC BY 4.0). Esta licença está disponível em: <<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>>**

Devido aos avanços recentes no entendimento da biologia do câncer de mama, novas investigações e análises moleculares dos tumores mamários permitiram

construir e adotar novas formas de classificar as neoplasias mamárias, baseando-se em biomarcadores expressos ou não pelas células tumorais (VUONG et al., 2014; CARDOSO et al., 2012; GODOY-ORTIZ et al., 2019; HARBECK et al., 2019; ZUBAIR; WANG; ALI, 2021).

Entretanto, embora existam um grande número de potenciais biomarcadores moleculares expressos pelas células malignas dos carcinomas mamários, três deles tem sido comumente utilizados para a sua classificação molecular: os receptores de hormônios (RHs), como o receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP); e o receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2) (VUONG et al., 2014; ZUBAIR; WANG; ALI, 2021). Tumores que expressam RE e/ou RP são conhecidos como tumores de mama positivos para hormônios enquanto que, aqueles que não expressam RE, RP ou HER2 são conhecidos como cânceres de mama triplo-negativos (ZUBAIR; WANG; ALI, 2021).

Através da caracterização do estado dos receptores hormonais RE e RP e do HER2, podemos dividir os carcinomas mamários em diferentes fenótipos: luminal A, luminal B, enriquecidos em HER-2 e triplo negativos (HARBECK et al., 2019). Tumores do subtipo luminal A apresentam alta expressão de RE e RP e não negativos para HER2 (HER2-) (HARBECK et al., 2019). Já os do tipo luminal B expressam RE e RP, embora menor quantidade, quando comparado com o subtipo luminal A (HARBECK et al., 2019). Além disso, podem expressar ou não HER2 e apresentam maior expressão de genes associados à proliferação, quando comparado com o luminal A (JOHNSON; CONANT; SOO, 2021). Os tumores enriquecidos com HER2 possuem esse gene superexpresso, não expressam RH e são altamente proliferativos. Por fim, os cânceres de mama triplo-negativos (CMTN) são tumores que não expressam RHs e HER2 (CMTN - RH-/HER2-) (GODOY-ORTIZ et al., 2019; HARBECK et al., 2019). Eles representam cerca 15% dos carcinomas mamários e constituem um grupo de tumores heterogêneos que apresentam dentre outras características, maior agressividade (ZUBAIR; WANG; ALI, 2021), alta invasividade, potencial metastático, pior prognóstico (HWANG et al., 2019; YIN et al., 2020) e menor sobrevida quando comparados com os demais grupos (WANG et al., 2019b). Os fatores de risco relacionados a esse tipo de tumor estão ligados a idade, a mutações gênicas (BIANCHINI et al., 2016), a história genética familiar do paciente, a densidade do tecido mamário, uso e exposição de drogas, IMC elevado, dieta rica em gordura e

produtos processados, tabagismo, uso de álcool e sedentarismo (ALMANSOUR, 2022).

Todavia, o pior prognóstico relacionado ao câncer de mama, assim como em outras neoplasias, está ligado principalmente a invasão das células malignas aos tecidos adjacentes ao tumor, com consequente disseminação dessas células do tumor primário através da circulação sistêmica, nervos, lado basal das células endoteliais, vasos linfáticos e cavidades celômicas (WELCH; HURST, 2019), seguido pela colonização de outros órgãos e tecidos no corpo, em um processo conhecido como metástase (LIU; CAO, 2016; STEEG, 2016; LOBB; LIMA; MÖLLER, 2017; FARES et al., 2020). Pacientes em qualquer estágio de desenvolvimento do câncer, seja ele inicial ou tardio, são propensos a desenvolverem a doença metastática (JIANG et al., 2015). No câncer de mama os órgãos metastáticos mais comuns são os ossos, pulmões, fígado e cérebro (BARONE et al., 2020) e pacientes com câncer de mama metastático tem sobrevida global média de 2 a 3 anos (CARDOSO et al., 2012). A metástase pulmonar é o segundo tipo mais comum em pacientes com câncer de mama (XIAO et al., 2018; DANG et al., 2019; WANG et al., 2019a; HASSANPOUR; DEGHANI, 2017; GIORDANO et al., 2020; LIN et al., 2021) e possui impacto significativo na morbidade e mortalidade dos pacientes, uma vez que as metástases pulmonares implicam na disfunção pulmonar que pode culminar na morte do paciente (MEDEIROS; ALLAN, 2019). Além do mais, metástases no pulmão estão relacionadas com pior prognóstico (XIAO et al., 2018).

A geração da doença metastática nos pulmões de pacientes com câncer de mama está relacionada com o tipo do tumor primário, no qual, tumores mamários enriquecidos com HER2 e CMTN apresentam maiores porcentagens de metástase nesse órgão (XIAO et al., 2018). Ademais, fatores extratumorais também estão implicados do desenvolvimento da doença metastática. A obesidade, por exemplo, está relacionada com a metástase no câncer de mama. Um estudo demonstrou que mulheres com IMC  $\geq 30$  apresentavam risco aumentado de 46% de chance de desenvolverem metástase em decorrência do câncer de mama após 10 anos de acompanhamento (EWERTZ et al., 2011). Um outro estudo demonstrou que a camundongos com obesidade apresentam neutrofilia pulmonar e esse fato está relacionado com o aumento das metástases no câncer de mama de forma dependente do fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e IL-5 (QUAIL et al., 2017).

Os processos metastáticos incluem uma miríade de atividades que não dependem apenas das células do tumor primário para desenvolver. Stephen Paget propôs a hipótese de “*seed and soil*” para explicar a doença metastática no câncer. Segundo essa hipótese as células tumorais (*seed* - semente) se dispersam para diferentes sítios, todavia, elas só irão desenvolver em locais férteis apropriados (*soil*-solo) (LIU et al., 2017).

Dessa forma, a geração da doença metastática é precedida pela preparação de um microambiente em locais alvos distantes, no qual antes mesmo das células tumorais colonizarem tais sítios anatômicos distantes do tumor primário, um microambiente permissivo e receptivo nesses locais é criado, a fim de garantir um ambiente ideal para a colonização e sobrevivência das células malignas em órgãos distantes, formando os chamados nichos pré-metastáticos (NPMs) (GUO et al., 2019, 2019; FARES et al., 2020). NPMs formam-se devidos aos efeitos sistêmicos promovidos pelo tumor primário (PEINADO et al., 2017). NPMs são microambientes complexos constituídos por diversos componentes celulares, como células imunes e células estromais, e por componentes derivados das células locais e tumorais distantes, como matriz extracelular (MEC), fatores solúveis e VEs (AGUADO et al., 2017).

Dessa forma, tumores primários podem coordenar a migração de diversos tipos celulares para os tecidos para favorecer a criação de ambientes permissivos às células tumorais, através da secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, como a IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  (LI; WEN; LIN, 2020). Dentre essas células recrutadas, destacam-se as células derivadas da medula óssea, que são componentes importantes para a formação de NPMs (LI; WEN; LIN, 2020). Dentro desse conjunto de células, destacam-se dois grupos: as células progenitoras hematopoiéticas derivadas da medula óssea e as células supressoras derivadas de linhagem mieloide (MDSC) (HØYE; ERLER, 2016; WANG et al., 2019c). As células progenitoras hematopoiéticas derivadas da medula óssea podem ser recrutadas para sítios secundários e em conjunto com células estromais reprogramadas, como os fibroblastos, podem promover modificações na estrutura e composição da MEC (HØYE; ERLER, 2016). MDSCs são células mieloides imaturas que podem infiltrar nos NPMs na presença de fatores solúveis como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), ligante de quimiocina 2/ proteína quimioatraente de monócito 1 (CCL2/MCP-1), IL-6, IL-1 $\beta$ , e GM-CSF (WANG et al., 2019c). Essas células medeiam múltiplos

efeitos na geração de NPMs, como ativação de fibroblastos que são responsáveis por gerarem fibrose pulmonar, facilitam a adesão de células tumorais circulantes, promovem angiogênese e inflamação e suprimem respostas imunes antitumorais das células *natural killer* e T (WANG et al., 2019c). No câncer de mama, por exemplo, já foi observado que a hipóxia no tumor primário leva a secreção de lisil oxidase pelas células tumorais. Essa molécula promove a reticulação do colágeno IV da membrana basal dos sítios pré-metastáticos, com consequente recrutamento de células mieloides que suportam a metástase nesse tipo de neoplasia (ERLER et al., 2009).

Os fatores solúveis e VEs derivados do tumor primário, bem como àqueles derivados dos locais de formação dos NPMs, também são responsáveis por ativarem outras células estromais do sítio secundário que, por sua vez, passam a exibir atividades pró-metastáticas, como a remodelação e deposição de componentes da MEC (WINKLER et al., 2020). Presumidamente, sendo os principais responsáveis pela deposição e remodelação da MEC, os fibroblastos residentes nos sítios secundários, quando ativados em resposta a atividade sistêmica desencadeada pelos tumores primários, exibem atividades aberrantes e favorecem a geração de NPMs (DE WEVER et al., 2014).

## 2.3 FIBROBLASTOS

Os fibroblastos são células mesenquimais de origem heterogênea e que são amplamente distribuídas por diversos tecidos e órgãos do corpo (LEBLEU; NEILSON, 2020). Essas células exercem diversas funções biológicas relacionadas a homeostasia tecidual, como a manutenção da MEC dos diversos tecidos conjuntivos e a cicatrização (TSCHUMPERLIN, 2013; PLIKUS et al., 2021), através da secreção de moléculas que compõem a MEC, como colágeno, elastina, fibronectina e glicosaminoglicanos, bem como pela remodelação da MEC através da reabsorção dos seus componentes (KENDALL; FEGHALI-BOSTWICK, 2014) por meio da secreção de metaloproteinases de matriz (MMPs), inibidores de MMPs e lisil oxidases (LU et al., 2011; KENDALL; FEGHALI-BOSTWICK, 2014).

Essa combinação entre deposição de uma ampla diversidade de moléculas, associada aos processos de remodelamento, faz com que os fibroblastos sejam capazes de produzirem uma interessante diversidade de proteínas que compõem a MEC e, dessa forma, diferentes arranjos de MECs que se diferenciam, dentre outras

formas, pela sua composição molecular, biomecânica e conseqüentemente, em sua fisiologia, garantindo, assim, um tecido conjuntivo adequado para suportar e auxiliar o funcionamento dos mais diversos tipos celulares e outros tecidos corporais (PLIKUS et al., 2021). Nos pulmões, os fibroblastos estão associados à produção de MEC local, no qual é tipicamente restrita as membranas basais e aos espaços intersticiais (WHITE, 2015). No interstício pulmonar os fibroblastos são as células mais identificáveis e, além de estarem envolvidas na deposição de MEC, também estão ligados aos reparos de lesões locais (WHITE, 2015).

Em adultos, os fibroblastos residentes nos tecidos geralmente são encontrados relativamente quiescentes e em repouso (HOUTHUIJZEN; JONKERS, 2018) e apresentam morfologia fusiforme (ELWAKEEL; WEIGERT, 2021). Ao serem ativados por mecanismos de reparo tecidual, por exemplo, essas células exibem alterações transcricionais que levam a proliferação e a alterações fenotípicas, no qual essas células passam a exibir uma morfologia diferenciada associada com migração, secreção de componentes da MEC, de componentes de remodelamento da MEC e fatores solúveis (KENDALL; FEGHALI-BOSTWICK, 2014). Dessa forma, fibroblastos ativados, conhecidos como miofibroblastos, são morfologicamente caracterizados por serem grandes células estreladas com longos prolongamentos citoplasmáticos (FORTIER et al., 2021) contendo feixes de microfilamentos de actina ou fibras de estresse (MICALLEF et al., 2012) e um retículo endoplasmático altamente ativo (BAUM; DUFFY, 2011).

É bem descrito que miofibroblastos tem como origem fibroblastos quiescentes, todavia, outras células como pericitos, células endoteliais e adipócitos podem desenvolver propriedades ligadas aos fenótipos de miofibroblastos e exibirem atividades biológicas relacionadas a essas células, como a deposição de MEC, por exemplo (KENDALL; FEGHALI-BOSTWICK, 2014). Dessa forma, a população de miofibroblastos em um tecido pode ter origem heterogênea (ELWAKEEL et al., 2019).

A transição dos fibroblastos quiescentes em miofibroblastos pode ser feita através da resposta de diversos sinais parácrinos e autócrinos mediados por citocinas e fatores de crescimento (KENDALL; FEGHALI-BOSTWICK, 2014) que incluem as vias de sinalização do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). Algumas citocinas como o TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 também podem, até certo ponto, favorecer a ativação dos fibroblastos (PLIKUS et al., 2021). Todavia, marcadamente, a via do

TGF- $\beta$  é fundamental para diferenciação dos fibroblastos em suas contrapartes ativas (PLIKUS et al., 2021). Ligantes da família do TGF- $\beta$  estão relacionados com a promoção da atividade dos fatores de transcrição SMAD, que está associado com a expressão da alfa-actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) (TOMASEK et al., 2002; SAHAI et al., 2020). A  $\alpha$ -SMA é uma proteína contrátil comumente expressa e utilizada para identificar miofibroblastos (MALMSTRÖM et al., 2004) e está associada as atividades contráteis observadas em fibroblastos ativados no qual estão relacionados com a remodelação biomecânica da MEC que essas próprias células secretam (SHINDE; HUMERES; FRANGOGIANNIS, 2017). Além disso, o TGF- $\beta$  também induz a expressão de componentes da MEC por miofibroblastos *in vitro* e *in vivo* (DESMOULIÈRE et al., 1993; MALMSTRÖM et al., 2004; MATSUMURA et al., 2020), como colágenos dos tipos I e III e fibronectina (VAN CAAM et al., 2018).

Miofibroblastos também exibem atividades pró-inflamatórias e no recrutamento de células imunes em locais lesionados, uma vez que produzem e respondem a uma série de citocinas, como TGF- $\beta$ , VEGF, fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF), IL-1, IL-6 e IL-8 (VAN CAAM et al., 2018), em contextos fisiológicos e patológicos (KENDALL; FEGHALI-BOSTWICK, 2014). Na lesão pulmonar, por exemplo, os fibroblastos residentes proliferam e são ativados para atuarem no reestabelecimento da arquitetura típica alveolar (QUESNEL et al., 2010), por meio da secreção de colágeno e fibronectina que sustentam, de maneira provisória, a proliferação e diferenciação de células progenitoras alveolares do tipo 2 (CHANDA et al., 2019).

Entretanto, embora importantes na homeostase tecidual, já é bem descrito que fibroblastos ativados de maneira aberrante contribuem para a deposição desordenada de MEC, com conseqüente desenvolvimento da doença fibrótica, que pode levar a disfunção orgânica. Por exemplo, na fibrose pulmonar, fibroblastos ativados de maneira aberrante apresentam uma reposta fibrótica patológica, conduzindo a graves danos na fisiologia pulmonar (KENDALL; FEGHALI-BOSTWICK, 2014).

Além do mais, fibroblastos ativados também exercem papéis biológicos em outras patologias, como o câncer. Em tumores sólidos, esses fibroblastos ativados são conhecidos como fibroblastos associados ao câncer (FACs) e exibem importantes papéis pró-tumorais (ERDOGAN; WEBB, 2017). Ademais, fibroblastos associados as metástases (FAMs) também desempenham importantes papéis na geração da doença

metastática. No câncer de mama, por exemplo, essas células apresentam perfil genômico diferenciado, quando comparado as suas contrapartes não diferenciadas (GONZÁLEZ et al., 2016).

## 2.4 FIBROBLASTOS E O CÂNCER

Os tumores sólidos são estruturas compostas por células cancerosas associadas a diversos outros tipos celulares não malignos, como células imunes, endoteliais, pericitos, fibroblastos e células mesenquimais, bem como pelos produtos produzidos e secretados por essas células, tais como a MEC, citocinas e fatores de crescimento que são produzidos e secretados por fibroblastos (BREMNES et al., 2011; ERDOGAN; WEBB, 2017).

O estroma normal é importante para manter a homeostasia tecidual e isso inclui sua atividade anti-tumorigênica (ALKASALIAS et al., 2018). Todavia, algumas células transformadas podem sobreviver e prosperar nesses ambientes, os convertendo em ambientes propícios para o seu desenvolvimento, formando assim, um microambiente tumoral (BREMNES et al., 2011; ALKASALIAS et al., 2018). É importante salientar que o desenvolvimento, a progressão e a promoção da invasão tumoral em tecidos adjacentes e distantes, bem como o próprio desenvolvimento do tumor local, estão intimamente relacionados com o constante *crosstalk* entre as células tumorais e seu estroma (SAHAI et al., 2020).

Dentre os diversos componentes celulares do estroma tumoral, destacam-se os FACs, que são uma população de células amplamente visualizadas em tumores sólidos (ELWAKEEL; WEIGERT, 2021). No câncer de mama, por exemplo, os FACs constituem a maior população de células estromais (HOUTHUIJZEN; JONKERS, 2018).

Estudos recentes vêm demonstrando que diversos tipos celulares podem dar origem aos FACs, como os fibroblastos residentes do tecido, fibrócitos recrutados da medula óssea, células-tronco mesenquimais, células epiteliais, células endoteliais, células somáticas maduras como pericitos, células musculares lisas e adipócitos (DAI et al., 2021; ELWAKEEL; WEIGERT, 2021). No câncer de mama já é descrito que os FACs podem se originar de células tronco mesenquimais (JOTZU et al., 2011; HOUTHUIJZEN; JONKERS, 2018) e dos fibroblastos residentes (AVGUSTINOVA et al., 2016; ELWAKEEL; WEIGERT, 2021). A diferenciação dessas células em FACs

pode estar relacionada com as vias moleculares dependentes do TGF- $\beta$  produzido e secretado pelas células cancerosas (BREMNES et al., 2011; JOTZU et al., 2011; ELWAKEEL; WEIGERT, 2021), bem como a via de sinalização Notch (STRELL et al., 2019), modulação inflamatória por IL-1 e IL-6, alterações da MEC, estresse fisiológico e danos no material genético (SAHAI et al., 2020).

No câncer de mama, FACs estão envolvidos em diversos processos pró-tumorais. Estão implicados em alterações nas respostas imunológicas que culminam no desenvolvimento de um microambiente imunossupressor, através do aumento da sobrevivência e diferenciação de células T reguladoras (COSTA et al., 2018). Moléculas produzidas e secretadas por FACs nos tumores mamários malignos estão diretamente relacionadas com a proliferação, sobrevivência e metástase das células cancerosas. A IL-6, CCL-2/MCP-1, MMP2, MMP9 e MMP11 são expressas em níveis elevados por FACs, quando comparados com suas contrapartes normais, e esses fatores estão relacionados com a invasão e metástase no câncer de mama (GONZÁLEZ et al., 2016). FACs também são potentes secretores de TGF- $\beta$ , citocina que está envolvida na ativação e sustentação autócrina dos FACs (KOJIMA et al., 2010), bem como promoção da migração e metástase das células malignas do câncer de mama (YU et al., 2014). Ainda, as vias do TGF- $\beta$  e CXCL12 (*C-X-C Motif Chemokine Ligand 12*) estão envolvidas na transição epitélio-mesenquimal (PELON et al., 2020). Em conjunto, esses e outros fatores solúveis secretados pelos FACs contribuem para a comunicação autócrina e parácrina e, dessa forma, as citocinas e fatores de crescimento secretados por FACs são essenciais para a progressão tumoral (ERDOGAN; WEBB, 2017).

Ademais, como células relacionadas intimamente com a produção e secreção da MEC, FACs podem promover uma constante deposição e remodelação da MEC, podendo secretar níveis elevados de proteínas da MEC, como fibronectina e colágeno do tipo I (ERDOGAN; WEBB, 2017). Essas modificações anormais da MEC influenciam diretamente no crescimento e a invasão tumoral (ELWAKEEL; WEIGERT, 2021), por promover a sobrevivência celular e reduzir a apoptose, promover a transição epitélio-mesenquimal e estimular a migração e invasão das células tumorais (HOOUTHUIJZEN; JONKERS, 2018). Ainda, a MEC secretada por FACs também está envolvida na promoção de resistência a quimioterápicos (CAZET et al., 2018). Dessa forma, a reorganização da MEC promovida e direcionada por FACs também contribui

substancialmente para a progressão do câncer de mama (HOUTHUIJZEN; JONKERS, 2018).

FACs também estão envolvidos diretamente na angiogênese, evento esse crucial para a sobrevivência, crescimento e metástase do câncer (WANG et al., 2019a). A elevada secreção de CXCL12 por FACs no câncer de mama promove a angiogênese (ORIMO et al., 2005). Ademais, forças mecânicas realizadas por FACs também podem ter papel importante na angiogênese no tumoral (SEWELL-LOFTIN et al., 2017).

Além de atuarem localmente na promoção do tumor, fibroblastos residentes em sítios secundários podem exibir atividades pró-metastáticas favorecendo a criação de NPMs e disseminação tumoral. Tais fibroblastos podem ser chamados de fibroblastos associados à metástase (FAMs) (WANG et al., 2021c).

Assim como os FACs, FAMs também são considerados um grupo de células com origem e funções heterogêneas, que pode refletir, por exemplo, o local onde residem. Dessa forma, fibroblastos residentes, células tronco mesenquimais, células estreladas hepáticas e células estromais derivadas do tumor primário são possíveis origens de FAMs (PEIN et al., 2020). Os FAMs podem ser encontrados em diversas metástases, como a hepática, pulmonar, cerebral e óssea, e possivelmente se originam, em muitos casos, dos fibroblastos residentes nos sítios secundários (FANG et al., 2018; WANG et al., 2021b).

Quanto a gênese, FAMs podem ser gerados antes mesmo da chegada das células do tumor primário no sítio metastático e essas células podem ser ativadas não apenas por células adjacentes tumorais ou estromais, mas também por células tumorais e estromais nos sítios primários por meio de fatores solúveis e VEs (FANG et al., 2018; PEIN et al., 2020; WANG et al., 2021b). Pein et al. (2020), por exemplo, relataram recentemente que a IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  produzida e secretada pelas células do câncer de mama induzem a produção de CXCL9 e CXCL10 em fibroblastos pulmonares, com conseqüente desenvolvimento de metástases no pulmão.

Quanto suas funções na patologia do câncer, embora FAMs e FACs desempenhem papéis similares na condução do tumor, a FAMs podem apresentar diferenças funcionais quando comparados com FACs e fibroblastos normais (NFs) (WANG et al., 2021b). FAMs podem exibir atividades mais robustas quando comparadas as suas contrapartes ativadas no tumor primário ou NFs (WANG et al.,

2020). Por exemplo, um estudo reportou que os FAMs isolados de pacientes acometidos com câncer de mama e com metástases ósseas e hepática apresentaram maior expressão de  $\alpha$ -SMA, quando comparados com FACs e NFs. Ademais, esses FAMs aumentaram significativamente a proliferação de células MDA-MB-436 e MDA-MB-231, quando comparados aos FACs. Além disso, esses pesquisadores demonstraram que os FAMs são responsáveis por aumentarem o crescimento e a metástase no câncer de mama *in vivo* (GUI et al., 2019). Um outro estudo demonstrou que FAMs derivados da metástase cerebral do câncer de mama expressam níveis elevados das quimiocinas CXCL12 e CXCL16, quando comparados com FACs e NFs da mama. Ainda, reportaram que os FAMs promovem a migração das células cancerígenas de maneira mais eficaz que os FACs (CHUNG et al., 2017).

FAMs também são capazes de suportar o desenvolvimento de tumores em sítios secundários por favorecerem a angiogênese nesses locais (O'CONNELL et al., 2011; WANG et al., 2021b). Um estudo relatou que fibroblastos S100A4+ em locais metastáticos do câncer de mama podem suportar as metástases em sítios secundários pela produção de VEGF, um importante fator angiogênico (O'CONNEL et al., 2011).

Sendo os FAMs uma população de fibroblastos ativadas no contexto da metástase e que essas células estão ativamente envolvidas na remodelação da MEC, FAMs podem promover a metástase através do remodelamento da MEC, por expressarem diversos fatores relacionados a esse processo (WANG et al., 2021b).

Ainda, assim como suas contrapartes localizadas nos tumores primários, FAMs também suportam a metástase por desempenharem importantes papéis na inibição das respostas imunes locais (WANG et al., 2021b). Foi relatado recentemente que FAMs pulmonares, no câncer de mama, secretam elevadas quantidades de IL-33 e esse fato está relacionado com o desenvolvimento de uma resposta inflamatória Th2 no ambiente metastático por promover o recrutamento de eosinófilos, neutrófilos e monócitos para o sítio de metástase (SHANI et al., 2020). Dessa forma, esse estudo demonstra que FAMs e célula imunes podem cooperar em conjunto para geração de um ambiente propício para o desenvolvimento da metástase no câncer de mama (SHANI et al., 2020).

Por fim, FAMs também suportam as células tumorais nas metástases, conferindo a essas células malignas aumento na capacidade de adesão, migração e invasão (WANG et al., 2021b).

Na luz dessas informações, fica claro que os fibroblastos, tanto no contexto do tumor primário, quanto em sítios secundários, exercem importantes funções na manutenção e progressão do câncer, em especial o de mama. Dessa forma, compreender como os fatores de risco associados ao câncer de mama, como a obesidade, interferem nesse processo, pode ser importante para buscar estratégias terapêuticas mais eficazes.

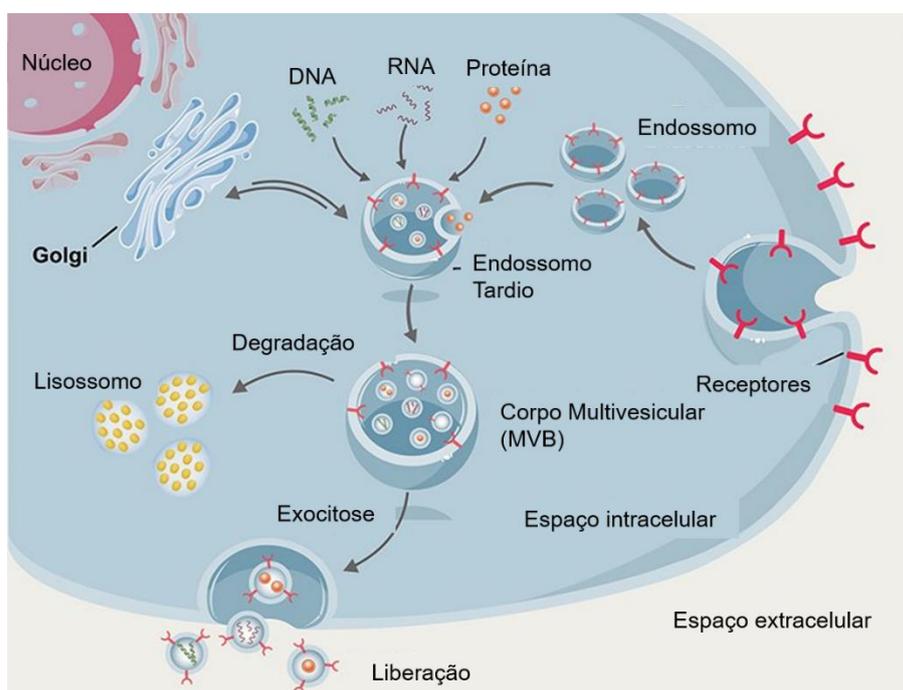
## **2.5 PEQUENAS VESÍCULAS EXTRACELULARES**

A comunicação entre as células em organismos multicelulares é essencial para a manutenção da homeostase do indivíduo. Dessa forma, as células utilizam diferentes estratégias para enviar, receber, reconhecer e responder aos diferentes sinais e estímulos do meio. Recentemente, novas formas de comunicação intercelular foram reconhecidas, dentre elas, àquelas relacionadas com as vesículas secretadas pelas células, chamadas coletivamente de vesículas extracelulares (VEs) (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013). Embora inicialmente a secreção de VEs, como os exossomos, tenha sido associada com a eliminação de compostos desnecessários pelas células, hoje sabe-se que essas estruturas estão intimamente relacionadas com diversas condições fisiológicas e patológicas (RASHED et al., 2017).

