

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
IMUNOLOGIA E DIP

Laíris Cunha Campos

**CARACTERIZAÇÃO DE CORPÚSCULOS E MEDIADORES
LIPÍDICOS EM LINHAGENS TUMORAIS METASTÁTICAS E
NÃO METASTÁTICAS**

Juiz de Fora

2017

2017
PPGCBIO

LAÍRIS CUNHA CAMPOS

ICB/UFJF

LAÍRIS CUNHA CAMPOS

**CARACTERIZAÇÃO DE CORPÚSCULOS E MEDIADORES
LIPÍDICOS EM LINHAGENS TUMORAIS METASTÁTICAS E
NÃO METASTÁTICAS**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, apresentada para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e DIP.

Orientadora: Prof. Dra. Heloísa D'Ávila da Silva Bizarro

Juiz de Fora

2017

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

Campos, Laíris Cunha.

Caracterização de corpúsculos e mediadores lipídicos em linhagens tumorais metastáticas e não metastáticas. / Laíris Cunha Campos. -- 2017.
103 f.

Orientadora: Heloísa D'Avila da Silva Bizarro

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2017.

1. Corpúsculo Lipídico. 2. Câncer. 3. Mediadores Lipídicos. I. Bizarro, Heloísa D'Avila da Silva, orient. II. Título.

*Dedico ao Vô Cunha e a minha mãe Fátima,
que mesmo suas ausências e o tempo, jamais
acabarão com um amor sem explicação! Os
guardarei eternamente em meu coração.*

AGRADECIMENTOS

Em um diminuto, singelo e singular espaço...

...Venho a agradecer hoje, aos que se fizeram e fazem parte desta realização pessoal.

Primeiramente Gostaria de agradecer a Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) por possibilitar a concretização deste sonho, permitindo a consecução do Mestrado, ocorrida por intermédio do Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias.

Destaco ainda tamanha importância das Agências de fomento, em especial, a CAPES pela concessão da Bolsa. Agradeço a credibilidade e a confiança depositada.

A minha orientadora, Prof. Dra. Heloísa D'Ávila da Silva Bizarro. Agradeço a compreensão depositada em mim, entendendo a minha inexperiência quando ingressei ao Laboratório de Biologia Celular (LBC). Palavras serão insuficientes para descrever tamanha gratidão. Devo reconhecer também sua paciência ímpar e maestria em se dedicar e elucidar paradigmas. Obrigada Helô por depositar sua confiança em mim!

Gostaria de agradecer a Prof. Dra. Jacy Gameiro por permitir a realização deste projeto, por meio da concessão das células estudadas.

Gostaria de agradecer aos integrantes do Laboratório de Biologia Celular, pela oportunidade de aprendizagem depositada a mim; de certo, os percalços seriam maiores se não obtivesse o respaldo de vocês. Em especial gostaria de destacar o Daniel e o Gabriel, principalmente pela paciência e disponibilidade em repetir os experimentos.

Gostaria de agradecer a Prof. Dr^a Rossana Melo e a Prof. Dr^a Patrícia Elaine de Almeida pelos ensinamentos ao longo destes dois anos, que contribuíram para a minha formação.

Gostaria de agradecer a Fernanda e a Rafaela por deixarem os dias mais alegres e pelo carinho de todo dia.

O LBC me apresentou e presenteou com a amizade de duas pessoas mais que especiais para mim! O tempo não traduz intensidade nem veracidade e nem o apreço que sinto por vocês! Sabrina e Nayara me faltam palavras para poder agradecer...

... Obrigada de coração pelas palavras, pelos momentos, pelos conselhos... Por se fazerem presentes em minha vida em momentos turbulentos! Serei

sempre grata por me arrancarem sorrisos em meio a lágrimas. Agradeço a disponibilidade de vocês, e a confiança depositada em mim em um valor tão inestimável: amizade!

Gostaria de agradecer a Pollyana, Juliana... E demais do Laboratório de Imunologia por me auxiliar diversas vezes, tanto em dúvidas quanto em produtos para o prosseguimento do experimento.

Devo reconhecer tamanha importância das antigas e atuais moradoras do Pari's Pension. Vivemos muitos momentos, estamos susceptíveis a n circunstâncias, e apesar dos problemas ocorridos... Sempre pude contar com vocês. Obrigada pela paciência, pelo apoio nos melhores e piores momentos.

Agradeço aos amigos que Lavras me presenteou; pessoas com que tive o prazer de conviver e alcançar um amadurecimento quanto pessoa, e compartilhar de muitas vivências. Obrigada a todos!

As novas e antigas amigadas, obrigada por concederem uma paciência ímpar em meio a tantas tribulações pessoais. Agradeço ainda pelos momentos de alegrias compartilhadas e felicitações por ter alcançado o que tanto almejei: o mestrado.

Agradeço aos meus familiares (tios, primos, e demais parentes), por sempre se importarem e preocuparem com o meu bem-estar. Por junto a mim, comemorem as conquistas alcançadas. Meu muito obrigada!

Em especial aos meus pais, Fátima e Aristides, todo o meu sincero reconhecimento. Um sonho nunca se sonha só, e eu pude contar com o amor e a presença de vocês. Obrigada pai e mãe, por significarem absolutamente tudo em minha vida...

...Preceitos, caráter, amor... Valores tão essenciais na vida de um ser humano. Agradeço ainda, pelos momentos de apoio, os abraços reconfortantes e as alegrias compartilhadas. Hoje se estou concretizando esta etapa, devo muito ao esforço e empenho de ambos, que para ofertarem um futuro, abdicaram de muitos projetos pessoais. Amo incondicionalmente vocês, obrigada de coração por tudo!

RESUMO

Os corpúsculos lipídicos (CL) são organelas dinâmicas que exercem inúmeras funcionalidades, destacando-se a regulação do metabolismo de lipídeos, estando presente em células normais e em células associadas com processos inflamatórios, os quais se associam a progressão tumoral. O câncer de mama é uma enfermidade que apresenta elevada incidência na população; onde o aumento da lipogênese e descontrole proliferativo celular caracterizam a patologia. Diversos estudos correlacionaram à progressão tumoral com a quantificação de corpúsculos lipídicos, bem como a produção de mediadores inflamatórios; uma vez que, em estágios avançados da doença, é observado um elevado número de CL no sítio tumoral, assim como, a produção de mediadores inflamatórios. Adicionalmente, o conhecimento sobre papel da via de sinalização mTOR vem sendo utilizado afim de sugerir novas terapêuticas ao câncer. Muitos estudos, visando elucidar mecanismos que promovam homeostase, bem como o entendimento da progressão do cancro de mama, utilizam de duas linhagens murinas (4T1 e 67 NR), facilmente transplantadas e tumorigênicas para os devidos fins. O presente trabalho consiste em caracterizar a produção de CL e mediadores inflamatórios em duas linhagens tumorais mamárias murinas, uma com capacidade invasiva (4T1) e a outra não metastática (67NR), e em macrófagos peritoneais tratados com sobrenadante das células 4T1 e 67NR. Corroborando, foi analisado a o papel da via mTOR modulação do metabolismo lipídico por meio do tratamento com rapamicina nos diferentes tipos celulares. Para este estudo as células tumorais foram cultivadas nos intervalos de tempo 24 e 48 h em meio RPMI-1640 contendo diferentes concentrações de SFB (0 a 10%), pré-tratadas ou não com rapamicina. Nossos resultados demonstraram que a formação de CL nas duas linhagens é diretamente proporcional a concentração de SFB utilizado e do tempo de cultivo. Observou-se um aumento na produção de leptina e TGF- β , com respectivo decréscimo de adiponectina pelas duas linhagens estudadas. Adicionalmente, observamos indução de formação de CL e PGE₂ em macrófagos tratados com sobrenadante das linhagens tumorais. Após tratamento com rapamicina houve uma inibição de CL, e aumento de PGE₂ quando as células tumorais e macrófagos foram pré-tratados com rapamicina. Em concomitância com alguns trabalhos, é nítido a participação de CL no desenvolvimento tumoral, e que sua elevada quantificação está relacionada a um pior prognóstico do cancro, devido à produção de mediadores inflamatórios. Cabe ainda salientar que, as expressões de adiponectinas e leptinas podem ser consideradas como marcadores da avaliação cancerosa, onde elevados níveis de Leptina são vistos em um pior prognóstico no Câncer de Mama.

Palavras-Chave: Corpúsculo Lipídico. Câncer de mama. 4T1. 67NR. mTOR. leptina

ABSTRACT

Lipid bodies (LB) are dynamic organelles that exert innumerable functionalities, especially the regulation of lipid metabolism, being present in normal cells and in cells associated with inflammatory processes. Breast cancer is a disease that presents high incidence in the population; where the increase of lipogenesis and cellular proliferative decontrol characterize the pathology. Several studies correlated to tumor progression with the quantification of lipid bodies, as well as the production of inflammatory mediators; Since in the advanced stages of the disease a high number of LB are observed at the tumor site, as well as the production of inflammatory mediators. Additionally, the knowledge of the role of mTOR signaling pathway has been used to suggest new therapies for cancer. Many studies aimed to elucidate the mechanisms that promote homeostasis, as well as the understanding of the progression of breast cancer, use two murine (4T1 and 67 NR), easily transplanted and tumorigenic lines for the right purposes. The present work consists of characterizing the production of inflammatory mediators and LB in two murine mammary tumor cells, one with invasive capacity (4T1) and the other non-metastatic (67NR), and in peritoneal macrophages treated with supernatant from 4T1 and 67NR cells. Concomitantly, the role of the mTOR pathway modulation of lipid metabolism was examined by treatment with rapamycin in the different cell types. For this study tumor cells were cultured at time intervals 24 and 48h in RPMI-1640 medium containing different concentrations of FBS (0 to 10%), pre-treated or not with rapamycin. Our results demonstrated that the formation of LB in the two strains is directly proportional to the concentration of SFB used and the culture time. An increase in the production of leptin and TGF- β was observed, with respective decrease of adiponectin by the two strains studied. Additionally, we observed induction of LB and PGE2 synthesis in macrophages treated with tumor cell supernatants. After the treatment with rapamycin there was a inhibition of LB and increase of PGE2 when tumor cells and macrophages were pretreated with rapamycin. Concomitant with some studies, the participation of LB in tumor development is clear and its high quantification is related to a worse prognosis of cancer due to the production of inflammatory mediators. It should also be noted that the expressions of adiponectin and leptin can be considered as a marker of cancer evaluation, which high levels of leptin are seen in a worse prognosis in Breast Cancer.

Keywords: Lipid Bodies. Breast Cancer. 4T1 and 67NR. mTOR. Leptin

Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1: Imagem representativa da organização celular dos subtipos de neoplasia.....	16
Figura 2: Anatomia da Mama Normal.....	17
Figura 3: Vias de Polarização Macrofágica: Via Clássica e Alternativa.....	23
Figura 4: Identificação de Corpúsculos Lipídicos em coloração com Tetróxido de ósmio e Oil Red O	30
Figura 5: Biogênese dos Corpúsculos Lipídicos.....	32
Figura 6: Mecanismos de síntese de Eicosanoides a partir do ácido araquidônico.....	33
Figura 7: Cascata de sinalização intracelular da via mTOR	35
Figura 8: Formação de Corpúsculos Lipídicos nas linhagens tumorais cultivadas com 10%SFB, frente a variável tempo: 24 e 48horas.....	48
Figura 9: Corpúsculos Lipídicos nas linhagens tumorais 4T1 e 67NR em 24 horas.	49
Figura 10: Produção de Prostaglandina E ₂ em células das linhagens 4T1 e 67NR em 24 e 48 horas	50
Figura 11: Formação de Corpúsculos Lipídicos em células das linhagens 4T1 e 67NR após 24h de cultura com diferentes concentrações de SFB (0 a 10%)..	51
Figura 12: Viabilidade celular das linhagens tumorais mamárias 4T1 e 67 NR após 24h de cultura com diferentes concentrações de SFB (0 a 10%).	52
Figura 13: Quantificação de Adiponectina nos sobrenadantes das linhagens tumorais mamárias 4T1 e 67NR em dois intervalos de tempo: 24 e 48 horas..	53
Figura 14: Quantificação de Leptina nas linhagens tumorais mamárias 4T1 e 67NR em dois intervalos de tempo: 24 e 48 horas.....	54
Figura 15: Quantificação de Leptina nas linhagens tumorais mamárias 4T1 e 67NR em diferentes concentrações de SFB	55
Figura 16: Formação de corpúsculos lipídicos na linhagem tumoral mamária 4T1 estimulada ou não com rapamicina.....	56
Figura 17: Formação de corpúsculos lipídicos na linhagem tumoral mamária 67NR pré-tratada ou não com rapamicina.....	56
Figura 18: Produção de Prostaglandina E ₂ na linhagem 4T1 em 24 e 48horas, pré-tratada ou não com rapamicina.....	58

Figura 19: Produção de Prostaglandina E2 na linhagem 67NR em 24 e 48horas, pré-tratada ou não com rapamicina.....	58
Figura 20: Produção de TGF- β na linhagem 4T1 em 24 e 48 horas, pré-tratada ou não com rapamicina	59
Figura 21: Produção de TGF- β na linhagem 67NR em 24 e 48 horas, pré-tratada ou não com rapamicina	60
Figura 22: Produção de TNF- α na linhagem 4T1 em 24 e 48horas, pré-tratada ou não com rapamicina	61
Figura 23: Produção de TNF- α na linhagem 67NR em 24 e 48horas, pré-tratadas ou não com rapamicina	61
Figura 24: Viabilidade Celular na linhagem 4T1 obtida por Azul de Tripan e, pré-tratadacom rapamicina.....	62
Figura 25: Viabilidade Celular na linhagem 67NR obtida por Azul de Tripan e, pré-tratada com rapamicina.....	63
Figura 27: Formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos estimulados com o sobrenadante da linhagem 67NR, pré-tratada ou não com rapamicina	64
Figura 28: Produção de PGE ₂ em macrófagos estimulados com o sobrenadante da linhagem 4T1, pré-tratada ou não com rapamicina	65
Figura 29: Produção de PGE ₂ em macrófagos estimulados com o sobrenadante da linhagem 67NR, pré-tratada ou não com rapamicina	66
Figura 30: Produção de Leptina em macrófagos estimulados com o sobrenadante da linhagem 67NR.....	67
Figura 31: Produção de Leptina em macrófagos estimulados com o sobrenadante da linhagem 4T1	67
Figura 33: Produção de TGF- β em macrófagos estimulados com o sobrenadante da linhagem 4T1 e pré-tratados com rapamicina.....	69
Figura 34: Produção de TNF- α nas linhagens tumorais: 4T1 e 67NR em 24 ou 48horas; e pré-tratadas ou não rapamicina.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HEPTE - 5-hidroperoxieicosatetranoico

5-LO – 5-lipoxigenase

AA – Ácido Araquidônico

ADRP- "*Adipose differentiation-related protein*" - Proteína relacionada com a diferenciação de adipócito

APC - "*Antigen-presenting cell*" – Célula Apresentadora de Antígeno

BCG – Bacilo de Calmette-Guérin

BRCA 1 – "*Breast Cancer 1*"

BRCA 2 – "*Breast Cancer 2*"

CL – Corpúsculo Lipídico

COX – Ciclooxigenase

DC - "*Dendritic cell*" – Célula Dendrítica

HER2 – "*Human epidermal growth factor response 2*"

IFN- γ - "*Interferon Gama*"

IL – Interleucina

INCA – Instituto Nacional do Câncer

LT - Leucotrieno

M-CSF - "*Macrophage colony-stimulating Factor*" – Fator estimulante da colônia de Macrófagos

MDSC - "*Myeloid-derived suppressor cells*" – Células supressoras derivadas da linhagem mielóide

MDM2 – “*Murine Doble Minute type 2 gene*”

mTOR – “mammalian target of rapamycin”

NK - "*Natural killer*" – Assassinas Naturais

p53 – Gene p53

TAM – Macrófagos associados ao tumor

TIP47 – "tail-interacting protein of 47 kD" – Proteína de interação de cauda de 47 kda

TGF- β - "*Transforming Growth Factor Beta*" – Fator de transformação de crescimento Beta

TNF- α - "*Tumor Necrosis Factor alpha*" - Fator de Necrose Tumoral Alfa

PLIN - "*Perilipin*" – Perilipina

VEGF - "*Vascular endothelial growth factor*" – Fator de Crescimento Endotelial Vascular

Sumário

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 CÂNCER	14
1.1.1 CÂNCER DE MAMA	16
1.2 RESPOSTA IMUNE AO CÂNCER	19
1.3 CORPÚSCULOS LIPÍDICOS	25
1.3.1 METABOLISMO LIPÍDICO E SUA CORRELAÇÃO COM DOENÇAS	32
1.3.2 METABOLISMO LIPÍDICO EM CÂNCER	34
2 OBJETIVOS	38
2.1 OBJETIVO GERAL	38
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
3 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 LINHAGENS CELULARES	39
3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	39
3.3 ESTIMULAÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS	41
3.4 - ESTIMULAÇÃO DE MACRÓFAGOS IN VITRO	41
3.5 COLORAÇÃO DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS	42
3.6 QUANTIFICAÇÃO PGE ₂	43
3.7 QUANTIFICAÇÃO DE LEPTINA , ADIPONECTINA, TGF- β e TNF- α	43
3.8 PROCESSAMENTO DAS IMAGENS	43
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA E ELABORAÇÃO DOS GRÁFICOS	44
4 RESULTADOS	44
4.1 EFEITO DO TEMPO DE CULTIVO NA FORMAÇÃO DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS NAS CÉLULAS TUMORAIS	44
4.2 PRODUÇÃO DE PGE ₂ NAS LINHAGENS CELULARES TUMORAIS MAMÁRIAS	46
4.3 FORMAÇÃO DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SFB	47
4.4 QUANTIFICAÇÃO DE ADIPONECTINA E LEPTINA NAS CÉLULAS TUMORAIS 4T1 E 67NR APÓS 24h DE CULTIVO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SORO	49

4.5 PAPEL DA VIA mTOR na FORMAÇÃO DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS NAS LINHAGENS TUMORAIS	52
4.6 SÍNTESE DE PROSTAGLANDINA E ₂ NAS LINHAGENS TUMORAIS VIA ESTIMULAÇÃO DO INIBIDOR DA VIA mTOR: RAPAMICINA.....	54
4.7 PAPEL DE mTOR na PRODUÇÃO DE TGF- β NAS LINHAGENS TUMORAIS	55
4.8 PRODUÇÃO DE TNF- α NAS LINHAGENS TUMORAIS VIA PRÉ-TRATAMENTO COM O INIBIDOR DA VIA mTOR: RAPAMICINA	57
4.9 VIABILIDADE CELULAR NAS LINHAGENS TUMORAIS VIA ESTIMULAÇÃO DO INIBIDOR DA VIA mTOR: RAPAMICINA.....	59
4.10 FORMAÇÃO DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS EM MACRÓFAGOS ESTIMULADOS COM SOBRENADANTE DAS LINHAGENS TUMORAIS E TRATADOS COM RAPAMICINA	60
4.11 PROSTAGLANDINA E ₂ EM MACRÓFAGOS ESTIMULADOS COM SOBRENADANTE DAS LINHAGENS TUMORAIS E TRATADOS COM RAPAMICINA.....	62
4.12 PRODUÇÃO DE LEPTINA EM MACRÓFAGOS ESTIMULADOS COM SOBRENADANTE DAS LINHAGENS TUMORAIS	63
4.13 PRODUÇÃO DE TGF- β EM MACRÓFAGOS ESTIMULADOS COM SOBRENADANTE DAS LINHAGENS TUMORAIS E TRATADOS COM RAPAMICINA.....	65
5 DISCUSSÃO	67
6 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	76
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

O Câncer é compreendido como sendo um grupo de aproximadamente 100 doenças, que compartilham de duas similaridades: a primeira condiz com o crescimento desordenado de populações clonais celulares, e a segunda; a capacidade de invasão destas células em outros órgãos e regiões do corpo, podendo danificar tecidos próximos ou em sítios distantes, o qual se denomina metástase (WEINBERG, 1996; CANCER RESEARCH INSTITUTE, 2003; INCA, 2011).

A ocorrência do câncer é relacionada por meio da ação de fatores externos (radiação, dieta), e internos (mutações genéticas, condição hormonal, resposta imunológica) (KOIFMAM e HATAGIMA, 2003; INCA, 2013; PRADO, 2014; GLOBAL CANCER, 2015). Deve-se salientar ainda que ambos os fatores podem atuar concomitantemente, ou em sequência no surgimento da doença.

As células cancerígenas apresentam propriedades que as distinguem das demais populações celulares, as quais são: potencial de replicação ilimitado; invasão tecidual; metástase; proliferação celular; evasão da apoptose e manutenção da vascularização (HANAHAN, 2000 ; MARTINEZ et al, 2006; RAKOFF-NAHOUM, 2006; ONUCHIC e CHAMMAS, 2010). O câncer origina-se pelo acúmulo de mutações ocorridas no material genético da célula, permitindo a sua expansão clonal desta célula, os quais não são reparados e inábeis de sofrerem apoptose (FEARON, 1997; RAKOFF-NAHOUM, 2006; GRIVICICH, REGNER e ROCHA, 2007; INCA, 2011).

Dentre os eventos mutacionais pode-se destacar a ativação de proto-oncogenes, e os genes supressores de tumor. Os proto-oncogenes são genes normais vinculados à atividade regulatória, que quando mutados originam os oncogenes - que atuam sobre o ciclo celular, por influenciar o crescimento e diferenciação celular (FERRARI et al, 2006; MARTINEZ et al, 2006; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016). Ao passo que os genes supressores

de tumor são expressos constitutivamente na célula atuando no reparo do DNA e processo apoptótico, na qual permite suprimir a formação de massa tumoral controlando, portanto, o crescimento demasiado (BORGES-OSORIO e ROBINSON, 2001; MARTINEZ et al, 2006; LEE e MULLER, 2010; ZHAO, SUN e ZHAO, 2013; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016).

Os genes supressores tumorais são constituídos por inúmeras famílias de genes, e atuam como fatores de regulação homeostática (COLOMBO e RAHAL, 2009). É importante destacar no processo de reparo, o gene TP53 (gene supressor de tumor) que codifica a proteína p53; atua principalmente na indução de genes de reparo, controla a integridade do genoma frente a danos celulares: como alterações cromossômicas, depleção de metabólitos, choque térmico, hipóxia. Quando as lesões são corrigidas, os níveis de p53 diminuem, em um processo de retroalimentação negativa por meio da proteína MDM-2 (Mouse Double Minute 2), que por meio da ubiquitinização transporta p53 até o citoplasma onde é degradada (PINTO e BRONSTEIN, 2008; COLOMBO e RAHAL, 2009). Caso esse mecanismo supressor falhar, acarretaria no surgimento de células mutadas, permitindo proliferação celular e/ou à resistência a apoptose; como consequência haveria fixação na mutação e, por conseguinte, as frequências de células com genótipo alterado aumentariam gradativamente (MENENDEZ et al., 2007; MAXIMOV e MAXIMOV, 2008; CHAMMAS et al, 2009; FERREIRA e ROCHA, 2010).

Considerando que os tumores malignos apresentam como similaridades a capacidade metastásica para outros tecidos e órgãos, isto é, a capacidade destas células invadirem e disseminarem para outros sítios do organismo, é necessário compreender que este processo envolve múltiplos estágios (FRIEDL e WOLF, 2003; SAHAI, 2007; YAMAGUCHI e CONDEELIS, 2007). Sahai (2007) descreve estágios do processo metastático exemplificados pela : motilidade das células, e entrada de células no sangue ou linfa, sucedido pelo trânsito celular nestes fluidos, e posterior saída das células tumorais da vascularização e crescimento em um novo sítio, este último pode ser exemplificado por rompimento do endotélio devido ao crescimento da massa tumoral, e permitir assim, a incorporação da mesma em um tecido circundante.

Conforme a proliferação de células transformadas e consequente fixação da população no organismo, pode-se distinguir a neoplasia em dois grupos: benignos e malignos (INCA, 2011; CANADIAN CANCER SOCIETY, 2016). O primeiro grupo consta de um crescimento lento e ordenado de células, as quais se assemelham as células normais do indivíduo e que, não possuem a capacidade de colonizar outros órgãos e tecidos. Em contrapartida tumores malignos apresentam desenvolvimento celular rápido e desordenado, quando comparado ao grupo anterior, e possui a competência de alastrar-se para outras regiões, acarretando no que se denomina metástase (Figura 1) (BABA e CÂTOI, 2007; CANCER RESEARCH UK, 2015; CANADIAN CANCER SOCIETY, 2016).

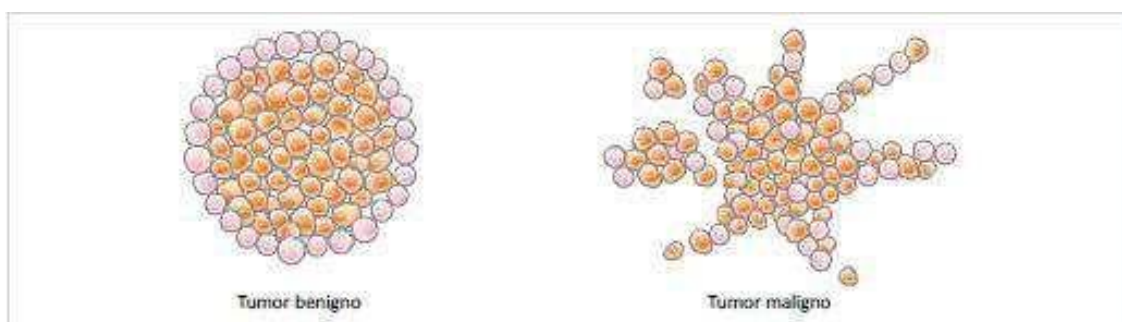


Figura 1: Imagem representativa da organização celular dos subtipos de neoplasia (ABC do CANCER / INCA, 2011).

É importante ressaltar as divergências entre as células cancerígenas e as normais sob dois aspectos: a especificação celular e a resposta dos sinais gerados pelo indivíduo. A especificação celular permite com que as células tumorais apresentem menor grau de especialização que as demais - isso permite com que estas se proliferem continuamente; enquanto a rejeição aos sinais gerados pelas células do indivíduo, pode ser exemplificada pela rejeição ao processo de morte celular, consentindo na multiplicação contínua, e, por conseguinte, favorecendo a proliferação da massa tumoral (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2015).

1.1.1 CÂNCER DE MAMA

A grande parcela dos eventos de câncer de mama trata-se de carcinomas, isto é, a proliferação celular desordenada que ocorre em células epiteliais do tecido mamário (MATHEUS et al, 2008; VIEIRA et al, 2008). Dentre os casos de carcinoma, nota-se elevada ocorrência do adenocarcinoma, referente ao desenvolvimento da massa tumoral no tecido glandular (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016).

A neoplasia mamária é considerada uma doença heterogênea, devido a constituição da mama conceber diversos sítios primários de desenvolvimento da patologia (BERTUCCI e BIRNBAUM, 2008; POLYAK, 2011). A mama é constituída por ductos e lobos, as quais estes últimos dispõem de secções menores denominadas lóbulos, que são sustentadas por tecido fibroso, e terminam em regiões nomeadas bulbo (Figura 2). Os ductos permitem a interligação das demais estruturas descritas acima, e apresenta o fenótipo mais comum da carcinogênese mamária (INCA, 2016; NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2016).

