

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**DIEGO DE ASSIS GONÇALVES**

**O EFEITO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DO TECIDO  
ADIPOSO OBESO EM CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA**

JUIZ DE FORA  
2022

**DIEGO DE ASSIS GONÇALVES**

**O EFEITO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DO TECIDO  
ADIPOSO OBESO EM CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas na área de Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias.

**Orientadora: Profa. Dra. Jacy Gameiro**

**JUIZ DE FORA  
2022**

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

Gonçalves, Diego de Assis.

O efeito de vesículas extracelulares do tecido adiposo obeso em células de câncer de mama / Diego de Assis Gonçalves. -- 2022.  
97 f. : il.

Orientadora: Jacy Gameiro

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2022.

1. Obesidade. 2. Vesículas extracelulares. 3. Câncer de mama. 4. Tecido Adiposo. I. Gameiro, Jacy, orient. II. Título.

**Diego de Assis Gonçalves**

**O efeito de vesículas extracelulares do tecido adiposo obeso em células de câncer de mama**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas. Área de concentração: Imunologia e Doenças Infectoparasitárias.

Aprovada em 18 de novembro de 2022.

**BANCA EXAMINADORA**

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

**Prof. Dr. Eugênio Damaceno Hottz**  
Universidade Federal de Juiz de Fora

**Profª. Drª. Juciane Maria de Andrade Castro**  
Universidade Federal de Juiz de Fora

**Profª. Drª. Fabiana Henriques Machado de Melo**

**Profª. Drª. Flavia Márcia de Castro e Silva**

Universidade Estadual do Rio de Janeiro

Juiz de Fora, 22/11/2022.



Documento assinado eletronicamente por **Jacy Gameiro, Professor(a)**, em 22/11/2022, às 14:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juciane Maria de Andrade Castro, Professor(a)**, em 22/11/2022, às 14:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabiana Henriques Machado de Melo, Usuário Externo**, em 22/11/2022, às 18:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Flavia Marcia de Castro e Silva, Usuário Externo**, em 23/11/2022, às 09:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eugenio Damaceno Hottz, Professor(a)**, em 24/11/2022, às 13:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf ([www2.ufjf.br/SEI](http://www2.ufjf.br/SEI)) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1049590** e o código CRC **8C7478A6**.

Dedico este trabalho à minha mãe, que nunca mediu esforços para proporcionar aquilo que segundo ela é a maior herança de todas: “os estudos”.

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe, por todo amor do mundo.

Agradeço à equipe do laboratório por toda convivência e aprendizado. À minha orientadora Jacy, pela oportunidade na realização deste doutorado, pela confiança, ensinamentos, incentivo e entusiasmo na pesquisa.

Aos companheiros de experimentos, conversas, sorrisos/lamentações que estiveram por perto ao longo destes anos, Ana, Augusto, Bárbara, Camilla, Erick, Letícia L., Letícia V., Mari, Maria Clara, Luan, Matheus, Sara, Victória.

À Leidinha, por toda ajuda, disponibilidade e companhia.

À Professora Dra. Michaela Luconi, que me acolheu durante o doutorado sanduíche, pela receptividade e ensinamentos. A todos do grupo Luconi pela companhia em um ano pandêmico e longe de casa, Giulia, Laura, Ila, Toni e Letizia.

Ao médico Dr. Victor Cangussu, pela parceria e ajuda neste trabalho.

Aos colaboradores da Fiocruz-RJ, Professor Dr. Dumith Chequer, por gentilmente abrir as portas do seu laboratório para o aprendizado de metodologias fundamentais na realização deste trabalho. Ao Luis Andres, por compartilhar todo conhecimento sobre isolamento e caracterização de vesículas extracelulares. Ao Felps, pelas conversas e pela ajuda na microscopia confocal.

Aos colaboradores do Laboratório de Imunotrombose da UFJF, pelos ensinamentos, conversas e ajuda na execução de experimentos, Professor. Dr. Eugênio Hottz e as alunas Paula, Nathália, Laura, Cecília e Sthefane.

Aos colaboradores do LDNano da UFJF, pela disponibilidade e ajuda na utilização do equipamento Zetasizer. Obrigado ao Professor Dr. Frederico Pittella e aos alunos Bia e Davi.

Às secretárias da pós-graduação, Fernanda e Graça, pelo auxílio com as burocracias administrativas.

Ao meu companheiro de vida, Raoni, por todo amor na forma de apoio, paciência, incentivo e bolos.

À minha família Lê, Lipe, pai e vó Lucília por todo carinho e suporte.

Aos amigos, por oferecerem uma mão, um sorriso ou uma fofoca, em especial Lu, Fernanda, Alyssa, Dié, Maíra, Raíza, Jéssica, Zé, Ramon e Júlia.

Agradeço ao suporte financeiro da CAPES, CNPq e FAPEMIG.

“Não há saber mais ou saber menos,  
há saberes diferentes.”

Paulo Freire



## RESUMO

A obesidade pode provocar a secreção desregulada de adipocinas e respostas pró-inflamatórias no tecido adiposo (TA), levando a disfunção metabólica. A inflamação crônica de baixo grau instalada na obesidade pode desempenhar um papel na patogênese de diferentes doenças, incluindo o câncer de mama. Entre os mecanismos de comunicação célula-célula está a secreção de vesículas extracelulares (VEs), que podem alterar o comportamento das células tumorais/estromais e criar um nicho favorável para a progressão tumoral. Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de VEs provenientes do tecido adiposo no comportamento de células do câncer de mama. Amostras de tecido adiposo foram coletadas de indivíduos obesos e indivíduos eutróficos de acordo com o Índice de Massa Corporal. Através de ultracentrifugação sequencial isolamos as VEs provenientes destas amostras. Essas partículas foram caracterizadas através de análises do diâmetro, marcadores proteicos e internalização pelas células tumorais. O tratamento com 5µg/mL de VEs do TA obeso não alterou a viabilidade celular das células de câncer de mama MDA-MB-231 e MCF-7, mas reduziu o crescimento celular e a capacidade de formar colônias da linhagem MCF-7. Em contrapartida, aumentou a formação de colônias das células MDA-MB-231. Além disso, estas VEs promoveram aumento da migração celular de ambas as linhagens. VEs do TA obeso, mas não do TA controle, aumentaram a secreção de TGF-β das células MDA-MB-231 e de IL-1α das MCF-7. Em modelo de obesidade induzida por dieta hiper lipídica, VEs do TA de camundongos obesos prejudicaram o crescimento celular e promoveram a migração de células da linhagem murina de câncer de mama 4T1, quando comparado as células não tratadas ou tratadas com VEs de animais controle. Não observamos diferenças na secreção e expressão de marcadores inflamatórios de células tratadas ou não com VEs. Estes resultados sugerem que o efeito de VEs do tecido adiposo obeso depende do tipo celular, mas em consonância indicam um aumento na capacidade de migração das células do câncer de mama. Estudos adicionais são necessários para identificar possíveis agentes e mecanismos de ação, nos quais estas vesículas extracelulares alteram o comportamento celular e suas consequências na progressão do câncer de mama.

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

## ABSTRACT

Obesity can promote the dysregulated secretion of adipokines and pro-inflammatory responses in adipose tissue (AT), leading to metabolic dysfunction. Chronic low-grade inflammation installed in obesity may play a role in the pathogenesis of different diseases, including breast cancer. Among the mechanisms of cell-cell communication is the secretion of extracellular vesicles (EVs), which can alter the behavior of tumor/stromal cells and create a favorable niche for tumor progression. Therefore, the objective of this work was to evaluate the effect of EVs from adipose tissue on the behavior of breast cancer cells. Adipose tissue samples were collected from obese and eutrophic individuals according to BMI. Through sequential ultracentrifugation we isolated the VEs from these samples. These particles were characterized through analysis of diameter, protein markers, and internalization by tumor cells. Treatment with 5 $\mu$ g/mL of EVs from obese AT did not change the cell viability of MDA-MB-231 and MCF-7 cells, but reduced cell growth and the ability to form colonies of the MCF-7 lineage. On the other hand, colony formation of MDA-MB-231 cells increased. In addition, these EVs increased the cell migration of both strains. EVs from the obese AT, but not from the control AT, increased TGF- $\beta$  secretion from MDA-MB-231 cells and IL-1 $\alpha$  from MCF-7 cells. In a high-fat diet-induced obesity model, EVs from the AT of obese mice impaired cell growth and promoted the migration of murine breast cancer 4T1 cells, when compared to untreated cells or treated with EVs from control animals. We did not observe differences in the secretion and expression of inflammatory markers from treated or untreated cells. These results suggest that the effect of EVs from obese adipose tissue depends on the cell type, but in accordance, they indicate an increase in the migration capacity of breast cancer cells. Additional studies are needed to identify possible agents and mechanisms of action in which these extracellular vesicles alter cellular behavior and their consequences for breast cancer progression.

**Keywords:** Obesity. Extracellular vesicles. Breast cancer. Adipose tissue.

## LISTA DE ABREVIATURAS

cDNA	DNA complementar
DAPI	4', 6-diamidino-2-fenilindol
DC	Dieta controle
DH	Dieta hiperlipídica
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
DMEM	do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Etilenodiamino tetra-acético
ELISA	do inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corporal
IFN	Interferon
M1	Macrófagos classicamente ativados
M2	Macrófagos alternativamente ativados
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos 1
MMP	Metaloproteinase de matriz
mRNA	RNA mensageiro
miRNA	micro RNA
nK	Células <i>natural killer</i>
NT	Não tratado
OMS	Organização Mundial da Saúde
OB	Obeso
PBS	Tampão fosfato-salino
RE	Receptor de estrogênio
RNA	Ácido ribonucléico
RP	Receptor de progesterona
SFB	Soro fetal bovino
VEs	Vesículas extracelulares
VEGF	Fator de crescimento endotelia vascular
TA	Tecido adiposo

TEM	Transição epitélio-mesenquimal
TGF	Fator de crescimento transformador
TNF	Fator de necrose tumoral

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Principais depósitos de tecido adiposo branco em humanos e roedores ..	20
<b>Figura 2.</b> Prevalência de obesidade no mundo. ....	22
<b>Figura 3.</b> Modulação patológica do tecido adiposo.....	25
<b>Figura 4.</b> Incidência dos tipos de câncer mais frequentes em mulheres no Brasil. ..	27
<b>Figura 5.</b> Microambiente tumoral. ....	31
<b>Figura 6.</b> Estrutura e composição dos exossomos. ....	33
<b>Figura 7.</b> Biogênese e secreção de exossomos.....	34
<b>Figura 8.</b> Esquema do delineamento experimental .....	39
<b>Figura 9.</b> Esquema do protocolo de isolamento das vesículas extracelulares.....	42
<b>Figura 10.</b> Distribuição do tamanho das VEs derivadas do tecido adiposo. ....	49
<b>Figura 11.</b> Expressão de marcadores proteicos para caracterização das VEs isoladas de tecido adiposo.. ....	50
<b>Figura 12.</b> Internalização de VEs do TA pelas células de câncer de mama .....	51
<b>Figura 13.</b> Efeito das VEs do tecido adiposo obeso na viabilidade de células de câncer de mama. ....	52
<b>Figura 14.</b> Efeito das VEs do tecido adiposo obeso no crescimento de células do câncer de mama.....	53
<b>Figura 15.</b> Efeito das VEs do tecido adiposo obeso na formação de colônias em células de câncer de mama.....	54
<b>Figura 16.</b> Efeito das VEs do tecido adiposo obeso na migração das células MDA-MB-231.....	56
<b>Figura 17.</b> Efeito das VEs do tecido adiposo obeso na migração das células MCF-7.. ....	57
<b>Figura 18.</b> Efeito das VEs do tecido adiposo na secreção de mediadores inflamatórios das células MDA-MB-231.....	59
<b>Figura 19.</b> Efeito das VEs do tecido adiposo na secreção de mediadores inflamatórios das células MCF-7. ....	60
<b>Figura 20.</b> Modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica.....	62
<b>Figura 21.</b> Distribuição do tamanho das VEs derivadas do tecido adiposo de camundongos.....	63
<b>Figura 22.</b> Efeito das VEs do tecido adiposo na viabilidade celular da linhagem 4T1.. ....	64

<b>Figura 23.</b> Efeito das VEs do tecido adiposo no crescimento celular da linhagem 4T1. .....	64
<b>Figura 24.</b> Efeito das VEs do tecido adiposo obeso na migração das células 4T1...65	65
<b>Figura 25.</b> Efeito das VEs do tecido adiposo na secreção de TGF- $\beta$ pelas células 4T1.. .....	66
<b>Figura 26.</b> Efeito das VEs do tecido adiposo na expressão de genes inflamatórios das células 4T1.....	67

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Classificação de indivíduos adultos de acordo com o IMC.....	22
<b>Tabela 2.</b> Composição da dieta hiperlipídica.....	39
<b>Tabela 3.</b> Parâmetros dos voluntários incluídos no estudo.....	47

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>19</b>
1.1	Tecido adiposo: Um órgão endócrino	19
1.2	Obesidade, inflamação e câncer	22
1.3	Câncer de mama e obesidade	27
1.4	Vesículas extracelulares e a comunicação entre células	32
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>38</b>
2.1	Objetivo geral	38
2.2	Objetivos específicos	38
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>39</b>
3.1	Delineamento experimental	39
3.2	Modelo de obesidade induzido por dieta em camundongos C57BL/6	40
3.3	Obtenção de vesículas extracelulares do tecido adiposo	41
3.4	Caracterização das vesículas extracelulares	42
3.4.1	Análise da expressão de proteínas por <i>western blot</i>	42
3.4.2	Análise do tamanho das vesículas extracelulares por espalhamento dinâmico da luz	43
3.4.3	Quantificação proteica das amostras de vesículas extracelulares	43
3.4.4	Análise da internalização das vesículas extracelulares pelas células tumorais	43
3.5	Cultura Celular	44
3.6	Ensaio de Viabilidade celular	44
3.7	Ensaio de Formação de Colônias	45
3.8	Ensaio de Cicatrização	45
3.9	Dosagem de citocinas	46
3.10	RT-qPCR	46
3.11	Análises estatísticas	47
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>48</b>