VEs são estruturas formadas por uma bicamada lipídica e que são produzidas e secretadas por todas as células (YOKOI; OCHIYA, 2021) e amplamente encontradas nos fluidos corporais, como saliva, sangue e urina (ABHANGE et al., 2021). Essas partículas caracterizam-se por não terem capacidade de replicação e por não terem núcleo funcional (THÉRY et al., 2018). Ademais, variam em forma, tamanho, origem celular, conteúdo e são comumente distribuídas em três grupos: os exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos (DOYLE; WANG, 2019).

Os corpos apoptóticos são as maiores VEs, variando de 1 a 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro e são liberados diretamente pelas células em apoptose (ABHANGE et al., 2021). As microvesículas, por sua vez, são VEs de tamanho intermediário, variando o diâmetro de 100 a 1000 nm de tamanho (ABHANGE et al., 2021). Essas VEs originam-se de brotamentos da membrana plasmática. Por fim, os exossomos, que são as menores

VEs, possuem tamanho variável entre 30 ~ 100 nm (ABHANGE et al., 2021), embora alguns trabalhos tenham reportado distribuições de tamanho um pouco maiores que as tradicionais (~200 nm) (PAULAITIS; AGARWAL; NANA-SINKAM, 2018). Quanto sua biogênese, os exossomos estão intimamente ligados a formação e desenvolvimento do sistema endossomal. Endossomos iniciais amadurecem em endossomos tardios ou corpos multivesiculares (MVBs), no qual, no interior dessas estruturas, ocorre a formação de várias vesículas intraluminais (HESSVIK; LLORENTE, 2018; WEI et al., 2021). Dessa forma, os exossomos se originam das vesículas intraluminais formadas pelo brotamento interno dos MVBs (JADLI et al., 2020). Esses MVBs fundem-se com a membrana plasmática e liberam os exossomos para o ambiente externo (COLOMBO; RAPOSO; THÉRY, 2014; HESSVIK; LLORENTE, 2018). De forma alternativa, os MVBs podem ser encaminhados para os lisossomos onde são degradados juntamente com seu conteúdo (GURUNATHAN; KANG; KIM, 2021). A figura 5 ilustra de forma simplificada a gênese dos exossomos nas células.



**Figura 5. Biogênese e secreção de exossomos. Fonte: Imagem adaptada de GURUNATHAN et al., 2021, p. 1283. Esta imagem está disponível sob licença Creative Commons 3.0 (CC BY-NC 3.0). Esta licença está disponível em: <<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>**

Embora muitos estudos nos últimos anos tenham dado enfoque aos papéis que os exossomos desempenham em condições fisiológicas e patológicas, ainda permanece a ser melhor caracterizada a diferenças entre exossomos e

microvesículas, visto que essas duas classes de VEs se sobrepõem em termos de marcadores e tamanho. Dessa forma, a menos que as pesquisas possam caracterizar a biogênese da VEs em seus estudos, a Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares enfatiza que os pesquisadores utilizem os termos pequenas VEs (pVEs) para partículas menores que 200 nm e grandes e/ou médias VEs para partículas maiores que 200 nm (THÉRY et al., 2018). Dessa forma, utilizaremos o termo pequenas VEs ao invés do termo exossomo para nos referirmos aos trabalhos que caracterizaram e utilizaram VEs com tamanho menor que 200 nm e que não tenham de fato caracterizado a biogênese das nanopartículas isoladas.

Com os avanços nas pesquisas envolvendo as pequenas VEs diversos trabalhos vêm evidenciando que essas vesículas são importantes em diversas condições fisiológicas e patológicas. O TA, por exemplo, é capaz de secretar pVEs que modulam as atividades das células-alvo, principalmente por mecanismos relacionados ao metabolismo de lipídios, homeostase do tecido/órgão (ZHAO et al., 2021), modulando respostas imunes, a sensibilidade sistêmica à insulina, o metabolismo de carboidratos e regulando a ingestão de alimentos e do metabolismo energético sistêmico (HUANG; XU, 2021). Um estudo que buscou analisar o proteoma de pequenas VEs derivadas do tecido adiposo de indivíduos magros ou em sobrepeso moderado, identificou 884 proteínas presentes nessas estruturas. Ademais, uma análise da função biológica dessas proteínas mostrou que muitas delas estão envolvidas em vias de sinalização relacionadas a fibrose hepática, lesões, câncer e componentes que constituem ou regulam a produção da MEC (HARTWIG et al., 2019).

No contexto da obesidade, as pVEs do TA de indivíduos com obesidade exibem alterações em seus conteúdos moleculares, podendo alterar a homeostase local e sistêmica. Por exemplo, um estudo evidenciou que pequenas VEs do TA de indivíduos com obesidade transportam micro-RNAs (miRNAs) que estão relacionados à ativação da via de sinalização TGF- $\beta$  e Wnt/ $\beta$ -catenina, que desempenham importantes papéis na promoção de inflamação e fibrose em órgãos alvo (FERRANTE et al., 2015). Um estudo demonstrou que a desregulação da via TGF- $\beta$  *in vitro* promovida por pVEs do TA de indivíduos com obesidade pode estar envolvidas na patogênese da síndrome do fígado gorduroso não alcoólico (KOECK et al., 2014). Também foi demonstrado que VEs secretadas pelo TA de indivíduos com obesidade estão envolvidas na resistência de hepatócitos a insulina (DANG et al., 2019) e resistência sistêmica a insulina e

intolerância a glicose (DENG et al., 2009; YING et al., 2017). Além disso, um outro estudo demonstrou que pVEs do TA na condição de obesidade inibem a polarização de macrófagos para o perfil M2, promovendo inflamação induzida pela obesidade (PAN et al., 2019). Dessa forma, fica evidente que alterações do tecido adiposo no contexto da obesidade podem trazer graves prejuízos ao indivíduo (FISMAN; TENENBAUM, 2014).

No câncer, estudos vêm demonstrando que as pVEs desempenham papéis cruciais em todas as etapas do desenvolvimento e progressão da doença. Essas nanopartículas podem levar a disfunção das respostas imunes, favorecendo a criação de um nicho pró-tumoral, bem como a geração de metástase (WANG et al., 2021a), na transformação de células saudáveis em células neoplásicas (OTHMAN; JAMAL; ABU, 2019), na proliferação das células malignas (SOLDEVILLA et al., 2014) e na transformação de células tronco mesenquimais em células estromais tumorais (CHO et al., 2011).

No câncer de mama, por exemplo, pVEs derivadas das células tumorais favorecem o desenvolvimento e progressão do tumor por diferentes mecanismos que podem favorecer a migração e invasão das células malignas (CAMPOS et al., 2018), estimular a transição epitélio-mesenquimal de células epiteliais mamárias não tumorigênicas (GALINDO-HERNANDEZ et al., 2014), promover a angiogênese (MAJI et al., 2017), polarizar macrófagos para um fenótipo associado a promoção do tumor (LIANG et al., 2020) e atenuar a resposta antitumoral mediada por células T (YANG et al., 2018). Ademais, as pVEs derivadas de células mamárias malignas também estão implicadas na diferenciação de fibroblastos e células mesenquimais em FACs. Um estudo observou que células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo adquirem o fenótipo de FACs com aumento da expressão de  $\alpha$ -SMA ao serem expostas às pequenas VEs derivadas de células do tumor mamário. Ademais, esse estudo demonstrou um aumento da expressão por essas células de fatores que promovem o tumor, como VEGF, CCL5 e TGF- $\beta$  (CHO et al., 2011). Em um outro estudo foi observado que pequenas VEs derivadas de células do tumor mamário podem levar a diferenciação de fibroblastos normais da mama em FACs, com consequente promoção da invasão e migração das células malignas (YANG et al., 2020).

Além de estarem diretamente envolvidos no desenvolvimento do tumor local, as pVEs derivadas das células tumorais também estão envolvidas na formação nos nichos pré-metastáticos e metástases (LOBB; LIMA; MÖLLER, 2017; GUO et al., 2019).

Um estudo reportou que as pequenas VEs derivadas de células de CMTN, MDA-MB-231, apresentam uma grande quantidade de MMPs e que esse fator pode estar relacionado com as propriedades metastáticas dessa linhagem celular. Ademais, esse mesmo estudo demonstrou que a presença de proteínas e miRNAs nas pequenas VEs analisadas são importantes para a progressão do câncer, como proteína histona H4, calmodulina, miR-130a e miR-328 (KRUGER et al., 2014).

pVEs derivadas de células tumorais podem provocar modificações na ativação de células do microambiente de sítios secundários para garantir a gênese da doença metastática. Hoshino et al. (2015) demonstraram que as pVEs de células tumorais parecem mediar seus efeitos pró-metastáticos de maneira não aleatória, concluindo que essas nanopartículas podem mediar metástases órgão-específicas. Costa-Silva et al. (2015) observaram que pVEs derivadas do adenocarcinoma ductal pancreático são captadas pelas células de Kupffer do fígado, que são induzidas a secretarem TGF- $\beta$ . Esse fator ativa as células estreladas hepáticas, culminando assim, na criação um ambiente fibrótico hepático com conseqüente geração de um nicho pré-metastático no órgão. Peinado et al (2012) observaram que pVEs derivadas de melanoma aumentam a permeabilidade vascular pulmonar. Ao avaliarem o perfil de expressão gênica no órgão, observaram cerca de 130 genes expressos diferencialmente em camundongos, dos quais estavam relacionados à remodelação da MEC e inflamação. Ademais, os pesquisadores evidenciaram que essas VEs aumentavam a carga metastática no pulmão, concluindo assim, que essas nanopartículas são estruturas chaves na doença metastática no melanoma.

pVEs também estão envolvidas na ativação de fibroblastos residentes em locais secundários, como os pulmões. Ji et al. (2020) reportaram que VEs derivadas de células de células malignas do câncer colorretal podem estar envolvidas na ativação de fibroblastos pulmonares em miofibroblastos, com conseqüente facilitação do crescimento e desenvolvimento do tumor metastático. Fang et al. (2018) reportaram que as pVEs derivadas do carcinoma hepatocelular altamente metastático são capazes de favorecer a ativação de fibroblastos no nicho pré-metastático

pulmonar, com conseqüente promoção da progressão do tumor por meio da secreção de IL-6 e IL-8.

Em síntese, fica claro que as pVEs são importantes componentes na comunicação intercelular, embora ainda seja necessário empreender mais esforços para uma melhor compreensão do papel dessas VEs derivadas do TA de indivíduos obesos no contexto do câncer de mama e da doença metastática nesse tipo de neoplasia.

## 2.6 JUSTIFICATIVA

Diante o exposto, o TA de indivíduos com obesidade apresenta atividade alterada no que tange a secreção de diversas citocinas pró-inflamatórias, conduzindo a uma inflamação sistêmica de baixo grau (BARONE et al., 2020). É bem estabelecido a relação entre a inflamação e o câncer (COUSSENS; WERB, 2002; MANTOVANI et al., 2008) e inflamação crônica não resolvida associada a obesidade pode contribuir para o aumento do risco de desenvolver câncer (PARK et al., 2014). A secreção aberrante de moléculas pelo tecido adiposo na condição de obesidade, como TNF- $\alpha$ , IL-6 e leptina, pode conduzir a uma progressão do tumor mamário e nas metástases, uma vez que essas moléculas atuam diretamente sobre as células tumorais ou no microambiente tumoral (BARONE et al., 2020). Já foi demonstrando experimentalmente que a leptina, que é suprarregulada no contexto da obesidade, medeia efeitos pró-tumorais e pró-metastáticos, pois está associada ao aumento da migração e invasão das células tumorais mamárias, indução da angiogênese e modulação das respostas imunes, principalmente àquelas ligadas aos macrófagos (BARONE et al., 2020). Além disso, foi demonstrado que existe uma importante associação entre as células adiposas e as células tumorais, uma vez que, adipócitos podem atuar no suprimento energético para células neoplásicas, através da liberação de ácidos graxos, que estimulam a promoção de metástases no câncer de ovário (NIEMAN et al., 2011), aumento da agressividade do melanoma (LAZAR et al., 2016), progressão (DIRAT et al., 2011), proliferação e migração (BALABAN et al., 2017) e motilidade (CARTER; CHURCH, 2012) de células do câncer de mama.

Por fim, embora ainda pouco estudado, tem surgido cada vez mais evidências que a secreção de VEs pelo tecido adiposo na obesidade pode estar diretamente envolvida na progressão do câncer e da geração da doença metastática (MORAES et

al., 2021). As pVEs derivadas do tecido adiposo foram recentemente sugeridas como importantes fatores no câncer colorretal (LU et al., 2017). Finalmente, um trabalho recente demonstrou que as VEs derivadas do tecido adiposo obeso aumentam a proliferação das células das linhagens tumorais mamárias MCF-7 e MDA-MB-231, bem como potencializam a capacidade migratória dessas segundas células, demonstrando que as vesículas derivadas do tecido adiposo podem desempenhar importantes papéis no contexto da obesidade no câncer de mama (RAMOS-ANDRADE et al., 2020).

Na luz dessas informações, fica evidente que a obesidade desempenha papéis fundamentais na progressão do câncer e da doença metastática. Ainda, embora a geração da doença metastática seja um evento que impacta diretamente na sobrevivência do indivíduo, os mecanismos subjacentes a sua ocorrência ainda permanecem por serem melhor compreendidos, visto que, diversos e complexos processos são requeridos (FARES et al., 2020). Por fim, parece que outros fatores extratumorais ainda pouco explorados, como o TA na condição de obesidade, figuram estar implicados no desenvolvimento dos nichos pré-metastáticos e, conseqüentemente, das metástases (MORAES et al., 2021).

Dessa forma, sabendo que a obesidade é um importante fator de risco para o câncer de mama; que o pulmão é um dos principais órgãos metastáticos nesse tipo de neoplasia; que os fibroblastos estão envolvidos ativamente na criação de nichos pré-metastáticos; hipotetizamos em nosso trabalho que a inflamação sistêmica crônica em indivíduos com obesidade promovida pelo TA nessa condição, bem como as pVEs derivadas desse tecido, podem ativar células em sítios secundários ao tumor, como os fibroblastos pulmonares, favorecendo a criação de um nicho chamativo e permissivo para as células tumorais e, conseqüentemente, auxiliando na geração de metástases.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

- Investigar a capacidade do TA derivado de indivíduos com obesidade em promover a ativação de fibroblastos pulmonares e avaliar os impactos de fibroblastos tratados na migração de células tumorais de CMTN.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Caracterizar morfologicamente e por tamanho as pVEs derivadas do TA de indivíduos com obesidade;
- Avaliar os efeitos *in vitro* dos meios condicionados depletados de VEs do TA de indivíduos com obesidade (MdOb) e das pVEs derivadas do TA de indivíduos com obesidade (pVEsOb) sobre fibroblastos pulmonares humanos;
- Avaliar a produção de mediadores inflamatórios por fibroblastos pulmonares tratados com MdOb e pVEsOb
- Investigar a ocorrência de alterações na migração das células câncer de mama MDA-MB-231 co-cultivadas com fibroblastos tratados com MdOb e pEVsOb.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

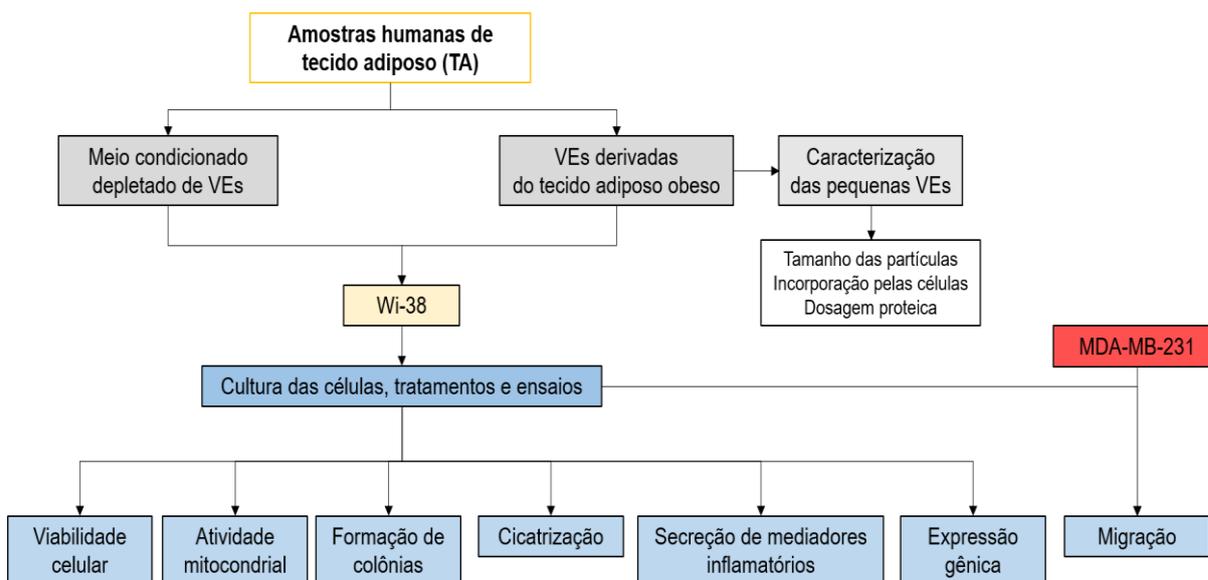
### 4.1 MATERIAIS

Foram utilizados o meio de cultura de células Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) para cultivar os fragmentos de tecido adiposo e das células de câncer de mama triplo-negativo MDA-MB-231; e RPMI para as células da linhagem de fibroblastos pulmonares Wi-38, ambos adquiridos da Gibco (Life Technologies). O tampão HEPES e a solução de antibióticos (contendo penicilina, estreptomicina e neomicina) também foram adquiridos da Gibco (Life Technologies). O soro fetal bovino (SFB) foi adquirido da Cultilab. A solução de tripsina/EDTA foi adquirida da Vitrocell. O azul de tripan utilizado no ensaio de viabilidade e proliferação foi adquirido da Sigma-Aldrich. O brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) foi adquirido da Ivitrogen™. Para realizar a extração do RNA das células em cultura, foi utilizado o reagente TransZol (TransGen Biotech). Os filtros de seringa Millex®GP (0,22µm) utilizados para filtrar o meio condicionado foram adquiridos da Merck. Os insertos utilizados no ensaio de migração *transwell* foram adquiridos da Corning®. O tecido adiposo e as células utilizadas nesse estudo foram mantidas em estufa úmida Forma Series II Water-Jacketed CO<sub>2</sub> Incubator (Thermo Scientific). Quando necessário, as amostras coletadas foram armazenadas em freezer Forma 88000 Series (Thermo Scientific), a -80°C. O processo de centrifugação das amostras foi feito utilizando a centrífuga Heraeus Megafuge 16R (Thermo Scientific) ou MR 23i (Thermo Scientific). A ultracentrifugação foi realizada na ultracentrífuga L-100XP (Beckman Coulter). A aquisição das imagens do ensaio de internalização das pVEsOb foi realizada no microscópio confocal (Leica DMI6000CS). A aquisição de imagens do ensaio de cicatrização foi realizada no microscópio de fluorescência invertido Olympus CKX53 com câmera acoplada. Para avaliar a atividade mitocondrial, foi utilizado o citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciense).

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Centro de Tecnologia Celular e Imunologia Aplicada (IMUNOCET-UFJF) e Laboratório Integrado de Pesquisa (LIP-UFJF).

## 4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para a execução da presente investigação, elaboramos o delineamento experimental conforme mostrando na figura 6. As amostras do tecido adiposo de voluntários eutróficos e com obesidade foram coletadas e o meio condicionado (MC) obtido. A partir dele, foram coletadas pVEs e o MC depletado de VEs. As pVEs foram caracterizadas através do tamanho e capacidade de internalização por células Wi-38.



**Figura 6. Esquema do delineamento experimental. O meio condicionado dos tecidos adiposos de indivíduos eutróficos e com obesidade foram obtidos e, em seguida, utilizados no processo de ultracentrifugação para a obtenção do meio depletado de VEs e isolamento das pVEs, que foram posteriormente caracterizadas. O material isolado foi utilizado para tratar os fibroblastos pulmonares Wi-38 e ensaios funcionais foram realizados. Por fim, fibroblastos tratados e células tumorais MDA-MB-231 foram co-cultivadas em sistema Transwell para avaliar a migração das células cancerosas. Fonte: Autor (2023).**

Em seguida, investigamos os efeitos do tecido adiposo sobre fibroblastos pulmonares. Para tanto, realizamos o tratamento dos fibroblastos da linhagem pulmonar Wi-38 em diferentes condições, conforme mostrado no quadro 1, e realizamos os ensaios funcionais de viabilidade celular, atividade mitocondrial, formação de colônias e cicatrização. Também avaliamos a secreção de mediadores inflamatórios e a expressão gênica dos fibroblastos em diferentes condições, conforme mencionado. Por fim, analisamos se os fibroblastos pulmonares submetidos as diversas condições de estudo estavam envolvidos no aumento da migração de células tumorais MDA-MB-231 através do ensaio de migração utilizando inserto Transwell.

### Quadro 1 – Grupos e tratamentos experimentais

Grupos	Tratamento
NT	Fibroblastos não tratados.
Wi-38+MdEu	Fibroblastos tratados com 20% de meio condicionado depletado de VEs do tecido adiposo de indivíduos eutróficos.
Wi-38+MdOb	Fibroblastos tratados com 20% de meio condicionado depletado de VEs do tecido adiposo de indivíduos com obesidade.
Wi-38+pVEsOb	Fibroblastos tratados com 15 µg/mL de pequenas VEs derivadas do tecido adiposo de indivíduos com obesidade.

MdEu = meio condicionado depletado de VEs derivado do TA de indivíduos eutróficos; MdOb = meio condicionado depletado de VEs derivado do TA de indivíduos com obesidade; pVEsOb = pequenas vesículas extracelulares derivadas do TA de indivíduos com obesidade. Fonte: Autor (2023)

## 4.3 CULTURA CELULAR

Para a realização desse estudo foram utilizadas a linhagem de fibroblastos pulmonares Wi-38, cedidas gentilmente pela Professora Doutora Kézia Scopel, do Laboratório de Parasitologia da UFJF, e a linhagem de células tumorais mamárias triplo negativas MDA-MB-231. As células Wi-38 foram cultivadas em garrafas de cultura contendo o meio de cultura RPMI suplementado com 10% de SFB, 1% de solução antibiótica e HEPES. As células MDA-MB-231 foram cultivadas em garrafas de cultura contendo o meio de cultura DMEM *high glucose* suplementado com 10% de SFB e 1% de solução antibiótica. As células semeadas foram mantidas em estufa úmida, a 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

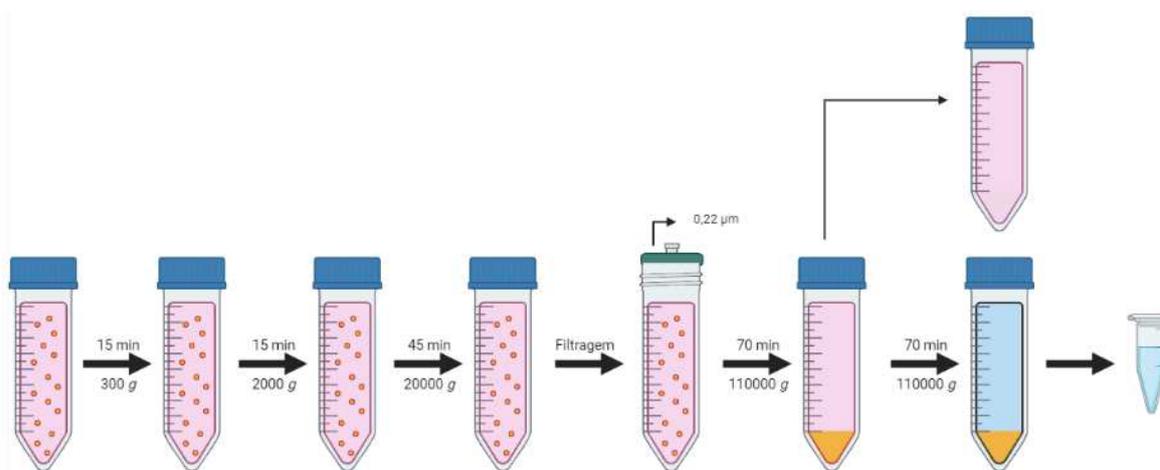
As culturas foram subcultivadas quando necessário (confluência entre 80% e 90%). Para tanto, as células foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS) 1X estéril, a fim de retirar células mortas e resíduos do meio de cultura. Em seguida, foi adicionada a solução tripsina/EDTA 0,25% com o objetivo de desaderir as células das garrafas. Posteriormente, foi adicionado meio de cultura suplementado com SFB, a fim de inativar a tripsina, e a solução contendo as células desaderidas foi centrifugada a 1500 rpm, por 5 minutos, a 4°C. O pellet formado foi ressuspensionado em meio suplementado correspondente e as células novamente semeadas e cultivadas da forma supracitada.

#### **4.4 OBTENÇÃO DO MEIO CONDICIONADO DERIVADO DO TECIDO ADIPOSEO E ISOLAMENTO DAS PEQUENAS VEs**

Sob aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (UFJF) (parecer: 5.321.687), o tecido adiposo visceral (TAV) de indivíduos eutróficos (IMC<25) e indivíduos com obesidade (IMC>30) submetidos a cirurgias abdominais e bariátricas, respectivamente, foram obtidos. Após as peças cirúrgicas serem retiradas, elas foram armazenadas em coletores estéreis contendo solução de antibióticos (100 µg/mL). Em seguida, o TAV dos voluntários foi lavado com PBS 1X estéril e dividido em pequenos fragmentos com o auxílio de pinça e bisturi. Os fragmentos foram então cultivados em placas de seis poços contendo DMEM suplementado com solução antibiótica (100 µg/mL) e mantidas em estufa úmida, a 37°C, em atmosfera contendo 5% CO<sub>2</sub>. Após 24 horas, o meio condicionado da cultura do TAV foi coletado.

Afim de obter o meio condicionado do TAV livre de VEs e isolar as pVEs, o sobrenadante obtido, como descrito anteriormente, foi submetido a processos de centrifugação e ultracentrifugação, adaptado de Franquesa et al. (2014) e conforme mostrado na figura 7. Primeiramente, o meio condicionado passou por três sucessivas centrifugações: 300 g, por 15 minutos; 2.000 g, por 15 minutos; 20.000 g, por 45 minutos, todas à 4°C. O sobrenadante proveniente do último processo de centrifugação foi então filtrado utilizando-se filtro de seringa com poros de 0,22 µm. O filtrado foi então ultracentrifugado a 110.000 g, por 70 minutos, a 4°C. O meio condicionado livre de vesículas extracelulares foi alíquotado em tubos tipo Falcon (50 mL) e armazenados em freezer, a -80°C. Para a obtenção das pequenas VEs, o pellet obtido na etapa anterior foi ressuscitado em PBS e ultracentrifugado novamente sob as mesmas condições descritas anteriormente. Por fim, o pellet obtido foi ressuscitado em aproximadamente 100 µl de PBS, alíquotado em microtubos e congelado à -80°C.

Para a realização dos experimentos, foi feito um pool, com no mínimo duas amostras de meios depletados ou pVEsOb.



**Figura 7. Processo de centrifugação e ultracentrifugação para a obtenção do meio condicionado livre de vesículas extracelulares. Fonte: Autor (2023). Criado em biorender.com**

## 4.5 CARACTERIZAÇÃO DAS PEQUENAS VEs

### 4.5.1 ANÁLISE DO TAMANHO DAS PEQUENAS VEs POR ESPALHAMENTO DINÂMICO DA LUZ.

O diâmetro das partículas foi analisado pela técnica de espalhamento dinâmico da luz (DLS – do inglês, *Dynamic Light Scattering*) que permite determinar o perfil da distribuição de tamanhos das partículas. Os isolados de pVEs foram diluídos 250 vezes em PBS filtrado (0.22 µm). O sobrenadante foi transferido para cubetas de vidro para medição do diâmetro hidrodinâmico no equipamento Zetasizer Nano (Malvern).