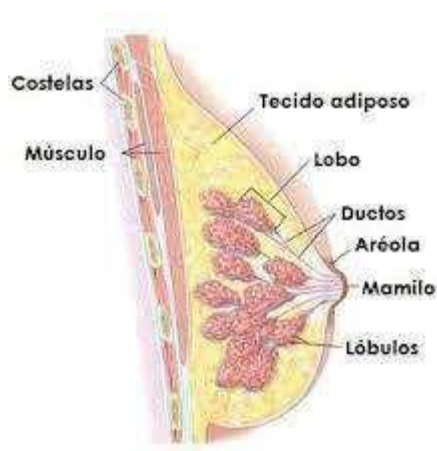


Figura 2: Anatomia da Mama Normal (BORCHARTT et al, 2013).

O Câncer de Mama apresenta elevada incidência em pessoas do gênero feminino em várias regiões do mundo, sendo o mais recorrente após o câncer de pele não melanoma (REES et al, 2014; INCA, 2016). Importante ressaltar que a enfermidade não se restringe somente a pessoas do gênero feminino, uma vez que dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) demonstraram que em 2013, houve a mortalidade de 181 homens com esta neoplasia; enquanto

nos Estados Unidos a cada ano surgem 2.300 novos casos em homens com a doença, representando, portanto, 1% do número total de episódios (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2016).

Dados de 2012 apontaram o surgimento de 1,7 milhões de casos no mundo do carcinoma mamário, representando um quarto de todas as ocorrências neoplásicas acometidas em mulheres (AMERICAN CANCER SOCIETY - GLOBAL CANCER FACTS & FIGURES, 2015). No Brasil a perspectiva para 2016 é de 596 mil novos casos de câncer, sendo 57.960 relativos à neoplasia mamária, a mais incidente no gênero feminino (INCA, 2016).

Considerando aspectos descritos anteriormente, a susceptibilidade do câncer de mama é influenciada por inúmeros fatores. Primeiramente pode-se destacar a influência hormonal (COLDITZ, 1998; MARTIN E WEBER, 2000). É necessário compreender a relação câncer de mama e hormônio; visto que a atividade celular é dependente da ação de vias metabólicas, muitas vezes controladas por ação hormonal. Quando a secreção de hormônios ultrapassa os níveis desejáveis, este colabora com a perda de homeostasia, ocasionando, portanto, o surgimento do Câncer (SILVA, SERAKIDES e CASSALI, 2004). Um segundo aspecto, a obesidade, é fator chave no desenvolvimento da neoplasia; uma vez que, o tecido adiposo permite a expressão de elevados níveis de aromatase (enzima responsável pela ativação do estrógeno), e permitindo, portanto, aumento nos níveis de estrógeno circulante, que acarretam a progressão celular por meio da inibição de sinais apoptóticos, e a promoção de oncogenes (CARTER e CHURCH, 2009; INUMARU, SILVEIRA e NAVES, 2011).

A partir da concepção que o surgimento do câncer se deve ao descontrole proliferativo de células; é entendida a funcionalidade dos fatores genéticos no desenvolvimento da neoplasia mamária (MARTIN e WEBER, 2000; INAMURU, SILVEIRA e NAVES, 2011). A expressão do oncogene HER2 está condicionada ao controle fisiológico de divisão e diferenciação celular, e quando sua expressão está superativada, este gene consiste como marcador de mau prognóstico. Sua superativação correlaciona-se a interferência no

crescimento celular, à inibição da morte celular, a migração e a invasão de células e a angiogênese - processos os quais levam à progressão de tumores malignos (MÉNARD et al, 2003; FREITAS, 2008; STAFIN et al, 2014; INGTHORSSON et al, 2016).

Considerando que os aspectos mutacionais referem-se à alteração e conseguinte perpetuação da característica, a presença dos genes mutados BRCA₁ e BRCA₂, confere maior susceptibilidade ao desenvolvimento do cancro mamário com relação a aspectos de hereditariedade. A presença do BRCA₁ e BRCA₂ mutados provém uma probabilidade de 80% no surgimento do Câncer de Mama (WELCSH e KING, 2001; KING, MARKS, MANDELL, 2003; METCALFE et al, 2004).

1.2 RESPOSTA IMUNE AO CÂNCER

O sistema imunológico é constituído por moléculas, células e órgãos, os quais têm por finalidade manter a homeostase do organismo (TEVA, FERNANDEZ e SILVA, 2009; CRUVINEL et al, 2010). No entanto, essa resposta frente a uma agressão, é constituída por uma ação conjunta da imunidade inata e imunidade adaptativa (AKIRA, UEMATSU e TAKEUCHI, 2006; COELHO-CASTELO et al, 2009; CRUVINEL,2010).

A resposta imune adaptativa é caracterizada por especialização da resposta, memória, especificidade e diversidade de reconhecimento antigênico, dentre outros. Sua funcionalidade depende da ativação linfocítica e de moléculas solúveis, como por exemplo: citocinas, quimiocinas e anticorpos (CRUVIEL et al, 2010). Independente do estímulo prévio, a imunidade inata-composta por: macrófagos, células Natural Killer, células dendríticas e neutrófilos - constitui uma resposta rápida e limitada ao estímulo exposto, na qual os principais mecanismos de atuação desta resposta são: fagocitose, síntese de quimiocinas e citocinas e liberação de mediadores inflamatórios (CRUVIEL et al, 2010; ALTFELD e GALE JR,2015).

O processo inflamatório constitui como um mecanismo de atuação da imunidade inata (CRUVIEL et al, 2010). A inflamação condiz à defesa do indivíduo frente a infecções, assim como, ela está envolvida nos processos de regeneração e reparo tecidual, retornando a homeostasia. No entanto, quando esse mecanismo de ação é exacerbado, desencadeia patologias originadas a partir da inflamação crônica, por exemplo, o câncer (RAKOFF-NAHOUM, 2006; CANDIDO e HAGEMANN, 2013; GOLDSZMID, 2014).

Proporcionalmente um quarto (1/4) dos casos de câncer diagnosticados refere-se a infecções associadas à inflamação crônica, isto é, uma resposta caracterizada por ser de longa duração e constituída por um infiltrado de células mononucleares. Um dos modelos demonstrando esta correlação entre iniciação tumoral e a inflamação, é a utilização da *Helicobacter pylori* induzindo o câncer gástrico. Este modelo demonstrou que a infecção ocasiona alteração na mucosa gástrica, acarretando recrutamento celular e consequente alteração do epitélio por meio de displasia. (COUSSENS e WERB, 2002; KARIN, 2005; LIN e KARIN, 2007; MANTOVANI et al, 2008; COLOTTA et al, 2009; GOLDSZMID, 2014). Outros tumores, porém, iniciam-se por meio de injúria tecidual originado por doenças genéticas ou disbiose (alteração da composição microbiana).

A compreensão entre câncer e inflamação, exige o entendimento do processo inflamatório na patologia neoplásica. Este mecanismo da resposta imune inata é desencadeado quando a injúria tecidual desencadeia por meio de sinais químicos, uma resposta contra essa agressão. Essas moléculas passam então, a ativar e recrutar células (monócitos, eosinófilos e neutrófilos) que se deslocam por meio da vascularização, alcançando os locais da lesão. (COUSSENS e WERB, 2002; LIMA et al, 2007; MEDZHITOV; 2008; SILVA, 2015).

O recrutamento de células aos sítios de injúria por meio dos vasos sanguíneos é desencadeado por fatores quimiotáticos, os quais incluem TGF- β , quimiocinas (MCP-1/CCL2; MCP-2/CCL8; MCP-3/CCL7), citocinas (IL-1 β e TNF- α) e eicosanóides (COUSSENS e WERB, 2002; MEDZHITOV; 2008; MENDONÇA e COUTINHO-NETTO, 2009). Após findar a injúria, ocorre à

remodelação tecidual - exercidos por macrófagos residentes e recrutados; por degradar e eliminar componentes do tecido conjuntivo danificado; e estimular a regeneração por meio de fatores de crescimento de fibroblastos (LIMA et al, 2007; MENDONÇA e COUTINHO-NETTO, 2011). Além disso, substituição de mediadores lipídicos: prostaglandina por lipoxina permite a resolução do processo - visto que as lipoxinas inibem o recrutamento de neutrófilos e promovem o recrutamento de monócitos, que removem as células mortas e iniciam a remodelação dos tecidos (MEDZHITOV; 2008).

Pode-se destacar a correlação da inflamação e imunologia neoplásica, ou seja, é um processo essencial na progressão doença, com funções definidas em diferentes estágios da neoplasia: promoção, progressão e proliferação do tumor (KARIN, 2005; CANDIDO e HAGEMANN, 2013). Além disso, essa correlação pode ser concebida em duas vias: intrínseca e extrínseca. A via intrínseca é relacionada a alterações genéticas, que por meio da ativação de oncogenes, acarretam o processo inflamatório e neoplasia; enquanto a via extrínseca refere-se a condições inflamatórias que aumentam o risco do câncer. É importante salientar que ambas as vias culminam na síntese de mediadores inflamatórios e recrutamento celular (MANTOVANI et al, 2008; COLOTTA et al, 2009; CANDIDO e HAGEMANN, 2013).

As células e mediadores inflamatórios são os constituintes principais do microambiente tumoral (MANTOVANI et al, 2008; COLOTTA et al, 2009; CANDIDO e HAGEMANN, 2013). Em algumas neoplasias, o processo inflamatório precede o desenvolvimento da malignidade; enquanto em outros cânceres, as alterações oncogênicas conduzem um meio inflamatório que promove o tumor, ajudando-o a proliferar e sobreviver, escapando dos mecanismos imunológicos de destruição tumoral, ocasionando por fim, angiogênese e metástase (KARIN, 2005; RAKOFF-NAHOUM, 2006; CANDIDO e HAGEMANN, 2013; GOLDSZMID, 2014).

O mecanismo imunológico de combate ao tumor é constituído por respostas inatas, adaptativas e conjuntas. A primeira linha efetora contra a célula tumoral consta: neutrófilos, macrófagos, Natural Killer, e mastócitos. Uma resposta conjunta é desencadeada pela célula T Natural Killer, e célula T

$\gamma\delta$, enquanto a adaptativa é desencadeada pela funcionalidade dos linfócitos. (CERWENKA e LANIER, 2001; LIU e ZENG, 2012).

As células *Natural Killer* (NK, assassinas naturais) constituem a primeira linha de defesa antitumoral, sendo capazes de reconhecer e espontaneamente matar as células "estressadas" e que apresentam a expressão do *Complexo principal de Histocompatibilidade I* (MHC I) atenuada. As células NK promovem a morte celular por lise, em que a existência de granzimas e perforinas – proteínas contidas em grânulos - são exocitados pela célula; acarretando na morte do alvo por criarem poros, e apresentando elevada citotoxicidade (SMYTH et al, 2002; LIU e ZENG, 2012; MACCALLI et al, 2009; MORVAN e LANIER, 2016).

A ativação das células *NK* ocorre por meio da ação de citocinas, as quais se destacam: *Interleucina-2* (IL-2); *Interleucina-12* (IL-12) e *Interferon-Gama* (IFN- γ); ocasionando assim, sua atividade citotóxica (SMYTH et al, 2002; MACCALLI et al, 2009). A resposta antitumoral nos aspectos inatos e adaptativos ao tumor pode advir da secreção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias pelas células *NK*, as quais se destacam: IFN- γ , Fator de Necrose Tumoral (TNF), *Interleucina-6* (IL-6), fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e CCL5 (GUILLEREY, HUNTINGTON e SMYTH, 2016).

Como produto da ativação das células *NK*, os níveis de IFN- γ , podem estimular outros tipos celulares, dos quais pode-se destacar o macrófago. É bem estabelecido em tumores sólidos, a existência de infiltrados de macrófagos, os quais são atraídos para os sítios neoplásicos por meio de fatores quimiotáticos produzidos localmente (SICA, ALLAVENA e MANOVANI, 2008; SICA, 2010; GALDIERO et al, 2013). Além da participação do IFN- γ , o macrófago é ativado via reconhecimento de antígenos na superfície da célula cancerosa; sua funcionalidade antitumoral condiz com a liberação de enzimas lisossomais e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Outro produto de sua ativação que deve ser apontado é a produção de TNF- α (Fator de necrose Tumoral - alfa), além de atuar na apoptose celular, participa do processo inflamatório, recrutando neutrófilos (MACCALLI et al, 2009).

É necessário ressaltar que a atividade macrófágica possui dualidade funcional frente ao cancro, que é mediada por duas vias: clássica e alternativa. A ativação macrófágica por via clássica desempenha atividade antitumorigênica, elucidado por reações destrutivas teciduais; ao passo que, quando estes são estimulados por via alternativa (IL-4 e IL-13); há secreção de citocinas que promovem angiogênese tumoral, ocorrendo à formação de fibrose e impedindo o processo inflamatório (Figura 3) (GALDIERO et al, 2008; SICA, 2010; MEDREK et al, 2012; WANG, LIANG e ZENG, 2014).

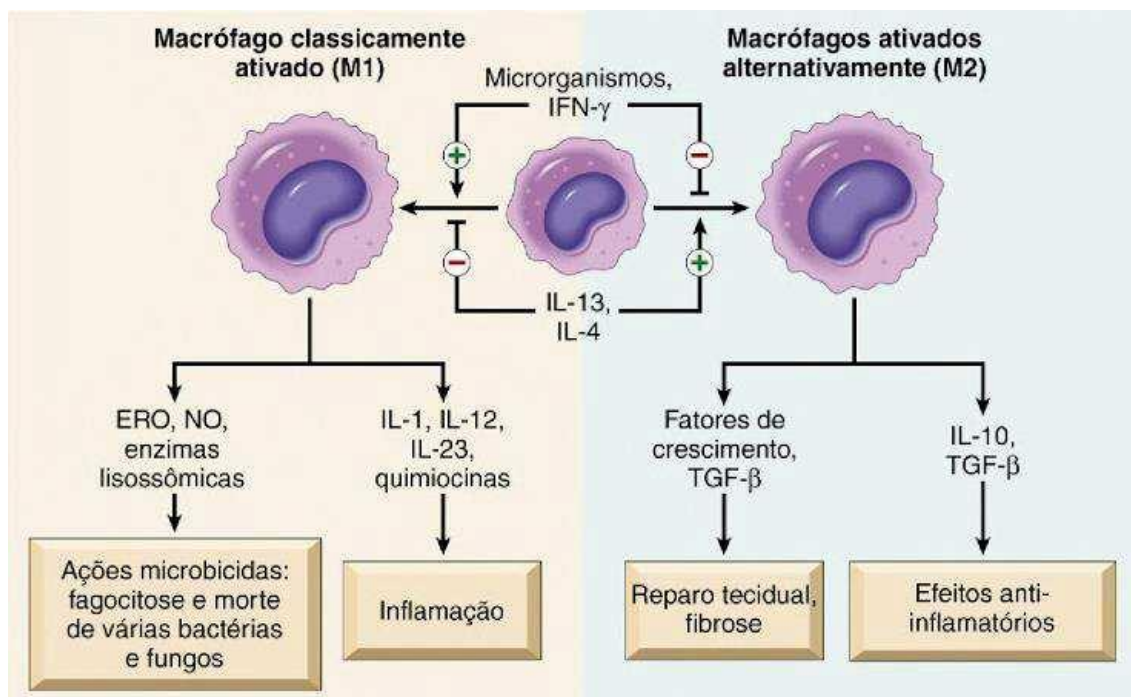


Figura 3: Vias de Polarização Macrófágica: Via Clássica e Alternativa (Adaptado: KUMAR, ABBAS e ASTER, 2016).

É importante destacar que a inibição de sinais que modulem a polarização para macrófagos M2, e induzam a um perfil pró-inflamatório M1; possam modular uma resposta imune, sendo então, uma estratégia que visa a retomar a ação antitumoral exercida por macrófagos (SICA, 2010).

Correlacionada com a memória e especificidade, a resposta imune adaptativa também participa da resposta imunológica ao tumor, portanto não está restrita somente a imunidade inata (LIN e KARIN, 2007; MANTOVANI et al, 2008; LIU e ZENG, 2012). Através de mecanismos humorais e celulares, as

células T citotóxicas (TCD8+) apresentam ação mais efetiva no combate a neoplasia (LIU e ZENG, 2012).

Para a elaboração de uma resposta imune adaptativa contra as células neoplásicas, a participação de antígenos associados ao tumor (TAA) é fundamental, visto que, estes ativam a resposta da célula T, através do complexo de histocompatibilidade principal (MHC). Os TAA's são reconhecidos pelos linfócitos T via MHC I ou II, por meio de uma célula apresentadora de antígeno (APC). Por meio da ação de moléculas coestimuladoras e secreção de quimiocinas e citocinas expressas, ocorre a ativação destes linfócitos bem como ocorre o recrutamento de células imunes efetoras (SPURRELL e LOCKLEY, 2014).

As células B consistem no segundo subtipo de linfócito mais abundante em tumores (YUEN, DEMISSIE e PILLAIS, 2016). A resposta imune humoral contra tumores possui funcionalidades ambíguas para findar a neoplasia. Primeiramente os anticorpos podem alterar a função dos alvos antigênicos nas células tumorais, permitindo a opsonização para a apresentação do antígeno pela célula dendrítica; ativar a cascata do sistema do complemento (proteínas plasmáticas inativadas que medeiam às respostas imunológicas, a qual seu estímulo permite a ativação de linfócitos B e consequente produção de anticorpos); ou contribuir para que as células NK promovam a morte da célula tumoral via citotoxicidade dependente de anticorpos mediada por célula (VISSER, EICHTEN e COUSSENS, 2006; YUEN, DEMISSIE e PILLAIS, 2016). Em contrapartida, os linfócitos B podem estabelecer o tumor via produção de fatores de crescimento, ou ainda pela atividade desempenhada pelas células B regulatórias – suprime a resposta imune antitumoral, pela atenuação promovida pela secreção de IL-10; ou direciona o perfil de resposta via produção de TGF- β (YUEN, DEMISSIE e PILLAIS, 2016).

Um mecanismo de escape intrínseco a ser descrito, condiz com o produto secretado tanto pelas células malignas quanto as não cancerosas, isto é, a expressão de fatores imunossupressores. De acordo com Abbas et al (2011), os imunossupressores podem ser compreendidos como inibidores de

componentes do sistema imunológico, com relação a resposta antitumoral, dois imunossupressores devem ser citados: TGF- β e VEGF.

Primeiramente pode-se destacar a ação do Fator de transformação de crescimento- β (TGF- β). Esta citocina está correlacionada à inibição da proliferação dos componentes da imunidade inata e adaptativa e da função efetora de linfócitos e macrófagos; com relação à resposta antitumoral, ela reduz a inflamação no sítio tumoral, o que influencia promovendo a sobrevivência do câncer. As células neoplásicas também secretam fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o VEGF atua de modo a inibir a diferenciação do progenitor em DC, portanto intervém indiretamente na apresentação cruzada e conseqüentemente, na ação linfocítica. Outros imunossupressores são expressos pelas células tumorais, dentre eles: Prostaglandinas; Interleucina-10 (IL-10), fator estimulante de colônia de macrófagos (M-CSF) (IGNEY e KRAMMER, 2002, FLAVELL et al, 2010).

Distintas populações celulares possuem a capacidade de suprimir a atividade tumoral, a qual caracteriza o outro tipo de evasão a resposta antitumoral. Pode-se destacar então o papel de linfócitos T regulatórios (Treg), Macrófagos associados ao tumor (TAM) e células supressoras derivadas de mielóides (MDSC) (SICA, ALLAVENA e MANTOVANI, 2008; MITTAL et al, 2014).

1.3 CORPÚSCULOS LIPÍDICOS

Importante denotar nas regiões de desenvolvimento tumoral há a formação de organelas que são sítios de produção de mediadores inflamatórios. Estudos vêm elucidando relação entre formação de corpúsculos lipídicos e a progressão tumoral (ACCIOLY et al, 2008; FAZOLINI et al, 2015).

Os corpúsculos lipídicos são organelas citoplasmáticas compostas por lipídeos neutros, destacando-se: triacilglicerol, diacilglicerol e ésteres de colesterol; circundadas por uma monocamada de fosfolipídios (TAUCHI-SATO et al., 2002; D'AVILA et al, 2006; GUO et al, 2009; BOZZA et al, 2011; TOLEDO et al, 2016). Outras terminologias referentes a esta estrutura são encontradas na literatura, tais como: "*lipid bodies*", "*adiposomes*", "*oil bodies*", "*lipid droplets*" na língua inglesa (THIAM et al, 2013).

Esta organela apresenta uma ampla distribuição, uma vez que, a encontramos tanto em células eucarióticas, quanto procarióticas. Em diversos tipos celulares, o tamanho dos corpúsculos lipídicos pode variar de 0,5 μm ; enquanto em adipócitos, atingem tamanho superior a 100 μm , preenchendo todo o citoplasma da célula (SAKA e VALDÍVIA, 2012; WALTHER e FARESE, 2012; MAHAJAN et al, 2015).

Muitas funcionalidades são atribuídas aos corpúsculos lipídicos, tais como: estoque de lipídios para geração de energia e síntese de membrana; tráfico de membranas; regulação do metabolismo lipídico; sinalização intracelular, produção de mediadores inflamatórios e etc. (D'AVILA et al, 2006; BOZZA et al, 2011; WALTHER e FARASE JR, 2012).

Cabe ressaltar que a constituição lipídica dos corpúsculos podem apresentar limitações quanto a sua identificação pela microscopia convencional, devido algumas colorações apresentarem o álcool como fixador ou na desidratação para a posterior coloração (MELO et al, 2011).

Ainda de acordo com Melo *et al* (2011), as técnicas de fixação constituem em solução de paraformaldeído, glutaraldeído ou formaldeído (formalina), em conjunto com coloração de tetróxido de ósmio ou com marcações fluorescentes, destacando-se: BODIPY (β -Bodipy-FL C5-HPA), Oil red O (ORO) ou ácido 1-pirenododecanóico (p96), dentre outros. O tetróxido de ósmio apresenta nítida visibilidade em microscopia de luz e eletrônica; sua interação a lipídeos insaturados e a fosfolipídeos promove a sua redução, apresentando coloração enegrecida permanente (Figura 4).

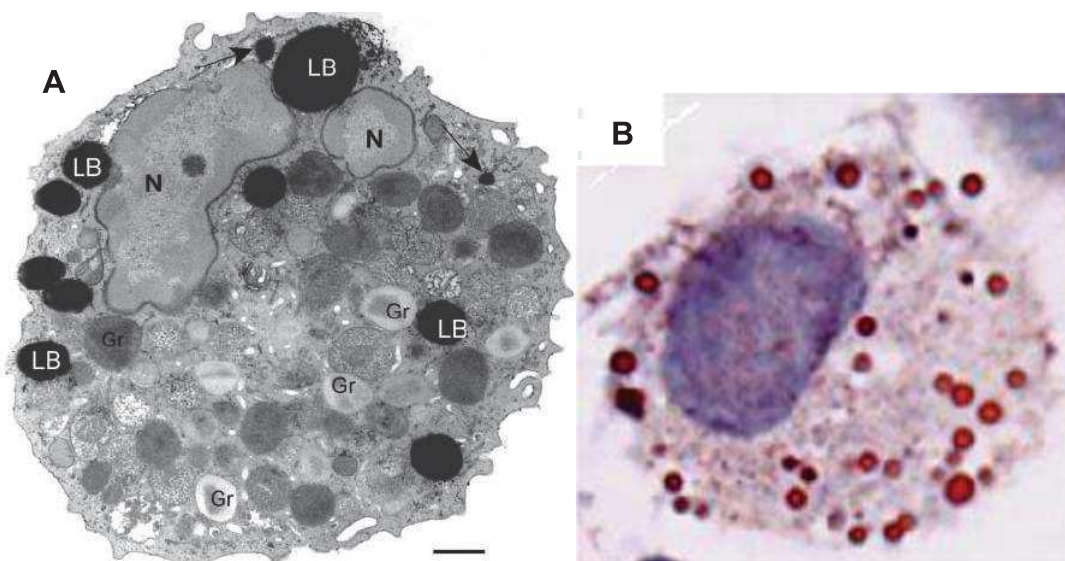


Figura 4: Identificação de Corpúsculos Lipídicos após pós fixação com Tetróxido de ósmio e Oil Red O. Corpúsculos Lipídicos em eosinófilos humano ativados, após pós fixação com tetróxido de ósmio. Imagem obtida por meio de microscopia eletrônica de transmissão (Adaptado de Melo et al, 2011) (Imagem A). Corpúsculos Lipídicos em macrófagos ativados, após coloração com Oil Red O. Imagem obtida por microscopia de luz (Adaptado de D'avila et al, 2008) (Imagem B.)

A constituição da monocamada fosfolipídica dos corpúsculos lipídicos, permite a separação do núcleo hidrofóbico da organela ao ambiente aquoso inserido, podendo estar envolvida no recrutamento de inúmeras proteínas associadas aos CL. A presença das proteínas nesta organela pode estar correlacionada com o processo de biogênese do corpúsculo, além de sua disposição estrutural, destacando-se: PLIN/Perilipina (antes denominada PAT); CIDE, Caveolinas e FIT (ARRESE, SAUDALE e SOULAGES, 2014; MAHAJAN et al, 2015).

A denominação de perilipinas (PLIN) se deve a localidade em que se encontram na organela. Este grupo proteico é composto por: Perilipina (PLIN1), ADRP (Proteína relacionada com a diferenciação de adipócitos) – atualmente denominada PLIN 2, TIP47 (Proteína de interação de porção terminal de 47kDa), S3-12 e OXPAT (SKINNER et al, 2013; ARRESE, SAUDALE e SOULAGES, 2014; MAHAJAN et al, 2015). Apesar das perilipinas representarem as proteínas mais abundantes no corpúsculo lipídico, sua ocorrência é influenciada por uma gama de condições, exemplificadas por: fase metabólica da célula e desenvolvimento celular, regulação transcricional e tipo tecidual (BRASAEMLE, 2007; ARRESE, SAUDALE e SOULAGES, 2014).

As perilipinas são marcadores de diferenciação de adipócito, nos quais a expressão de seu gene é controlado via PPAR γ (Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama) (BICKEL, TANSEY e WELTE, 2009).

Esses receptores nucleares estão envolvidos nos processos de adipogênese (podendo acarretar a diferenciação em adipócitos), inflamação, manutenção homeostática e metabolismo lipídico (ALMEIDA et al, 2012; WANG et al, 2014).

O PPAR não somente controla a expressão de proteínas associadas aos corpúsculos lipídicos, mas também estão envolvidos na biogênese dos CL (ALMEIDA et al, 2009; FREITAS, 2014; LEIGUEZ, 2015). Tendo em vista a funcionalidade exercida por esses receptores, os PPAR estão correlacionados a modelos de infecção crônica, uma vez que, elevados níveis de prostaglandina direciona a um perfil macrofágico anti-inflamatório (ALMEIDA et al, 2009; FREITAS, 2014).

