

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS –
IMUNOLOGIA E DIP/ GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA

Gabriela Coeli Menezes Evangelista

**PAPEL DA RESPOSTA IMUNE CELULAR DA OBESIDADE NA
PROGRESSÃO DO CARCINOMA MAMÁRIO EXPERIMENTAL**

JUIZ DE FORA

2016

GABRIELA COELI MENEZES EVANGELISTA

**PAPÉL DA RESPOSTA IMUNE CELULAR DA OBESIDADE NA
PROGRESSÃO DO CARCINOMA MAMÁRIO EXPERIMENTAL**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Imunologia, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas: Área: Imunologia.

Orientadora: Prof^a Dra. Jacy Gameiro

JUIZ DE FORA

2016

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

Evangelista, Gabriela Coeli Menezes.

Papel da resposta imune celular da obesidade na progressão do carcinoma mamário experimental / Gabriela Coeli Menezes

Evangelista. -- 2016.

86 f.

Orientadora: Jacy Gameiro

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2016.

1. Obesidade. 2. Câncer de mama. 3. Resposta celular. 4. Linfonodos inguinais drenantes. I. Gameiro, Jacy , orient. II. Título.

GABRIELA COELI MENEZES EVANGELISTA

**Papel da resposta imune celular da obesidade na progressão do
carcinoma mamário experimental**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, na área de Imunologia e Doenças Infecto Parasitárias, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, na área de Imunologia e Doenças Infecto Parasitárias.

Aprovada em _____ de _____ de 2016.

BANCA EXAMINADORA:

Prof.^a Dr.^a Jacy Gameiro

Orientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr.^a Mariana Renovato Martins

Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Prof.^o Dr. Carlos M. C. Maranduba

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dedico esse trabalho
aos grandes amores da minha vida:
Regina, Geraldo e Neima.

AGRADECIMENTO

Primeiramente queria agradecer à minha família, ao centro do meu mundo, que me permitiu estar aqui, me apoiou, me incentivou e me amou. Pai, mãe e Neiminha, dedico não só esse trabalho, mas toda a minha vida à vocês, meus amores eternos!

Gostaria de agradecer também à minha família de longe, minha querida e amada avó Neima, meus tios e primos, que sempre torceram por mim. Meu agradecimento vai também para minha terceira família: Kim, Ana e Dedé que também me deram boas doses de coragem para enfrentar isso tudo. E por falar no meu amor, não tem como não dedicar esse trabalho à você que sempre esteve ao meu lado, tão paciente, tão dedicado me encorajando a cada tropeço. Você com certeza foi uma das minhas maiores fortalezas.

Ainda ganhei outra família nesse período, os Gameiro's, que foram essências na construção desse trabalho que contou com muitas mãos e corações, como as de Sarinha, Aninha, Lucia, Jucy, Felipe, Guilherme, Luisa, Maíra, Mayara, Juju, Paula, Rafa, Ranieri, a recém-chegada Bárbara (que me deu o empurrão inicial) e claro, a responsável por essa união toda, a Jacy, que me ensinou muito além da ciência. Uma parte especial dessa família foi a irmã que ganhei, a Polly, que segurou minha mão por todo esse processo, que foi co-orientadora, mãe, irmã, ouvinte e consoladora não apenas nas horas vagas, mas em tempo integral! Amo vocês!

Finalmente, gostaria de agradecer aos nossos companheiros do IMUNOCET, que pacientemente cederam de forma muito acolhedora seu espaço, seus equipamentos e, muitas vezes, até reagente para que todo esse trabalho fosse adiante. Muito obrigada, torço por cada um de vocês!

Não poderia me esquecer dos outros professores que me ajudaram nessa luta, primeiramente a professora Ana Paula, que, além do espaço, também dedicou seu tempo angariando melhoras para nós, ao professor Gilson, que com toda a paciência do mundo, me acolheu em horas de desespero, me mostrou as melhores direções e sempre esteve disponível para uma boa conversa e ao professor Henrique, que sempre me incentivou, me deu suporte técnico e muita coragem principalmente nas horas depois do expediente!!!

À vocês minha gratidão sem tamanho, gostaria de retribuir minimamente a cada um o que fizeram por mim! Muito, muito obrigada!

RESUMO

Atualmente a obesidade é um problema de saúde pública, que afetar todas as idades, classes sociais e regiões do planeta. Segundo dados da OMS de 2016, 13% da população adulta é considerada obesa. No Brasil 12,4% dos homens e 16,9% das mulheres acima de 18 anos foram considerados obesos, em 2011, pelo Ministério da Saúde. O câncer de mama é o único câncer diagnosticado em todas as regiões do planeta e, segundo a Sociedade Americana de Câncer, em 2012, o câncer de mama foi responsável por 25% dos novos casos e matou mais de meio milhão de mulheres. As brasileiras também sofrem com o tumor de mama que é o mais diagnosticado no Brasil, segundo dados de 2016 do INCA.

A obesidade duplica a chance de desenvolver câncer de mama e isso está relacionado à inflamação crônica de baixo grau instaurada pelo acúmulo de gordura que recruta células inflamatórias secretoras de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, aumentando a inflamação. Nesse contexto as células mamárias malignas se apropriam dessa inflamação e seus mediadores para promover sua sobrevivência, proliferação, disseminação e metástase.

Para identificarmos o papel da obesidade no tumor mamário, utilizamos o modelo experimental de câncer de mama murino 4T1 em animais Balb/c fêmeas alimentadas por 16 semanas com dieta padrão ou dieta hiperlipídica (60% das quilocalorias são lipídeos). Cada animal foi pesado semanalmente e o consumo médio diário de ração foi calculado. Ao final das 16 semanas mais os 21 dias de injeção do tumor, os animais foram eutanasiados para a quantificação do peso das gorduras perigonadais e retroperitoniais e remoção dos linfonodos inguinais drenantes do tumor para realização da citometria de fluxo.

Os resultados indicaram que os animais alimentados com HFD, ganharam mais peso mesmo consumindo menos ração em relação, aos animais alimentados com dieta padrão. Esse ganho de peso refletiu em uma maior adiposidade nos obesos, devido ao maior peso das gorduras perigonadais e retroperitoniais. Além disso, os animais obesos apresentaram um maior Índice de Lee em relação aos controles.

Nosso trabalho indicou uma queda generalizada da resposta imune contra tumor, pois observamos uma diminuição no número de células totais dos linfonodos drenantes do tumor, refletindo num menor número de células dendríticas e macrófagos, que apresentaram menor ativação com baixas expressões dos co-estimuladores CD80 e CD86; e numa redução da resposta adaptativa, tanto no número de células efetoras como linfócitos auxiliares e citotóxicos quanto no número de células reguladoras como os linfócitos Breg e Treg. Além disso, também observamos um desbalanço entre a citocina inflamatória IFN- γ e a citocina anti-inflamatória IL-10, produzidas por linfócitos CD4⁺ e CD8⁺.

Em conjunto, nossos dados nos permitem concluir que a obesidade afeta diretamente o sistema imune através da diminuição da resposta celular contra o tumor como um todo, essa regulação pode ser devido a modulação da hematopoiese e indução de células MDSC.

Palavras-chave: Obesidade, câncer de mama, resposta celular, linfonodos inguinais drenantes.

ABSTRACT

Nowadays the obesity is a public health issue capable to affect all ages, social classes, and regions of the globe. According to data from World Health Organization in 2014, 13% of the adult population is considered obese. In Brazil the numbers are also startling: in the adult population 12.4% of the men and 16.9% of women already were considered obese in 2011 by Ministry of Health. Breast cancer is the only one diagnosed in all regions of the planet and, according to American Society of Cancer, in 2012 this type of cancer was responsible for 25% of the new cases and killed more than half millions of women. The Brazilian women undergo by breast cancer, which is the most commonly diagnosed among Brazilian women, according to data from National Institute of Cancer in 2015.

It is certain that the obesity duplicates the chances to develop breast cancer and it is correlated to the low grade chronic inflammation established by the fat accumulation which recruits inflammatory cells that secrete cytokines, chemokines, and growth factors, increasing the inflammation. In this context the malignant mammalian cells get hold of this inflammation and its mediators to promote its own survival, proliferation, dissemination, and metastasis.

To identify the role of the obesity in malignant breast tumor, we utilized in this project the experimental murine model of breast cancer 4T1 in animals Balb/c females fed for 16 weeks with the pattern diet or high-fat diet which 60% of kilocalories coming from lipids. Each animal was weekly weighed and the individual average intake was calculated. At the end of the 16 weeks more 21 tumor days after injection, the animals were euthanized for removal of the perigonadal and retroperitoneal fat-pads and also for the removal of the draining inguinal lymph nodes of the tumor to flow cytometry analysis.

The results indicate that the animals fed with HFD, had weight gain even eating less than the animals fed by control diet. This gain reflected in a major adiposity in obese animals due to higher weight of the perigonadal and retroperitoneal fat-pads. Moreover, the obese animals had a higher Lee Index on comparison of the control animals.

Our work indicated a general decrease in the immune response against the tumor because was observed a decay of the number of the total cells of the tumor lymph nodes drainage, which reflected a low number of macrophages and dendritic cells, which also presents a lower activation with low expression of co-stimulators CD80 and CD86; and a decrease in the number of cells from adaptive response effector and in regulator cells like lymphocytes Breg and Treg. In addition, was also observed an unbalancing between the inflammatory cytokine IFN γ and the anti-inflammatory cytokine IL-10, produced by lymphocytes CD4⁺ and CD8⁺.

Together, this data allowed us to conclude that the obesity directly affects the immune system through the reduction of the cellular response against the tumor, this setting can be due to modulation of hematopoiesis and induction of MDSC.

Key words: Obesity, breast cancer, immune response, draining inguinal lymph nodes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01:	Prevalência de obesidade no mundo, em indivíduos de ambos os sexos, com 18 anos ou mais no ano de 2014.....	Pág. 20
Figura 02:	Prevalência de excesso de peso e obesidade na população adulta (com 20 ou mais anos) masculina e feminina no Brasil entre os períodos de 1974 a 2009.....	Pág. 22
Figura 03:	Esquema ilustrativo dos componentes do tecido mamário normal.....	Pág. 27
Figura 04:	Variação internacional da taxa de incidência de câncer de mama em 2012.....	Pág. 28
Figura 05:	Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 em mulheres no Brasil.....	Pág. 29
Figura 06:	Características funcionais adquiridas durante o processo de transição de uma células saudável para uma células maligna.....	Pág 32
Figura 07:	Modulação do tecido adiposo durante o ganho de peso.....	Pág 34
Figura 08:	Esquema do microambiente tumoral e a influência das quimiocinas na evasão do sistema imunológico, angiogênese e intravassamento e extravassamento.....	Pág. 37
Figura 09:	Esquema ilustrativo do delineamento experimental.....	Pág. 45
Figura 10:	Ganho de peso corporal e menor consumo de ração dos animais obesos.....	Pág. 53
Figura 11:	Aumento do peso das gorduras corporais em animais obesos.....	Pág. 51

Figura12:	Aumento do Índice de Lee em obesos.....	Pág. 54
Figura 13:	Diminuição do número de células nos linfonodos inguinais, das células granulosas e linfoides em obesos.....	Pág. 55
Figura 14:	Diminuição da resposta imune inata em animais obesos.....	Pág. 57
Figura 15:	Diminuição da maturação das células dendríticas e de macrófagos nos animais obesos.....	Pág. 58
Figura 16:	Diminuição da resposta imune adaptativa em animais obesos.....	Pág. 60
Figura 17:	Desbalanço de citocinas de perfil pró-inflamatório e anti-inflamatório em animais obesos e controles com câncer de mama 4T1.....	Pág. 62
Figura 18:	Diminuição da resposta imune de linfócitos B regulatórios em animais obesos.....	Pág. 64
Figura 19:	Diminuição resposta imune de linfócitos T regulatórios em animais obesos.....	Pág. 66

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Condições associadas à obesidade.....	Pág. 19
Tabela 02: Classificação de sobrepeso em adultos de acordo com o Índice de Massa Corpórea.....	Pág. 23
Tabela 03: Componentes de 1kg de ração rica em gordura (HFD).....	Pág. 43
Tabela 04: Relação das populações caracterizadas e seus respectivos receptores e flurocromos utilizados.....	Pág. 49

LISTA DE SIGLAS

APC	“Antigen-presenting cell” – em português células apresentadoras de antígenos
BCR	“B cell receptor” – em português receptor de célula B
Breg	Linfócitos B regulatórios
CAF	“Cancer-associated fibroblasts” – em português fibroblastos associados ao câncer
CCL2	“C-C motif chemokine 2” – em português ligante de quimiocina 2
CCL3	“C-C motif chemokine 3” – em português ligante de quimiocina 3
CCL4	“C-C motif chemokine 4” – em português ligante de quimiocina 4
CCL5	“C-C motif chemokine 5” – em português ligante de quimiocina 5
CCL11	“C-C motif chemokine 11” – em português ligante de quimiocina 11
CTL	“Cytotoxic T lymphocytes” – em português linfócitos T citotóxicos
CTR	Controles
CXCL1	“C-X-C motif chemokine 1” – em português ligante de quimiocina 1
CXCL3	“C-X-C motif chemokine 3” – em português ligante de quimiocina 3
CXCL5	“C-X-C motif chemokine 5” – em português ligante de quimiocina 5
CXCL7	“C-X-C motif chemokine 7” – em português ligante de quimiocina 7
CXCL8	“C-X-C motif chemokine 8” – em português ligante de quimiocina 8
CXCL10	“C-X-C motif chemokine 10” – em português ligante de quimiocina 10
CXCL12	“C-X-C motif chemokine 12” – em português ligante de quimiocina 12
CSF1	“Colony-stimulating factor 1” – em português fator estimulador de crescimento de colônia 1

CSF1R	“CSF1 receptor” – em português receptor de CFS1
DC	“Dendritic cells” – em português células dendríticas
DCNT	Plano de ações estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis
DMEM	“Dulbecco’s modified eagle’s medium” – em português meio modificado de dulbecco’s
Endef	Estudo Nacional da Despesa Familiar
EGF	“Epidermal growth factor” – em português fator de crescimento epidérmico
EGFR	“EGF receptor” – em português receptor do EGF
GM-CSF	“Granulocyte macrophage colony stimulating factor” – em português fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
HFD	“High-fat diet” – em português dieta rica em gordura
IL-1	“Interleukin - 1” – em português interleucina - 1
IL-1 β	“Interleukin - 1 beta” – em português interleucina - 1 beta
IL-3	“Interleukin - 3” – em português interleucina - 3
IL-4	“Interleukin - 4” – em português interleucina - 4
IL-5	“Interleukin - 5” – em português interleucina - 5
IL-6	“Interleukin - 6” – em português interleucina -6
IL-8	“Interleukin - 8” – em portuguêsinterleucina - 8
IL-10	“Interleukin - 10” – em português interleucina - 10
IL-12	“Interleukin - 12” – em português interleucina - 12
IL-13	“Interleukin - 13” – em português interleucina - 13

IL-15	“Interleukin - 15” – em português interleucina - 15
IMC	Índice de massa corpórea
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IFN- γ	Interferon gama
MCP-1	“Monocyte chemotactic protein - 1” – em português proteína quimiotática de monócitos
MHC	“Major histocompatibility complex” – em português complexo de histocompatibilidade principal
MHC I	“Major histocompatibility complex class I” – em português complexo de histocompatibilidade principal classe I
MHC II	“Major histocompatibility complex class II” – em português complexo de histocompatibilidade principal classe II
MIF	Média de intensidade de fluorescência
MMP	“Matrix metalloproteinase” – em português metaloproteinase de matriz
MSC	“Mesenchymal stem cells” – em português células tronco mesenquimais
MDSC	“Myeloid-derived suppressor cells” – em português células supressoras derivadas de mielóides
NK	“Natural killer cells” – em português células exterminadoras naturais
NLR	“NOD-like receptors” – em português receptores do tipo NOD
OB	Obesos
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAMP	“Pathogen-associated molecular pattern” – em português padrões moleculares associados à patógenos
PBS	“Phosphate-buffered saline” – em português tampão fosfato-salino

PDGF	“Platelet-derived growth factor” – em português fator de crescimento derivado de plaquetas
PNSN	Pesquisa Nacional de Saúde e Nutrição
POF	Pesquisas de Orçamentos Familiares
Kcal	Quilocalorias
RPM	Rotações por minuto
RPMI	“Roswell Park Memorial Institute” – em português meio de cultura RPMI
SFB	Soro fetal bovino
SD	“Standard deviation” – em português desvio padrão
TAL	“Tumour-associated lymphocytes” – em português linfócitos associados ao tumor
TAM	“Tumour-associated macrophages” – em português macrófagos associados ao tumor
TAN	“Tumour-associated neutrophils” – em português neutrófilos associados ao tumor
TCD4 ⁺	Linfócitos T auxiliares
TCD8 ⁺	Linfócitos T citotóxicos
TCR	“T cell receptor” – em português receptor de célula T
TEM	Transição epitélio-mesenquimal
TGF	“Transforming growth factor” – em português fator transformador de crescimento
TGF- β	“Transforming growth factor- β ” – em português fator transformador de crescimento beta
Th1	“T helper 1” – em português linfócito T auxiliar 1

Th2	“T helper 2” – em português linfócito T auxiliar 2
Th17	“T helper 17” – em português linfócito T auxiliar 17
TLR	“Toll-like receptors” – em português receptores do tipo toll
TNF- α	“Tumor necrosis factor alpha” – em português fator de necrose tumoral alpha
TNF- β	“Tumor necrosis factor beta” – em português fator de necrose tumoral beta
Treg	Linfócitos T regulatórios
VEGF	“Vascular endothelial growth factor” – em português fator de crescimento endotelial e vascular
VEGFR	“VEGF receptor” – em português receptor do VEGF
VIGITEL	Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico
UNICEF	Fundo das Nações Unidas para a Infância

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Obesidade	18
1.2	Câncer	25
1.3	Obesidade, câncer de mama e sistema imunológico	31
2	JUSTIFICATIVA	39
3	OBJETIVOS	41
3.1	Objetivo geral	41
3.2	Objetivos específicos	41
4	MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1	Animais	42
4.2	Indução da obesidade	43
4.3	Cultura de células da linhagem 4T1	44
4.4	Indução do modelo de câncer de mama ortotópico <i>in vivo</i>	44
4.5	Delineamento experimental	45
4.6	Eutanásia	46
4.7	Citometria de fluxo	46
4.8	Análise estatística	50
5	RESULTADOS	51
5.1	Avaliação do modelo de obesidade	51
5.2	Avaliação do perfil dos linfonodos	54
5.3	Avaliação do perfil de células da resposta inata nos linfonodos	55
5.4	Avaliação do perfil de células da resposta adaptativa nos linfonodos	59
5.5	Avaliação do perfil de citocinas dos linfócitos TCD4⁺ E TCD8⁺ nos linfonodos	61
5.6	Avaliação do perfil de linfócitos regulatórios nos linfonodos	63
6	DISCUSSÃO	67
7	CONCLUSÃO	78
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

1 INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a obesidade é uma doença complexa, multifatorial, com dimensões fisiológicas, sociais e psicológicas, que afeta um amplo espectro de indivíduos (praticamente todas as idades e grupos sociais) e é caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura abdominal capaz de prejudicar a saúde do indivíduo e gerar uma inflamação sistêmica crônica de baixo grau, com presença de numerosos marcadores inflamatórios, que estão diretamente correlacionados com o grau de obesidade (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015).

A crescente industrialização, urbanização e mecanização levou, em dimensão global, à alterações nos padrões alimentares (com o aumento da ingestão de alimentos ricos em gordura em detrimento à ingestão de alimentos de baixo teor calórico e ricos em fibras), nas formas de trabalho cada vez mais sedentárias e na queda da realização de atividade física. Esses fatores, juntamente com a falta de políticas públicas de apoio à setores como saúde, agricultura, transportes, marketing consciente e educação alimentar, levaram a uma epidemia de obesidade. Atualmente, a obesidade é considerada um problema de saúde pública, que acarreta diversos danos para a saúde dos indivíduos como observado na tabela 01 e gera custos sociais e econômicos inestimáveis, como a redução da qualidade de vida e dias de trabalho perdidos, visitas médicas, pensões por incapacidade e mortalidade prematura (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

Tabela 01: Condições associadas à obesidade. Adaptado de (PEREIRA; FRANCISCHI; LANCHETA JR., 2003).

Cardiovasculares	Hipertensão	Ortopédicas	Osteoartrite
	Trombose		Gota
	Acidente vascular cerebral	Endócrinas	Síndrome do ovário policístico
Respiratórias	Falta de ar		Irregularidades menstruais
Gastrointestinais	Apnéia do sono	Gavidez	Operação por cesariana
	Hérnia de hiato		Macrogenitossomia
Metabólicas	Esteatose	Cânceres	Defeito no tubo neural
	Hiperlipidemia		Câncer de mama
	Resistência à insulina		Câncer endometrial
	Diabetes mellitus		Câncer de próstata
			Câncer de col retal

Antes considerado um problema de países com renda elevada, o excesso de peso e obesidade estão agora em ascensão em países de baixa e média renda, especialmente em ambientes urbanos, onde o aumento dos níveis de obesidade muitas vezes coexistem na mesma população (ou até mesmo na mesma família) com quadro de subnutrição. Isso ocorre porque crianças desses países são mais vulneráveis à inadequado acompanhamento pré-natal e nutricional na infância e juventude. Ao mesmo tempo, essas crianças são expostas a alimentos com elevado teor de gordura e/ou açúcar e pobres em micronutrientes de alta densidade energética, já que esse tipo de dieta tende a ter um custo mais baixo, porém também tem menor qualidade nutritiva. Estes padrões alimentares em conjunto com níveis mais baixos de atividade física, resultam em aumentos acentuados da obesidade infantil, enquanto os problemas de subnutrição continuam presentes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

Estudos epidemiológicos realizadas com pessoas gestadas durante o período da fome Holandesa (dezembro de 1944 – abril 1945), indicaram que a desnutrição durante a vida intra-uterina gera adaptações capazes de modular processos metabólicos como acúmulo de gordura, síntese de adipócitos e resistência à insulina, durante a vida adulta o que aumentariam os riscos de desenvolvimento de doenças. Roseboom e colaboradores em 2001, demonstraram que pessoas expostas à desnutrição no início da gestação, possuíam um maior IMC, modificação

da distribuição da gordura corporal e maior risco de doenças cardiovasculares na vida adulta, além disso, outro estudo estabeleceu uma associação entre a exposição à fome durante a gestação e a diminuição da tolerância à glicose em adultos com 50 anos (RAVELLI et al., 1998; ROSEBOOM et al., 2001). Esses estudos foram confirmados em modelo animal, onde a desnutrição fetal e o excesso de alimentação logo após o nascimento, induziram um “catch-up” (crescimento rápido) que favoreceu a programação da obesidade na vida adulta, porém essa programação foi dependente do tipo de desnutrição, do momento da gestação em que esse déficit ocorreu e do catch-up alcançado (BIESWAL et al., 2006).