### 4.5.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Um volume de 3 µL da suspensão das EVs foi fixado com 100 µL de paraformaldeído 4%. A mistura (2 µL) foi transferida a duas grades revestidas com Formvar de carbono para microscopia eletrônica. As membranas foram cobertas por 20 minutos. Uma gota de 100 µL de PBS foi colocada em uma folha de parafilme e as grades transferidas com o lado da membrana da amostra voltada para baixo, usando uma pinça limpa, por 2 minutos. As grades foram mantidas úmidas no lado da membrana durante todas as etapas, mas secas no lado oposto. As grades foram transferidas para uma gota de 50 µL de 1% de glutaraldeído, durante 5 minutos, antes de transferir para uma gota de 100 µL de água destilada, durante 2 minutos. Essa etapa foi repetida para um total de 8 lavagens em água. Para contrastar as amostras,

as grades foram transferidas para uma solução de 50  $\mu$ L de solução de uranil-oxalato, pH 7, durante 5 minutos, antes de ser transferido para uma gota de 50  $\mu$ L de metilcelulose-UA (4% de acetato de uranilo e 2% metil celulose numa proporção de 100  $\mu$ L/900  $\mu$ L, respectivamente), durante 10 minutos, colocando as grades em um prato de vidro coberto com parafilme em gelo. As grades foram removidas com aço inoxidável e o excesso de fluido foi recolhido suavemente no papel de filtro 54 Whatman nº1. As grades foram secas e armazenadas em caixas. A seguir, as amostras foram analisadas no microscópio eletrônico de transmissão, modelo JEM 1.011 a 80 kV. (JEOL/Massachusetts/USA). As imagens foram captadas em uma câmera (model 785 ES1000W, Gatan, USA) e analisadas no programa de computador “Gatan versão 1.6”

#### **4.5.3 QUANTIFICAÇÃO PROTEICA DAS pVEsOb**

Após o isolamento das pVEsOb do tecido adiposo e do MdOb, uma alíquota das amostras foi utilizada para realizar a dosagem proteica, utilizando-se o kit *Micro BCA Protein Assay* (Thermo Fisher Scientific, EUA), seguindo a metodologia proposta pelo fabricante.

#### **4.5.4 INTERNALIZAÇÃO DAS pVEsOb PELOS FIBROBLASTOS PULMONARES**

Buscamos, em seguida, avaliar a internalização das pVEsOb pelos fibroblastos pulmonares da linhagem Wi-38. Para tanto,  $2 \times 10^4$  células foram semeadas, por poço, em placa de 24 poços, que continham lamínulas de vidro estéreis, por 24 horas. Em seguida, amostras de pVEsOb e de MdOb foram diluídas em PBS para a concentração proteica final de 50  $\mu$ g/mL, em volume final de 500  $\mu$ L e então transferidas para tubos de ultracentrifugação. Para a marcação das pVEsOb foi utilizado o kit *PKH26 Red Fluorescent Cell Linker* (Sigma-Aldrich). Em cada tubo, foi adicionada a solução corante contendo 400  $\mu$ L de Diluente C e 3  $\mu$ L de PKH26. Como controle de marcação, um tubo adicional contendo apenas PBS e a solução corante foi preparado. Após 3 minutos de marcação, foi adicionado em cada tubo 1 mL de PBS suplementado com SFB livre de VEs, por dois minutos, para parar a reação e os tubos preenchidos com meio de cultura não suplementado. Em seguida, o material foi ultracentrifugado a 110.000 g, por 1 hora, a 4°C para a lavagem do excesso de marcação.

Após o processo, o sobrenadante foi retirado cuidadosamente dos tubos e ressuspendido em 100 µL de meio de cultura RPMI não suplementado. Os fibroblastos foram então tratados com 15 µL das respectivas amostras (quadro 2). Após 4 horas de tratamento, o sobrenadante foi retirado, os poços lavados com PBS 1X e as células fixadas em paraformaldeído 4%, por 20 minutos. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1X e incubadas com Hoechst (Sigma-Aldrich, EUA) (2µg/mL) para visualização do núcleo celular, por 5 minutos, lavadas três vezes com PBS 1x e as lâminas montadas com meio de montagem e visualizadas, por fim, em microscópio confocal.

**Quadro 2 – Grupos e tratamentos experimentais realizados para avaliar a internalização de pVEsOb por fibroblastos pulmonares**

<b>Grupos</b>	<b>Tratamento</b>
+pVEsOb - PKH - Hoechst	Células tratadas com pVEsOb não coradas com PKH e Hoechst
- pVEsOb +PKH + Hoechst	Células não tratadas com pVEsOb, coradas com PBS+PKH e Hoechst
+ pVEsOb - PKH + Hoechst	Células tratadas com pVEsOb, não coradas com PKH e coradas com Hoechst
+MdOb +PKH + Hoechst	Células tratadas com solução contendo MdOb corada com PKH e Hoechst
+ pVEsOb +PKH + Hoechst	Células tratadas com pVEsOb coradas com PKH e Hoechst

## **4.6 EFEITOS DO TECIDO ADIPOSEO NA VIABILIDADE DE FIBROBLASTOS PULMONARES**

Buscamos investigar os efeitos dos diferentes tratamentos supracitados (Quadro 1) na viabilidade dos fibroblastos pulmonares. Para tanto, foram realizados os ensaios de exclusão por azul de tripan e MTT.

### **4.6.1 ENSAIO DE EXCLUSÃO POR AZUL DE TRIPAN**

1 x 10<sup>4</sup> células Wi-38 foram semeadas, por poço, em placas de 96 poços, contendo 100 µL de meio RPMI suplementado com 1% de SFB e 1% de solução de antibióticos e mantidas por 24 horas para adesão, em estufa úmida, à 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após o tempo, as células foram lavadas com PBS 1X e, em seguida, tratadas com os tratamentos correspondentes (Quadro 1) suplementados com 1% SFB e 1% de solução antibiótica. Para cada condição foram feitas triplicatas técnicas, em três ensaios independentes. Após 24 e 48 horas de

tratamento, as células foram tripsinizadas (50 µL/poço) e adicionado meio de cultura contendo 10% de SFB para inativação da tripsina (50 µL/poço). Em seguida, as células foram diluídas no corante azul de tripan, para verificar a perda de seletividade da membrana plasmática, já que essa substância penetra apenas células cuja membrana plasmática não se encontra íntegra, infiltrando-se no citoplasma e, dessa forma, indicando morte celular (MASSON-MEYERS; BUMAH; ENWEMEKA, 2016; STROBER, 2015). As células vivas (incolores) e mortas (coradas), foram contadas em câmara de Neubauer com o auxílio de um microscópio de luz. Os dados obtidos foram convertidos em porcentagem de células vivas em relação ao número total (células vivas + não vivas).

#### **4.6.2 ENSAIO DE MTT**

Além de avaliar a integridade da membrana, buscamos avaliar a atividade metabólica celular como indicador da viabilidade, através do ensaio de MTT. Esse ensaio colorimétrico consiste na redução do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) em cristais de formazan pelas desidrogenases mitocondriais das células metabolicamente viáveis.

Para tanto,  $1 \times 10^4$  células Wi-38 foram semeadas, por poço, em placa de 96 poços, contendo 100 µL de meio RPMI suplementado com 1% de SFB e 1% de solução de antibióticos, por 24 horas, em estufa úmida, a 37°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS 1X e em seguida, conforme o quadro 1, receberam 100 µL dos tratamentos correspondentes (Quadro 1) suplementados com 1% SFB e 1% de solução antibiótica. Para cada condição foram feitas triplicatas técnicas, em três ensaios independentes. Após 24 e 48 horas de tratamento, os sobrenadantes dos poços foram retirados, os poços lavados e adicionados 90 µL de meio de cultura RPMI suplementado e 10 µL de solução de MTT (5 mg/mL), por poço, e a placa novamente incubada em estufa úmida, nas condições supracitadas, por 4 horas. Em seguida, o meio contendo MTT foi aspirado de cada poço e adicionado 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), por poço, a fim de solubilizar os cristais de formazan. A absorbância foi absorvida em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 540 nm.

## 4.7 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

Buscamos avaliar se os diferentes tratamentos (Quadro 1) impactam na proliferação dos fibroblastos pulmonares. Para tanto,  $1 \times 10^4$  células Wi-38 foram semeadas, por poço, em placas de 96 poços, contendo 100  $\mu\text{L}$  de meio RPMI suplementado com 1% de SFB e 1% de solução de antibióticos e mantidas por 24 horas para adesão, em estufa úmida, à 37°C, em atmosfera contendo 5% de  $\text{CO}_2$ . Após o tempo, as células foram lavadas com PBS 1X estéril e, em seguida, tratadas com os tratamentos correspondentes (Quadro 1) suplementados com 1% SFB e 1% de solução antibiótica. Para cada condição foram feitas triplicatas técnicas, em três ensaios independentes. Após 24 e 48 horas de tratamento, as células foram tripsinizadas (50  $\mu\text{L}$ /poço) e adicionado meio de cultura contendo 10% de SFB para inativação da tripsina (50  $\mu\text{L}$ /poço). Em seguida, as células foram diluídas no corante azul de tripan, e contadas em câmara de Neubauer com o auxílio de um microscópio de luz. Foram consideradas apenas as células vivas para a montagem dos gráficos.

## 4.8 ATIVIDADE MITOCONDRIAL

Buscamos avaliar a atividade mitocondrial dos fibroblastos pulmonares tratados com pVEsOb utilizando a sonda fluorescente tetrametilrodamina etílico éster (TMRE) (Fluka Analytical), que mede o potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi\text{m}$ ) por citometria de fluxo. Para tanto  $2,5 \times 10^5$  células Wi-38 foram semeadas, por poço, em placa de 6 poços, contendo 2 mL de meio RPMI suplementado com 10% SFB e 1% de solução antibióticos e mantidas por 24 horas para adesão, em estufa úmida, à 37°C, em atmosfera contendo 5% de  $\text{CO}_2$ . Após o tempo, as células foram lavadas com PBS 1X estéril e, em seguida, tratadas com novo meio suplementado (10% SFB e 1% solução antibiótica) contendo 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de pVEsOb. Após incubação por 24 e 48 horas com o tratamento, as células foram tripsinizadas e foi adicionado meio de cultura contendo 10% de SFB para inativar a tripsina. A suspensão celular foi, em seguida, centrifugada a 1500 rpm, por 5 minutos, à 4°C, e as células ressuspendidas em 300  $\mu\text{L}$  de solução balanceada de Hank's (HBSS). A suspensão foi transferida para tubos de citometria e, em seguida, adicionou-se em cada tubo TMRE (100 nM), por 10 minutos, à 37°C. Como controles, foram utilizados fibroblastos não tratados com pVEsOb e células não marcadas.

Em seguida, as amostras foram avaliadas por citômetro de fluxo com 30.000 eventos adquiridos. Para as análises foi utilizado o software FlowJo®. Os dados obtidos foram representados em média de intensidade de fluorescência.

#### **4.9 ENSAIO DE CLONOGENICIDADE**

Avaliamos se o meio condicionado depletado de pVEs do tecido adiposo eutrófico e de indivíduos com obesidade influenciam na capacidade de formação de colônias das células da linhagem Wi-38. Para tanto,  $2 \times 10^3$  fibroblastos da linhagem Wi-38 foram semeados, por poço, em placa de 12 poços, contendo 800  $\mu$ L de meio RPMI suplementado com 10% SFB e 1% de solução antibióticos e mantidas por 24 horas para adesão, em estufa úmida, à 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após o tempo, as células foram lavadas com PBS 1X e, em seguida, tratadas com MdOb ou MdEu suplementados com 10% SFB e 1% de solução antibiótica. Para cada condição foram feitas duplicatas técnicas, em três ensaios independentes. Após 14 dias de tratamento, as placas foram lavadas com PBS 1X duas vezes, fixadas com paraformaldeído 4%, por 10 minutos, lavadas novamente com PBS 1X e coradas com cristal violeta 0,1%, por 1 minuto. Após lavagem abundante com PBS 1X as placas permaneceram em temperatura ambiente e foram fotografadas utilizando-se microscópio invertido com câmera acoplada. As imagens obtidas foram utilizadas para quantificar as colônias com o auxílio do software *ImageJ*.

#### **4.10 ENSAIO DE CICATRIZAÇÃO (*WOUND HEALING*)**

Os efeitos do tecido adiposo sobre a migração dos fibroblastos da linhagem Wi-38 foram avaliados através do ensaio *Wound healing* (cicatrização de feridas).  $8 \times 10^4$  fibroblastos foram semeados por poço, em placa de 24 poços, contendo 500  $\mu$ L de meio RPMI suplementado com 1% de SFB e 1% de solução de antibióticos e mantidas por 24 horas para adesão, em estufa úmida, à 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24 horas, o meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas com meio de cultura não suplementado por duas vezes. Com o auxílio de ponteiros p200, foi feito um risco longitudinal produzindo um *gap* sem células e, em seguida, os poços foram lavados com RPMI não suplementado para a remoção das células desaderidas. Posteriormente, as células foram tratadas com os tratamentos correspondentes (Quadro 1) suplementados com 1% SFB e 1% de solução antibiótica. Para cada

condição foram feitas triplicatas técnicas, em três ensaios independentes. Em seguida, as placas foram levadas para aquisição de imagens com o auxílio de microscópio invertido acoplado com câmera fotográfica. Dois diferentes campos fotográficos foram obtidos em cada poço no momento após o tratamento (tempo zero – T0), 12 (T12) e 24 (T24) horas após o risco/tratamento. Para garantir que os mesmos campos fossem fotografados nos tempos propostos, e assim acompanhar a migração nesses locais, previamente à semeadura das células foram feitas duas retas paralelas, perpendiculares ao risco do *gap*, com auxílio de marcador permanente e régua, no fundo de cada poço da placa. O comprimento do *gap* foi medido ao longo do tempo utilizando o software *ImageJ*.

## **4.11 DOSAGEM DE MEDIADORES SOLÚVEIS**

Para investigar a produção de mediadores solúveis por fibroblastos tratados sob diferentes condições, dosamos as citocinas por meio do ensaio imunoenzimático (ELISA) do tipo sanduíche. Para tanto, foram semeadas  $1,5 \times 10^5$  fibroblastos da linhagem Wi-38 foram semeados, por poço, em placa de 6 poços, contendo 2 mL de meio RPMI suplementado com 10% SFB e 1% de solução antibióticos e mantidas por 24 horas para adesão, em estufa úmida, à 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após o tempo, as células foram lavadas com PBS 1X estéril e, em seguida, tratadas com os tratamentos correspondentes (Quadro 1) suplementados com 10% SFB e 1% de solução antibiótica. Após 24 e 48 de tratamento, o sobrenadante de cada poço foi retirado, alíquotado e armazenado em freezer, a -80°C para posteriormente ser utilizado o ensaio de ELISA. Foram dosadas as citocinas Ang1, IL1- $\beta$ , IL-6, MIF, RANTES, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , VEGF, conforme especificações do fabricante.

## **4.12 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA**

### **4.12.1 EXTRAÇÃO DE RNA**

$1,5 \times 10^5$  fibroblastos da linhagem Wi-38 foram semeados, por poço, em placa de 6 poços, contendo 2 mL de meio RPMI suplementado com 10% SFB e 1% de solução antibióticos e mantidas por 24 horas para adesão, em estufa úmida, à 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após o tempo, as células foram lavadas com PBS 1X estéril e, em seguida, tratadas com os tratamentos correspondentes (Quadro 1) suplementados com 10% SFB e 1% de solução antibiótica. Após 48 horas de

tratamento, o sobrenadante foi recolhido, alíquotado e armazenado em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, as células foram lavadas com PBS 1X estéril e, depois, adicionado 0,5 mL de TransZol, por poço, e realizado movimento de *up-down*. Posteriormente, o conteúdo de cada poço foi transferido para um microtubo de 1,5 mL e a amostra armazenada em freezer, a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Após descongelamento em gelo, foi adicionado 200  $\mu\text{L}$  de clorofórmio em cada microtubo, com posterior homogeneização por inversão por 15 segundo e, por fim, incubação em temperatura ambiente, por 3 minutos. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm, a  $4^{\circ}\text{C}$ , por 15 minutos. O RNA presente na fase aquosa superior foi cuidadosamente coletado e transferido para outro microtubo, sendo adicionado 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol e, em seguida, incubados *overnight*, a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para a precipitação do RNA. Posteriormente, as amostras foram novamente centrifugadas a 12.000 rpm, por 15 minutos, a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi então descartado, o pellet lavado com etanol 75% e os microtubos novamente centrifugados a 7.500 rpm, por 5 minutos, a  $4^{\circ}\text{C}$ . A etapa anterior foi repetida e após a retirada do sobrenadante, os microtubos foram deixados invertidos sobre papel toalha com a tampa aberta para a evaporação do etanol. Após a secagem, foi adicionado 30  $\mu\text{L}$  de água *RNAse free* e, em seguida, a solução armazenada em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.12.2 SÍNTESE DO DNA COMPLEMENTAR (cDNA)

A absorbância das amostras de RNA foi determinada em espectrofotômetro NanoDrop Lite (Thermo Scientific) para avaliar a qualidade e para quantificação do ácido nucleico das amostras. As dosagens foram feitas a partir de 1  $\mu\text{L}$  da amostra e a quantidade de RNA foi padronizada. A síntese de cDNA foi realizada pela técnica de transcrição reversa a partir das fitas de mRNA isoladas como descrito na etapa anterior. A síntese foi realizada em tubos nuclease-free, utilizando-se os seguintes reagentes do *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems): enzima transcriptase (1  $\mu\text{L}$ ), dNTP (Desoxirribonucleotídeos Fosfatados) (0,8 $\mu\text{L}$ ), *random primers* (2  $\mu\text{L}$ ), *RT buffer* (2  $\mu\text{L}$ ). Na solução, também foi adicionado  $\text{H}_2\text{O}$  *nuclease-free* (4,2  $\mu\text{L}$ ). Os tubos foram levados ao termociclador (Eppendorf® Mastercycler) nas seguintes condições:  $25^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos,  $37^{\circ}\text{C}$  por 120 minutos e  $85^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos, com a temperatura final do ciclo chegando a  $4^{\circ}\text{C}$ . O cDNA sintetizado foi armazenado em freezer, a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 4.12.3 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS mRNAs

Após a síntese do cDNA, foi realizada a reação em cadeia da polimerase em tempo real (rt-PCR). Foram utilizados iniciadores (5'-3') para análise da expressão de mRNAs específicos, conforme descrito no quadro 3.

**Quadro 3** – Primers que foram utilizados para avaliar a expressão de genes alvos do estudo

Genes	Foward primer (5'->3')	Reverse primer (5'->3')
<b>CCL2</b>	TCTCAAAGCTGAAGCTCGCACT	TATGAGCAGCAGGCACAGAA
<b>S100A4</b>	TCTTGGTTTGATCCTGACTGCT	TGTCCCTGTTGCTGTCCAAG
<b>GAPDH</b>	AATGGGCAGCCGTTAGGAAA	GCGCCAATACGACCAAATC

CCL2 - *C-C Motif Chemokine Ligand 2*; S100A4 - *S100 Calcium Binding Protein A4*; GAPDH - gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. Fonte: Autor (2023)

O gene de referência foi o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*). Para a reação de rt-PCR os cDNAs foram diluídos 1:5 em água extra pura. As reações foram feitas no volume final de 10 µL, dos quais 1 µL de amostra cDNA e 9 µL da solução contendo 5µL *Syber™ Green Master Mix* (Applied Biosystems), *primers Foward* (0,7 µL) e *reverse* (0,7 µL) de cada gene, na concentração de 10 µM e água extra pura (2,6 µL). O ensaio de rt-PCR foi realizado em um sistema de rt-PCR (StepOnePlus; Applied Biosystems) utilizando-se as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos 95°C por 15 segundos para desnaturação, seguido do anelamento dos primers e extensão a 60°C por 1 minuto e 95°C por 15 segundos.

Para cada amostra foram feitas triplicatas biológicas, usando duplicatas de poços. Como controle negativo para a reação de rt-PCR foram utilizados poços contendo o mix da reação mais os primers e água ultrapura.

A análise das curvas de *melting* e de dissociação foi feita ao final de cada corrida como controle da qualidade da amplificação gênica. Para análise da expressão gênica através do rt-PCR, foi utilizado o método Delta-Delta Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ). Foi calculado inicialmente o  $\Delta Ct$  de cada amostra, subtraindo-se os valores de Ct do gene controle (*GAPDH*) dos valores de Ct do gene alvo. Após determinação do  $\Delta Ct$  da amostra, para o cálculo do  $\Delta\Delta Ct$  foi utilizada a seguinte fórmula: [ $\Delta Ct$  (amostra) -  $\Delta Ct$  (amostra controle)]. Uma vez determinado o  $\Delta\Delta Ct$ , foi aplicada a fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , que resultou no valor da expressão gênica relativa.

### 4.13 ENSAIO DE MIGRAÇÃO

Avaliamos, por fim, se os fibroblastos tratados em diferentes condições (Quadro 1), aumentavam a capacidade migratórias de células do câncer de mama triplo-negativo MDA-MB-231. Para tanto,  $2,5 \times 10^4$  fibroblastos foram semeados, por poço, em placas de 24 poços, contendo 700  $\mu\text{L}$  de meio RPMI suplementado com 10% SFB e 1% de solução de antibióticos e mantidas por 24 horas para adesão, em estufa úmida, a 37°C, em atmosfera contendo 5% de  $\text{CO}_2$ . Após o tempo, as células foram lavadas com PBS 1X e, em seguida, tratadas com os tratamentos correspondentes (Quadro 1) suplementados com 10% SFB e 1% de solução antibiótica. Após 48 horas de tratamento, insertos *Transwell* (Corning, EUA) com poros de 0,8  $\mu\text{m}$  de diâmetro foram inseridos e  $1 \times 10^5$  células MDA-MB-231 foram semeadas no topo do inserto. Como controles, foram utilizados poços contendo fibroblastos não tratados, contendo apenas MdEu, MdOb ou pVEsOb. Para cada condição foram feitas duplicatas técnicas, em três ensaios independentes.

Para avaliar a migração das células tumorais, os insertos foram removidos dos poços, incubados em paraformaldeído 4%, por 5 minutos, em temperatura ambiente, e lavados em seguida com PBS 1X. Posteriormente, os insertos foram incubados em solução metanólica de cristal violeta 1%, por 5 minutos. Os insertos foram lavados com água destilada para a remoção do excesso do corante e as células que não migraram, foram cuidadosamente removidas da parte superior da câmara utilizando-se hastes de algodão.

Em seguida, as membranas dos insertos foram retiradas cuidadosamente com o auxílio de uma lâmina de bisturi, acondicionadas uma por poço, em placa de 24 poços, e adicionado 400  $\mu\text{L}$  de SDS 1X, por poço, para solubilizar o cristal violeta. As placas foram então levadas para o agitador tipo shaker (Thermo MaxQ 4000 modelo 4329), por 3 horas, a 90 rpm, a 37°C. Em seguida, 100  $\mu\text{L}$  de cada poço foram transferidos para placas de 96 poços. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro, a 620 nm.

### 4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram feitas utilizando o software GraphPad Prims 9.0 (GraphPad Software). A normalidade das variáveis numéricas foi testada para distribuição normal usando o teste de Shapiro-Wilk. Os grupos experimentais com

apenas uma variável foram analisados utilizando-se o teste *OneWay* ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. Já os grupos experimentais com duas variáveis foi utilizado o teste *TwoWay* ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. Para comparações envolvendo apenas dois grupos, foi utilizado o teste T de Student. Para a comparação das proporções entre os sexos foi utilizado o teste de qui-quadrado. Em todas as análises foram considerados significativos os resultados que apresentaram  $p < 0,05$ . Os dados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 VOLUNTÁRIOS

Para investigar o possível papel dos fatores solúveis derivados tecido adiposo visceral de indivíduos com obesidade, amostras do tecido adiposo de pacientes eutróficos (n=3) e com obesidade (n=4) foram coletadas para se obter o meio condicionado e isolar as pVEs. Os voluntários com obesidade apresentaram IMC médio de 40,67, sendo 75% indivíduos do sexo feminino e idade média de 51 anos. Os voluntários eutróficos tiveram IMC médio de 23,64, sendo 66,7% do sexo feminino e idade média aproximada de 67 anos (Tabela 1). Utilizamos pVEs adicionais de voluntários com obesidade para realizar os experimentos contendo essas nanovesículas, conforme mostrado na Tabela 2.

**Tabela 1** – Dados dos voluntários cujos tecidos adiposos foram utilizados para recolher o meio condicionado e isolar pequenas VEs

Grupo	Idade (Média ± EP)*	IMC (Média ± EP)*	Sexo
Eutrófico	67,33 ± 4,17	23,64 ± 0,44	2 F; 1 M
Com obesidade	51 ± 2,92	40,67 ± 4,37	3 F; 1 M

EP = Erro padrão; IMC = Índice de massa corporal; F = feminino; M = masculino. Resultados expressos em média ± erro padrão. Fonte: Autor (2023)

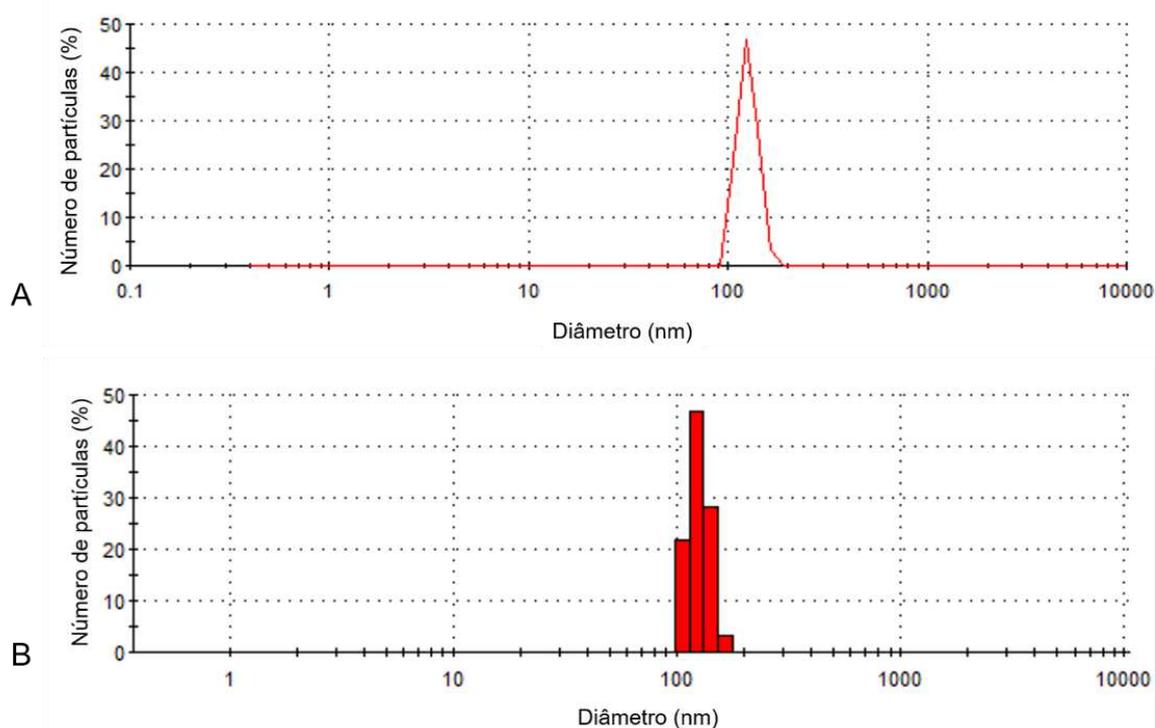
**Tabela 2** – Dados adicionais dos voluntários com obesidade cujos tecidos adiposos foram utilizados para isolar pVE

Grupo	Idade (Média ± EP)	IMC (Média ± EP)	Sexo
Com obesidade	48,75 ± 6,94	40,75 ± 1,75	4F; 0 M

EP = Erro padrão; IMC = Índice de massa corporal; F = feminino; M = masculino. Resultados expressos em média ± erro padrão. Fonte: Autor (2023)

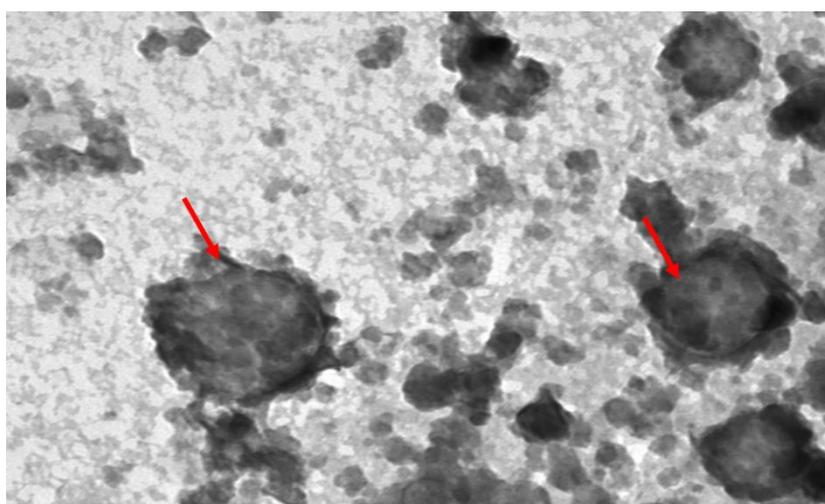
### 5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS PEQUENAS VEs

Isolamos as pVEs derivadas do tecido adiposo de indivíduos com obesidade (pVEsOb) pelo método de ultracentrifugação e avaliamos a distribuição do tamanho das partículas por DLS. Observamos que o diâmetro hidrodinâmico médio das partículas isoladas do tecido adiposo de indivíduos com obesidade foi de 126 ± 8 nm (Figura 8A), sendo que 46,6% das pVEs apresentavam diâmetro hidrodinâmico de 122,4 nm (Figura 8B).