O processo de biogênese dos corpúsculos lipídicos ainda não demonstra clareza, a hipótese amplamente aceita descreve que eles provêm da membrana do Retículo Endoplasmático (RE), uma vez que, explicaria sua organização circundada por uma monocamada de fosfolídeos, contendo em seu centro lipídeos neutros. Essa proposição condiz com a produção de lipídeos neutros (triacilglicerol e ésteres de colesterol) e seu respectivo acúmulo e depósito entre as monocamadas da membrana do RE, possibilitando que haja um brotamento, e com isso, ocasionaria a formação de uma organela limitada por uma monocamada de fosfolípidios e proteínas

(FIGURA 5) (MARTIN e PARTON, 2006; BELLER et al, 2010; CHAPMAN et al, 2012). Bozza e Bandeira-Melo (2005) esclarecem que a biogênese dessa organela não condiz como resultado de uma injúria celular (desequilíbrio fisiológico) ou acúmulo de ácidos graxos, mas sim regulado por uma gama de fatores: dependente do estímulo e do tipo celular e condição patológica.

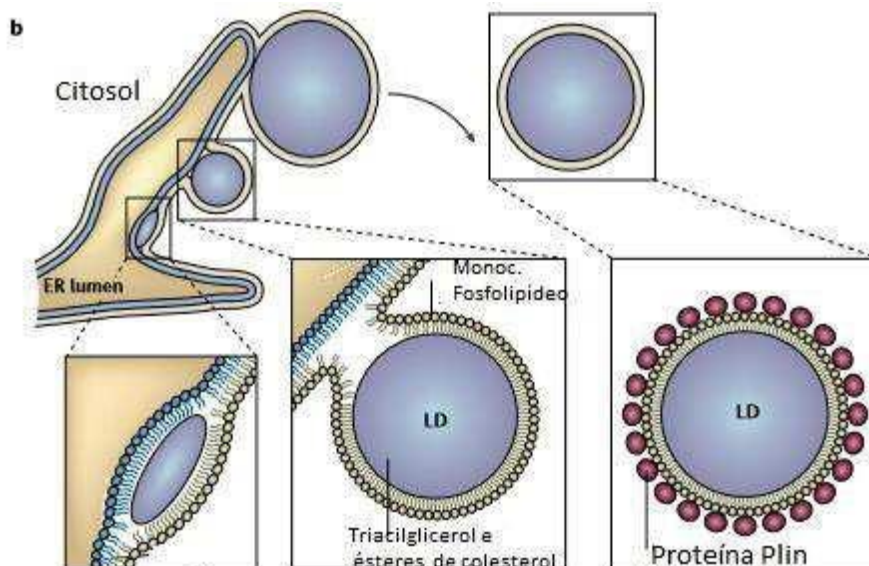


Figura 5: Biogênese dos Corpúsculos Lipídicos (adaptado : Martin e Parton, 2006).

Os corpúsculos lipídicos são considerados sítios de localização e produção de enzimas que biossintetizam mediadores lipídicos, sendo definidos como moléculas orgânicas ativas que são liberadas no decorrer da resposta inflamatória; dentre os quais, podemos ressaltar os eicosanoides, exemplificadas pelas prostaglandinas e leucotrienos (BOZZA e BANDEIRA-MELO, 2005; MELO et al, 2013).

Os eicosanoides são moléculas derivadas do ácido araquidônico (AA), e para obtê-las é necessária a liberação deste aos fosfolípidos da membrana (AA - constituinte dos ácidos graxos e composto por 20 átomos de carbono). O desprendimento da membrana é acarretado pela atividade da enzima fosfolipase A₂ (PLA₂), em que a família cPLA₂ (citosólica) está envolvida na síntese de eicosanoides. Sucendendo o desprendimento do ácido araquidônico da membrana, o mesmo é metabolizado por dois sistemas enzimáticos: lipoxigenase (LO) obtendo como produto, leucotrieno; e ciclooxigenase (COX),

desencadeando a produção de prostaglandinas e tromboxanos (Figura 5) (BROKE e PETERS-GOLDEN, 2007).

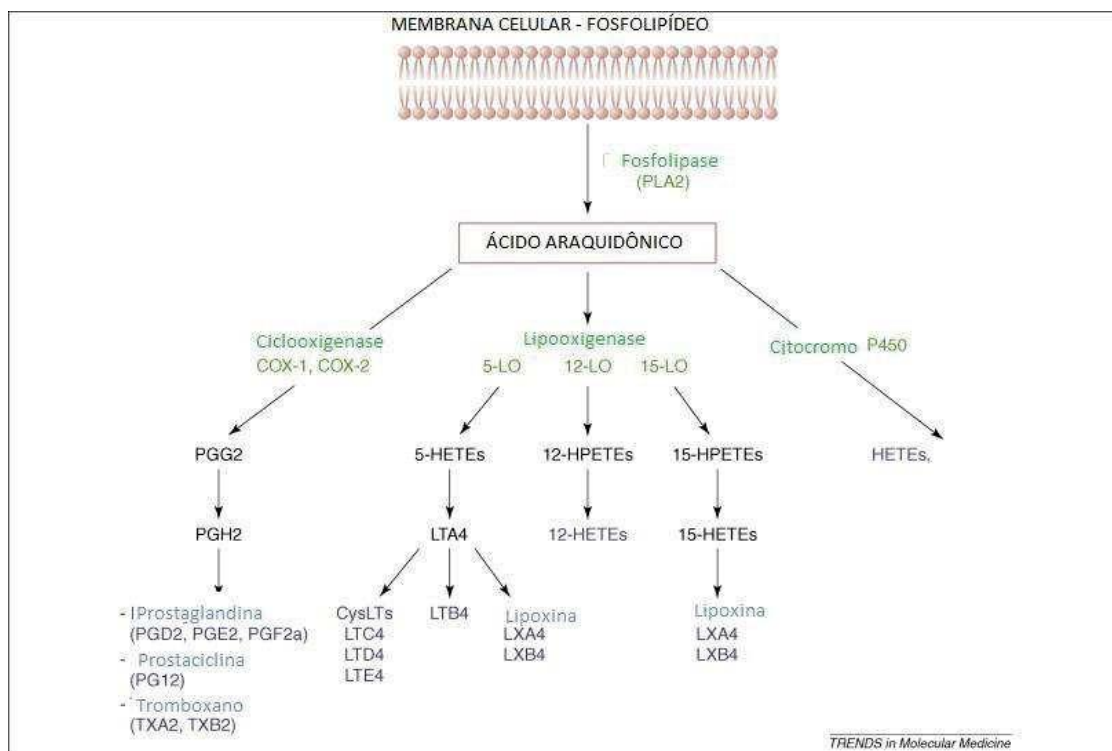


Figura 6: Mecanismos de síntese de Eicosanóides a partir do ácido araquidônico (adaptado de: HARIZI, CORCUFF e GUALDE, 2008).

A ciclooxigenase é uma isoenzima que catalisa a biossíntese de eicosanóides possuindo dois isotipos: COX-1 e COX-2. A primeira é encontrada nas células sob condições normais, isto é, expressa constitutivamente. A ciclooxigenase-2 pode se manifestar por meio de estímulos pró-inflamatórios (citocinas: IL-1; TNF- α , a título de exemplo), e apresentar sua atividade inibida por meio de citocinas anti-inflamatórias e drogas glicocorticóides (CARVALHO, CARVALHO e SANTOS, 2004; RICCIOTTI e FITZGERALD, 2011).

Concomitantemente com a ilustração de Harizi, Corcuff e Gualde (2008) a inserção de uma molécula de oxigênio no ácido araquidônico promove a produção de PGG₂, que é rapidamente convertida em PGH₂ (por ação da COX), e esta se transforma nos demais isotipos de PGs (PGE₂, PGD₂, PGF_{2a},

PGI₂), além de prostaciclina e tromboxano (BROCK e PETERS-GOLDEN, 2007).

Leucotrienos (LTs) e lipoxinas (LXs) são produtos da via do metabolismo do ácido araquidônico desencadeada pelas lipoxigenases. A obtenção destes é estimulada por meio da clivagem do ácido graxo, na qual a enzima 5-Lipoxigenase (5-LO) promove catálise; convertendo o AA em 5-hidroperoxieicosatetranoico (5-HEPTE). Deve-se mencionar a participação de um intermediário instável, o LTA₄, o qual pode ser convertido a LTB₄; ou ainda, conjugado com demais substâncias, ocasionando a produção de LTC₄, LTD₄, LTE₄ (FUNK, 2005; BROCK e PETERS-GOLDEN, 2007).

Proteínas e citocinas têm sido relacionadas à formação de corpúsculos lipídicos. Maya-Monteiro e col (2008), demonstraram que a formação dos CL induzida por leptina (hormônio advindo de adipócitos) foi dependente da via mTOR.

A via do “alvo da rapamicina em mamíferos” (mTOR) é uma das vias de controle traducional especializada em responder a sinais externos, como, parece ser a chave na regulação gênica em resposta a sinais do ambiente, através do reconhecimento de receptores de superfície celular, incluindo TLRs e fatores de crescimento (CALKHOVEN, MULLER e LEUTZ, 2002). A rapamicina é um macrolídeo lipofílico que interage com a quinase mTOR inibindo a atividade desta quinase *in vitro* (HARA *et al.*, 2002). Está cada vez mais claro que a mTOR é o componente central de uma complexa rede de sinalização que regula o crescimento e a proliferação celular. Além disso, sua atividade tem sido implicada na regulação de processos inflamatórios e trombóticos por regular a tradução sinal-dependente em leucócitos (MAHONEY *et al.*, 2001). A mTOR recebe sinais da membrana plasmática por uma via de transdução de sinais ainda não caracterizada que inclui a proteína quinase B (PKB/AKT) e a proteína “fosfatidilinositol 3-quinase” (PI3K), dependendo do tipo celular estudado. Uma vez ativada, a via mTOR controla o estado de fosforilação e atividade de dois efetores chaves: a proteína S6K1 (p70-S6K) e a 4E-BP1 (Figura 7). A sinalização dessas fosfoproteínas via mTOR, promove o início da tradução de um subconjunto de RNAs altamente regulados,

promovendo o aumento da síntese protéica (GINGRAS *et al.*, 2001a) (Figura 7).

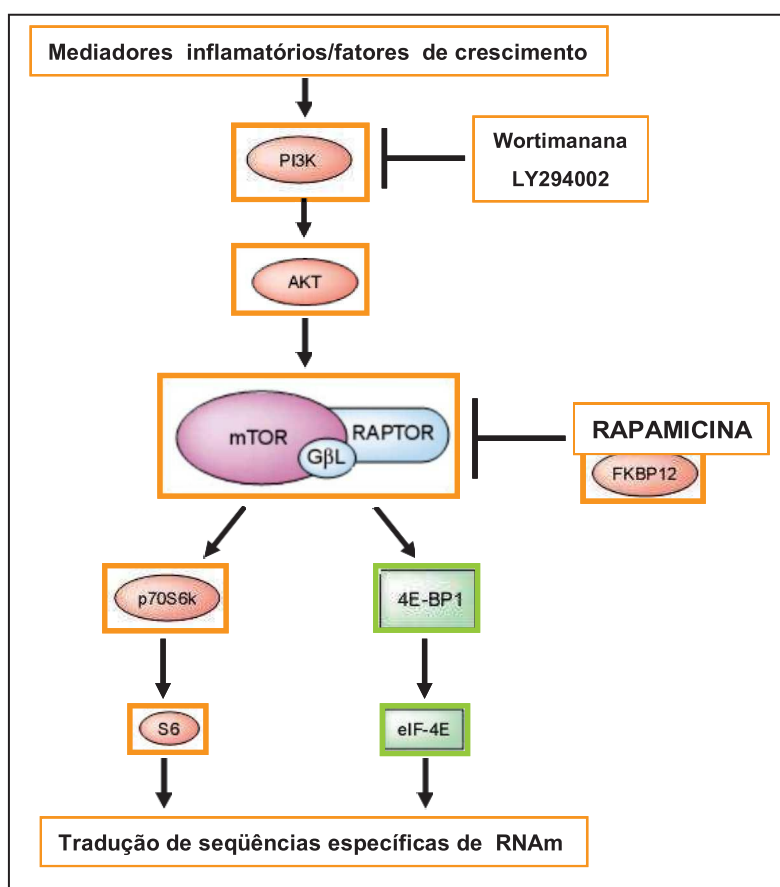


Figura 7: Cascata de sinalização intracelular da via mTOR. Adaptado de Gingras *et al.*, 2001.

No caso da sinalização da leptina, segundo Maya-Monteiro e col (2008) os corpúsculos lipídicos formados pela estimulação com essa adipocina foram sítios de localização da 5-LO, o que acarretou, no aumento da síntese de LBT₄. De forma interessante, a via mTOR parece atuar em processos celulares, os quais incluem: sobrevivência celular, progressão do ciclo celular, migração e síntese proteica. Estudos recentes vem comprovando que a desregulação dessa via está associada a promoção da tumorigênese e angiogênese em diversas neoplasias (JIANG e LIU, 2009; FAZOLINI *et al.*, 2015)

1.3.1 METABOLISMO LIPÍDICO E SUA CORRELAÇÃO COM DOENÇAS

O organismo predispõe de mecanismos fisiológicos que permitem a manutenção da homeostase corpórea elucidado, por exemplo, pela lipotoxicidade (excesso de ácidos graxos contidos no interior da célula). Para restringir o acúmulo de ácidos graxos, as células dispõem de dois recursos homeostáticos: oxidação destes componentes orgânicos ou retirando o triacilglicerol para o interior dos corpúsculos lipídicos. Quando o limiar da oxidação dos componentes orgânicos é ultrapassada pela presença de lipídeos neutros, isso permite o aumento da formação de CL, (GREENBERG et al, 2011).

Trabalhos denotam o acúmulo lipídico em diversas classes celulares, tais como: macrófagos, eosinófilos e leucócitos; logo, a concentração, e alterações no metabolismo lipídico nas células hospedeiras pode caracterizar as infecções (MELO et al, 2011, RABHI et al, 2016). Explicitando a afirmação acima, estudos conduzidos por D'Ávila *et al* (2006 e 2007), demonstraram o aumento de corpúsculos lipídicos em macrófagos e eosinófilos pleurais induzidos pela infecção por *Mycobacterium bovis bacillus* Calmette-Guérin (BCG), bem como Almeida et al (2009) em macrófagos infectados *in vitro*. Almeida et al (2009) demonstrou que o PPAR γ regulou a produção de PGE $_2$ em macrófagos infectados com BCG, e obviamente, os níveis de COX-2 apresentaram-se aumentados.

É observado que os protozoários são capazes de provocar a formação de corpúsculos lipídicos em células hospedeiras, uma vez que, evocam uma resposta inflamatória intensa, caracterizada por infiltração macrofágica. Rabhi *et al* (2016) averiguou aspectos relacionados aos CL em *Leishmania major*, e demonstrou que a produção da organela é dependente do tempo. Deve-se elucidar ainda que, patógenos intracelulares utilizam a modulação do metabolismo lipídico, por meio da geração de corpúsculos, como mecanismo de evasão a resposta imune do hospedeiro, o que pode ser constatado pelos trabalhos desenvolvidos pelo nosso grupo com o agente causador da doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi* (TOLEDO, D'ÁVILA e MELO, 2016). Em *T. cruzi* houve uma intensa formação de CLs em macrófagos peritoneais, o que esteve correlacionada com a produção de PGE $_2$ no sítio inflamatório, indicando

a atividade celular (FREIRE- DE-LIMA, 2000; MELO et al., 2003; D'ÁVILA et al, 2011)

Outras observações patológicas em que constataam o aumento no número de corpúsculos lipídicos e síntese de eicosanóides condizem com as células tumorais (ACCIOLY et al, 2008; BOZZA, MAGALHÃES e WELLER, 2010; BOZZA e VIOLA, 2010; BOZZA et al, 2011; SANTOS e SCHULZE, 2012; ABRAMCZYK et al, 2015). Os carcinomas apresentam alterações no metabolismo lipídico desencadeadas pelo aumento da lipogênese (síntese de ácidos graxos), o que corresponde com similaridades fenotípicas tumorais; bem como ao mau prognóstico em câncer de mama, cólon e próstata (ACCIOLY et al, 2008).

1.3.2 METABOLISMO LIPÍDICO EM CÂNCER

A lipogênese – síntese de ácidos graxos – condiz com um fenótipo semelhante observado em cancros de mama, gástrico e de cólon (SWINNEN, BRUSSELMANS e VERHOEVEN, 2006; ACCIOLY et al, 2008; FAZOLINI et al, 2015; DJEFAFLIA, VASSEUR e GUILLAUMOND, 2016). O metabolismo lipídico em câncer proporciona o aumento na formação de corpúsculos lipídicos, os quais, estocam o excesso de lipídeos (ACCIOLY et al, 2008; DJEFAFLIA, VASSEUR e GUILLAUMOND, 2016).

Concomitantemente com a formação de corpúsculos, ocorre o aumento da síntese de mediadores inflamatórios, exemplificados pelas prostaglandinas (ACCIOLY et al, 2008; BOZZA, MAGALHÃES e WELLER, 2010; BOZZA e VIOLA, 2010; BOZZA et al, 2011; SANTOS e SCHULZE, 2012; ABRAMCZYK et al, 2015). Estes prostanóides provêm da atividade da ciclooxigenase, em que a síntese de PGE₂ está associada ao processo inflamatório, em que há o recrutamento de células imunes ao tumor (TILLEY, COFFMAN e KOLLER, 2001; RICCIOTTI e FITZGERALD, 2011). Em adição, a prostaglandina E₂, pode promover o cancro por se ligar a receptores e promover a sinalização que controla a proliferação celular, angiogênese, migração e apoptose (WANG e DUBOIS, 2006).

É de conhecimento que os tumores são encontrados em áreas hipóxicas (baixa concentração de oxigênio), como consequência do aumento de volume do abscesso. A baixa oxigenação acarreta a ativação de fatores induzíveis de hipóxia (HIF), que promove a angiogênese devido à expressão de VEGF. Outra funcionalidade descrita por HIF1 é promover o acúmulo de lipídios através da indução da proteína 2 induzível por hipóxia, a qual está envolvida na deposição de lipídeos neutros no interior dos corpúsculos lipídicos; além da produção de triacilglicerol em tecido adiposo através do PPAR γ (SANTOS e SCHULZE, 2012).

Em patologias como diabetes do tipo II ou câncer, é estabelecido a ativação da via mTOR. Em adição a via mTOR é um regulador no metabolismo celular, exemplificados por: crescimento, proliferação e sobrevivência. A via mTOR I está relacionada a regulação de lipídeos os quais, são requeridos para o crescimento celular e proliferação - características intrínsecas a neoplasias (LAPLANTE e SABATINI, 2012).

Fazolini e cols (2015) analisaram aspectos do metabolismo lipídico em carcinoma intestinal, a partir da estimulação com o inibidor da via mTOR: rapamicina. Como resultados deste estudo, observaram a inibição de aspectos do metabolismo lipídico via rapamicina, sendo exemplificados pela restrição na formação de corpúsculos lipídicos.

O tecido adiposo caracteriza-se não somente por reserva lipídica, mas também por secretar fatores que exercem funções endócrinas e parácrinas, denominadas adipocinas; que atuam no metabolismo lipídico (modulando a formação de corpúsculos lipídicos), níveis de insulina e processo inflamatório. Disfunções adipocíticas podem acarretar em síndromes metabólicas, originárias de inflamações crônicas e desregulação do metabolismo, permitindo maior susceptibilidade no risco de obesidade e câncer. Sendo assim as adipocinas estão condicionadas ao crescimento da célula neoplásica ou influenciando a tumorigênese (HEBBARD e RASCH, 2014).

Pode-se destacar o papel antagônico relacionado ao câncer desenvolvido pelas adipocinas: Leptinas e Adiponectinas (HEBBARD e

RASCH, 2014). As adiponectinas são proteínas secretadas por adipócitos, as quais quando expressas em níveis baixos correlaciona-se a: resistência à insulina; diabetes mellitus, cânceres (gástrico, mama e endometrial). Sua menor expressão condiz com aumento em número e tamanho do tumor, acarretando a invasão e progressão neoplásica (WOLF et al, 2006).

As leptinas são hormônios secretados por adipócitos, a qual sua funcionalidade apresenta antagonista comparado a adiponectina. Estas se associam a progressão tumoral, devido à promoção da angiogênese, e produzem efeitos antiapoptóticos em células neoplásicas (DUTTA et al, 2012; FAZOLINI et al, 2015). É reconhecido que a obesidade eleva os níveis de leptina e decrescem os níveis de adiponectinas, sendo importantes para o estabelecimento do carcinoma mamário (DUTTA et al, 2012).

Fazolini *et al* (2015) estudando a correlação entre corpúsculos lipídicos e ativação de Leptina em células carcinogênicas intestinais, observou que a adipocina induziu a biogênese de corpúsculos lipídicos, e conseqüentemente modulou a expressão de ciclooxigenase-2 (COX-2), permitindo a produção de PGE-2; estando de acordo com os trabalhos de Accioly *et al* (2008). Considerando os trabalhos de Accioly *et al* (2008) e Fazolini *et al* (2015), o presente estudo faz-se necessário para compreender a funcionalidade de corpúsculos lipídicos e seus mediadores na progressão tumoral mamária; bem como entender o papel das adipocinas no metabolismo lipídico na neoplasia, tendo em vista que o Câncer de mama apresenta elevada incidência na população.

Devido à relevância da neoplasia mamária, muitos estudos vêm sendo desenvolvidos a partir da utilização de duas linhagens murinas como modelos de estudo: 4T1 e 67NR (TAO et al, 2008; SIMÕES et al, 2015). Estas células se assemelham quanto a sua origem (glândulas mamárias), propriedades de crescimento (aderência), e capacidade tumorigênica (ATCC, 2016).

A linhagem 4T1 apresenta caráter agressivo, podendo metastatizar com facilidade em outros sítios, como por exemplo, linfonodo e pulmão (DUPRÉ, RELDMAN e HUNTER JR, 2007; LOU et al., 2008; TAO et al, 2008; NAGLER

et al, 2011; ISSA et al, 2013; MADERA et al, 2015; SIMÕES et al, 2015). Em contrapartida, a linhagem 67NR não possui a competência de metastatizar em outros sítios, porém é capaz de originar tumor primário na glândula mamária (LOU et al., 2008).

Sendo assim, várias linhagens celulares com diferentes propriedades metastáticas vêm sendo utilizadas como objeto de estudo para elucidar os mecanismos envolvidos ao Câncer. Neste estudo, utilizamos as linhagens 4T1 e 67NR para esclarecer aspectos relacionados ao metabolismo lipídico no modelo de Câncer de Mama, visto que esta neoplasia é a mais incidente na população feminina.

Considerando o trabalho de Maciel e col. (em preparação), no qual observou em modelos *in vivo* e *in vitro*, utilizando células 4T1, um aumento na expressão de prostaglandina E2, concomitantemente com o aumento da formação de corpúsculos lipídicos; o presente trabalho consiste em estudar os aspectos envolvidos ao metabolismo lipídico: formação de corpúsculos lipídicos e síntese de mediadores inflamatórios em linhagens utilizadas em modelos *in vitro* e *in vivo*, afim de elucidar os mecanismos envolvidos na relação metabolismo lipídico e progressão tumoral.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar e comparar a formação de corpúsculos lipídicos e síntese de mediadores inflamatórios em duas linhagens celulares tumorais de mama: uma metastásica (4T1) e a outra não metastásica (67NR); bem como analisar o papel da via de sinalização mTOR nas linhagens tumorais e na ativação de macrófagos cultivados com meio condicionado das linhagens tumorais

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Analisar a formação de corpúsculos lipídicos e síntese de mediadores inflamatórios (PGE₂, leptina, adiponectina e citocinas pró e anti-inflamatórias) nas linhagens tumorais 4T1 e 67NR cultivadas *in vitro*;

2.2.2 - Avaliar a formação de corpúsculos lipídicos e síntese de mediadores inflamatórios (PGE₂, leptina, adiponectina e citocinas pró e anti-inflamatórias) em macrófagos estimulados *in vitro* com meio condicionado das linhagens tumorais;

2.2.3 - Avaliar o papel da via mTOR na formação de corpúsculo lipídicos e síntese de PGE₂ e citocinas em nas linhagens tumorais 4T1 e 67NR cultivadas *in vitro*, utilizando para isto, o pré-tratamento com rapamicina, inibidor da atividade de mTOR;

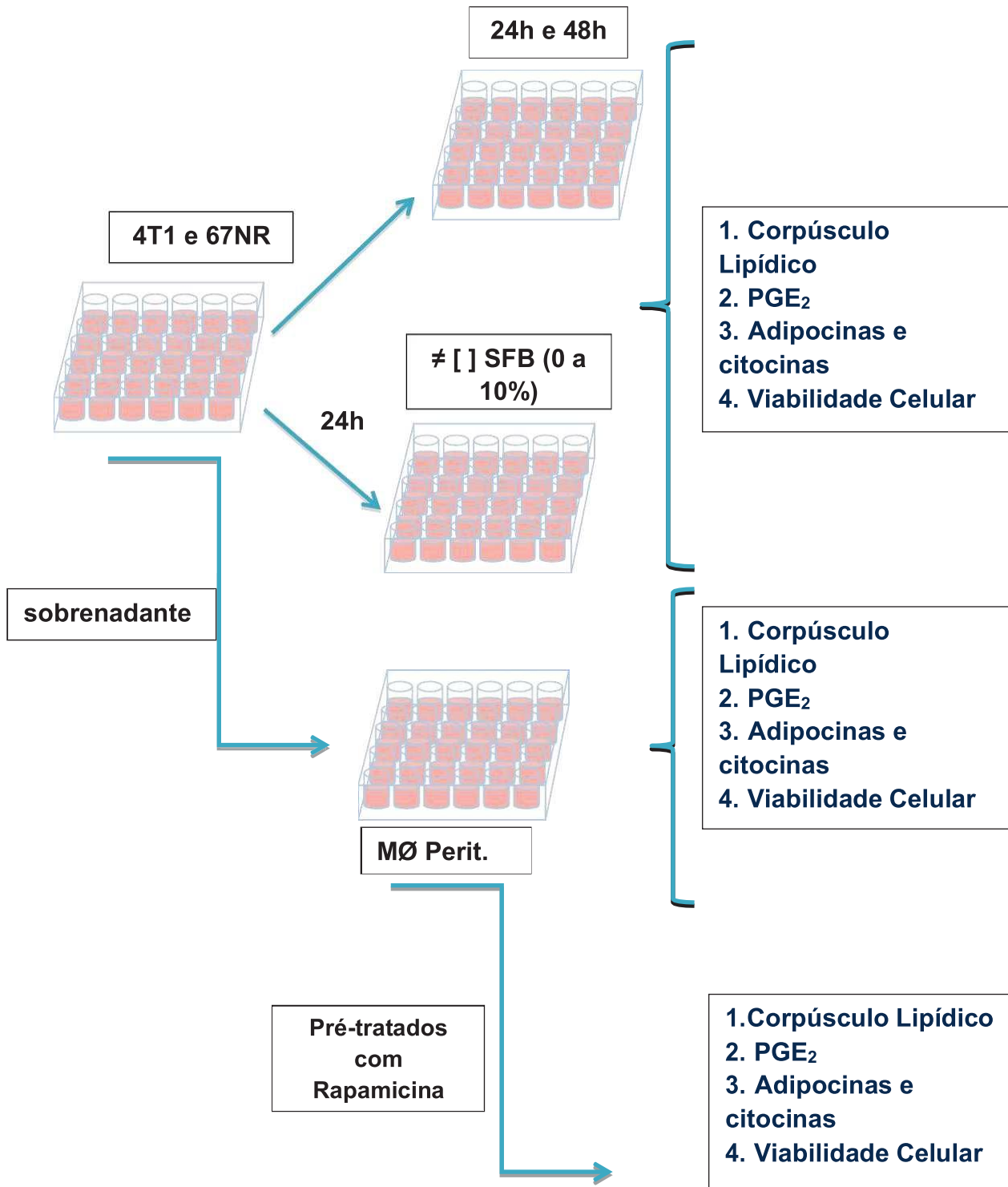
2.2.4 - Avaliar o papel da via mTOR na formação de corpúsculo lipídicos e síntese de PGE₂ e citocinas em macrófagos estimulados *in vitro* com meio condicionado das linhagens tumorais, utilizando para isto o pré-tratamento com rapamicina, inibidor da atividade de mTOR;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LINHAGENS CELULARES

As linhagens tumorais mamárias, metastásica (4T1 - ATCC® CRL – 2539™) e não metastásica (67 NR) foram gentilmente cedidas pela Dra. Jacy Gameiro do Laboratório de Imunologia das Doenças Infecto Parasitárias e Obesidade (LIDIPO) da Universidade Federal de Juiz de Fora. As alíquotas contendo 1×10^6 células das linhagem 4T1 e 67NR, foram mantidas em -80° . Para os experimentos, as alíquotas foram descongeladas e cultivadas em meio RPMI-1640 (contendo: 10% de Soro Fetal Bovino (SFB); 1% de Penicilina e Estreptomicina e 1% L-glutamina (Sigma-Aldrich, USA) em garrafas de cultura celular de 75cm^2 . As linhagens celulares foram mantidas a 37°C em atmosfera de gás carbônico (5% CO_2), e utilizadas para experimentos posteriores ou para a manutenção da cultura no Laboratório de Biologia Celular – ICB – UFJF.