4.1	Obtenção de vesículas extracelulares do tecido adiposo humano pelo método de ultracentrifugação.....	48
4.2	Vesículas Extracelulares do tecido adiposo obeso não alteraram a viabilidade celular das linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 .....	52
4.3	As Vesículas Extracelulares do tecido adiposo obeso Alteraram a formação de colônias das células do câncer de mama .....	54
4.4	As Vesículas Extracelulares do tecido adiposo obeso Promoveram a migração das células MDA-MB-231 e MCF-7.....	55
4.5	As Vesículas Extracelulares do tecido adiposo obeso alteraram a secreção de citocinas das células MDA-MB-231 e MCF-7.....	58
4.6	Obtenção de Vesículas Extracelulares do tecido adiposo de camundongos C57BL/6 .....	61
4.7	As vesículas Extracelulares do tecido adiposo obeso prejudicaram o crescimento celular da linhagem 4T1.....	63
4.8	As Vesículas Extracelulares do tecido adiposo obeso promoveram a migração das células 4T1 .....	65
4.9	As Vesículas Extracelulares do tecido adiposo não alteraram a secreção de TGF-B e a expressão de marcadores inflamatórios da linhagem 4T1 .....	66
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>68</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>74</b>
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	75
	ANEXOS .....	95
	ANEXO A – GONÇALVES, D. A., RIBEIRO, V., GUALBERTO, A., <i>et al.</i> "COVID-19 and Obesity: An Epidemiologic Analysis of the Brazilian Data", International Journal of Endocrinology, v. 2021, 2021.....	95
	ANEXO B – GONÇALVES, D. A., JASIULIONIS, M. G., DE MELO, F. H. M. "The Role of the BH4 Cofactor in Nitric Oxide Synthase Activity and Cancer Progression: Two Sides of the Same Coin", International Journal of Molecular Sciences 2021, Vol. 22, Page 9546, v. 22, n. 17, p. 9546, 2 set. 2021. ....	96
	ANEXO C – SOARES, J. P. M., GONÇALVES, D. A., DE SOUSA, R. X., <i>et al.</i> "Disruption of Redox Homeostasis by Alterations in Nitric Oxide Synthase Activity	

and Tetrahydrobiopterin along with Melanoma Progression", International Journal of Molecular Sciences, v. 23, n. 11, p. 5979, 1 jun. 2022.....97

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 TECIDO ADIPOSEO: UM ÓRGÃO ENDÓCRINO

Para a espécie humana, além de se apresentar como o principal reservatório enérgico do organismo, o tecido adiposo (TA) possui importante função de proteção mecânica e isolamento térmico. Nos mamíferos o TA se distingue em tecido adiposo branco, tecido adiposo marrom e tecido adiposo bege (ZWICK et al., 2018).

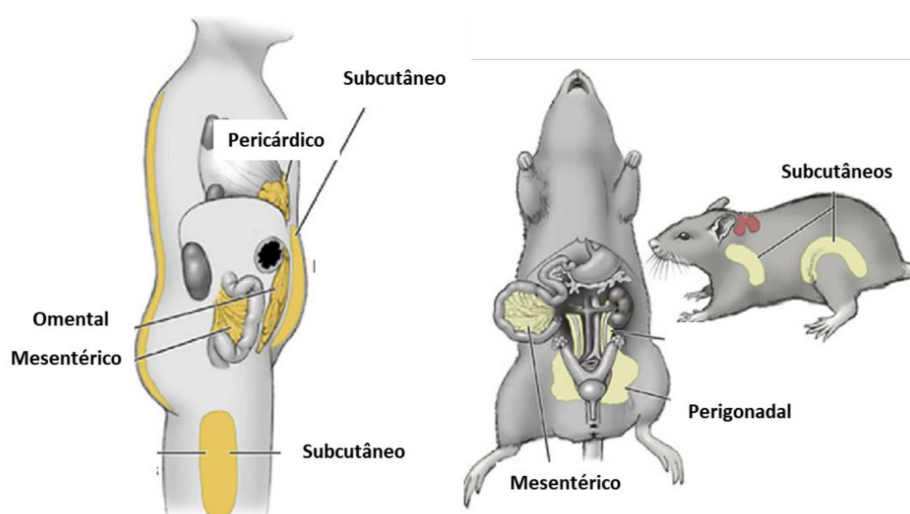
Também conhecido como multilocular, o tecido adiposo marrom é especializado na produção de calor, processo conhecido como termogênese. Nele, os adipócitos são caracterizados pela presença de muitas gotículas lipídicas de tamanhos diversos, notável número de mitocôndrias e alta expressão basal da proteína desacopladora 1 (UCP-1), proteína atuante no processo de termogênese. Este tecido é particularmente encontrado em animais hibernantes e pequenos roedores. Nos humanos, atribuía-se sua presença significativa apenas em neonatos, entretanto, estudos recentes demonstraram depósitos de gordura termogênica também em adultos (MULYA; KIRWAN, 2016).

O tecido adiposo bege é composto por adipócitos multiloculares que também possuem a capacidade de converter energia em calor. Esses adipócitos possuem baixa expressão basal de UCP-1, porém após estímulo como exposição ao frio, exercícios e alguns hormônios, ocorre um aumento na expressão desta proteína e consequente produção de calor nos adipócitos. Apesar de compartilhar características bioquímicas e metabólicas com o tecido adiposo marrom, o tecido adiposo bege se localiza em depósitos de tecido adiposo branco (KAJIMURA, 2017; WANG; SEALE, 2016).

A maior parte do tecido adiposo presente nos humanos corresponde ao tecido adiposo branco. Ele é encontrado em todo o organismo, abrangendo regiões subcutâneas e envolvendo órgãos da cavidade abdominal. Também chamado de unilocular, apresenta adipócitos grandes e esféricos contendo uma única gotícula lipídica (LUONG; HUANG; LEE, 2019). Uma característica importante é que essas células possuem grande capacidade de crescimento, fato relacionado a função de armazenamento de lipídios (KAJIMURA, 2017).

Com diferentes localizações anatômicas e funções metabólicas, o tecido adiposo branco pode ser dividido em dois tipos principais: tecido adiposo subcutâneo e tecido adiposo visceral (ZWICK et al., 2018). O tecido adiposo visceral (presente na cavidade abdominal) apresenta adipócitos com maior capacidade lipolítica do que células do TA subcutâneo. Além disso, é mais vascularizado, innervado e com maior infiltrado de células inflamatórias. Em contrapartida, os adipócitos do TA subcutâneo possuem maior capacidade de absorção de ácidos graxos livres (IBRAHIM, 2010; LAFONTAN, 2013).

Os principais depósitos de TA visceral em humanos compreende em mesentérico, omental, retroperitoneal (envolvendo órgãos intra-abdominais), gonadal e pericárdico (FIGURA 1). O TA subcutâneo está distribuído em todo corpo humano, sendo os principais depósitos no abdômen, nádegas e coxas. Nos roedores, modelo mais comumente usados nos trabalhos pré-clínicos sobre obesidade, o tecido adiposo branco também se distribui em vários depósitos. O TA subcutâneo é encontrado na parte anterior próximo ao pescoço e axilas, e na parte posterior na região dorso lombar até a região glútea (inguinal) (FIGURA 1) (BARTNESS et al., 2014). O TA visceral nestes animais se divide nas regiões retroperitoneal, mesentérico e perigonadal. Este último é frequentemente utilizado na literatura por ser maior e mais acessível (CHUSYD et al., 2016; LUONG; HUANG; LEE, 2019).



**Figura 1. Principais depósitos de tecido adiposo branco em humanos e roedores.** Esquema das localizações de tecido adiposo visceral (Omental, mesentérico, perigonadal) e subcutâneo. Adaptado de Bartness et al., 2014.

No final da década de 80 quando pesquisadores atribuíram o tecido adiposo ao metabolismo de esteroides sexuais e alguns anos depois com a identificação e caracterização da leptina, ele passava então a ser visto não somente como um reservatório passivo de energia. Hoje, o tecido adiposo é reconhecido como um órgão endócrino capaz de coordenar diferentes processos biológicos (FUNCKE; SCHERER, 2019). Através da secreção de moléculas bioativas, conhecidas por adipocinas, atua tanto a nível local (de forma autócrina/parácrina) como também a nível sistêmico. Além de enviar sinais por meio das adipocinas, ele expressa uma variedade de receptores, permitindo comunicação eficiente com outros órgãos (MANCUSO, 2016).

Os adipócitos são os principais constituintes do tecido adiposo, que ainda apresenta: células endoteliais, células tronco mesenquimais, células do sistema imune, terminais nervosos e vasos sanguíneos. Tanto adipócitos como os outros tipos celulares são capazes de secretar adipocinas (BAI; SUN, 2015). Essas moléculas compõem um grupo heterogêneo e podem participar no metabolismo lipídico, balanço energético, angiogênese e resposta inflamatória (ZORENA et al., 2020).

A leptina, por exemplo, pode agir a nível hipotalâmico, inibindo a fome e aumentando o consumo de energia. Por outro lado, a adiponectina atua no sistema nervoso central, estimulando o apetite e reduzindo o gasto energético (ZORENA et al., 2020). Além disso, estas adipocinas possuem um papel importante na resposta inflamatória. Assim como outros exemplos, incluindo o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), resistina, interleucina (IL)-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) e fator de crescimento transformador- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (FARKHONDEH et al., 2020).

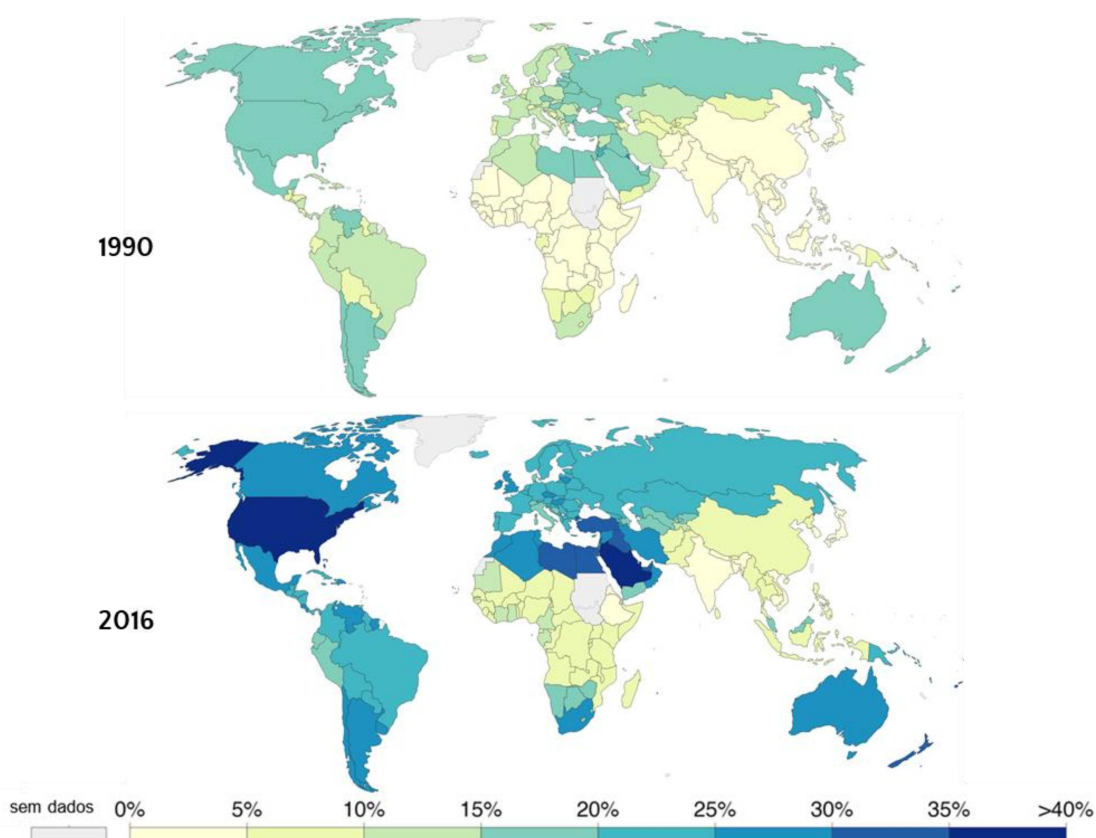
Dependendo de alterações na privação ou excesso de nutrientes, o tecido adiposo pode responder de forma dinâmica através da hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos, garantindo a homeostase energética. A expansão saudável do TA ocorre através do recrutamento de células precursoras de adipócitos, vascularização adequada e baixa inflamação (GOOSSENS, 2017). Neste contexto, alguns indivíduos podem de certa forma preservar a homeostase do organismo, levando a um quadro conhecido como obesidade metabolicamente saudável (OUCHI et al., 2011).

Em condições patológicas, o remodelamento ou expansão rápida e descontrolada do tecido adiposo leva a vascularização deficiente, hipóxia, fibrose, aumento de infiltrados de células imunes, acompanhada da secreção desregulada de

adipocinas com subsequentes respostas pró-inflamatórias, processo característico da obesidade (KAHN; WANG; LEE, 2019).

## 1.2 OBESIDADE, INFLAMAÇÃO E CÂNCER

A obesidade é motivo de preocupação para a saúde pública em todo mundo, representando uma emergência sanitária, social e econômica. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a prevalência da obesidade mais que dobrou nos últimos vinte anos (FIGURA 2), sendo que apenas no ano de 2016 aproximadamente 2 bilhões de adultos em todo mundo estavam acima do peso, dentre os quais 650 milhões com obesidade (OMS, 2016). Apesar dos números expressivos, ainda faltam políticas públicas e ações eficazes no combate a obesidade em todo o mundo.



**Figura 2. Prevalência de obesidade no mundo.** Porcentagem de indivíduos adultos obesos em todo o mundo, nos anos de 1990 e 2016. Adaptado de: ourworldindata.org (2022).