**Figura 8. Diâmetro das pVEs obtidas do tecido adiposo de indivíduos com obesidade. (A) Curva de distribuição do tamanho das pVEs derivadas do tecido adiposo de indivíduos com obesidade, (B) Histograma de tamanho de partículas de pVEs derivadas do tecido adiposo de indivíduos com obesidade. Fonte: Autor (2023).**

Em seguida, analisamos por meio de microscopia eletrônica de transmissão a morfologia e o tamanho das pVEs isoladas do tecido adiposo, conforme descrito anteriormente. Conforme mostrado na figura 9, obtivemos pequenas VEs de morfologia de prato, com tamanho médio de 100 nm.



**Figura 9. Microscopia eletrônicas das pVEs isoladas do TAV de indivíduos com obesidade. Setas vermelhas indicam as pequenas VEs. Fonte: Autor (2023)**

### 5.3 INTERNALIZAÇÃO DAS pVEsOb PELOS FIBROBLASTOS PULMONARES

Após a obtenção e caracterização das pVEs derivadas do tecido adiposo de indivíduos com obesidade, investigamos se essas vesículas poderiam ser internalizadas por fibroblastos pulmonares, corando-as com o corante PKH26. Após 4 horas de tratamento observamos que as células Wi-38 foram capazes de internalizar as pVEsOb coradas (Figura 10E). Não observamos marcação do PKH26 em células não tratadas com pVEsOb, indicando que não houve marcação inespecífica (Figura 10B e C). Além disso, como controle adicional, não observamos marcações nas células tratadas com MdOb (Figura 10D), demonstrando a eficácia do processo de ultracentrifugação no isolamento das pVEs.

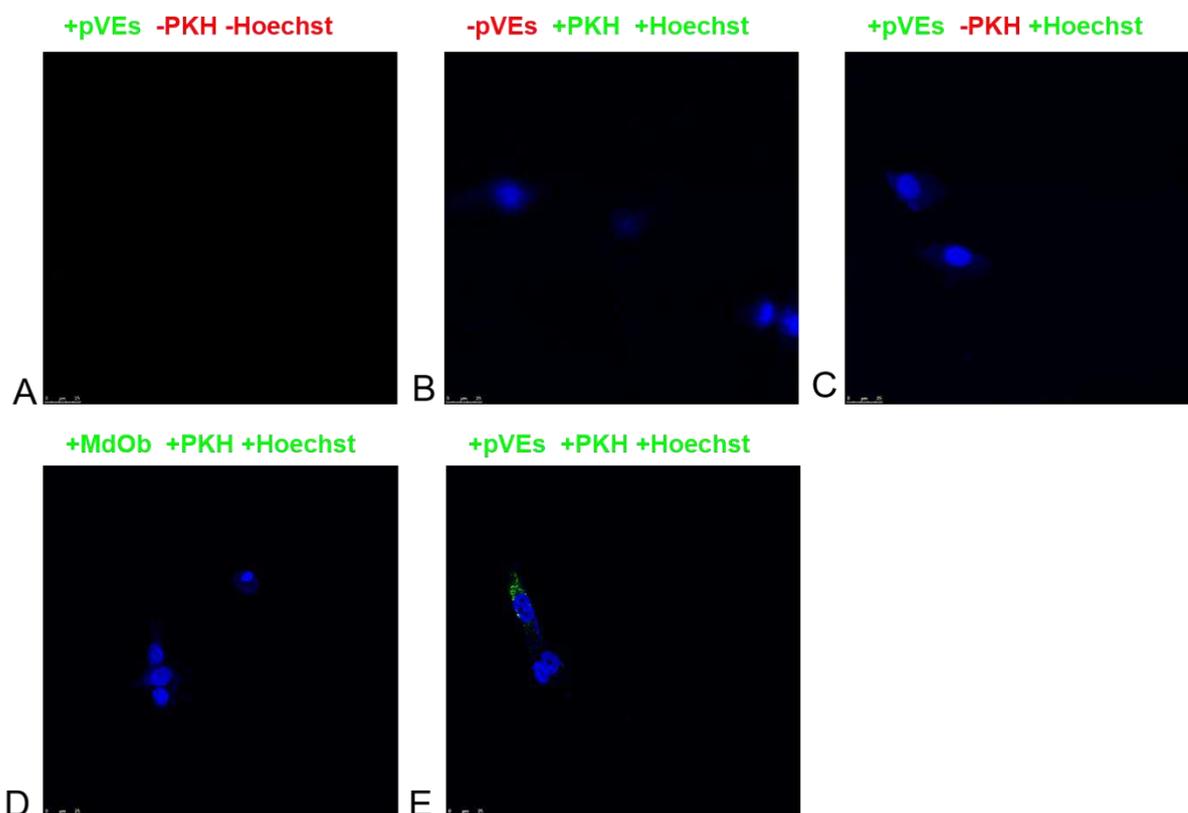


Figura 10. Internalização das pVEsOb coradas com PKH26 por células Wi-38. Os fibroblastos pulmonares foram tratados (A, C, E) por quatro horas com pVEsOb coradas (E) ou não (A, C) com o corante fluorescente PKH26. Além disso, como controle, fibroblastos também foram tratados por 4 horas com MdOb contendo PKH26 e não foram observadas marcações (D), indicando eficácia da técnica em isolar pVEs. pVEsOb estão marcadas em verde e os núcleos, que foram corados com Hoechst, em azul. Imagens obtidas em microscópio confocal, com aumento de 63x. Imagens representativas de um experimento. Fonte: Autor (2023).

## 5.4 VIABILIDADE CELULAR

Após a obtenção dos meios condicionados depletados dos tecidos adiposos de indivíduos eutróficos e com obesidade, bem como a obtenção e caracterização das pVEsOb, avaliamos a viabilidade das células da linhagem de fibroblastos pulmonares Wi-38 submetidas a diferentes condições de tratamento (Quadro 1), em diferentes tempos, utilizando diferentes técnicas. Observamos que tanto MdEu e MdOb, quanto as pVEsOb não alteram a viabilidade celular, quando avaliada pelo ensaio de exclusão por azul de tripan (Figura 11). Entretanto, observamos alterações significativas na viabilidade celular quando avaliada pelo ensaio de redução do MTT, nos tempos de 24 e 48 horas (Figura 12). Observamos que no tempo de 24 horas, os fibroblastos do grupo tratado com 15 µg/mL de pVEsOb apresentaram diminuição estatisticamente significativa da viabilidade celular quando comparado com todos os demais grupos. No tempo de 48 horas observamos uma diminuição estatisticamente significativa da viabilidade celular nos fibroblastos tratados com pVEsOb e MdOb e aumento da viabilidade celular nas células tratadas com MdEu. Curiosamente, houve uma diminuição da viabilidade celular estatisticamente significativa nas células tratadas com pVEsOb, quando comparadas com àquelas tratadas com MdOb, em ambos os tempos analisados, sugerindo que alterações metabólicas são mais pronunciadas no grupo tratado com as pVEs derivadas do TA de indivíduos com obesidade, do que àquelas observadas no grupo tratado com MdOb no tempo de 48 horas.

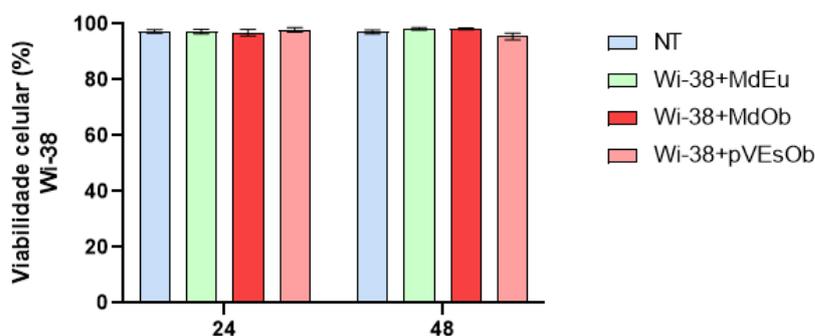


Figura 11. Avaliação da viabilidade celular pelo método de exclusão de azul de Tripan, de fibroblastos pulmonares Wi-38 tratados com os meios condicionados depletados de VEs derivados do tecido adiposo de indivíduos com obesidade ou eutrófico, e pVEsOb, em diferentes tempos. A viabilidade celular das células da linhagem Wi-38 foi analisada 24 e 48 horas após diferentes tratamentos pelo método de exclusão de azul de tripan. NT: controle não tratado; Wi-38+MdEu: 20% de meio condicionado depletado de VEs derivado do TA de indivíduos eutróficos; Wi-38+MdOb: 20% de meio condicionado depletado de VEs derivado do TA de indivíduos com obesidade; Wi-38+pVEsOb: 15 µg/mL de pequenas VEs derivadas do tecido adiposo de indivíduos com obesidade. Dados estão expressos em média ± erro padrão de três experimentos independentes. Não foram observadas diferenças estatísticas. Fonte: Autor (2023).

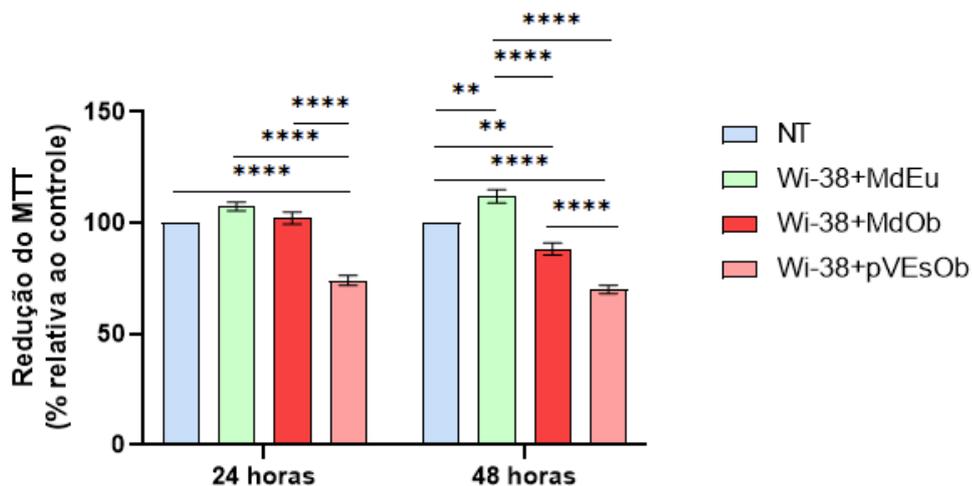


Figura 12. Avaliação da viabilidade celular pelo método de redução do MTT, de fibroblastos pulmonares Wi-38 tratados com os meios condicionados depletados de VEs derivados do tecido adiposo de indivíduos com obesidade ou eutrófico, e pVEsOb, em diferentes tempos. A viabilidade celular das células da linhagem Wi-38 foi analisada 24 e 48 horas após diferentes tratamentos pelo método de redução do MTT. NT: controle não tratado; Wi-38+MdEu: 20% de meio condicionado depletado de VEs derivado do TA de indivíduos eutróficos; Wi-38+MdOb: 20% de meio condicionado depletado de VEs derivado do TA de indivíduos com obesidade; Wi-38+pVEsOb: 15 µg/mL de pequenas VEs derivadas do tecido adiposo de indivíduos com obesidade. Dados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão de três experimentos independentes. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ . Fonte: Autor (2023).

## 5.5 PROLIFERAÇÃO CELULAR

Avaliamos, em seguida, se os meios condicionados ou as pVEsOb impactavam diretamente na proliferação dos fibroblastos pulmonares, em diferentes tempos. Não observamos alterações nesse parâmetro em 24 ou 48 horas após o tratamento das células em diferentes condições (Figura 13), embora uma tendência de aumento no número de células pôde ser visualizada no grupo tratado com MdOb, no tempo de 48 horas ( $p=0,1637$ )

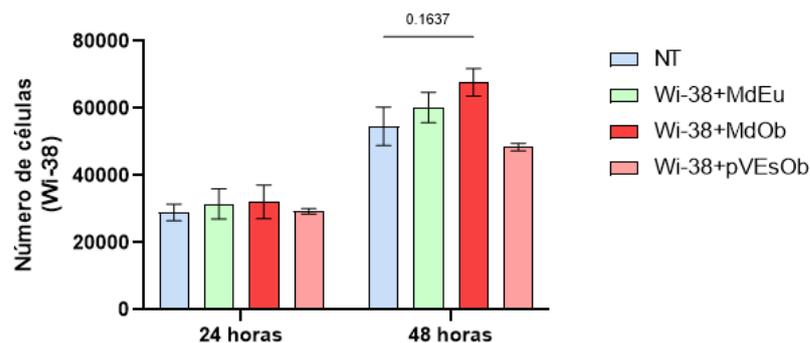


Figura 13. Avaliação da proliferação de fibroblastos pulmonares Wi-38 tratados com os meios condicionados depletados de VEs derivados do tecido adiposo de indivíduos com obesidade ou eutrófico, e pVEsOb, em diferentes tempos. A proliferação celular das células da linhagem Wi-38 foi analisada 24 e 48 horas após diferentes tratamentos. NT: controle não tratado; Wi-38+MdEu: 20% de meio condicionado depletado de VEs derivado do TA de indivíduos eutróficos; Wi-38+MdOb: 20% de meio condicionado depletado de VEs derivado do TA de indivíduos com obesidade; Wi-38+pVEsOb: 15  $\mu\text{g/mL}$  de pequenas VEs derivadas do tecido adiposo de indivíduos com obesidade. Dados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão de três experimentos independentes. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Fonte: Autor (2023).

## 5.6 ATIVIDADE MITOCONDRIAL

Após observarmos alterações pronunciadas na viabilidade celular pelo método de MTT em células tratadas com pVEsOb e não constataremos alterações na proliferação celular, indagamos se as nanopartículas derivadas do TA de indivíduos com obesidade estariam alterando a polaridade da membrana interna das mitocôndrias dos fibroblastos pulmonares. Após 24 e 48 de tratamento com pVEsOb, não observamos diferença significativamente estatística na polarização das mitocôndrias das células Wi-38 tratadas, quando comparado ao grupo controle (Figura 14).

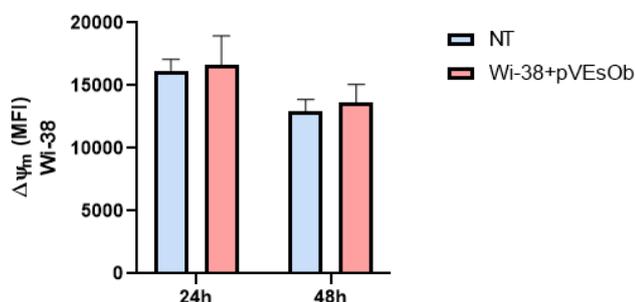


Figura 14. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial de fibroblastos pulmonares Wi-38 tratados com pVEsOb, em diferentes tempos. O potencial de membrana mitocondrial dos fibroblastos foi avaliado 24 e 48 após o tratamento com 15  $\mu\text{g/mL}$  de pVEsOb. NT: controle não tratado; Wi-38+pVEsOb: 15  $\mu\text{g/mL}$  de pequenas VEs derivadas do tecido adiposo de indivíduos com obesidade. Dados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão de três experimentos independentes. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Fonte: Autor (2023).

## 5.7 ENSAIO CLONOGÊNICO

Em seguida, investigamos a capacidade dos fibroblastos pulmonares formarem colônias após 14 dias do tratamento. Observamos que os fibroblastos tratados com MdEu possuem capacidade aumentada de formarem colônias, quando comparados com o grupo NT e MdOb (Figura 15).

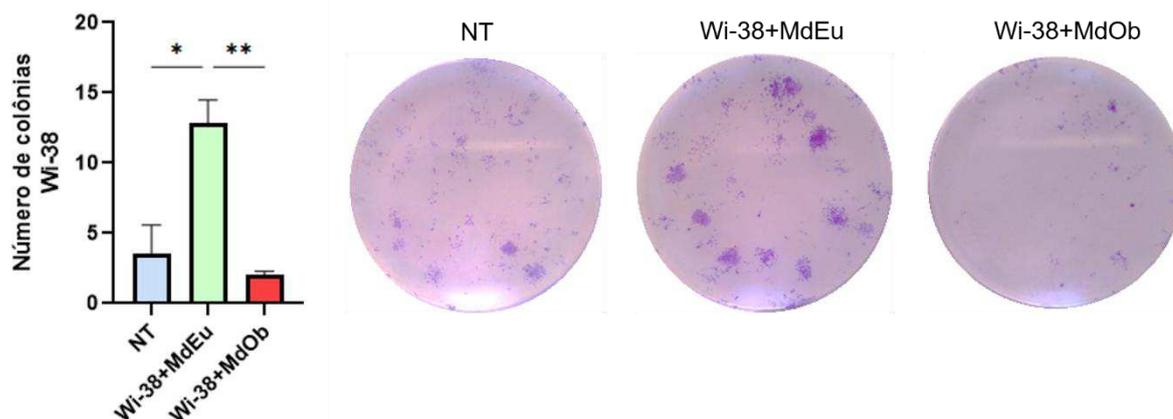
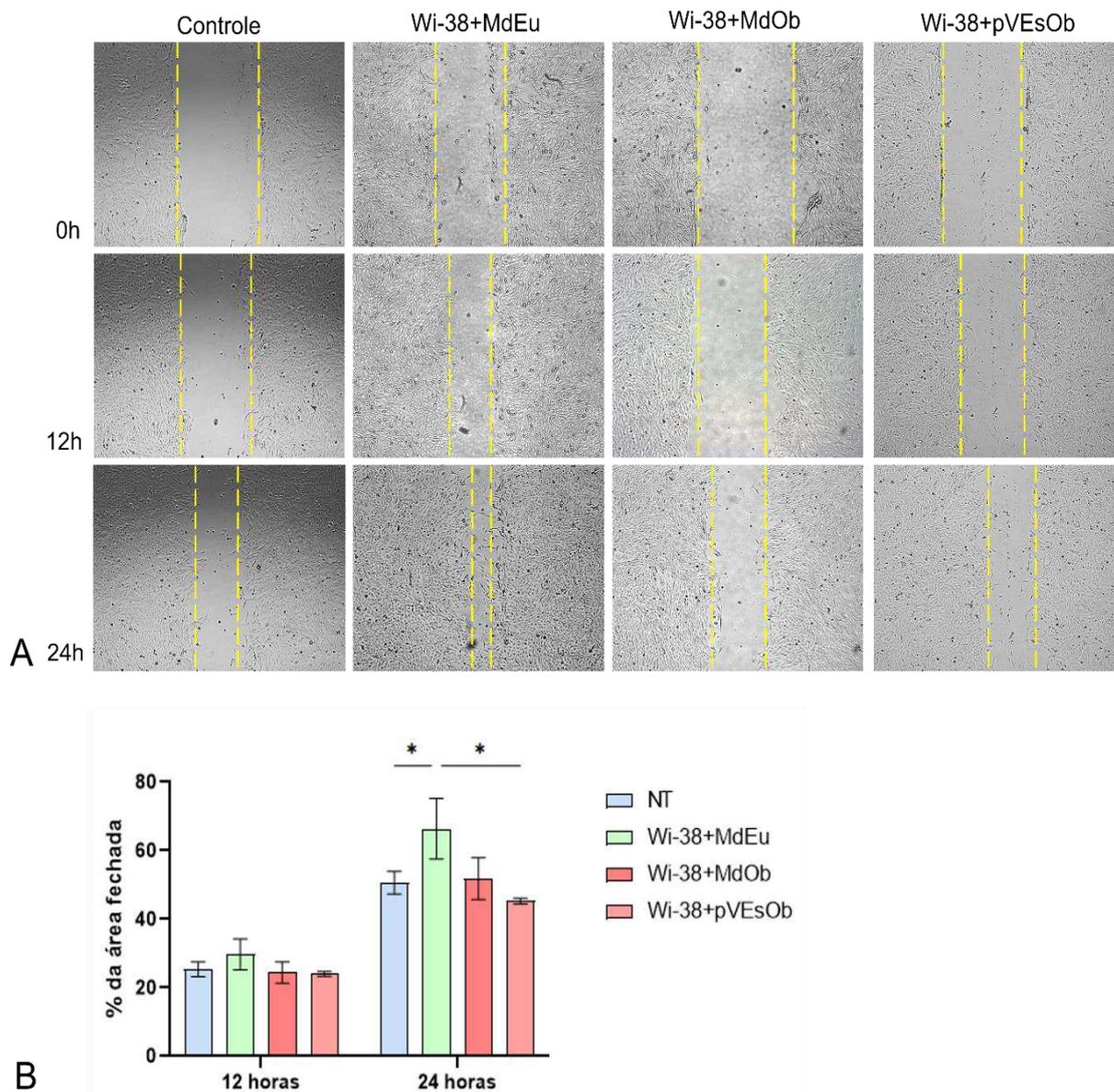


Figura 15. Efeitos do MdEu e MdOb sobre a formação de colônias de fibroblastos pulmonares (Wi-38). Foi investigado a capacidade de formação de colônias dos fibroblastos tratados com o MdEu e MdOb. Após 14 dias de tratamento foram adquiridas imagens e as colônias contadas. As fotos são representativas de um experimento. Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão de três experimentos independentes. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

## 5.8 CICATRIZAÇÃO

Posteriormente, investigamos o possível papel dos meios depletados de VEs dos tecidos adiposos de indivíduos eutróficos e com obesidade, bem como as pVEsOb, na migração coletiva de fibroblastos pulmonares através do ensaio de migração *wound healing* (cicatrização de feridas). As células da linhagem Wi-38 tratadas com o MdEu migraram mais rapidamente quando comparado ao controle e ao grupo tratado com pVEsOBs (Figura 16) após 24 horas de tratamento. Além disso, observamos uma tendência de migração mais veloz das células tratadas com MdEu, quando comparadas com aquelas tratadas com MdOb ( $p = 0,1317$ ).



**Figura 16.** Avaliação dos efeitos dos meios condicionados depletados de VEs derivados do tecido adiposo de indivíduos com obesidade ou eutróficos, e pVEsOb, sobre fibroblastos pulmonares Wi-38, em diferentes tempos. A migração celular das células da linhagem Wi-38 foi analisada nos tempos de 12 e 24 horas após o tratamento. NT: controle não tratado; Wi-38+MdEu: 20% de meio condicionado depletado de VEs derivado do TA de indivíduos eutróficos; Wi-38+MdOb: 20% de meio condicionado depletado de VEs derivado do TA de indivíduos com obesidade; Wi-38+pVEsOb: 15 µg/mL de pequenas VEs derivadas do tecido adiposo de indivíduos com obesidade. Dados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão de três experimentos independentes. \*  $p < 0.05$ . Fonte: Autor (2023).

## 5.9 SECREÇÃO DE MEDIADORES SOLÚVEIS

Dado ao fato de que observamos alterações em alguns dos ensaios funcionais, conforme descrito anteriormente, avaliamos os efeitos dos meios condicionados dos tecidos adiposos de indivíduos eutróficos e com obesidade na secreção de

mediadores solúveis importantes para a formação de NPM e metástases. Dessa forma, investigamos os níveis de Ang1, IL1- $\beta$ , IL-6, MIF, RANTES, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , VEGF do sobrenadante de fibroblastos tratados em diferentes condições (Quadro 1), após 24 e 48 de tratamento (Figura 17).

Não observamos diferenças estatisticamente significativas na secreção de TGF- $\beta$  e VEGF entre os grupos, nos tempos avaliados. O MdEu não foi capaz de aumentar a secreção de nenhum dos mediadores investigados. As pVEsOb foram capazes de aumentar apenas a secreção de Ang1 por fibroblastos pulmonares, nos tempos de 24 e 48 horas, quando comparado ao controle (NT) e MdEu. Todavia, as células tratadas com o MdOb apresentaram níveis elevados estatisticamente significativos dos mediadores Ang1, IL1- $\beta$ , IL-6, RANTES e MIF, nos tempos de 24 e 48 horas, quando comparados com o grupo NT e MdEu. Além disso, células tratadas com MdOb apresentaram níveis estatisticamente elevados de TNF- $\alpha$ , no tempo de 24 horas, quando comparados com os grupos NT e MdEu, e estatisticamente significativo no tempo de 48 horas, quando comparado ao NT.