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



Em um primeiro momento, a partir da confluência das duas linhagens tumorais mamárias: metastática (4T1) e não metastática (67NR), foram avaliadas várias questões sobre duas variáveis: tempo e concentrações de Soro fetal Bovino (SFB).

Foram avaliados em 24 e 48 horas: a formação de corpúsculos lipídicos, por meio da contagem de lâminas coradas com Oil Red O; a produção de Prostaglandina E2, a partir do Ensaio Imunoenzimático; quantificação de adipocinas (adiponectina e leptina) e citocinas por ELISA; e por fim, a viabilidade celular por meio do Azul de Tripán (STROBER, 2001). Os mesmos aspectos avaliativos foram utilizados para as diferentes concentrações de Soro Fetal Bovino (0%, 2%, 4%, 6%, 8%, 10%).

Em uma segunda etapa, procurou-se avaliar: formação de corpúsculos lipídicos; PGE₂; quantificação de adipocinas e viabilidade celular de macrófagos peritoneais estimulados com os sobrenadantes das células tumorais.

3.3 ESTIMULAÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS

Para averiguar se a concentração de Soro Fetal Bovino e o tempo de culturas são capazes de modular a formação de corpúsculos lipídicos nas linhagens tumorais, as células 4T1 e 67 NR foram cultivadas (1×10^6 /poço) em placas de cultura de 24 poços (cada poço contendo uma lamínula redonda ao fundo) em RPMI-1640 (contendo 0%, 2%, 4%, 6%, 8% e 10% de Soro Fetal Bovino (SFB); 1% de Penicilina e Estreptomina e 1% L-glutamina (Sigma-Aldrich, USA)) a 37°C (5% CO₂). Após 24h ou 48h, as células foram fixadas com formalina 3,7% para posterior contagem de corpúsculos lipídicos e análise da viabilidade celular por meio de azul de tripan. O sobrenadante foi coletado para dosagens de eicosanóides, adipocinas e citocinas.

3.4 - ESTIMULAÇÃO DE MACRÓFAGOS IN VITRO

Camundongos machos C57Bl/6 foram cedidos pelo biotério pelo Centro de Biologia da Reprodução – CBR- UFJF. Os animais pesando entre 20 a 25g

foram eutanasiados em câmara de CO₂, para posterior coleta dos macrófagos peritoneais. Todos os procedimentos com animais foram executados segundo protocolos aprovados pelo CEUA/UFJF (039/2012 e 22/2015). Os macrófagos foram cultivados em placas de cultura de 24 poços contendo lamínula redonda no fundo com meio RPMI-1640 (contendo: 2% de Soro Fetal Bovino (SFB); 1% de Penicilina e Estreptomicina e 1% L-glutamina (Sigma-Aldrich, USA), em estufa a 37°C (5% CO₂) pelo período de uma noite. Posteriormente, os macrófagos foram estimulados com sobrenadante (livre de células) das células tumorais 4T1 e 67NR (nas concentrações de 25%, 50% e 100% do volume final por poço) por 24h. Após esse período, o sobrenadante foi descartado e as células cultivadas por mais 24h com meio RPMI-1640 contendo 2% de SFB. Para investigar o papel da via mTOR, os macrófagos foram pré-tratados (30 min) com rapamicina (20nM). Durante todo o tempo experimental foi mantido o tratamento com rapamicina. As células foram utilizadas para quantificação de corpúsculos lipídicos e o sobrenadante coletado para dosagens de eicosanóides, adipocinas e citocinas.

3.5 COLORAÇÃO DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS

A solução estoque de oil red O (1-([4-(Xylylazo)xylyl]azo)-2-naphthol) (Sigma Aldrich) foi preparada a 0,3% (0,3 g de oil red O qsp 100mL de isopropanol (ácido isopropílico) (Sigma Aldrich)). Em seguida, filtrada e acondicionado em temperatura ambiente. A solução de uso foi preparada no dia da coloração. Para isso, diluiu-se 6 mL da solução estoque em 4mL de água destilada. Concluída a diluição, a solução foi novamente filtrada e utilizada para a coloração de corpúsculos lipídicos.

As células das linhagens tumorais e os macrófagos estimulados, após fixadas, foram lavados com água destilada e coradas no próprio poço das placas de cultura. Para isso, foi adicionada a solução de uso de Oil red O em quantidade suficiente para cobrir a lamínula, e incubada por 5 minutos. Decorrido o tempo, as células foram lavadas 5 vezes com água destilada e as

laminas montadas com meio de montagem contendo DAPI (VECTASHIELD® mounting medium containing DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) para a marcação do núcleo das células.

Os corpúsculos lipídicos foram contados em 50 células consecutivas após análise em microscópio de fluorescência BX-51 acoplado com câmera digital XC-50, sob objetiva de 100x (Olympus, Tokyo, Japan).

3.6 QUANTIFICAÇÃO PGE₂

A dosagem de PGE₂ produzida pelas linhagens tumorais mamárias e macrófagos, foi realizada no sobrenadante (livre de células) das culturas pelo Ensaio Imunoenzimático (EIA assay), adotando as orientações do fabricante (Cayman Chemical, USA). A leitura da placa foi realizada em leitor de microplacas (SPECTRAMAX 190, Molecular Devices) a 405 nm utilizando o programa Softmax Pro.

3.7 QUANTIFICAÇÃO DE LEPTINA , ADIPONECTINA, TGF- β e TNF- α

A produção de adipocinas (leptina e adiponectina), TGF- β e TNF- α pelas linhagens tumorais e macrófagos foi dosada por ELISA. Foram utilizados os kits Duo set (R&D Systems) e os ensaios seguiram as determinações do fabricante. A quantificação foi mensurada a partir das curvas padrão proveniente da diluição realizada. A leitura foi realizada como descrito acima em 450 nm utilizando o programa Softmax Pro

3.8 PROCESSAMENTO DAS IMAGENS

As imagens foram capturadas a partir das lâminas confeccionadas para a análise quantitativa e qualitativa das linhagens tumorais mamárias e macrófagos, permitindo o caráter comparativo destas mediante a produção de corpúsculos lipídicos. As imagens foram processadas por meio do programa

PannoramicViewer para posicionamento da barra de escala e ajuste do foco e aumento (100x), do equipamento PannoramicScan da 3D HDHITECH.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA E ELABORAÇÃO DOS GRÁFICOS

Os gráficos foram obtidos por meio do programa GraphPad Prism®7(GraphPad Software). A análise dos resultados foi mediante Média \pm EPM e analisados estatisticamente segundo ANOVA seguido pelo teste *t* de Student, com significância de $p < 0.05$.

4 RESULTADOS

4.1 EFEITO DO TEMPO DE CULTIVO NA FORMAÇÃO DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS NAS CÉLULAS TUMORAIS

Inicialmente, para investigar o número de corpúsculos lipídicos nas duas linhagens tumorais, as células foram cultivadas em placas de 24 poços por 24 e 48h em meio RPMI contendo 10% de SFB. Nossos resultados demonstram o elevado número de corpúsculos lipídicos em ambas às linhagens tumorais mamárias (Figuras 8 e 9) no tempo de 24h. Em 48h houve um aumento significativo na formação destas organelas nas 2 linhagens analisadas. No entanto, neste tempos, a linhagem 4T1 (metastática) apresentou maior número destas organelas em comparação com a linhagem 67NR.

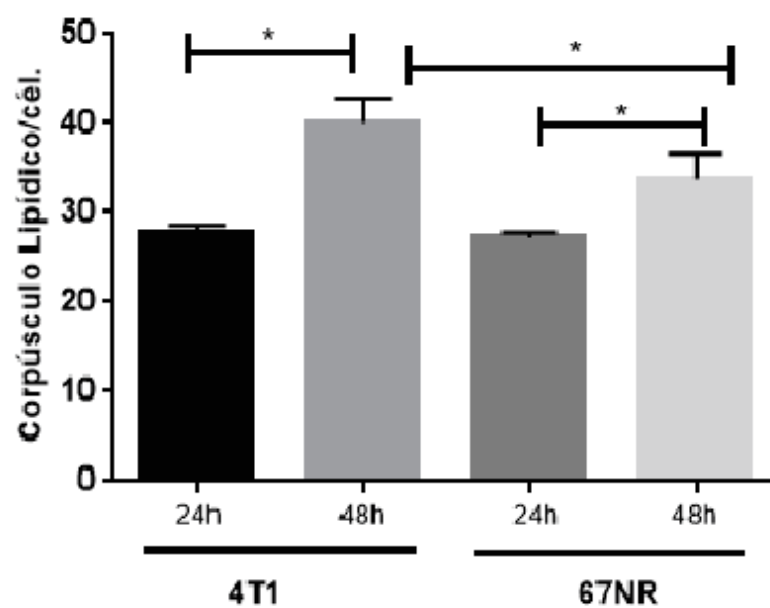


Figura 8: Formação de Corpúsculos Lipídicos nas linhagens tumorais cultivadas com 10%SFB, frente a variável tempo: 24 e 48horas. Barras representam media \pm EPM, n = 3. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) são indicadas por *. O gráfico foi obtido pelo programa Graphpad Prism 7[®] utilizando ANOVA.

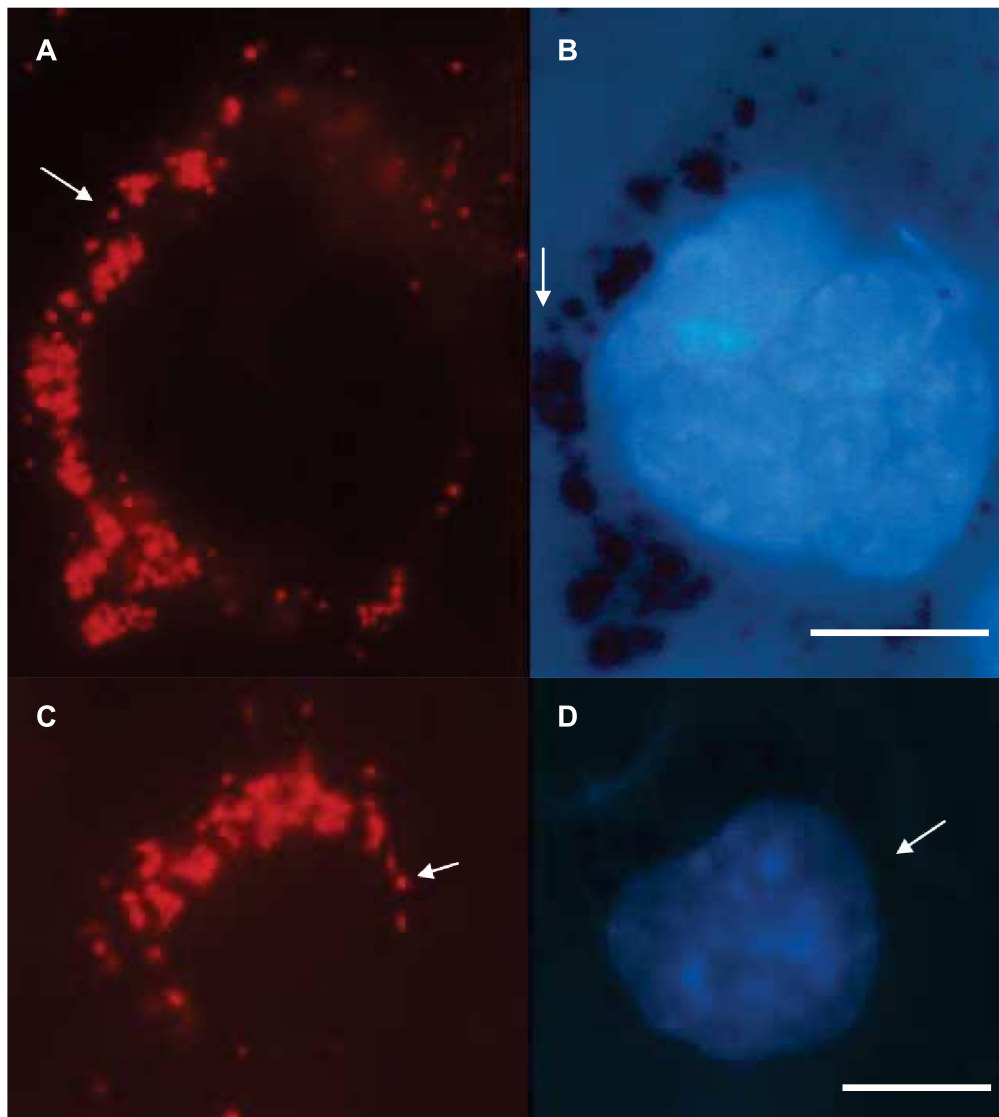


Figura 9: Corpúsculos Lipídicos nas linhagens tumorais 4T1 e 67NR em 24 horas. As letras A e B representam a linhagem 4T1; enquanto C e D referem-se a 67NR. As imagens A e C: coloração dos corpúsculos lipídicos com Oil red e B e D foram obtidas por meio da marcação com DAPI, destacando-se o núcleo celular. As imagens foram obtidas através de microscopia de fluorescência, por meio do programa PanoramicViewer. Barra = 10 μ m

4.2 PRODUÇÃO DE PGE₂ NAS LINHAGENS CELULARES TUMORAIS MAMÁRIAS

Os corpúsculos lipídicos apresentam grande quantidade de ácido araquidônico, o qual é o precursor na síntese de eicosanoides (WAN et al., 2007). Além disso, os CL's contém um aparato enzimático que direciona a produção de eicosanoides: Ciclooxygenases (COX) e lipoxigenases (LOX) (BOZZA et al, 2011).

Prostaglandinas são mediadores inflamatórios, os quais são originários da metabolização da ciclooxigenase a partir do ácido araquidônico (TILLEY, COFFMAN e KOLLER, 2001; RICCIOTTI e FITZGERALD, 2011). Algumas literaturas correlacionam o aumento da Prostaglandina E₂ com o pior prognóstico de câncer; e a partir deste pressuposto, analisamos a produção desse mediador inflamatório nas duas linhagens estudadas em 24 e 48 horas (Figura 10).

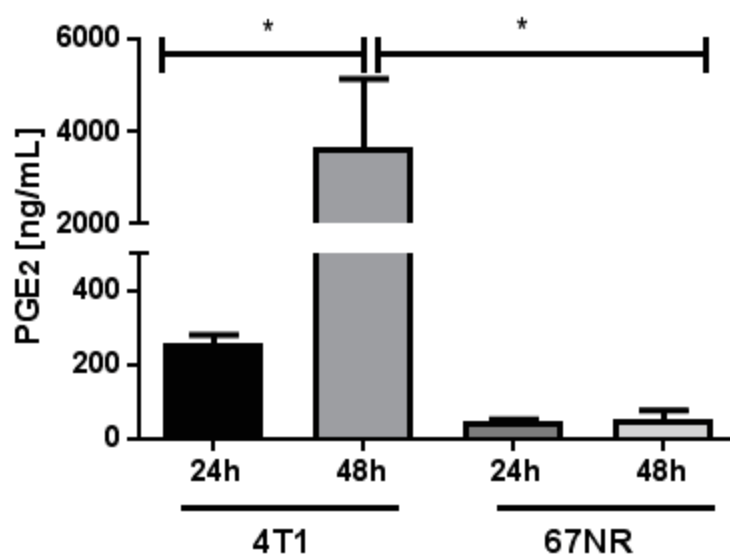


Figura 10: Produção de Prostaglandina E₂ em células das linhagens 4T1 e 67NR em 24 e 48 horas. Barras representam média ± EPM, n = 3. Diferenças significativas entre os grupos são indicadas por *, $p < 0,05$. O gráfico obtido pelo programa Graphpad Prism 7® utilizando ANOVA.

É interessante notar a partir da Figura 10, que a linhagem metastática apresentou maiores níveis de produção de PGE₂, quando comparado a linhagem não metastática (67NR) nos dois tempos analisados. Além disso, a produção desse mediador inflamatório foi dependente do tempo de cultivo na linhagem 4T1, uma vez que, no tempo de 48h houve maior síntese de prostaglandina comparado ao tempo de 24h no mesmo tipo celular.

4.3 FORMAÇÃO DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SFB

Considerando o trabalho de Mota *et al* (2014) que correlacionou a biogênese de corpúsculos lipídicos com suplementação de meio na cultura de macrófagos peritoneais, foi analisada a formação da organela em diferentes concentrações de SFB (0, 2, 4, 6, 8 e 10%), afim de compreender os mecanismos tumorigênicos correlacionados ao metabolismo lipídico, bem como sua sobrevivência. Como observado na figura 11, o aumento na formação de corpúsculos lipídicos nas duas linhagens analisadas foi proporcional ao aumento da concentração de soro, atingindo maior número em 10% de SFB, com média de aproximadamente 60 corpúsculos lipídicos por célula.

A análise da figura 11 pertinentes a diversas concentrações de SFB permitem inferir que a correlação: suplementação de soro e biogênese dos corpúsculos lipídicos são diretamente proporcionais, uma vez que, meios contendo maior concentração de SFB apresentaram maiores números desta organela. A suplementação consiste no fornecimento de nutrientes que são requeridos pelas células para sua sobrevivência e desenvolvimento (ALVES e GUIMARÃES, 2010), e estes fatores adicionais consentem na formação de novos corpúsculos lipídicos, sendo perceptível na quantificação das mesmas sob a variável imposta: concentração.

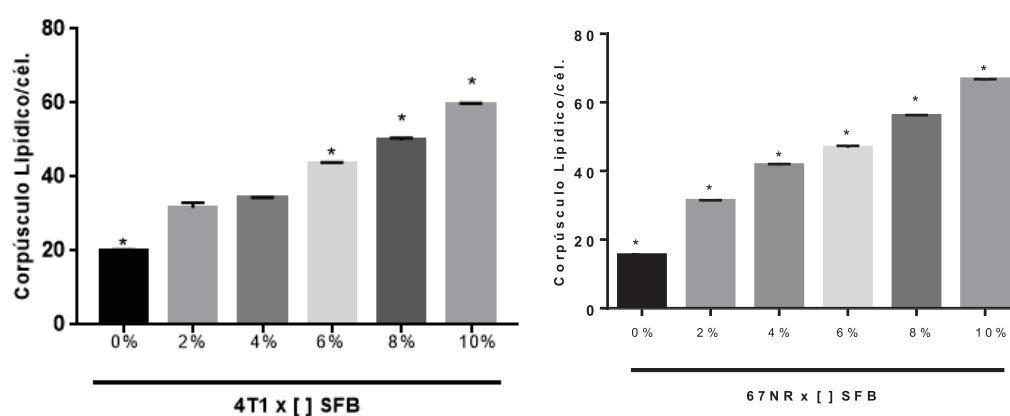


Figura 11: Formação de Corpúsculos Lipídicos em células das linhagens 4T1 e 67NR após 24h de cultura com diferentes concentrações de SFB (0 a 10%). Barras representam média \pm EPM, $n = 3$. Diferenças significativas entre os grupos são indicadas por *, $p < 0,05$. O gráfico obtido pelo programa Graphpad Prism 7® utilizando ANOVA.

Depois de quantificar os corpúsculos lipídicos, como descrito acima, avaliamos a viabilidade celular frente a variação na concentração de SFB pelo método de Azul de Tripán, que cora as células que apresentam perda da integridade de membrana característico de células em morte celular por necrose. Observou-se nos dois primeiros estímulos (0% e 2% de SFB) quase ausência de células viáveis, apresentando elevado número de células lisadas (Figura 12). Nas demais concentrações, notou-se um crescente aumento na viabilidade, alcançando sua totalidade com 10% SFB.

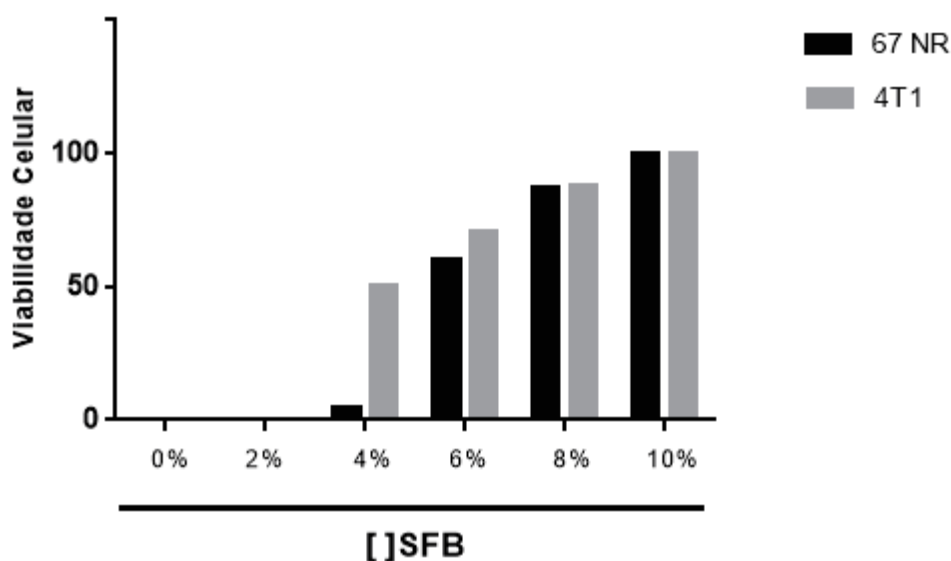


Figura 12: Viabilidade celular das linhagens tumorais mamárias 4T1 e 67 NR após 24h de cultura com diferentes concentrações de SFB (0 a 10%). Barras representam de células viáveis, gráfico representativo de 5 experimentos independentes. O gráfico obtido pelo programa Graphpad Prism 7®

4.4 QUANTIFICAÇÃO DE ADIPONECTINA E LEPTINA NAS CÉLULAS TUMORAIS 4T1 E 67NR APÓS 24h DE CULTIVO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SORO

As adipocinas são hormônios secretados pelos adipócitos, que desencadeiam enfermidades quando expressas em quantidades anormais (WOLF et al, 2006; KRECHLER et al, 2010; DUTTA et al, 2012). As leptinas e adiponectinas desempenham funções importantes no prognóstico ao câncer, as quais promovem crescimento celular por meio da inibição de apoptose (supressão do gene p53, inibição do Fas), e permitindo a migração celular

(WOLF et al, 2006; DUTTA et al, 2012). Sendo assim, investigamos a produção de adipocinas pelas células 4T1 e 67NR após 24h e 48h.

Como demonstrado na figura 13, a produção de adiponectina nas duas linhagens foi semelhante no tempo de 24h, no entanto, com 48h de cultura as células 4T1 apresentaram maior produção de adiponectina comparado com as células 67NR. Também foram dosadas as concentrações de adiponectina nas células cultivadas com diferentes concentrações de soro nos grupos com viabilidade acima de 60%. Nossos dados demonstraram que não houve produção de adiponectina nas células 4T1 e 67NR quando as células foram cultivadas com 6 ou 8% de SFB (dados não demonstrados).

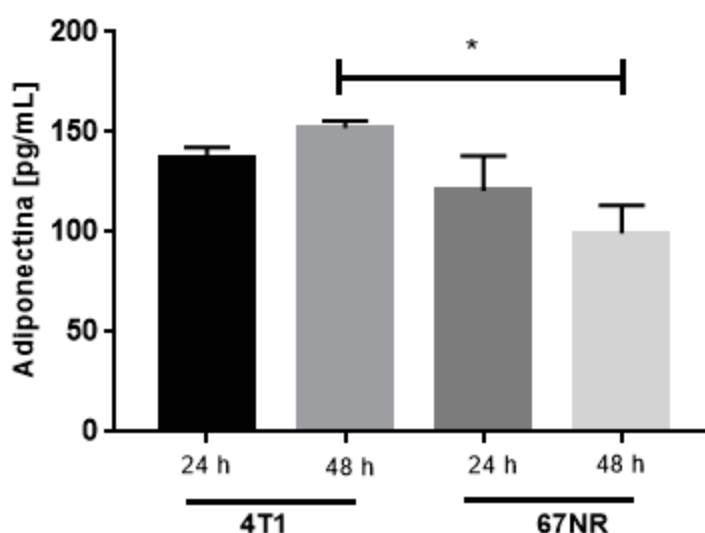


Figura 13: Quantificação de Adiponectina nos sobrenadantes das linhagens tumorais mamárias 4T1 e 67NR em dois intervalos de tempo: 24 e 48 horas. Barras representam média \pm EPM, $n \geq 3$. O símbolo (*) representa diferença significativa entre os grupos, apresentando $p < 0,05$. O gráfico foi obtido pelo programa Graphpad Prism 7® utilizando ANOVA.

Concomitantemente, realizamos também a dosagem de leptina produzida pelas células. Observamos que os níveis dosados de leptina foram cerca de 10x maior quando comparado aos da adiponectina. No tempo de 48h, na linhagem 4T1, notamos um aumento de leptina comparado ao tempo de 24h, enquanto que na linhagem de 67NR houve uma diminuição no tempo de 48h em comparação com a linhagem 4T1 no mesmo tempo (Figura 14). Simultaneamente, analisamos a produção de leptina em diversas concentrações de soro nas duas linhagens estudadas. Nossos resultados

demonstraram que houve aumento significativo na produção de leptina com aumento da concentração de soro de 6% para 10%. Porém as células 67NR apresentaram menor produção desta adipocina em todas as concentrações de soro analisadas, quando comparadas a linhagem metastática e não houve diferença na produção de leptina nas três concentrações de SFB utilizadas nas células 67NR (Figura 15).