Dados da OMS atualizados em janeiro de 2015 indicam que a obesidade em adultos¹ mais do que duplicou desde 1980 no planeta. Em números percentuais, 39% dos adultos estavam acima do peso e 13% já eram considerados obesos em todo mundo no ano de 2014. A figura 01 apresenta o mapa mundial da prevalência da obesidade em homens e mulheres e a sua distribuição pelo planeta (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015).

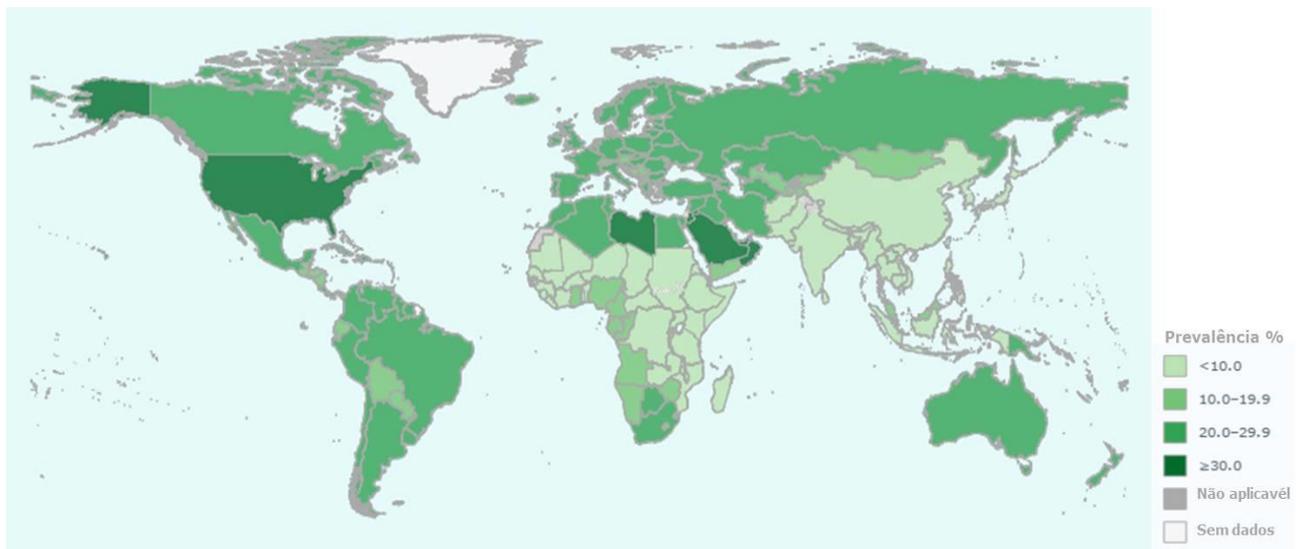


Figura 01: Prevalência de obesidade ($IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$) no mundo, em indivíduos de ambos os sexos, com 18 anos ou mais no ano de 2014. Adaptado de (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016a).

Essa doença também representa um risco para crianças, pois, além dos distúrbios citados na Tabela 01, a obesidade infantil aumenta as chances de morte prematura, pode acarretar algumas incapacidades físicas na vida adulta e pode

¹ Adultos são pessoas com 18 anos ou mais.

gerar efeitos psicológicos, como baixa auto-estima, depressão e isolamento social. De acordo com levantamentos de 2013 feitos pelo Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF), pela OMS e pelo Banco Mundial, entre 2000 e 2013, o número de crianças menores de cinco anos com excesso de peso em todo o mundo aumentou de 32 para 42 milhões. Se essa tendência continuar, estima-se que a prevalência de sobrepeso infantil, vai subir para 11% em todo o mundo no ano de 2025 (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2000). Além disso, a obesidade infantil é um forte preditor da obesidade na idade adulta, o que gerará fortes consequências, tanto para o indivíduo quanto para a sociedade como um todo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016b).

Os dados mais recentes, sobre obesidade e sobrepeso no Brasil, foram reunidos no “Plano de ações estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis” (DCNT), 2011-2022, um levantamento composto por quatro diferentes inquéritos (Estudo Nacional da Despesa Familiar (Endef), a Pesquisa Nacional de Saúde e Nutrição (PNSN) e as Pesquisas de Orçamentos Familiares (POF) e o mais recente Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL BRASIL 2010)) realizados ao longo de diversos anos e organizados pelo Ministério da Saúde. Esse plano demonstra em diferentes contextos e abordagens, os aspectos do sobrepeso e da obesidade (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILANCIA EM SAÚDE, 2011).

A proporção de adultos obesos tem aumentado de forma progressiva no Brasil, atingindo 12,4% dos homens e 16,9% das mulheres, em 2009, como demonstra a figura 02. O excesso de peso e a obesidade entre jovens e crianças também foi preocupante, pois já atingem, 33,5% dos jovens e 14,3% das crianças e a prevalência de obesidade em jovens foi de 5,9% em meninos e 4% em meninas (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILANCIA EM SAÚDE, 2011).

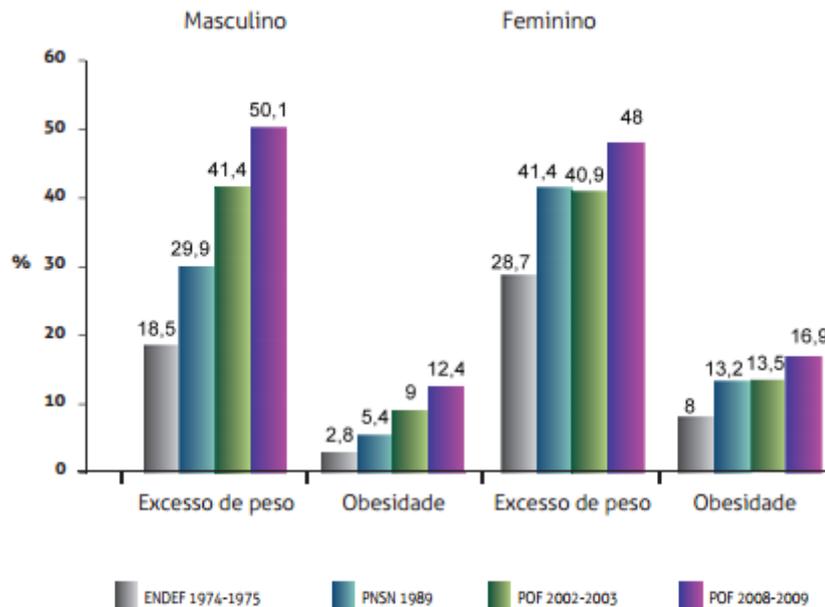


Figura 02: Prevalência de excesso de peso e obesidade na população adulta (com 20 ou mais anos) masculina e feminina no Brasil entre os períodos de 1974 a 2009. Adaptado de (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILANCIA EM SAÚDE, 2011).

A medida utilizada pela Organização Mundial da Saúde e pelo Ministério da Saúde brasileiro para classificar sobrepeso e obesidade foi o Índice de Massa Corporal (IMC) (tabela 02), calculado a partir da relação do peso (em quilos) dividido pela altura (em metros ao quadrado) de cada indivíduo. O IMC é uma ferramenta bem aplicável pois seu cálculo é idêntico para ambos os sexos, para todas as idades e é um importante indicador de fator de risco para doenças não transmissíveis. No entanto, este índice deve ser considerado um guia, pois pode não corresponder ao mesmo nível de gordura em diferentes indivíduos, correndo o risco de gerar grandes variações de obesidade. Uma pessoa com IMC de 30 kg/m^2 ou mais é considerada obesa e uma pessoa com IMC igual ou maior que 25 kg/m^2 é considerada com sobrepeso. E essa medida portanto pode ser usada como um sinal de risco para o aparecimento de comorbidades como doenças crônicas (diabetes, doenças cardiovasculares e cânceres) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

Tabela 02: Classificação de sobrepeso e obesidade em adultos de acordo com o Índice de Massa Corpórea. Adaptado de (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

Classificação	IMC (kg/m²)	Risco de comorbidades
Subpeso	<18,5	Baixo
Média normal	18,5 – 24,9	Médio
Sobrepeso	≥25,0	Elevado
Pré-obeso	25,0 – 29,9	Alto
Obeso classe I	30,0 – 34,9	Altamente elevado
Obeso classe II	35,0 – 39,9	Grave
Obeso classe III	≥40,0	Altamente grave

Indivíduos adultos com IMC normal possuem em média 3 a 4 kg de tecido adiposo, já em indivíduos obesos com IMC ≥ 40 esse tecido pode chegar a 45 kg em alguns casos. O tecido adiposo, anteriormente creditado apenas como um reservatório de energia, passou a ser reconhecido como um importante órgão endócrino, pois a distribuição, tamanho e quantidade de adipócitos, podem regular processos fisiológicos fundamentais (SUNDARA RAJAN; LONGHI, 2016). O tecido adiposo é composto por múltiplos depósitos de gordura, que são agrupados em dois tipos diferentes: o tecido adiposo marrom e o tecido adiposo branco. O primeiro, está relacionado ao gasto de energia e termogênese (transformando gordura em calor) em resposta à estímulos percebidos pelo sistema nervoso central e por isso possui um número grande de mitocôndrias e é bem vascularizado. O segundo, está envolvido no controle da homeostase energética, bem como na produção de hormônios e moléculas inflamatórias como as adipocinas, relacionadas com a inflamação (TRAN; KAHN, 2010).

O tecido branco representa a maior parte da gordura corporal e possui diferentes funções e efeitos metabólicos de acordo com sua localização, assim dois depósitos se destacam: o tecido adiposo subcutâneo e o tecido adiposo visceral. Estudos epidemiológicos descobriram que o crescimento do tecido adiposo visceral é determinante para a obesidade, pois é responsável pelo aumento da circunferência abdominal e do diâmetro do quadril, além de estar diretamente associado às doenças como resistência à insulina, diabetes tipo 2, hipertensão, aterosclerose, esteatose hepática e à mortalidade global (TRAN; KAHN, 2010).

Além de toda a atividade metabólica, o tecido adiposo produz uma variedade de mediadores bioativos como adiponectina, leptina, IL-6, TNF- α , os quais atuam localmente e sistemicamente para a homeostase do organismo, podendo assim responder rapidamente e eficientemente às alterações na ingestão de nutrientes através da expansão no tamanho (hipertrofia) e número (hiperplasia) dos adipócitos (SUNDARA RAJAN; LONGHI, 2016).

Na obesidade, onde existe uma rica disponibilidade de energia associada à sobrenutrição, há perda da homeostase metabólica sistêmica e um processo inflamatório é ativado pelo aumento da massa do tecido adiposo, esta resposta determina um aumento dos níveis circulantes de mediadores bioativos como os citados acima. Esse aumento na secreção de citocinas pró-inflamatórias modula a resposta das células desse tecido, como adipócitos, pré-adipócitos, fibroblastos e macrófagos, os quais irão agir como mais um estímulo para essa inflamação, iniciando um ciclo vicioso entre respostas metabólicas e respostas imunes nesses indivíduos obesos, culminando no desencadeamento de uma inflamação crônica de baixo grau, determinante para o aparecimento de patologias relacionadas à obesidade (CARUSO; BALISTRERI; CANDORE, 2010).

Com o aumento evidente da obesidade entre os humanos, diversos estudos foram iniciados para compreender melhor essa doença. Alguns buscaram causas genéticas para essa patologia e identificaram um importante gene, o *ob*, responsável por codificar a leptina. Porém poucas evidências foram encontradas sobre uma maior pré-disposição de uma população à obesidade em relação a outras por motivos exclusivamente genéticos. Além disso, como o aumento substancial da doença é recente – aconteceu em pouco mais de duas décadas – não houve tempo suficiente para a obesidade influenciar, de forma determinante, os fatores genéticos e, por isso, os pesquisadores determinaram que fatores ambientais, como dieta e falta de exercícios físicos, também estão envolvidos com a obesidade (PEREIRA; FRANCISCHI; LANCHETA JR., 2003).

Para o melhor entendimento dos impactos dessa doença, estudos começam a ser feitos com modelos animais, utilizando diversos tipos de indução à obesidade, como: (i) lesão neuronal no núcleo arqueado do hipotálamo, realizada cirurgicamente ou quimicamente; (ii) alterações endócrinas feitas através de ovariectomia, eliminando os hormônios ovários do sistema; (iii) manipulações genéticas, geralmente, feitas no gene *ob* produtor da leptina; (iv) dieta a

qual simula o ganho calórico ocasionado pela alta ingestão de lipídeos e/ou açúcares (PEREIRA; FRANCISCHI; LANCHETA JR., 2003).

O modelo animal de obesidade realizado com dieta é o que mais se aproxima do que ocorre em humanos, pois aumenta a ingestão de lipídeos e/ou açúcares (assim como ocorre em dietas ocidentais que são as mais consumidas) levando a uma maior ingestão de energia densa (alto teor de gordura, açúcares e amido), em detrimento à ingestão de alimentos de energia diluída (vegetais, frutas e cereais integrais), conduzindo, assim, ao aumento no consumo total de energia. Nesse contexto haverá desequilíbrio energético entre as calorias consumidas e as calorias gastas, que é a causa fundamental do excesso de peso e da obesidade (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

Diversos estudos já apontaram que a obesidade e o sobrepeso estão diretamente associados com as chances de desenvolver câncer de próstata (DI SEBASTIANO; MOURTZAKIS, 2014), câncer de mama (KWAN et al., 2015), câncer de cólon (NEUMANN et al., 2015), câncer de bexiga (SUN et al., 2015), câncer de tireóide (ZHANG et al., 2014) e com o pior prognósticos dessas doenças. A nível global, o desenvolvimento de diferentes tipos de cânceres cresce em paralelo ao aumento de peso da população mundial, por isso é importante a realização de estudos de sobreposição entre obesidade e câncer para que se entenda a correlação entre essas duas doenças

1.2 Câncer

Câncer é o nome genérico dado a um grupo de mais de 100 tipos de doenças, desencadeadas por mutações ou alterações epigenéticas (imprinting genômico, silenciamento de genes, bookmarking) que geram mudanças no material genético ou nos transcritos das células que não são reparados e nem levam a morte celular. Essa desestabilização do genoma altera processos fisiológicos essenciais, transformando células normais em células cancerígenas, que vão perpetuar o DNA anormal.

Distintos tipos de tumores podem ser classificados de acordo com sua capacidade de invasão: tumores invasivos são chamados de tumores metastáticos e tumores não invasivos são chamados de tumores benignos; ou podem ser

classificados de acordo com a origem da células maligna: (i) cânceres que começam na pele ou nos tecidos que revestem ou cobrem os órgãos internos são denominados carcinomas; (ii) cânceres que começam no osso, cartilagem, gordura, músculo, vasos sanguíneos ou outro tecido conjuntivo ou de suporte são denominados de sarcomas; (iii) cânceres que começam no tecido produtor de sangue, como a medula óssea, e provocam um grande número de células anormais no sangue são denominados leucemias; (iv) cânceres que começa nas células do sistema imunológico são denominados linfoma e mieloma e (v) cânceres que começam nos tecidos do cérebro e da medula espinhal são denominados de câncer do sistema nervoso central (INCA, 2016a).

O câncer da mama é um tumor maligno que começa principalmente nas células da mama (em poucos casos pode começar em outros tecidos) e ocorre quase exclusivamente em mulheres, mas os homens podem desenvolvê-lo também (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016). O carcinoma mamário é considerado cada vez mais um grupo de doenças distintas devido à diferenças nos padrões moleculares, comportamentos clínicos, respostas ao tratamento e fatores de risco. A identificação de subtipos de tumores mamários pode ser dada pela origem do tumor: câncer de mama ductal que começa nos ductos que levam leite ao mamilo ou câncer de mama lobular que começa nas glândulas que produzem o leite materno, (como ilustrado na figura 03) ou pela detecção da presença e/ou ausência de marcadores biológicos como: receptores de estrogênio, receptores de progesterona e do fator de crescimento epidérmico humano 2 (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2013).

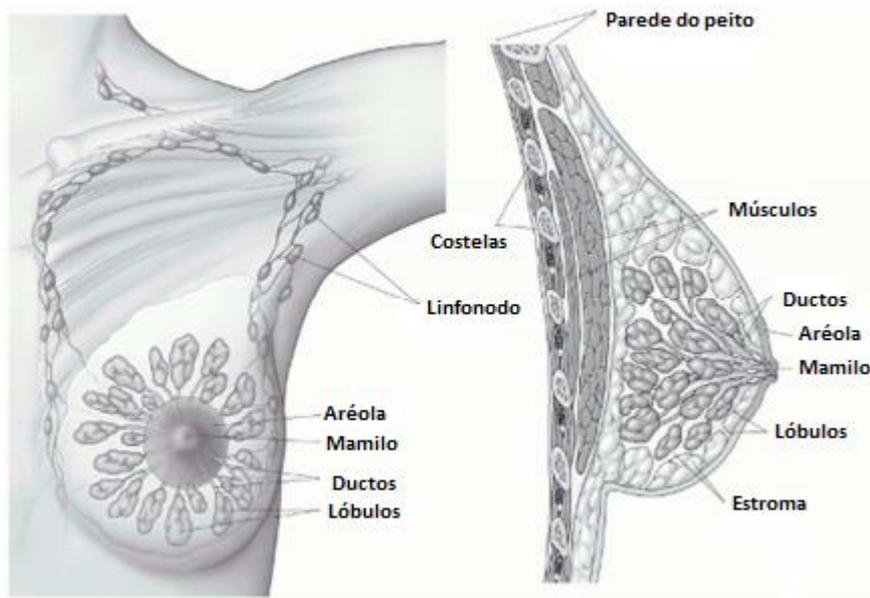


Figura 03: Esquema ilustrativo dos componentes do tecido mamário normal. Adaptado de (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016).

No ano de 2012, em todo o mundo, o câncer matou mais que doenças infecciosas e parasitárias (como a síndrome da imunodeficiência adquirida, tuberculose e malária), sendo responsável por uma em cada sete mortes. Em países desenvolvidos, o câncer é a segunda principal causa de morte, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares e em países em desenvolvimento, o câncer é a terceira maior causa de morte. Estimativas indicam que o número total de mortes causadas por câncer irá aumentar para 21,7 milhões de pessoas em 2030, 13 milhões de novos casos em relação a estimativa de 2010. No entanto, esse número pode ser maior devido à crescente adoção de estilos de vida que aumentam, cada vez mais, a exposição aos fatores de riscos relacionados com o desenvolvimento de diferentes tipos de cânceres (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2013).

Segundo a Sociedade Americana de Câncer (2013), o câncer de mama é o câncer mais comumente diagnosticado entre mulheres na maioria dos países em todo o mundo. O tumor mamário é o único câncer comum entre mulheres em todas as regiões do planeta sendo responsável por cerca de 1,7 milhões de novos casos diagnosticados em 2012 (representando 25% de todos os novos casos de câncer em mulheres) e totalizando 521.900 mortes de mulheres no mundo no mesmo ano (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2013).

A grande variação na taxa de incidência de câncer de mama ao redor do mundo (ilustrada pelo mapa mundial na figura 04) ocorre devido à diferenças na

composição da população, recursos para a saúde, práticas de detecção, estilo de vida, fatores ambientais e genéticos, além do reflexo do nível de desenvolvimento econômico dos países (países com baixa renda possuem um menor registro de incidência devido a ineficiente triagem, inexistência de aparato tecnológico de detecção, falta de equipe médica treinada e falta de programas de prevenção, já nos países de alta renda esse registro é maior devido ao rastreamento mamográfico eficiente e detecção tumores de assintomáticos) (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015) .



Figura 04: Variação internacional da taxa de incidência de câncer de mama em 2012. Adaptado de (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015).

No Brasil, os dados sobre câncer de mama são majoritariamente gerados pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), o qual demonstrou a distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para mulheres em 2016, sendo o tumor de mama o que mais atinge as brasileiras, responsável por 28,1% dos casos no território nacional, ficando à frente do câncer de útero e de ovário, responsáveis, respectivamente, por 7,9% e 3% dos casos, como mostra a figura 05 (INCA, 2016b).

	Localização Primária	Casos	%
Mulheres 	Mama feminina	57.960	28,1%
	Cólon e Reto	17.620	8,6%
	Colo do útero	16.340	7,9%
	Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
	Estômago	7.600	3,7%
	Corpo do útero	6.950	3,4%
	Ovário	6.150	3,0%
	Glândula Tireoide	5.870	2,9%
	Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
	Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

Figura 05: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 em mulheres no Brasil. Adaptado de (INCA, 2016b).

Segundo Melo e Junqueira, existem vários fatores de riscos que estão diretamente ligados ao aumento das chances de se desenvolver câncer de mama, esses fatores de risco podem ser ambientais (radiação, consumo de tabaco e álcool, obesidade, exposição solar, agentes infecciosos) e/ou fatores fisiológicos (idade, mutações hereditárias, hormônios, inatividade física e condições imunológicas), que podem levar ao acúmulo de mutações, capazes de desencadear a mudança de uma célula normal em uma célula cancerígena (MELO; JUNQUEIRA; CHAMMAS, 2003). A maioria das mulheres que possui um ou mais fatores de risco para câncer de mama nunca desenvolveu a doença, pois um fator de risco, ou mesmo vários, não necessariamente conduzirão ao aparecimento da doença. Porém, muitos pacientes com câncer de mama não têm fatores de risco aparentes e quando os têm é difícil saber o quanto e qual dos fatores podem ter contribuído para o surgimento da doença. Alguns fatores podem ter maior influência para o aparecimento do câncer do que outros, como é o caso do envelhecimento, pois a cada três cânceres de mama invasivos, dois são diagnosticados em mulheres com 55 anos ou mais (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2013).

Os custos financeiros com o câncer incluem tanto os gastos diretos com tratamento, assistência e reabilitação, que estão diretamente relacionados à patologia quanto, os gastos indiretos como a perda de produção econômica, pagamento de seguros de saúde e morte prematura. Segundo a Agência de Investigação de Saúde e Qualidade, nos Estados Unidos, em 2011, U\$\$ 88,7 bilhões foram gastos diretamente para custeio do combate e tratamento do câncer. Já a Europa, em 2008, perdeu € 75 bilhões devido à diminuição da produtividade da população com algum tipo de câncer (HANLY; SOERJOMATARAM; SHARP, 2015).