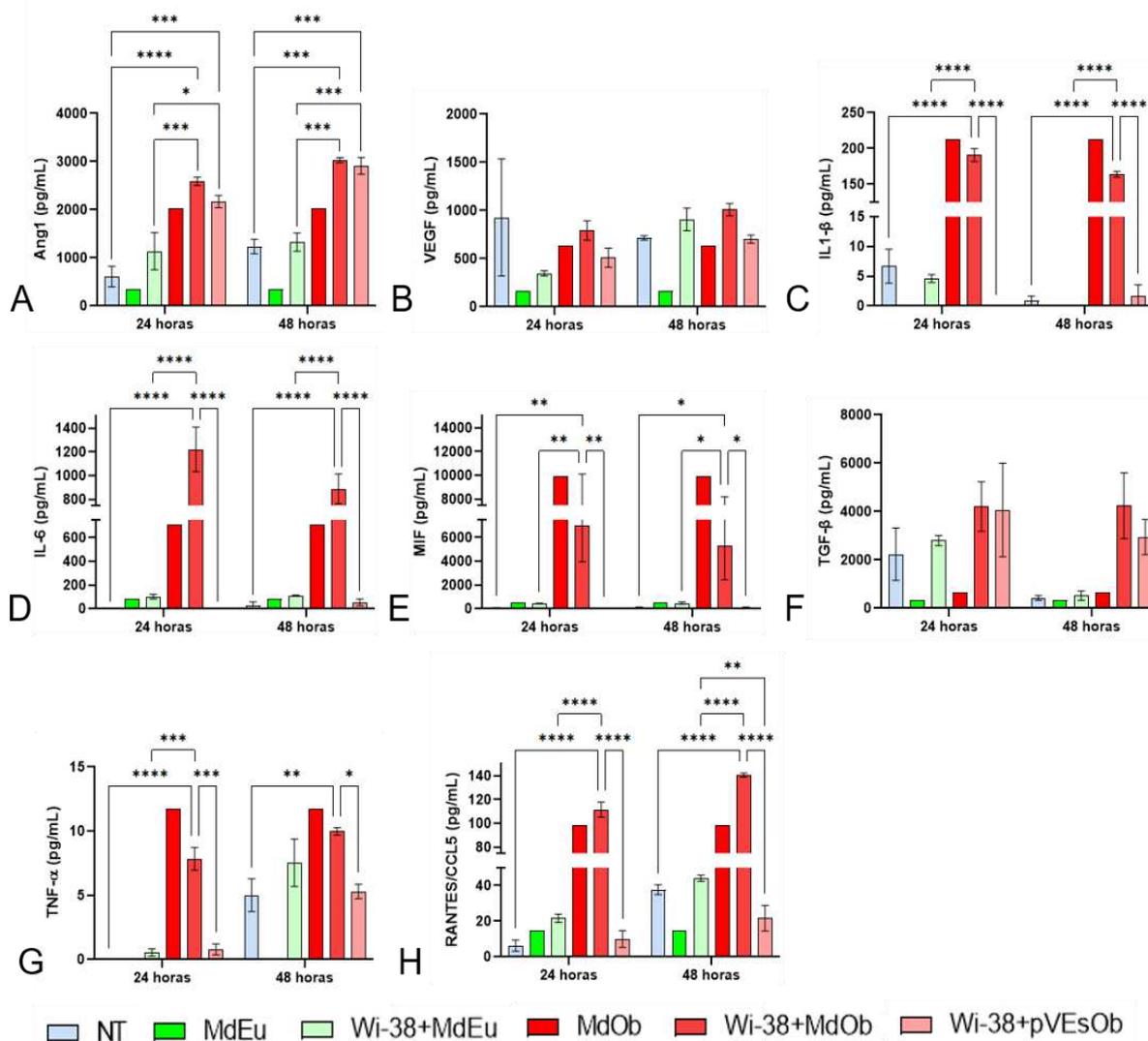
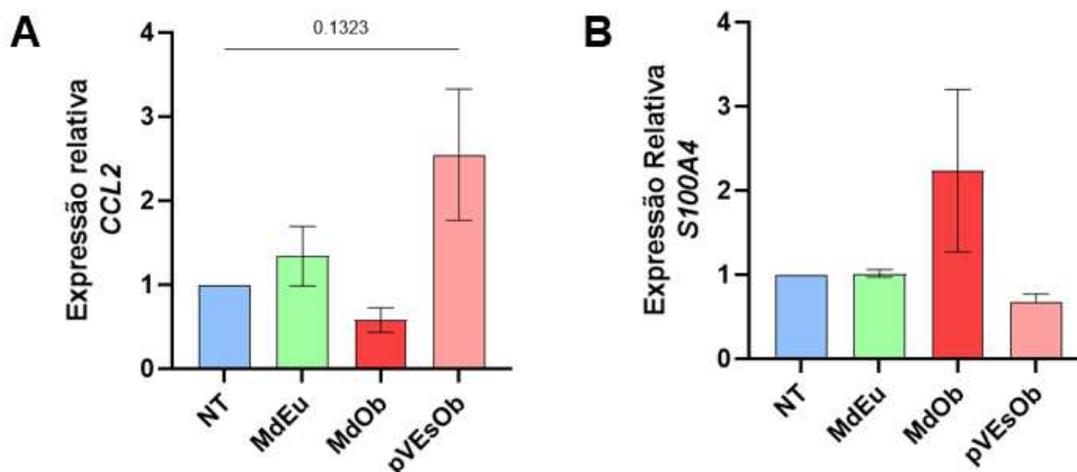


Figura 17. Avaliação dos fatores solúveis no sobrenadante de fibroblastos tratados com os meios condicionados depletados de VEs derivados do tecido adiposo de indivíduos com obesidade ou eutróficos, e pVEsOb, em diferentes tempos. Os fatores solúveis do sobrenadante dos fibroblastos Wi-38 foram quantificados por ELISA, após 24 e 48 horas do tratamento. Também estão identificados nos gráficos a concentração dos respectivos fatores solúveis dos meios depletados anteriormente ao tratamento (MdEu e MdOb) para fins de comparação, não indicando, de fato, a concentração dos tratamentos em si nos tempos de 24 e 48 horas. NT: controle não tratado; Wi-38+MdEu: 20% de meio condicionado depletado de VEs derivado do TA de indivíduos eutróficos; Wi-38+MdOb: 20% de meio condicionado depletado de VEs derivado do TA de indivíduos com obesidade; Wi-38+pVEsOb: 15 μg/mL de pequenas VEs derivadas do tecido adiposo de indivíduos com obesidade. Ang1 = angiopoietina 1; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular; IL1-β: interleucina 1-beta; IL6 = interleucina 6; MIF = fator inibidor da migração de macrófagos; TGF-β = fator de crescimento transformador-beta; TNF-α = fator de necrose tumoral-alfa; CCL5 = Chemokine (C-C motif) ligand 5. Dados estão expressos em média ± erro padrão de três experimentos independentes. \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001. Fonte: Autor (2023).

## 5.10 EXPRESSÃO GÊNICA

Aqui, também investigamos a expressão de dois fatores importantes encontrados em diferentes subconjuntos de FACs e FAMs, a *CCL2* e *S100A4*. Nossos resultados demonstraram um aumento da expressão de *CCL2* em fibroblastos tratados com pVEsOb, embora não tenha sido significativo (Figura 18A), e nenhum aumento na expressão de *S100A4* (Figura 18B).



**Figura 18.** Expressão relativa dos genes *CCL2* e *S100A4* por fibroblastos pulmonares tratados em diferentes condições. Após 48 horas de tratamento, foi analisado por rt-PCR a expressão dos genes *CCL2* e *S100A4* em fibroblastos pulmonares. NT: controle não tratado; Wi-38+MdEu: 20% de meio condicionado depletado de VEs derivado do TA de indivíduos eutróficos; Wi-38+MdOb: 20% de meio condicionado depletado de VEs derivado do TA de indivíduos com obesidade; Wi-38+pVEsOb: 15 µg/mL de pequenas VEs derivadas do tecido adiposo de indivíduos com obesidade. Dados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão de três experimentos independentes. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos. Fonte: Autor (2023).

## 5.11 MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS MDA-MB-231

Por fim, avaliamos se as células tratadas com os meios condicionados ou pVEsOb aumentavam a migração das células tumorais MDA-MB-231, após 48 de tratamento, utilizando insertos. Como controles, utilizamos poços contendo apenas os meios condicionados ou pVEsOb sem fibroblastos. Não observamos diferenças estatísticas na migração das células tumorais, em nenhuma das condições avaliadas (Figura 19).

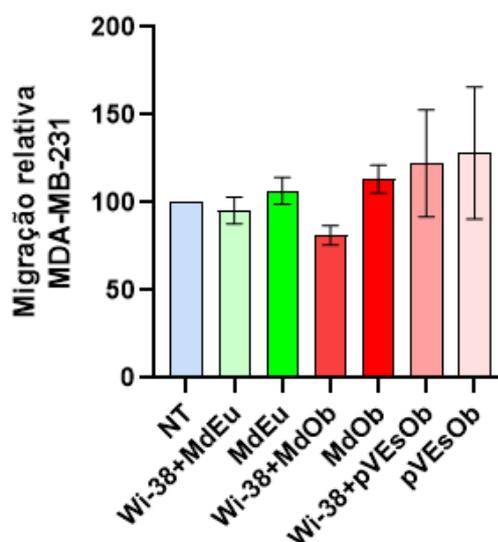


Figura 19. Avaliação da migração relativa das células tumorais MDA-MB-231 pela membrana do inserto, por absorbância, após 48 horas de tratamento dos fibroblastos pulmonares. Meios condicionados e pVEsOb sem células Wi-38 foram utilizados como controle. NT: controle não tratado; Wi-38+MdEu: 20% de meio condicionado depletado de VEs derivado do TA de indivíduos eutróficos; Wi-38+MdOb: 20% de meio condicionado depletado de VEs derivado do TA de indivíduos com obesidade; Wi-38+pVEsOb: 15 µg/mL de pequenas VEs derivadas do tecido adiposo de indivíduos com obesidade. Dados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão de três experimentos independentes. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Fonte: Autor (2023).

## 6 DISCUSSÃO

A expansão patológica do tecido adiposo na obesidade pode levar a profundas modificações histofisiológicas desse tecido, acarretando consequências sistêmicas em indivíduos com obesidade (KAHN; WANG; LEE, 2019), como doenças cardiometabólicas ou câncer, como o de mama (RAMOS-ANDRADE et al., 2020). Todavia, pouco ainda se sabe sobre como o quadro obeso pode potencializar o desenvolvimento e progressão da doença metastática, principalmente no que tange à formação dos NPM. Dessa forma, buscamos tentar compreender nesse trabalho os possíveis papéis das alterações fisiopatológicas do tecido adiposo de indivíduos com obesidade na fisiologia dos fibroblastos pulmonares, visto que o pulmão é um dos principais sítios metastáticos no câncer de mama (XIAO et al., 2018) e os fibroblastos são importantes células estromais envolvidas na formação dos NPM e nas metástases (PLIKUS et al., 2021).

Importante considerar que as células, no geral, além de secretarem uma miríade de biomoléculas ativas também secretam pVEs capazes de carrear matérias bioativas que interferem diretamente nas funções celulares (ZHAO et al., 2021). No que tange aos estudos das pVEs secretadas pelo TA, nos últimos sete anos, observou-se um aumento expressivo do número de publicações que visavam investigar os papéis dessas nanovesículas em diversas condições (ZHAO et al., 2021). Curiosamente, o maior número de trabalhos se concentra em avaliar os efeitos das pVEs derivadas de células-tronco mesenquimais do TA e apenas cerca de 7% das publicações tem se concentrado em investigar os papéis das pVEs secretadas de maneira geral pelo tecido adiposo (ZHAO et al., 2021), justificando empreender mais esforços para uma melhor compreensão do papel do TA como um todo em condições fisiopatológicas. Com isso, buscamos compreender não só como as moléculas bioativas secretadas pelo TA podem provocar alterações em fibroblastos pulmonares, mas também interrogar os papéis das pVEs isoladas desse tecido na fisiologia dessas células.

Para realizar nossa investigação obtivemos amostras do tecido adiposo visceral de voluntários eutróficos e com obesidade e, a partir delas, por método de ultracentrifugação, obtivemos os meios condicionados livres de VEs e isolamos as pVEsOb desses meios.

Primeiramente, buscamos caracterizar nosso isolado de pVEs do TA de indivíduos com obesidade pelo diâmetro das partículas. Por método de DLS, obtivemos VEs com diâmetro hidrodinâmico de  $126 \pm 8$  nm (Figura 8). Nossos achados estão de acordo com o que a Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares preconiza para a classificação de pVEs (<200 nm) (THÉRY et al., 2018). Jayabalan et al. (2019), investigando o papel dos exossomos do tecido adiposo visceral humano no quadro da diabetes mellitus gestacional, também isolaram por ultracentrifugação pVEs com tamanhos semelhantes aos encontrados em nosso trabalho (~100 nm). Resultado também semelhante aos achados de Patel et al. (2016), que isolaram pVEs de células tronco do tecido adiposo visceral na condição de obesidade com diâmetro  $104 \pm 7$  nm.

Além da técnica de DLS, também buscamos investigar o tamanho dos isolados do TA de indivíduos com obesidade, bem como sua morfologia (Figura 9), e encontramos nanopartículas com diâmetro e forma característicos e semelhantes aos de pVEs isoladas em outros trabalhos que envolveram o isolamento de pVEs do tecido adiposo ou componentes desse órgão (CHEN et al., 2019; JAYABALAN et al., 2019; HOANG et al., 2020; LI et al., 2022a). Ainda, evidenciando o sucesso no isolamento das pVEsOb, não encontramos VEs no MdOb utilizado em experimentos subsequentes (Figura 10D). Esses resultados, em conjunto, demonstram que a técnica empregada para o isolamento das pVEs foi eficaz e estão de acordo com o que a literatura preconiza para as características gerais de pVEs e exossomos, embora não utilizaremos essa última designação nessa pesquisa, por não investigarmos a biogênese das pVEs isoladas para podermos afirmar que são categoricamente exossomos.

Investigamos, inicialmente, se os fibroblastos pulmonares eram capazes de internalizar as pVEsOb e após quatro horas de tratamento, encontramos as pVEsOb localizadas de maneira perinuclear nas células Wi-38 (Figura 10E). Outros trabalhos demonstraram que os fibroblastos são capazes de internalizar as pVEs advindas de células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (HU et al., 2016; LI et al., 2022b; PARVANIYAN et al., 2020; REN et al., 2022), embora os fibroblastos dessas pesquisas tenham sido fibroblastos de origem do tegumento humana. Dessa forma, demonstramos que, assim como os fibroblastos do tegumento, os fibroblastos pulmonares são capazes de internalizar pVEs advindas do TA.

Fibroblastos são conhecidos por serem células dinâmicas e por desempenharem importantes papéis na integridade dos estromas dos locais onde residem (PLIKUS et al., 2021). Além disso, respondem fortemente à diversos estímulos levando à alteração de sua fisiologia (LEBLEU; NEILSON, 2020). Aqui, observamos que os meios depletados e as pVEsOb não alteram a viabilidade celular, no que tange à integridade da membrana plasmática (Figura 11). Interessantemente, foi demonstrado que os adipócitos (KOSMACEK; OBERLEY-DEEGAN, 2020) e células progenitoras de adipócitos (LI et al., 2019; PARVANIAN et al., 2021) podem proteger os fibroblastos submetidos à diferentes condições de estresse, sugerindo que o tecido adiposo é importante nos processos de proteção e manutenção da viabilidade celular dessas células.

Em nosso trabalho, embora tenhamos observado uma tendência de aumento da proliferação nas células tratadas com o MdOb ( $p=0,1637$ ), não observamos diferenças estatisticamente significativas na proliferação de fibroblastos entre os grupos avaliados (Figura 13). Os efeitos dos fatores secretados por células do tecido adiposo sobre fibroblastos foram investigados em outros trabalhos e apresentam resultados conflitantes. Por exemplo, El-Hattab et al. (2020), ao investigarem a interação entre adipócitos e fibroblastos dérmicos também não observaram alterações na proliferação dessas segundas células após serem tratadas com o meio condicionado das primeiras por 48 horas. Yano et al. (2022), por sua vez, só observaram proliferação de fibroblastos dérmicos na concentração de 250  $\mu\text{g/ml}$  de meio condicionado derivado de células tronco mesenquimais do tecido adiposo, e não em concentrações mais elevadas (500 e 1000  $\mu\text{g/ml}$ ). Li et al. (2021), no entanto, observaram que fibroblastos derivados de fibrose cicatricial hipertrófica, quando tratados com o exossomos derivados de células tronco mesenquimais adiposas, diminuía a proliferação quando comparado ao grupo controle. Outros trabalhos que enfocaram no papel das pVEs derivadas de células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo na fisiologia dos fibroblastos, observaram aumento da proliferação dessas células (GUO et al., 2022; LI et al., 2022a). É importante ressaltar que como avaliamos as pVEs derivadas do TA de indivíduos com obesidade, essas pVEs podem advir de diferentes fontes celulares desse tecido. Ademais, as alterações pronunciadas na fisiologia do tecido adiposo no contexto da obesidade podem alterar os conteúdos vesiculares das pVEs, o que poderia levar a diferentes respostas nas células-alvo (KWAN et al., 2021). Por exemplo, já foi observado alterações da

fisiologia celular entre as células-tronco mesenquimais do tecido adiposo de indivíduos eutróficos e com obesidade (LOUWEN et al., 2018; OESTREICH et al., 2020) e, dessa forma, as respostas celulares dos fibroblastos nesses diferentes contextos podem variar.

Alguns trabalhos indicaram aumento da proliferação celular de fibroblastos tratados com meio condicionado de células-tronco derivadas do TA (KIM et al., 2018) ou exossomos derivados dessas células (HOANG et al., 2020) através do ensaio de viabilidade celular por MTT. Aqui, constatamos que os meios condicionados depletados ou pVEsOb não alteram a proliferação celular (Figura 13), embora tenhamos observado alterações significativas no estado metabólico dos fibroblastos tratados em diferentes condições (Figura 12). Chamamos atenção para esse fato, pois importantes críticas são tecidas a respeito do ensaio de MTT acerca do seu real valor para avaliar a proliferação celular, uma vez que nossos dados, assim como de outras pesquisas (RAI et al., 2018; VAN TONDER; JOUBERT; CROMARTY, 2015; WANG; HENNING; HEBER, 2010), demonstramos que, de fato, o ensaio de MTT pode não estar diretamente relacionado com esse parâmetro.

Dado que os sais de MTT são reduzidos a formazan por desidrogenases citosólicas (BERRIDGE; TAN, 1993; LÜ et al., 2012) e principalmente as mitocondriais, como a succinato desidrogenase (RAI et al., 2018), e que essas enzimas são utilizadas nas vias metabólicas celulares, utilizamos o ensaio de MTT em nosso trabalho para verificar a viabilidade metabólica das células, uma vez que este ensaio pode ser utilizado para estimar o estado metabólico (HOOGSTRATEN et al., 2022) e redox celular (RAI et al., 2018). Aqui, encontramos um aumento da viabilidade metabólica em fibroblastos tratados com MdEu após 48 horas de tratamento. Curiosamente, o MdOb apresentou efeito oposto no mesmo tempo. Esses achados podem ser explicados, em parte, pelo possível aumento da biogênese de mitocôndrias nas células, uma vez que esse fato foi associado com o aumento da redução dos sais de MTT em formazan (RAI et al., 2018). A biogênese de mitocôndrias ocorre em respostas a múltiplos fatores e estímulos (JORNAYVAZ; SHULMAN, 2010; POPOV, 2020) e foi demonstrado que indivíduos com obesidade apresentam diminuição da biogênese mitocondrial quando comparado ao grupo eutrófico (HEINONEN et al., 2015). Ademais, fatores solúveis podem promover ou inibir a biogênese mitocondrial. A adiponectina, por exemplo, é uma adipocina que exibe efeitos anti-inflamatórios, está correlacionada com aumento da sensibilidade a insulina e possui sua expressão

diminuída em indivíduos com obesidade, está envolvida no aumento da biogênese mitocondrial (QIAO et al., 2012; CHEN et al., 2022) ou resgate, em parte, desse processo após estresse celular (WANG et al., 2017). Em contrapartida, a resistina, uma adipocina secretada em elevadas quantidades pelo tecido adiposo de indivíduos obesos e que está associada com inflamação sistêmica e resistência à insulina (DEGAWA-YAMAUCHI et al., 2003), foi implicada no comprometimento da biogênese mitocondrial por inibir a via pelo qual o coativador 1-alfa do receptor gama ativado por proliferador de peroxissomo (PGC-1 $\alpha$ ), um coativador transcricional que induz a biogênese mitocondrial (AUSTIN; ST-PIERRE, 2012), medeia esse processo (CHEN et al., 2018). Ademais, a resistina pode induzir a disfunção mitocondrial por induzir fissão mitocondrial anormal (YANG et al., 2023) e a exacerbação desse processo leva a geração de mitocôndrias disfuncionais em fibroblastos fibróticos (GUO et al., 2023). Interessantemente, a repressão da PGC-1 $\alpha$  em fibroblastos pulmonares humanos foi associada a fibrose pulmonar idiopática devido ao aumento da secreção de fatores pró-fibróticos e aumento da expressão de  $\alpha$ -SMA (CAPORARELLO et al., 2019), característica marcante de miofibroblastos. Recentemente, Li et al. (2022c) demonstraram que FACs derivados de carcinoma oral de células escamosas que apresentaram reprogramação metabólica, com desvio da fosforilação oxidativa para a via glicolítica, eram pró-angiogênicos e, mais interessante, apresentaram baixa expressão de PGC-1 $\alpha$ . Quando esse coativador foi superexpresso a capacidade pró-angiogênica, bem como reprogramação metabólica desviada para a via glicolítica, foram prejudicados, demonstrando que PGC-1 $\alpha$  em fibroblastos pode ser um elemento crítico para a progressão tumoral. Em suma, sugere-se que os mediadores solúveis liberados pelos tecidos adiposos de indivíduos magros e com obesidade desencadeiam mecanismos antagônicos relativos ao estado metabólico dos fibroblastos pulmonares. Entretanto, ainda se faz necessário mais investigações sobre os papéis dessas adipocinas em fibroblastos pulmonares e seus reais papéis na fisiologia mitocondrial.

Em relação às pVEs, curiosamente, células Wi-38 tratadas com pVEsOb tiveram alterações metabólicas pronunciadas 24 e 48 horas após o tratamento, ocorrendo diminuição do estado metabólico, quando comparado com todos os grupos, incluindo MdOb. Esse fato nos motivou a investigar possíveis alterações no  $\Delta\Psi_m$  dessas células, dado que as mitocôndrias são sensíveis à perda de  $\Delta\Psi_m$  (LERNER; SUNDAR; RAHMAN, 2016) e perturbações prolongadas desse status podem trazer

consequências patológicas (ZOROVA et al., 2018). Nossos achados demonstram que as pVEsOb não estão implicados em alterações transitórias prolongadas do  $\Delta\Psi_m$  (Figura 14), sugerindo que a diminuição da viabilidade metabólica não está relacionada a alterações no potencial de membrana das mitocôndrias dessas células. Importante ressaltar que em outras condições de distúrbios relacionados a mitocôndria, o  $\Delta\Psi_m$  permaneceu inalterado (ABRAMOV et al., 2010; BIRD et al., 2014; ZHDANOV et al., 2017) e esse fato pode estar relacionado à manutenção do  $\Delta\Psi_m$  via atividade reversa da ATP sintase (HONG; PEDERSEN, 2008; ZHDANOV et al., 2017) que visa atenuar a despolarização mitocondrial e apoptose induzida por estresse (ACIN-PEREZ et al., 2023).

Dado ao fato de que as pVEs carregam moléculas bioativas, não podemos excluir o fato de que miRs, que são pequenos RNAs não codificantes que regulam a expressão gênica a nível pós-transcricional (KIM; KIM, 2021), possam contribuir para alterações metabólicas aqui encontradas. No que tange, por exemplo, a biogênese de mitocôndrias, bem como o papel de PGC1- $\alpha$  nesse processo, miRs diferencialmente expressos na obesidade podem estar envolvidos em alterações do funcionamento mitocondrial, estado metabólico das células e estado de ativação de fibroblastos. Por exemplo, Ferrante et al. (2015) demonstram que exossomos derivados do tecido adiposo na condição de obesidade carregam maiores quantidade de miR-23b, quando comparado a indivíduos magros. Interessantemente, esse miR foi o responsável por suprimir a expressão pós-transcricional de PGC1- $\alpha$  em células de osteosarcoma, favorecendo o “efeito Warburg” e a proliferação dessas células (ZHU; LI; MA, 2019). O miR-34a, que também é altamente expresso em exossomos secretados por adipócitos no contexto da obesidade (PAN et al., 2019), foi relacionado com disfunção mitocondrial em células endoteliais da retina humana, por também estar relacionado com a diminuição da expressão de PGC1- $\alpha$  (THOUNAOJAM et al., 2019). Interessantemente, o miR-34a foi implicado na ativação exacerbada de fibroblastos em diferentes órgãos, tendo como consequências o agravamento de processos fibróticos no fígado, coração, rins e pulmões (ZHAO et al., 2022). Adicionalmente, o miR-155, que é superexpresso nos exossomos derivados de macrófagos tecido adiposo na condição de obesidade (YING et al., 2017) e superexpresso no tecido adiposo de indivíduos com obesidade (KARKENI et al., 2016), foi implicado na diminuição da expressão de PGC1- $\alpha$  por adipócitos (KARKENI et al., 2016), e assim como miR-34a, miR-155 também já foi apontado como responsável por levar a

ativação de fibroblastos, com consequente piora em quadros de fibrose devido a deposição de MEC de forma exacerbada por essas células (EISSA; ARTLETT, 2019). Não obstante, não podemos descartar a hipótese de que outros miRs tenham como alvos outras moléculas associadas ao metabolismo celular e que possam ter impactado diretamente a viabilidade metabólica dos fibroblastos pulmonares tratados com pVEsOb. Por exemplo, a succinato desidrogenase pode ter suas subunidades como alvos de miR (MORENO et al., 2020), como o miR-210, que foi relatado anteriormente elevado na fração exossomal circulante de indivíduos com obesidade e diabetes tipo II (CHEN et al., 2022a) e como elemento chave na patogenicidade da obesidade relacionada a diabetes (TIAN et al., 2020). Em conjunto, sugere-se que os miRs carregados pelas pVEsOb podem estar desempenhando papéis centrais nas alterações metabólicas dos fibroblastos pulmonares, embora qual ou quais miRs estejam envolvidos nesse processo, bem como as vias de sinalização envolvidas, ainda permanecem a serem melhor elucidados.

Além dos impactos no metabolismo, evidenciamos aqui que fibroblastos pulmonares tratados com MdEu foram capazes de formar muito mais colônias que aqueles não tratados ou tratados com MdOb. Interessantemente, foi reportado anteriormente que células Wi-38, mesma linhagem utilizada em nosso trabalho, não foram capazes de formar colônias após 14 dias de plaqueamento (ALT et al., 2011), tempo semelhante ao executado aqui. Notamos ainda que células tratadas com MdEu produziram mais colônias que as células não tratadas ou tratadas com MdOb, sugerindo que os fatores solúveis de MdEu são responsáveis pela manutenção de um perfil proliferativo a longo prazo dos fibroblastos.

Dado ao fato que os fibroblastos são importantes componentes do estroma responsáveis pela cicatrização (DESJARDINS-PARK; FOSTER; LONGAKER, 2018), indagamos se os meios depletados, bem como as pVEsOb impactariam no fechamento do *gap* pelos fibroblastos pulmonares no ensaio de cicatrização de feridas *in vitro*. Aqui, observamos que o MdEu, mas não o MdOb ou pVEsOb, favoreceu o fechamento do *gap* pelos fibroblastos pulmonares mais rapidamente, após 24 horas de tratamento (Figura 16). Outros trabalhos que visavam observar o potencial do meio condicionado derivado de adipócitos (EL-HATTAB et al., 2020), meio condicionado de células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (KIM et al., 2007; STESSUK et al., 2016) ou de exossomos derivados dessas últimas células (HU et al., 2016; GUO et al., 2022; LI et al., 2022a) no fechamento de feridas *in vitro* por

fibroblastos, mostraram aumento da migração dessas células e fechamento de arranhaduras de forma mais veloz. Nossos resultados, assim como os observados em outros trabalhos, podem estar atrelados ao fato de o meio condicionado derivado do tecido adiposo eutrófico, bem como biomoléculas dos exossomos, possuírem uma série de fatores solúveis, como fatores de crescimento, citocinas e componentes da MEC (LÓPEZ et al., 2018; EL-HATTAB et al., 2020) que desencadeiam respostas celulares que aumentam a motilidade. Dessa forma, a ativação dos fibroblastos para o fenótipo de miofibroblastos pelos fatores solúveis, poderia justificar a maior migração coletiva dos fibroblastos (D'URSO; KURNIAWAN, 2020) que aqui observados, uma vez que já foi relatado anteriormente que o meio condicionado de adipócitos é responsável pelo aumento da expressão de  $\alpha$ -SMA em fibroblastos e aumento da velocidade fechamento do risco *in vitro* (EL-HATTAB et al., 2020). Ademais, a expressão de  $\alpha$ -SMA em fibroblastos pulmonares é um fator importante, embora não único, para a promoção da migração celular (ASANO et al., 2017). Ainda, fibroblastos da fibrose pulmonar idiopática, que expressam elevadas quantidade  $\alpha$ -SMA, também são descritos como tendo maior capacidade de migração (EPSTEIN SHOCHET et al., 2017). Entretanto, é necessário ter cautela nessa suposição, uma vez que foi relatado que a expressão de  $\alpha$ -SMA por miofibroblastos foi relacionada com a diminuição da capacidade migratória de FACs (RØNNOV-JESSEN; PETERSEN, 1996). Em acordo com esse fato, Desai, Hsia e Schwarzbauer (2014) notaram que células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo que desenvolveram o fenótipo de miofibroblastos com aumento de expressão de  $\alpha$ -SMA, diminuíram a capacidade migratória. Ademais, um trabalho anterior (LI et al., 2022a) demonstrou que os exossomos derivados de células tronco mesenquimais adiposas aumentavam a migração de fibroblastos, embora levaram a diminuição da expressam de  $\alpha$ -SMA por essas células. Os mecanismos que levaram o aumento da atividade migratória não foram elucidados pelos autores (LI et al., 2022a) e, assim como em nosso trabalho, permanecem por serem melhor esclarecidos. Nossos dados de migração são particularmente interessantes na medida que os efeitos positivos no meio condicionado ou das pVEs na cicatrização de feridas *in vitro* observados aqui e em outros trabalhos, não foram preservados na condição obesa. Mais interessante, é o fato de as células Wi-38 tratadas com MdOb estavam em um ambiente altamente concentrado com citocinas pró-inflamatórias, com a IL-1 $\beta$  (Figura 17) , que já foi descrita anteriormente por favorecer a migração de fibroblastos pulmonares no ensaio

de cicatrização (GABASA et al., 2020). Interessantemente, é bem estabelecido que a obesidade afeta diretamente a cicatrização de feridas, retardando esse processo (HOLCOMB et al., 2009; WAGNER et al., 2012; ALMA et al., 2023). Além disso, em modelo murino, o atraso da cicatrização de feridas cutâneas foi relacionada com o atraso da diferenciação de miofibroblastos em animais obesos devido ao papel das citocinas pró-inflamatórias derivadas do tecido adiposo na obesidade (NASCIMENTO; COSTA, 2006). Em nosso trabalho podemos observar que MdOb foi rico em fatores solúveis pró-inflamatórios, como IL-6, IL-1 $\beta$ , MIF, TNF- $\alpha$  e CCL5/RANTES (Figura 17) o que permitiu a manutenção de um ambiente pró-inflamatório nos poços onde os fibroblastos pulmonares foram semeados. Dessa maneira, sugerimos que os fatores solúveis, em conjunto, e as pVEs do tecido adiposo de indivíduos obesos podem impactar na migração coletiva dessas células, além de afetar o estado metabólico, como indicamos anteriormente. Dessa forma, tal condição pró-inflamatória pode ter contribuído para as diferenças de comportamento observadas em fibroblastos tratados com MdEu e MdOb.