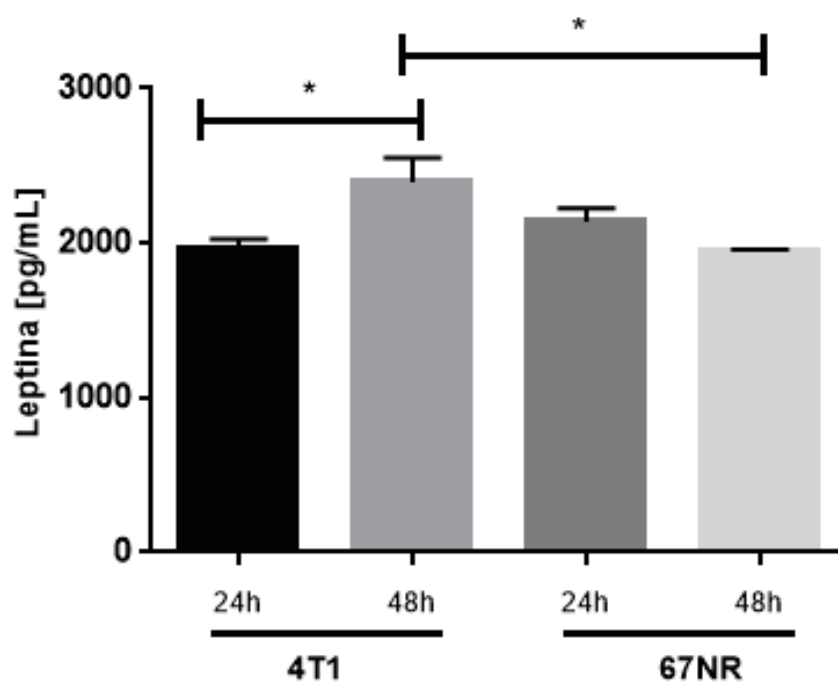


Figura 14: Quantificação de Leptina nas linhagens tumorais mamárias 4T1 e 67NR em dois intervalos de tempo: 24 e 48 horas. Barras representam média \pm EPM, $n \geq 3$. O símbolo (*) representa diferença significativa entre os grupos, apresentando $p < 0,05$. O gráfico foi obtido pelo programa Graphpad Prism 7® utilizando ANOVA.

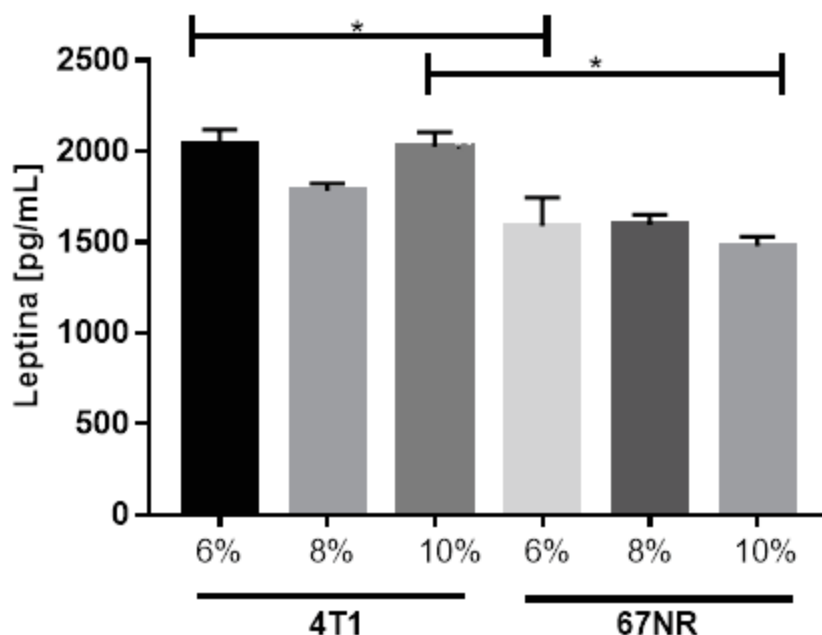


Figura 15: Quantificação de Leptina nas linhagens tumorais mamárias 4T1 e 67NR em diferentes concentrações de SFB. Barras representam média \pm EPM, $n \geq 3$. O símbolo (*) representa diferença significativa entre os grupos, apresentando $p < 0,05$. O gráfico foi obtido pelo programa Graphpad Prism 7® utilizando ANOVA.

4.5 PAPEL DA VIA mTOR na FORMAÇÃO DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS NAS LINHAGENS TUMORAIS

A via mTOR é caracterizada por estar envolvida em processos que visem homeostasia; tais processos incluem: regulação do crescimento celular e proliferação; fatores de crescimento; sobrevivência, dentre outros (LEE, INOKI e GUAN, 2007; ZAROGOULIDIS et al, 2014; CARGNELLO, TCHERKEZIAN e ROUX, 2015). De acordo com Laplante e Sabatini (2012), a via mTOR está envolvida na regulação de diversos mecanismos celulares, implicando no aumento de patologias, como por exemplo, obesidade e câncer. Alguns estudos consideram que a utilização da rapamicina, um inibidor da via mTOR pode ser uma resposta anti-tumoral efetiva (GUERTIN e SABATINI, 2005, CARGNELLO, TCHERKEZIAN e ROUX, 2015). Com base na atuação da rapamicina como inibidor da via mTOR, procuramos avaliar se a formação de

corpúsculos lipídicos poderia ser modulada nas linhagens tumorais mamárias: 4T1 e 67NR inibindo essa via de ativação (Figuras 16 e 17).

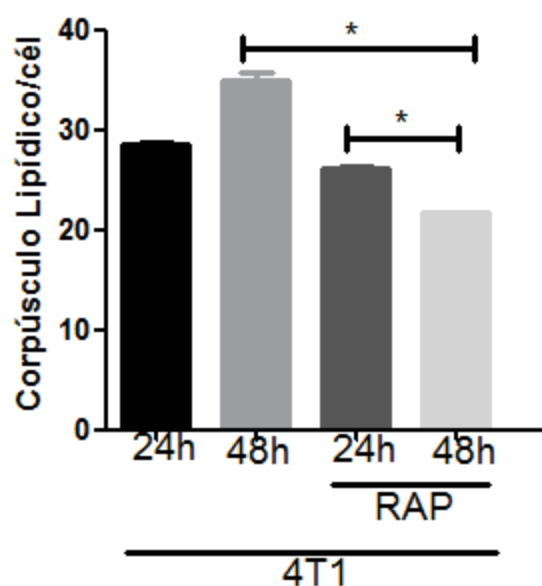


Figura 16: Formação de corpúsculos lipídicos na linhagem tumoral mamária 4T1 estimulada ou não com rapamicina. Barras representam media \pm EPM, $n \geq 3$. O símbolo (*) representa diferença significativa entre os grupos, apresentando $p < 0,05$. O gráfico foi obtido pelo programa Graphpad Prism 7® utilizando ANOVA.

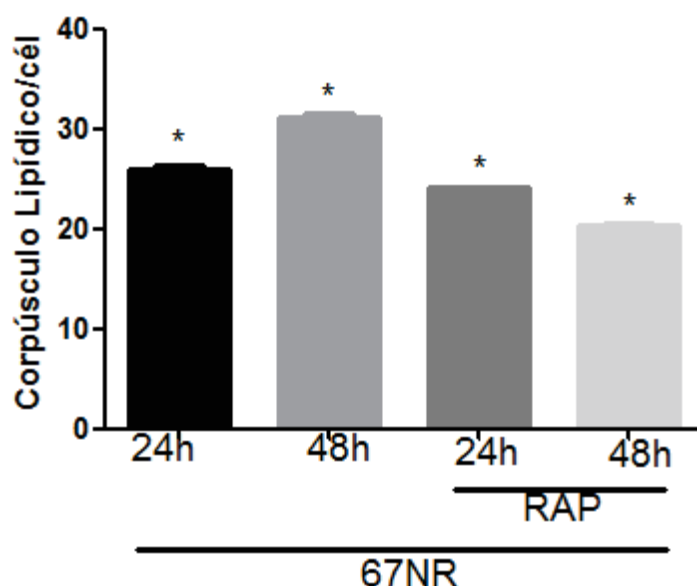


Figura 17: Formação de corpúsculos lipídicos na linhagem tumoral mamária 67NR pré-tratada ou não com rapamicina. Barras representam media \pm EPM, $n \geq 3$. O símbolo (*) representa diferença significativa entre os grupos, apresentando $p < 0,05$. O gráfico foi obtido pelo programa Graphpad Prism 7® utilizando ANOVA.

Concomitantemente com os resultados preliminares aqui demonstrados, podemos observar nas figuras 16 e 17, nas linhagens não tratadas com rapamicina que, ambas apresentaram elevada formação de corpúsculos lipídicos. Após o pré-tratamento com rapamicina, observou-se uma redução na formação de CL's, em ambas as linhagens nos dois tempos analisados.

4.6 SÍNTESE DE PROSTAGLANDINA E₂ NAS LINHAGENS TUMORAIS VIA ESTIMULAÇÃO DO INIBIDOR DA VIA mTOR: RAPAMICINA

Tendo em vista que o dado anterior apontou para a restrição da formação de CL's, procuramos avaliar posteriormente, o efeito da inibição de mTOR na síntese do mediador inflamatório PGE₂ nas duas linhagens tumorais: 4T1 e 67NR(Figuras 18 e 19).

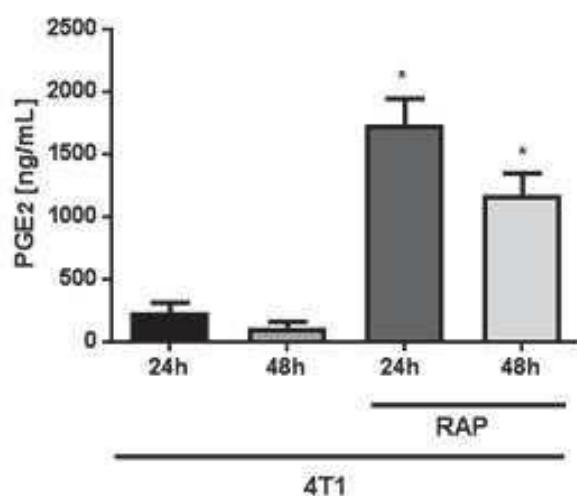


Figura 18: Produção de Prostaglandina E₂ na linhagem 4T1 em 24 e 48 horas, pré-tratada ou não com rapamicina. Barras representam média ± EPM, n ≥ 3. O símbolo (*) representa diferença significativa entre os grupos, apresentando p < 0,05. O gráfico foi obtido pelo programa Graphpad Prism 7® utilizando ANOVA.

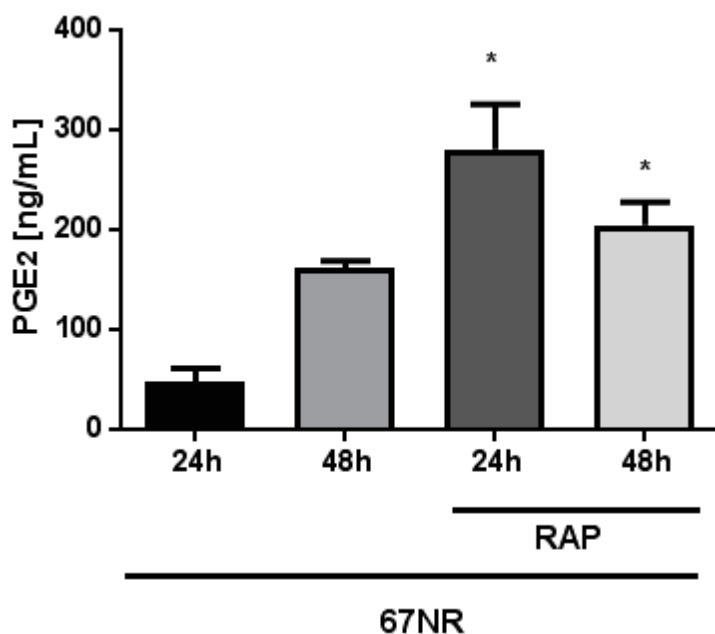


Figura 19: Produção de Prostaglandina E2 na linhagem 67NR em 24 e 48 horas, pré-tratada ou não com rapamicina. Barras representam media \pm EPM, $n \geq 3$. O símbolo (*) representa diferença significativa entre os grupos, apresentando $p < 0,05$. O gráfico foi obtido pelo programa Graphpad Prism 7® utilizando ANOVA

Interessante notar nas figuras 17 e 18, que ambas as linhagens tumorais mamárias, apresentaram maior produção de prostaglandina E₂ nos grupos tratados com rapamicina, quando comparado aos grupos não tratados. Sugerindo que nestas linhagens estudadas a inibição de mTOR induziu um aumento na produção de PGE₂, mesmo inibindo a formação de CL.

4.7 PAPEL DE mTOR na PRODUÇÃO DE TGF- β NAS LINHAGENS TUMORAIS

O TGF- β é uma citocina anti-inflamatória que permite a progressão, invasão e metástase tumoral (MASSAGUÉ, 2005; LIN e KARIN, 2007;

LEBRUN, 2012). Tendo em vista que esta citocina pode direcionar a sobrevivência do tumor, analisamos por ELISA a quantificação do TGF- β nas linhagens 4T1 e 67NR (Figuras 20 e 21).

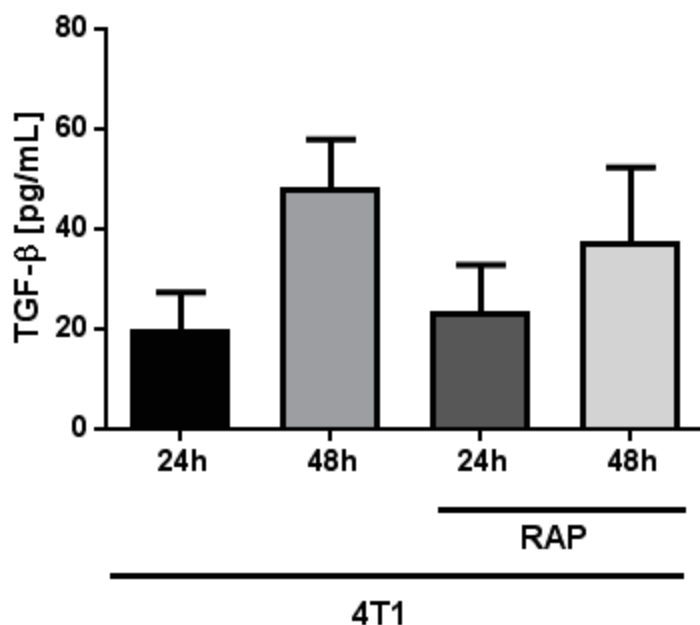


Figura 20: Produção de TGF- β na linhagem 4T1 em 24 e 48 horas, pré-tratada ou não com rapamicina. Barras representam media \pm EPM, $n \geq 3$. O símbolo (*) representa diferença significativa entre os grupos, apresentando $p < 0,05$. O gráfico foi obtido pelo programa Graphpad Prism 7® utilizando ANOVA.

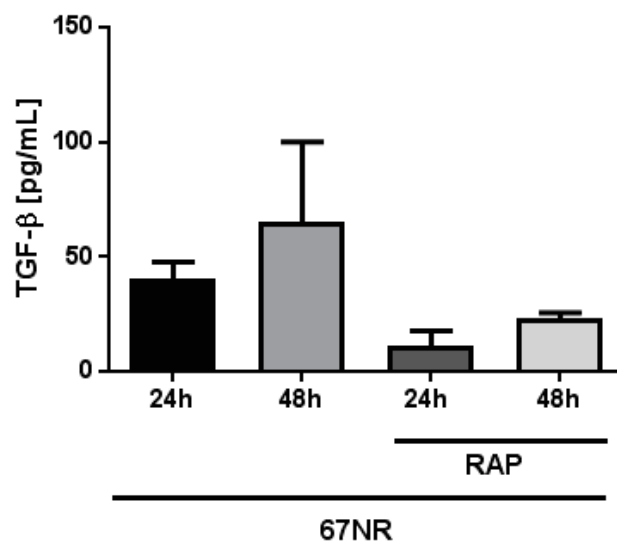


Figura 21: Produção de TGF- β na linhagem 67NR em 24 e 48 horas, pré-tratada ou não com rapamicina. Barras representam media \pm EPM, $n \geq 3$. O símbolo (*) representa diferença significativa entre os grupos, apresentando $p < 0,05$. O gráfico foi obtido pelo programa Graphpad Prism 7® utilizando ANOVA.

Nas 2 linhagens analisadas houve uma tendência ao aumento da concentração de TGF- β com o aumento do tempo de cultura, assim com observado para corpúsculos lipídicos. Além disso, observou-se uma tendência a redução nos níveis da citocina anti-inflamatória quando as linhagens tumorais foram pré-tratadas com o inibidor da via mTOR (rapamicina) nos dois tempos analisados.

4.8 PRODUÇÃO DE TNF- α NAS LINHAGENS TUMORAIS VIA PRÉ-TRATAMENTO COM O INIBIDOR DA VIA mTOR: RAPAMICINA

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória, possui uma dualidade funcional na patologia: atividade antitumoral, ele atua na apoptose celular, participa do processo inflamatório, recrutando neutrófilos (MACCALLI et al, 2009). Em contrapartida, o favorecimento do tumor pelo TNF- α é bem estabelecido promoção da sobrevivência das células neoplásicas, exemplificados pela angiogênese e metástase (LIN e KARIN, 2007; KHANDEKAR, COHEN e SPIEGELMAN, 2011). A partir do pressuposto, foram analisados os níveis de produção desta citocina pró-inflamatória nas linhagens tumorais mamárias (Figuras 22 e 23).

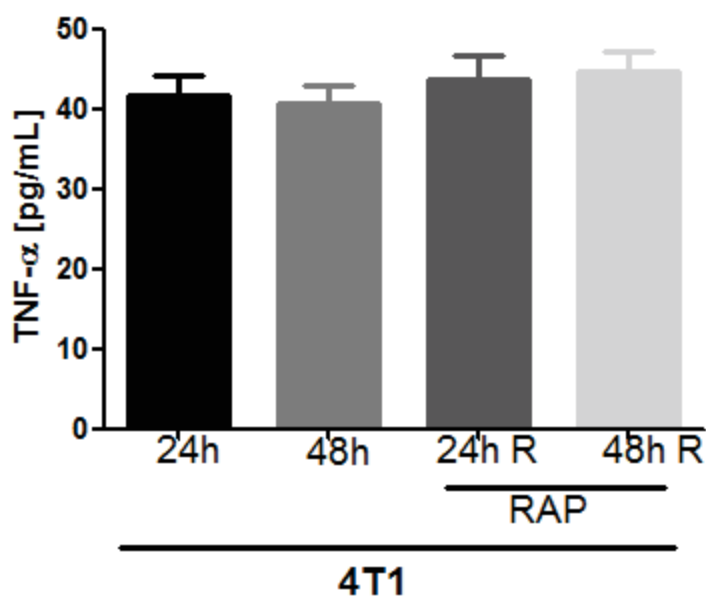


Figura 22: Produção de TNF- α na linhagem 4T1 em 24 e 48 horas, pré-tratada ou não com rapamicina. Barras representam media \pm EPM, $n \geq 3$. O símbolo (*) representa diferença significativa entre os grupos, apresentando $p < 0,05$. O gráfico foi obtido pelo programa Graphpad Prism 7[®] utilizando ANOVA.

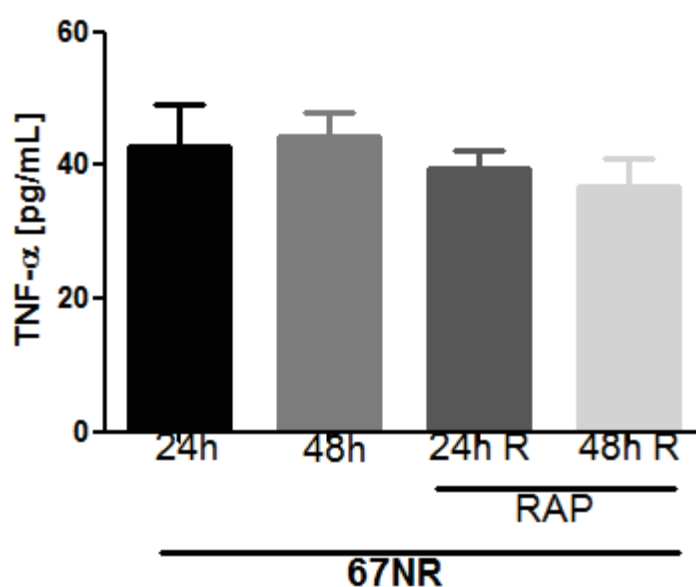


Figura 23: Produção de TNF- α na linhagem 67NR em 24 e 48 horas, pré-tratadas ou não com rapamicina. Barras representam media \pm EPM, $n \geq 3$. O símbolo (*) representa diferença significativa entre os grupos, apresentando $p < 0,05$. O gráfico foi obtido pelo programa Graphpad Prism 7[®] utilizando ANOVA.

Com relação aos níveis de produção da citocina TNF- α nas linhagens tumorais mamárias estudadas, observamos nas Figuras 22 e 23 que,

ambas apresentaram níveis proximais da síntese de fator de necrose tumoral- α nos dois tempos analisados. Além disso, o tratamento com rapamicina não modificou a produção de TNF- α nas duas linhagens

4.9 VIABILIDADE CELULAR NAS LINHAGENS TUMORAIS VIA ESTIMULAÇÃO DO INIBIDOR DA VIA mTOR: RAPAMICINA

Em estudos preliminares, apontamos que a viabilidade celular é dependente da suplementação de Soro Fetal Bovino no meio suplementado. De forma interessante, a formação de corpúsculos lipídicos foi proporcional a concentração de SFB, conforme trabalhos de Mota *et al* (2014). A partir do pressuposto, analisamos a viabilidade celular nas linhagens 4T1 e 67NR pré-tratadas com rapamicina (Figuras 24 e 25).

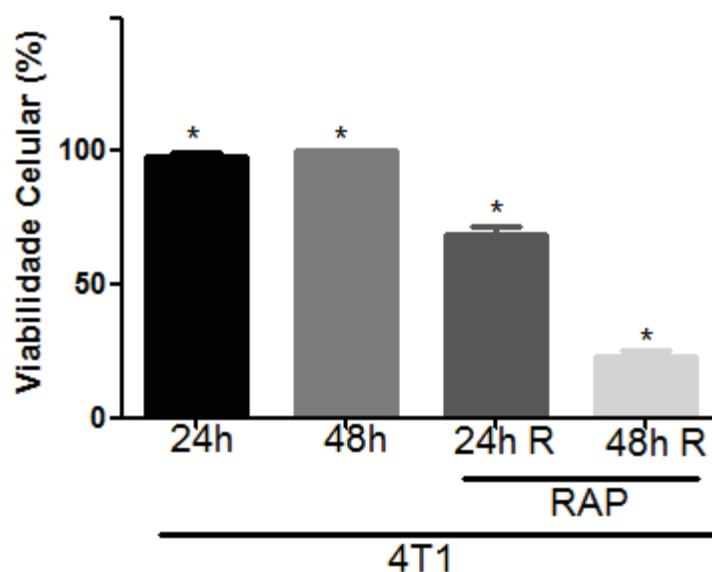


Figura 24: Viabilidade Celular na linhagem 4T1 obtida por Azul de Tripán e, pré-tratada com rapamicina. Barras representam média \pm EPM, $n \geq 3$. O símbolo (*) representa diferença significativa entre os grupos, apresentando $p < 0,05$. O gráfico foi obtido pelo programa Graphpad Prism 7[®] utilizando ANOVA.

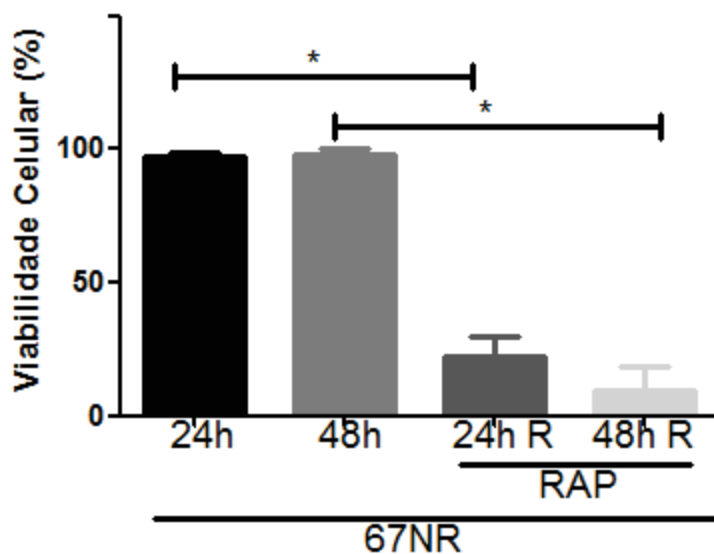


Figura 25: Viabilidade Celular na linhagem 67NR obtida por Azul de Tripan e, pré-tratada com rapamicina. Barras representam media \pm EPM, $n \geq 3$. O símbolo (*) representa diferença significativa entre os grupos, apresentando $p < 0,05$. O gráfico foi obtido pelo programa Graphpad Prism 7® utilizando ANOVA.

Com base nas análises de viabilidade celular pode-se relatar a notável redução em ambas as linhagens, quando tratadas com rapamicina. Outro fator a ser destacado é que a linhagem não metastática (67NR) apresentou uma redução mais acentuada na viabilidade celular, quando comparada a célula 4T1.

4.10 FORMAÇÃO DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS EM MACRÓFAGOS ESTIMULADOS COM SOBRENADANTE DAS LINHAGENS TUMORAIS E TRATADOS COM RAPAMICINA

Sabe-se que os macrófagos possuem uma dualidade funcional com relação ao câncer, seja pela promoção da angiogênese ou ainda, pela inflamação local (GALDIERO et al, 2013). Procuramos avaliar, posteriormente, a modulação do metabolismo lipídico em macrófagos estimulados com sobrenadante das células tumorais e/ou sucedidas de tratamento com rapamicina; visando elucidar aspectos relacionados ao cancro (Figuras 26 e 27).

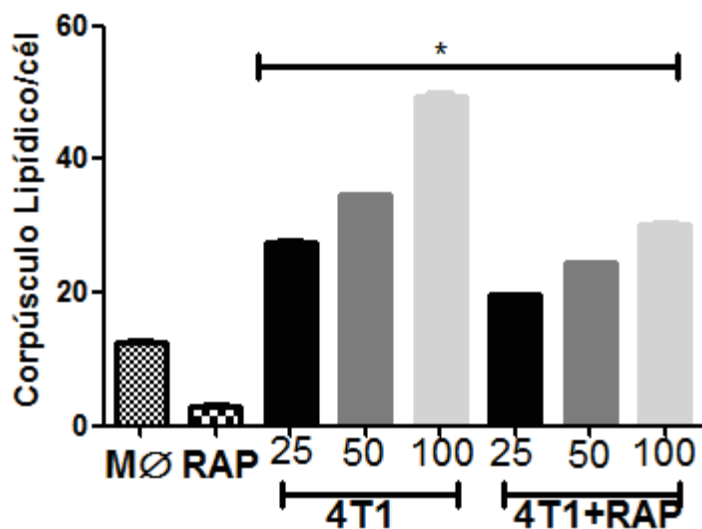


Figura 26: Formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos estimulados com o sobrenadante da linhagem 4T1, pré-tratada ou não com rapamicina. Barras representam média \pm EPM, $n \geq 3$. O símbolo (*) representa diferença significativa entre os grupos, apresentando $p < 0,05$. O gráfico foi obtido pelo programa Graphpad Prism 7® utilizando ANOVA.