No Brasil, dados do Ministério da Saúde indicam que o percentual de adultos com obesidade também aumentou consideravelmente nos últimos anos, passando de

11,6% em 2006 para 20,3% em 2019. Além disso, mais da metade da população adulta no país (55,4%) se encontra com excesso de peso (BRASIL, 2019).

De origem multifatorial, a obesidade é uma doença complexa que pode ser causada por fatores ambientais, como alimentação altamente calórica e sedentarismo, bem como fatores genéticos, fisiológicos, psicológicos, socioeconômicos e culturais. Caracteriza uma condição crônica causada pelo excesso de ingestão calórica em relação ao gasto de energia, resultando no acúmulo anormal de tecido adiposo e ganho excessivo de peso (REN et al., 2021).

O Índice de Massa Corporal (IMC), calculado pela divisão do peso (Kg) pelo quadrado da altura (m) é usado pela OMS como base para a definição da obesidade. De acordo com este parâmetro, o indivíduo é considerado obeso quando apresenta o  $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ , conforme demonstrado na Tabela 1 (OMS, 2000). O IMC está correlacionado positivamente com o risco de doenças cardiovasculares e metabólicas (GOOSSENS, 2017). Entretanto, este método de classificação não considera a presença de massa muscular esquelética no organismo e não indica a distribuição corpórea de gordura abdominal/periférica. Ainda assim, apesar de apresentar limitações, é de extrema relevância para avaliações epidemiológicas da doença (O'ROURKE, 2018).

**Tabela 1.** Classificação de indivíduos adultos de acordo com o IMC

<b>Categoria</b>	<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>
Abaixo do peso	< 18,5
Peso normal	18,5 - 24,9
Sobrepeso	25 - 29,9
Obesidade	$\geq 30$
Obesidade grau I	30 - 34,9
Obesidade grau II	35 - 39,9
Obesidade grau III	$\geq 40$

IMC: índice de Massa Corporal. Adaptado de: OMS, 2000.

A distribuição da gordura corporal, associada as diferentes propriedades funcionais dos depósitos de tecido adiposo branco, é um importante fator de risco metabólico (GOOSSENS, 2017). No contexto da obesidade, a disfunção do tecido

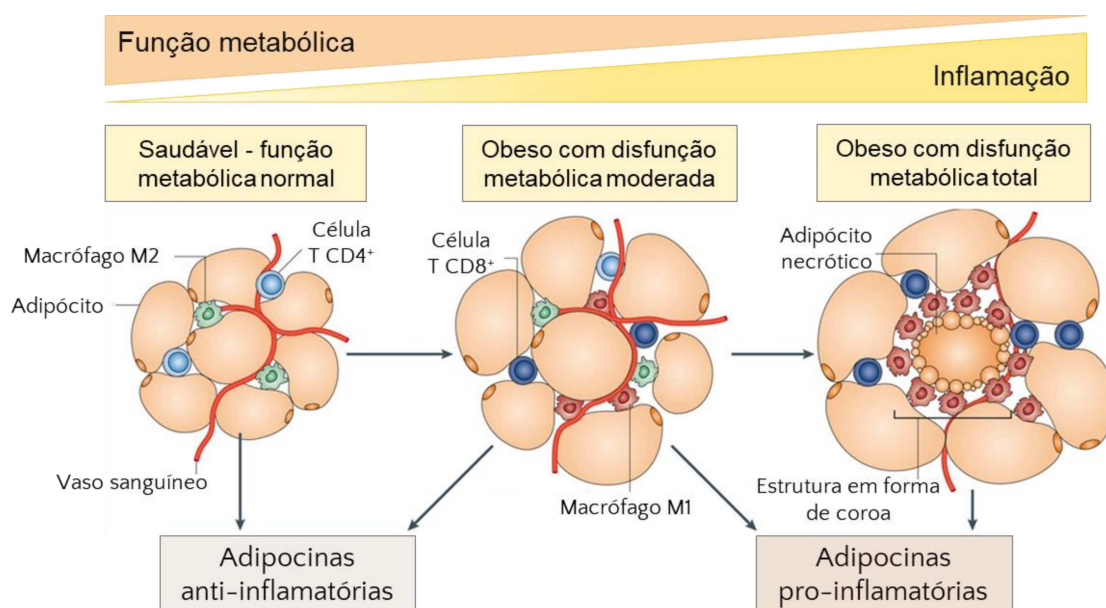
adiposo subcutâneo pode induzir a deposição ectópica de gordura (tecido adiposo visceral, músculo esquelético e fígado) prejudicando a homeostase metabólica do organismo (LONGO et al., 2019). Sabe-se que o acúmulo de tecido adiposo visceral e o decorrente aumento da circunferência abdominal, estão intimamente relacionados às consequências associadas a obesidade, como por exemplo resistência à insulina. Além disso, a obesidade abdominal se apresenta como fator de risco para o desenvolvimento de doenças como hipertensão, aterosclerose, esteatose hepática e diabetes *Mellitus* tipo 2 (GOOSSENS, 2017).

O estresse homeostático desencadeado pelo balanço energético positivo nos adipócitos é o ponto de partida para inflamação crônica presente na obesidade. Algumas evidências indicam que o processo inflamatório pode servir para o remodelamento e expansão saudável do tecido adiposo (WERNSTEDT ASTERHOLM et al., 2014). Como resposta inicial ao excesso de nutrientes absorvidos, a inflamação pode promover a angiogênese como mecanismo para evitar a hipóxia em um tecido que se encontra em expansão. Essa expansão do TA, por sua vez, surge na tentativa de evitar a deposição de lipídios em outros tecidos (como músculo esquelético e fígado, por exemplo). Estes efeitos são prejudiciais ao organismo a partir do momento que a resposta é prolongada e o TA encontra dificuldade de se expandir através da hiperplasia. Deste modo, ocorre hipertrofia dos adipócitos, fibrose e morte celular (REILLY; SALTIEL, 2017). Estes eventos desencadeiam respostas imunes inatas e alteram o repertório imunológico para um estado pró-inflamatório.

No tecido adiposo obeso os adipócitos podem liberar mediadores pró-inflamatórios, como MCP-1, TNF- $\alpha$  e ácidos graxos livres, induzindo a ativação de macrófagos residentes e recrutando monócitos para o tecido adiposo (FIGURA 3). A maioria dos macrófagos localizados no TA de indivíduos obesos se organiza em torno de adipócitos mortos, formando estruturas semelhantes a coroas. Além da infiltração, a obesidade induz o aumento do número proporcional de macrófagos com fenótipo M1 (pró-inflamatório) em detrimento de macrófagos M2 (anti-inflamatórios) (PATEL; BURAS; BALASUBRAMANYAM, 2013). Estes macrófagos, por sua vez, secretam mediadores inflamatórios, como TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1. Esta ligação entre adipócitos e macrófagos estabelece e mantém o estado de inflamação crônica no tecido adiposo obeso (BAI; SUN, 2015; HILL; BOLUS; HASTY, 2014). A população de células T também é alterada conforme a progressão da obesidade, com aumento de células T citotóxicas e diminuição de células T reguladoras. Além disso, a hipóxia ocasionada



pela hipertrofia dos adipócitos também pode regular positivamente mediadores pró-inflamatórios, como interleucina IL-6, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), leptina e metaloproteinases de matriz MMP-2 e MMP-9 (OUCHI et al., 2011). Outras células do sistema imune também estão associadas a inflamação do tecido adiposo obeso: eosinófilos, neutrófilos e células dendríticas, dentre outras ações, promovem a infiltração e polarização M1 dos macrófagos (KAWAI; AUTIERI; SCALIA, 2021).



**Figura 3. Modulação patológica do tecido adiposo.** Com expansão descontrolada do tecido adiposo, os adipócitos sofrem hipertrofia, levando a vascularização deficiente, hipóxia e fibrose. Além do recrutamento de monócitos, ocorre uma mudança de perfil fenotípico dos macrófagos residentes, de M1 para M2; A população de linfócitos T também é alterada. Como resultado, o tecido adiposo obeso secreta fatores pró-inflamatórios e apresenta disfunção metabólica. Adaptado de: Ochi et al., 2011.


Os níveis circulantes de leptina, TNF- $\alpha$ , IL-6 foram correlacionados à obesidade e sobrepeso, tanto em humanos como em modelos experimentais murinos. Além disso, estas adipocinas foram associadas a distúrbios metabólicos e cardiovasculares presentes na obesidade (OBRADOVIC et al., 2021; ZHAO; KUSMINSKI; SCHERER, 2021). A leptina estimula a ativação de células do sistema imune e induz a produção de citocinas pró-inflamatórias (OBRADOVIC et al., 2021). Em contrapartida, a adiponectina age de forma antagônica na função imune, inibindo a atividade de macrófagos e induzindo a secreção de citocinas anti-inflamatórias. Os níveis séricos de adiponectina possuem correlação negativa com a obesidade (TUMMINIA et al., 2019).

É relevante destacar que a inflamação aguda é um importante processo fisiológico do corpo em resposta a uma infecção ou lesão. Entretanto, a inflamação crônica, como a apresentada no contexto da obesidade, pode desempenhar um papel na patogênese de diferentes doenças, incluindo alguns tipos de câncer. O tecido adiposo obeso favorece o desenvolvimento e progressão tumoral através da secreção desregulada de várias adipocinas que possuem efeitos na lipólise e vias inflamatórias (LEE et al., 2015; PARK et al., 2014).

O câncer tem sido descrito como um conjunto de doenças geradas por anormalidades genéticas, tais como mutações em genes supressores e oncogenes, além de alterações epigenéticas, incluindo metilação do DNA e modificação de histonas (HANAHAN; WEINBERG, 2011; SHARMA; KELLY; JONES, 2010). Segundo Hanahan e Weinberg, uma série de alterações interferem na fisiologia de uma célula normal para a transformação maligna: autossuficiência em fatores de crescimento; insensibilidade a fatores inibitórios de proliferação; capacidade de evasão à apoptose; potencial replicativo desordenado; angiogênese sustentada; invasão tecidual e metástase; reprogramação do metabolismo da energia celular e evasão da ação de células do sistema imunológico. A aquisição desses marcadores está associada ao aumento da instabilidade genômica e ao estabelecimento de um microambiente inflamatório, proporcionando às células tumorais a capacidade de sobreviver, proliferar e disseminar (HANAHAN; WEINBERG, 2011; NEGRINI; GORGOULIS; HALAZONETIS, 2010).

### 1.3 CÂNCER DE MAMA E OBESIDADE

O câncer de mama recebe destaque pela elevada incidência e mortalidade. Em 2020, correspondeu por cerca de 30% dos novos casos de câncer em mulheres no Brasil, com mais de 18.000 óbitos (FIGURA 4) (INCA, 2021). No mesmo ano, 2,3 milhões de mulheres tinham o diagnóstico de câncer de mama em todo o mundo, chegando a 685.000 mortes (WHO, 2021).

	Localização Primária	Casos	%
Mulheres 	Mama feminina	66.280	29,7%
	Cólon e reto	20.470	9,2%
	Colo do útero	16.590	7,4%
	Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
	Glândula tireoide	11.950	5,4%
	Estômago	7.870	3,5%
	Ovário	6.650	3,0%
	Corpo do útero	6.540	2,9%
	Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
	Sistema nervoso central	5.220	2,3%

**Figura 4. Incidência dos tipos de câncer mais frequentes em mulheres no Brasil.** Número de casos estimados conforme a localização primária do tumor em mulheres no Brasil, 2020. Adaptado de: INCA, 2021.

Considerada uma doença heterogênea, o câncer de mama possui diferentes formas de classificação, como a histológica ou de acordo com um painel de expressão gênica (ŁUKASIEWICZ et al., 2021). Levando em consideração o perfil de transcritos, o câncer de mama pode ser classificado em cinco subtipos intrínsecos: HER2 (receptor de crescimento epidérmico humano 2) enriquecido, Luminal A, Luminal B, Basal-Símile e Baixa Expressão de Claudina (TURNER et al., 2021).

Importante considerar que subtipos moleculares distintos podem coexistir em um mesmo tumor, apresentando heterogeneidade de fenótipos celulares. Além disso, o perfil molecular pode representar um estado provisório e não permanente, isto é, existem mecanismos que possibilitam a mudança no fenótipo das células tumorais (TURNER et al., 2021; YEO; GUAN, 2017).

Uma vez que os ensaios moleculares utilizados para classificação do câncer de mama apresentam custos significativos, subgrupos baseados na anatomia e marcadores imuno-histoquímicos são tradicionalmente utilizados para tomada de

decisões de tratamento e prognóstico. Entre estes parâmetros estão: tamanho e grau do tumor, e marcações como do receptor de progesterona (RP), receptor de estrogênio (RE), HER2 e Ki67 (marcador de proliferação celular). Neste contexto, o câncer de mama pode ser classificado em três subtipos clínicos principais: luminal (expressa RE e/ou RP), HER-2+ e triplo negativo (EMENS, 2018).

O tipo luminal pode ainda ser dividido em subtipo A e B. O câncer de mama luminal A apresenta alta expressão do receptor de estrógeno (RE) e/ou receptor de progesterona (RP), ausência de HER2, e baixa expressão de genes relacionados a proliferação celular, como MKI67. Apesar de expressarem níveis semelhantes de RE, o subtipo luminal B se diferencia do A pela expressão variada de RP e HER2, podendo ser RP negativo e/ou HER2 positivo (ŁUKASIEWICZ et al., 2021; TURNER et al., 2021).

Os tumores enriquecidos com HER2 são caracterizados pela expressão elevada deste receptor e ausência dos receptores hormonais de estrogênio e progesterona. Além disso, também apresentam maior expressão de genes relacionados a proliferação celular. Este grupo representa de 10 a 15% dos cânceres de mama e geralmente possuem crescimento mais acelerado quando comparado aos luminais (ŁUKASIEWICZ et al., 2021; TURNER et al., 2021).