No Brasil, o Sistema Único de Saúde gastou mais de R\$ 1,7 bilhões no tratamento contra o câncer em 2008, número 176% maior em relação aos gastos no ano de 1999. A cada ano, no planeta, são gastos mais de U\$ 2 trilhões, correspondendo a cerca de 1,5% do produto interno bruto mundial, em iniciativas relacionadas ao câncer (INCA, 2016a). Portanto, não somente pela perda financeira, mas principalmente pelo grande número de indivíduos atingidos por todo o mundo, é de grande importância prevenir essa doença. Cânceres causados por fatores ambientais como tabagismo, consumo excessivo de álcool, excesso de peso ou obesidade, inatividade física, maus hábitos alimentares, exposição excessiva ao sol e agentes infecciosos (como o papilomavírus humano, o vírus da hepatite B e C, vírus da imunodeficiência humana) poderiam ser facilmente prevenidos se os fatores causadores fossem eliminados ou evitados através de mudanças comportamentais.

Para além de uma mudança no estilo de vida, existem, no caso do câncer de mama, exames preventivos bem difundidos, como a mamografia, a qual aumentou o número dos diagnósticos de cânceres de mama antes que eles causem quaisquer sintomas. Ainda assim, alguns cânceres não são encontrados, seja porque a mamografia não foi feita sob condições ideais ou porque a técnica não foi capaz de detectar a massa tumoral. Por isso, a realização em conjunto de mamografia, ressonância magnética, exames clínicos das mamas e o auto-exame oferece às mulheres uma maior chance de reduzir o risco de morrer de câncer de mama (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015).

O prognóstico de câncer de mama invasivo é fortemente influenciado pela fase, extensão e disseminação do tumor quando diagnosticado. Se diagnosticado numa fase inicial, enquanto ainda é pequeno e menos provável que tenha se espalhado para outras partes do corpo, o tratamento é mais eficaz e isso muitas vezes significa uma melhor chance de cura, especialmente se o câncer for removido cirurgicamente (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015). No Brasil, 47% dos casos de câncer de mama são detectados no estágio II (refere-se à tumores que se espalharam para tecidos vizinhos ou gânglios linfáticos próximos), 8% detectados no estágio III (quando as células tumorais já alcançam gânglios linfáticos acima da clavícula), apenas 20% no estágio I (quando o câncer que ainda está confinado à mama) e 5% são detectados já no estágio IV (quando já existe metástase para nódulos linfáticos e/ou órgãos distantes e a doença está avançada). As modalidades de tratamento do câncer atualmente são: cirurgia, quimioterapia, radioterapia,

terapia hormonal, terapia imunológica e terapia orientada, estes tratamentos podem ser utilizados sozinhos ou em combinação (INCA, 2014).

Em modelos animais, diversas subpopulações tumorais como 67, 168, 66, e 410 foram originadas a partir de um único tumor de mama espontâneo em um camundongo Balb/c e dessas subpopulações foi isolada a sublinhagem utilizada nesse trabalho, a 4T1 (HEPPNER; MILLER; SHEKHAR, 2000). Estudos precursores sobre essas linhagens de câncer de mama murino realizados por Miller e Aslakson em 1992, demonstraram a partir de ensaios clonogênicos que as células 4T1 geram metástases, principalmente, mas não exclusivamente, pela via hematológica (ASLAKSON; MILLER, 1992). Devido à alta capacidade de disseminar para mesmos sítios afetados pelo câncer de mama humano, o modelo de carcinoma mamário murino 4T1 representa um sistema ideal para o estudo de metástases, regimes terapêuticos, investigações de bases moleculares, celulares e patológicas de câncer de mama em diversos órgãos e tecidos.

1.3 Obesidade, câncer de mama e sistema imunológico

Para que o processo de transformação de células normais para células malignas aconteça, se faz necessário a aquisição de determinadas características pelas células normais, as quais irão garantir a sobrevivência, proliferação, disseminação e metástase tumoral. E para escapar do sítio primário, as células tumorais devem modificar características intrínsecas, extrínsecas e concluir uma sequência de passos que favoreçam a invasão, transporte, detenção, extravasamento e crescimento fora do sítio de origem. Hanahan e Weinberg em 2000, definiram seis características funcionais das células cancerígenas, que podem ser adquiridas mais de uma vez (por diferentes mecanismos em diferentes estágios de desenvolvimento): (i) auto-suficiência quanto a fatores de crescimento; (ii) insensibilidade quanto a fatores inibitórios de proliferação; (iii) evasão da apoptose ou morte celular programada; (iv) potencial replicativo infinito; (v) angiogênese sustentada e; (vi) invasão tecidual e metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Em 2011, os mesmos autores revisaram esse trabalho e determinaram a aquisição de duas características emergentes: (vii) a desestabilidade do genoma (que gera mutações aleatórias, permitindo modificar ou reprogramar o metabolismo celular, a

fim de subvertê-lo a proliferação do tumor) e (viii) a instauração de um estado inflamatório (que permite a progressão tumoral através das células do sistema imune do hospedeiro), como demonstrado na figura 06 (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

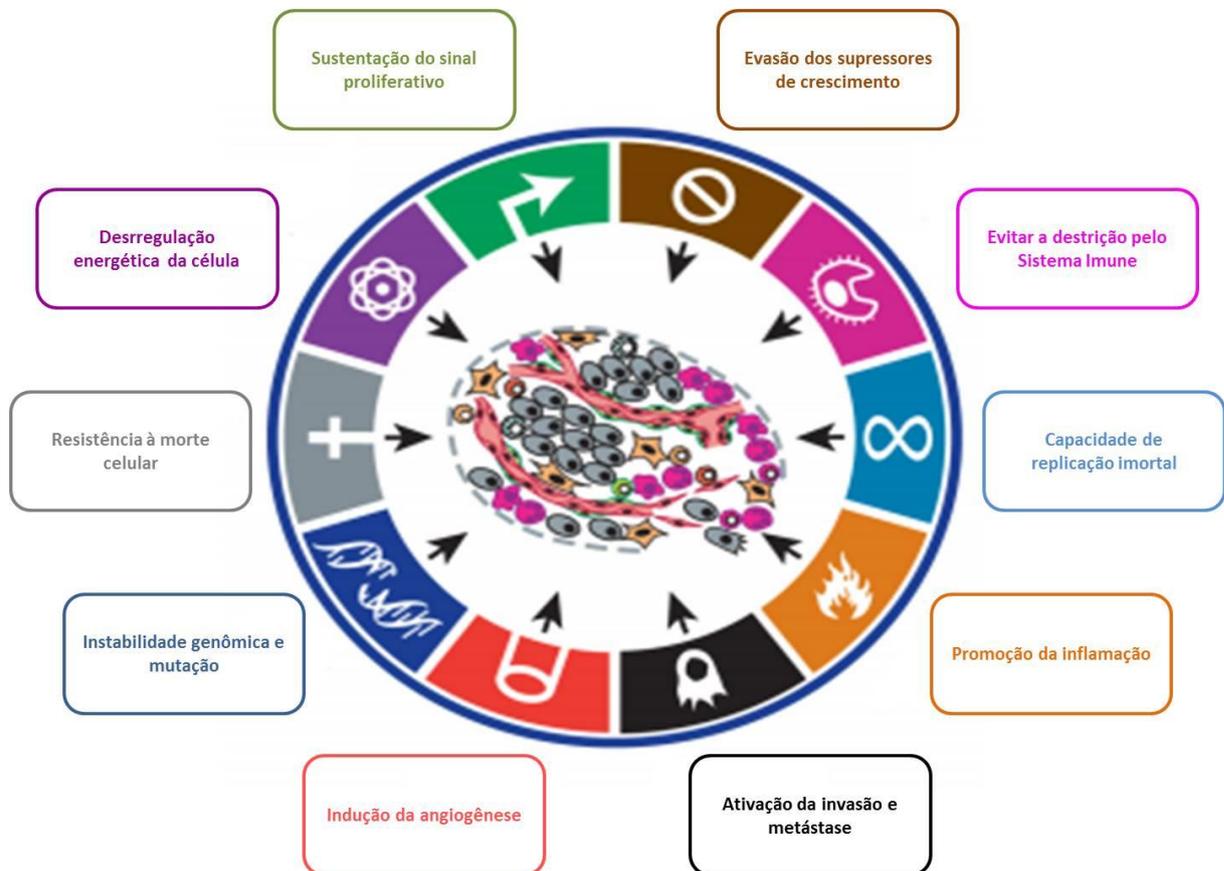


Figura 06: Características funcionais adquiridas durante o processo de transição de células saudáveis para uma células malignas. Adaptado de (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

O microambiente do tumor de mama em indivíduos obesos é caracterizado pelo aumento da inflamação, hipóxia, angiogênese, invasão, metástase e mudanças nos fatores de crescimento proliferativos (VONA-DAVIS; ROSE, 2009). Muitos estudos têm demonstrado várias moléculas que podem ser associadas à formação desse microambiente tumoral, como leptina, fator de necrose tumoral α e β (TNF- α e TNF- β), interleucinas -1, -4, -6, -8 (IL-1, IL-4, IL-6, IL-8), quimiocinas como CCL2 e CCL5, e que levam a um pior prognóstico de câncer de mama (GILBERT; SLINGERLAND, 2013).

Quando as células do tumor de mama se tornam invasivas, o primeiro tecido que elas entram em contato é o tecido adiposo. Essa interação com os adipócitos –

auxiliada por receptores de citocinas e quimiocinas das células cancerígenas e pela produção de quimioatrativos pelo órgão alvo – estimula a progressão tumoral através da inflamação (GILBERT; SLINGERLAND, 2013).

As células imunes representam cerca de dois terços da fração estromal do tecido adiposo, em um indivíduo obeso a sua expansão extensiva o torna um grande compartimento do sistema imune capaz de influenciar a inflamação sistêmica, a capacidade de armazenamento de lipídeos, a sensibilidade à insulina, o metabolismo da glicose e a homeostase metabólica (GRANT; DIXIT, 2015).

Durante o ganho de peso, o tecido adiposo que era estável, sem inflamação, com ótimo metabolismo e função vascular normal passa por uma remodelação tecidual, a qual afetará o controle da secreção de moléculas bioativas, a polarização para fenótipos pró-inflamatórios (como a troca de perfil de macrófagos M2 para M1), a perda de linfócitos Treg e o aumento de células B, linfócitos T, neutrófilos, eosinófilos e mastócitos (GRANT; DIXIT, 2015).

A hipertrofia de adipócitos, devido ao aumento do armazenamento de gordura ou aumento da expressão mediadores pró-inflamatórios, desloca o equilíbrio imune para a produção de moléculas pró-inflamatórias, criando um ambiente que ativa a troca de macrófagos do tipo M2 para M1 e favorece o aparecimento de estruturas de coroa constituídas por adipócitos do tipo necrótico. A hiperplasia do tecido, gera um maior número de pré-adipócitos, aumentando, conseqüentemente, o número de adipócitos, que por sua vez eleva os níveis de leptina em detrimento dos níveis de adiponectina, recrutando maior quantidade de células do sistema imunológico as quais secretam mais leptina, gerando um ciclo vicioso que impedirá a resolução da inflamação. Como ilustrado na figura 07, o aumento no tamanho e no números dos adipócitos gera uma inflamação retroalimentada que se cronifica, originando um microambiente com baixo grau de inflamação crônica, característico de indivíduos obesos, o qual desencadeará alterações patológicas como a modulação na composição celular do tecido adiposo, além de uma infiltração de macrófagos e fibrose (CARUSO; BALISTRERI; CANDORE, 2010).

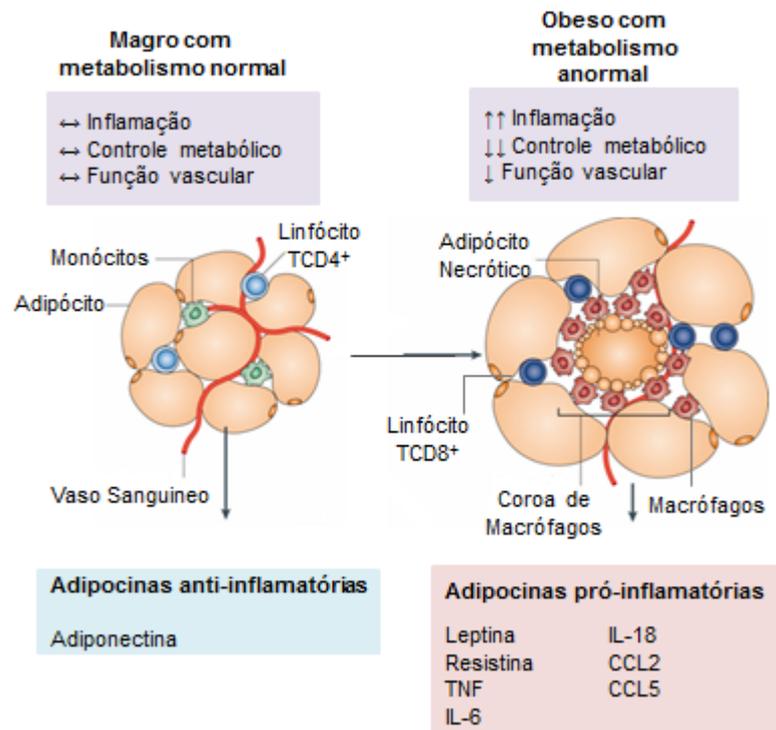


Figura 07: Modulação do tecido adiposo durante o ganho de peso. Adaptado de (OUCHI et al., 2011).

Além disso, a produção de diversos fatores inflamatórios pelos numerosos células no tecido adiposo do obeso, pode estimular a circulação de altos níveis de ácidos graxos livres, que ativam a sinalização de receptores do tipo Toll (TLR – do inglês “Toll-like receptors”) e aumentam a secreção de TNF- α , VEGF (do inglês “vascular endothelial growth factor”), IL-6, IL-8, CCL2, CCL5 e CCL11, as quais podem contribuir para crescimento do tumor de mama, pois CCL2 e CCL5 podem suprimir a atividade anti-tumoral exercida pelos linfócitos T; a IL-6 contribui para o desequilíbrio a favor da leptina em detrimento da adiponectina produzindo mais citocinas e mediadores pró-inflamatórios; e outros fatores como TNF- α , VEGF e IL-8, podem levar ao crescimento de vasos no ambiente hipóxico favorecendo o tumor (SIMONS *et al.*, 2005; GILBERT; SLINGERLAND, 2013).

As adipocinas afetam o apetite, a saciedade, a glicose, o metabolismo lipídico, regula pressão arterial, inflamação e funções imunes. Portanto elas trabalham em rede para regular esses processos fisiológicos não só localmente, mas também sistemicamente. Devido a esse ambiente inflamado não se restringe ao tecido adiposo, níveis séricos dessas moléculas aumentam nos obesos, indicando

que fatores pró-inflamatórios como TNF- α , IL-6, IL-8, e VEGF, além de sustentarem o infiltrado de células do sistema imune, aumentam a angiogênese e a transição epitélio-mesenquimal, podendo gerar efeitos oncogênicos em locais distantes e ajudar no desenvolvimento do tumor mamário e sua metástase (CARUSO; BALISTRERI; CANDORE, 2010).

Uma importante adipocina circulante é a leptina que exerce um papel duplo de hormônio – sendo responsável pela saciedade – e de citocina –atuando como modeladora na resposta imune inata e adaptativa. Seu papel no câncer de mama em animais obesos, foi estudado por Zheng e colaboradores (2011), através de modelos de mutação gênica, usando camundongos ob/ob e db/db. No grupo ob/ob, que não possuía leptina circulante. Os tumores formados foram menores e houve uma diminuição da proporção de células-tronco cancerígenas. Já no grupo db/db, que possui altos níveis de leptina circulante mas não tem os receptores para ela se ligar, os animais desenvolveram tumores maiores devido à promoção da sobrevivência e crescimento das células-tronco cancerígenas, concluindo que em indivíduos obesos com altos níveis de leptina circulante, o tumor de mama é mais agressivo (ZHENG et al., 2011).

Assim, dentro desse contexto de interação das células malignas com o tecido adiposo, destaca-se uma importante rede de sinalização à nível local e sistêmico, que irá direcionar o transporte das células pelos vasos sanguíneos ou linfáticos e auxiliar no tropismo pelo órgão alvo, isto é, essas interações no microambiente tumoral coordenam a disseminação do câncer e o desenvolvimento de metástases (KARNOUB; WEINBERG, 2007). Várias moléculas fazem parte dessa rede, inclusive as citadas acima, mas ela também é elaborada com ajuda de membros de uma família de citocinas quimiotáticas conhecidas como quimiocinas, que engloba cerca de 50 moléculas subdivididas com base no padrão de resíduos de cisteína na sua região amino-terminal, em quatro grupos: C, CC, CXC e CX3C (onde X indica qualquer aminoácido). Inicialmente essas moléculas foram descritas como reguladoras do tráfego de células do sistema imune (principalmente leucócitos) para locais de inflamação, mas atualmente sabe-se que as quimiocinas, juntamente com seus receptores, podem regular também uma infinidade de outras funções, que incluem a manutenção da homeostase do tecido, a regulação de cascatas sinalizadoras, tumorigênese, invasão, metástase, adesão (célula-célula e célula-matriz), transição epitélio-mesenquimal e sobrevivência (ZLOTNIK; YOSHIE, 2000).

Em tumores, a expressão das quimiocinas e seus receptores está desregulada e, por isso, podem servir como marcadores de desenvolvimento de neoplasias e progressão da doença. No esquema da figura 08 as células epiteliais neoplásicas, secretam quimiocinas as quais não atuam apenas autocrinamente, mas também ajudam a modular o microambiente tumoral, direcionando a migração através do gradiente quimiotático, promovendo o recrutamento de várias células, que formam infiltrados tumorais como: os macrófagos associados ao tumor (TAM do inglês “tumour-associated macrophages”), neutrófilos associados ao tumor (TAN do inglês “tumour-associated neutrophils”), linfócitos associados ao tumor (TAL do inglês “tumour-associated lymphocytes), fibroblastos associados ao câncer (CAF do inglês “cancer-associated fibroblasts) e células tronco mesenquimais (MSC, do inglês “mesenchymal stem cells”), que produzem uma série de quimiocinas, citocinas, proteases e fatores de crescimento, culminando em um microambiente tumoral possuidor de uma complexa rede de comunicação capaz de modular a evasão do sistema imunológico, angiogênese, intravasamento e extravasamento, essenciais para o desenvolvimento, sobrevivência e metástase do câncer de mama (ROUSSOS; CONDEELIS; PATSIALOU, 2011).

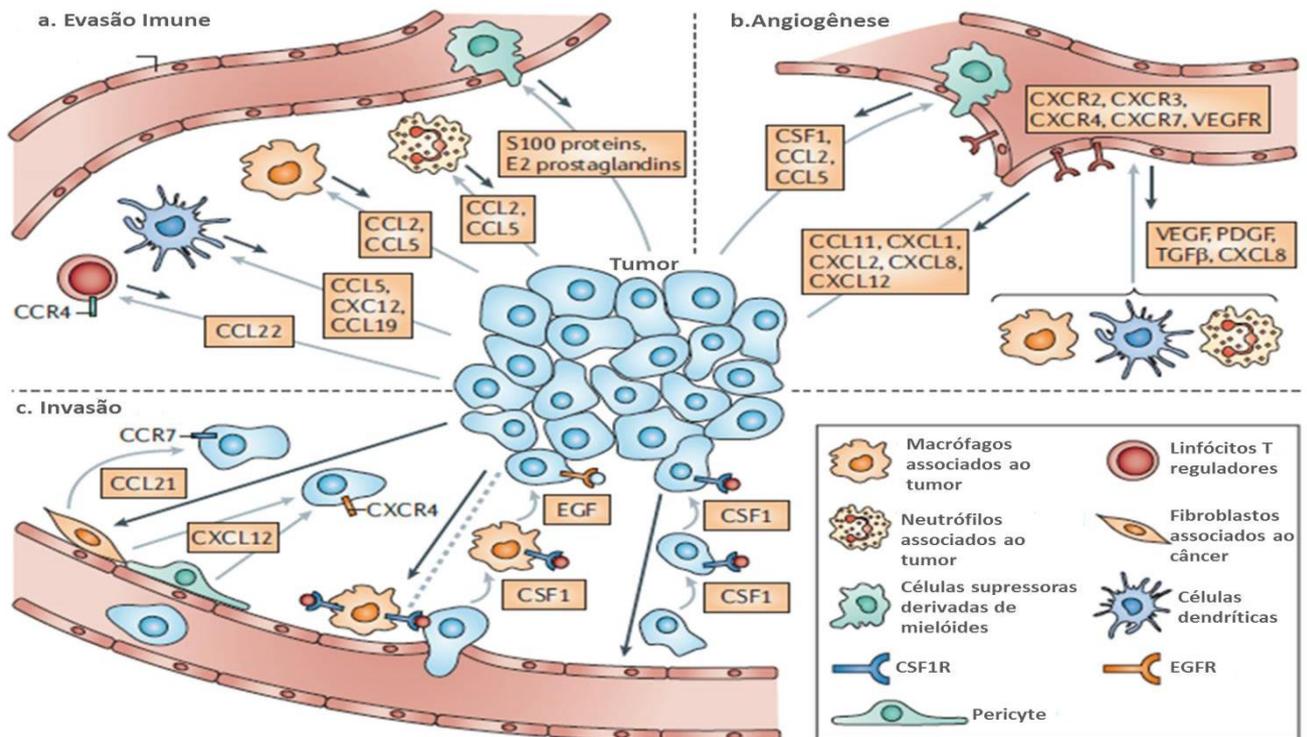


Figura 08: Esquema do microambiente tumoral e a influência das quimiocinas na evasão do sistema imunológico (a.), angiogênese (b.) e intravasamento e extravasamento (c.). As setas cinzas indicam a direção do gradiente quimiotático: da célula que secretou para a célula que responde ao estímulo; setas pretas indicam a direção da migração celular; setas cinzas pontilhadas a matriz de fibra por onde a célula migra. CSF1 (fator estimulador de crescimento de colônia 1, do inglês colony-stimulating factor 1); CSF1R (receptor de CFS1, do inglês “CSF1 receptor”; EGF (fator de crescimento epidermal, do inglês “epidermal growth factor”); EGFR (receptor do EGF, do inglês “EGF receptor”; PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas, do inglês “platelet-derived growth factor”); TGFβ (fator transformador de crescimento beta, do inglês “transforming growth factor-β”); VEGF; VEGFR (receptor do VEGF, do inglês “VEGF receptor”). Adaptado de (ROUSSOS; CONDEELIS; PATSIALOU, 2011)

Uma das quimiocinas mais críticas para recrutamento de macrófagos associados ao tumor no câncer de mama é a CCL5 pois ela estimula essas células a produzirem MMPs (metaloproteinases do inglês “matrix metalloproteinase”) e fatores angiogênicos que permitem a invasão do câncer de mama. Outra importante quimiocina é a CCL2, que pode ser secretada tanto pelas próprias células tumorais quanto pelos macrófagos e é responsável pelo recrutamento de linfócitos Th2 pró-tumorigênicos, pois são incapazes de montar uma resposta suficiente para acabar com o câncer, além de inibir a tentativa de estabelecer uma resposta eficientemente apropriada contra o tumor (PENG; SHU; KRAUSS, 1997).