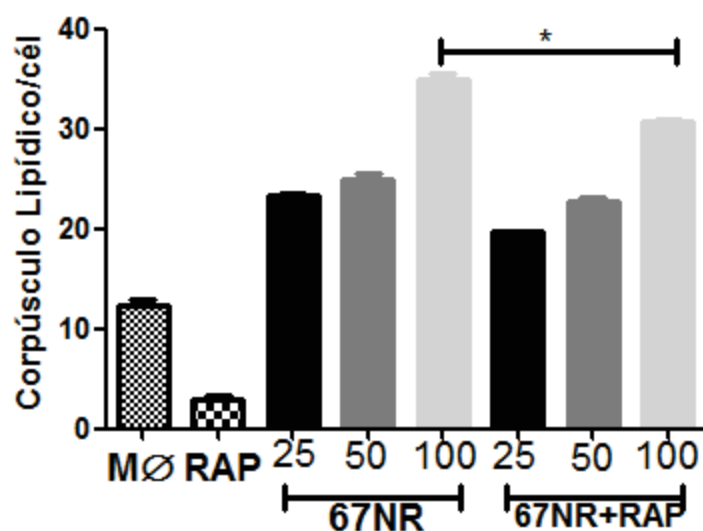


Figura 27: Formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos estimulados com o sobrenadante da linhagem 67NR, pré-tratada ou não com rapamicina. Barras representam média \pm EPM, $n \geq 3$. O símbolo (*) representa diferença significativa entre os grupos, apresentando $p < 0,05$. O gráfico foi obtido pelo programa Graphpad Prism 7® utilizando ANOVA.

O tratamento dos macrófagos peritoneais com sobrenadante das células tumorais induziu um aumento na formação de corpúsculos lipídicos proporcional ao aumento da concentração de sobrenadante utilizado.

Interessante notar na Figura 27 que, a presença da rapamicina na maior concentração da linhagem 67NR (67NR 100) inibiu parcialmente a formação dos corpúsculos lipídicos; todavia na linhagem 4T1, essa redução foi mais efetiva.

4.11 PROSTAGLANDINA E₂ EM MACRÓFAGOS ESTIMULADOS COM SOBRENADANTE DAS LINHAGENS TUMORAIS E TRATADOS COM RAPAMICINA

Com base em dados previamente citados, em que há uma correlação positiva entre formação de corpúsculos lipídicos e síntese de mediadores inflamatórios; procurou avaliar a modulação de PGE₂ em macrófagos estimulados com sobrenadante das culturas celulares tumorais, e/ou sucedido pelo tratamento com rapamicina (Figuras 28 e 29).

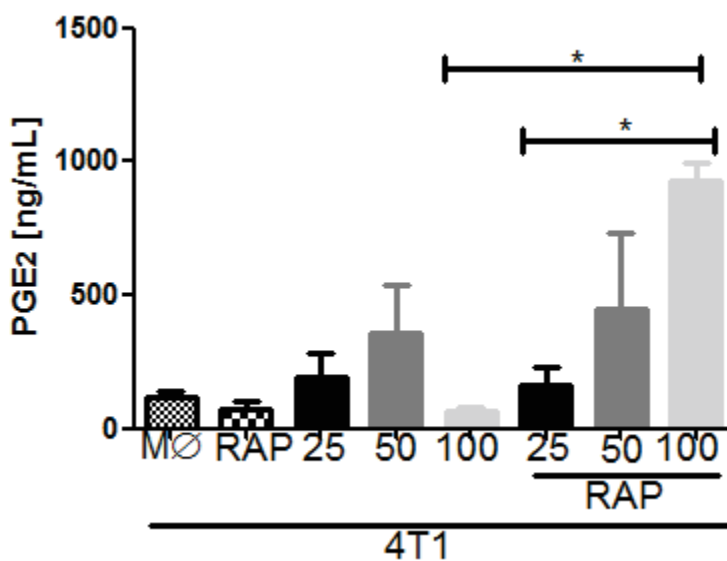


Figura 28: Produção de PGE₂ em macrófagos estimulados com o sobrenadante da linhagem 4T1, pré-tratada ou não com rapamicina. Barras representam média \pm EPM, $n \geq 3$. O símbolo (*) representa diferença significativa entre os grupos, apresentando $p < 0,05$. O gráfico foi obtido pelo programa Graphpad Prism 7® utilizando ANOVA.

Em macrófagos estimulados com o sobrenadante de ambos os tipos celulares foi possível observar um discreto aumento na produção de PGE₂ pelas células conforme aumentava a concentração de sobrenadante utilizado. No entanto, novamente de forma surpreendente, o tratamento com rapamicina

aumentou os níveis de PGE₂ produzidos pelos macrófagos tratados com sobrenadante de 4T1.

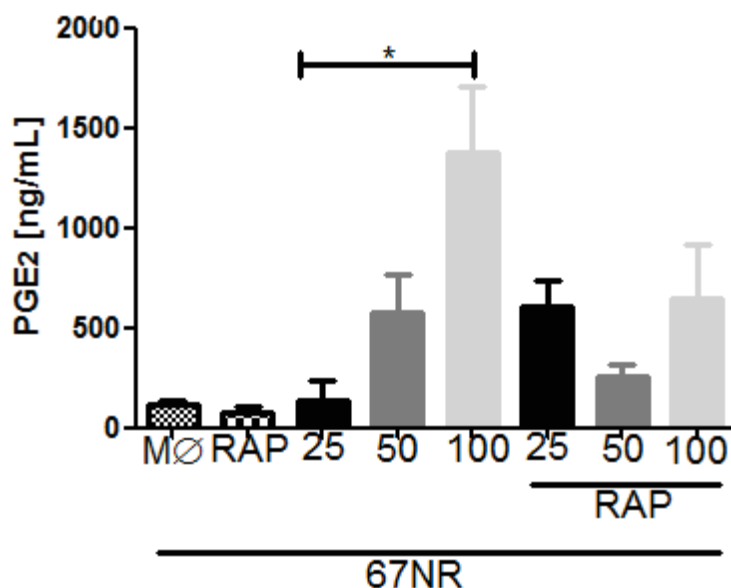


Figura 29: Produção de PGE₂ em macrófagos estimulados com o sobrenadante da linhagem 67NR, pré-tratada ou não com rapamicina. Barras representam média \pm EPM, $n \geq 3$. O símbolo (*) representa diferença significativa entre os grupos, apresentando $p < 0,05$. O gráfico foi obtido pelo programa Graphpad Prism 7® utilizando ANOVA.

De forma interessante podemos analisar na Figura 29 que, há modulação lipídica na maior concentração de sobrenadante celular, e o tratamento da rapamicina reduziu os níveis do mediador inflamatório analisado. Uma possível explicação para tal fato quando comparado a Figura 28, se deve a alta capacidade invasiva da linhagem 4T1, que culmina rapidamente metástase em murinos (ATCC, 2016).

4.12 PRODUÇÃO DE LEPTINA EM MACRÓFAGOS ESTIMULADOS COM SOBRENADANTE DAS LINHAGENS TUMORAIS

Fazolini e cols (2015) demonstraram que os níveis de leptina estavam associados a biogênese de corpúsculos lipídicos, bem como a síntese de mediadores inflamatórios. De forma interessante, Dutta et al (2012) retratou que elevadas quantificações desta adipocina, demonstram um pior prognóstico de Câncer de Mama.

Para mais, buscamos analisar os níveis de leptina em macrófagos estimulados com sobrenadante da célula tumoral, visando elucidar mecanismos envolvidos na patologia neoplásica e não função efetora macrofágica (Figuras 30 e 31).

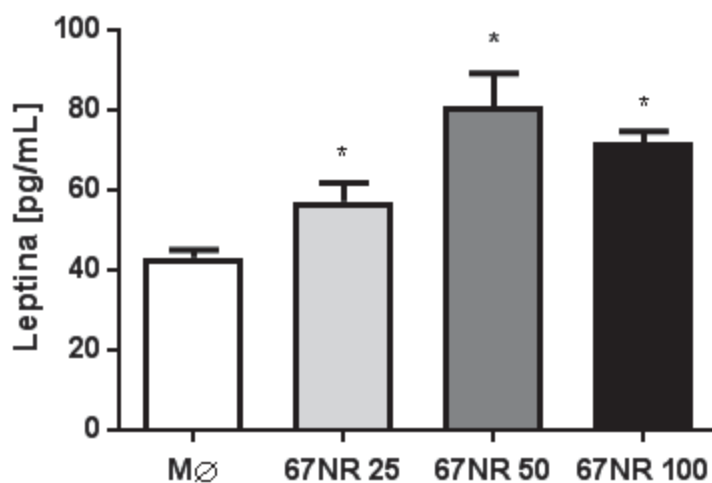


Figura 30: Produção de Leptina em macrófagos estimulados com o sobrenadante da linhagem 67NR. Barras representam média \pm EPM, $n \geq 3$. O símbolo (*) representa diferença significativa entre os grupos, apresentando $p < 0,05$. O gráfico foi obtido pelo programa Graphpad Prism 7® utilizando ANOVA.

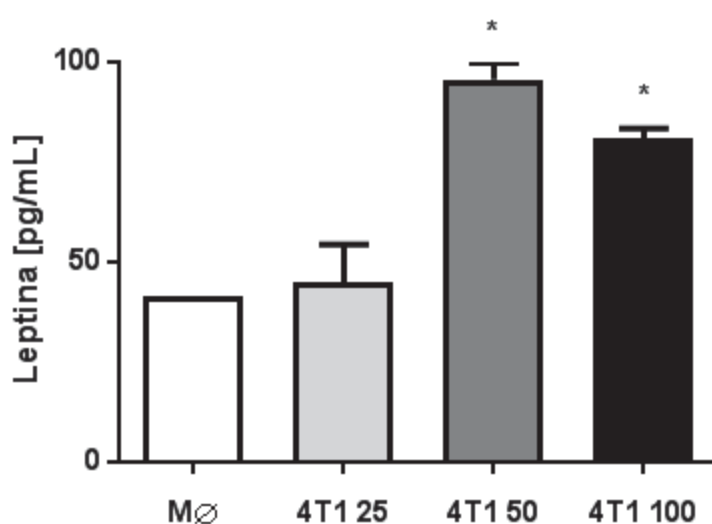


Figura 31: Produção de Leptina em macrófagos estimulados com o sobrenadante da linhagem 4T1. Barras representam média \pm EPM, $n \geq 3$. O símbolo (*) representa diferença significativa entre os grupos, apresentando $p < 0,05$. O gráfico foi obtido pelo programa Graphpad Prism 7® utilizando ANOVA.

De forma intrigante podemos observar que os macrófagos estimulados com sobrenadante as células tumorais apresentaram elevados níveis de leptina em ambos os grupos. No entanto, tanto em 4T1, quanto em 67NR, o pico de produção de leptina foi à concentração intermediária de sobrenadante.

Em suma, esses dados apontam que os macrófagos estimulados com sobrenadante, apresentam elevados níveis de leptina, podem acarretar na promoção e progressão do câncer pela atuação do metabolismo lipídico.

4.13 PRODUÇÃO DE TGF- β EM MACRÓFAGOS ESTIMULADOS COM SOBRENADANTE DAS LINHAGENS TUMORAIS E TRATADOS COM RAPAMICINA

TGF- β está correlacionado à inibição da proliferação dos componentes da resposta imunológica e da função efetora de linfócitos e macrófagos; com relação à resposta antitumoral, promovendo a sobrevivência do câncer (FLAVELL et al, 2010). Por meio dessa alteração efetora de macrófagos, procuramos analisar os níveis desta citocina, para posterior elucidação do processo do cancro mamário (Figuras 32 e 33).

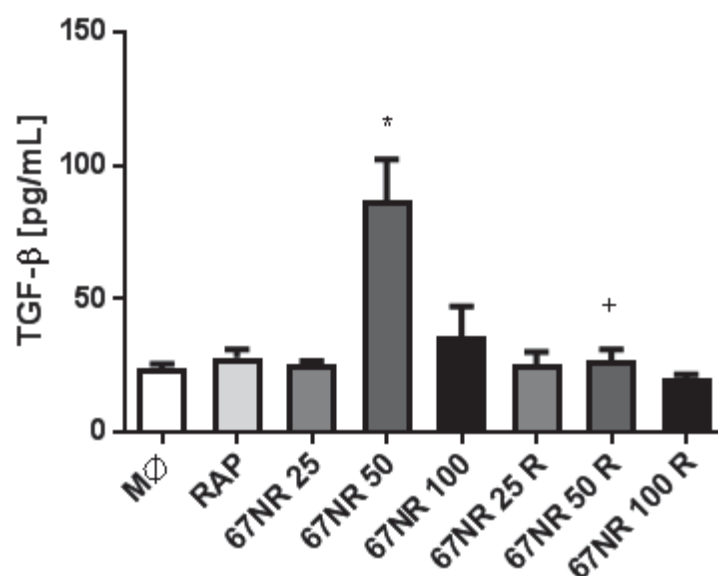


Figura 32: Produção de TGF- β em macrófagos estimulados com o sobrenadante da linhagem 67NR e pré-tratados com rapamicina. Barras representam media \pm EPM, $n \geq 3$. O símbolo (*) representa diferença significativa entre os grupos, apresentando $p < 0,05$. O gráfico foi obtido pelo programa Graphpad Prism 7[®] utilizando ANOVA.

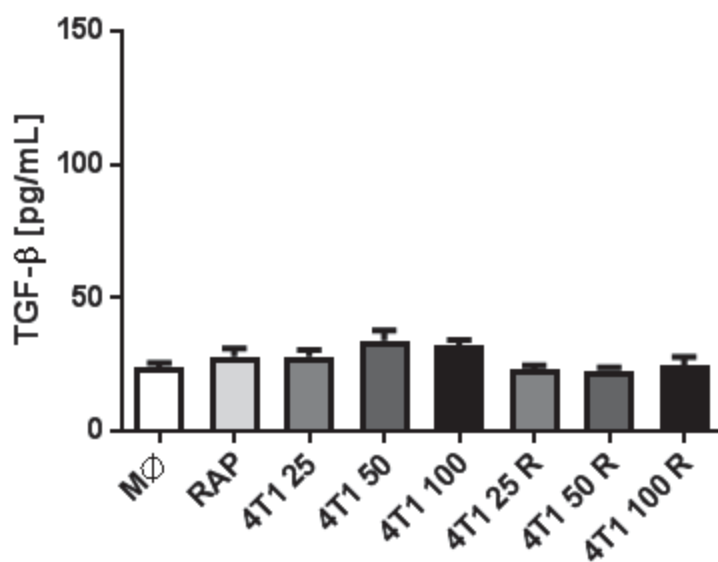


Figura 33: Produção de TGF- β em macrófagos estimulados com o sobrenadante da linhagem 4T1 e pré-tratados com rapamicina. Barras representam media \pm EPM, $n \geq 3$. O símbolo (*) representa diferença significativa entre os grupos, apresentando $p < 0,05$. O gráfico foi obtido pelo programa Graphpad Prism 7[®] utilizando ANOVA.

Interessante notar nas figuras 32 e 33 que, os níveis da citocina TGF- β permaneceram constantes em todos os grupos analisados; excetuando-se 67NR 50 (Figura 32). Assim como na leptina, a dose de 50% de sobrenadante de 67NR foi a mais efetiva para induzir a produção de TGF- β , e a rapamicina inibiu essa indução. No entanto, os mesmos resultados não foram observados em 4T1. Com base nestes dados podemos sugerir que, a rapamicina inibe a citocina anti-inflamatória em macrófagos estimulados com 67NR, que por sua vez, não desempenha sua função imunossupressora em neoplasias (IGNEY e KRAMMER, 2002; FLAVELL et al, 2010).

5 DISCUSSÃO

As neoplasias apresentam-se como a segunda causa de mortalidade na população (MA e YU, 2006). A neoplasia mamária é a mais frequente na população feminina, e apresenta heterogeneidade quanto a origem patológica (BERTUCCI e BIRNBAUM, 2008; POLYAK, 2011).

É observado um fenótipo patológico comum entre as neoplasias: condições inflamatórias associadas, as quais podem ser exemplificadas pela obesidade. Correlacionado aos aspectos descritos, tem-se relatado o acúmulo de corpúsculos lipídicos, os quais atuam no metabolismo lipídico e inflamação (BOZZA e VIOLA, 2010; FAZOLINI et al, 2015).

O presente estudo objetivou caracterizar a formação de corpúsculos lipídicos, bem como analisar a síntese de mediadores inflamatórios em duas linhagens tumorais mamárias murinas, uma metastática e a outra não metastática. A utilização dessas linhagens em modelos *in vitro* é de fundamental relevância visto que, apresenta reprodutibilidade e consistência dos resultados quando comparados aos modelos *in vivo*.

Inicialmente, procurando analisar os aspectos referentes a natureza das linhagens tumorais mamárias murinas, pode-se observar um expressivo aumento na formação de corpúsculos lipídicos em ambas estirpes estudadas: 67NR e 4T1. O aumento na formação dos CL's foi dependente do tempo de estimulação, este aspecto é visto tanto em modelos *in vivo* quanto *in vitro*; estando condizente com os trabalhos de Pol et al (2004); e Martin e Parton (2006). De forma interessante, Maciel e cols (2015) demonstraram o aumento na formação dessas organelas: em modelos *in vivo* do carcinoma mamário, havendo uma potencialização em indivíduos obesos estimulados com 4T1; em contrapartida, em modelos *in vitro*, a co-estimulação com BCG ou *T. cruzi* potenciaram a formação de CL's induzida pelo câncer de mama murino.

Concomitantemente com o modelo de neoplasia mamária, estudos em cancro intestinal demonstraram o incremento na formação de corpúsculos lipídicos. Accioly e cols (2008) comprovaram que secções intestinais normais apresentaram menor formação de CL's quando comparado a histologia tumoral intestinal; além disso, observou em modelos *in vitro* que, a CACO-2 a síntese de CL foi superior quando relacionado às células IEC-6.

Em suma, este fato corrobora com trabalhos anteriores que demonstraram que a organela modula o metabolismo lipídico da célula permitindo a lipogênese, fenótipo frequente encontrado nas neoplasias (ACCIOLY et al, 2008; BOZZA e VIOLA, 2010; FAZOLINI et al, 2015).

A análise da formação dos corpúsculos lipídicos nas linhagens tumorais mamárias murinas ocorreu também, pela variabilidade nas concentrações de Soro Fetal Bovino (SFB). É interessante destacar que o SFB consta de fatores nutricionais e macromoleculares essenciais para o crescimento celular, os quais destacam-se: albumina, aminoácido, hormônio e lipídeos (ALVES e GUIMARÃES, 2010; MONCLARO, 2016). Em concomitância com o trabalho de Mota *et al* (2014) que correlacionou a biogênese de corpúsculos lipídicos com a suplementação de meio na cultura de macrófagos peritoneais, o presente estudo averiguou que o aumento na formação de CL's nas linhagens tumorais analisadas foi proporcional ao aumento da concentração de soro, atingindo maior número em 10% de SFB. De forma interessante, a cultura de macrófagos peritoneais em meio contendo SFB a 10% também induzi maior formação de corpúsculos lipídicos em comparação com macrófagos cultivados a 2% SFB (D'Ávila, Almeida e Rodrigues em comunicação pessoal). Por esse motivo, os

referidos autores utilizam em macrófagos 2% de SFB para diminuir o efeito deste na formação de CL quando as células são estimuladas com BCG, *T. cruzi*, etc. No entanto, a formação da organela apresentou valores absolutos bem menores dos que os apresentados nas linhagens 4T1 e 67NR, sugerindo portanto, a invasividade da neoplasia pode ser dependente do metabolismo lipídico e influenciada por componentes do SFB.

De forma interessante, o presente trabalho analisou a viabilidade das células tumorais mamárias murinas nas diferentes concentrações de soro analisadas. Observou que a maior viabilidade das linhagens tumorais mamárias consistia com a maior suplementação de SFB no meio; logo, a adição de soro está diretamente relacionado viabilidade e produtividade celular nas linhagens analisadas. Importante ressaltar que, os níveis de soro fetal bovino apresentam elevados níveis de fatores de crescimento e baixos níveis de imunoglobulinas (BIAGGIO, 2014). Esses dados então permitem sugerir que, em condições *in vivo*, a partir do conhecimento sobre a relação inversa entre imunoglobulinas e fatores de crescimento; que os corpúsculos lipídicos podem então se apresentar como marcadores de mau prognóstico, assim como observado por Mitra, Goodman e Le (2014). Uma vez que, em presença de fatores de crescimento, as células tumorais podem apresentar maior formação destas organelas e maior viabilidade.

A inflamação consiste em processos regulares em algumas patologias, como a obesidade e câncer. É compreendido que durante o desencadeamento dessa resposta, há a participação de mediadores inflamatórios os quais, recrutam células da resposta imune ao ambiente, assim como, permite a sinalização de citocinas (TILLEY, COFFMAN e KELLER, 2001; NAOKI e NARUMIYA, 2012). A prostaglandina é um mediador inflamatório que provêm do ácido araquidônico a partir da atuação da ciclooxigenase. Trabalhos vem elucidando a importância do metabolismo do AA para a carcinogênese. Accioly e cols (2008), estudando neoplasia intestinal, observou um aumento da expressão da COX₂, bem como a produção de PGE₂. Os nossos resultados apresentaram o mesmo perfil quando comparado aos estudos em cancros intestinais (Accioly e cols (2008) e Fazolini e cols (2015)).

De modo interessante, pode-se notar a produção elevada de Prostaglandina E₂ na linhagem tumoral mamária metastática (4T1) quando comparada a não metastática, 67NR. A partir do pressuposto, pode sugerir que, a PGE₂ pode estar relacionada a um favorecimento da metástase tumoral, visto que este mediador inflamatório atua estimulando as células tumorais, por inibir a apoptose; e conseqüentemente, favorecer fatores angiogênicos, que culminarão na invasividade e metástase (WANG e DuBOIS, 2006; GREENHOUGH et al, 2009; WANG et al, 2009; READER, HOLT e FULTON, 2011; NAKANISHI e ROSEMBERG, 2013).

Atualmente é reconhecido que o tecido adiposo não possui uma função limitada ao estoque de energia; mas também é associado a ele inúmeros processos fisiológicos (JARDÉ et al, 2009; PRADO et al, 2009; COEKHO, OLIVEIRA e FERNANDES, 2013). Com relação a neoplasia, entendimentos apontam para a contribuição do tecido adiposo no estabelecimento da doença, por contribuir na tumorigênese por meio de citocinas e adipocinas, que modulam por exemplo, a angiogênese (SILVEIRA et al, 2009; KHANDEKAR, COHEN e SPIEGELMAN, 2011). A literatura vêm abordando o papel das adipocinas: leptina e adiponectina no estabelecimento neoplásico. A partir do pressuposto, o presente estudo analisou a produção destas proteínas em modelo *in vitro* do carcinoma mamário.

É interessante destacar que os resultados apontaram que os níveis de leptina e adiponectina foram significativos na linhagem metastática quando comparado a não metastática no tempo de 48h. Outro fator a ser descrito são os níveis de leptina, que quando confrontado aos de adiponectina, apresentaram-se, aproximadamente, dez vezes maior. Com base nesses dados, pode-se sugerir que a modulação nos níveis destas adipocinas – altos níveis de leptina e baixos de adiponectina - permite o estabelecimento do cancro mamário; e está de acordo com os trabalhos de Grossmann et al (2008) e Dutta et al (2012).

Em estudos de adenocarcinoma intestinal, Fazolini et al (2015) demonstraram que a leptina modulou o metabolismo lipídico, de tal forma que incrementou a formação de corpúsculos lipídicos, bem como a síntese de mediadores inflamatórios. Nossos resultados em modelos *in vitro* de carcinoma mamário apresentaram o mesmo perfil; assim como Maciel e cols (em preparação) comprovaram o aumento dessa adipocina em animais obesos com tumor de mama.

É elucidado que a via mTOR é caracterizada por estar envolvida em processos que visem homeostasia; tais processos incluem: regulação do crescimento celular e proliferação; fatores de crescimento e sobrevivência (LEE, INOKI e GUAN, 2007; ZAROGOULIDIS et al, 2014; CARGNELLO, TCHERKEZIAN e ROUX, 2015). Em contrapartida, tratamentos com inibidores da via mTOR: rapamicina - inibe a proliferação celular em diversos tipos celulares e em alguns casos, ocasiona a apoptose (EASTON e HOUGHTON, 2006).

No presente estudo, observou-se que o tratamento com o inibidor da via mTOR, modulou o metabolismo lipídico. A rapamicina foi capaz de reduzir a formação de corpúsculos lipídicos nas linhagens tumorais mamárias: metastática (4T1) e não metastática (67NR); estando de acordo com o trabalho de Fazolini et al (2015), que averiguaram a diminuição de corpúsculos lipídicos nas células IEC-6 (carcinoma de cólon).

De forma interessante, a inibição da formação de corpúsculos lipídicos pela rapamicina, aumentou a PGE₂ em ambas as linhagens: 4T1 e 67NR. Maya-Monteiro et al (2008) demonstraram que a inibição de CL pela rapamicina, foi acompanhada de inibição da síntese de leucotrienos. Nossos experimentos sugerem a hipótese de que a síntese de leucotrienos possa ter sido modulada e o aumento da síntese de PGE pode ser atribuído a uma competição por substrato entre ciclooxigenase e lipoxigenase, a qual, no presente estudo, pode ter favorecido a síntese de prostaglandinas. Estudos de D'Ávila e cols (dados não publicados) e Chen e Reiss (2002) demonstraram a competição enzimática, entre ciclooxigenase e lipoxigenase pelo substrato AA, demonstrando em alguns momentos que ocorre a estimulação da via da ciclooxigenase ocorre inibição de lipoxigenase, e vice-versa, corroborando com os resultados apresentados. No entanto, mais experimentos tornam-se necessários para confirmar essa hipótese.

Outrora foram analisadas as citocinas TGF- β e TNF- α , as quais desempenham funções importantes em neoplasias. O TGF- β é uma citocina antiinflamatória que regula o crescimento celular, diferenciação, apoptose, invasão e angiogênese (NEUZILLET et al, 2015). Nossos resultados sugerem que as 2 linhagens produziram TGF- β na dependência do tempo de cultura. No entanto, a produção de TGF- β nas duas linhagens tumorais tendeu para a redução quando tratadas com a rapamicina. A possível reversão na quantificação desta citocina pode ser atribuída ao fato de que a rapamicina, inibidor da via mTOR, interfere nas funções atribuídas a esta via, assim como,

nas funções pro-tumorigênicas atribuídas a TGF- β . A partir do pressuposto, pode-se concluir que a utilização de mecanismos inibitórios da sinalização mTOR e da citocina, podem contribuir como alvo terapêutico em diversas patologias desencadeadas pela exacerbação das mesmas, como por exemplo, o câncer (LAPLANTE e SABATINI, 2012; NEUZILLET et al, 2015).