A ausência dos receptores hormonais (estrogênio e progesterona) e do HER2 é característica do câncer de mama triplo negativo, que correspondem a cerca de 20% de todos os tumores de mama. Sua prevalência é mais comum em mulheres mais jovens, abaixo dos 40 anos, e muitas vezes associados a um pior prognóstico (GARRIDO-CASTRO; LIN; POLYAK, 2019). Estes tumores constituem um grupo heterogêneo e como a ausência dos receptores é uma propriedade de grande relevância clínica, o termo triplo negativo muitas vezes é utilizado na literatura para designar outros subtipos moleculares como o basal-símile. De fato, entre 50 a 70% dos tumores TN são classificados como basais (PRAT et al., 2010).

É justamente na possibilidade de terapias particulares que a prática clínica se norteia, buscando preservar os pacientes de procedimentos como a quimioterapia. Por exemplo, a terapia anti-estrogênio é recomendada para o tratamento de tumores que apresentam superexpressão de RE, enquanto anticorpos monoclonais anti-HER2 (como Trastuzumabe e Pertuzumabe) são utilizados no tratamento dos tumores que superexpressam HER2 (HARBECK et al., 2019). Devido ao fenótipo molecular e alta

heterogeneidade do grupo, os tumores TN ainda carecem de terapias alvo eficazes, tornando a quimioterapia o principal tratamento nesses casos (YIN et al., 2020).

Além da obesidade ser um fator de risco para o câncer de mama, sabe-se que diferentes tratamentos em pacientes com obesidade, são menos eficazes do que em pacientes não obesas (LEE et al., 2019). É importante destacar que além da obesidade, outros fatores são considerados de risco para o câncer de mama, entre eles, sexo feminino, idade avançada, histórico familiar da doença, mutações genéticas (como nos genes BRCA1 e BRCA2), sedentarismo, consumo excessivo de álcool, ingestão de alimentos processados, tabagismo (ŁUKASIEWICZ et al., 2021).

Segundo Bowers e colaboradores, em mulheres na pós-menopausa a obesidade aumenta o risco de câncer de mama em aproximadamente 40% (BOWERS et al., 2013). Estudos mostraram o aumento da recorrência metastática, diminuição do intervalo livre de doença e diminuição na sobrevida em pacientes de câncer de mama com obesidade (MAJED et al., 2007; PORTER et al., 2006). Curiosamente, a obesidade também pode ter efeito na promoção do câncer de mama triplo negativo pela ação do estrogênio, por mecanismos independentes do seu receptor (CHEN; DING; WANG, 2016; GUPTA et al., 2007; SUN et al., 2017).

Como mencionado anteriormente, a secreção desregulada de adipocinas presente no contexto da obesidade, tem um importante papel na patogênese e desenvolvimento do câncer. Estudos identificaram que níveis séricos de leptina estavam correlacionados positivamente tanto com a obesidade, como a presença e pior prognóstico do câncer de mama (CHEN et al., 2006; SULTANA et al., 2017). Além disso, em comparação ao tecido mamário normal, a expressão do receptor da leptina também é aumentada no tumor (SÁNCHEZ-JIMÉNEZ et al., 2019). Alshaker e colaboradores demonstraram que o gene deste receptor estava com níveis elevados em pacientes com maior IMC e nas metástases de tumores RE-negativos (ALSHAKER et al., 2014). A leptina também foi associada à regulação positiva do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e seu receptor tipo 2 (VEGFR2), induzindo a angiogênese no câncer de mama (ZHOU; GUO; GONZALEZ-PEREZ, 2010). Em contrapartida, a adiponectina apresenta uma correlação negativa à progressão tumoral (SONI; TORVUND; MANDAL, 2021). Interessantemente, a proporção nos níveis das duas adipocinas, adiponectina e leptina, é um fator importante na tumorigênese do câncer de mama (GROSSMANN et al., 2010).

Níveis elevados de IL-6 também vem sendo correlacionados a um pior prognóstico e metástase do câncer de mama (CHEN et al., 2022). A regulação positiva de IL-6 presente na obesidade, foi apontada como um dos possíveis mecanismos de resistência à terapia anti-VEGF neste tipo de tumor (INCIO et al., 2018). Um estudo mostrou que IL-6 secretada por pré-adipócitos aumentou a proliferação, migração e invasão celular *in vitro*. Além disso, em modelo tumoral de xenoinxerto, coinjeção de pré-adipócitos aumentou, ao passo que a neutralização de IL-6 inibiu o crescimento do tumor de mama (KIM et al., 2018). O TNF- $\alpha$  é outra adipocina pro-inflamatória aumentada na obesidade e associada a progressão deste tipo de câncer, agindo na migração e invasão das células tumorais (ASIEDU et al., 2011; LIANG; ZHANG; FU, 2007). Além disso, o TNF- $\alpha$  induz a secreção de leptina e IL-6 no tecido adiposo (DEVERICKS et al., 2022). A família de citocinas IL-1 também foi descrita como importante agente pró-tumoral, atuando principalmente nos processos de invasão e metástase óssea (NUTTER et al., 2014; TEMPLETON et al., 2015; TULOTTA; OTTEWELL, 2018).

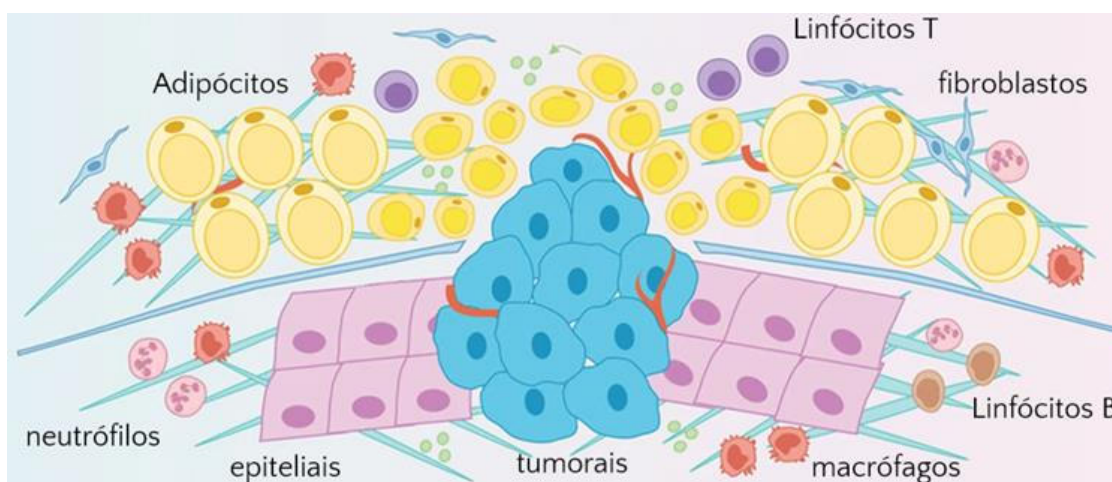
A metástase é um processo complexo e representa a principal causa de morte em pacientes com câncer de mama. Primeiramente, as células tumorais derivadas do epitélio adquirem a capacidade de migrar e invadir, permitindo o intravasamento para circulação. Essas células devem sobreviver em condições adversas, como a perda de adesão ao substrato, e algumas conseguem extravasar da circulação e se infiltrar em um local distante para formar um nicho metastático (ANNETT; MOORE; ROBSON, 2020).

Durante as etapas iniciais da metástase as células tumorais passam por um dinâmico evento morfogenético chamado de transição epitélio-mesenquimal (TEM). É durante este processo que as células epiteliais adquirem um fenótipo mesenquimal, proporcionando forte capacidade de migração e invasão. Para isso acontecer, comumente ocorrem uma série de modificações, incluindo a perda de adesão e junção celular, reorganização do citoesqueleto e alongamento celular (SAITOH, 2018).

A inflamação crônica tem sido associada à promoção da TEM em diversos tipos de tumores (COHEN et al., 2015; SUAREZ-CARMONA et al., 2017). Um estudo mostrou que a obesidade induzida por dieta hiperlipídica em camundongos, promoveu a transição epitélio-mesenquimal das células tumorais, impulsionando o desenvolvimento e metástase do câncer de mama triplo negativo (BOUSQUENAUD

et al., 2018). Em um trabalho semelhante, este efeito foi associado com a via de sinalização da leptina (BOWERS et al., 2018). A relação entre TEM e inflamação tem sido descrita a partir da ação de um ou mais mediadores inflamatórios. Asiedu e colaboradores constataram que a ação de TGF- $\beta$  em sinergia com TNF- $\alpha$  foi capaz de promover a TEM em células tumorais de mama (ASIEDU et al., 2011). Este processo também foi estimulado pela sinalização da via IL-6/STAT3 (GYAMFI et al., 2018). Além disso, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  produzidos por macrófagos, foram capazes de induzir a secreção de TGF- $\beta$ , promovendo a TEM e aumentando a migração em células da linhagem MCF-7 (SINGH; SHANKAR; SAINIS, 2014).

Além das tumorais, diferentes tipos de células compõem o microambiente do tumor, incluindo fibroblastos, adipócitos, células endoteliais e imunes, juntamente com componentes da matriz extracelular (FIGURA 5)(BAGHBAN et al., 2020). As células tumorais podem reprogramar e controlar a função das células estromais, de forma a suportar o crescimento tumoral e metástase (ZHAO et al., 2020). Além da inflamação local do tecido adiposo mamário, sabe-se que a inflamação de outros depósitos de TA apresenta consequências sistêmicas na progressão do câncer de mama (HOWE et al., 2013). Dentre os mecanismos de comunicação entre as células estão as vesículas extracelulares, podendo atuar tanto a nível local, como sistêmico (ZHANG et al., 2019).



**Figura 5. Microambiente tumoral.** Além das células tumorais, outros tipos celulares, bem como vasos sanguíneos e matriz extracelular compõem o microambiente do tumor. Adaptado de: Zhao et al., 2020.



#### 1.4 VESÍCULAS EXTRACELULARES E A COMUNICAÇÃO ENTRE CÉLULAS

Descritas inicialmente como uma forma de eliminação seletiva de componentes celulares, hoje se sabe que as vesículas extracelulares (VEs) são importantes agentes de comunicação célula a célula. Essas vesículas podem interagir de diferentes formas com a célula alvo, incluindo ativação de receptores de superfície e através do transporte de moléculas biologicamente ativas, como proteínas, mediadores lipídicos e ácidos nucleicos (ZHANG et al., 2019). As VEs compreendem um grupo heterogêneo de vesículas e comumente são classificadas em 3 subgrupos principais: microvesículas, exossomos e corpos apoptóticos, que podem diferir em sua biogênese, morfologia, tamanho e composição (DOYLE; WANG, 2019).

As microvesículas são um grupo de vesículas extracelulares que se originam por brotamento direto da membrana plasmática. É um grupo com grande diversidade de tamanho, variando de 100 nm a 1  $\mu$ m. Os corpos apoptóticos também são vesículas heterogêneas considerando o diâmetro, podendo variar de 50 nm a 5000 nm. Eles são liberados pelas células mortas através da separação da membrana plasmática após perturbação hidrostática (WILLMS et al., 2018).

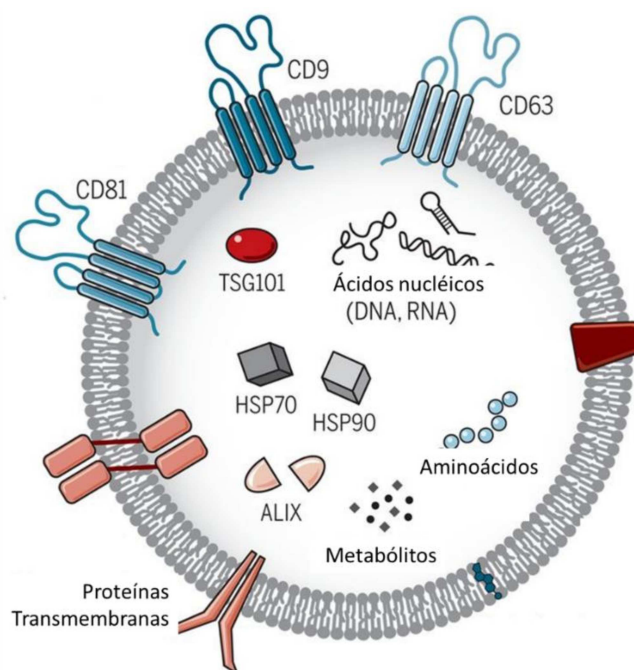
Os exossomos, por sua vez, apresentam o tamanho que varia de 30 a 150 nm. Estas VEs são envoltas por uma bicamada lipídica e carregam uma variedade de conteúdo citoplasmático, de acordo com a natureza da célula doadora. Entre os componentes transportados pelos exossomos estão proteínas, lipídios, e ácidos nucleicos como DNA, mRNA e microRNA (FIGURA 6) (LLORENTE et al., 2013). MicroRNAs são moléculas não codificantes que podem regular negativamente a expressão de determinado gene. Esse tipo de RNA é o mais encontrado nos exossomos, refletindo no grande número de trabalhos que os correlacionam (ZHANG et al., 2015).

A nomenclatura e definição das vesículas extracelulares passou por mudanças ao longo do tempo, principalmente pela dificuldade de padronização das metodologias de obtenção e pela falta de marcadores específicos para alguns subtipos, como exossomos e microvesículas. Por essa razão, desde 2018, pesquisadores da Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares recomendam o uso de termos mais descritivos, baseados em aspectos como, tamanho das partículas, composição bioquímica e células/tecido de origem (THÉRY et al., 2018). Em relação ao tamanho por exemplo, considera-se como VEs pequenas (pVEs) aquelas menores que 200nm, enquanto VEs médias/grandes aquelas maiores que



200nm (THÉRY et al., 2018). Entretanto, além de uma vasta literatura publicada anteriormente com a nomenclatura baseada na biogênese, ainda hoje, muitos pesquisadores preferem utilizá-la, principalmente para definição de exossomos (WITWER; THÉRY, 2019).