As quimiocinas também estão envolvidas na regulação do recrutamento de células não-imunes, como fibroblastos e miofibroblastos, que podem migrar dos tecidos adjacentes normais ou de locais distantes do corpo para o microambiente

tumoral. Esse recrutamento leva ao aumento dos níveis de CXCL12 a qual está associada ao crescimento do câncer e formação de novos vasos, culminando no aumento da capacidade de invasão e disseminação metastática de células do carcinoma mamário (KARNOUB; WEINBERG, 2007).

Quimiocinas pró-angiogênicas secretadas por células malignas como CXCL1, CXCL5 e CXCL8 recrutam células do sistema imune, fazendo com que células do infiltrado tumoral produzam MMPs e aumentem a secreção do VEGF. O balanço favorável para quimiocinas anti-angiogênicas em relação às quimiocinas pró-angiogênicas direciona a resposta linfocitária para um perfil Th1 anti-tumoral, determinando o curso do desenvolvimento do câncer (KARNOUB; WEINBERG, 2007).

As células do câncer de mama também sofrem diretamente a influência das quimiocinas, pois respondem ao gradiente quimiotático produzido por elas em virtude dos múltiplos receptores dessas moléculas que são expressos em suas membranas. Estudos de incubação com diferentes linhagens de tumor mamário e CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL1, CXCL3, CXCL7, CXCL8, ou CXCL10 observaram que algumas dessas quimiocinas promoveram a migração das células malignas de acordo com o estímulo e a concentração desses fatores quimiotáticos. Porém, linhagens diferentes responderam à estimulação de forma diferente, indicando que as respostas distintas podem ser atribuídas ao espectro diversificado de receptores de quimiocinas expresso nas diferentes linhagens tumorais (YOUNGS et al., 1997).

Devido às atividades pró-inflamatórias e pró-tumorais das quimiocinas, os altos níveis plasmáticos dessas moléculas em pacientes com câncer de mama podem estar relacionados com a gravidade da doença ou serem indicadores de prognósticos para a doença se espalhar ou reincidir. Nesse contexto, muitos esforços são aplicados em terapias anti-quimiocinas (seja antagonizando essas moléculas, inibindo seus receptores ou combatendo-as com anticorpos) as quais podem, eventualmente, conter a progressão do tumor e serem úteis no tratamento do câncer mamário (KARNOUB; WEINBERG, 2007).

2 JUSTIFICATIVA

Dados de 2016 da Organização Mundial da Saúde, indicam que o sobrepeso atinge 39% e a obesidade 13% dos adultos no planeta, além disso, esse distúrbio alimentar pode ser associado à doenças cardiovasculares, respiratórias, gastrointestinais, metabólicas, ortopédicas, urológicas, endócrinas, dermatológicas e diversos tipos e gravidades de câncer. Por isso, a obesidade é considerada um problema de saúde pública que assola países de baixa, média e alta renda (PEREIRA; FRANCISCHI; LANCHETA JR., 2003; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016a).

O tumor mamário é o único câncer comum em mulheres de todas as regiões do planeta, representando 25% de todos os novos casos de câncer em mulheres no mundo e totalizando 521.900 mortes de mulheres em 2012 no mundo (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015). No Brasil, o câncer de mama é responsável por 28,1% dos casos de cânceres e para 2016 são esperados 600 mil novos casos de cânceres, sendo o câncer de mama o terceiro câncer mais estimado, com expectativa de 57.960 mil novos casos em 2016 (INCA, 2016b).

Devido à grande proporção tomada por essas duas doenças e a ligação já estabelecida entre elas (DI SEBASTIANO; MOURTZAKIS, 2014; KWAN et al., 2015; LA VECCHIA et al., 2011; NEUMANN et al., 2015; SUN et al., 2015; ZHANG et al., 2014), é de grande importância determinar modelos animais de obesidade e câncer de mama a fim de se aprofundar o conhecimento sobre a correlação entre esses dois fatores. Estudos indicam que dietas ricas em gordura induzem a obesidade (em seres humanos e em roedores), que mulheres obesas apresentam um risco aumentado de desenvolver câncer de mama na pós-menopausa e um elevado IMC é associado ao mau prognóstico em pacientes com câncer de mama (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2013).

O modelo com a linhagem murina de carcinoma mamário 4T1 permite a investigação sobre os mecanismos (eventos celulares, moleculares e as interações entre eles) relevantes para as rotas e padrões de distribuição do câncer de mama, pois reconstitui o espectro histopatológico, a heterogeneidade da neoplasia e reproduz a história natural da doença (o período de desenvolvimento e a variabilidade de processos) além de ser capaz de gerar metástases no pulmão,

fígado, osso e cérebro por meio da via hematológica, semelhante ao processo ocorrido no câncer de mama humano (HEPPNER; MILLER; SHEKHAR, 2000).

Estudos ainda não publicados de Salvador e colaboradores, feitos por nosso grupo de pesquisa, determinaram o impacto da obesidade no desenvolvimento do câncer de mama em camundongos Balb/c, utilizando a linhagem 4T1 e indicaram que a ingestão de HFD (do inglês “high-fat diet”), a longo prazo é capaz de aumentar a progressão do carcinoma, aumentando o peso e o volume da massa tumoral, além de levar a um maior número de metástases ósseas do tumor de mama, levando ao aumento da mortalidade dos animais obesos em relação aos animais alimentados com a ração controle, concluindo claramente que a obesidade gera um pior prognóstico no câncer de mama (SALVADOR, 2014). Esses dados, corroboram com os de Kim e colaboradores (2011) - que usaram a mesma linhagem tumoral 4T1 injetada subcutaneamente na mama de camundongos Balb/c alimentados com HFD por um longo tempo – o qual observaram que, apesar de pouco efeito sobre o consumo de energia e sobre o peso corporal, a HFD aumenta o crescimento do tumor, angiogênese, metástases, bem como mortalidade nos obesos em relação aqueles alimentados com ração padrão (KIM et al., 2011).

Diante desse panorama, é evidente que padrões celulares e moleculares da relação entre a obesidade e o câncer de mama, as redes de sinalização presentes no microambiente tumoral – responsáveis pela progressão das células malignas - e a caracterização das células do sistema imune – responsáveis, em parte, pelo orquestramento da resposta imune contra o tumor - devem ser estudadas para a melhor compreensão dos fatores determinados pela obesidade que afetam e modulam a progressão, angiogênese, migração e metástase do câncer de mama em modelo animal.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar a influência da obesidade no perfil de células imunológicas do linfonodo inguinal drenante do tumor em camundongos Balb/c fêmeas com tumor mamário da linhagem 4T1.

3.2 Objetivos específicos

Determinar a eficácia da dieta hiperlipídica através do ganho de peso, consumo diário e acúmulo de gordura perigonadal e retroperitoneal.

Determinar o tamanho e a população celular dos linfonodos inguinais drenantes do tumor através da contagem de células desse órgão.

Determinar as populações de células da resposta imune inata e da resposta imune adaptativa nos linfonodos inguinais drenantes do tumor através de citometria de fluxo.

Determinar a produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias pelas populações de células da resposta imune adaptativa nos linfonodos inguinais drenantes do tumor através de citometria de fluxo.

Determinar as populações de células B e T regulatórias nos linfonodos inguinais drenantes do tumor através de citometria de fluxo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos Balb/c fêmeas com idade entre 4 e 6 semanas de idade obtidos da colônia do Biotério de Centro de Biologia da Reprodução, da Universidade Federal de Juiz de Fora. Acondicionados em gaiolas de polipropileno - cobertas com cama de maravalha, dotadas de cocho para ração e local para mamadeira com água filtrada – e foram mantidos em armários climatizados (ALESCO), localizados em alojamento com ciclo de fotoperíodo de 12h claro/12h escuro, controlado automaticamente, durante todo o procedimento experimental.

Estudos de Olson e colaboradores em 2010, demonstraram que camundongos C57BL/6 são mais susceptíveis à dieta hiperlipídica, em relação aos camundongos BALB/c e isso reflete diretamente no aumento do peso corporal, da glândula mamária e da gordura (OLSON et al., 2010). Porém, mesmo com a resistência desses animais à obesidade, nós os utilizamos devido à especificidade das linhagens de tumor de mama usadas no presente trabalho. Estudos de nosso grupo, com a linhagem BALB/c, avaliou a exposição desses animais à HFD por seis, oito, doze e dezesesseis semanas indicaram que 16 semanas de dieta levaram a um maior aumento de peso corporal, maior acúmulo de gorduras perigonadal e retroperitoneal, além de alterações em parâmetros bioquímicos como glicose e colesterol em relação aos animais alimentados por menos semanas, um quadro compatível com a caracterização da síndrome metabólica e o excesso de peso existente na obesidade (SALVADOR, 2014)

O protocolo experimental do presente trabalho foi submetido à Comissão de Ética no Uso dos Animais da Universidade Federal de Juiz de Fora, recebendo aprovação, certificada no Protocolo de nº 038/2014 – CEUA.

4.2 Indução da obesidade

Os animais designados como controles foram alimentados com ração comercial padrão (Nuvilab), na qual 70% das quilocalorias (kcal) eram advindas de carboidratos, 20% de proteínas e 10% de lipídeos. Já os animais designados como obesos receberam uma dieta rica em gordura, onde 20% das quilocalorias eram obtidas a partir de carboidratos, 20% de proteínas e 60% de lipídeos, totalizando 35,2% de lipídeos na composição.

A ração HFD foi produzida em nosso laboratório, onde cada ingrediente foi cuidadosamente pesado e homogeneizado com o auxílio de um multiprocessador (PHILLIPS/WALITA). A massa originada foi acondicionada em recipientes plásticos para a produção de pellets e mantida congelada (-20°C) até o momento de distribuição nas gaiolas, por um prazo máximo de dois meses. Os ingredientes para o preparo dessa ração foram adquiridos da empresa PRAGSOLUÇÕES Biociência e a composição está descrita na tabela 03.

Tabela 03: Componentes de 1 kg da ração rica em gordura (HFD)

Ingrediente	Peso (g)
Caseína	200,0
Sacarose	100,0
Amido de milho	115,5
Amido destrinzado	132,0
Banha de porco	312,0
Oléo de soja	40,0
Celulose	50,0
Mistura de minerais AIN-93	35,0
Mistura de vitaminas AIN-93	10,0
L-cistina	3,0
Bitartarato	2,5

Todos os animais foram pesados individualmente uma vez a cada semana, durante todo o tempo de indução do modelo. A ração oferecida em cada gaiola foi pesada duas vezes por semana para determinar o consumo individual diário da dieta comum ou HFD.

4.3 Cultura de células da linhagem 4T1

As células foram cultivadas em meio de cultura RPMI (do inglês “Roswell Park Memorial Institute”) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico (100 unidades/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina GIBCO®) a 37°C e 5% de CO₂. Após atingirem cerca de 80% de confluência, as células foram lavadas com tampão salino fosfato (PBS) 0,15 M, pH 7,4 (2,8 mM Na₂PO₄ + 7,2 mM Na₂HPO₄ + 0,14 M NaCl) e em seguida incubadas com solução de Tripsina - EDTA 0,25% GIBCO®, durante 5 minutos, a 37°C. Após a incubação, a suspensão celular foi centrifugada a 1500 RPM (rotações por minuto), durante 5 minutos, a 4°C. Para verificação da viabilidade celular, depois de ressuspendidas em RPMI, as células foram diluídas em Azul de Tripán 0,2% e contadas em Câmara de Neubauer.

4.4 Indução do modelo de câncer de mama ortotópico *in vivo*

Talvez um dos sistemas modelo mais amplamente utilizados no cancro da mama é a de tumores transplantáveis. Os tumores podem ser de origem xenogênica (organismo diferente, p. ex: ser humano), origem singênicos (mesmo organismo com o mesmo fundo genético) ou alogênicos (mesmo organismo com um fundo genético diferente), e os receptores podem ser de tipo selvagem ou geneticamente modificados (por exemplo, knock-out, ratos humanizados, etc.). Transplantes podem ser colocados ortotopicamente (na glândula mamária para o câncer de mama) ou subcutâneamente.

Após dezesseis semanas do início da dieta, os animais receberam 5×10^4 células 4T1 (KIM et al., 2011), num volume total de 100 µL, injetadas no tecido subcutâneo, na região da primeira glândula mamária inguinal direita. Todos os animais continuaram sendo alimentados com as respectivas dietas até o momento da eutanásia.

4.5 Delineamento experimental

O experimento realizado objetivou a medida da adiposidade a partir da pesagem das gorduras viscerais e a caracterização da população de células do sistema imune nos linfonodos inguinais drenantes do tumor a partir de citometria de fluxo, como ilustrado na figura 09. Para isso, dois grupos de animais foram alimentados por 16 semanas com a dieta padrão ou a dieta rica em lipídeos e separados em: controle com tumor (CTR 4T1) e obeso com tumor (OB 4T1). Os animais, depois das 16 semanas de dieta, foram inoculados com 5×10^4 células tumorais da linhagem 4T1. Aos 21 dias após a injeção do tumor, todos os animais foram eutanasiados e deles foram retirados: gorduras perigonadal e retroperitoneal para pesagem e determinação do ganho de peso, linfonodos inguinais drenantes do tumor para a avaliação dos tipos celulares através de citometria de fluxo.

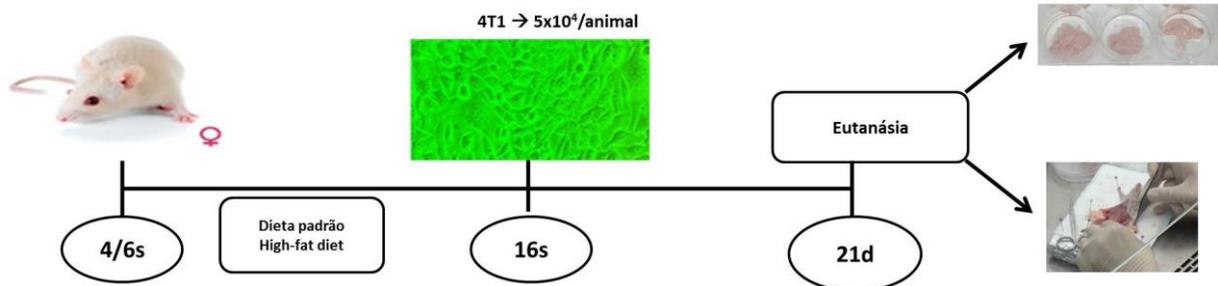


Figura 09: Esquema ilustrativo do delineamento experimental.

4.6 Eutanásia

As eutanásias foram realizadas por aprofundamento da anestesia utilizando Quetamina (100 mg/kg) e um relaxante muscular, a Xilazina (10 mg/kg), por via intraperitoneal, seguidas de exsanguinação por punção cardíaca.

4.7 Citometria de fluxo

Os linfonodos inguinais drenates foram coletados e mantidos em PBS 1X com 5% de SFB até serem macerados em cerca de 5 ml de RPMI completo com auxílio de trama de tecido e êmbulo de seringa estéreis em placa de Petri em ambiente estéril. Após a maceração mecânica, o lisado celular foi coletado e transferido para tubos Falcons de 15 ml para ser centrifugado a 1500 RPM por 5 minutos à 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 1 ml de RPMI completo para a contagem de células em Câmara de Neubauer. Para obtenção do número suficiente de células (cerca de 10^7 células por mL) foi necessário juntar os linfonodos de dois animais, formando um *pool*. Todo o procedimento de coleta e maceração, até a centrifugação, além de todo o material utilizado nesses procedimentos, foram mantidos de forma estéril dentro da cabine de segurança biológica. Em diferentes placas com 96 wells foram plaqueadas 10^6 células por poço para realizar a compensação, marcação extracelular, marcação de FOXP3 e marcação intracelular.

Foi realizada a compensação de cinco fluorocromos diferentes: FITC, Alexa 647, PE, PECy7 e APCCy7, utilizando os seguintes anticorpos: CD4-FITC, CD8 Alexa 647, CD86-PE, CD25 PECy7 e CD3-APCCy7. Utilizamos uma placa de 96 wells separada para evitar contaminação dos poços, mas o protocolo foi semelhante ao da marcação extracelular.

Na placa de marcação extracelular foram usadas duas combinações de anticorpos: a primeira marcou macrófagos (CD11b- Alexa 488, células dendríticas (CD11c-APCCy7) e as moléculas co-estimulatórias B7-1 (CD80-APC) e B7-2 (CD86-PE); e a segunda marcou células B regulatórias (CD19-APC e CD25-PECy7). Após

plaqueadas e centrifugadas, as células foram ressuspensas e incubadas em solução bloqueio (PBS 1X + 2% de soro normal de camundongo) por 15 minutos à 4°C e após esse bloqueio todas as etapas foram feitas em ambiente com luz indireta. Foram utilizados 20 µL por poço da combinação de anticorpos previamente diluídos em tampão FACS (PBS 1X + 1% SFB + 0,09% de azida sódica), durante 30 minutos à 4°C. Posteriormente a essa incubação a placa foi lavada com 150 µL de tampão FACS, centrifugada à 1500 RPM por 5min à 4°C e por último em cada poço foi colocado 150 µL de FACS para ressuspender as células que foram transferidas para os tubos de ensaio para a leitura imediata.

Na placa de marcação com FOXP3 foi usada uma combinação de anticorpos para marcar as células T regulatórias (Treg) auxiliares e citotóxicas (CD4-FITC, CD8 Alexa 647, FOXP3-PE e CD25-PECy7). Após plaqueadas e centrifugadas, as células foram ressuspensas e incubadas em solução de bloqueio por 15 minutos à 4°C e posteriormente a esse bloqueio todas as etapas foram feitas em ambiente com luz indireta. Na primeira incubação com os anticorpos extracelulares (CD4, CD8 e CD25), foram utilizados 20 µL por poço da combinação de anticorpos previamente diluídos em tampão FACS, durante 20 minutos à temperatura ambiente, depois a placa foi lavada uma vez com tampão FACS e ressuspensa com 200 µL de tampão de fixação (1 parte de Fixation Buffer®BD em 19 partes de PBS 1X) por poço e incubada por 30 minutos à 4°C. Decorrido esse tempo a placa foi centrifugada a 1700 RPM por 5min para remover o tampão de fixação e incubada com 200 µL de tampão de permeabilização (1 parte de Permeabilization Buffer®BD em 4 partes de PBS 1X) por 30 minutos à 37°C. Em seguida, a placa foi lavada com tampão FACS e cada poço foi ressuspensado com 20 µL de anticorpo FOXP3 previamente diluído em tampão FACS, incubado por 20 minutos à temperatura ambiente. Por último, depois da placa ser lavada mais uma vez com tampão FACS, em cada poço foi colocado 150 µL de FACS para ressuspender as células que foram transferidas para os tubos de ensaio para a leitura imediata.

Na placa de marcação intracelular, foi usada uma combinação de anticorpos para marcar as células T, células T auxiliares e citotóxicas e a produção de citocinas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias por essas células (CD3-APCCy7, CD4-FITC, CD8 Alexa 647, IL-10-PE e IFN-γ-BV421). Após plaqueadas e centrifugadas, as células foram estimuladas com 100 µL por poço de RPMI e 5 ng/mL de PMA *overnight* à 37°C. Ao fim dessas horas de incubação foi adicionado 50 µL de Stop

Golgi®BD em cada poço e incubados por 2 horas à 37°C. Ao final do processo de estímulos, a placa foi centrifugada a 1200 RPM por 5 minutos para ser ressuspendida e incubada em solução de bloqueio por 15 minutos à 4°C, posteriormente a esse bloqueio todas as etapas foram feitas em ambiente com luz indireta. Na primeira incubação com os anticorpos extracelulares (CD3, CD4 e CD8), foram utilizados 20 µL por poço da combinação de anticorpos previamente diluídos em tampão FACS, durante 30 minutos à 4°C. A placa foi lavada uma vez com tampão FACS e ressuspendida com 100 µL de tampão de fixação e permeabilização (CITOFIX/CITOPERM®BD) por poço, incubada por 20 minutos à 4°C. Decorrido esse tempo a placa foi centrifugada para remover o tampão de fixação e lavada duas vezes com 250 µL de tampão de lavagem (1 parte de Perm Wash®BD em 9 partes de água MiliQ), para a segunda incubação, agora com 20 µL por poço da combinação de anticorpos intracelulares (IL-10 e IFN-γ) previamente diluídos em Perm Wash, durante 30 minutos à 4°C. Em seguida a placa foi lavada com tampão FACS e cada poço foi ressuspendido com 20 µL de anticorpo FOXP3 previamente diluído em tampão FACS, incubado por 20 minutos à temperatura ambiente e por último, depois da placa ser lavada mais uma vez com tampão FACS, em cada poço foi colocado 150 µL de FACS para ressuspender as células que foram transferidas para os tubos de ensaio para a leitura imediata.

Todas as leituras foram realizadas à fresco no citometro BD FACSCanto™II e os dados foram analisados usando o programa FlowJo versão 10. A tabela 04 mostra os anticorpos usados para a marcação das diferentes populações e seus respectivos fluorocromos.

Tabela 04: Relação das populações caracterizadas e seus respectivos receptores e fluorocromos utilizados.

População	Receptor	Fluorocromo
Macrófago	CD11b	Alexa 488
	CD80	APC
	CD86	PE
Células Dendríticas	CD11c	APCCy7
	CD80	APC
	CD86	PE
Linfócitos B	CD19	APC
Linfócitos B regulatório	CD19	APC
	CD25	PECy7
Linfócitos T	CD3	APCCy7
Linfócitos T Auxiliares	CD3	APCCy7
	CD4	FITC
	IFN- γ	BV421
	IL-10	PE
Linfócitos T Auxiliares Regulatórios	CD4	FITC
	CD25	PECy7
	FOXP3	PE
Linfócitos T Citotóxicos	CD3	APCCy7
	CD8	Alexa 647
	IFN- γ	BV421
	IL-10	PE
	CD8	FITC
Linfócitos T Citotóxicos Regulatórios	CD25	PECy7
	FOXP3	PE

4.8 Análise estatística

A confecção dos gráficos e as análises estatísticas foram realizadas através do programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software). Primeiramente foram feitos os testes de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Posteriormente, os dados que respeitavam a curva de normalidade foram submetidos ao teste T não pareado e para os dados que não respeitavam a curva de normalidade foi feito teste de Mann-Whitney. Foram utilizadas análises de variância (ANOVA) de dois fatores, seguidas de pós-teste de Bonferroni, para os dados de ganho de peso e consumo de ração.