Fibroblastos são células que respondem a diversos estímulos pró-inflamatórios e ampliam a inflamação e resposta fibrótica no estroma em condições patológicas (WEI; NGUYEN; BRENNER, 2021). Desse modo, investigamos aqui se os fatores solúveis derivados do TA de indivíduos com obesidade, bem como as pVEsOb poderiam induzir ao aumento de fatores pró-inflamatórios e angiogênicos, e encontramos aumento de alguns desses fatores, como IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , MIF, RANTES/CCL5 e Ang1 (Figura 17) no sobrenadante de fibroblastos tratados com o MdOb e não com MdEu. O aumento desses fatores no sobrenadante dos fibroblastos pode ser devido aos estímulos pró-inflamatórios encontrados no MdOb. Por exemplo, MIF, uma potente citocina pró-inflamatória, foi implicado no aumento da expressão e secreção de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 por fibroblastos (ZHANG et al., 2021). A IL-1 $\beta$  pode levar ao aumento da produção de mediadores inflamatórios, como IL-6, IL-8 e GM-CSF por fibroblastos pulmonares (OSEI et al., 2020). Outra citocina pró-inflamatória amplamente secretada pelo tecido adiposo de indivíduos com obesidade, o TNF- $\alpha$ , está associado a inflamação intersticial e fibrose por ativação da sinalização de NF- $\kappa$ B (HTWE et al., 2015; HOU et al., 2018), induzir a expressão de TGF- $\beta$  e MMP9 por fibroblastos pulmonares de camundongos (SULLIVAN et al., 2009), induzir a expressão e secreção de MIF por fibroblastos da cápsula articular (ZHANG et al., 2021), induzir a secreção de IL-8 por fibroblastos pulmonares (DRAKE et al., 2023),

aumentar a produção de IL-6 por fibroblastos duodenais (PANG et al., 2008), cardíacos (TURNER et al., 2007) e pulmonares (KLEE et al., 2016; DRAKE et al., 2023). Ademais, a IL-6, outra citocina altamente secretada no tecido adiposo de indivíduos com obesidade, também favoreceu a ação inflamatória de fibroblastos por estimular a produção de TGF- $\beta$  por essas células (MA et al., 2012). Ademais, a IL-6 (VAN LINTHOUT; MITEVA; TSCHOPE, 2014) e o TNF- $\alpha$  (DRAKE et al., 2023) podem induzir fibroblastos a produzirem e secretarem quimiocinas, como CCL5/RANTES. Além do mais, não podemos desconsiderar também que a ação conjunta dessas múltiplas citocinas pró-inflamatórias derivadas do tecido adiposo na condição de obesidade, conforme aqui observamos, possam exercer atividades sinérgicas e/ou antagônicas em fibroblastos, aumentando ainda mais a complexidade dessa rede de comunicação. Por exemplo, já foi bem descrito a algum tempo que o TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , de maneira sinérgica, aumentam a produção de IL-6 por fibroblastos pulmonares (ELIAS; LENTZ, 1990; NG; TAN; GUY, 1994). Além disso, essas duas citocinas, também de forma sinérgica, aumentam a produção de GM-CSF por fibroblastos pulmonares, levando a inflamação exacerbada (FITZGERALD et al., 2003). Outra citocina encontrada em níveis elevados em indivíduos com obesidade, a IL-17 (CHEHIMI; VIDAL; ELJAAFARI, 2017), sinergicamente com o TNF- $\alpha$ , aumenta a produção de IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  e G-CSF por fibroblastos (KATZ; NADIV; BEER, 2001; NGUYEN et al., 2017). Em contrapartida, o tratamento de fibroblastos pulmonares com TGF- $\beta$  e IL-1 $\beta$  diminuiu a expressão de  $\alpha$ -SMA, e do oncogene homólogo associado ao glioma 1 (*GLI1* - um ativador de fibroblastos em miofibroblastos) e *COL1A1* (MIA; BOERSEMA; BANK, 2014). Entretanto, esse mesmo grupo avaliou que essas citocinas, de modo sinérgico, aumentaram a expressam das MMPs 1 e 9. Interessantemente, MMP-9 secretada por fibroblastos pulmonares contribui para a fibrose na fibrose pulmonar idiopática (PARDO et al., 2016). Ademais, FACs secretores de MMP-1 favorecem a degradação da MEC e angiogênese no câncer de mama, favorecendo a gênese da doença metastática (MANNELLO, 2011).

Aqui, também investigamos se as diferentes condições de tratamento poderiam influenciar o aumento da secreção de TGF- $\beta$ , visto que outros fatores pró-inflamatórios que aqui observamos, podem levar ao aumento da secreção dessa citocina pró-inflamatória e pró-fibrótica. Observamos uma tendência de aumento dos níveis de TGF- $\beta$  em fibroblastos tratados com MdOb (Figura 17F), embora não tenham sido estatisticamente significativos ( $p=0,1435$ ), quando comparado com o grupo NT. Dessa

forma, nossos resultados parecem paradoxais, visto que em outros trabalhos, citocinas como IL-6 (MA et al., 2012) e TNF- $\alpha$  (SULLIVAN et al., 2009) foram relatadas como fortes indutores da produção de TGF- $\beta$  por fibroblastos. Dessa forma, não podemos descartar que outros fatores solúveis secretados pelo tecido adiposo de indivíduos com obesidade, bem como fatores intrínsecos dos fibroblastos pulmonares, possam estar em jogo e sendo determinantes para nossos achados. Por exemplo, foi demonstrado anteriormente que o interferon gama (IFN- $\gamma$ ) é altamente expresso e secretado no TA de indivíduos com obesidade (BRADLEY et al., 2022; HUANG et al., 2022) e essa citocina pró-inflamatória já foi descrita anteriormente por inibir a secreção de TGF- $\beta$  em fibroblastos pulmonares através da regulação positiva de Smad7 (HUANG et al., 2002). Além disso, Smad7 bloqueia a via de ativação do TGF- $\beta$  e inibe a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos (VU et al., 2019; CHANG et al., 2021). Logo, é importante verificar de forma ainda mais profunda como essa coletânea de fatores pró-inflamatórios são responsáveis por alterar a biologia dos fibroblastos, afim de consolidar ainda mais o papel do tecido adiposo na condição de obesidade, com um todo, na modulação de respostas estromais em diferentes fisiopatologias.

É importante considerarmos que não podemos descartar a hipótese de que os níveis de mediadores solúveis pró-inflamatórias encontrados nos poços de fibroblastos semeados em conjunto com o MdOb estejam de fato mais elevados por causa do nosso tratamento, o que configura um viés em nosso trabalho. Todavia, é importante frisar que muitas citocinas, como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  possuem meia vida curta, são sensíveis a temperatura e com isso são rapidamente degradadas (SIMPSON et al., 2020; LIU et al., 2021). Dessa forma, não podemos desconsiderar também a possibilidade que MdOb inflamatório estar, de fato, ativando os fibroblastos, levando a manutenção do ambiente inflamatório observado *in vitro* em nossa pesquisa.

No que diz respeito às pVEsOb, observamos que essas nanoestruturas não foram capazes de aumentar a secreção dos fatores pró-inflamatórios, como IL-1 $\beta$ , IL-6, MIF e TGF- $\beta$ . Curiosamente, pVEsOb induziram os fibroblastos pulmonares a secretarem elevadas quantidades de angiopoietina 1 (Ang1), 24 e 48 horas após o tratamento. Além disso, também encontramos elevadas concentrações dessa glicoproteína em fibroblastos pulmonares cultivados com MdOb e não em MdEu, também em 24 e 48 horas após o tratamento. Ang1 é expressa e secretada por diversos tipos celulares, como fibroblastos, e que atua se ligando ao seu receptor Tie2 que também é expresso por vários tipos celulares, como células endoteliais,

neutrófilos (STURN et al., 2005; BURNETT et al., 2017), eosinófilos (AKWII; MIKELIS, 2021) monócitos (SEOK et al., 2013) e fibroblastos (BRUNCKHORST et al., 2014). Além de Tie2, foi demonstrado anteriormente que Ang1 também podem-se ligar a integrinas, como  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 3$  e  $\alpha v\beta 5$  (BRINDLE; SAHARINEN; ALITALO, 2006). Ang1 está envolvida na manutenção da integridade e estabilidade do endotélio dos vasos sanguíneos, além de estar envolvida em processos de remodelação, angiogênese (ISIDORI; VENNERI; FIORE, 2016) e diminuição do aumento da permeabilidade vascular. Ademais, Ang1 foi descrita anteriormente como um importante fator em respostas anti-inflamatórias (ECHAVARRIA et al., 2015; ISIDORI; VENNERI; FIORE, 2016). Ang1 demonstrou ter efeitos benéficos em condições patológicas, como isquemia, diabetes (ISIDORI; VENNERI; FIORE, 2016), sepse (LELIGDOWICZ et al., 2018) e malária cerebral (HIGGINS et al., 2016). Entretanto, o papel da Ang1 nas respostas anti-inflamatórias tem limitações, uma vez que, células não endoteliais que também expressam receptores para Ang1, podem exibir respostas pró-inflamatórias ou patogênicas e, dessa forma, estarem relacionadas com a fisiopatologia em condições cancerosas ou não. Por exemplo, monócitos também expressam Tie2, que ao se ligar a Ang1, estimulam essas células a expressarem e secretarem TNF- $\alpha$ , secretarem IL-6, além de induzirem a diferenciação dessas células ao perfil M1 pró-inflamatório (SEOK et al., 2013). Ademais, foi demonstrado recentemente que Ang1 possui efeito pró-aterogênico por diminuir o efluxo de colesterol em macrófagos, polarizar macrófagos para o perfil M1, levando ao aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias por essas células, acarretando, por fim, em inflamação vascular (OU et al., 2020). Ang1 induziu a translocação epitelial de P-selectina em células endoteliais, aumentando dessa maneira a adesão de neutrófilos. Ademais, Ang1 levou a ativação de neutrófilos, que passaram a secretar elevadas quantidades de fator ativador de plaquetas (PAF), que contribuiu ainda mais para o aumento da adesão de neutrófilos ao endotélio (LEMIEUX et al., 2005). Ang1 também promoveu o aumento da viabilidade de neutrófilos, que, de maneira sinérgica com PAF, aumentou ainda mais esse parâmetro (DUMAS et al., 2012). Ademais, Ang1 foi responsável por aumentar a migração de neutrófilos por efeito direto nessas células e através da ativação e liberação de CCL4 por macrófagos peritoneais, sugerindo direcionamento de resposta inflamatória (BURNETT et al., 2017). Ang1 também levou ao aumento de expressão e secreção da IL-8 em neutrófilos humanos, ampliando ainda mais a visão de que essa glicoproteína induz respostas inflamatórias nesses

granulócitos (NEAGOE et al., 2012). Por fim, Ang1 induziu NETose em neutrófilos humanos, que aumentam a adesão em células endoteliais e podem induzir atividade pró-angiogênica (LAVOIE et al., 2018). Esses dados suportam a ideia que que neutrófilos, ativados por Ang1, podem exibir atividades pró-inflamatórias (NEAGOE et al., 2012). Em pacientes com hipertensão pulmonar idiopática, foi relatado que a via Tie2/Ang1 encontra-se alterada, uma vez que Ang1 levou a células endoteliais pulmonares a secretarem fatores que estão envolvidos na contração e remodelação dos vasos sanguíneos, levando a hiperplasia de músculos lisos, sugerindo agravamento na hipertensão pulmonar (DEWACHTER et al., 2006). Na artrite reumatoide, os fibroblastos sinoviais, em resposta ao TNF- $\alpha$ , secretam ativamente Ang1, contribuindo para a angiogênese nesta patologia (GRAVALLESE, 2003). Essa regulação positiva de Ang1 em fibroblastos sinoviais da artrite reumatoide é decorrente da indução da via de sinalização NF- $\kappa$ B ativada pelo TNF- $\alpha$  nessas células (SCOTT et al., 2005). Além disso, Ang1 foi implicada na destruição das articulações na artrite reumatoide, por ativação da via de sinalização NF- $\kappa$ B das células sinoviais e indução da secreção de MMP3 (HASHIRAMOTO et al., 2007). No contexto do câncer, o papel da Ang1 na promoção ou inibição do tumor parece depender do tipo de neoplasia (FAGIANI; CHRISTOFORI, 2013; NONG et al., 2021). No câncer cervical, Ang1 favorece a migração e invasão das células tumorais. Além disso, a regulação negativa desse fator foi responsável pela diminuição *in vivo* do crescimento tumoral (YANG et al., 2017). No câncer ovariano, as angiopoietinas, como a Ang1, são expressas pelas células neoplásicas e favorecem o desenvolvimento tumoral. Nesse estudo, em modelo murino, animais cujos tumores possuíam células que expressavam Ang1 tinham sobrevida menor, aumento da angiogênese tumoral e acúmulo de FACs no tumor (BRUNCKHORST et al., 2014). No câncer hepático foi sugerido que as angiopoietinas, dentre elas a Ang1, estão envolvidas na formação de tubos de células endoteliais *in vitro* e angiogênese *in vivo* (DONG et al., 2022). Ademais, Ang1 foi implicada na proliferação, migração e invasão de células endoteliais no carcinoma hepatocelular (DONG et al., 2021). Ang1 foi implicada no aumento de metástases pulmonares, por induzir o alargamento dos vasos no tumor e tecidos normais, mesmo em células tumorais pouco metastáticas (HOLOPAINEN et al., 2009). No câncer de mama, o papel da Ang1 na promoção ou inibição tumoral permanece controverso. Há algum tempo, Hayes et al. (2000) observaram que a superexpressão de Ang1 em células tumorais levou a diminuição do tamanho do

tumor mamário. Ademais, em um outro trabalho que utilizou camundongos nocautes para Ang1 e que desenvolviam tumores de mamas espontâneos, foi demonstrado que a falta de Ang1 levou a maior número de metástases pulmonares, sugerindo que em modelo murino, a manutenção da integridade vascular promovida por Ang1 é importante para diminuir as metástases (MICHAEL et al., 2017). Em contrapartida, recentemente, Liu et al. (2023) mostraram que no câncer de mama triplo-negativo os níveis elevados de Ang1 foram relacionados a menor sobrevida de pacientes para esse tumor, além de promover a proliferação e a sobrevivência das células triplo-negativas, por regular positivamente carboxipeptidase A4 (CPA4). Ademais, foi demonstrado que a expressão de *ANGPT1*, gene que codifica a proteína Ang1, por células malignas mamárias como a MDA-MB-231, é importante na promoção da angiogênese no câncer de mama (FLORES-PÉREZ et al., 2016). Ademais, em células tumorais mamárias MCF-7, o *knockdown* de Ang1 inibiu a proliferação e migração dessas células, enquanto que a superexpressão de Ang1 resgatou esses parâmetros. Ademais, a supressão de Ang1 em células MCF-7 inibiu a formação de tubos por células HUVEC, indicando que Ang1 tumoral é importante para a formação de vasos sanguíneos no tumor (LIANG et al., 2018). De maneira adicional, *BRCA1*, um importante gene supressor tumoral, inibe, em nível transcricional Ang1. Tumores mamários deficientes em *BRCA1* possuem regulação positiva de *ANGPT1*, vascularização proeminente e crescimento tumoral acelerado.

Nossos achados aqui são importantes, pois demonstramos, até onde sabemos, pela primeira vez, que as pVEsOb induzem os fibroblastos pulmonares humanos a secretarem uma quantidade elevada Ang1 *in vitro*. Entretanto, são necessárias investigações adicionais para revelarem as reais implicações biológicas desses achados, pois como apontamos acima, Ang1 pode mediar diversos e importantes processos em diferentes tipos celulares e isso poderia auxiliar na compreensão de como as pVEsOb podem contribuir para diferentes fisiopatologias no contexto da obesidade, dentre elas a progressão do câncer. Ademais, ainda é necessário elucidar de que maneiras as pVEsOb induziram os fibroblastos pulmonares a secretarem Ang1.

Além da Ang1, buscamos investigar se os fatores solúveis do tecido adiposo, bem como as pVEsOb poderiam aumentar a secreção de outro fator pró-angiogênico importante para a metástase tumoral e formação dos NPMs, o VEGF. Nossos dados demonstram que nem MdEu, MdOb ou pVEsObs, foram importantes para aumentar a

produção VEGF por fibroblastos pulmonares nas condições estudadas. Nossos achados aqui são paradoxais, visto que, conforme mostramos anteriormente, encontramos níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 (NAGASAKI et al., 2014; MIRKESHAVARZ et al., 2017) e IL-1 $\beta$  (RISTIMÄKI et al., 1998; XI et al., 2011; DONG et al., 2018), que já foram descritas anteriormente como indutoras da expressão e secreção de VEGF. Dessa forma, assim como no TGF- $\beta$ , consideramos que outros fatores solúveis no MdOb podem estar interferindo nessas respostas, como o IFN- $\gamma$ , que foi relacionado com a diminuição da secreção de VEGF por fibroblastos (KOMMINENI et al., 2008; LU et al., 2009).

Além do mais, investigamos a expressão de marcadores de ativação de fibroblastos associados ao câncer (CHOI et al., 2013), como *S100A4* e *CCL2*. Não encontramos aumento da expressão de ambos os genes, embora tenhamos encontrado uma tendência de aumento de *CCL2* ( $p=0,1323$ ) pelos fibroblastos tratados com pVEsOb (Figura 18). A expressão de *S100A4* é principalmente estimulada por TGF- $\beta$  (TOMCIK et al., 2015; FEI et al., 2017) e em nosso trabalho não verificamos aumento significativo dessa citocina em nenhum dos tratamentos avaliados, justificando, dessa forma, não termos encontrado aumento da expressão desse gene. Em contrapartida a *CCL2* é supra regulado em fibroblastos pela ação de citocinas pró-inflamatórias que aqui encontramos, como IL-6 (VALIN et al., 2020) e TNF- $\alpha$  (TSOU et al., 2012; VALIN et al., 2020). Esse fato nos faz levantar questionamentos acerca de como os múltiplos fatores solúveis podem estar interagindo e levando a regulação da expressão e tradução gênica. Em suma, reforçamos o fato de que são necessárias mais pesquisas que enfoquem na atuação dos múltiplos fatores secretados pelo TA de indivíduos com obesidade, em conjunto, na modulação de fibroblastos pulmonares, bem como as respostas moleculares subjacentes para melhor compreender o papel biológico dessas células no contexto da obesidade e fisiopatologias associadas a ela.

Por fim, buscamos compreender se os fibroblastos pulmonares tratados em diferentes condições poderiam aumentar a migração das células tumorais triplo negativas, MDA-MB-231, afim de observar se, no contexto da obesidade, fibroblastos pulmonares expostos aos fatores solúveis do TA de indivíduos com obesidade, bem como pVEsOb, aumentariam a migração *in vitro* das células tumorais, o que poderia sugerir o papel dessas células estromais, no contexto da obesidade, no impulsionamento de metástases. Aqui, não verificamos aumento da migração das

células cancerosas em nenhuma das condições analisadas, sugerindo que os fibroblastos pulmonares, no contexto da obesidade, por si só, e *in vitro*, não são capazes de aumentar a capacidade migratória as células tumorais. Curiosamente, outros trabalhos demonstram que o meio condicionado ou exossomos do tecido adiposo (NOWICKA et al., 2013), adipócitos (KO et al., 2019; BELLANGER et al., 2021) células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (LIN; WANG; ZHAO, 2013; PREISNER et al., 2018; YUAN et al., 2021) promovem o aumento da migração de células tumorais em diferentes tipos de câncer, como o de ovário (NOWICKA et al., 2013), melanoma (PREISNER et al., 2018; KO et al., 2019), colorretal (KO et al., 2019), dermatofibrosarcoma protuberans (YUAN et al., 2021) e mama (LIN; WANG; ZHAO, 2013; BELLANGER et al., 2021). As diferenças observadas podem ser relacionadas com as diferentes metodologias empregadas, bem como número de células semeadas no topo da câmara Transwell e tempo de cultivo. Embora não foram observadas alterações na migração das células tumorais, não podemos desconsiderar a hipótese de que esses fibroblastos pulmonares, no contexto da obesidade, poderiam impulsionar a migração e ativação de células imunes, por exemplo, e favorecer, de fato, a geração de um nicho pré-metastático efetivo. Isso porque múltiplos fatores inflamatórios, como aqui observamos, são quimioatraentes e ativadores de leucócitos, que poderiam conferir alterações estromais e potencializar aumento da migração das células tumorais (KITAMURA; QIAN; POLLARD, 2015; LI; WEN; LIN, 2020). Dessa forma, investigações adicionais sobre o impacto da inflamação de baixo grau crônica na obesidade sobre os fibroblastos pulmonares, atrelada a quimiotaxia e ativação de leucócitos podem ser importantes para desvendar a interação TA-estroma pulmonar-células cancerosas.

É importante destacar que nosso estudo possui algumas limitações. Devido à escassez de TA de indivíduos eutróficos, não fomos capazes de comparar as respostas induzidas por pVEsOb e àquelas que poderiam ou não serem induzidas por pVEs do TA de indivíduos eutróficos. Além do mais, encontramos um aumento estatisticamente significativo entre as idades de indivíduos magros e com obesidade, e já foi demonstrado que o tecido adiposo em indivíduos mais velhos pode sofrer alterações em sua fisiologia (OU et al., 2022), o que pode ser caracterizado como um viés. Por fim, como ressaltamos anteriormente, não podemos desconsiderar também que os altos níveis de fatores solúveis pró-inflamatórias no sobrenadante dos

fibroblastos pulmonares sejam decorrentes apenas do nosso tratamento, embora sugerimos ação complementar dos fibroblastos.

## **7 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Em nosso trabalho, demonstramos que os fibroblastos pulmonares podem exibir alterações funcionais quando expostos ao Md de indivíduos com obesidade e eutróficos. Além disso, demonstramos que pVEsOb derivadas por TA de indivíduos com obesidade podem ser internalizadas pelos fibroblastos pulmonares, levando a possíveis alterações metabólicas e aumento da secreção de Ang1. Por fim, não observamos alteração da migração das células tumorais triplo-negativas MD-MB-231 pelo ensaio de Transwell. Entretanto, mais investigações são necessárias para verificar se a comunicação endócrina entre o TA na condição de obesidade e fibroblastos pode ser importante para outras fisiopatologias do sistema respiratório, bem como para a quimioatração e ativação de leucócitos que, em conjunto, podem potencializar respostas pró-metastáticas no câncer de mama, visto que a inflamação de baixo grau crônica na obesidade pode afetar a progressão tumoral e levar a piores desfechos clínicos na obesidade.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELLA, V. et al. Leptin in the interplay of inflammation, metabolism and immune system disorders. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 13, n. 2, p. 100–109, 5 fev. 2017.
- ABHANGE, K. et al. Small extracellular vesicles in cancer. **Bioactive Materials**, v. 6, n. 11, p. 3705–3743, nov. 2021.
- ABRAMOV, A. Y. et al. Mechanism of neurodegeneration of neurons with mitochondrial DNA mutations. **Brain**, v. 133, n. 3, p. 797–807, 1 mar. 2010.
- ACIN-PEREZ, R. et al. Inhibition of  $\text{ATP}$  synthase reverse activity restores energy homeostasis in mitochondrial pathologies. **The EMBO Journal**, 13 mar. 2023.
- AGUADO, B. A. et al. Engineering the pre-metastatic niche. **Nature Biomedical Engineering**, v. 1, n. 6, p. 0077, 13 jun. 2017.
- AKWII, R. G.; MIKELIS, C. M. Targeting the Angiotensin/Tie Pathway: Prospects for Treatment of Retinal and Respiratory Disorders. **Drugs**, v. 81, n. 15, p. 1731–1749, 29 out. 2021.
- ALKASALIAS, T. et al. Fibroblasts in the Tumor Microenvironment: Shield or Spear? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 5, p. 1532, 21 maio 2018.
- ALMA, A. et al. Obesity and Wound Healing: Focus on Mesenchymal Stem Cells. **Life**, v. 13, n. 3, p. 717, 6 mar. 2023.
- ALMANSOUR, N. M. Triple-Negative Breast Cancer: A Brief Review About Epidemiology, Risk Factors, Signaling Pathways, Treatment and Role of Artificial Intelligence. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 9, 25 jan. 2022.
- ALT, E. et al. Fibroblasts share mesenchymal phenotypes with stem cells, but lack their differentiation and colony-forming potential. **Biology of the Cell**, v. 103, n. 4, p. 197–208, abr. 2011.
- ARBEX, A. K. et al. Obesity epidemic in Brazil and Argentina: a public health concern. **Journal of health, population, and nutrition**, v. 32, n. 2, p. 327–34, jun. 2014.
- ASANO, S. et al. Matrix stiffness regulates migration of human lung fibroblasts. **Physiological Reports**, v. 5, n. 9, p. e13281, maio 2017.
- AUSTIN, S.; ST-PIERRE, J. PGC1 $\alpha$  and mitochondrial metabolism – emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders. **Journal of Cell Science**, v. 125, n. 21, p. 4963–4971, 1 nov. 2012.
- AVGUSTINOVA, A. et al. Tumour cell-derived Wnt7a recruits and activates fibroblasts to promote tumour aggressiveness. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 10305, 18 abr. 2016.
- BALABAN, S. et al. Adipocyte lipolysis links obesity to breast cancer growth: adipocyte-derived fatty acids drive breast cancer cell proliferation and migration. **Cancer & Metabolism**, v. 5, n. 1, p. 1, 13 dez. 2017.
- BARONE, I. et al. The weight of obesity in breast cancer progression and metastasis:

Clinical and molecular perspectives. **Seminars in Cancer Biology**, v. 60, p. 274–284, fev. 2020.

BAUM, J.; DUFFY, H. S. Fibroblasts and Myofibroblasts: What Are We Talking About? **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 57, n. 4, p. 376–379, abr. 2011.

BELLANGER, D. et al. Adipocytes Promote Breast Cancer Cell Survival and Migration through Autophagy Activation. **Cancers**, v. 13, n. 15, p. 3917, 3 ago. 2021.

BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S. Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 303, n. 2, p. 474–482, jun. 1993.

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, 17 nov. 2016.

BIRD, M. J. et al. Neuronal and astrocyte dysfunction diverges from embryonic fibroblasts in the *Ndufs4<sup>fky/fky</sup>* mouse. **Bioscience Reports**, v. 34, n. 6, 1 dez. 2014.

BRADLEY, D. et al. Interferon gamma mediates the reduction of adipose tissue regulatory T cells in human obesity. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 5606, 24 set. 2022.

BREMNES, R. M. et al. The Role of Tumor Stroma in Cancer Progression and Prognosis: Emphasis on Carcinoma-Associated Fibroblasts and Non-small Cell Lung Cancer. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 6, n. 1, p. 209–217, jan. 2011.