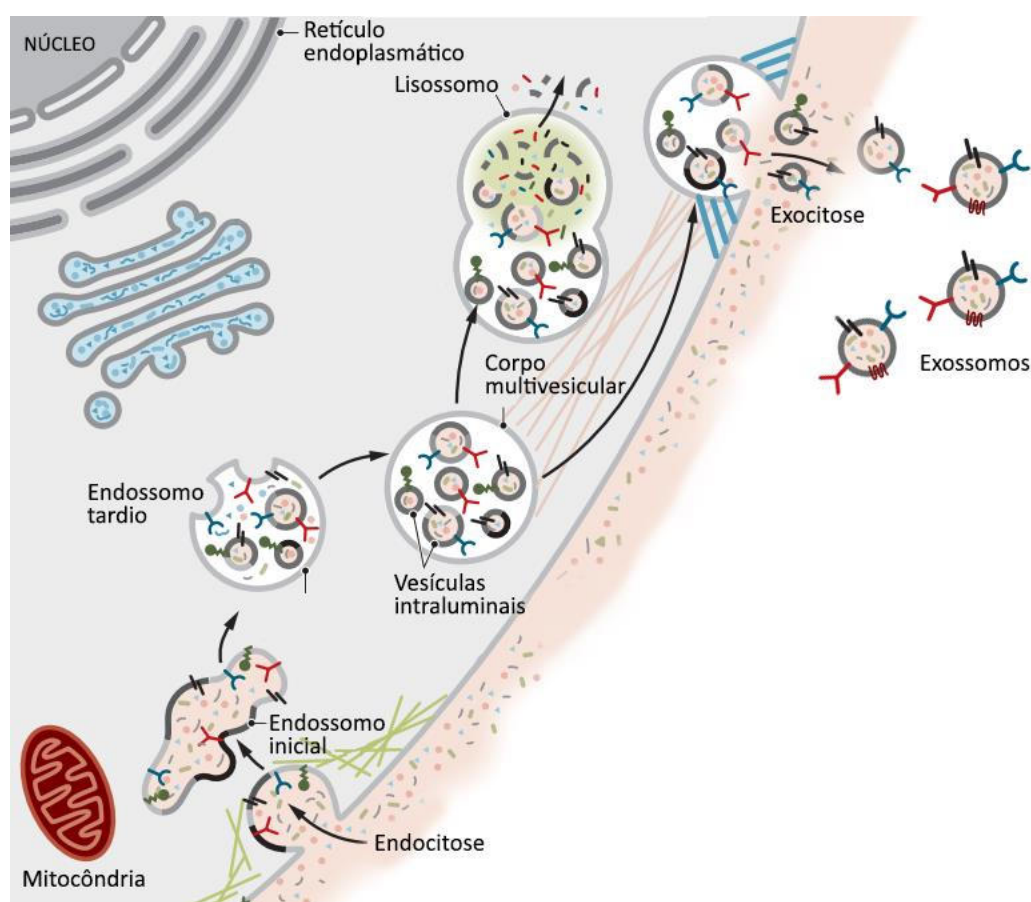
De origem endocítica, os exossomos se formam dentro de corpos multivesiculares. Estas estruturas são compartimentos endossomais ricas em vesículas intraluminais, que por sua vez englobam componentes citoplasmáticos como proteínas e ácidos nucleicos. Os corpos multivesiculares podem se fundir com a membrana plasmática da célula, liberando as vesículas intraluminais para o meio extracelular, que a partir deste momento passam a ser denominadas exossomos. Em alternativa, estes corpos multivesiculares podem ser enviados ao lisossoma para que sejam degradados juntamente com seu conteúdo (FIGURA 7) (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013; RECORD et al., 2018).



**Figura 6 - Estrutura e composição dos exossomos.** Exossomos são compostos de uma bicamada lipídica e podem carrear proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e metabólitos. Adaptado de: Gurung et al., 2021.

Dentre os mecanismos relatados neste processo de biogênese, a via que envolve proteínas do Complexo de Triagem Endossomal Necessário para Transporte (*endosomal sorting complex required for transport* - ESCRT) recebe destaque. A maquinaria deste complexo participa da formação e secreção das vesículas

intraluminais, bem como do transporte de corpos multivesiculares. Por esse motivo, componentes do ESCRT e outras proteínas acessórias são comumente encontradas nos exossomos, entre elas ALIX, TSG101, HSP70 e HSP90 $\beta$ . Estudos indicaram que a biogênese dos exossomos pode acontecer por outros mecanismos, independentes de ESCRT (GURUNG et al., 2021; KALLURI; LEBLEU, 2020). Um exemplo é a participação das tetraspaninas, uma família de proteínas integrais de membrana, que também desempenham um importante papel nesse processo. Por esse motivo, as tetraspaninas como CD9, CD63 e CD81, frequentemente são usadas como biomarcadores de exossomos (ZHANG et al., 2015). Em contrapartida, por haver menor interação de endossomos com o aparelho de Golgi e retículo endoplasmático durante a formação dos exossomos, proteínas associadas a estas organelas se encontram em níveis mais baixos nessas vesículas, e sendo comumente utilizadas como marcadores não exossomais, como é o caso da Calnexina (ZHANG et al., 2015).



**Figura 7. Biogênese e secreção de exossomos.** Exossomos tem origem endocítica e são liberados para o meio extracelular pela fusão de corpos multivesiculares com a membrana plasmática. Adaptado de: Kalluri et al., 2020.

Após serem liberados, os exossomos se ligam a célula-alvo e podem interagir diretamente com receptores extracelulares ou através da liberação da carga dentro da célula. Este mecanismo pode acontecer via fusão direta com a membrana plasmática ou internalização por meio de fagocitose, endocitose mediada por clatrina/caveolina, entre outras (RECORD et al., 2018).

Presente na maioria dos fluidos biológicos, os exossomos podem ser encontrados na urina, plasma e saliva. Como o conteúdo dessas VEs depende da origem celular e condições fisiológicas, concentrações e composição dessas vesículas circulantes podem servir como biomarcadores para algumas doenças, incluindo diversos tipos de tumores (DOYLE; WANG, 2019; ZHANG et al., 2019).

As células tumorais são capazes de se comunicar com o microambiente circundante através da secreção de exossomos. Por intermédio da transferência do conteúdo bioativo, essas vesículas podem alterar o comportamento das células estromais e criar um nicho pró-tumoral, atuando nos processos de angiogênese, invasão e evasão da vigilância imunológica (WILLMS et al., 2018). Além disso, ao entrar na circulação e alcançar órgãos distantes, os exossomos podem favorecer a formação do nicho pré-metastático (BEBELMAN et al., 2018).

Em um modelo murino de câncer de mama, Yang e colaboradores observaram que houve um aumento do crescimento tumoral e metástase em camundongos tratados com exossomos derivados das linhagens tumorais MDA-MB-231 e MCF-7, comparados aqueles inoculados com exossomos provenientes da linhagem epitelial normal de mama MCF-10A. Além disso, eles observaram que os exossomos das linhagens tumorais promoveram a ativação de fibroblastos que por sua vez favoreceram a migração e invasão celular via miR-146a (YANG et al., 2020). Exossomos de células de câncer de mama quimiorresistentes, induziram a transição epitélio-mesenquimal e a quimiorresistência de células tumorais sensíveis, através do transporte do miR-155 (SANTOS et al., 2018). Outros estudos também constataram a participação de diversos miRNAs exossomais na proliferação e metástase do câncer de mama (MEDEIROS; ALLAN, 2019; WANG et al., 2020; ZHOU et al., 2014). Fong e colaboradores mostraram que exossomos derivados de células tumorais auxiliaram a metástase, através da reprogramação metabólica de células normais no nicho metastático (FONG et al., 2015).

Os efeitos dessas VEs na resposta do sistema imune contra o câncer de mama também foram investigados. Estudos mostraram que exossomos de células

tumorais foram internalizados por macrófagos e induziram a polarização M2, favorecendo o crescimento e metástase tumoral em modelo murino (PIAO et al., 2017; XUN et al., 2021). O tratamento com 20µg de exossomos derivados da linhagem tumoral murina 4T1, induziu a produção de IL-1β, IL-6 e TNF-α em macrófagos, favorecendo a progressão do tumor (GUO et al., 2020). Também em modelo murino, Sunyoung e colaboradores identificaram que exossomos provenientes de células tumorais, induziram a via IL-6/STAT3 em macrófagos derivados da medula óssea, regulando citocinas pró e anti-inflamatórias e criando um ambiente pró-tumoral (HAM et al., 2018). Prejudicando a imunovigilância, PD-L1 (*Programmed-Death Ligand 1*) exossomal de células tumorais, inibiu a ativação e resposta de células T *in vitro* e *in vivo* (YANG et al., 2018). Inicialmente, os estudos sobre a participação de VEs no microambiente tumoral desconsideravam, em sua maior parte, os efeitos daquelas provenientes de células estromais. Atentando para uma via de mão dupla, trabalhos recentes têm relatado o papel dessas VEs em processos importantes da progressão de diversos tipos de tumores (LI; NABET, 2019)

Fibroblastos associados ao câncer favoreceram a proliferação, migração e invasão *in vitro* de células MDA-MB-231 e MCF-7 através de exossomos. Além disso, observou-se que miR-500a-5p, superexpresso nos exossomos desses fibroblastos, foi capaz de promover a transição epitélio-mesenquimal e aumentar o crescimento e metástase tumoral em modelo murino de xenoenxerto (CHEN et al., 2021). Dou e colaboradores mostraram que exossomos derivados de fibroblastos foram capazes de aumentar a expressão de PD-L1 em células do câncer de mama, induzindo a apoptose de células T e prejudicando a resposta imune (DOU et al., 2020). Interessantemente, um trabalho demonstrou que exossomos liberados por células T infiltradas no tumor, aumentaram a morte de células tumorais. Foi observado que estes exossomos continham PD-1 ligado à membrana, e através disso foram capazes de promover a internalização de PD-L1 das células tumorais e formar aglomerados com os exossomos secretados por essas células, suprimindo a ligação PD-1/PD-L1 e aumentando a atividade antitumoral (QIU et al., 2021).

VEs provenientes de adipócitos diferenciados de células tronco mesenquimais, foram incorporadas e promoveram a proliferação, migração e quimiorresistência de células MCF-7 (WANG et al., 2019b). Adipócitos humanos induziram a transição epitélio-mesenquimal de células de câncer de mama, através da liberação destas vesículas. Além disso, o estudo demonstrou que este efeito foi

ainda maior quando se utilizou exossomos de adipócitos provenientes de pacientes com diabetes tipo 2, evidenciando o papel das células metabolicamente anormais neste tipo de tumor (JAFARI et al., 2021).

Apesar do aumento expressivo no número de trabalhos envolvendo vesículas extracelulares e diversos tipos de tumores, o papel dessas vesículas provenientes do tecido adiposo ainda é pouco estudado. Além disso, considerando que o conteúdo transportado por elas está relacionado com a fisiologia do tecido de origem, compreender seu papel na promoção e progressão do câncer de mama no contexto da obesidade, é de grande relevância.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Estudar os efeitos de vesículas extracelulares provenientes do tecido adiposo na biologia de células do câncer de mama.

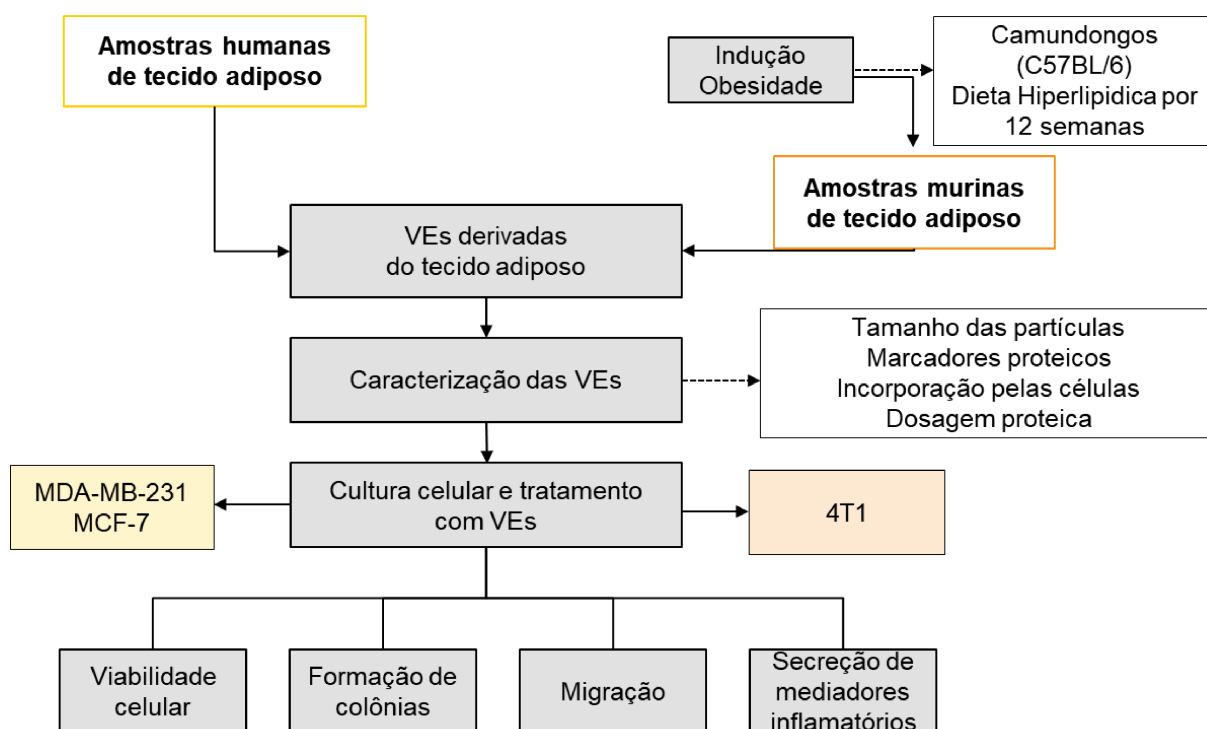
### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Caracterizar as vesículas extracelulares isoladas do tecido adiposo.
- Avaliar os efeitos *in vitro* das vesículas extracelulares provenientes do tecido adiposo na viabilidade, crescimento, capacidade clonogênica e migração de células do câncer de mama.
- Analisar a produção de mediadores inflamatórios nas células tumorais de mama tratadas com vesículas extracelulares do tecido adiposo obeso e eutrófico.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para o desenvolvimento do presente estudo elaboramos o delineamento experimental representado na Figura 8. Amostras humanas e murinas de tecido adiposo (obeso e eutrófico) foram coletadas para obtenção de VEs. Logo em seguida, realizamos a caracterização dessas vesículas através do tamanho, marcadores proteicos e capacidade de internalização nas células. Linhagens celulares de câncer de mama, humanas (MDA-MB-231 e MCF-7) e murina (4T1), foram tratadas com respectivas VEs. O efeito nas células tumorais foi avaliado através de ensaios funcionais de viabilidade celular, formação de colônias e migração. Além disso avaliamos o efeito das VEs do TA na secreção de mediadores inflamatórios.