Os dados representam as médias dos valores encontrados com a apresentação dos desvios padrões e foram considerados diferentes quando a probabilidade de serem iguais foi menor que 5% ($p \leq 0,05$), de acordo com os testes indicados.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação do modelo de obesidade

Para avaliar a indução da obesidade nos animais que receberam a ração HFD, foram analisados o peso corporal (g), consumo diário de ração(g/dia/animal), ganho de peso (g/19 semanas) e a porcentagem de ganho de peso (%g/19 semanas) nos grupos controles e obesos, além do peso das gorduras perigonadais e retroperitoniais que foram avaliados individualmente nos animais dos dois grupos estudados.

Como demonstrado na figura 10, o peso dos animais obesos foi significativamente maior que o peso dos animais controles a partir da segunda semana de dieta – mesmo eles apresentando uma média de peso inicial menor -, essa diferença perpetuou por todas as 17 semanas seguintes. Já em relação ao consumo de ração, os animais obesos comeram menos ração em relação aos animais controles já a partir da 1ª semana de dieta até a 19ª semana. Apesar desse menor consumo em gramas, os animais obesos, consumiram mais calorias em comparação aos animais controles, indicando que o aumento de peso ocorre devido a alta densidade calórica da ração hiperlipídica utilizada nesse estudos. Além disso, calculamos também a média e a média percentual do ganho de peso entre os dois grupos e observamos que os animais obesos ficaram, em média, 6,2 gramas mais pesados que os animais controles, refletindo no ganho de peso de 37% nos animais obesos e apenas 19% nos animais controles.

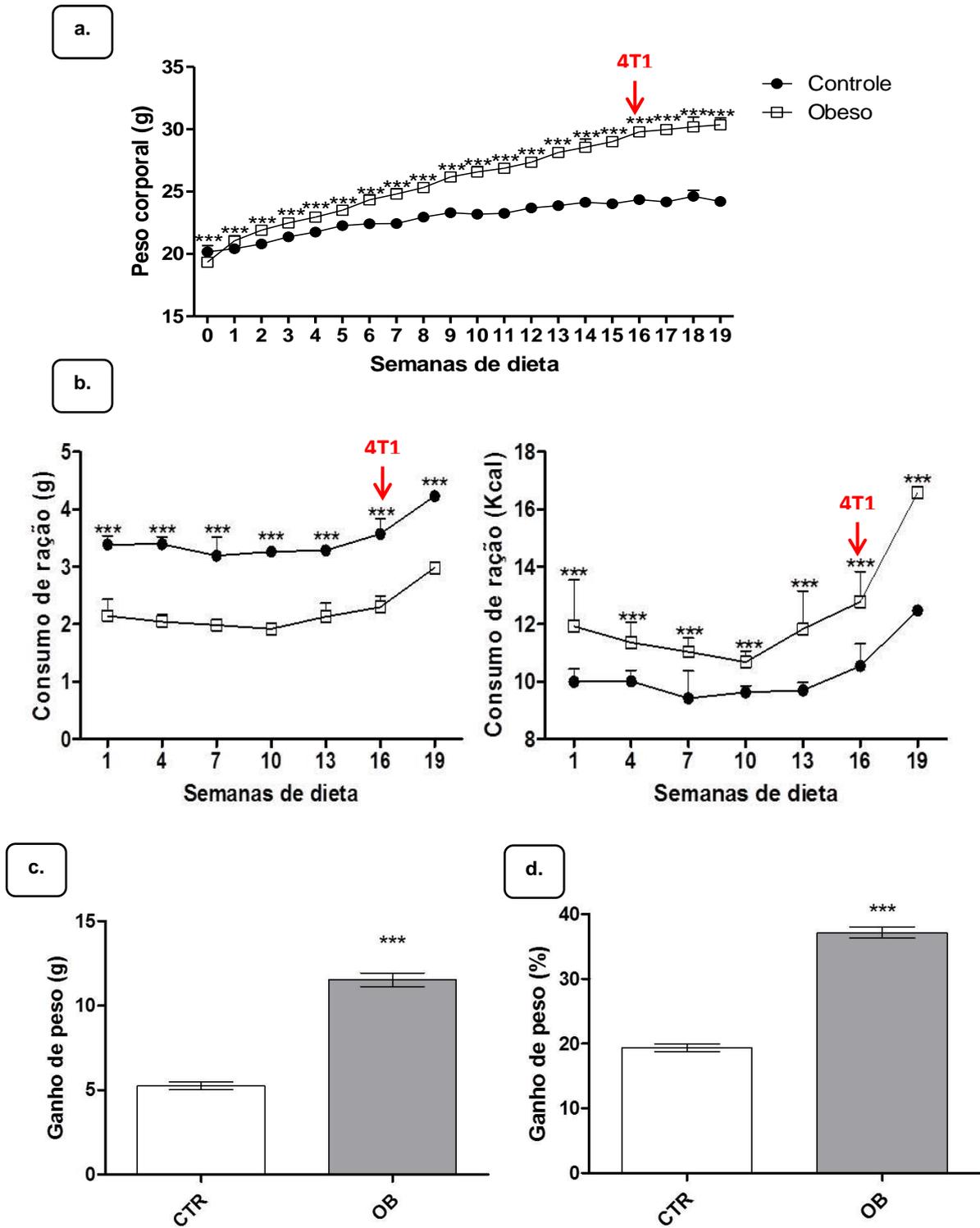


Figura 10: Ganho de peso corporal e menor consumo de ração dos animais obesos (OB) comparados aos animais controles (CTR), que receberam dieta padrão ou HFD. **(a.)** Média de peso corporal em gramas até 19 semanas de dieta; **(b.)** Média diária do consumo de ração por animal até 19 semanas de dieta em gramas e kilocalorias; **(c.)** Média de ganho de peso dos animais controles e obesos até 19 semanas de dieta; **(d.)** Porcentagem média de ganho de peso dos animais controles e obesos até 19 semanas de dieta. Cada ponto e cada barra representam a média \pm o desvio padrão (SD, do inglês “standard deviation”). *** $p \leq 0,001$; significativamente diferente do grupo controle ($n = 116$ controles até a 18ª semana, depois 67 controles e $n = 106$ obesos até a 18ª semana, depois 52 obesos, nas figuras a e b $n = 125$ controles e $n = 95$ obesos, nas figuras c e d).

A obesidade é caracterizada pelo ganho de gordura corporal e para determinar se houve aumento da adiposidade nos animais obesos em relação aos animais controle, pesamos as gorduras perigonadais e retroperitoniais. Como demonstrado na figura 11, observou-se um aumento de mais de 3 vezes da gordura perigonadal dos obesos, com média de peso de $1,476 \pm 0,9692$ gramas, em relação aos controles, com média de peso de $0,426 \pm 0,5415$ gramas; esse aumento também foi significativo para a gordura retroperitoneal, onde os obesos tiveram uma média de peso de $0,960 \pm 0,9343$ gramas e os controles de $0,088 \pm 0,0787$ gramas, indicando um aumento de mais de 10 vezes da gordura retroperitoneal nos animais alimentados com HFD.

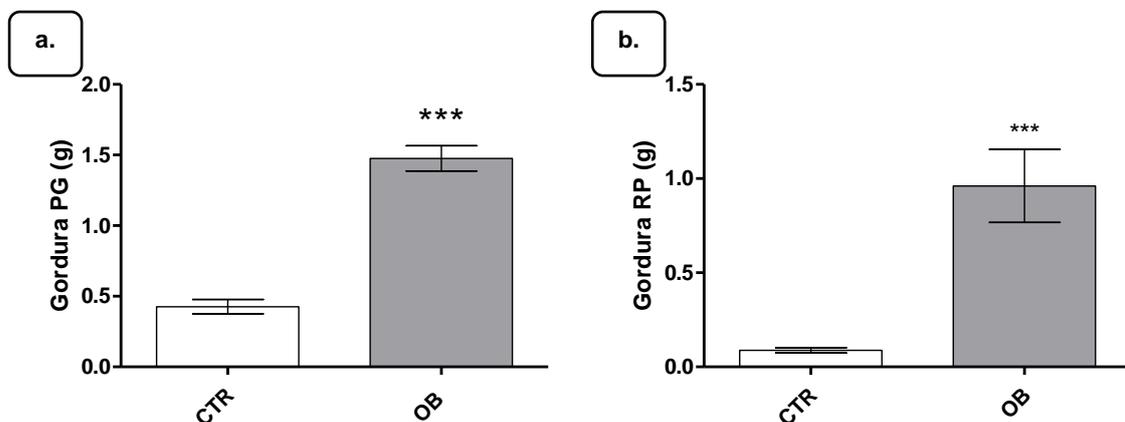


Figura 11: Aumento do peso das gorduras corporais em animais obesos (OB) comparados aos animais controles (CTR), com 16 semanas de dieta padrão ou HFD e com 21 dias de tumor 4T1. **(a.)** Gordura perigonadal (PG) (n= 112 controle e 118 obesos); **(b.)** Gordura retroperitoneal (RP) (n= 33 controles e 23 obesos). Cada barra representa a média \pm SD. *** $p \leq 0,001$; significativamente diferente do grupo controle.

Além dos fatores observados acima, nós calculamos o Índice de Lee através da fórmula
$$\frac{\sqrt[3]{\text{Peso}(g) \times 1000}}{\text{Comprimento Naso-Anal}(mm)}$$
, sendo uma avaliação análoga ao IMC em humanos (PATTERSON, 1968; DE CARVALHO *et al.*, 2015). Observamos o Índice de Lee significativamente maior nos animais obesos quando comparado ao grupo controle conforme a figura 12, indicando o excesso de peso devido ao aumento da gordura corporal dos animais, em decorrência da alimentação com a ração rica em lipídeos.

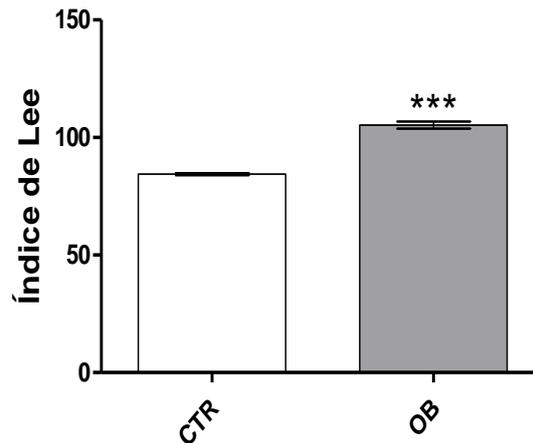


Figura 12: Aumento do Índice de Lee em animais obesos (OB) comparados aos animais controles (CTR), com 16 semanas de dieta padrão ou HFD e com 21 dias de tumor 4T1. Cada barra representa a média \pm SD. *** $p \leq 0,001$; significativamente diferente do grupo controle (n= 90 controles e 75 obesos).

5.2 Avaliação do perfil dos linfonodos

Para avaliar a resposta celular ao tumor, coletamos os linfonodos inguinais (que são os linfonodos drenantes do tumor de mama em nosso modelo devido ao local de injeção das células). Dada a baixa quantidade de células extraídas desses órgãos foi necessário juntá-los em *pools* com dois animais.

A figura 13 a representa o número de células $\times 10^6$ nos linfonodos dos animais controles e obesos que receberam a linhagem de tumor de mama 4T1. Observamos uma queda significativa na média do número de células nos linfonodos, de $23 \times 10^6 \pm 5,916$ nos animais controles, para uma média de $12,9 \times 10^6 \pm 4,129$ nos animais obesos.

Nossos dados indicam, na figura 13 b e c, que a queda no número de células atingiu tanto as populações de linfócitos – marcados com anticorpo anti-CD3⁺ – quanto as populações de granulócitos – separados por gates de tamanho e granulosidade – dos animais obesos.

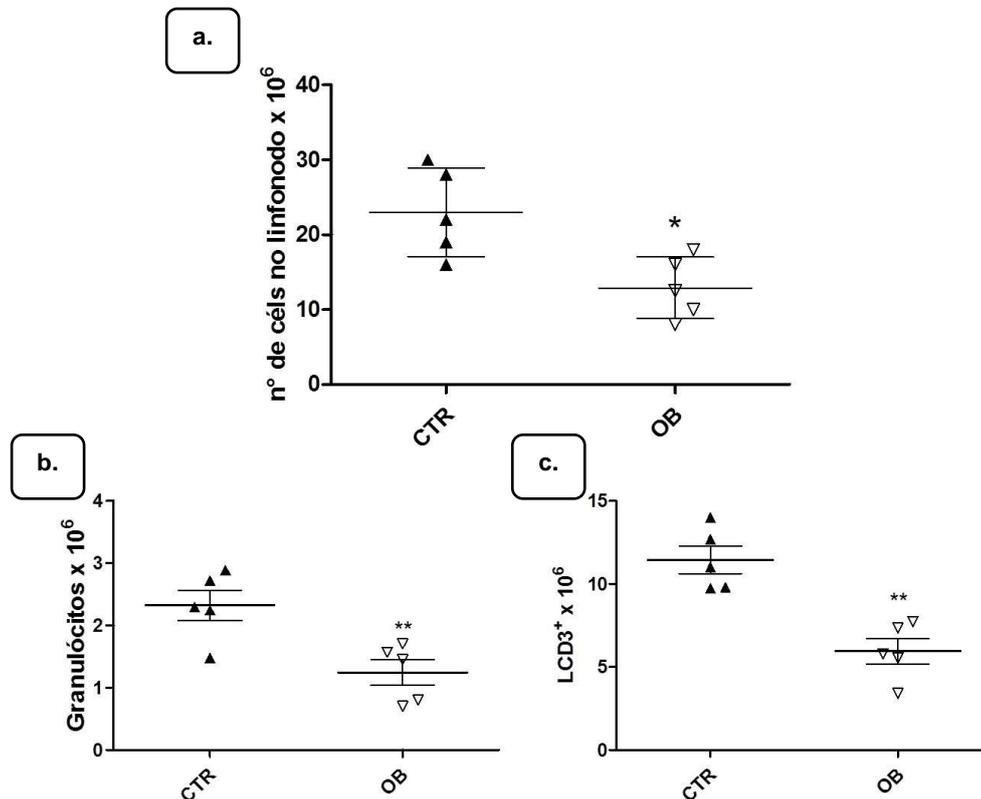


Figura 13: Diminuição do número de (a.) células nos linfonodos inguinais drenantes; (b.) células granulosas; e (c.) células linfóides em animais obesos (OB) em relação aos animais controles (CTR) com 16 semanas de dieta HFD ou padrão e com 21 dias de tumor 4T1. Cada barra representa a média ± SD. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ significativamente diferente do grupo controle. (n= 5 controles e n= 5 obesos).

5.3 Avaliação do perfil de células da resposta inata nos linfonodos

Para marcar as células da imunidade inata, foram utilizados anticorpos ligantes dos receptores de membrana plasmática anti-CD11b, anti-CD80 e anti-CD86, para marcar macrófagos e macrófagos ativados e anticorpos ligantes dos receptores de membrana plasmática anti-CD11c, anti-CD80 e anti-CD86, para marcar células dendríticas e células dendríticas ativadas.

A figura 14 a e 15 a ilustram, a partir de gráficos dot's plot's e da porcentagem de células, a separação das populações de macrófagos e células dendríticas. Na figura 14 b, observamos que o número de macrófagos nos linfonodos dos animais os quais receberam HFD durante longo período foi significativamente menor quando comparados aos animais que receberam ração padrão por esse mesmo tempo, passando de $4,34 \times 10^6 \pm 1,207$ nos controles para

$2,18 \times 10^6 \pm 0,5694$ nos obesos, uma redução de 48% nessa população. Essa diminuição também é visível na figura 14 c, onde o número médio de células dendríticas dos obesos, caiu 45% quando comparado com a média de células dos animais controles, passando de $4,73 \times 10^6 \pm 1,445$ para $2,57 \times 10^6 \pm 0,9794$.

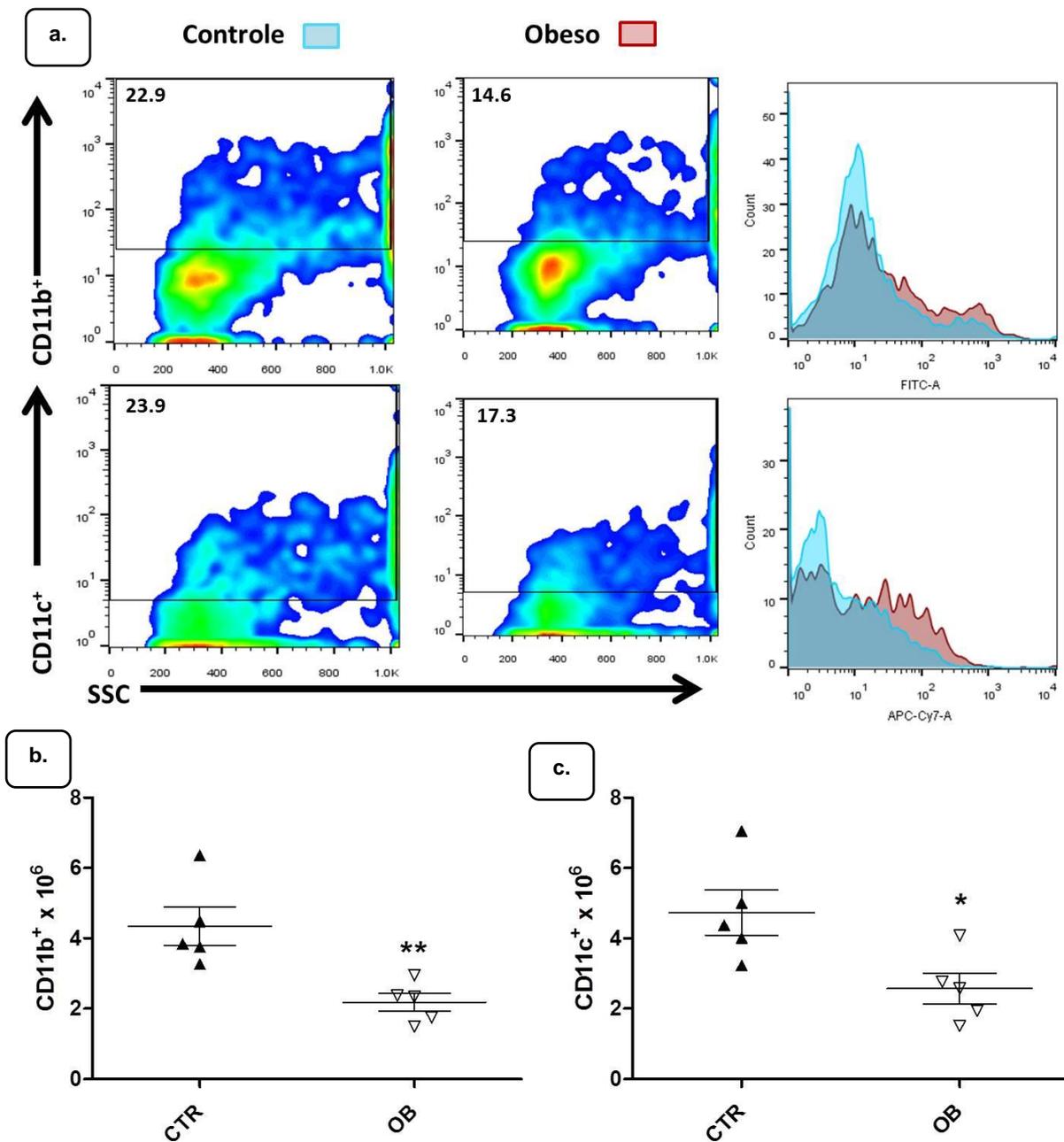


Figura 14: Diminuição da resposta imune inata em animais obesos (OB) em relação aos animais controles (CTR), alimentados por 16 semanas de dieta controle ou HFD e com 21 dias de tumor 4T1. **(a.)** ilustração da separação por gates das populações de macrófagos (CD11b⁺) e células dendríticas (CD11c⁺) em porcentagem, nos animais controles e obesos; **(b.)** média do número absoluto de macrófagos (CD11b⁺) presentes em animais controles e obesos; e **(c.)** média do número absoluto de células dendríticas (CD11c⁺) presentes em animais controles e obesos. Cada barra representa a média ± SD. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ significativamente diferente do grupo controle. (n = 5 controles e n = 5 obesos).

Para determinar se os macrófagos e as células dendríticas dos linfonodos eram células ativadas e maduras/diferenciadas, utilizou-se anticorpos para marcadores de receptores de moléculas coestimuladores anti-CD80 e anti-CD86. Nesse contexto, os macrófagos CD80⁺ e CD86⁺ dos animais obesos diminuíram 47% em relação ao grupo controle, demonstrando uma menor maturação dessas células, o mesmo ocorreu com as células dendríticas que também apresentaram uma redução de 38% na expressão dos co-estimuladores em sua membrana, resultando em uma quantidade maior de células imaturas, como observado na figura 15 b e c.