BRINDLE, N. P. J.; SAHARINEN, P.; ALITALO, K. Signaling and Functions of Angiotensin-1 in Vascular Protection. **Circulation Research**, v. 98, n. 8, p. 1014–1023, 28 abr. 2006.

BRUNCKHORST, M. K. et al. Angiotensins Promote Ovarian Cancer Progression by Establishing a Procarcinogenic Microenvironment. **The American Journal of Pathology**, v. 184, n. 8, p. 2285–2296, ago. 2014.

BÖRGESON, E.; BOUCHER, J.; HAGBERG, C. E. Of mice and men: Pinpointing species differences in adipose tissue biology. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 10, 15 set. 2022.

BURNETT, A. et al. Angiotensin-1 enhances neutrophil chemotaxis in vitro and migration in vivo through interaction with CD18 and release of CCL4. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 2332, 24 maio 2017.

CAMPOS, A. et al. Caveolin-1-containing extracellular vesicles transport adhesion proteins and promote malignancy in breast cancer cell lines. **Nanomedicine**, v. 13, n. 20, p. 2597–2609, out. 2018.

CAPORARELLO, N. et al. PGC1 $\alpha$  repression in IPF fibroblasts drives a pathologic metabolic, secretory and fibrogenic state. **Thorax**, v. 74, n. 8, p. 749–760, ago. 2019.

CARDOSO, F. et al. 1st International consensus guidelines for advanced breast cancer (ABC 1). **The Breast**, v. 21, n. 3, p. 242–252, jun. 2012.

CARTER, J. C.; CHURCH, F. C. Mature breast adipocytes promote breast cancer cell motility. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 92, n. 3, p. 312–317, jun. 2012.

CAZET, A. S. et al. Targeting stromal remodeling and cancer stem cell plasticity overcomes chemoresistance in triple negative breast cancer. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 2897, 24 dez. 2018.

CHANDA, D. et al. Developmental pathways in the pathogenesis of lung fibrosis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 65, p. 56–69, fev. 2019.

CHANG, C.-J. et al. Overcoming interferon (IFN)- $\gamma$  resistance ameliorates transforming growth factor (TGF)- $\beta$ -mediated lung fibroblast-to-myofibroblast transition and bleomycin-induced pulmonary fibrosis. **Biochemical Pharmacology**, v. 183, p. 114356, jan. 2021.

CHEHIMI, M.; VIDAL, H.; ELJAAFARI, A. Pathogenic Role of IL-17-Producing Immune Cells in Obesity, and Related Inflammatory Diseases. **Journal of Clinical Medicine**, v. 6, n. 7, p. 68, 14 jul. 2017.

CHEN, S. et al. Exosomes derived from miR-375-overexpressing human adipose mesenchymal stem cells promote bone regeneration. **Cell Proliferation**, v. 52, n. 5, 5 set. 2019.

CHEN, X. et al. Elevation of Circulating miR-210 Participates in the Occurrence and Development of Type 2 Diabetes Mellitus and Its Complications. **Journal of Diabetes Research**, v. 2022, p. 1–10, 23 nov. 2022a.

CHEN, Y. et al. Adiponectin promotes repair of renal tubular epithelial cells by regulating mitochondrial biogenesis and function. **Metabolism**, v. 128, p. 154959, mar. 2022b.

CHEN, Z. et al. Resistin destroys mitochondrial biogenesis by inhibiting the PGC-1 $\alpha$ /NRF1/TFAM signaling pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 504, n. 1, p. 13–18, set. 2018.

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

CHOI, S.-Y. et al. Podoplanin,  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin or S100A4 Expressing Cancer-Associated Fibroblasts Are Associated with Different Prognosis in Colorectal Cancers. **Journal of Korean Medical Science**, v. 28, n. 9, p. 1293, 2013.

CHUNG, B. et al. Human brain metastatic stroma attracts breast cancer cells via chemokines CXCL16 and CXCL12. **npj Breast Cancer**, v. 3, n. 1, p. 6, 2 dez. 2017.

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.

CONSIDINE, R. V. et al. Serum Immunoreactive-Leptin Concentrations in Normal-Weight and Obese Humans. **New England Journal of Medicine**, v. 334, n. 5, p. 292–295, fev. 1996.

COSTA-SILVA, B. et al. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. **Nature Cell Biology**, v. 17, n. 6, p. 816–826, 18 jun. 2015.

COSTA, A. et al. Fibroblast Heterogeneity and Immunosuppressive Environment in Human Breast Cancer. **Cancer Cell**, v. 33, n. 3, p. 463- 479.e10, mar. 2018.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 860–867, dez. 2002.

D'URSO, M.; KURNIAWAN, N. A. Mechanical and Physical Regulation of Fibroblast–Myofibroblast Transition: From Cellular Mechanoreponse to Tissue Pathology. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, 22 dez. 2020.

DAI, L. et al. Fibroblasts in cancer dormancy: foe or friend? **Cancer Cell International**, v. 21, n. 1, p. 184, 26 dez. 2021.

DANG, S.-Y. et al. Exosomal transfer of obesity adipose tissue for decreased miR-141-3p mediate insulin resistance of hepatocytes. **International Journal of Biological Sciences**, v. 15, n. 2, p. 351–368, 2019.

DE WEVER, O. et al. Carcinoma-associated fibroblasts provide operational flexibility in metastasis. **Seminars in Cancer Biology**, v. 25, p. 33–46, abr. 2014.

DEGAWA-YAMAUCHI, M. et al. Serum Resistin (FIZZ3) Protein Is Increased in Obese Humans. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, n. 11, p. 5452–5455, 1 nov. 2003.

DENG, Z. -B. et al. Adipose Tissue Exosome-Like Vesicles Mediate Activation of Macrophage-Induced Insulin Resistance. **Diabetes**, v. 58, n. 11, p. 2498–2505, 1 nov. 2009.

DESAI, V. D.; HSIA, H. C.; SCHWARZBAUER, J. E. Reversible Modulation of Myofibroblast Differentiation in Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e86865, 23 jan. 2014.

DESJARDINS-PARK, H. E.; FOSTER, D. S.; LONGAKER, M. T. Fibroblasts and wound healing: an update. **Regenerative Medicine**, v. 13, n. 5, p. 491–495, 1 jul. 2018.

DESMOULIÈRE, A. et al. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. **Journal of Cell Biology**, v. 122, n. 1, p. 103–111, 1 jul. 1993.

DEWACHTER, L. et al. Angiotensin/Tie2 Pathway Influences Smooth Muscle Hyperplasia in Idiopathic Pulmonary Hypertension. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 174, n. 9, p. 1025–1033, 1 nov. 2006.

DIRAT, B. et al. Cancer-Associated Adipocytes Exhibit an Activated Phenotype and Contribute to Breast Cancer Invasion. **Cancer Research**, v. 71, n. 7, p. 2455–2465, 1 abr. 2011.

DONG, M. et al. Autocrine IL-1 $\beta$  mediates the promotion of corneal neovascularization by senescent fibroblasts. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 315, n. 5, p. C734–C743, 1 nov. 2018.

DONG, S.-S. et al. Exosomal miR-3682-3p Suppresses Angiogenesis by Targeting ANGPT1 via the RAS-MEK1/2-ERK1/2 Pathway in Hepatocellular Carcinoma. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, 29 mar. 2021.

- DONG, S. et al. Arsenic trioxide inhibits angiogenesis of hepatocellular carcinoma after insufficient radiofrequency ablation via blocking paracrine angiopoietin-1 and angiopoietin-2. **International Journal of Hyperthermia**, v. 39, n. 1, p. 888–896, 31 dez. 2022.
- DOYLE, L.; WANG, M. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. **Cells**, v. 8, n. 7, p. 727, 15 jul. 2019.
- DRAKE, L. Y. et al. Asthmatic lung fibroblasts promote type 2 immune responses via endoplasmic reticulum stress response dependent thymic stromal lymphopoietin secretion. **Frontiers in Physiology**, v. 14, 25 jan. 2023.
- DUMAS, E. et al. Angiopoietin-1 but not angiopoietin-2 promotes neutrophil viability: Role of interleukin-8 and platelet-activating factor. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1823, n. 2, p. 358–367, fev. 2012.
- ECHAVARRIA, R. et al. Angiopoietin-1 inhibits toll-like receptor 4 signalling in cultured endothelial cells: role of miR-146b-5p. **Cardiovascular Research**, v. 106, n. 3, p. 465–477, 1 jun. 2015.
- EISSA, M.; ARTLETT, C. The MicroRNA miR-155 Is Essential in Fibrosis. **Non-Coding RNA**, v. 5, n. 1, p. 23, 12 mar. 2019.
- EL-HATTAB, M. Y. et al. Human Adipocyte Conditioned Medium Promotes In Vitro Fibroblast Conversion to Myofibroblasts. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 10286, 24 jun. 2020.
- ELIAS, J. A.; LENTZ, V. IL-1 and tumor necrosis factor synergistically stimulate fibroblast IL-6 production and stabilize IL-6 messenger RNA. **The Journal of Immunology**, v. 145, n. 1, p. 161–166, 1 jul. 1990.
- ELWAKEEL et al. Phenotypic Plasticity of Fibroblasts during Mammary Carcinoma Development. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, p. 4438, 9 set. 2019.
- ELWAKEEL, E.; WEIGERT, A. Breast Cancer CAFs: Spectrum of Phenotypes and Promising Targeting Avenues. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 21, p. 11636, 27 out. 2021.
- EPSTEIN SHOCHET, G. et al. Fibroblast paracrine TNF- $\alpha$  signaling elevates integrin A5 expression in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). **Respiratory Research**, v. 18, n. 1, p. 122, 19 dez. 2017.
- ERDOGAN, B.; WEBB, D. J. Cancer-associated fibroblasts modulate growth factor signaling and extracellular matrix remodeling to regulate tumor metastasis. **Biochemical Society Transactions**, v. 45, n. 1, p. 229–236, 8 fev. 2017.
- ERLER, J. T. et al. Hypoxia-Induced Lysyl Oxidase Is a Critical Mediator of Bone Marrow Cell Recruitment to Form the Premetastatic Niche. **Cancer Cell**, v. 15, n. 1, p. 35–44, jan. 2009.
- EWERTZ, M. et al. Effect of Obesity on Prognosis After Early-Stage Breast Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 1, p. 25–31, 1 jan. 2011.
- FAGIANI, E.; CHRISTOFORI, G. Angiopoietins in angiogenesis. **Cancer Letters**, v.

328, n. 1, p. 18–26, jan. 2013.

FANG, T. et al. Tumor-derived exosomal miR-1247-3p induces cancer-associated fibroblast activation to foster lung metastasis of liver cancer. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 191, 15 dez. 2018.

FARES, J. et al. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, p. 28, 12 dez. 2020.

FASSHAUER, M.; BLÜHER, M. Adipokines in health and disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 36, n. 7, p. 461–470, jul. 2015.

FEI, F. et al. Role of metastasis-induced protein S100A4 in human non-tumor pathophysiologies. **Cell & Bioscience**, v. 7, n. 1, p. 64, 25 dez. 2017.

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, 17 mar. 2015.

FISMAN, E. Z.; TENENBAUM, A. Adiponectin: a manifold therapeutic target for metabolic syndrome, diabetes, and coronary disease? **Cardiovascular Diabetology**, v. 13, n. 1, p. 103, 2014.

FITZGERALD, S. M. et al. GM-CSF Induction in Human Lung Fibroblasts by IL-1  $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and Macrophage Contact. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 23, n. 2, p. 57–65, fev. 2003.

FLORES-PÉREZ, A. et al. Dual targeting of ANGPT1 and TGFBR2 genes by miR-204 controls angiogenesis in breast cancer. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 34504, 5 out. 2016.

FORTIER, S. M. et al. Myofibroblast dedifferentiation proceeds via distinct transcriptomic and phenotypic transitions. **JCI Insight**, v. 6, n. 6, 22 mar. 2021.

GABASA, M. et al. Interleukin-1 $\beta$  Modulation of the Mechanobiology of Primary Human Pulmonary Fibroblasts: Potential Implications in Lung Repair. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 22, p. 8417, 10 nov. 2020.

GALIC, S.; OAKHILL, J. S.; STEINBERG, G. R. Adipose tissue as an endocrine organ. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 316, n. 2, p. 129–139, mar. 2010.

GALINDO-HERNANDEZ, O. et al. Extracellular vesicles from MDA-MB-231 breast cancer cells stimulated with linoleic acid promote an EMT-like process in MCF10A cells. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 91, n. 6, p. 299–310, dez. 2014.

GARCIA-MARTINEZ, L. et al. Epigenetic mechanisms in breast cancer therapy and resistance. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1786, 19 dez. 2021.

GIORDANO, C. et al. The Biology of Exosomes in Breast Cancer Progression: Dissemination, Immune Evasion and Metastatic Colonization. **Cancers**, v. 12, n. 8, p. 2179, 5 ago. 2020.

GODING SAUER, A. et al. Current Prevalence of Major Cancer Risk Factors and Screening Test Use in the United States: Disparities by Education and Race/Ethnicity. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 28, n. 4, p. 629–642, 1 abr. 2019.

GODOY-ORTIZ, A. et al. Deciphering HER2 Breast Cancer Disease: Biological and Clinical Implications. **Frontiers in Oncology**, v. 9, 29 out. 2019.

GOMES, D. C. K. et al. Trends in obesity prevalence among Brazilian adults from 2002 to 2013 by educational level. **BMC Public Health**, v. 19, n. 1, p. 965, 18 dez. 2019.

GONZÁLEZ, L. et al. Gene expression profile of normal and cancer-associated fibroblasts according to intratumoral inflammatory cells phenotype from breast cancer tissue. **Molecular Carcinogenesis**, v. 55, n. 11, p. 1489–1502, nov. 2016.

GRAVALLESE, E. M. Angiopoietin-1 is expressed in the synovium of patients with rheumatoid arthritis and is induced by tumour necrosis factor alpha. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 62, n. 2, p. 100–107, 1 fev. 2003.

GUI, Y. et al. Metastatic Breast Carcinoma–Associated Fibroblasts Have Enhanced Protumorigenic Properties Related to Increased IGF2 Expression. **Clinical Cancer Research**, v. 25, n. 23, p. 7229–7242, 1 dez. 2019.

GUO, J.-A. et al. The Antisenescence Effect of Exosomes from Human Adipose-Derived Stem Cells on Skin Fibroblasts. **BioMed Research International**, v. 2022, p. 1–12, 29 jun. 2022.

GUO, Q. et al. Integrin  $\beta$ 1-enriched extracellular vesicles mediate monocyte adhesion and promote liver inflammation in murine NASH. **Journal of Hepatology**, v. 71, n. 6, p. 1193–1205, dez. 2019.

GUO, T. et al. Mitochondrial fission and bioenergetics mediate human lung fibroblast durotaxis. **JCI Insight**, v. 8, n. 1, 10 jan. 2023.

GURUNATHAN, S.; KANG, M.-H.; KIM, J.-H. A Comprehensive Review on Factors Influences Biogenesis, Functions, Therapeutic and Clinical Implications of Exosomes. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 16, p. 1281–1312, fev. 2021.

H. RASHED, M. et al. Exosomes: From Garbage Bins to Promising Therapeutic Targets. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 3, p. 538, 2 mar. 2017.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, mar. 2011.

HARBECK, N. et al. Breast cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 5, n. 1, p. 66, 23 dez. 2019.

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

HASHIRAMOTO, A. et al. Angiopoietin 1 directly induces destruction of the rheumatoid joint by cooperative, but independent, signaling via ERK/MAPK and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt. **Arthritis & Rheumatism**, v. 56, n. 7, p. 2170–2179, jul. 2007.

HASSANPOUR, S. H.; DEGHANI, M. Review of cancer from perspective of molecular. **Journal of Cancer Research and Practice**, v. 4, n. 4, p. 127–129, dez.

2017.

HAYES, A. J. et al. Expression and function of angiopoietin-1 in breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 83, n. 9, p. 1154–1160, nov. 2000.

HEINONEN, S. et al. Impaired Mitochondrial Biogenesis in Adipose Tissue in Acquired Obesity. **Diabetes**, v. 64, n. 9, p. 3135–3145, 1 set. 2015.

HESSVIK, N. P.; LLORENTE, A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 75, n. 2, p. 193–208, 21 jan. 2018.

HIGGINS, S. J. et al. Dysregulation of angiopoietin-1 plays a mechanistic role in the pathogenesis of cerebral malaria. **Science Translational Medicine**, v. 8, n. 358, 28 set. 2016.

HOANG, D. H. et al. Differential Wound Healing Capacity of Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Originated From Bone Marrow, Adipose Tissue and Umbilical Cord Under Serum- and Xeno-Free Condition. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 7, 24 jun. 2020.

HOLCOMB, V. B. et al. Obesity impairs wound healing in ovariectomized female mice. **In vivo (Athens, Greece)**, v. 23, n. 4, p. 515–8, 2009.

HOLOPAINEN, T. et al. Angiopoietin-1 Overexpression Modulates Vascular Endothelium to Facilitate Tumor Cell Dissemination and Metastasis Establishment. **Cancer Research**, v. 69, n. 11, p. 4656–4664, 1 jun. 2009.

HONG, S.; PEDERSEN, P. L. ATP Synthase and the Actions of Inhibitors Utilized To Study Its Roles in Human Health, Disease, and Other Scientific Areas. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 72, n. 4, p. 590–641, dez. 2008.

HOOGSTRATEN, C. A. et al. Dissecting Drug-Induced Cytotoxicity and Metabolic Dysfunction in Conditionally Immortalized Human Proximal Tubule Cells. **Frontiers in Toxicology**, v. 4, 28 fev. 2022.

HOSHINO, A. et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. **Nature**, v. 527, n. 7578, p. 329–335, 19 nov. 2015.

HOU, J. et al. TNF- $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation promotes myofibroblast differentiation of LR-MSCs and exacerbates bleomycin-induced pulmonary fibrosis. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 3, p. 2409–2419, mar. 2018.

HOUTHUIJZEN, J. M.; JONKERS, J. Cancer-associated fibroblasts as key regulators of the breast cancer tumor microenvironment. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 37, n. 4, p. 577–597, 21 dez. 2018.

HØYE, A. M.; ERLER, J. T. Structural ECM components in the premetastatic and metastatic niche. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 310, n. 11, p. C955–C967, 1 jun. 2016.

HRUBY, A. et al. Determinants and Consequences of Obesity. **American Journal of Public Health**, v. 106, n. 9, p. 1656–1662, set. 2016.

HTWE, S. S. et al. Investigating NF- $\kappa$ B signaling in lung fibroblasts in 2D and 3D culture systems. **Respiratory Research**, v. 16, n. 1, p. 144, 1 dez. 2015.

HU, L. et al. Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells accelerates cutaneous wound healing via optimizing the characteristics of fibroblasts. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 32993, 12 set. 2016.

HUANG, L.-Y. et al. Interferon Family Cytokines in Obesity and Insulin Sensitivity. **Cells**, v. 11, n. 24, p. 4041, 14 dez. 2022.

HUANG, M. et al. IL-7 inhibits fibroblast TGF- $\beta$  production and signaling in pulmonary fibrosis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 109, n. 7, p. 931–937, 1 abr. 2002.

HUANG, Z.; XU, A. Adipose Extracellular Vesicles in Intercellular and Inter-Organ Crosstalk in Metabolic Health and Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 25 fev. 2021.

HWANG, K.-T. et al. Impact of Breast Cancer Subtypes on Prognosis of Women with Operable Invasive Breast Cancer: A Population-based Study Using SEER Database. **Clinical Cancer Research**, v. 25, n. 6, p. 1970–1979, 15 mar. 2019.

ISIDORI, A. M.; VENNERI, M. A.; FIORE, D. Angiopoietin-1 and Angiopoietin-2 in metabolic disorders: therapeutic strategies to restore the highs and lows of angiogenesis in diabetes. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 39, n. 11, p. 1235–1246, 25 nov. 2016.

IZQUIERDO, A. G. et al. Leptin, Obesity, and Leptin Resistance: Where Are We 25 Years Later? **Nutrients**, v. 11, n. 11, p. 2704, 8 nov. 2019.

JADLI, A. S. et al. Inside(sight) of tiny communicator: exosome biogenesis, secretion, and uptake. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 467, n. 1–2, p. 77–94, 22 abr. 2020.

JAYABALAN, N. et al. Adipose Tissue Exosomal Proteomic Profile Reveals a Role on Placenta Glucose Metabolism in Gestational Diabetes Mellitus. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 104, n. 5, p. 1735–1752, 1 maio 2019.

JI, Q. et al. Primary tumors release ITGBL1-rich extracellular vesicles to promote distal metastatic tumor growth through fibroblast-niche formation. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1211, 5 dez. 2020.

JIANG, W. G. et al. Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives. **Seminars in Cancer Biology**, v. 35, p. S244–S275, dez. 2015.

JOHNSON, K. S.; CONANT, E. F.; SOO, M. S. Molecular Subtypes of Breast Cancer: A Review for Breast Radiologists. **Journal of Breast Imaging**, v. 3, n. 1, p. 12–24, 26 jan. 2021.

JORNAYVAZ, F. R.; SHULMAN, G. I. Regulation of mitochondrial biogenesis. **Essays in Biochemistry**, v. 47, p. 69–84, 14 jun. 2010.

JOTZU, C. et al. Adipose tissue derived stem cells differentiate into carcinoma-associated fibroblast-like cells under the influence of tumor derived factors. **Cellular Oncology**, v. 34, n. 1, p. 55–67, 15 fev. 2011.

KAHN, C. R.; WANG, G.; LEE, K. Y. Altered adipose tissue and adipocyte function in the pathogenesis of metabolic syndrome. **Journal of Clinical Investigation**, v. 129, n. 10, p. 3990–4000, 1 out. 2019a.

KAHN, C. R.; WANG, G.; LEE, K. Y. Altered adipose tissue and adipocyte function in

the pathogenesis of metabolic syndrome. **Journal of Clinical Investigation**, v. 129, n. 10, p. 3990–4000, 1 out. 2019b.

KARKENI, E. et al. Obesity-associated Inflammation Induces microRNA-155 Expression in Adipocytes and Adipose Tissue: Outcome on Adipocyte Function. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 101, n. 4, p. 1615–1626, 1 abr. 2016.

KATZ, Y.; NADIV, O.; BEER, Y. Interleukin-17 enhances tumor necrosis factor  $\gamma$ -induced synthesis of interleukins 1, 6, and 8 in skin and synovial fibroblasts: A possible role as a  $\gamma$ -fine-tuning cytokine? in inflammation processes. **Arthritis & Rheumatism**, v. 44, n. 9, p. 2176–2184, set. 2001.

KENDALL, R. T.; FEGHALI-BOSTWICK, C. A. Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5, 27 maio 2014.

KIERNAN, K.; MACIVER, N. J. The Role of the Adipokine Leptin in Immune Cell Function in Health and Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 29 jan. 2021.

KIM, M. H. et al. Galectin-1 from conditioned medium of three-dimensional culture of adipose-derived stem cells accelerates migration and proliferation of human keratinocytes and fibroblasts. **Wound Repair and Regeneration**, v. 26, p. S9–S18, dez. 2018.

KIM, W.-S. et al. Wound healing effect of adipose-derived stem cells: A critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. **Journal of Dermatological Science**, v. 48, n. 1, p. 15–24, out. 2007.

KIM, Y.; KIM, O.-K. Potential Roles of Adipocyte Extracellular Vesicle-Derived miRNAs in Obesity-Mediated Insulin Resistance. **Advances in nutrition (Bethesda, Md.)**, v. 12, n. 2, p. 566–574, 31 mar. 2021.

KITAMURA, T.; QIAN, B.-Z.; POLLARD, J. W. Immune cell promotion of metastasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 2, p. 73–86, 23 fev. 2015.

KLEE, S. et al. WISP1 mediates IL-6-dependent proliferation in primary human lung fibroblasts. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 20547, 12 fev. 2016.

KO, J. et al. Conditioned media from adipocytes promote proliferation, migration, and invasion in melanoma and colorectal cancer cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 10, p. 18249–18261, 9 out. 2019.

KOECK, E. S. et al. Adipocyte exosomes induce transforming growth factor beta pathway dysregulation in hepatocytes: a novel paradigm for obesity-related liver disease. **Journal of Surgical Research**, v. 192, n. 2, p. 268–275, dez. 2014.

KOJIMA, Y. et al. Autocrine TGF- $\beta$  and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 46, p. 20009–20014, 16 nov. 2010.

KOMMINENI, V. K. et al. IFN- $\gamma$  acts as anti-angiogenic cytokine in the human cornea by regulating the expression of VEGF-A and sVEGF-R1. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 374, n. 3, p. 479–484, set. 2008.

KOSMACEK, E. A.; OBERLEY-DEEGAN, R. E. Adipocytes protect fibroblasts from

radiation-induced damage by adiponectin secretion. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 12616, 28 jul. 2020.

KRUGER, S. et al. Molecular characterization of exosome-like vesicles from breast cancer cells. **BMC Cancer**, v. 14, n. 1, p. 44, 27 dez. 2014.

KWAN, H. Y. et al. The impact of obesity on adipocyte-derived extracellular vesicles. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 78, n. 23, p. 7275–7288, 22 dez. 2021.

LARSEN, M. J. et al. Hereditary Breast Cancer: Clinical, Pathological and Molecular Characteristics. **Breast Cancer: Basic and Clinical Research**, v. 8, p. BCBCR.S18715, 15 jan. 2014.

LAVOIE, S. S. et al. Synthesis of Human Neutrophil Extracellular Traps Contributes to Angiopoietin-Mediated In Vitro Proinflammatory and Proangiogenic Activities. **The Journal of Immunology**, v. 200, n. 11, p. 3801–3813, 1 jun. 2018.

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.

LEAL, V. S. et al. Excesso de peso em crianças e adolescentes no Estado de Pernambuco, Brasil: prevalência e determinantes. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 28, n. 6, p. 1175–1182, jun. 2012.

LEBLEU, V. S.; NEILSON, E. G. Origin and functional heterogeneity of fibroblasts. **The FASEB Journal**, v. 34, n. 3, p. 3519–3536, 10 mar. 2020.

LELIGDOWICZ, A. et al. Endothelial Activation: The Ang/Tie Axis in Sepsis. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 24 abr. 2018.

LEMIEUX, C. et al. Angiopoietins can directly activate endothelial cells and neutrophils to promote proinflammatory responses. **Blood**, v. 105, n. 4, p. 1523–1530, 15 fev. 2005.

LERNER, C. A.; SUNDAR, I. K.; RAHMAN, I. Mitochondrial redox system, dynamics, and dysfunction in lung inflammation and COPD. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 81, p. 294–306, dez. 2016.

LI, C. et al. Adipose Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Promote Wound Healing Through the WNT/ $\beta$ -catenin Signaling Pathway in Dermal Fibroblasts. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 18, n. 6, p. 2059–2073, 26 ago. 2022a.

LI, J. et al. Exosomes from human adipose-derived mesenchymal stem cells inhibit production of extracellular matrix in keloid fibroblasts via downregulating transforming growth factor- $\beta$ 2 and Notch-1 expression. **Bioengineered**, v. 13, n. 4, p. 8515–8525, 1 abr. 2022b.

LI, L. et al. Conditioned Medium from Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell Culture Prevents UVB-Induced Skin Aging in Human Keratinocytes and Dermal Fibroblasts. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 1, p. 49, 19 dez. 2019.

LI, R.; WEN, A.; LIN, J. Pro-Inflammatory Cytokines in the Formation of the Pre-Metastatic Niche. **Cancers**, v. 12, n. 12, p. 3752, 13 dez. 2020.

LI, X. et al. Glycometabolic reprogramming-mediated proangiogenic phenotype

enhancement of cancer-associated fibroblasts in oral squamous cell carcinoma: role of PGC-1 $\alpha$ /PFKFB3 axis. **British Journal of Cancer**, v. 127, n. 3, p. 449–461, 1 ago. 2022c.

LI, Y. et al. Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells attenuate hypertrophic scar fibrosis by miR-192-5p/IL-17RA/Smad axis. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 12, n. 1, p. 221, 31 dez. 2021.