Com relação aos níveis de TNF- α nas linhagens tumorais estimuladas ou não com rapamicina, pode-se notar a homogeneidade da produção desta citocina pró-inflamatória em todos os grupos demonstrados. Nossos resultados estão de acordo com o estudo de Fazolini e cols (2015), que demonstraram que a leptina não induziu o aumento na síntese de TNF- α nas células epiteliais intestinais. Da mesma forma que aqui, a leptina produzida pelas células tumorais parece não afetar a síntese desta citocinas de forma autócrina nas próprias células tumorais. Ao analisar a dosagem das citocinas, podemos sugerir que, a via mTOR pode ser considerada um alvo efetivo na terapêutica contra o câncer, devido modular o metabolismo lipídico e a produção de citocinas no microambiente tumoral.

As neoplasias são constituídas por populações clonais de células mutadas (WEINBERG, 1996; CANCER RESEARCH INSTITUTE, 2003). O presente estudo procurou avaliar a viabilidade das células tumorais mamárias, metastática ou não, estimuladas com o inibidor da via mTOR. Ambas as linhagens apresentaram significativa redução da viabilidade celular, visto que, a rapamicina atua de forma a inibir as funcionalidades exercidas por mTOR, como por exemplo, crescimento e proliferação celular (LAPLANTE e SABATINI, 2012).

O processo inflamatório direciona para o estabelecimento neoplásico, na qual essa resposta é caracterizada por infiltração macrófaga local (KIMURA et al, 2007). De forma interessante, os macrófagos possuem uma dualidade de funções no âmbito neoplásico: os classicamente ativados (M1) exerce papel antitumoricida; ao passo que, os alternativamente ativados (M2) desempenham funções que promovem o tumor (MURRAY e WYNN, 2011). Tendo em vista a importância destas células na resposta frente a neoplasias, o presente estudo analisou diversos aspectos do metabolismo lipídico em macrófagos

estimulados com sobrenadante das linhagens tumorais, e seguido ou não, com pelo tratamento com rapamicina.

Primeiramente procurou-se avaliar a formação dos corpúsculos lipídicos nos macrófagos estimulados com o sobrenadante das linhagens tumorais mamárias, sucedidas ou não com rapamicina. Os dados elucidaram uma estimulação na formação de CL quando os macrófagos foram tratados com sobrenadante das culturas tumorais. O que de certa forma corrobora com o trabalho de Maya-Monteiro et al (2008), visto que em nosso estudo as células tumorais produziram grande quantidades de leptina que pode ter contribuído para a formação destas organelas nos macrófagos. No nosso estudo, também foi observada uma redução na formação desta de CL quando os macrófagos foram tratados com o inibidor da via mTOR; estando de acordo com os dados aqui demonstrados, referentes ao estímulo de rapamicina nas células tumorais. Ainda concordância com modelo de carcinoma intestinal de Fazolini e cols (2015), em que a rapamicina contribuiu para a redução da formação de corpúsculos lipídicos nas células epiteliais.

De modo interessante a possível competição das enzimas ciclooxigenase e lipooxigenase pelo substrato, também foi apontado em macrófagos estimulados com o sobrenadante das células tumorais; pelo fato de que os níveis de prostaglandina E₂ aumentaram após o estímulo com rapamicina. Importante denotar que este fato não é um fenômeno isolado, visto que Chen e Reiss (2002) e dados não publicados de D'Ávila et al , demonstraram o mesmo fenômeno.

A Leptina é uma adipocina secretada pelo tecido adiposo, a qual desempenha funções na homeostase energética, além de modular ações do sistema imunológico, como por exemplo, a inflamação (MAYA-MONTEIRO e BOZZA, 2008; TOURKANTONIS et al, 2013). Alguns estudos vem correlacionando os níveis de leptina ao estabelecimento neoplásico (Dutta et al, 2012; TOURKANTONIS et al, 2013; Fazolini et al, 2015). Com base na importância da leptina no câncer, avaliamos os níveis desta adipocina em macrófagos estimulados com diferentes concentrações do sobrenadante das células. De modo interessante, os níveis de leptina aumentaram nos

macrófagos estimulados quando comparados ao grupo controle em ambas as linhagens tumorais mamárias estudadas.

A partir dos dados explicitados sobre a quantificação de leptina, podemos relacionar nossos dados aos trabalhos de Dutta et al (2012), que condiz a elevada quantificação desta adipocina com a progressão de cânceres como o de cólon, mama e gástrico; e ao de Fazolini et al (2015) em modelo de carcinoma do cólon. Fazolini e cols (2015) demonstraram que a leptina incrementou a formação de corpúsculos lipídicos, bem como de mediadores inflamatórios. Enquanto Maya-Monteiro et al (2008) em macrófagos peritoneais, demonstrou a elevação da síntese de CL's, bem como a síntese de Leucotrieno B₄. Em suma, nossos dados apontam para um favorecimento do tumor mamário a partir dos níveis quantificados de leptina em modelo *in vitro*, estando condizente com o artigo em preparação de Maciel e cols (2015) em modelo *in vivo* de carcinoma mamário, que observou a elevação desta adipocina em animais obesos com tumores.

Sucedendo a análise da produção de leptina, avaliamos a produção de TGF- β nos macrófagos estimulados com o sobrenadante das linhagens tumorais, estimulados ou não com rapamicina. Foi observado que a produção de TGF- β nos macrófagos estimulados com as duas linhagens tumorais, tratados ou não com rapamicina apresentaram valores próximos. A possível explicação é que, como em macrófagos, como a via mTOR não está modulando o crescimento celular, esta via parece ter efeito somente na redução na formação de corpúsculos lipídicos nos macrófagos peritoneais.

6 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados descritos, pode-se relatar que as linhagens tumorais mamárias, metastática e não metastática, apresentam números absolutos de corpúsculos lipídicos elevados, estando em concomitância com os trabalhos de Accioly et al (2008) e Fazolini et al (2015). Em contrapartida, a utilização da rapamicina, inibiu a formação de CL's, e de forma interessante, elevou a produção de prostaglandinas em grupos estimulados com o inibidor da via mTOR.

Com relação a natureza das linhagens tumorais mamárias, é interessante inferir que a linhagem metastática 4T1 apresentou maiores níveis de formação de corpúsculos lipídicos, assim como, da síntese de mediadores inflamatórios, PGE2 e Leptina, quando comparadas a linhagens não metastáticas, 67NR. Com base nestas informações, pode atribuir a capacidade invasiva da 4T1 a modulação do metabolismo lipídico. Em adição, os níveis de adiponectina e leptina produzidos pelas linhagens conduzem ao estabelecimento tumoral mamário, estando de acordo com Dutta et al (2012).

Com relação a estimulação da rapamicina nas linhagens tumorais mamárias, pode observar uma restrição na formação de corpúsculos lipídicos e uma elevação na síntese de prostaglandina. Tal fato pode ser atribuído a competição das enzimas ciclooxigenase e lipoxigenase ao substrato, conforme Chen e Reiss (2002) e dados não publicados de D'Ávila et al (2006). Ainda referente a aspectos moduladores do metabolismo lipídico, a rapamicina tendeu para redução dos níveis da produção de TGF- β , e mas não alterou a produção de TNF- α . As modulações dos níveis destas citocinas permite constituir ações terapêuticas ao Câncer, visto que altas concentrações de TGF- β promovem a angiogênese, em face que, TNF- α constitui como uma citocina de atividade anti-tumoral. Os mesmos aspectos foram vistos em macrófagos estimulados com sobrenadante das células tumorais estimuladas com rapamicina. No entanto, novos experimentos são necessários para consolidar estes dados.

Em suma, o presente estudo elucidou aspectos lipídicos moduladores na progressão tumoral mamária, e que, é recorrente em outras neoplasias. A partir do conhecimento referente a neoplasias e ação de modulação da via mTOR, novas ações terapêuticas podem ser propostas para o câncer de mama.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, ABUL K.; LICHTMAN, ANDREW, H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. Tradução da 7ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

ABRAMCYK, H.; SURMACKI, J.; KOPEC, M.; OLEJNIK, A. K.; PIETRUSZEWSKA, K. L.; MAJEWSKA, K. F. The role of lipid droplets and adipocytes in cancer. Raman imaging of cell cultures: MCF10A, MCF7, and MDA-MB-231 compared to adipocytes in cancerous human breast tissue. *Analyst*, v. 140, p. 2224-2235, 2015.

ACCIOLY, M. T.; PACHECO, P.; MONTEIRO, C.M. M.; CARROSSINI, N.; ROBBS, B. K.; OLIVEIRA, S. S.; KAUFMANN, C.; DIAZ, J. A. M.; BOZZA, P. T.; VIOLA, J. P. B. Lipid Bodies are reservoirs of Cyclooxygenase-2 and sites of Prostaglandin – E2 Synthesis in Color Cancer Cells. *The Journal of Cancer Research*, v. 68, p. 1732-1740, 2008.

AKIRA, S; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*, v. 124, p. 783-801, 2006.

ALBEITUNI, S. H.; DING, C.; YAN, J. 2013. Hampering Immune Suppressors: Therapeutic Targeting of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Cancer. *The Cancer Journal*, v. 19, n. 6, p. 490-501, 2013.

ALMEIDA, P. E.; CARNEIRO, A. C.; SILVA, A. R.; BOZZA, P. T. PPAR γ Expression and Function in Mycobacterial Infection: Roles in Lipid Metabolism, Immunity, and Bacterial Killing. *PPAR Research*, v. 2012, p. 01-07, 2012.

ALMEIDA, P. E.; SILVA, A. R.; MAYA-MONTEIRO, C. M.; TOROCHSIK, D.; D'AVILA, H.; DEZSO, B.; MAGALHAES, K. G.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; NAGY, L.; BOZZA, P. T. *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin infection induces TLR2-dependent peroxisome proliferator-activated receptor expression and activation: functions in inflammation, lipid metabolism, and pathogenesis. *Journal of Immunology*, v. 183, p. 1337-1345, 2009.

ALTFELD, M.; GALE JR, M. Innate Immunity against HIV-1 Infection. *Nature Immunology*, v. 16, n. 6, p. 554-562, 2015.

ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A.C. R. Cultivo Celular. In: MOLINARO, E.; CAPUTO, L.; AMENDOEIRA, R. Conceitos e Métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde. Rio de Janeiro, EPSJV; IOC, v. 2, p. 215-253, 2010.

AMERICAN CANCER SOCIETY. 2015. Global Cancer Facts & Figures 3rd Edition. Atlanta: American Society, 2015.

AMERICAN CANCER SOCIETY. 2016. Cancer Facts & Figures 2016. Atlanta: American Society, 2016.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Oncogenes and tumor suppressor genes. Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/cancercauses/geneticsandcancer/genesandcancer/genes-and-cancer-oncogenes-tumor-suppressor-genes>>. Acesso em: 10 de Junho de 2016.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Types of Breast Cancer. 2016. Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-breast-cancer-types>>. Acesso em: 01 de Março de 2016.

AOKI, T.; NARUMIYA, S. Prostaglandins and chronic inflammation. Trends in Pharmacological Sciences, v. 33, n. 6, p. 304-311, 2012.

ARRESE, E. L.; SAUDALE, F. Z.; SOULAGES, J. L.. Lipid Droplets as Signaling Platforms Linking Metabolic and Cellular Functions. National Institutes of Health, v. 7, p.07-16, 2014.

ATCC. 4T1 (ATCC®CRL2539™). Disponível em: <<https://www.atcc.org/~ps/CRL-2539.ashx>>. Acesso em: 15 de Maio de 2016.

BABA, AI.; CÂTOI, C. Tumor Cell Morphology. Comparative Oncology. The Publishing House of the Romanian Academy, 2007.

BELLER, M.; THIEL, K.; THUL, P. J.; JACKLE, H. FEBS Letters, v. 584p. 2176-2182, 2010.

BERTUCCI, F.; BIRNBAUM, D. Reasons for breast cancer heterogeneity. Journal of Biology, v. 7, n.6, 2008.

BIAGGIO, R. T. Adaptação de linhagens celulares humanas para crescimento em suspensão e meios de cultura livres de soro fetal bovino. 2014. 93f. Dissertação (Mestre em Ciências). Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto.

BICKEL, P. E.; TANSEY, J. T.; WELTE, M. A. PAT proteins, na ancient Family of lipid droplets proteins that regulate cellular lipid stores. Biochemistry and Biophysics Acta, v. 6, p. 419-440, 2009.

BORGES-OSÓRIO, M.R.; ROBINSON, W. M. 2001. Genética Humana. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, p. 278-299.

BORCHARTT, T. B.; CONCI, A.; LIMA, R. C. F.; RESMINI, R.; SANCHEZ, A. Breast thermography from an image processing viewpoint: a survey. Signal Processing, v. 93, p. 2785-2803, 2013.

BORTONCELLO, B. P.; ALMEIDA, F. B.; PERES, A. Células Natural Killer e seu potencial na Imunoterapia contra o Câncer. Ciência em Movimento, v. 15, n. 30, p.17-25, 2013.

BOZZA, P.T.; BANDEIRA-MELO, C. Mechanisms of Leukocyte lipid body formation and function in inflammation. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 100, p. 113-120, 2005.

BOZZA, P.T.; BAKKER-ABREU, I.; NAVARRO-XAVIER, R.; BANDEIRA-MELO, C. Lipid body function in eicosanoid synthesis: an update. Prostaglandins leukotrienes and essential fatty acids, v. 85, n. 5, p. 205-213, 2011.

BOZZA, P. T.; MAGALHÃES, K. G.; WELLER, P. F. Leukocyte lipid bodies – Biogenesis and functions in inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1791, p.540-551, 2009.

BOZZA, P. T.; VIOLA, J. P. B. Lipid droplets in inflammation and câncer. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, v. 82, p. 243- 250, 2011.

BRASAEMLE, D.L. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *Journal of Lipid Research*, v. 48, p. 2547-2559, 2007.

BROKE; T. G.; PETERS-GOLDEN, M. Activation and regulation of cellular eicosanoid biosynthesis. *Scientific World Journal*, v. 7, p. 1273-1284, 2007.

CALKHOVEN, C.F.; MULLER, C.; LEUTZ, A. Translational control of gene expression and disease. *Trends in Molecular Medicine*, v. 8, p.577–583, 2002.

CANADIAN CANCER SOCIETY. 2016. Types of Tumours. Disponível em: <<http://www.cancer.ca/en/cancer-information/cancer-101/what-is-cancer/types-of-tumours/?region=on>>. Acesso em: 15 de dezembro de 2016.

CANCER RESEARCH UK. Disponível em: <<http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/what-is-cancer/how-cancers-grow>>. Acesso em: 28 de dezembro de 2015.

CANDIDO, J.; HAGEMANN, T. Cancer-related Inflammation. *Journal of the Clinical Immunology*, v. 33, p. S79-S84, 2013.

CARGNELLO, M.; TCHERKEZIAN, J.; ROUX, P.P. The expanding role of mTOR in cancer cell growth and proliferation. *Mutagenesis*, v. 30, n. 2, p. 169 – 176, 2015

CARTER, J. C.; CHURCH, F. C. Obesity and Breast Cancer: The Roles of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ and Plasminogen Activator Inhibitor-1. *PPAR Research*, v. 2009, 2009.

CARVALHO, W. A.; CARVALHO, R. D. S.; SANTOS, F. R. Analgésicos Inibidores Específicos da Ciclooxigenase-2: Avanço Terapêutico. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v. 54, n. 3, p. 448- 464, 2004.

CERWENKA, A.; LANIER, L. L. Natural killer cells, viroses and câncer. *Nature Reviews Immunology*, v. 1, p. 41-49, 2001.

CHAMMAS, R.; SILVA, D. C. P.; WAINSTEIN, A. J.; ABDALLAH, K. A.. *Imunologia Clínica das Neoplasias. Imunologia Clínica na Prática Médica*. São Paulo: Atheneu, 2009.

CHAPMAN, K. D.; DYER, J. M., MULLEN, R. T. Biogenesis and functions of lipid droplets in plants. *Journal of Lipid Research*, v. 53, p. 215-226, 2012.

CHEN, N.; REISS, C. S. Distinct Roles of Eicosanoids in the Immune Response to Viral Encephalitis: Or Why You Should Take NSAIDs. *Viral Immunology*, v.15, n.1, p. 133 – 146, 2002.

COELHO-CASTELO, A. A. M.; TROMBONE, A. P. F.; ROCHA, C. D.; LORENZI, J. C. C. Resposta Imune a doenças infecciosas. *Revista da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto*, v. 42, n. 2, p. 127-142, 2009.

COELHO, M.; OLIVEIRA, T.; FERNANDES, R. Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. *Archieve Medical of Sciences*, v. 9, n. 2, p. 191-200, 2013.

COLDITZ, G. A. Relationship Between Estrogen Levels, Use of Hormone Replacement Therapy, and Breast Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 90, n. 11, p. 814-823, 1998.

COLOMBO, J.; RAHAL, P. Alterações Genéticas em Câncer de Cabeça e Pescoço. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 55, n. 2, p. 165-174, 2009.

COLOTTA, F.; ALLAVENA, P.; SICA, A.; GARLANDA, C.; MANTOVANI, A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*, v. 30, n. 7, p. 1073-1081, 2009.

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

CRUVINEL, W. M.; JUNIOR, D. M.; ARAUJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S. SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C. Sistema Imunitário- Parte 1: Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 50, n. 4, p. 434-461, 2010.

D'AVILA, H.; FREIRE-DE-LIMA, C. G.; ROQUE, N. R.; TEIXEIRA, L.; BARJA-FIDALGO, C. ; SILVA, A. R. ; MELO, R. C. N.; DOSREIS, G. A.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; BOZZA, P. T. Host Cell Lipid Bodies Triggered by *Trypanosoma cruzi* Infection and Enhanced by the Uptake of Apoptotic Cells Are Associated With Prostaglandin E2 Generation and Increased Parasite Growth. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 204, p. 951-961, 2011.

D'AVILA, H; MAYA-MONTEIRO, C.M; BOZZA, P.T. Lipid bodies in innate immune response to bacterial and parasite infections. *International immunopharmacology*, v. 8, p. 1308-1315, 2008.

D'AVILA, H.; MELO, R. C. N.; PARREIRA, G. G.; WERNECK-BARROSO, E.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; BOZZA, P.T. *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin Induces TLR2-Mediated Formation of Lipid Bodies: Intracellular Domains for Eicosanoid Synthesis in Vivo. *The Journal of Immunology*, v. 176, n.5, p. 3087-3097, 2006.

D'ÁVILA, H., ALMEIDA, P. E., ROQUE, N. R., CASTRO-FARIA-NETO, H. C., & BOZZA, P. T. Toll-like receptor-2-mediated CC chemokine receptor 3 and eotaxin-driven eosinophil influx induced by *Mycobacterium bovis* BCG pleurisy. *Infection and immunity*, v. 75, p. 1507-1511, 2007.

DJEFAFLIA, S. B.; VASSEUR, S.; GUILLAUMOND, F. Lipid metabolic reprogramming in cancer cells. *Oncogenesis*, v.5, p.01 – 10, 2016.

DRANOFF, G Cytokines in Cancer pathogenesis and Cancer Therapy. *Nature Reviews Cancer*, v. 4, p. 11-22, 2004.

DUPRÉ, S. A.; REDELMAN, D.; HUNTER JR, K. W. The mouse mammary carcinoma 4T1: characterization of the cellular landscape of primary tumours and metastatic tumour foci. *International Journal of Experimental Pathology*, v. 88, p. 351-360, 2007.

DUTTA, D.; GHOSH, S.; PANDIT, K.; MUKHOPADHYAY, P.; CHOWDHURY, S. Leptin and cancer: Pathogenesis and therapeutic modulation. *Indian Journal of Endocrinology and metabolism*, v. 16, p. s596-s600, 2012.

DZIVENU, O.K.; PHIL, D.; O'DONNELL-TORMEY, J. *Cancer and Immune System: The Vital Connection*. Cancer Research Institute, 2003. Disponível em: <<http://www.cancerresearch.org/CRI/media/Content/Cancer%20Immunotherapy/Cancer-and-the-Immune-System-The-Vital-Connection.pdf>>. Acesso em: 28 de dezembro de 2015.

EASTON, J. B.; HOUGHTON, P. J. mTOR and cancer therapy. *Oncogene*, v. 25, p. 6436-6446, 2006.

FAZOLINI, N. P. B.; CRUZ, A. L. S.; WERNECK, M. B. F.; VIOLA, J. P. B.; MONTEIRO, C. M. M.; BOZZA, P. T. Leptin Activation of mTOR pathway in intestinal epithelial cell triggers lipid formation, cytokine production and increased cell proliferation. *Cell Cycle*, v. 14, p. 2666-2676, 2015.

FEARON, E. R. Human Cancer Syndromes: Clues to the Origin and Nature of Cancer. *Science*, v. 278, p. 1043-1050, 1997.

FERRARI, A. L.; ROBEIRO, M. F. M.; RECHE, M.; BRUM, I. S.; KOHEK, M. B.; CORLETA, H. V. E.; CAPP, E. Expressão dos protooncogenes *c-fos*, *c-myc* e *c-jun* em miométrio normal e miomas humanos. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v. 28, p. 590-595, 2006.

FERREIRA, C.; ROCHA, J. *Oncologia Molecular*. São Paulo: Editora Atheneu, 2010.

FLAVELL, R.A.; SANJABI, S.; WRZESINSKI A, LICONA-LIMON P. 2010. The polarization of immune cells, in the tumour environment by TGF β . *Immunology*, v. 10, p. 554-567, 2010.

FREIRE-DE-LIMA, C. G.; NASCIMENTO, D. O.; SOARES, M. B. P.; BOZZA, P. T.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; MELLO, F. G.; REIS, G. A.; LOPES, M. F. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature*, v. 403, p. 199-203, 2000.

FREITAS, C. Envolvimento de receptores da resposta imune inata e dos inflamassomos na biogênese e função dos corpúsculos lipídicos durante infecção por *Mycobacterium bovis* BCG. 2014. 113f. Tese (Doutora em Biologia Celular e Molecular) – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

FREITAS, C. S. Estendendo o Conhecimento sobre a Família Her-Receptores para o Fator de Crescimento Epidérmico e seus ligantes às Malignidades Hematológicas. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 54, n.1, p. 79-86, 2008.

FRIEDL, P.; WOLF, K. Tumour-Cell invasion and migration: Diversity and escape mechanisms. *Nature*, v. 3, p. 362-374, 2003.

FUNK, C.D. Leukotriene Modifiers as Potential Therapeutics for cardiovascular disease. *Nature Reviews*, v. 4, p. 664-672, 2005.

GAJEWSKI, T.; SCHREIBER, H.; FU, Y. Innate and adaptive cells in the tumour microenvironment. *Nature Reviews Immunology*, v. 14, p. 1014-1022, 2013.

GALDIERO, M. R.; BONAVITA, E.; BARAJON, I.; GARLANDA, C.; MANTOVANI, A.; JAILLON, S. Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer. *Immunology*, v. 218, p. 1402-1410, 2013.

GALUZZI, L.; VACCHELLI, E.; PEDRO, J. M. B. S. et al. Classification of current anticancer immunotherapies. *Oncotarget*, v. 5, n. 24, p. 12472-12508, 2015.

GOLDSZMID, R.S.; DZUTSEV, A.; TRINCHIERI, G. Host Immune Response to Infection and Cancer: Unexpected Commonalities. *Cell Host&Microbe*, v. 15, p. 295-305, 2014.

GREENBERG, A. S.; COLEMAN, R. A.; KRAEMER, F. B.; McMANAMAN, J. L.; OBIN, M. S.; PURI, V.; YAN, Q.W.; MIYOSHI, H.; MASHEK, D. G. The role of lipid droplets in metabolic disease in rodents and humans. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 121, n. 6, p. 2102-2110, 2011.

GREENHOUGH, A.; SMARTT, H. J. M.; MOORE, A. E.; ROBERTS, H. R.; WILLIAMS, A. C.; PARASKEVA, C.; KAIDI, A. The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to tumour microenvironment. *Carcinogenesis*, v. 30, n. 3, p. 377-386, 2009.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte Celular por Apoptose. *Revista Brasileira de Cancerologia.*, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

GROSSENBACHER, S. K.; CANTER, R. J.; MURPHY, W. J. Natural Killer cell immunotherapy to target stem-like tumour cells. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, v. 4, n. 19, p. 01-03, 2016.

GROSSMANN, M. E.; RAY, A.; DOGAN, S.; MIZUNO, N.K.; CLEARY, M. P. Balance of adiponectin and leptin modulates breast cancer cell growth. *Cell Research*, v. 18, p. 1154 – 1156, 2008.

GUERTIN, D. A.; SABATINI, D. M. An expanding role for mTor in Cancer. *Trends in Molecular Medicine*, v. 11, n.8, p. 353-361, 2005

GUILLEREY, C. HUNTINGTON, N. D.; SMYTH, M. Targeting natural killer cells in cancer immunotherapy. *Nature Immunology*, v.17, n.9, p.1025-1036, 2016.

GUO, Y.; CORDES, K. R.; FARESE JR, R. V.; WHALTER, T.C. Lipid droplets at a glance. *Journal of Cell Science*, v. 122, p. 749-752, 2009.

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

HARA, K.; MARUKI, Y.; LONG, X.; YOSHINO, K.; OSHIRO, N.; HIDAYAT, S.; TOKUNAGA, C.; AVRUCH-LA, J.; YONEZAWA, K. Raptor, a binding partner of target of Rapamycin (TOR), Mediates TOR action. *Cell*, v. 110, n. 2, p. 177-189, 2002.

HARIZI, H.; CORCUFF, J. B.; GUALDE, N. Arachidonic-acid derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. *Trends in Molecular Medicine*, v. 14, n. 10, p. 461-469, 2008.

HEBBARD, L. e RANSCHT, B. Multifaceted roles of adiponectin in Cancer. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 28, p. 59-69, 2014. HEUSINKVELD, M.; STEENWIJK, P. J. V.V.; GOEDEMANS, R.; RAMWADHDOEBE, T. H.; GORTER, A.; WELTERS, M. J. P.; HALL, T. V.; BURG, S.H. V. D. M2 macrophages induced by prostaglandina E2 and IL-6 from Cervical carcinoma are switched to M1 macrophages by CD4 + Th1 Cells. *The Journal of Immunology*, v. 187, p. 1157-1165, 2011.

HINRICHS, C. S.; SPOLSKI, R.; PAULOS, C. M.; GATTIONI, L.; KERSTANN, K. W.; PALMER, D. C.; KLEBANOFF, C. A.; ROSENBERG, S. A.; LEONARD, W. J.; RESTIFO, N. P. IL-2 and IL-21 confer opposing differentiation programs to CD8+ T cells for adoptive immunotherapy. *Blood*, 111, p. 5326-5333, 2008.

HORSSSEN, R. V.; HAGEN, T. M. L. T.; EGGERMONT, A. M. M. TNF- α in Cancer Treatment: Molecular Insights, Antitumor Effects, and Clinical Utility. *The Oncologist*, v. 11, p. 397 – 408, 2006.

IGNEY, F. H.; KRAMMER, P. H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature Reviews Cancer*, v. 2, n. 4, p. 277 – 288, 2002.