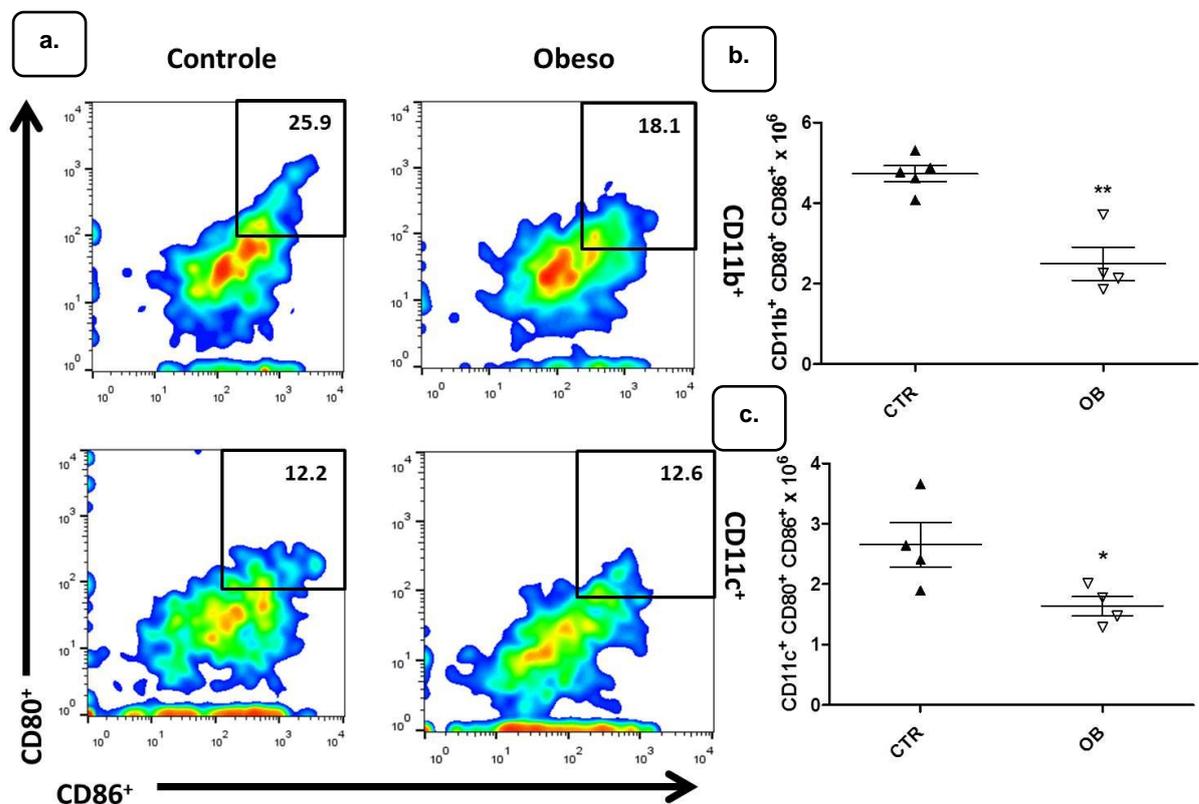


Figura 15: Diminuição da maturação das células dendríticas e dos macrófagos nos animais obesos (OB) em relação aos animais controles (CTR), alimentados por 16 semanas com dieta controle ou HFD e com 21 dias de tumor 4T1. **(a.)** ilustração da separação por gates das populações de macrófagos (CD11b⁺ CD80⁺ CD86⁺) e células dendríticas (CD11c⁺ CD80⁺ CD86⁺) em porcentagem, nos animais controles e obesos; **(b.)** média do número absoluto de macrófagos (CD11b⁺ CD80⁺ CD86⁺) presentes em animais controles e obesos; e **(c.)** média do número absoluto de células dendríticas (CD11c⁺ CD80⁺ CD86⁺) presentes em animais controles e obesos. Cada barra representa a média ± SD. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; significativamente diferente do grupo controle. (n = 5 controles e n = 5 obesos).

5.4 Avaliação do perfil de células da resposta adaptativa nos linfonodos

Para marcar as células da imunidade adaptativa, foram utilizados anticorpos anti receptores de membrana plasmática anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8 para marcar linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺, respectivamente.

Os Dot's Plot's na figura 16 a, ilustram as populações de linfócitos marcados com CD3 em animais controles e obesos, e indicam de onde derivou as populações representadas nos Dot's Plot's da figura 16 b, o quais ilustram os linfócitos T auxiliares (CD4⁺) e os linfócitos T citotóxicos (CD8⁺), em animais controles e obesos. Na figura 16 c e d, observa-se que nas duas populações celulares – T CD4⁺ e T CD8⁺ – houve uma diminuição significativa nos obesos em relação aos controles. Os linfócitos auxiliares (CD3⁺/CD4⁺) passaram de $14,05 \times 10^6 \pm 3,161$ células nos controles para $7,91 \times 10^6 \pm 2,588$ nos obesos, indicando uma queda de 43% dessas células nos animais que receberam HFD. Em relação aos linfócitos T citotóxicos (CD3⁺/CD8⁺) a redução foi de 38%, passando de uma média de células de $5,37 \times 10^6 \pm 1,27$ nos controles para uma média de $3,34 \times 10^6 \pm 0,8989$ nos obesos.

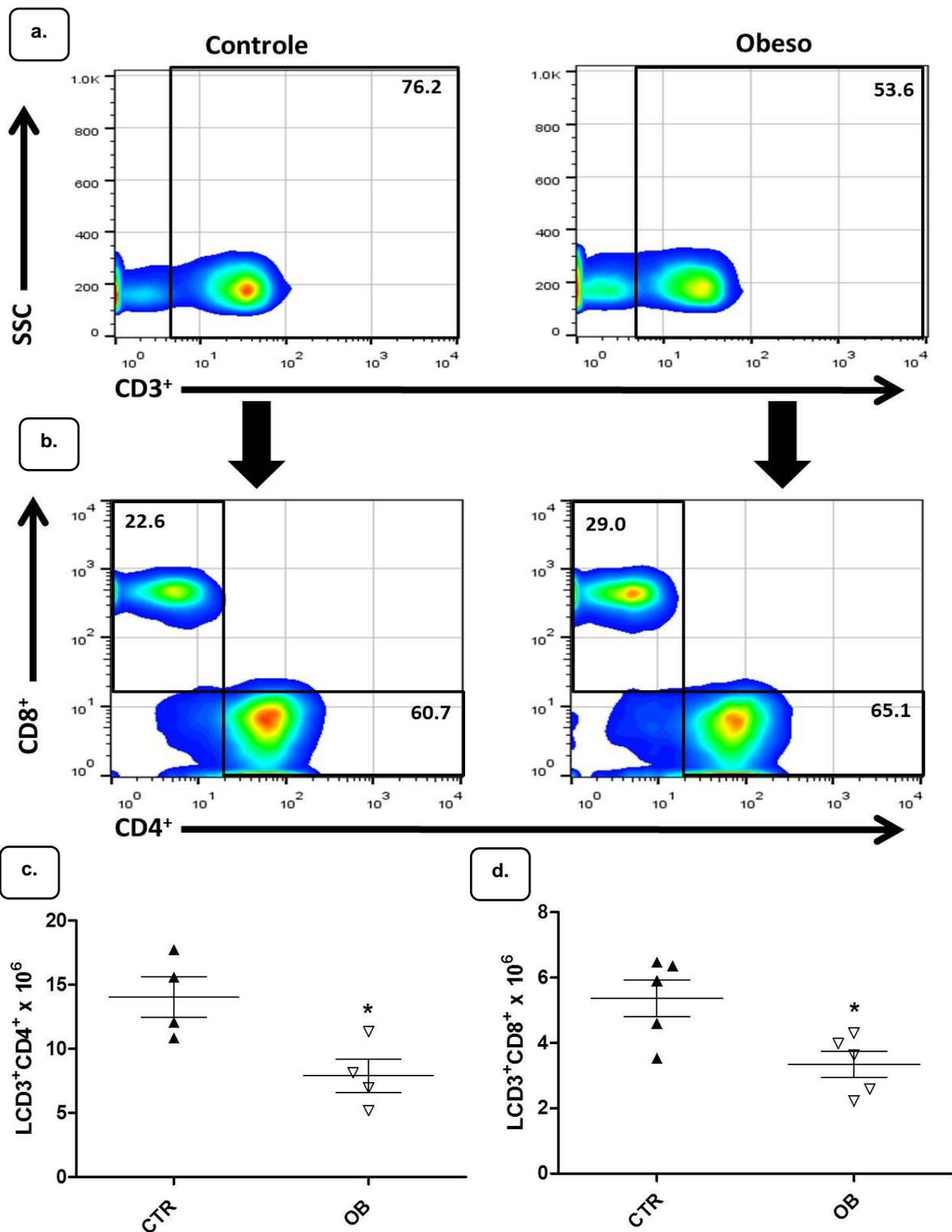


Figura 16: Diminuição da resposta imune adaptativa em animais obesos (OB) em relação aos animais controles (CTR), alimentados por 16 semanas de dieta controle ou HFD e com 21 dias de tumor 4T1. **(a.)** ilustração da separação por gates das populações de linfócitos (CD3⁺) em porcentagem, nos animais controles e obesos; **(b.)** ilustração da separação por gates das populações de linfócitos auxiliares (CD3⁺ CD4⁺) e linfócitos citotóxicos (CD3⁺ CD8⁺) em porcentagem, nos animais controles e obesos; **(c.)** média do número absoluto de linfócitos auxiliares (CD3⁺ CD4⁺) presentes em animais controles e obesos; **(d.)** média do número absoluto de linfócitos citotóxicos (CD3⁺ CD8⁺) presentes em animais controles e obesos. Cada barra representa a média ± SD. * $p < 0,05$; significativamente diferente do grupo controle. (n= 5 controles e n= 5 obesos).

5.5 Avaliação do perfil de citocinas dos linfócitos TCD4⁺ E TCD8⁺ nos linfonodos

Para marcar citocinas produzidas pelos linfócitos auxiliares e citotóxicos, foram utilizados os anticorpos intracelulares anti-IL-10, e anti-IFN- γ , conjugados com anticorpos anti receptores de membrana plasmática anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8.

A figura 17 a contém os Dot's Plot's ilustrativos da separação das populações de linfócitos auxiliares (CD4⁺) e linfócitos citotóxicos (CD8⁺) em animais controles e obesos de onde derivam os dot's plot's da figura 17 b, os quais ilustram as populações de CD4⁺ produtores de INF- γ e IL-10 e as populações de CD8⁺ produtores de INF- γ e IL-10 em animais controles e obesos. Na figura 17 c e e, observa-se que as os linfócitos T auxiliares (CD3⁺/CD4⁺) dos obesos produziram significativamente menos IFN- γ (interferon gama) em relação aos controles, enquanto a produção de IL-10 não sofreu alteração. E nas figuras 17 d e f, os linfócitos T citotóxicos (CD3⁺/CD8⁺) dos animais obesos, tiveram uma produção de IFN- γ semelhante com os animais controles, mas uma diminuição significativa na produção de IL-10 quando comparados a esse mesmo grupo.

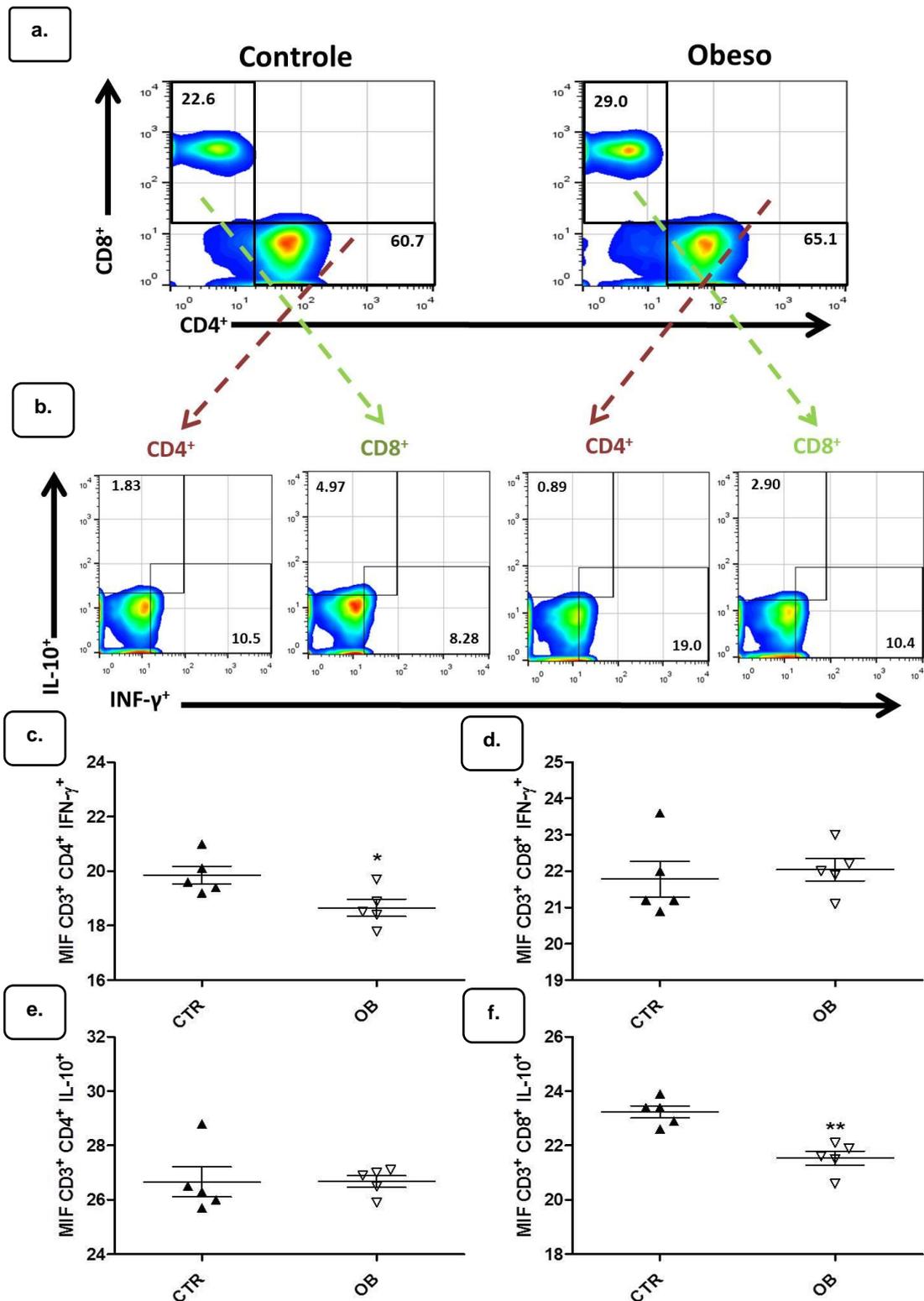


Figura 17: Desbalanço de citocinas de perfil pró-inflamatório e anti-inflamatório em animais com 16 semanas de dieta controle ou HFD e com 21 dias de tumor 4T1. **(a.)** ilustração da separação por gates das populações de linfócitos auxiliares (CD4⁺) e linfócitos citotóxicos (CD8⁺) em porcentagem, nos animais controles e obesos; **(b.)** ilustração da separação por gates das populações de linfócitos CD4⁺ e linfócitos CD8⁺ produtores de INF-γ e IL-10 em porcentagem, nos animais controles e obesos; **(c.)** média de intensidade de fluorescência (MIF) de INF-γ nos linfócitos auxiliares CD4⁺ nos animais controles e obesos; **(d.)** média de MIF de INF-γ nos linfócitos auxiliares CD8⁺ nos animais controles e obesos; **(e.)** média de MIF de IL-10 nos linfócitos auxiliares CD4⁺ nos animais controles e obesos; **(f.)** média de MIF de IL-10 nos linfócitos auxiliares CD8⁺ nos animais controles e obesos; Cada barra representa a média ± SD. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; significativamente diferente do grupo controle. (n= 5 controles e n= 5 obesos).

5.6 Avaliação do perfil de linfócitos regulatórios nos linfonodos

Para marcar as células regulatórias B, foi utilizado o anticorpo intracelular anti-FoxP3, conjugados com anticorpos anti receptores de membrana plasmática anti-CD19.

A figura 18 a, contém os Dot's Plot's ilustrativos da separação da população de linfócitos B (CD19⁺) de animais controles e obesos, de onde derivam os dot's plot's da figura 18 b ilustrativa das populações de linfócitos B regulatórios (CD19⁺ CD25⁺) de animais controles e obesos. Os resultados apresentados na figura 18 c e d indicam que a população de linfócitos B e linfócitos B regulatórios dos animais obesos, sofreram uma diminuição significativa em relação aos animais controles. O linfócitos B regulatórios caíram mais da metade: 60%, passando de uma média de células de $0,36 \times 10^6 \pm 0,0344$ para $0,14 \times 10^6 \pm 0,0652$ em obesos e os linfócitos B dos obesos diminuíram 53% em relação aos linfócitos B dos animais controles que receberam ração padrão.

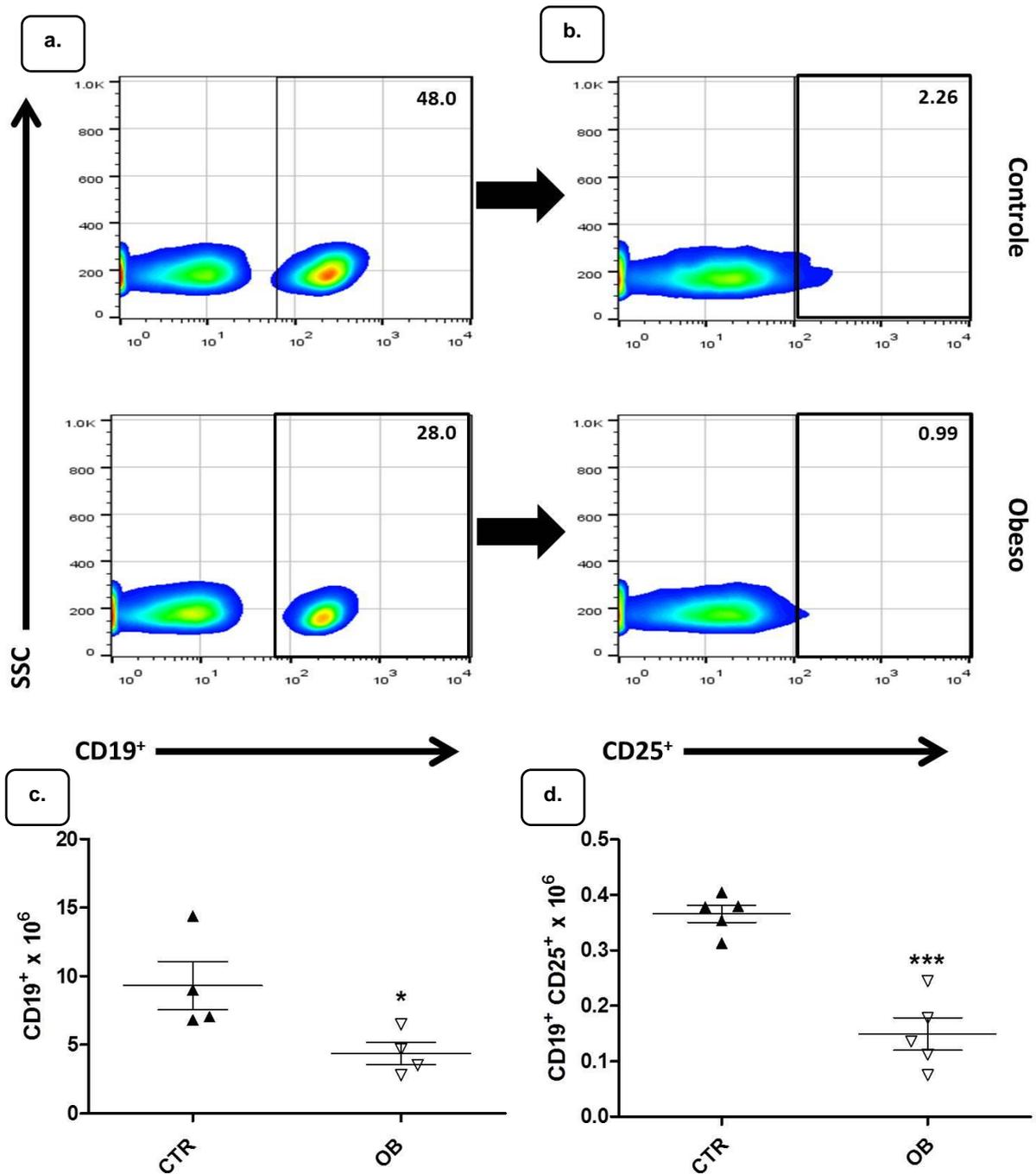


Figura 18: Diminuição resposta imune de linfócitos B e B regulatórios em animais obesos (OB) em relação aos animais controles (CTR) alimentados por 16 semanas com dieta controle ou HFD e com 21 dias de tumor 4T1. **(a.)** ilustração da separação por gates das populações de linfócitos B (CD19⁺) em porcentagem, nos animais controles e obesos; **(b.)** ilustração da separação por gates das populações de linfócitos B regulatórios (CD19⁺ CD25⁺) em porcentagem, nos animais controles e obesos; **(c.)** média do número absoluto de linfócitos B (CD19⁺) presentes em animais controles e obesos; **(d.)** média do número absoluto de linfócitos B regulatórios (CD19⁺ CD25⁺) presentes em animais controles e obesos. Cada barra representa a média ± SD. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; significativamente diferente do grupo controle. (n= 5 controles e n= 5 obesos).

Para marcar as células regulatórias T, foi utilizado o anticorpo intracelular anti-FoxP3, conjugados com anticorpos anti receptores de membrana plasmática anti-CD25, anti-CD4 e anti-CD8.

A figura 19 a esquematiza os Dot's Plot's ilustrativos da separação das populações de linfócitos T auxiliares (CD4⁺) e linfócitos T citotóxicos (CD8⁺) em animais controles e obesos, de onde partem os dot's plot's da figura 19 b ilustrativos das populações de linfócitos TCD4⁺ regulatórios (CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺) e linfócitos TCD8⁺ (CD8⁺ CD25⁺ FoxP3⁺) de animais controles e obesos. Nas figuras 19 c e d, observamos que as células Treg diminuíram significativamente nos animais obesos, independente a subpopulação, se T CD4⁺ ou T CD8⁺, passando de uma média de células de $0,45 \times 10^6 \pm 0,0466$ nos animais que ingeriram dieta padrão para $0,26 \times 10^6 \pm 0,1104$ nos animais que ingeriram HFD (uma queda de 42% em relação ao controle) e de $0,20 \times 10^6 \pm 0,1054$ nos animais controles para $0,03 \times 10^6 \pm 0,0112$ nos animais obesos (uma redução de 85% em relação ao controle), respectivamente.