**Figura 8. Esquema do delineamento experimental.** De modo geral, isolamos as vesículas extracelulares do tecido adiposo (obeso e eutrófico), tanto em amostras humanas, como em amostras murinas. Após caracterização destas vesículas extracelulares, buscamos avaliar seus efeitos no comportamento de células do câncer de mama. Fonte: elaborada pelo autor (2022).

### 3.2 MODELO DE OBESIDADE INDUZIDO POR DIETA EM CAMUNDONGOS C57BL/6

Sob aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) (número 038/2019) foram utilizados camundongos C57BL/6, com idade entre 4 e 6 semanas obtidos do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução, da Universidade Federal de Juiz de Fora. Os animais foram acondicionados em gaiolas e mantidos em alojamento com ciclo de fotoperíodo de 12h claro/12h escuro durante todo o período experimental. Foram distribuídos aleatoriamente em grupos controle (alimentados com dieta padrão-Nuvilab) e obeso (alimentados com dieta hiperlipídica, produzida em nosso laboratório). Para produção da ração hiperlipídica, os ingredientes foram pesados, homogeneizados e a massa obtida foi armazenada e conservada a -20°C. As quilocalorias da ração hiperlipídica tinham como fonte: 28,6% de carboidratos, 14,4% de proteínas e 57% de lipídeos (TABELA 02). Por sua vez, a ração padrão apresentava em sua composição nutricional: 55% de carboidratos, 22% de proteínas e apenas 4,5% de lipídeos.

**Tabela 2:** Composição da dieta hiperlipídica

<b>Ingredientes</b>	<b>g/Kg</b>
Caseína	200,0
Sacarose	100,0
Amido de milho	115,5
Amido Dextrinizado	132,0
Banha	312,0
Óleo de soja	40,0
Celulose	50,0
Mistura de minerais AIN-93	35,0
Mistura de vitaminas AIN-93	10,0
L-cistina	3,0
Bitartarato de Colina	2,5

Fonte: elaborada pelo autor (2022).

Os animais foram pesados individualmente uma vez a cada semana durante todo o período experimental. Para o cálculo do consumo de ração por gaiola,



cada semana realizamos a pesagem da ração ofertada e da sobra. Após 12 semanas de dieta, os animais foram eutanasiados e o tecido adiposo perigonadal de cada animal foi retirado com auxílio de pinça e tesoura, foi então pesado e seguiu para o isolamento de VEs como descrito na próxima seção.

### **3.3 OBTENÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DO TECIDO ADIPOSEO**

As VEs foram isoladas do tecido adiposo de camundongos (como descrito anteriormente na seção 3.2) e a partir de amostras humanas. Para este procedimento, o projeto foi submetido (número: 85521518.4.0000.5147) e aprovado (parecer: 5.321.687) pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Juiz de Fora. As amostras de tecido adiposo foram coletadas de voluntários com obesidade submetidos a cirurgia bariátrica (IMC>35) e voluntários eutróficos (IMC>18 e <25) submetidos a cirurgias abdominais. Tanto para o processamento das amostras humanas, assim como das murinas, o tecido adiposo foi fragmentado em pequenos pedaços com auxílio de pinça e bisturi. Os pedaços de tecido foram então cultivados em placas de petri (Sarsted, Alemanha) em DMEM suplementado com penicilina, estreptomicina (100 µg/mL) mantidas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24 horas, o meio condicionado da cultura de tecido foi coletado para o isolamento das VEs pelo método de ultracentrifugação (FIGURA 9). Primeiramente, o meio condicionado foi submetido a 3 etapas de centrifugação, onde o sobrenadante de cada etapa passou para a seguinte (300g por 15 minutos, 2000g por 15 minutos e a 20000g por 45 minutos) todas a 4°C. O sobrenadante proveniente desta última centrifugação foi então filtrado (0.22 µm) e ultracentrifugado a 100000g, por 70 minutos a 4°C. O pellet resultante foi ressuscitado em PBS (tampão fosfato salina), filtrado em 0.22 µm, e ultracentrifugado novamente sob as mesmas condições. Finalmente o pellet obtido foi ressuscitado em aproximadamente 100 microlitros de PBS (filtrado), aliqotado em microtubos e congelados à -80°C. Cada amostra de VEs foi descongelada por no máximo 2 vezes.



**Figura 9. Esquema do protocolo de isolamento das vesículas extracelulares.** O meio de cultura do tecido adiposo foi coletado após 24 horas e iniciou-se o processo de obtenção das VEs pelo método de ultracentrifugação. Fonte: elaborada pelo autor (2022).

### 3.4 CARACTERIZAÇÃO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES

#### 3.4.1 Análise da expressão de proteínas por *western blot*

Para verificar a expressão de CD81 e calnexina, nós utilizamos pontos diversos do processo de isolamento das VEs do tecido adiposo obeso: o pellet final da ultracentrifugação (contendo as partículas desejadas) e o sobrenadante da primeira ultracentrifugação a 100000g (amostra sem vesículas). A extração proteica das VEs isoladas foi realizada através da adição de 1% de Triton X-100 e inibidores de proteases e fosfatases. Após 30 minutos em gelo, a amostra foi sonicada por 30 segundos e em seguida condicionada por mais 30 minutos em gelo. A dosagem do conteúdo proteico presente nas amostras foi realizada através do método de Bradford, utilizando o reagente Bio-Rad *protein assay dye* (Bio-Rad Laboratories, CA, EUA) contendo o composto Comassie Blue. As proteínas provenientes dos lisados foram então separadas mediante SDS-PAGE em gel de acrilamida por aproximadamente 1 hora, 300V e 50mA. Em seguida as proteínas foram transferidas para membranas de PVDF do Kit de transferência Trans-Blot Turbo™ Transfer system (Bio-Rad Laboratories, CA, EUA) (7 minutos, 100V, 300mA). As membranas de PVDF contendo as proteínas foram então incubadas com o anticorpo primário específico diluído em TBS-Tween (0,1% Tween-20, 10 mM Tris, 150mM NaCl, pH 7.4), *overnight* a 4°C e sob agitação. No dia seguinte, as membranas foram lavadas 3 vezes com TBS-Tween por 10 minutos e incubadas com respectivos anticorpos secundários (conjugados ao HRP) diluídos em TBS-Tween por 90 minutos, em temperatura ambiente, também sob agitação. As membranas foram lavadas 5 vezes por 10 minutos com TBS-Tween e reveladas com kit de detecção de quimiluminescência (ECL detection kit, Immobilon, Merck-Millipore) no instrumento Chemidoc (Chemidoc™ Touch, BIO-RAD). Como anticorpos primários foram utilizados Anti-CD81 (sc-166029, Santa Cruz), Anti-

Calnexina (sc-23954, Santa Cruz) e FABP4 (Santa Cruz), todos diluídos a 1:500. Os respectivos anticorpos secundários utilizados foram diluídos a 1:2000.

#### **3.4.2 Análise do tamanho das vesículas extracelulares por espalhamento dinâmico da luz.**

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

#### **3.4.3 Quantificação proteica das amostras de vesículas extracelulares.**

Após a obtenção das VEs, uma alíquota da amostra foi destinada à dosagem do conteúdo proteico com a utilização do kit *Micro BCA Protein Assay* (Thermo Fisher Scientific, EUA), seguindo a metodologia proposta pelo fabricante

#### **3.4.4 Análise da internalização das vesículas extracelulares pelas células tumorais.**

Para visualização da internalização das VEs, as células foram previamente plaqueadas em placas de 24 poços, contendo uma lamínula de vidro em cada poço, e após 24h iniciou-se a marcação. Primeiramente, amostras de VEs do tecido adiposo obeso ou do meio condicionado livre de VEs, foram diluídas em PBS para concentração proteica final de 50 µg/mL e volume final de 500 µL. As amostras foram então depositadas em tubos de ultracentrifuga e 3 µL da sonda lipofílica PKH26 (Sigma-Aldrich, EUA) foram adicionados em cada um deles. Um tubo adicional contendo apenas PBS mais 3 µL de PKH26 foi utilizado como controle da marcação. Após 3 minutos de incubação, acrescentou-se em cada tubo 1 mL de PBS suplementado com 5% de SFB livre de exossomos. As amostras foram então preenchidas com DMEM e ultracentrifugadas a 110000g por 1h a 4°C para lavagem do excesso de marcação. Após este processo, o meio foi retirado e o pellet final contendo cerca de 100 µL foi utilizado para tratamento das células. As células MDA-MB-231 e MCF-7 foram então tratadas com 15 µL do respectivo grupo amostral marcado com PKH26. Após 4 horas de tratamento, o meio foi retirado, os poços lavados com PBS e as células fixadas em

paraformoldeído 4% por 20 minutos. As células foram lavadas 2 vezes com PBS e então incubadas com Hoechst (Sigma-Aldrich, EUA) na diluição 1:2000 por 5 minutos no escuro. As células foram então lavadas por 3 vezes com PBS e as lâminas foram preparadas com meio de montagem para visualização em microscópio confocal Leica DMI6000CS.

### **3.5 CULTURA CELULAR**

Foram utilizadas as linhagens humanas de carcinoma mamário MDA-MB-231 (subtipo triplo negativo) e MCF-7 (subtipo luminal A), e a linhagem murina 4T1 (subtipo triplo negativo). Todas elas cultivadas em placas de cultura (Sarstedt, Alemanha) meio DMEM (Gibco, EUA) pH 7,2, suplementado com 10% de SFB (Sigma-Aldrich, EUA). As placas de cultura foram mantidas em estufa a 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. As culturas foram subcultivadas sempre que necessário; geralmente em condições de 80% de confluência. Para tal, utilizamos PBS para lavagem e tripsina para remoção das células. As células foram submetidas ao tratamento com VEs provenientes do tecido adiposo obeso e eutrófico (quando indicado). Para todos os experimentos realizados, foi realizado o tratamento na concentração de 5µg/mL de VEs para as linhagens humanas MDA-MB-231 e MCF-7 e de 1,5µg/mL de VEs para a linhagem 4T1.

### **3.6 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR**

O efeito das VEs do tecido adiposo na taxa de viabilidade das linhagens MDA-MB-231, MCF-7 e 4T1 foi avaliado a partir da contagem do número de células ao longo do tempo. Para isso, a mesma quantidade de células foi plaqueada para cada grupo experimental em placas de 24 poços (5x10<sup>3</sup> células por poço para as linhagens MDA-MB-231 e MCF-7, 1x10<sup>3</sup> células para a linhagem 4T1; todas em volume final de 500 µL). Após 24 horas de plaqueamento, as células foram lavadas com PBS e adicionou-se meio completo contendo ou não VEs obtidas de tecido adiposo. Após 48, 72 e 96 horas de tratamento, as células foram tripsinizadas e contadas com o auxílio do Azul de Trypan (15250-061, *Life Technologies*, EUA) em câmara de Neubauer. Para os gráficos de “número de células” foram consideradas apenas as células vivas. Para os gráficos de viabilidade foram consideradas as

porcentagens de células vivas em relação ao número total (células vivas + mortas). Os experimentos foram realizados em triplicata técnica e biológica.

### 3.7 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS

Para este ensaio, 200 células das linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 foram plaqueadas em placas de 12 poços. Após 24 horas, os poços foram lavados com PBS-1X e um novo meio completo contendo o respectivo tratamento foi adicionado. Após 7 dias, as placas foram lavadas com PBS e fixadas com 1mL de paraformaldeído 3,7% por 15 minutos. A coloração das colônias foi realizada através de cristal violeta 0,5% por 5 minutos. Em seguida, as placas foram lavadas com água destilada para remoção do excesso de corante e fotografadas. O número de colônias foi obtido com o auxílio do software *ImageJ*.

### 3.8 ENSAIO DE CICATRIZAÇÃO

Para avaliar a migração celular, as células foram plaqueadas com meio completo em placas de 24 poços. As linhagens MDA-MB-231, MCF-7 e 4T1 foram plaqueadas respectivamente nas densidades de  $7 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^4$  células por poço. Após 24 horas do plaqueamento, as células foram lavadas duas vezes com PBS-1X e um novo meio de cultura sem SFB foi adicionado. Após 12 horas, ao atingirem cerca de 90-95% de confluência, foi feito um risco no meio de cada poço com auxílio de ponteiros p200. Os poços foram lavados com DMEM sem SFB para remoção total das células que se desprenderam. Para cada poço foi adicionado meio DMEM contendo 0,5% de SFB e com a respectiva concentração de VEs diluída. Logo em seguida, considerando o momento do risco como tempo inicial, as placas foram levadas para aquisição de imagens com auxílio de microscópio invertido acoplado a câmera fotográfica. Cada poço foi analisado em dois pontos distintos e estes mesmos pontos foram analisados 24 e 48 horas após o tratamento/risco. Previamente ao plaqueamento das células, traçamos com auxílio de pincel marcador permanente e régua, duas retas perpendiculares ao risco no fundo de cada poço da placa. Desta forma garantimos a aquisição e análise de imagens dos mesmos pontos ao longo do tempo. A migração celular foi quantificada com auxílio do *ImageJ* com base nas imagens adquiridas.