INCA. 2011. *Abc do Câncer: Abordagens Básicas para o controle do Câncer*. Rio de Janeiro: INCA. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/abc_do_cancer.pdf>. Acesso em: 28 de dezembro de 2015.

INCA. *Imunoterapia*. Disponível em: <www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=104>. Acesso em: 10 de Maio de 2016.

INCA. 2013. O cancer e seus fatores de risco. O que a educação pode evitar? Rio de Janeiro: INCA. Disponível em:<<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/Cancerfatoresrisco.pdf>>. Acesso em: 10 de Dezembro de 2016.

INCA. Mama. Disponível em:<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/cancer_mama+>. Acesso em: 10 de dezembro de 2016.

INGTHORSSON, S.; ANDERSEN, A.; HILMARSDOTTIR, B.; MAELANDSMO, G. M.; MAGNUSSON, M. K.; GUDJONSSON, T. HER2 induced EMT and tumorigenicity in breast epithelialprogenitor cells is inhibited by coexpression of EGFR. *Oncogene*, v. 35, p. 4244-4255, 2016.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativa 2016. Incidência do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2016.

INUMARU, L .E.; SILVEIRA, E. A.; NAVES, M. M. V. Fatores de Risco e de proteção para câncer de mama: uma revisão sistemática. *Caderno de Saúde Pública*, v. 27, n. 7, p. 1259- 1270, 2011.

ISSA, A.; GIL, J. W.; HEIDEMAN, M. R.; SAHIN, O.; WIEMANN, S.; DEY, J. H.; HYNES, N.H. Combinational targeting of FGF and ErbB receptors blocks growth and metastatic spread of breast cancer models. *Breast Cancer Research*, v. 15, p. 01-15, 2013.

JARDÉ, T.; CALDEFIE, F. C.; MENDES, N. G.; MISHHELLANY, F.; BUECHIER, C.; LIORCA, F. P.; VASSON, M. P. Involvement od adiponectina and leptin in breast cancer: clinical and in vitro studies. *Endocrine Related Cancer*, v. 16, p. 1197-1210, 2009.

JIANG, B. H.; LIU, L. Z. PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Advances in Cancer Research*, n. 102, p. 19-65, 2009.

KARIN, M.; GRETEN, F.R. NF- κ B: Linking Inflammation and Immunity to Cancer Development and Progression. *Nature Reviews Immunology*, v. 5, p.749-759, 2005.

KIMURA, Y. S.; WATARI, K.; FOTOVATI, A.; HOSOL, F.; YASUMOTO, K.; IZUMI, H.; KOHNO, K.; UMEZAWA, K.; IGUCHI, H.; SHIROUZU, K.; TAKAMORI, S.; KUWANO, M.; ONO, M. Inflammatory stimuli from macrophages and cancer cells synergistically promote tumor growth and angiogenesis. *Cancer Science*, v. 98, n.12, p.2009-2018, 2011.

KING, M. C.; MARKS, J. H.; MANDELL, J. B. 2003. Breast and Ovarian Cancer Risks Due to Inherited mutations in BRCA₁ and BRCA₂. *Science*, v. 302, p. 643-646, 2003.

KHANDEKAR, M. J.; COHEN, P. SPIELGEMAN, B. M. Molecular mechanisms of cancer development in obesity. *Nature Reviews Cancer*, v. 11, p. 886- 895, 2011.

KOIFMAM, S.; HATAGIMA, A. Exposição aos agrotóxicos e câncer ambiental. In: PERES, F.(org.) *É veneno ou remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente*. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, cap. 4, p. 75-99, 2003.

KRECHLER, ZEMAN, M.; VECKA, M.; MACASEK, J. JACHYMOVA, M.; ZIMA, T.; ZAK, A. Leptin and Adiponectin in pancreatic cancer with diabetes mellitus. *Neoplasma*, v. 58, n. 1, p. 58-64, 2010.

KUMAR, V.; ABBAS, A.; ASTER, J. Robbins&Cotran: *Patologia – Bases patológicas das doenças*. 9ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

LAPLANTE, M.; SABATINI, D. M. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, v. 149, n. 2, p. 274-293, 2012.

LEBRUN, J. J. The Dual Role of TGF β in Human Cancer: From Tumor Suppression to Cancer Metastasis. *International Scholarly Research Network Molecular Biology*, v. 2012, p. 01-28, 2012.

LEE, C. H.; INOKI, K.; GUAN, K. L. mTOR pathway as a target in tissue hypertrophy. *Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology*, v. 47, p. 443-467, 2007.

LEE, E. Y. H. P.; MULLER, W. J. Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, v. 2, p.01-18, 2010.

LEIGUEZ, E.J. Estudo dos fatores envolvidos na formação de Corpúsculos lipídicos, induzido por uma fosfolipase A2, isolada do veneno de serpent: síntese e metabolism de lipídeos. 2015. 32f. Tese (Doutorado em Ciências – Área em Imunologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

LIMA, R. R.; COSTA, A. M. R.; SOUZA, R. D.; LEAL, W. G. INFLAMAÇÃO EM DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS. Revista Paraense de Medicina, v. 21, n. 2, p. 29-34, 2007.

LIN, W. W.; KARIN, M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. The Journal of the Clinical Investigation, v. 17, n. 5, p. 1175-1183, 2007.

LIU, Y.; CAO, X. The origin and function of tumor-associated macrophages. Cellular & Molecular Immunology, v. 12, p. 01-04, 2015.

LIU, Y.; ZENG, G. Cancer and Innate Immune System Interactions: Translational Potentials for Cancer Immunotherapy. Journal of ImmunoTherapy, v. 35, n. 4, p. 299-308, 2012.

LOU, Y.; PREOBRAZHENSKA, O.; AUF DEM KELLER, U.; SUTCLIFFE, M.; BARCLAY, L.; McDONALD, P. C. et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is not sufficient for spontaneous murine breast cancer metastasis. Developmental Dynamics, v. 237, p. 2755-2768, 2008.

MA, X.; YU, H. Global Burden of Cancer. Yale Journal of Biology and Medicine, v. 79, p.85-94, 2006.

MACCALLI, C.; SCARAMUZZA, S.; PARMINANI, G. TNK cells (NKG2D+ CD8+ or CD4+T lymphocytes) in control of human tumors. Cancer Immunology Immunotherapy; v. 58, p.801-808, 2009.

MACIEL, S.P. Papel da obesidade e do desenvolvimento de tumores de mama na resposta inflamatória durante infecções por patógenos intracelulares: análise de corpúsculos lipídicos e mediadores inflamatórios em macrófagos, 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, área de Concentração: Imunologia e Doenças Infecto-parasitárias) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.

MADERA, L.; GREENSHIELDS, A.; COOMBS, M. R. P.; HOSKIN, D. W. 4T1 Murine Mammary Carcinoma Cells Enhance Macrophage-Mediated Innate Inflammatory Responses. *Plos One*, v. 10, n. 7, p.01-25, 2015.

MAHAJAN, S.; BHASKAR, N.; KAUR, H.; PANDEY, R.; MANHAS, S. Lipid Droplets: a Dynamic Organelle in Health and Disease. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, v. 5, p. 173 – 184, 2015.

MAHONEY, T.S.; WEYRICH, A.S.; DIXON, D.A.; MCINTYRE, T.; PRESCOTT, S.M.; ZIMMERMAN, G.A. Cell adhesion regulates gene expression at translational checkpoints in human myeloid leukocytes. *PNAS*, v. 98, n. 18, p. 10284–10289, 2001.

MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P.; SICA, A.; BALKWILL, F. Cancer-related inflammation. *Nature*, v. 454, p. 436-444, 2008.

MANTZOROS, C. PETRIDOU, E.; DESSYPRIS, N.; CHAVELAS, C.; DALAMAGA, M.; ALEXE, D. M.; PAPADIAMANTIS, Y.; MARKOPOULOS, C.; SPANOS, E.; CHROUSOS, G.; TRICHOPOULOS, D. Adiponectin and Breast Cancer Risk. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 89, p. 1102-1107, 2004.

MARTIN, S.; PARTON, R. G. Lipid Droplets: a unified view of a dynamic organelle. *Nature Reviews Cell Biology*, v. 5, p. 373-378, 2006.

MARTIN, A.M.; WEBER, B. L. Genetic and Hormonal Risk Factors in Breast Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 92, n. 14, p. 1126-1135, 2000.

MARTINEZ, M. A. R.; FRANCISCO, G.; CABRAL, L.S.; RUIZ, I. R. G.; FESTA NETO, C. Genética molecular aplicada ao cancer cutâneo não melanoma. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 81, n. 5, p. 405-419, 2006.

MASSAGUÉ, J. TGF β in Cancer. *Cell*, v. 134, p. 215 – 230, 2005.

MATHEUS, V. S.; KESTELMAN, F. P.; CANELLA, E. O.; DJAHJAH, M. C. R.; KOCH, H. A. Carcinoma medular da mama: correlação anátomo-radiológica. *Radiologia Brasileira*, v. 41, n.6, p.379-383, 2008.

MAXIMOV, G.; MAXIMOV, K. The role of p53 tumor-suppressor protein in apoptosis and cancerogenesis. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, v. 22, n. 2, p. 664-668, 2008.

MAYA-MONTEIRO, C.M., ALMEIDA, P.E.; D'AVILA, H.; MARTINS, A. S.; REZENDE, A. P.; CASTRO FARIA-NETO, H.; BOZZA, P. T. Leptin induces macrophage lipid body formation by a phosphatidylinositol 3-kinase- and mammalian target of rapamycin-dependent mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*. v..283, p. 2203-2210, 2008.

MAYA-MONTEIRO, C. M.; BOZZA, P. T. Leptin and mTOR: Partners in metabolism and inflammation. *Cell Cycle*, v. 7, n. 12, p. 1713-1717, 2008.

MEDREK, C.; PONTÉN, F.; JIRSTOM, K.; LEANDERSSON, K. The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients. *BMC Cancer*, v. 12, p. 01-09, 2012.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, v. 454, p. 428-435, 2008.

MELO, R. C. N.; D'AVILA, H.; WAN, H.-C.; BOZZA, P. T.; DVORAK, A. M.; WELLER, P.F. Lipid Bodies in Inflammatory Cells: Structure, Function and Current Imaging Techniques. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, v. 59, n. 5, p. 540-556, 2011.

MELO, R. C. N. et al. Macrophage lipid body induction by Chagas disease in vivo: putative intracellular domains for eicosanoid formation during infection. *Tissue cell*, v. 35, n. 1, p. 59-67, 2003.

MELO, R. C. N.; PAGANOTI, G. F.; DVORAK, A. M.; WELLER, P. F. The Internal Architecture of Leukocyte Lipid body Organelles Captured by Three-Dimensional Electron Microscopy Tomography. *PlosOne*, v. 8, n.3, p. 01-12, 2013.

MÉNARD, S.; PUPA, S. M.; CAMPIGLIO, M.; TAGLIABUE, E. Biologic and therapeutic role of HER2 in cancer. *Oncogene*, v. 22, p. 6570-6578, 2003.

MENDONÇA, R. J.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 84, n. 3, p. 257-262, 2009.

MENENDEZ, D.; INGA, A.; JORDAN, J. J.; RESNICK, M. A. Changing the p53 master regulatory network: Elementary, my dear Mr Watson. *Oncogene*, v. 26, n. 15, p. 2191-2201, 2007.

METCALFE, K.; LYNCH, H. T.; GHADIRIAN, P.; TUNG, N.; OLIVOTTO, I.; WARNER, E.; OLAPODE, O. I.; EISEN, A.; WEBER, B.; MCLENNAN, J.; SUN, P.; FOULKES, W. D.; NAROD, S. A. Contralateral Breast Cancer in BRCA1 and BRCA 2 Mutation Carriers. *Journal of Clinical Oncology*, v. 22, n. 12, p. 2328-2335, 2004.

MITRA, R.; GOODMAN, O. B.; LE, T. T. Enhanced of detection of metastatic prostate cancer cells in human plasma with lipid bodies staining. *BMC CANCER*, v. 14, p. 01-12, 2014.

MITTAL, D.; GUBIN, M. M.; SCHREIBER, R. D.; SMYTH, M. J. New insights into cancer immunoediting and its three component phases – elimination, equilibrium and escape. *Current Opinion in Immunology*, v. 27, p. 16-25, 2014.

MONCLARO, A. V. Soro Fetal Bovino. Disponível em: <<http://www.labome.com.br/method/Fetal-Bovine-Serum.html>>. Acesso em: 10 de janeiro de 2017. Página da internet de responsabilidade de pessoa jurídica:

Labome. Disponível em: < <http://www.labome.com.br/method/Fetal-Bovine-Serum.html>>. Acesso em: 03 de setembro de 2016.

MORVAN, M. G.; LANIER, L. L. 2016. NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. *Nature Reviews Cancer*, 16: 7-19.

MOTA, L. A. M.; NETO, J. R.; MONTEIRO, V. G.; LOBATO, C. S. S.; OLIVEIRA, M. A.; CUNHA, M.; D'ÁVILA, H.; SEABRA, S. H.; BOZZA, P. T.; DAMATTA, R. A. Culture of mouse peritoneal macrophages with mouse serum induces lipid bodies that associate with the parasitophorous vacuole and decrease their microbicidal capacity against *Toxoplasma gondii*. *Memorial do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 109, p. 767-774, 2014.

MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature Reviews Immunology*, v. 11, n. 11, p. 723-737, 2011.

NAGLER, C.; HARDT, C.; ZANKER, K.S.; DITTMAR, T. Co-cultivation of murine BMDCs with 67NR mouse mammary carcinoma cells give rise to highly drug resistant cells. *Cancer Cell International*, v. 11, n. 21, p. 01-13, 2011.

NAKANISHI, M.; ROSEMBERG, D. W. Multifaceted roles of PGE2 in inflammation and cancer. *Seminars Immunopathology*, v. 35, n. 2, p. 123-137, 2013.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **What is Cancer?**. Disponível em: < <http://www.cancer.gov/about-cancer/what-is-cancer>>. Acesso em: 28 de dezembro de 2015.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. Immunotherapy. Disponível em < <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/immunotherapy>>. Acesso em: 10 de maio de 2016.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. Breast Cancer – Patient Version. Disponível em: <www.cancer.gov/types/breast>. Acesso em: 15 de maio de 2016.

NATURE. Tumour Immunology & Immunotherapy. Disponível em: <www.nature.com/reviews/focus/tumourimmunology/index.html?WT.ec_id=SLBU_COMMS>. Acesso em: 15 de Maio de 2016.

NATURE. 2016. Disponível em: <www.nature.com/subjects/cell-culture>. Acesso em: 20 de Dezembro de 2016.

NEUZILLET, C.; RABALLAND, A. T.; COHEN, R.; CROS, J.; FAIVRE, S.; RAYMOND, E.; GRAMONT, A. Targeting the TGF β pathway for cancer therapy. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 147, p. 22–31, 2015.

NEVES, E. M. S. F. T. Macrófago: Biologia, Diversidade e função. 2015. 57f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Fernando Pessoa, Porto.

ONUCHIC, A. C.; CHAMMAS, R. Câncer e o microambiente tumoral. *Revista de Medicina (São Paulo)*, v. 89, n. 1, p. 21-31, 2010.

PAGE, D. B., BOURLA, A. B.; DANIYAN, A.; NAIDOO, J.; SMITH, E.; SMITH, M.; FRIEDMAN, C.; KHALIL, D. N.; FUNT, S.; SHOUSHTARI, A. N.; OVERWIJK, W. W.; SHARMA, P.; CALLAHAN, M. K. Tumor immunology and câncer immunotherapy:summary of the 2014 SITC primer. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, v. 3, n. 25, p. 01-10, 2015.

PALUCKA, K.; BANCHEREAU, J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nature Reviews Cancer*, v. 12, n. 4, p. 265-277, 2012.

PAMPALONA, J.; FRÍAS, C.; GENESCÀ, A.; TUSELL, L. Progressive telomere dysfunction causes cytokinesis failure and leads to the accumulation of polyploid cells. *PLoS Genetics*, San Francisco, v. 8, n. 4, p. 01-11, 2012.

PINTO, E. M.; BRONSTEIN, M. D. Aspectos Moleculares da Tumorigênese Hipofisária. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia&Metabolismo*, v. 52, n. 4, p. 599-610, 2008.

POL, A. et al. Dynamic and regulated association of caveolin with lipid bodies: modulation of lipid body motility and function by a dominant negative mutant. *Molecular Biology of the Cell*, v. 15, p. 99–110, 2004.

POLYAK, K. Heterogeneity in Breast Cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 121, n. 10, p. 3786-3788, 2011.

PRADO, B. B. F. Influência dos hábitos de vida no desenvolvimento do Câncer. *Ciência e Cultura*, v. 66, n. 1, p. 21-24, 2014.

PRADO, W. L.; LOFRANO, M. C.; OYAMA, L. M.; DÊMASO, A. R. Obesity and inflammatory Adipokines: Practical Implications for exercise prescription. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, v. 15, n. 5, p. 378-383, 2009.

RAHBI, S.; RABHI, I.; TRENTIN, B.; PIQUEMAL, D.; REGNAULT, B.; GOYARD, S.; LANG, T.; DESCOTEAUX, A.; ENNINGA, J.; TABBANE, L. G. Lipid Droplet Formation, their localization and Dynamics during *Leishmania major* Macrophage Infection. *Plos One*, v. 11, p. 01-19, 2016.

RAKOFF-NAHOUM, S. Why Cancer and Inflammation?. *Yale Journal of Biology and Medicine*, v. 79, p. 123-130, 2006.

READER, J.; HOLT, D.; FULTON, A. Prostaglandin E2 EP receptors as Therapeutic Targets in Breast Cancer. *Cancer Metastasis Reviews*, v. 30, n. 0, p. 449-463, 2011.

REES, J. R.; ZENS, M. S.; GUL, J.; CELAYA, M. O.; RIDDLE, B. L.; KARAGAS, M. R. Non Melanoma Skin Cancer and Subsequent Cancer Risk. *Plos One*, v. 9, n. 6, p. 1-8, 2014.

RESENDE, F. C. B.; PASSOLD, J.; FERREIRA, S. I. A. C.; ZANETTI, C. R.; LIMA, H. C. Adjuvantes de vacinas: possibilidades de uso em ser humanos ou animais. *Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia*, v.27, n.3, p. 116-124, 2004.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A.. Prostaglandins and Inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, v. 31, p. 986-1000, 2011.

SAHAI, E. Illuminating the metastatic process. *Nature Reviews Cancer*, v. 7, p. 737-749, 2007.

SAKA, H. A.; VALDIVIA, R. Emerging roles for lipid droplets in immunity and host-pathogen interactions. *Annual Reviews of Cell and developmental Biology*, v. 28, n. 1, p. 411-437, 2012.

SANT'ANNA, C. C.; FERREIRA, S. Imunização contra Tuberculose. *Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto*, v. 6, n. 1, p. 51-55, 2007. Disponível em < www.revista.hupe.uerj.br/detalhe_artigo.asp?id=225 >. Acesso em: 02 de maio de 2016.

SANTOS, R. C.; SCHULZE, A. Lipid Metabolism in Cancer. *FEBS Journal*, v. 279, p. 2610-2623, 2012.

SCHUSTER, M.; NECHANSKY, A.; LOIBNER, H.; KIRCHEIS. Cancer immunotherapy. *Biotechnology Journal*, v.1, p. 138-147, 2006.

SICA, A. Role of tumour-associated macrophages in cancer related inflammation. *Experimental Oncology*, v. 32, n. 3, p. 153-158, 2010.

SICA, A.; ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A. Cancer related inflammation: The macrophage connection. *Cancer letters*, v. 264, p. 204-215, 2008.

SILVA, A. E.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G. D. Carcinogênese hormonal e neoplasias hormônio-depedentes. *Ciência Rural*, v. 34, n. 2, p. 625-633, 2004.

SILVA, I. C. Neutrófilos: aspectos clássicos, plasticidade e novas funções imunorregulatórias. *Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais*, v. 7, p. 35-46, 2015.

SILVEIRA, M. R.; FROLLINI, A. B.; VERLENGIA, R.; CAVAGLIERI, C. R. Correlação entre obesidade, adipocinas e sistema imunológico. *Revista Brasileira de Cineantropometria & Desempenho Humano*, v. 11, n. 4, p.466-472, 2009.

SIMÕES, R. V.; SERGANOVA, I. S.; KRUCHEVSKY, N.; LEFTIN, A.; SHESTOV, A. A.; THALER, H. T.; SUKENICK, G.; LOCASAL, J. W.; BLASBERG, R. G.; KOUTCHER, J. A.; ACKERSTAFF, E. Metabolic Plasticity of Metastatic Breast Cancer Cells: Adaptation to Changes in the Microenvironment. *Neoplasia*, v. 17, n. 8, p. 671-684, 2015.

SKINNER, J. R.; HARRIS, L. - A. L. S; SHEW, T. M.; ABUMRAD, N. A.; WOLINS, N. E. Perilipin 1 moves between the fat droplet and the endoplasmic reticulum. *Adipocyte*, v .2, n. 2, p. 80-86, 2013.

SMYTH, M. J.; HAYAKAWA, Y.; TAKEDA, K.; YAGITA, H. New aspects of Natural Killer cell surveillance and therapy of câncer. *Nature Reviews Cancer*, v. 2, p.850-861, 2002.

SOBOLEWSKI, C.; CERELLA, C.; DICATO, M.; GHIBELLI, L.; DIEDERICH, M. The Role of Cyclooxygenase-2 in Cell Proliferation and Cell Death in Human Malignancies. *International Journal of Cell Biology*, v. 2010, p.01-21, 2010.

SPURRELL, E.; LOCKLEY, M. Adaptive immunity in cancer immunology and therapeutics. *E Cancer Medical Science*, v. 8, p. 01-10, 2014.

STAFIN, I.; CAPONI, L. G. F.; TORRES, T. P.; ARAUJO, J. N.; GUEDES, V. R. Fatores Prognósticos no Câncer de mama. *Revista de Patologia do Tocantins*, v. 01, n. 01, p. 14-29, 2014.

SWINNEN, J. V.; BRUSSELMANS; K.; VERHOEVEN, G. Increased lipogenesis in cancer cells: new players, novel targets. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, v. 9, p. 358-365, 2006.

TAO, K.; FANG, M.; ALROY, J.; SAHAGIAN, G. G. Imagable 4T1 model for the study of late breast câncer. *BMC Cancer*, v. 8, p. 01-20, 2008.

TAUCHI-SATO, K.; OZEKI, S.; HOUJOU, T.; TAGUCHI, R.; FUJIMOTO, T. The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique fatty acid composition. *Journal of biological chemistry*, v. 277, n. 46, p. 44507-44512, 2002.

TEVA, A.; FERNANDEZ, J. C. C.; SILVA, V. . *Imunologia*. In: MOLINARO, Etelcia Moraes; CAPUTO, Luzia Fátima Gonçalves; AMENDOEIRA, Maria Regina Reis (Org.). *Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde*. Rio de Janeiro, RJ: Instituto Oswaldo Cruz, Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio,. v.4, p. 19 – 124, 2009-2010.

THIAM, A. R.; FARESE, R. V.; WALTHER, T. C. The biophysics and cell biology of lipid droplets. *Nature Review Molecular Cell Biology*, v. 14, p. 775-786, 2013.

TILLEY, S. L.; COFFMAN, T. M.; KOLLER, B. H. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 108, n. 1, p. 15-23, 2001.

TOLEDO, D. A. M.; D'AVILA, H.; MELO, R. C. N. Host Lipid Bodies as Platforms for intracellular Survival of Protozoan Parasites. *Frontiers in Immunology*, v. 7, p.01-06, 2016.

TOURKANTONIS, I.; KIAGIA, M.; PEPONI, E.; TSAGOULI, S.; SYRIGOS, K. N.. The Role of Leptin in Cancer Pathogenesis. *Journal of Cancer Therapy*, v.4, p. 640-650, 2013.

VIEIRA, D. S. C.; DUFLOTH, R.M.; SCHMITT, F. C. L.; ZEFERINO, L. C. Carcinoma de mama: novos conceitos na classificação. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v. 30, n. 1, p. 42-47, 2008.

VISSER, K. E.; EITCHEN, A.; COUSSENS, L. M. Paradoxal roles of the immune system during cancer development. *Nature*, v. 6, p. 24-37, 2006.

WALTHER, T. C.; FARESE JR, R. V. Lipid droplets and Cellular Lipid Metabolism. *Annual Review of Biochemistry*, v. 81, n. 1, p. 687-714.

WAJANT, H. The Role of TNF in Cancer. Results and problems in cell differentiation, v. 49, p. 01 – 15, 2009.

WAN, H.C. et al. Roles and origins of leukocyte lipid bodies: proteomic and ultrastructural studies. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, v. 21, n. 1, p. 167-78, 2007.

WANG, L.; WALTENBERGER, B.; WENZIG, E. M. P.; BLUNDER, M.; LIU, X.; MALAINER, C.; BLAZEVIC, T.; SCHWAIGER, S.; ROLLINGER, J. M.; HEISS, E. H.; SCHUSTER, D.; KOPP, B.; BAUER, R.; STUPPNER, H.; DIRSCH, V. M.; ATASANOV, A. G. 2014. Natural product agonists of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ): a review. Biochemical and Pharmacology, v. 92, p.73-89, 2014.

WANG, F.; ARUM, P.; FRIEDGMAN, J.; CHEN, Z.; VAN, W. C. Current and potential inflammation targeted therapies in head and neck cancer. Current opinion in pharmacology, v. 9, n. 4, p. 389-395, 2009.

WANG, D.; DuBOIS, R. N. Prostaglandins and cancer. Prostaglandins and Cancer. Gut, v. 55, p. 115-122, 2006.

WANG, N.; LIANG, H.; ZEN, K. Molecular mechanisms that influence the macrophage M1-M2 polarization balance. Frontiers in Immunology, v. 5, p. 01-09, 2014.

WEINBERG, R. A. How Cancer Arises. Scientific American, p. 62-70, 1996.

WELCSH, P. L.; KING, M. C.. BRCA₁ and BRCA₂ and the genetics of Breast and Ovarian Cancer. Human Molecular Genetics, v. 10, n. 7, p. 705-713, 2001.

WOLF, I.; SADETZKI, S.; KANETY, H.; KUNDEL, Y.; PARIENTE, C.; EPSTEIN, N.; OBERMAN, B.; CATANE, R.; KAUFMAN, B.; SHIMON, I. 2006. Adiponectin, ghrelin and Leptin in Cancer cachexia in Breast and Colon Cancer Patients. Cancer, v. 106, n. 4, p.966-973, 2006.

YAMAGUCHI, H.; CONDEELIS, J. Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1773, p. 642-652, 2007.

YUE, G. J.; DEMISSIE, E.; PILLAI, S. B lymphocytes and Cancer: A Love-Hate relationship. *Trends in Cancer*, v. 2, n. 12, p. 747-757, 2016.

ZAROGOULIDIS, P.; LAMPAKI, S.; TURNER, J. F.; HUANG, H.; KAKOLYRIS, S.; SYRIGOS, K.; ZAROGOULIDIS, K. mTOR pathway: A current, up-to-date mini-review. *Oncology Letters*, v. 8, p. 2367-2370, 2014.

ZHAO, M.; SUN, J.; ZHAO, Z. 2013. TSGene: a web resource for tumor suppressor genes. *Nucleic Acids Research*, v.41, p. D970-D976, 2013.