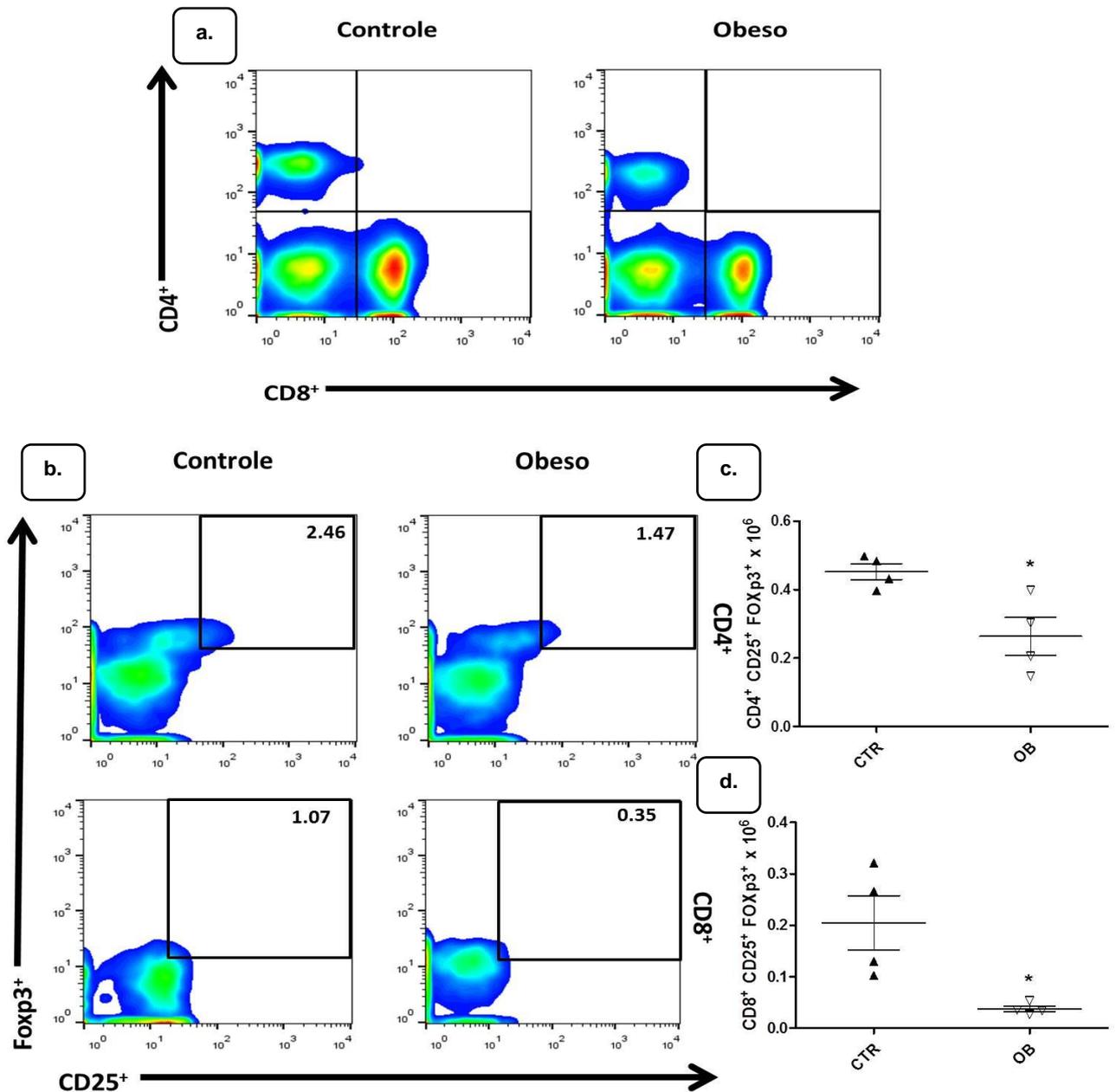


Figura 19: Diminuição resposta imune de linfócitos T regulatórios em animais obesos (OB) em relação aos animais controles (CTR) alimentados por 16 semanas com dieta controle ou HFD e com 21 dias de tumor 4T1. **(a.)** ilustração da separação por gates das populações de linfócitos TCD4⁺ e linfócitos TCD8⁺ em porcentagem, nos animais controles e obesos; **(b.)** ilustração da separação por gates das populações de linfócitos T auxiliares regulatórios (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) e linfócitos T citotóxicos regulatórios (CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺) em porcentagem, nos animais controles e obesos; **(c.)** média do número absoluto de linfócitos TCD4⁺ regulatórios (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) presentes em animais controles e obesos; **(d.)** média do número absoluto de linfócitos TCD8⁺ regulatórios (CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺) presentes em animais controles e obesos. Cada barra representa a média ± SD. * $p \leq 0,05$; significativamente diferente do grupo controle. (n= 5 controles e n= 5 obesos).

6 DISCUSSÃO

A obesidade e o câncer de mama são doenças amplamente distribuídas pelo planeta e que atualmente estão em ascensão, levando a um grave problema de saúde pública mundial. Devido a correlação positiva estabelecida entre as duas doenças (DI SEBASTIANO; MOURTZAKIS, 2014; KWAN et al., 2015; NEUMANN et al., 2015; SUN et al., 2015; ZHANG et al., 2014), é de grande importância definirmos melhor os padrões da resposta imunológica celular dos obesos ao tumor de mama.

Para que o estudo do tumor de mama fosse feito em animais obesos, definimos o tempo de indução da obesidade em 16 semanas, de acordo com estudo de Salvador e colaboradores (dados ainda não publicados), realizado em nosso laboratório com camundongos Balb/c fêmeas, que compararam quatro períodos diferentes de exposição à dieta hiperlipídica – seis, oito, doze e dezesseis semanas – para definir o melhor tempo de dieta. Os dados indicaram que a obesidade foi melhor caracterizada quando expostos à dezesseis semanas de dieta, pois os animais que comeram a HFD por esse período apresentaram um maior índice glicêmico (indicando uma possível resistência à insulina), maiores níveis circulantes de colesterol total, maior quantidade de leptina dosadas no sangue e na gordura, além de apresentarem um ganho de peso corporal com menor ingestão da ração e um aumento significativo das gorduras perigonadais e retroperitoniais, em relação aqueles animais expostos à dieta padrão, isso significa que com uma dieta HFD por dezesseis semanas as fêmeas Balb/c apresentavam um distúrbio metabólico bem característico do quadro de obesidade.

Nossos dados corroboram com os achados de Salvador e indicam que os animais alimentados com a ração hiperlipídica ganham mais peso, apesar de consumirem menos ração, excluindo a possibilidade do maior ganho de peso ser em função de um quadro de hiperfagia (exarcebada ingestão de alimentos), como já descrito por outros autores (HARIRI; THIBAUT, 2010; RAMIREZ; TORDOFF; FRIEDMAN, 1989; WARWICK, 1996). Além disso, nossos animais BALB/c fêmeas, ainda que considerados resistentes à obesidade em decorrência da linhagem e do sexo (NISHIKAWA et al., 2007), obtiveram um aumento significativo tanto do peso

corporal quanto do peso das gorduras perigonadais e retroperitoniais, diferente do que já foi discutido pela literatura (KIM et al., 2011; YEON et al., 2014). Essa divergência pode ser resultante do tempo de dieta e/ou da maior percentagem de lipídeos na ração que possui 60% das suas quilocalorias advindas de lipídeos.

A resposta anti-tumoral é montada inicialmente através da apresentação de antígenos tumorais solúveis, levados através da via linfática, aos linfonodos mais próximos do tumor – denominados linfonodos drenantes do tumor. Após a identificação e processamento desses antígenos pelas células apresentadoras de antígenos (APC's) dá-se início a resposta imune com ativação de células mielóides (macrófagos, células dendríticas e granulócitos) e células linfóides (linfócitos B, linfócitos T e células NK) que irão para o sítio da inflamação (ABBAS,2015).

Ao contar as células dos linfonodos inguinais drenantes do tumor, observamos uma diminuição das células desses órgãos nos animais obesos em relação aos animais controles, a partir disso, medimos as populações mielóides e linfóides (responsáveis pela resposta celular) os quais também sofreram uma redução. Isso indica uma queda da resposta celular como um todo, levando a crer que os animais obesos estão passando por uma falha da resposta do sistema imunológico que pode ser resultado da modulação e/ou inibição realizada pelo tumor sobre a resposta anti-tumoral, em um contexto da inflamação crônica de baixo grau estabelecida pela obesidade.

Processos que integram o quadro de inflamação crônica de baixo grau observado na obesidade como: aumento dos níveis de insulina e leptina circulantes, fatores de crescimento, fatores inflamatórios (citocinas e quimiocinas) e fatores de crescimento vasculares, determinam um aumento da susceptibilidade ao câncer e/ou a progressão do tumor, pois essas moléculas estão associadas à processos como a transição epitélio-mesenquimal (TEM) e ativação do sistema imune, a qual gera alterações nos infiltrados celulares (com modulação dos macrófagos, células dendríticas e linfócitos) determinando um aumento ainda maior da circulação de citocinas inflamatórias tais como IL-1, IL-6, TNF- α e a quimiocina CCL2, por exemplo. Estudos relacionando câncer e obesidade, determinaram que a mudança na TEM, a atuação de adipócitos intratumoriais, a liberação de fatores de crescimentos, citocinas e quimiocinas – locais e sistêmicas – formam um solo fértil, semeado pela obesidade, para a sinalização de crescimento, inflamação, alterações

vasculares, invasão, metástas, progressão e sobrevivência do tumor (HURSTING; DUNLAP, 2012).

As células do sistema imune inato estão envolvidas, geralmente, na defesa inicial contra vírus, bactérias e tumores os quais compartilham padrões moleculares associados à patógenos (PAMP's – do inglês “pathogen-associated molecular pattern”), que são capazes de ativar as células fagocitárias, como neutrófilos e macrófagos, células NK e granulócitos, que por sua vez respondem sem especificidade, porém de forma ágil (ABBAS, 2015).

Os macrófagos são células que participam de todas as fases da tumorigênese: durante as fases iniciais os macrófagos exibem fenótipos M1 mais pró-inflamatórios / anti-tumorais, já nas fases mais avançadas os macrófagos exibem um fenótipo M2 anti-inflamatório / pró-tumoral (BALKWILL; CHARLES; MANTOVANI, 2005; LIN; POLLARD, 2007). Entre os agentes celulares recrutados durante a progressão tumoral, os macrófagos são os mais bem caracterizados, mas seu fenótipo e função são afetados pela proximidade com a massa tumoral. No modelo murino de câncer de mama, as células tumorais ficam lado a lado com o tecido adiposo visceral, o qual contém um elevado número de macrófagos M1 pró-inflamatórios, que rodeiam adipócitos hiperplásicos e apoptóticos formando uma estrutura de coroa (CLS – do inglês “crown like structures”) a qual mantém a inflamação crônica de baixo grau, pois CLS está associada com ativação de NF- κ B, aumento de mediadores pró-inflamatórios e elevada atividade das aromatases (ALTINTAS et al., 2011). Juntando essa relação entre adipócitos e macrófagos e a conversa deles com as células carcinogênicas mamárias, tem-se como resultado a produção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e fatores de crescimento, os quais contribuem para a sobrevivência, disseminação e proliferação da doença (SANTANDER et al., 2015).

As células dendríticas (DC – do inglês “dendritic cells”) são células chave que fazem a ponte entre a resposta imune inata e resposta imune adaptativa, pois possuem uma grande capacidade para modular a resposta imune como um todo, já que elas são APCs profissionais o que as permite detectar infecção através de receptores de PAMPs como, por exemplo, receptores do tipo toll (TLR – do inglês “Toll-like receptors”) e receptores do tipo NOD (NLRs – do inglês “NOD-like receptors”), que promovem a maturação funcional das DCs permitindo sua migração para as zonas das células T de órgãos linfóides secundários, onde irão apresentar

os antígenos para as células T (DIEU et al., 1998; YANAGIHARA et al., 1998). A apresentação pode ocorrer pela via clássica através do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe I e MHC de classe II ou de forma não clássica quando antígenos lipídicos são apresentados através da molécula CD1. As apresentações são capazes de ativar linfócitos T específicos, incluindo células T CD8⁺, CD4⁺ e células NK (PALUCKA; COUSSENS, 2016), porém a iniciação eficiente de células T naive por células dendríticas é finamente regulada por uma rede de eventos, incluindo o aumento da formação de complexos estáveis de peptídeo-MHC, expressão de moléculas co-estimuladoras, produção de citocinas e a interação dinâmica entre DCs ativadas e as células T naive. O papel das DCs no tumor, pode ser de vigilância anti-tumoral, quando há uma iniciação eficiente da resposta imune específica contra o tumor, determinada pela apresentação antigênica eficiente e ativadora de linfócitos T; ou pode ser de evasão pró-tumoral, quando há uma deficiência na maturação das DCs em conjunto com fatores imunossupressores do microambiente tumoral (LIN et al., 2010).

Os receptores de membrana CD80 e CD86, são moléculas co-estimuladoras responsáveis pelo sinal secundário que permite desencadear a ativação dos linfócitos depois da formação do complexo TCR/MHC, quando esses sinais secundários não existem ou estão baixos as APC's não atingem seu estado de maturidade, tornando-se imaturas. A consequência disso é que a apresentação de antígenos passa a ter uma papel inverso, isto é, as APCs imaturas quando se ligam aos linfócitos T naives levam essas células a um estado anérgico o qual impede sua ação efetora.

Ao quantificarmos as células do sistema imune inato, identificamos que elas não só estavam em menor quantidade nos animais que receberam HFD em relação aos que receberam ração padrão, mas também possuíam menores níveis de co-estimuladores em sua membrana, indicando que houve uma baixa dessa resposta e que essas células estavam imaturas nos animais obesos. Nossos dados corroboram com estudos de ALMAND *et al.* (2000) em pacientes com câncer de mama, os quais identificaram uma maior quantidade de macrófagos e células dendríticas imaturas no tecido tumoral em comparação com voluntários saudáveis, esses níveis de células imaturas foram relacionados com o maior peso tumoral e maior duração da doença. A diminuição de maturação dessas células, é correlacionada com células supressoras derivadas de mielóides (MDSC, do inglês "Myeloid-derived suppressor

cells”) que são uma população heterogênea de células mielóides imaturas, originadas de progenitores mielóides os quais não finalizaram sua diferenciação em macrófagos, células dendríticas e outros granulócitos; elas são caracterizadas pelo seu papel funcional de supressão do sistema imunológico. Em modelos animais com linhagem 4T1, a inibição de MDSC's levou a um aumento da maturação dos macrófagos e das células dendríticas, indicando, portanto, que essas células modulam ativamente a supressão da resposta imune inata (KERKAR et al., 2011).

As células do sistema imune adaptativo são capazes de montar uma resposta mais efetiva e duradoura contra patógenos, pois elas possuem refinada especificidade devido aos seus imensos repertórios de receptores e memória que permitem rápida e efetiva resposta em um segundo encontro. As células responsáveis pela resposta adaptativa são os linfócitos B com suas subpopulações (plasmocitárias, de memórias e reguladores) e os linfócitos T com suas subpopulações (auxiliares – Th1, Th2, Th17, citotóxicos e reguladores) (ABBAS, 2015).

As células T CD4⁺ e T CD8⁺ estão envolvidas na resposta imune contra o câncer de mama com atuações diferentes ao longo da progressão da doença, visto que em estágios iniciais, os linfócitos Th1 e CD8⁺ são dominantes nas populações dos infiltrados tumorais de linfócitos e estão ligados à imunovigilância; e em estágios tardios, os linfócitos CD4⁺ aumentam significativamente em números e subconjuntos com dominação das subpopulações Treg e Th17, que podem contribuir para a promoção do tumor (HUANG et al., 2015).

Já é sabido que as células T CD4⁺ são importantes coordenadoras do processo de imunoedição do sistema imunológico durante a progressão do tumor mamário, pois ao serem ativadas essas células secretam diferentes tipos de citocinas com base em funções efetoras, por exemplo: as células Th1 secretam IL-2, TNF- α , e IFN- γ juntamente com linfócitos T citotóxicos (CTL – do inglês “cytotoxic T lymphocytes”), o que permite a promoção da citotoxicidade em macrófagos e o aumento do processamento de antígenos e expressão de moléculas MHC I e II em APCs. Em contraste, a expressão de IL-4, -5, -6, -10, -13 por células Th2 podem induzir anergia da célula T e perda de citotoxicidade mediada por elas, reforçar a imunidade humoral e regular as atividades de TAM (PALUCKA; COUSSENS, 2016).

As células T CD8⁺ são consideradas as principais células efetoras contra o câncer, uma vez que podem dar origem a linfócitos T citotóxicos que matam as células neoplásicas (APPAY et al., 2008). Os CTLs podem ser gerados através da

reprogramação de células T de memória ou pela ativação, nos órgãos linfóides secundários, de células T CD8⁺ naives por APCs que apresentam peptídeos derivados de tumores, no contexto da co-estimulação através do CD80 e CD86, bem como através de citocinas como IL-12, IFN- γ e IL-15 (STEINMAN, 2012). As propriedades anti-tumorais das células T CD8⁺ incluem: elevada afinidade células malignas com baixa expressão de MHC; níveis elevados de mediadores citotóxicos como granzimas e perforina; expressão de moléculas de superfície que permite a migração para o tumor; e estendida longevidade, além de memória, permitindo assim a produção de CTL na re-exposição ao antígeno. Porém, após a chegada no microambiente tumoral, as células T CD8⁺ enfrentam numerosos obstáculos, tais como pontos intrínsecos de checagem (CD28-CTLA-4 e PD1-PD-L1); reguladores extrínsecos como células T reg e/ou células supressoras derivadas de mielóides (MDSC – do inglês myeloid-derived suppressor cells); um microambiente tumoral inflamatório pró-câncer; perda de antígeno e evasão dos tumores; e alterações de tecidos específicos, tais como células de gordura no câncer de mama (COUSSENS; ZITVOGEL; PALUCKA, 2013; FEHÉRVARI; SAKAGUCHI, 2004; SHARPE; MOUNT, 2015).

Após verificarmos que a resposta imune inata estava diminuída, fomos pesquisar se isso poderia estar influenciando as células da resposta imune adaptativa e para isso marcamos as células auxiliares e citotóxicas. Ao contarmos os linfócitos CD3⁺/CD4⁺ e CD3⁺/CD8⁺ dos obesos, identificamos uma diminuição dessas células, o que indica uma baixa na resposta imune adaptativa. Nossos dados diferem de Huang e colaboradores, em 2015, os quais observaram que o número de linfócitos CD4⁺ aumentaram em tumores mamários e houve uma alteração dinâmica entre suas subpopulações, sugerindo que cada uma possui um envolvimento ativo, com funções distintas na resposta imune durante a progressão do tumor. Já em relação aos linfócitos CD8⁺, o mesmo grupo, observou um acúmulo dessas células nos sítios tumorais e esse fato estava negativamente correlacionado com o avanço da doença e metástase e positivamente correlacionado com maior taxa de sobrevivência, em câncer de mama humano.

Essa diminuição encontrada em nosso trabalho, que difere da literatura, pode ser atribuída à uma possível disfunção hematopoiética observada nos animais obesos. Dados não publicados de Salvador e colaboradores demonstraram aumento de metástases na medula óssea dos animais obesos, o que pode prejudicar a

hematopoiese e culminar na redução de progenitores mielóides e linfóides. Chan et al., em 2012, também observaram essa disfunção hematopoiética quando estudaram populações de células T em animais que receberam HFD, onde os animais obesos apresentaram um decréscimo de 38% de células T CD4⁺ e T CD8⁺ no sangue em relação aos animais controles. Os autores atribuíram esse evento à quebra de equilíbrio entre o sistema esquelético e imunológico, o que acelera a deterioração da estrutura óssea e, simultaneamente, diminui o processo hematopoiético, expondo os animais obesos a uma pior resposta imunológica ao tumor (CHAN et al., 2012).

Além disso, os animais obesos possuem mais quantidade de MDSC's, ocasionando o direcionamento da hematopoiese para a produção dessas células que são responsáveis pela resolução da inflamação e equilíbrio do tecido. No caso da inflamação crônica de baixo grau observada na obesidade, essa resolução nunca ocorre, culminando no acúmulo dessas células reguladoras, além disso, os ácidos graxos produzidos pelos adipócitos, muito mais numerosos nos indivíduos obesos, também foram descritos como indutores do acúmulo de MDSC (OKWAN-DUODU et al., 2013).

A regulação da resposta inflamatória deve acontecer para que haja a manutenção da homeostase do hospedeiro, porém no caso do tumor mamário, as células malignas subvertem a função supressora das MDSC para favorecerem a progressão, disseminação e sobrevivência do câncer de mama. Em modelo murino de tumor mamário 4T1, a supressão dos linfócitos pela ação de MDSC foi descrita através de diferentes mecanismos como: i) estimulação de reguladores imunológicos, como células Treg, células Th2 e TAMs (MUNDY-BOSSE et al., 2011); ii) sequestro de arginina que leva a privação dos linfócitos desse aminoácido gerando uma deficiência na expressão da cadeia zeta do receptor CD3 (TCR – do inglês "Tcell receptor"), prendendo-as a fase do ciclo celular G0-G1 (EZERNITCHI et al., 2006); sequestro de cisteína do meio impedindo a oferta desse aminoácido pelas APC's durante o processo de apresentação de antígeno, culminando na perturbação da ativação de linfócitos, além de impedir a produção de glutathione uma importante molécula que protege as células do estresse oxidativo freqüente no microambiente tumoral, levando a morte dos linfócitos T que vão para o tumor (SRIVASTAVA et al., 2010); iii) produção de espécies reativas de oxigênio em resposta a estímulos tumorais (TGF- β , IL-3, IL-6, IL-10 e GM-CSF), como o ácido nítrico, o qual limita a

resposta de IFN- γ pelas células T, peroxinitrito que gera a nitração do receptor de células T (TCR) impedindo sua ligação ao MHC e óxido nítrico que diminui a expressão de MHC de classe II induzindo a apoptose celular (GABRILOVICH; NAGARAJ, 2009; MUNDY-BOSSE et al., 2011); iv) perturbação do tráfego dessas células para os sítios de ativação, como linfonodo, onde são apresentados os antígenos que ativam as células, através da inibição de L-selectina, uma molécula de adesão que facilita o extravasamento de linfócitos para os nódulos linfáticos e locais inflamatórios, inibindo uma potencial resposta efetora de chegar até o tumor (ROSEN, 2004).

As células da resposta adaptativa como os linfócitos T auxiliares e citotóxicos, por exemplo, são capazes de secretar diferentes citocinas as quais estão envolvidas na emissão de sinais para outras células e, conseqüentemente, na montagem da resposta imunológica contra antígenos imunogênicos. IFN- γ é uma citocina essencial para imunidade contra patógenos intracelulares e câncer, pois camundongos knockout para essa citocina ou seu receptor, ficam altamente susceptíveis a uma variedade de bactérias, protozoários, infecção por vírus, além de desenvolverem tumores maiores e agressivos (SCHRODER et al., 2004). O IFN- γ é produzido tanto por células inatas quanto pelas adaptativas, visto que células NK são fontes primárias dessa molécula, linfócitos CD4⁺ Th1 produzem altas doses de IFN- γ e linfócitos CD8⁺, após a ativação e diferenciação em CTL, elevam a produção dessa citocina. O papel melhor caracterizado do IFN- γ na modulação do sistema imune é através de células T CD8, que ao secretarem-no aumentam a apresentação de antígenos via MHC I, facilitando o reconhecimento das células infectadas ou neoplásicas pelos CTL, além disso, o IFN- γ pode agir sobre as células T CD4⁺ e células B (DE ARAUJO-SOUZA; HANSCHKE; VIOLA, 2015).