### 3.9 DOSAGEM DE CITOCINAS

As células foram plaqueadas em placas de 6 poços nas densidades de  $1 \times 10^5$  (MDA-MB-231 e MCF-7) e  $5 \times 10^4$  (4T1) células por poço. Após 24 horas do plaqueamento os poços foram lavados com PBS-1X e um novo meio contendo os respectivos tratamentos foi adicionado. Após 24 e 48h do tratamento, o sobrenadante de cada poço foi retirado e mantido a  $-80^\circ\text{C}$  para posterior ensaio de ELISA. Foram utilizados 50  $\mu\text{L}$  de amostras sem diluição, para dosagem das citocinas IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ , VEGF e CCL5/RANTES através de ensaio imunoenzimático de captura (ELISA), de acordo com especificações do fabricante (R&D systems).

### 3.10 RT-qPCR

As células foram plaqueadas em placas de 6 poços nas densidades de  $1 \times 10^5$  (MDA-MB-231 e MCF-7) e  $5 \times 10^4$  (4T1) células por poço. Após 24 horas do plaqueamento os poços foram lavados com PBS-1X e um novo meio contendo os respectivos tratamentos foi adicionado. Após 24h de tratamento, os poços foram lavados 2 vezes com PBS-1X, e em seguida adicionamos 0,5 mL de Trizol (*Invitrogen*, Califórnia, EUA) por poço. A solução de células foi transferida para tubos e estes armazenados a  $-80^\circ\text{C}$ . Prosseguindo a extração de RNA, essas amostras foram descongeladas em gelo e adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  de clorofórmio em cada tubo, para incubação por 3 min em temperatura ambiente. As amostras foram então centrifugadas a 12000 rpm, por 15 min, a  $4^\circ\text{C}$  e a fase aquosa resultante foi coletada e transferida para outro tubo. Em cada tubo foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol e incubado por 10 min a temperatura ambiente, centrifugados a 12000 rpm por 15 min. Após este processo, o pellet foi lavado duas vezes com etanol 75%, o sobrenadante descartado e após secagem, foram adicionados 30  $\mu\text{L}$  de água livre de RNase. As amostras foram armazenadas a  $-80^\circ\text{C}$ . Posteriormente, a quantidade e qualidade de RNA foi estimada através do espectrofotômetro (NanoDrop 2000, *Thermo Fisher Scientific*, EUA). Para a síntese de cDNA, utilizamos o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Thermo Fisher Scientific, EUA) e após seguir o protocolo de acordo com o fabricante os tubos contendo cDNA foram armazenados a  $-20^\circ\text{C}$ .

Após a síntese do cDNA, realizou-se a PCR. Os iniciadores utilizados para análise da expressão de mRNAs específicos estão descritos no quadro 1. As reações foram feitas no volume final de 10  $\mu\text{L}$ , dos quais 2,5  $\mu\text{L}$  da mostra cDNA e 7,5  $\mu\text{L}$  da

solução contendo 5µL *Syber Green Master Mix* (Applied Biosystems), iniciadores senso (0,2 µL) e anti-senso (0,2 µL) de cada gene, na concentração de 10 µM e água extra pura (2,1 µL). O ensaio de PCR em tempo real foi realizado através do equipamento *Step One Plus Real-time RT-PCR System*. As sequências dos iniciadores utilizados estão descritas no Quadro 3.

Para a análise dos resultados das reações de PCR em tempo real foi utilizada a metodologia  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , em que *threshold cycle* (Ct) é o número de ciclos em que o sinal de fluorescência da reação ultrapassa o *threshold* (nível de sinal que reflete um aumento significativo sobre o sinal inicial).  $\Delta Ct$  é a diferença entre o Ct do gene de interesse (Ct<sub>alvo</sub>) e o CT do gene referência endógena (para todas as reações nós utilizamos a Actina). Já a diferença entre a as variações de Ct<sub>alvo</sub> e do Ct<sub>referência endógena</sub> é denominada  $\Delta\Delta Ct$ .

**Quadro 1.** Sequência dos iniciadores utilizados nas reações de RT-qPCR

Gene	Sequência senso	Sequência anti-senso
<i>CCL-5</i>	GGGTACCATGAAGATCTCTGC	TCTAGGGAGAGGTAGGCAAAG
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	TTGACGGACCCCAAAGAT	GAAGCTGGATGCTCTCATCTG
<i>VEGF</i>	AGACAGAACAAAGCCAGAAATCAC	CACGTCTGCGGATCTTGGAC
<i>IL-6</i>	GCTACCAAACCTGGATATAATCAGGA	CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	CTACTTTGGAGTCATTGCTCTGTG	CCAGCATCTTGTGTTTCTGAGTAG
<i>B-actina</i>	CCACCATGTACCCAGGCATT	CCACCATGTACCCAGGCATT

### 3.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas através do programa GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software). As variáveis numéricas foram testadas para distribuição normal usando o teste de Shapiro-Wilk. Para verificação de significância estatística dos experimentos com mais de dois grupos experimentais e apenas uma variável, foi utilizado o teste *OneWay* ANOVA seguida de pós teste de Bonferroni. Para as análises estatísticas dos experimentos com mais de dois grupos experimentais e mais de uma variável foi aplicado *TwoWay* ANOVA seguido dos pós-teste de Bonferroni. Para comparações envolvendo apenas dois grupos, analisamos a significância através do teste t de *student*. Em todas as análises foram considerados significativos somente aqueles resultados que apresentaram  $p < 0,05$ , com intervalo de confiança de 95%. Os dados foram mostrados como média  $\pm$  erro padrão.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 OBTENÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DO TECIDO ADIPOSEO HUMANO PELO MÉTODO DE ULTRACENTRIFUGAÇÃO

Primeiramente, para obtenção das VEs, amostras de tecido adiposo foram coletadas de voluntários obesos (n=11) submetidos a cirurgia bariátrica ou voluntários eutróficos submetidos a cirurgias abdominais (n=2). Os indivíduos obesos apresentavam IMC médio de 40.94, sendo 82% do sexo feminino e idade média de 46 anos. Enquanto os voluntários eutróficos tinham IMC médio de 24.06, 100% do sexo feminino e idade média de 65 anos (TABELA 3).

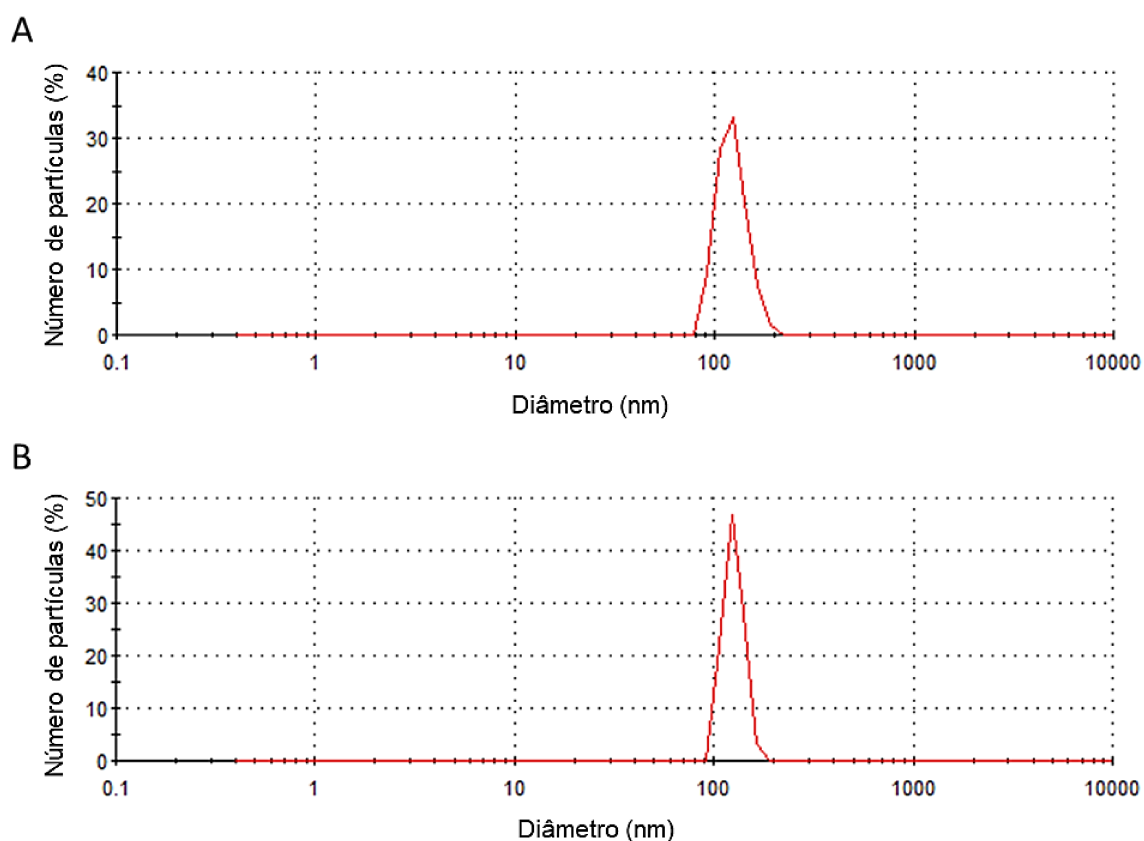
**Tabela 3.** Parâmetros dos voluntários incluídos no estudo.

	<b>Eutróficos (n=2)</b>	<b>Obesos (n=11)</b>
IMC**	24.06 ± 0.26	40.94 ± 1.99
Idade, anos*	65.5 ± 6.5	46.73 ± 3.03
Sexo, feminino	2 (100%)	9 (82%)

IMC: índice de massa corporal, F: feminino, M: masculino. Valores representam a média ± erro padrão, ou porcentagem. \*, p < 0.05; \*\*, p < 0.01.

As VEs foram isoladas pelo método de ultracentrifugação, como descrito anteriormente, e então caracterizados pelo tamanho e presença/ausência de marcadores proteicos específicos. Primeiramente, através de análises por DLS nós observamos que o diâmetro médio das partículas isoladas a partir do tecido adiposo eutrófico e obeso foi de 132±18,4 nm e 126,9±8,1 nm respectivamente (FIGURA 10).

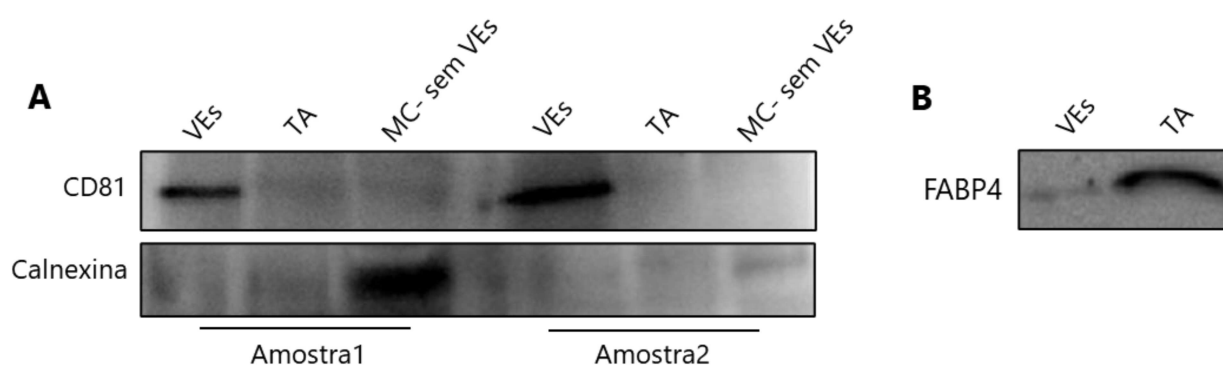




**Figura 10. Distribuição do tamanho das VEs derivadas do tecido adiposo.** Gráfico da distribuição do tamanho das partículas encontradas nas amostras de VEs do tecido adiposo. (A) Partículas isoladas do tecido adiposo eutrófico (B) Partículas isoladas do tecido adiposo obeso. Gráficos representativos da análise de amostras diferentes para cada grupo.