LIANG, H. et al. miR-153 inhibits the migration and the tube formation of endothelial cells by blocking the paracrine of angiopoietin 1 in breast cancer cells. **Angiogenesis**, v. 21, n. 4, p. 849–860, 29 nov. 2018.

LIANG, Y. et al. RETRACTED ARTICLE: LncRNA BCRT1 promotes breast cancer progression by targeting miR-1303/PTBP3 axis. **Molecular Cancer**, v. 19, n. 1, p. 85, 8 dez. 2020.

LIN, R.; WANG, S.; ZHAO, R. C. Exosomes from human adipose-derived mesenchymal stem cells promote migration through Wnt signaling pathway in a breast cancer cell model. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 383, n. 1–2, p. 13–20, 29 nov. 2013.

LIN, S. et al. Clinicopathological characteristics and survival outcomes in patients with synchronous lung metastases upon initial metastatic breast cancer diagnosis in Han population. **BMC Cancer**, v. 21, n. 1, p. 1330, 14 dez. 2021.

LIN, X.; LI, H. Obesity: Epidemiology, Pathophysiology, and Therapeutics. **Frontiers in Endocrinology**, v. 12, 6 set. 2021.

LIU, C. et al. Cytokines: From Clinical Significance to Quantification. **Advanced Science**, v. 8, n. 15, p. 2004433, 10 ago. 2021.

LIU, Q. et al. Factors involved in cancer metastasis: a better understanding to “seed and soil” hypothesis. **Molecular Cancer**, v. 16, n. 1, p. 176, 2 dez. 2017.

LIU, X. et al. Angiopoietin-1 promotes triple-negative breast cancer cell proliferation by upregulating carboxypeptidase A4. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, 1 maio 2023.

LIU, Y.; CAO, X. Characteristics and Significance of the Pre-metastatic Niche. **Cancer Cell**, v. 30, n. 5, p. 668–681, nov. 2016.

LOBB, R. J.; LIMA, L. G.; MÖLLER, A. Exosomes: Key mediators of metastasis and pre-metastatic niche formation. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 67, p. 3–10, jul. 2017.

LÓPEZ, J. F. et al. Adipose tissue extract shows potential for wound healing: in vitro proliferation and migration of cell types contributing to wound healing in the presence of adipose tissue preparation and platelet rich plasma. **Cytotechnology**, v. 70, n. 4, p. 1193–1204, 6 ago. 2018.

LOUWEN, F. et al. Insight into the development of obesity: functional alterations of adipose-derived mesenchymal stem cells. **Obesity Reviews**, v. 19, n. 7, p. 888–904, jul. 2018.

LÜ, L. et al. Exocytosis of MTT formazan could exacerbate cell injury. **Toxicology in Vitro**, v. 26, n. 4, p. 636–644, jun. 2012.

- LU, P. et al. Extracellular Matrix Degradation and Remodeling in Development and Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 12, p. a005058–a005058, 1 dez. 2011.
- LU, X. et al. Sedentary lifestyle related exosomal release of Hotair from gluteal-femoral fat promotes intestinal cell proliferation. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 45648, 31 maio 2017.
- LU, Y. et al. Responsiveness of Stromal Fibroblasts to IFN- $\gamma$  Blocks Tumor Growth via Angiostasis. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 10, p. 6413–6421, 15 nov. 2009.
- ŁUKASIEWICZ, S. et al. Breast Cancer—Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies—An Updated Review. **Cancers**, v. 13, n. 17, p. 4287, 25 ago. 2021.
- MA, F. et al. Macrophage-Stimulated Cardiac Fibroblast Production of IL-6 Is Essential for TGF  $\beta$ /Smad Activation and Cardiac Fibrosis Induced by Angiotensin II. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e35144, 4 maio 2012.
- MAJI, S. et al. Exosomal Annexin II Promotes Angiogenesis and Breast Cancer Metastasis. **Molecular Cancer Research**, v. 15, n. 1, p. 93–105, 1 jan. 2017.
- MALMSTRÖM, J. et al. Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Specifically Induce Proteins Involved in the Myofibroblast Contractile Apparatus. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 3, n. 5, p. 466–477, maio 2004.
- MANNELLO, F. What does matrix metalloproteinase-1 expression in patients with breast cancer really tell us? **BMC Medicine**, v. 9, n. 1, p. 95, 11 dez. 2011.
- MANTOVANI, A. et al. Cancer-related inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 436–444, 1 jul. 2008.
- MARINO-ENRIQUEZ, A.; FLETCHER, C. D. M. Shouldn't we care about the biology of benign tumours? **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 11, p. 701–702, 16 nov. 2014.
- MATSUMURA, T. et al. TGF- $\beta$ -induced activation of conjunctival fibroblasts is modulated by FGF-2 and substratum stiffness. **PLOS ONE**, v. 15, n. 11, p. e0242626, 18 nov. 2020.
- MEDEIROS, B.; ALLAN, A. L. Molecular Mechanisms of Breast Cancer Metastasis to the Lung: Clinical and Experimental Perspectives. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 9, p. 2272, 8 maio 2019.
- MIA, M. M.; BOERSEMA, M.; BANK, R. A. Interleukin-1 $\beta$  Attenuates Myofibroblast Formation and Extracellular Matrix Production in Dermal and Lung Fibroblasts Exposed to Transforming Growth Factor- $\beta$ 1. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. e91559, 12 mar. 2014.
- MICALLEF, L. et al. The myofibroblast, multiple origins for major roles in normal and pathological tissue repair. **Fibrogenesis & Tissue Repair**, v. 5, n. S1, p. S5, 6 dez. 2012.
- MICHAEL, I. P. et al. Angiopoietin-1 deficiency increases tumor metastasis in mice. **BMC Cancer**, v. 17, n. 1, p. 539, 11 dez. 2017.
- MIRKESHAVARZ, M. et al. Interleukin-6 secreted by oral cancer- associated

fibroblast accelerated VEGF expression in tumor and stroma cells. **Cellular and Molecular Biology**, v. 63, n. 10, p. 131–136, 31 out. 2017.

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.

MORENO, C. et al. Succinate Dehydrogenase and Ribonucleic Acid Networks in Cancer and Other Diseases. **Cancers**, v. 12, n. 11, p. 3237, 3 nov. 2020.

NAGASAKI, T. et al. Interleukin-6 released by colon cancer-associated fibroblasts is critical for tumour angiogenesis: anti-interleukin-6 receptor antibody suppressed angiogenesis and inhibited tumour–stroma interaction. **British Journal of Cancer**, v. 110, n. 2, p. 469–478, 17 jan. 2014.

NASCIMENTO, A. P.; COSTA, A. M. A. Overweight induced by high-fat diet delays rat cutaneous wound healing. **British Journal of Nutrition**, v. 96, n. 6, p. 1069–1077, 15 dez. 2006.

NEAGOE, P.-E. et al. Angiopoietin-1 but not angiopoietin-2 induces IL-8 synthesis and release by human neutrophils. **Journal of Cellular Physiology**, v. 227, n. 8, p. 3099–3110, ago. 2012.

NEUHOUSER, M. L. et al. Overweight, Obesity, and Postmenopausal Invasive Breast Cancer Risk. **JAMA Oncology**, v. 1, n. 5, p. 611, 1 ago. 2015.

NG, S. B.; TAN, Y. H.; GUY, G. R. Differential induction of the interleukin-6 gene by tumor necrosis factor and interleukin-1. **The Journal of biological chemistry**, v. 269, n. 29, p. 19021–7, 22 jul. 1994.

NGUYEN, H. N. et al. Autocrine Loop Involving IL-6 Family Member LIF, LIF Receptor, and STAT4 Drives Sustained Fibroblast Production of Inflammatory Mediators. **Immunity**, v. 46, n. 2, p. 220–232, fev. 2017.

NIEMAN, K. M. et al. Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. **Nature Medicine**, v. 17, n. 11, p. 1498–1503, 30 nov. 2011.

NONG, B. et al. Immune-related gene ANGPT1 is an adverse biomarker for endometrial carcinoma. **Translational Cancer Research**, v. 10, n. 6, p. 2962–2976, jun. 2021.

NOWICKA, A. et al. Human Omental-Derived Adipose Stem Cells Increase Ovarian Cancer Proliferation, Migration, and Chemoresistance. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. e81859, 2 dez. 2013.

O'CONNELL, J. T. et al. VEGF-A and Tenascin-C produced by S100A4 + stromal cells are important for metastatic colonization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 38, p. 16002–16007, 20 set. 2011.

O'ROURKE, R. W. Adipose tissue and the physiologic underpinnings of metabolic disease. **Surgery for Obesity and Related Diseases**, v. 14, n. 11, p. 1755–1763, nov. 2018.

OESTREICH, A. K. et al. Is Obesity a Disease of Stem Cells? **Cell Stem Cell**, v. 27, n. 1, p. 15–18, jul. 2020.

- ORIMO, A. et al. Stromal Fibroblasts Present in Invasive Human Breast Carcinomas Promote Tumor Growth and Angiogenesis through Elevated SDF-1/CXCL12 Secretion. **Cell**, v. 121, n. 3, p. 335–348, maio 2005.
- OSEI, E. T. et al. Epithelial-interleukin-1 inhibits collagen formation by airway fibroblasts: Implications for asthma. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 8721, 26 maio 2020.
- OTHMAN, N.; JAMAL, R.; ABU, N. Cancer-Derived Exosomes as Effectors of Key Inflammation-Related Players. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 4 set. 2019.
- OU, M.-Y. et al. Adipose tissue aging: mechanisms and therapeutic implications. **Cell Death & Disease**, v. 13, n. 4, p. 300, 4 abr. 2022.
- OU, X. et al. Angiotensin-1 aggravates atherosclerosis by inhibiting cholesterol efflux and promoting inflammatory response. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1865, n. 2, p. 158535, fev. 2020.
- PAN, Y. et al. Adipocyte-secreted exosomal microRNA-34a inhibits M2 macrophage polarization to promote obesity-induced adipose inflammation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 129, n. 2, p. 834–849, 22 jan. 2019.
- PANG, G. et al. GM-CSF, IL-1 $\alpha$ , IL- $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, ICAM-1 and VCAM-1 gene expression and cytokine production in human duodenal fibroblasts stimulated with lipopolysaccharide, IL-1 $\alpha$  and TNF- $\alpha$ . **Clinical and Experimental Immunology**, v. 96, n. 3, p. 437–443, 28 jun. 2008.
- PARDO, A. et al. Role of matrix metalloproteinases in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. **Respiratory Research**, v. 17, n. 1, p. 23, 4 dez. 2016.
- PARK, J. et al. Obesity and cancer—mechanisms underlying tumour progression and recurrence. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 10, n. 8, p. 455–465, 17 ago. 2014.
- PARVANIAN, S. et al. Exosomal vimentin from adipocyte progenitors accelerates wound healing. **Cytoskeleton**, v. 77, n. 10, p. 399–413, 17 out. 2020.
- PARVANIAN, S. et al. Exosomal Vimentin from Adipocyte Progenitors Protects Fibroblasts against Osmotic Stress and Inhibits Apoptosis to Enhance Wound Healing. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 9, p. 4678, 28 abr. 2021.
- PATEL, R. S. et al. Adipose-derived stem cells from lean and obese humans show depot specific differences in their stem cell markers, exosome contents and senescence: role of protein kinase C delta (PKC $\delta$ ) in adipose stem cell niche. **Stem cell investigation**, v. 3, p. 2, 2016.
- PAULAITIS, M.; AGARWAL, K.; NANA-SINKAM, P. Dynamic Scaling of Exosome Sizes. **Langmuir**, v. 34, n. 32, p. 9387–9393, 14 ago. 2018.
- PEIN, M. et al. Metastasis-initiating cells induce and exploit a fibroblast niche to fuel malignant colonization of the lungs. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1494, 20 dez. 2020.
- PEINADO, H. et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. **Nature Medicine**, v. 18, n. 6, p. 883–891, 27 jun. 2012.

- PEINADO, H. et al. Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 5, p. 302–317, 17 maio 2017.
- PELON, F. et al. Cancer-associated fibroblast heterogeneity in axillary lymph nodes drives metastases in breast cancer through complementary mechanisms. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 404, 21 dez. 2020.
- PLIKUS, M. V. et al. Fibroblasts: Origins, definitions, and functions in health and disease. **Cell**, v. 184, n. 15, p. 3852–3872, jul. 2021.
- POPOV, L. Mitochondrial biogenesis: An update. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 24, n. 9, p. 4892–4899, 12 maio 2020.
- PREISNER, F. et al. Impact of Human Adipose Tissue-Derived Stem Cells on Malignant Melanoma Cells in An In Vitro Co-culture Model. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 14, n. 1, p. 125–140, 24 fev. 2018.
- QIAO, L. et al. Adiponectin Increases Skeletal Muscle Mitochondrial Biogenesis by Suppressing Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase-1. **Diabetes**, v. 61, n. 6, p. 1463–1470, 1 jun. 2012.
- QUAIL, D. F. et al. Obesity alters the lung myeloid cell landscape to enhance breast cancer metastasis through IL5 and GM-CSF. **Nature Cell Biology**, v. 19, n. 8, p. 974–987, 24 ago. 2017.
- QUESNEL, C. et al. Alveolar fibroblasts in acute lung injury: biological behaviour and clinical relevance. **European Respiratory Journal**, v. 35, n. 6, p. 1312–1321, 1 jun. 2010.
- RAI, Y. et al. Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits the application of MTT assay in the estimation of radiation induced growth inhibition. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1531, 24 jan. 2018.
- 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.
- RAPOSO, G.; STORVOGEL, W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. **Journal of Cell Biology**, v. 200, n. 4, p. 373–383, 18 fev. 2013.
- REN, S. et al. Exosomes from Adipose Stem Cells Promote Diabetic Wound Healing through the eHSP90/LRP1/AKT Axis. **Cells**, v. 11, n. 20, p. 3229, 14 out. 2022.
- RICQUIER, D. Uncoupling Protein 1 of Brown Adipocytes, the Only Uncoupler: A Historical Perspective. **Frontiers in Endocrinology**, v. 2, 2011.
- RISTIMÄKI, A. et al. Proinflammatory Cytokines Regulate Expression of the Lymphatic Endothelial Mitogen Vascular Endothelial Growth Factor-C. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 14, p. 8413–8418, abr. 1998.
- RØNNOV-JESSEN, L.; PETERSEN, O. W. A function for filamentous alpha-smooth muscle actin: retardation of motility in fibroblasts. **Journal of Cell Biology**, v. 134, n. 1, p. 67–80, 1 jul. 1996.
- ROY, R.; CHUN, J.; POWELL, S. N. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 1, p. 68–78, 23 jan. 2012.

- SAHAI, E. et al. A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. **Nature Reviews Cancer**, v. 20, n. 3, p. 174–186, 24 mar. 2020.
- SALTIEL, A. R.; OLEFSKY, J. M. Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 1, p. 1–4, 3 jan. 2017.
- SCOTT, B. B. et al. TNF- $\alpha$  modulates angiopoietin-1 expression in rheumatoid synovial fibroblasts via the NF- $\kappa$ B signalling pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 328, n. 2, p. 409–414, mar. 2005.
- SEOK, S. H. et al. Angiopoietin-1 elicits pro-inflammatory responses in monocytes and differentiating macrophages. **Molecules and Cells**, v. 35, n. 6, p. 550–556, 16 jun. 2013.
- SEWELL-LOFTIN, M. K. et al. Cancer-associated fibroblasts support vascular growth through mechanical force. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 12574, 3 dez. 2017.
- SHANI, O. et al. Fibroblast-Derived IL33 Facilitates Breast Cancer Metastasis by Modifying the Immune Microenvironment and Driving Type 2 Immunity. **Cancer Research**, v. 80, n. 23, p. 5317–5329, 1 dez. 2020.
- SHARMA, S. et al. Translational products of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: Bench to bedside applications. **World Journal of Stem Cells**, v. 13, n. 10, p. 1360–1381, 26 out. 2021.
- SHINDE, A. V.; HUMERES, C.; FRANGOIANNIS, N. G. The role of  $\alpha$ -smooth muscle actin in fibroblast-mediated matrix contraction and remodeling. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1863, n. 1, p. 298–309, jan. 2017.
- SIMPSON, S. et al. Thermal stability of cytokines: A review. **Cytokine**, v. 125, p. 154829, jan. 2020.
- SINN, H.-P.; KREIPE, H. A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. **Breast Care**, v. 8, n. 2, p. 149–154, 2013.
- SOLDEVILLA, B. et al. Tumor-derived exosomes are enriched in  $\Delta$ Np73, which promotes oncogenic potential in acceptor cells and correlates with patient survival. **Human Molecular Genetics**, v. 23, n. 2, p. 467–478, 15 jan. 2014.
- STEEG, P. S. Targeting metastasis. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 4, p. 201–218, 24 abr. 2016.
- STESSUK, T. et al. Platelet-rich plasma (PRP) and adipose-derived mesenchymal stem cells: stimulatory effects on proliferation and migration of fibroblasts and keratinocytes in vitro. **Archives of Dermatological Research**, v. 308, n. 7, p. 511–520, 9 set. 2016.
- STOLARCZYK, E. Adipose tissue inflammation in obesity: a metabolic or immune response? **Current Opinion in Pharmacology**, v. 37, p. 35–40, dez. 2017.
- STRELL, C. et al. Impact of Epithelial–Stromal Interactions on Peritumoral Fibroblasts in Ductal Carcinoma in Situ. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 111, n. 9, p. 983–995, 1 set. 2019.

- STURN, D. H. et al. Angiopoietin Affects Neutrophil Migration. **Microcirculation**, v. 12, n. 5, p. 393–403, jan. 2005.
- SULLIVAN, D. E. et al. TNF- $\alpha$  induces TGF- $\beta$  1 expression in lung fibroblasts at the transcriptional level via AP-1 activation. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 13, n. 8b, p. 1866–1876, 2 ago. 2009.
- SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 4 maio 2021.
- TAN, C. Y.; VIDAL-PUIG, A. Adipose tissue expandability: the metabolic problems of obesity may arise from the inability to become more obese. **Biochemical Society Transactions**, v. 36, n. 5, p. 935–940, 1 out. 2008.
- THÉRY, C. et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 7, n. 1, p. 1535750, 1 dez. 2018.
- THOUNAOJAM, M. C. et al. MicroRNA-34a (miR-34a) Mediates Retinal Endothelial Cell Premature Senescence through Mitochondrial Dysfunction and Loss of Antioxidant Activities. **Antioxidants**, v. 8, n. 9, p. 328, 22 ago. 2019.
- TIAN, F. et al. miR-210 in Exosomes Derived from Macrophages under High Glucose Promotes Mouse Diabetic Obesity Pathogenesis by Suppressing NDUFA4 Expression. **Journal of Diabetes Research**, v. 2020, p. 1–12, 19 mar. 2020.
- TOMASEK, J. J. et al. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 3, n. 5, p. 349–363, 1 maio 2002.
- TOMCIK, M. et al. S100A4 amplifies TGF- $\beta$ -induced fibroblast activation in systemic sclerosis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 74, n. 9, p. 1748–1755, set. 2015.
- TSCHUMPERLIN, D. J. Fibroblasts and the Ground They Walk On. **Physiology**, v. 28, n. 6, p. 380–390, nov. 2013.
- TSOU, H. et al. Apoptosis signal-regulating kinase 1 is mediated in TNF- $\alpha$ -induced CCL2 expression in human synovial fibroblasts. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 113, n. 11, p. 3509–3519, 18 nov. 2012.
- TURNER, N. et al. Mechanism of TNF $\alpha$ -induced IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 expression in human cardiac fibroblasts: Effects of statins and thiazolidinediones. **Cardiovascular Research**, v. 76, n. 1, p. 81–90, 1 out. 2007.
- VALIN, A. et al. IL6/sIL6R regulates TNF $\alpha$ -inflammatory response in synovial fibroblasts through modulation of transcriptional and post-transcriptional mechanisms. **BMC Molecular and Cell Biology**, v. 21, n. 1, p. 74, 30 dez. 2020.
- VAN CAAM, A. et al. Unraveling SSc Pathophysiology; The Myofibroblast. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 13 nov. 2018.
- VAN LINTHOUT, S.; MITEVA, K.; TSCHOPE, C. Crosstalk between fibroblasts and inflammatory cells. **Cardiovascular Research**, v. 102, n. 2, p. 258–269, 1 maio 2014.

- VAN TONDER, A.; JOUBERT, A. M.; CROMARTY, A. D. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. **BMC Research Notes**, v. 8, n. 1, p. 47, 20 dez. 2015.
- VU, T. N. et al. Interferon- $\gamma$  enhances the antifibrotic effects of pirfenidone by attenuating IPF lung fibroblast activation and differentiation. **Respiratory Research**, v. 20, n. 1, p. 206, 11 dez. 2019.
- VUONG, D. et al. Molecular classification of breast cancer. **Virchows Archiv**, v. 465, n. 1, p. 1–14, 31 jul. 2014.
- WAGNER, I. J. et al. Obesity impairs wound closure through a vasculogenic mechanism. **Wound Repair and Regeneration**, p. n/a-n/a, jul. 2012.
- WANG, F. et al. Cancer-associated fibroblast regulation of tumor neo-angiogenesis as a therapeutic target in cancer (Review). **Oncology Letters**, 25 jan. 2019a.
- WANG, H. et al. Adiponectin partially rescues high glucose/high fat-induced impairment of mitochondrial biogenesis and function in a PGC-1 $\alpha$  dependent manner. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 21, n. 3, p. 590–599, jan. 2017.
- WANG, H. et al. Characteristics of pre-metastatic niche: the landscape of molecular and cellular pathways. **Molecular Biomedicine**, v. 2, n. 1, p. 3, 30 dez. 2021a.
- WANG, P.; HENNING, S. M.; HEBER, D. Limitations of MTT and MTS-Based Assays for Measurement of Antiproliferative Activity of Green Tea Polyphenols. **PLoS ONE**, v. 5, n. 4, p. e10202, 16 abr. 2010.
- WANG, R. et al. The Clinicopathological features and survival outcomes of patients with different metastatic sites in stage IV breast cancer. **BMC Cancer**, v. 19, n. 1, p. 1091, 12 dez. 2019b.
- WANG, W.; SEALE, P. Control of brown and beige fat development. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 17, n. 11, p. 691–702, 24 nov. 2016.
- WANG, X. et al. Effects of CAF-Derived MicroRNA on Tumor Biology and Clinical Applications. **Cancers**, v. 13, n. 13, p. 3160, 24 jun. 2021b.
- WANG, Y. et al. MDSCs: Key Criminals of Tumor Pre-metastatic Niche Formation. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 7 fev. 2019c.
- WANG, Z. et al. Metastasis-associated fibroblasts: an emerging target for metastatic cancer. **Biomarker Research**, v. 9, n. 1, p. 47, 10 dez. 2021c.
- WATANABE, K. et al. Leptin enhances cytokine/chemokine production by normal lung fibroblasts by binding to leptin receptor. **Allergology International**, v. 68, p. S3–S8, set. 2019.
- WEI, H. et al. Regulation of exosome production and cargo sorting. **International Journal of Biological Sciences**, v. 17, n. 1, p. 163–177, 2021.
- WEI, K.; NGUYEN, H. N.; BRENNER, M. B. Fibroblast pathology in inflammatory diseases. **Journal of Clinical Investigation**, v. 131, n. 20, 15 out. 2021.
- WELCH, D. R.; HURST, D. R. Defining the Hallmarks of Metastasis. **Cancer**

**Research**, v. 79, n. 12, p. 3011–3027, 15 jun. 2019.

WHITE, E. S. Lung Extracellular Matrix and Fibroblast Function. **Annals of the American Thoracic Society**, v. 12, n. Supplement 1, p. S30–S33, mar. 2015.

WINKLER, J. et al. Concepts of extracellular matrix remodelling in tumour progression and metastasis. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 5120, 9 dez. 2020.

WU, S. et al. Evaluating intrinsic and non-intrinsic cancer risk factors. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 3490, 28 dez. 2018.

XI, X. et al. Ocular Fibroblast Diversity: Implications for Inflammation and Ocular Wound Healing. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 52, n. 7, p. 4859, 30 jun. 2011.

XIAO, W. et al. Breast cancer subtypes and the risk of distant metastasis at initial diagnosis: a population-based study. **Cancer Management and Research**, v. Volume 10, p. 5329–5338, nov. 2018.

YANG, H.-M. et al. Resistin impairs mitochondrial homeostasis via cyclase-associated protein 1-mediated fission, leading to obesity-induced metabolic diseases. **Metabolism**, v. 138, p. 155343, jan. 2023.

YANG, P. et al. Cervical cancer cell-derived angiopoietins promote tumor progression. **Tumor Biology**, v. 39, n. 7, p. 101042831771165, 18 jul. 2017.

YANG, S.-S. et al. Breast cancer-derived exosomes regulate cell invasion and metastasis in breast cancer via miR-146a to activate cancer associated fibroblasts in tumor microenvironment. **Experimental Cell Research**, v. 391, n. 2, p. 111983, jun. 2020.

YANG, Y. et al. Exosomal PD-L1 harbors active defense function to suppress T cell killing of breast cancer cells and promote tumor growth. **Cell Research**, v. 28, n. 8, p. 862–864, 29 ago. 2018.

YANO, F. et al. Effects of conditioned medium obtained from human adipose-derived stem cells on skin inflammation. **Regenerative Therapy**, v. 20, p. 72–77, jun. 2022.

YIN, L. et al. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. **Breast Cancer Research**, v. 22, n. 1, p. 61, 9 dez. 2020.

YING, W. et al. Adipose Tissue Macrophage-Derived Exosomal miRNAs Can Modulate In Vivo and In Vitro Insulin Sensitivity. **Cell**, v. 171, n. 2, p. 372- 384.e12, out. 2017.

YOKOI, A.; OCHIYA, T. Exosomes and extracellular vesicles: Rethinking the essential values in cancer biology. **Seminars in Cancer Biology**, v. 74, p. 79–91, set. 2021.

YU, Y. et al. Cancer-associated fibroblasts induce epithelial–mesenchymal transition of breast cancer cells through paracrine TGF- $\beta$  signalling. **British Journal of Cancer**, v. 110, n. 3, p. 724–732, 12 fev. 2014.

YUAN, Z. et al. Impact of human adipose tissue-derived stem cells on dermatofibrosarcoma protuberans cells in an indirect co-culture: an in vitro study. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 12, n. 1, p. 440, 6 dez. 2021.

ZATTERALE, F. et al. Chronic Adipose Tissue Inflammation Linking Obesity to Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. **Frontiers in Physiology**, v. 10, 29 jan. 2020.

ZHANG, Y. et al. Macrophage migration inhibitory factor activates the inflammatory response in joint capsule fibroblasts following post-traumatic joint contracture. **Aging**, v. 13, n. 4, p. 5804–5823, 28 fev. 2021.

ZHAO, M. et al. MicroRNA-34a: A Novel Therapeutic Target in Fibrosis. **Frontiers in Physiology**, v. 13, 20 jun. 2022.

ZHAO, R. et al. Composition, isolation, identification and function of adipose tissue-derived exosomes. **Adipocyte**, v. 10, n. 1, p. 587–604, 1 jan. 2021.

ZHDANOV, A. V. et al. Low energy costs of F1Fo ATP synthase reversal in colon carcinoma cells deficient in mitochondrial complex IV. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 106, p. 184–195, maio 2017.

ZHOU, Z. et al. Adipose Extracellular Vesicles: Messengers From and to Macrophages in Regulating Immunometabolic Homeostasis or Disorders. **Frontiers in immunology**, v. 12, p. 666344, 2021.

ZHU, R.; LI, X.; MA, Y. miR-23b-3p suppressing PGC1 $\alpha$  promotes proliferation through reprogramming metabolism in osteosarcoma. **Cell Death & Disease**, v. 10, n. 6, p. 381, 16 maio 2019.

ZOROVA, L. D. et al. Mitochondrial membrane potential. **Analytical Biochemistry**, v. 552, p. 50–59, jul. 2018.

ZUBAIR, M.; WANG, S.; ALI, N. Advanced Approaches to Breast Cancer Classification and Diagnosis. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, 26 fev. 2021.

ZWICK, R. K. et al. Anatomical, Physiological, and Functional Diversity of Adipose Tissue. **Cell Metabolism**, v. 27, n. 1, p. 68–83, jan. 2018.