A interleucina 10 (IL-10) pode ser expressa pela maioria das células T, incluindo células Tregs, APCs, macrófagos, bem como células epiteliais. IL-10 inibe a secreção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , TNF- α , IL-1 β e IL-6 por células T CD4⁺ e também inibe a expressão de moléculas MHC e moléculas co-estimulatórias em vários níveis, regulando as respostas secundárias do T CD8⁺. Além disso, foi sugerido que a IL-10 contribui para um microambiente tumoral supressor do sistema imune (MUMM et al., 2011; SARAIVA et al., 2009).

Após determinar a quantidade de linfócitos, observamos a secreção da citocina inflamatória IFN- γ e da citocina anti-inflamatória IL-10 e o que achamos foi

uma produção menor de IFN- γ pelos linfócitos auxiliares dos obesos em relação aos controles, mas uma secreção igual de IL-10 entre os dois grupos, isso indica que o linfócito CD4⁺ dos animais alimentados com HFD foram menos eficientes em montar uma resposta anti-tumoral com ativação de linfócitos auxiliares Th1 devido a menor quantidade de IFN- γ , mas sua capacidade de direcionar a resposta para um perfil Th2, que é pró-tumoral, através de IL-10 foi igual a dos controles, explicando assim a menor quantidade de linfócitos efetores da imunidade adaptativa. Em relação aos linfócitos CD8⁺, encontramos níveis semelhantes de secreção de IFN- γ , porém uma menor produção de IL-10 nos animais obesos em relação aos animais controles indicando que esses linfócitos citotóxicos eram efetores, pois produziam mais IFN- γ e menos IL-10, porém como seu número foi reduzido nos obesos, a resposta citotóxica contra o tumor nesses animais, em relação aos animais controles, não foi capaz de gerar uma resposta suficientemente eficiente para combater o tumor.

Outra importante célula da resposta imune adaptativa, é o linfócito B, o qual monta uma resposta contra patógenos a partir do reconhecimento de antígenos específicos pelo receptor de célula B (BCR – do inglês “B cell receptor”) e da intensa proliferação e formação dos centros germinativos, onde podem trocar de classe de imunoglobulina e se diferenciarem em células plasmáticas (PC) produtoras de anticorpos de elevada afinidade, responsáveis por eliminar o patógeno via formação do complexo antígeno-anticorpo, ativação do sistema complemento ou opsonização de células infectadas (NELSON, 2016).

As células B também podem promover a imunidade anti-tumoral através do fornecimento de antígenos tanto para os linfócitos CD4⁺ quanto para os linfócitos CD8⁺, resultando na expansão dessas células e na formação de memória, podendo atuar como APCs para sustentar a sobrevivência e proliferação de células T infiltradas no tumor. Além disso, os anticorpos secretados pelas células B oferecem grandes benefícios para a imunidade anti-tumoral, pois ao ligarem-se aos antígenos tumorais amplificam a resposta imune adaptativa (SHEN et al., 2016).

Ao avaliarmos a quantidade de linfócitos B no linfonodo inguinal drenante do tumor, observamos uma queda pela metade no número dessas células nos animais obesos em relação aos animais controles, portanto, as células B, que poderiam ativar os linfócitos T através de apresentação, ou produzir anticorpos que combateriam as células malignas, foram diminuídas, e sua ação de indutoras de resposta anti-tumoral foi anulada.

Para além das funções anti-cancerígenas das células B, evidências sugerem que subpopulações reguladoras podem exercer o papel de supressoras da resposta imune ao interagir diretamente com o tecido tumoral, células T, APCs, Tregs e MDSCs (SHEN et al., 2016). Co-culturas de células Breg com células T CD4⁺ e T CD8⁺ resultaram em uma redução significativa na capacidade proliferativa desses linfócitos, induzindo a anergia e a apoptose, devido a secreção de citocinas como TGF- β ou por contato célula-célula (XING et al., 2015). Nossos dados indicaram uma queda da subpopulação de linfócitos B regulatórios nos animais que foram alimentados com HFD em relação aos animais alimentados com ração padrão e isso pode significar um aumento da resposta, já que seu papel supressor é bem efetivo, porém acreditamos que essa diminuição é devido a pouca quantidade de linfócitos B, indicando que o baixo nível de Breg não levaria ao aumento da resposta anti-tumoral.

A descoberta de células T reguladoras (Treg) muda o clássico paradigma de diferenciação Th1/Th2 alterando o pensamento convencional sobre o papel das células T CD4⁺ na imunidade contra o tumor, pois elas podem dar origem a células auxiliares com perfis distintos de citocinas como os linfócitos Treg, os quais diminuem a atividade de CTL e evitam respostas auto-imunes (PALUCKA; COUSSENS, 2016). Sendo assim, as Treg podem desempenhar um papel crítico na modulação dos níveis de inflamação dos tecidos através das suas interações com os vários componentes do sistema imune. Uma função bem definida para estas células é o direcionamento da interação entre células T efetoras e células APCs através de citocinas, tais como IL-10 e TGF- β ou interações diretas, o qual induz um microambiente imunossupressor, impedindo a montagem de uma resposta anti tumoral efetora, tornando-se um importante obstáculo durante o câncer de mama (TADOKORO et al., 2006).

Nossos dados contradizem o trabalho de DEIULIIS *et al.*, 2011, o qual demonstra que o aumento de depósitos adiposos viscerais estão associados à redução do número e função de Treg, o que pode levar a inclinação da resposta para um perfil pró-inflamatório, resultando em um aumento direto da resposta inata e adaptativa (DEIULIIS et al., 2011). O que observamos em nosso estudo foi a diminuição do perfil regulatório devido a queda no número de células T CD4⁺ e IL-10, o que impediria a diferenciação dessas células em células reguladoras, mas que não levou ao aumento da resposta anti-tumoral, pois as células linfoides estão

diminuídas nos animais obesos devido ao possível comprometimento da hematopoiese desses animais.

Em resumo, a obesidade ao induzir uma inflamação crônica de baixo grau, gera um aumento dos níveis de fatores de crescimento (como VEGF, TNF- α e IGF), de citocinas (como IL-1 e IL-6), de quimiocinas (como CCL-2, CCL-5 e CXCL-12), o direcionamento para a diferenciação de MDSC (via aumento de COX ou ácidos graxos), o aumento de TEM (com ajuda de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas) e a diminuição da hematopoiese.

Nossos dados sugerem que, se presentes, esses eventos em conjunto, regulam a resposta inata e adaptativa, levando a diminuição de macrófagos e células dendríticas, além de impedir sua maturação, a diminuição de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, além do desbalanço na secreção das citocinas IFN- γ e IL-10 e da diminuição das células reguladoras B e T. A consequência final disso, é a redução na resposta imune celular, o aumento do tamanho e da progressão tumoral (ocasionando uma massa de tumor maior e mais volumosa), além de um aumento na capacidade metastática do câncer de mama, levando assim a uma menor sobrevida dos pacientes obesos.

7 CONCLUSÃO

Os animais obesos com tumor possuem menor quantidade de macrófagos e células dendríticas, os quais estão menos ativados e geram uma menor ativação dos linfócitos T auxiliares e citotóxicos que também estão em menor quantidade e apresentam um desbalanço na produção das citocinas IL-10 e INF- γ . Além disso, verificamos uma diminuição da resposta regulatória com menores níveis tanto dos linfócitos regulatórios B quanto dos linfócitos regulatórios T. Isso possivelmente se deve a inflamação crônica de baixo grau observada nos animais obesos, a qual aumenta os níveis de citocinas como IL-1, IL-6 e TNF- α que podem contribuir para desregulação da hematopoiese levando ao acúmulo das células MDSC e consequente supressão do sistema imune, culminando na progressão tumoral.

A redução da resposta inata e adaptativa nos animais obesos explica os dados encontrados anteriormente por nosso grupo, onde animais obesos apresentaram um tumor maior, mais agressivo e metastático, o que levou a uma menor sobrevida nesse grupo em relação aos animais magros.

Contudo, mais estudos são necessários para definir o papel das MDSCs no déficit da resposta imune celular em nosso modelo experimental, além disso, se faz necessário também avaliar a produção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento no microambiente tumoral, bem como no tecido adiposo adjacente ao tumor para melhor definir a atuação de cada componente na intrínseca relação da obesidade com o câncer de mama.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. H. I. V. *Imunologia celular e molecular*. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

ALMAND, B. et al. Clinical Significance of Defective Dendritic Cell Differentiation in Cancer. *Clinical Significance of Defective Dendritic Cell Differentiation*. v. 6, n. May, p. 1755–1766, 2000.

ALTINTAS, M. M. et al. Mast cells, macrophages, and crown-like structures distinguish subcutaneous from visceral fat in mice. **Journal of lipid research**, v. 52, n. 3, p. 480–488, 2011.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Breast Cancer: Facts and Figures 2013-2014** (C. DeSantus, R. Siegel, A. Jemal, Eds.). [s.l: s.n.].

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Global Cancer Facts & Figures 3rd Edition**. (L. Torre, R. Siegel, A. Jemal, Eds.). Atlanta: American Cancer Society; 2015, 2015.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Breast Cancer**. Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/index>>. Acesso em: 7 jun. 2016.

APPAY, V. et al. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: Consensus and issues. **Cytometry Part A**, v. 73, n. 11, p. 975–983, 2008.

ASLAKSON, C. J.; MILLER, F. R. Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. **Cancer Research**, v. 52, n. 6, p. 1399–1405, 1992.

BALKWILL, F.; CHARLES, K. A.; MANTOVANI, A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. **Cancer Cell**, v. 7, n. 3, p. 211–217, 2005.

BIESWAL, F. et al. The importance of catch-up growth after early malnutrition for the programming of obesity in male rat. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 14, n. 8, p. 1330–1343, 2006.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILANCIA EM SAÚDE. **Plano de ações estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) no Brasil 2011-2022** (Brasil. Ministério Da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ed.). Brasília: [s.n.].

CARUSO, C.; BALISTRERI, C. R.; CANDORE, G. The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases. **Mediators of Inflammation**, v. 2010, p. 19, 2010.

CHAN, M. E. et al. Bone structure and B-cell populations, crippled by obesity, are partially rescued by brief daily exposure to low-magnitude mechanical signals. **FASEB Journal**, v. 26, n. 12, p. 4855–4863, 2012.

COUSSENS, L. M.; ZITVOGEL, L.; PALUCKA, A. K. Neutralizing Tumor-Promoting Chronic Inflammation: A Magic Bullet? **Science**, v. 339, n. 6117, p. 286–291, 2013.

DE ARAUJO-SOUZA, P. S.; HANSCHKE, S. C. H.; VIOLA, J. P. B. Epigenetic control of interferon-gamma expression in CD8 T cells. **Journal of Immunology Research**, v. 2015, p. 7, 2015.

DE CARVALHO, R. V. H. et al. Plasmodium berghei ANKA infection results in exacerbated immune responses from C57BL/6 mice displaying hypothalamic obesity. **Cytokine**, p. 545–548, 2015.

DEIULIIS, J. et al. Visceral adipose inflammation in obesity is associated with critical alterations in regulatory cell numbers. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1, 2011.

DI SEBASTIANO, K.; MOURTZAKIS, M. The Role of Dietary Fat throughout the Prostate Cancer Trajectory. **Nutrients**, v. 6, n. 12, p. 6095–6109, 2014.

DIEU, M. C. et al. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. **The Journal of experimental medicine**, v. 188, n. 2, p. 373–386, 1998.

EZERNITCHI, A. V. et al. TCR Down-Regulation under Chronic Inflammation Is Mediated by Myeloid Suppressor Cells Differentially Distributed between Various Lymphatic Organs. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 7, p. 4763–4772, 2006.

FEHÉRVARI, Z.; SAKAGUCHI, S. CD4+ Tregs and immune control. **Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 9, p. 1209–1217, 2004.

GABRILOVICH, D. I.; NAGARAJ, S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. **Nature reviews. Immunology**, v. 9, n. 3, p. 162–74, 2009.

GILBERT, C. A.; SLINGERLAND, J. M. Cytokines, obesity, and cancer: new insights on mechanisms linking obesity to cancer risk and progression. **Annual review of medicine**, v. 64, n. October, p. 45–57, 2013.

GRANT, R. W.; DIXIT, V. D. Adipose tissue as an immunological organ. **Obesity**, v. 23, n. 3, p. 512–518, 2015.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, p. 57–70, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HANLY, P.; SOERJOMATARAM, I.; SHARP, L. Measuring the societal burden of cancer: The cost of lost productivity due to premature cancer-related mortality in Europe. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 4, p. E136–E145, 2015.

HARIRI, N.; THIBAUT, L. High-fat diet-induced obesity in animal models. **Nutrition research reviews**, v. 23, n. 2, p. 270–99, 2010.

HEPPNER, G. H.; MILLER, F. R.; SHEKHAR, P. M. Nontransgenic models of breast cancer. **Breast cancer research : BCR**, v. 2, n. 5, p. 331–334, 2000.

HUANG, Y. et al. CD4+ and CD8+ T cells have opposing roles in breast cancer progression and outcome. **Oncotarget**, v. 6, n. 19, p. 17462–78, 2015.

HURSTING, S. D.; DUNLAP, S. M. Obesity, metabolic dysregulation, and cancer: A growing concern and an inflammatory (and microenvironmental) issue. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1271, n. 1, p. 82–87, 2012.

INCA. **Estimativa Incidência de câncer no Brasil - 2014**. [s.l.: s.n.].

INCA. **Câncer**. Disponível em:
<http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em: 6 jun. 2016a.

INCA. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil** Ministério da Saúde Instituto Nacional de Cancer José Alencar Gomes da Silva. Rio de Janeiro: [s.n.].

KARNOUB, A. E.; WEINBERG, R. A. Chemokine networks and breast cancer metastasis. **Breast disease**, v. 26, p. 75–85, 2007.

KERKAR, S. P. et al. IL-12 triggers a programmatic change in dysfunctional myeloid-derived cells within mouse tumors. **Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 12, 2011.

KIM, E. et al. Dietary fat increases solid tumor growth and metastasis of 4T1 murine mammary carcinoma cells and mortality in obesity-resistant BALB/c mice. **Breast Cancer Research**, v. 13, n. 4, p. R78, 2011.

KWAN, M. L. et al. Association of high obesity with PAM50 breast cancer intrinsic subtypes and gene expression. **BMC Cancer**, v. 15, n. 1, p. 1–10, 2015.

LA VECCHIA, C. et al. Overweight, obesity, diabetes, and risk of breast cancer: interlocking pieces of the puzzle. **The oncologist**, v. 16, n. 6, p. 726–729, 2011.

LIN, A. et al. Dendritic cells integrate signals from the tumor microenvironment to modulate immunity and tumor growth. **Immunology Letters**, v. 127, n. 2, p. 77–84, 2010.

LIN, E. Y.; POLLARD, J. W. Tumor-associated macrophages press the angiogenic switch in breast cancer. **Cancer Research**, v. 67, n. 11, p. 5064–5066, 2007.

MELO, F. H. M.; JUNQUEIRA, M. S.; CHAMMAS, R. Mecanismos de Invasão e Metástases. In: **Bases da Oncologia**. [s.l: s.n.]. p. 201–226.

MUMM, J. B. et al. IL-10 Elicits IFN γ -Dependent tumor immune surveillance. **Cancer Cell**, v. 20, n. 6, p. 781–796, 2011.

MUNDY-BOSSE, B. L. et al. Myeloid-derived suppressor cell inhibition of the IFN response in tumor-bearing mice. **Cancer Research**, v. 71, n. 15, p. 5101–5110, 2011.

NELSON, B. H. CD20 + B Cells: The Other Tumor-Infiltrating Lymphocytes. **Journal of immunology**, 2016.

NEUMANN, K. et al. Is obesity associated with advanced stage or grade of colon cancer? **Canadian Journal of Surgery**, v. 58, n. 2, p. 140–142, 2015.

NISHIKAWA, S. et al. Diet-Induced Obesity in C57BL / 6J and BALB / cA Mice. **Obesity**, v. 56, n. October 2006, p. 263–272, 2007.

OKWAN-DUODU, D. et al. Obesity-driven inflammation and cancer risk: role of myeloid derived suppressor cells and alternately activated macrophages. **American journal of cancer research**, v. 3, n. 1, p. 21–33, 2013.

OLSON, L. et al. Pubertal exposure to high fat diet causes mouse strain-dependent alterations in mammary gland development and estrogen responsiveness LK Olson. **International Journal of Obesity**, v. 1734, n. 1, p. 1415–1426, 2010.

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

PALUCKA, A. K.; COUSSENS, L. M. The Basis of Oncoimmunology. **Cell**, v. 164, n. 6, p. 1233–1247, 2016.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Obesity and Poverty: a new public health challenge**. (M. Peña, J. Bacallao, Eds.) Obesity and Poverty. **Anais...2000**

PATTERSON, L. L. B. AND B. D. Carcass Fat Content in Weanling and Adult Female Rats With Hypothalamic Lesions J [. **Journal of Endocrinology**, v. 40, n. 1965, p. 527–528, 1968.

PENG, L.; SHU, S.; KRAUSS, J. C. Monocyte Chemoattractant Protein Inhibits the Generation of Tumor-reactive T Cells¹. **Cancer Research**, v. 57, p. 4849–4854, 1997.

PEREIRA, L. O.; FRANCISCHI, R. P. DE; LANCHA JR., A. H. Obesidade: hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência à insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 47, n. 2, p. 111–127, 2003.

RAMIREZ, I.; TORDOFF, M. G.; FRIEDMAN, M. I. Dietary hyperphagia and obesity: What causes them? **Physiology and Behavior**, v. 45, n. 1, p. 163–168, 1989.

RAVELLI, A. C. J. et al. Glucose-tolerance in adults after prenatal exposure to famine. **The Lancet**, v. 351, p. 173–177, 1998.

ROSEBOOM, T. J. et al. Effects of prenatal exposure to the Dutch famine on adult disease in later life: an overview. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 185, n. 5, p. 93–98, 2001.

ROSEN, S. D. Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond. **Annual review of immunology**, v. 22, p. 129–56, 2004.

ROUSSOS, E. T.; CONDEELIS, J. S.; PATSIALOU, A. Chemotaxis in cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 11, n. 8, p. 573–87, 2011.

SALVADOR, P. A. **Papel da obesidade induzida por dieta hiperlipídica no desenvolvimento de carcinoma mamário experimental.** [s.l: s.n.].

SANTANDER, A. M. et al. Paracrine interactions between adipocytes and tumor cells recruit and modify macrophages to the mammary tumor microenvironment: the role of obesity and inflammation in breast adipose tissue. **Cancers**, v. 7, n. 1, p. 143–178, 2015.

SARAIVA, M. et al. Interleukin-10 Production by Th1 Cells Requires Interleukin-12-Induced STAT4 Transcription Factor and ERK MAP Kinase Activation by High Antigen Dose. **Immunity**, v. 31, n. 2, p. 209–219, 2009.

SCHRODER, K. et al. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. **Journal of leukocyte Biology**, v. 75, n. February, p. 163–189, 2004.

SHARPE, M.; MOUNT, N. Genetically modified T cells in cancer therapy: opportunities and challenges. **Disease models & mechanisms**, v. 8, n. 4, p. 337–50, 2015.

SHEN, M. et al. Positive and negative functions of B lymphocytes in tumors. **Oncotarget**, v. 5, n. 0, 2016.

SIMONS, P. J. et al. Cytokine-mediated modulation of leptin and adiponectin secretion during in vitro adipogenesis: Evidence that tumor necrosis factor- α and interleukin- β treated human preadipocytes are potent leptin producers. **Cytokine**, v. 32, n. 2, p. 94–103, 2005.

SRIVASTAVA, M. K. et al. Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine. **Cancer Research**, v. 70, n. 1, p. 68–77, 2010.

STEINMAN, R. M. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. **Annu Rev Immunol**, v. 30, p. 1–22, 2012.

SUN, J.-W. et al. Obesity and Risk of Bladder Cancer: A Dose-Response Meta-Analysis of 15 Cohort Studies. **Plos One**, v. 10, n. 3, p. e0119313, 2015.

SUNDARA RAJAN, S.; LONGHI, M. P. Dendritic cells and adipose tissue. **Immunology**, 2016.

TADOKORO, C. E. et al. Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo. **J Exp Med**, v. 203, n. 3, p. 505–511, 2006.

TRAN, T. T.; KAHN, C. R. Transplantation of adipose tissue and stem cells: role in metabolism and disease. **Nature reviews. Endocrinology**, v. 6, n. 4, p. 195–213, 2010.

VONA-DAVIS, L.; ROSE, D. P. Angiogenesis, adipokines and breast cancer. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 20, n. 3, p. 193–201, 2009.

WARWICK, Z. S. Probing the causes of high-fat diet hyperphagia: a mechanistic and behavioral dissection. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 20, n. 1, p. 155–61, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases.** World Health Organization. [s.l: s.n.].

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesidade.** Disponível em: <<http://www.who.int/topics/obesity/en/>>. Acesso em: 9 mar. 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Health Observatory Map Gallery.** Disponível em: <<http://www.who.int/topics/obesity/en/>>. Acesso em: 1 jan. 2016a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Report of the commission on ending childhood obesity.** [s.l: s.n.].

XING, C. et al. Critical role for thymic CD19+CD5+CD1dhiIL-10+ regulatory B cells in immune homeostasis. **Journal of leukocyte biology**, v. 97, n. 3, p. 547–56, 2015.

YANAGIHARA, S. et al. EB1/CCR7 is a new member of dendritic cell chemokine receptor that is up-regulated upon maturation. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 161, n. 6, p. 3096–102, 1998.

YEON, H. et al. Lysophospholipid profile in serum and liver by high-fat diet and tumor induction in obesity-resistant BALB / c mice. v. 30, p. 1433–1441, 2014.

YOUNGS, S. J. et al. Chemokines induce migrational responses in human breast carcinoma cell lines. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 71, n. 2, p. 257–266, 1997.

ZHANG, W. et al. Meta-analysis in the association between obesity and risk of thyroid cancer. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 7, n. 12, p. 5268–5274, 2014.

ZHENG, Q. et al. Leptin deficiency suppresses MMTV-Wnt-1 mammary tumor growth in obese mice and abrogates tumor initiating cell survival. **Endocrine-Related Cancer**, v. 18, n. 4, p. 491–503, 2011.

ZLOTNIK, A.; YOSHIE, O. Chemokines : A New Classification System and Their Role in Immunity. **Immunity**, v. 12, n. 3, p. 121–127, 2000.