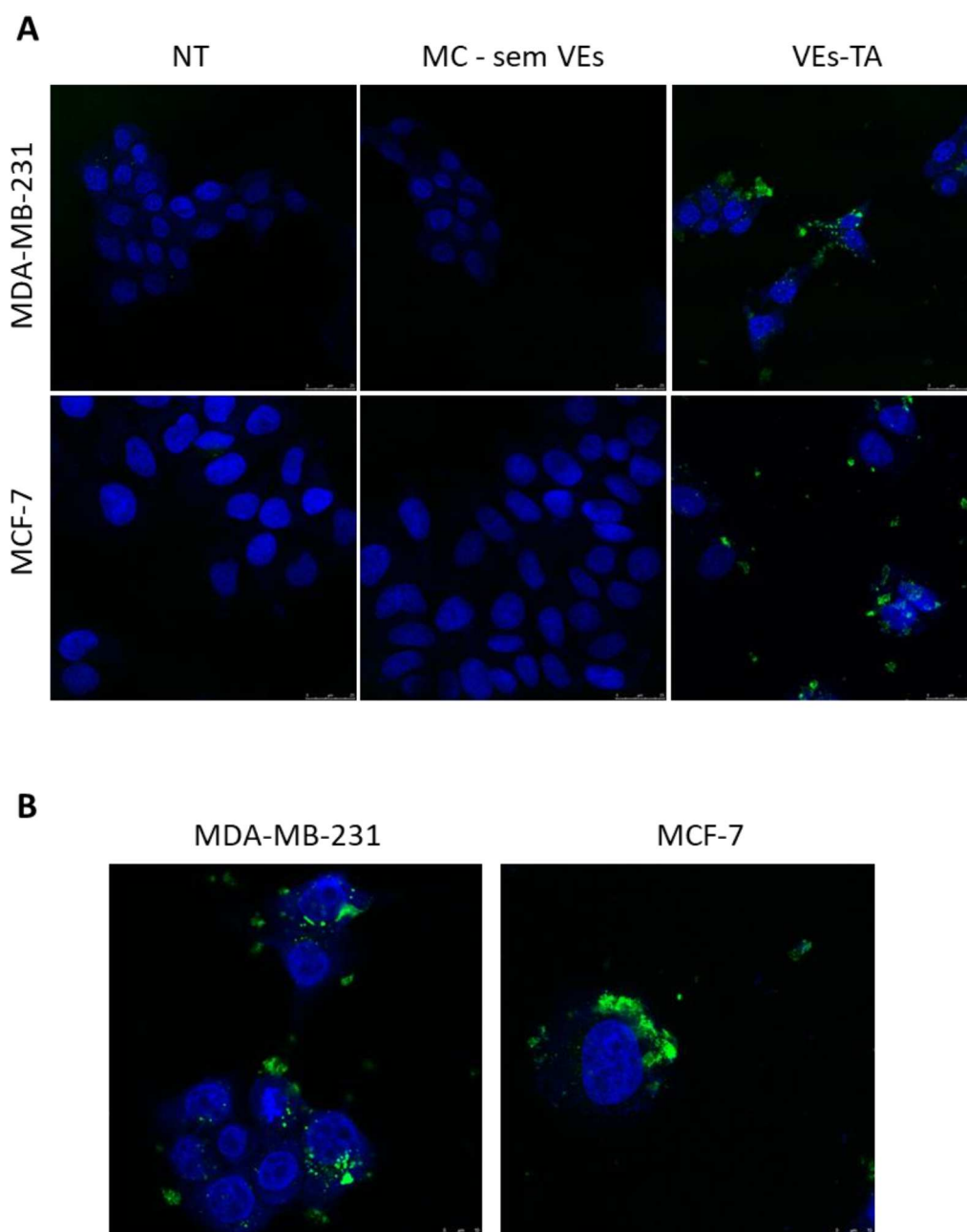
Seguindo na caracterização das partículas isoladas, nosso próximo passo foi avaliar a expressão de marcadores proteicos através da técnica de *Western Blot*. O CD81 está presente na membrana de VEs e é comumente utilizado para identificar exossomos, enquanto a calnexina vêm sendo utilizada como controle negativo para estas VEs (DOYLE; WANG, 2019). Não observamos a presença de calnexina e CD81 nas amostras de tecido adiposo (FIGURA 11A). As amostras isoladas pela ultracentrifugação sequencial revelaram a expressão do marcador CD81 e a ausência da calnexina. Como controle, também analisamos a expressão destes mesmos marcadores do sobrenadante retirado na primeira ultracentrifugação do processo de obtenção, sobrenadante este, livre de VEs. Como esperado, não constatamos a presença de CD81 neste sobrenadante, que por outro lado indicou a presença de calnexina (FIGURA 11A). Complementando a caracterização, analisamos a expressão da proteína FABP4 nas amostras de VEs e no tecido adiposo de origem. Esta proteína foi escolhida por ser altamente expressa neste tecido (ZENG; SAUTER;

LI, 2020). Observamos a presença de FABP4 tanto no tecido adiposo, como nas VEs isoladas a partir dele (FIGURA 11B).



**Figura 11. Expressão de marcadores proteicos para caracterização das VEs isoladas de tecido adiposo.** (A) expressão dos marcadores CD81 e calnexina em duas amostras distintas de VEs, respectivo tecido adiposo (TA) de origem e no meio condicionado livre de VEs (MC-sem VEs). (B) expressão da proteína FABP4 em uma amostra de VEs e do respectivo tecido adiposo de origem.

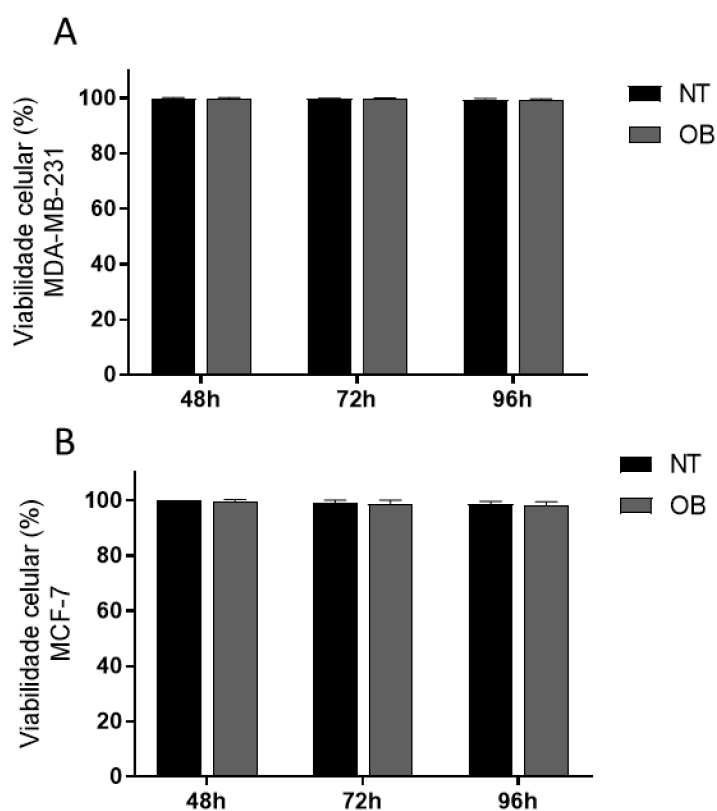
Por fim, analisamos a incorporação das VEs pelas células tumorais. Para isso, nós utilizamos o marcador lipofílico PKH26 para corar as VEs do TA obeso e aquisição de imagens em microscópio confocal. Após 4 horas do tratamento com estas vesículas, observamos que as células MDA-MB-231 e MCF-7 foram capazes de internalizá-las (FIGURA 12A e B). Não observamos marcação de PKH26 no grupo de células não tratadas (FIGURA 12A). Como controle experimental, também utilizamos o meio condicionado livre de VEs, provenientes da primeira ultracentrifugação do processo de isolamento. Também não observamos marcações neste grupo (FIGURA 12A), indicando a eficácia do método empregado na obtenção das VEs.



**Figura 12. Internalização de VEs do TA pelas células de câncer de mama.** Após 4 horas de tratamento das células tumorais, a internalização das VEs previamente coradas com PKH26 (em verde) foi analisada através de microscopia confocal. O núcleo celular foi corado com Hoechst (em azul). (A) Imagens adquiridas em aumento 40x das células não tratadas (NT), tratadas com meio condicionado livre de VEs (MC-sem VEs) ou tratadas com VEs do TA (VEs-TA). (B) Imagens adquiridas com aumento 63x das células tratadas com VEs do TA. Imagens representativas de 1 experimento.

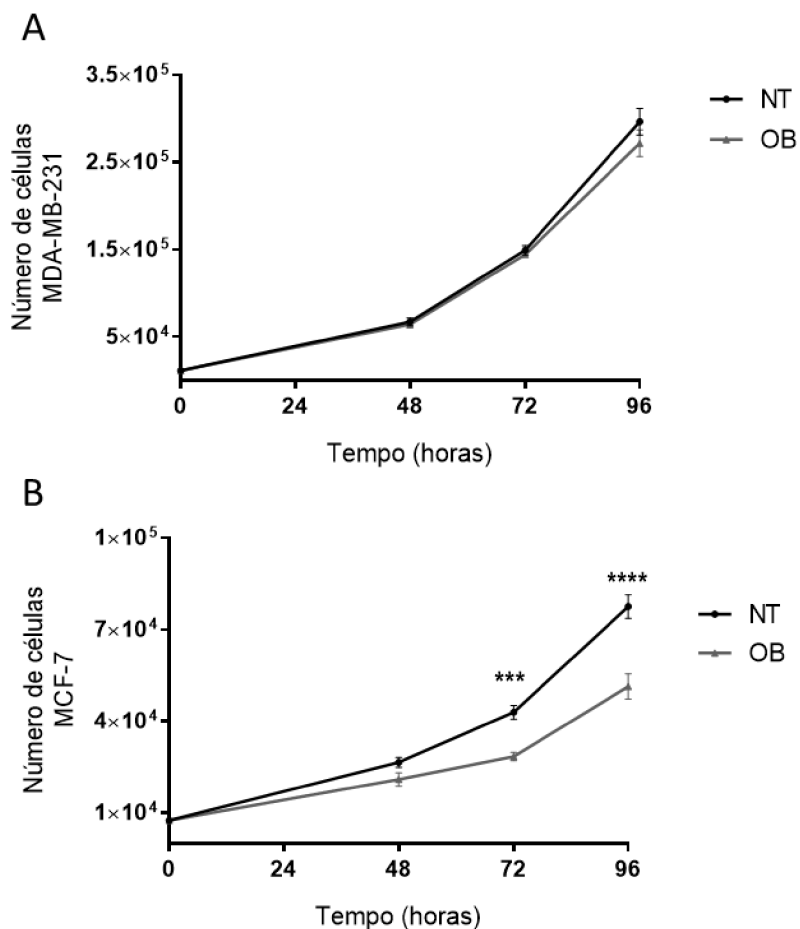
## 4.2 VESÍCULAS EXTRACELULARES DO TECIDO ADIPOSEO OBESO NÃO ALTERARAM A VIABILIDADE CELULAR DAS LINHAGENS MDA-MB-231 E MCF-7

Após a caracterização das VEs, buscamos analisar se elas seriam capazes de modificar o comportamento das células de tumor de mama. A padronização da quantidade de VEs aplicada nos experimentos foi determinada pela concentração proteica das amostras. Primeiramente, avaliamos a viabilidade celular em diferentes períodos de tempo. As linhagens tumorais MDA-MB-231 e MCF-7 foram tratadas ou não, com 5 µg/mL de VEs isoladas a partir do tecido adiposo obeso. O tratamento com VEs não foi capaz de alterar o número de células viáveis em ambas as linhagens ao longo das 96 horas após o tratamento (FIGURA 13A e B).



**Figura 13. Efeito das VEs do tecido adiposo obeso na viabilidade de células de câncer de mama.** A viabilidade das células MDA-MB-231 (A) e MCF-7 (B) foi analisada após 48, 72 e 96 horas de tratamento ou não. NT: grupo não tratado; OB: grupo tratado com 5µg/mL de VEs do tecido adiposo obeso. Os valores foram expressos como médias ± erro padrão de 3 experimentos independentes.

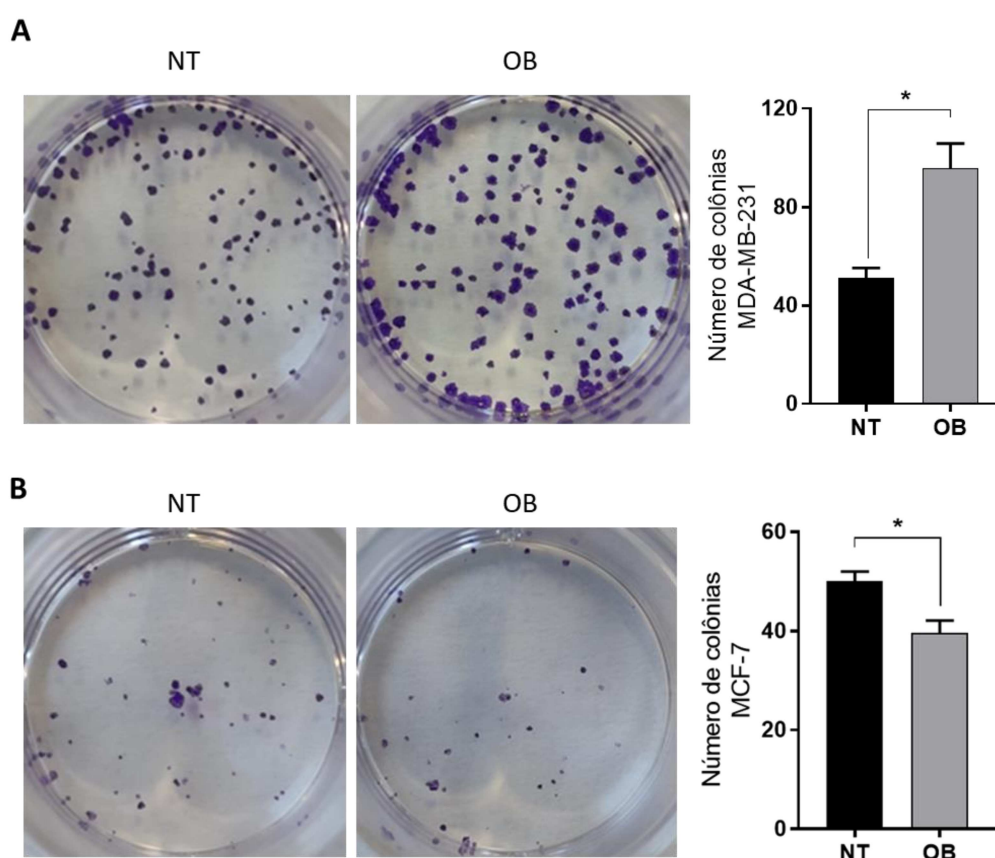
Curiosamente, observamos uma redução no número de células da linhagem MCF-7 nos tempos 72 e 96 horas após o tratamento com VEs, quando comparadas às células não tratadas (FIGURA 14B). Por outro lado, não encontramos alterações no crescimento celular da linhagem MDA-MB-231 após o tratamento com VEs (FIGURA 14A).



**Figura 14. Efeito das VEs do tecido adiposo obeso no crescimento de células do câncer de mama.** O crescimento celular das linhagens (A) MDA-MB-231 e (B) MCF-7 foi analisado após 48, 72 e 96 horas de tratamento ou não. NT: grupo não tratado; OB: grupo tratado com 5µg/mL de VEs do tecido adiposo obeso. Os valores foram expressos como médias ± erro padrão de 3 experimentos independentes. \*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*,  $p < 0.0001$

### 4.3 AS VESÍCULAS EXTRACELULARES DO TECIDO ADIPOSEO OBESO ALTERARAM A FORMAÇÃO DE COLÔNIAS DAS CÉLULAS DO CÂNCER DE MAMA

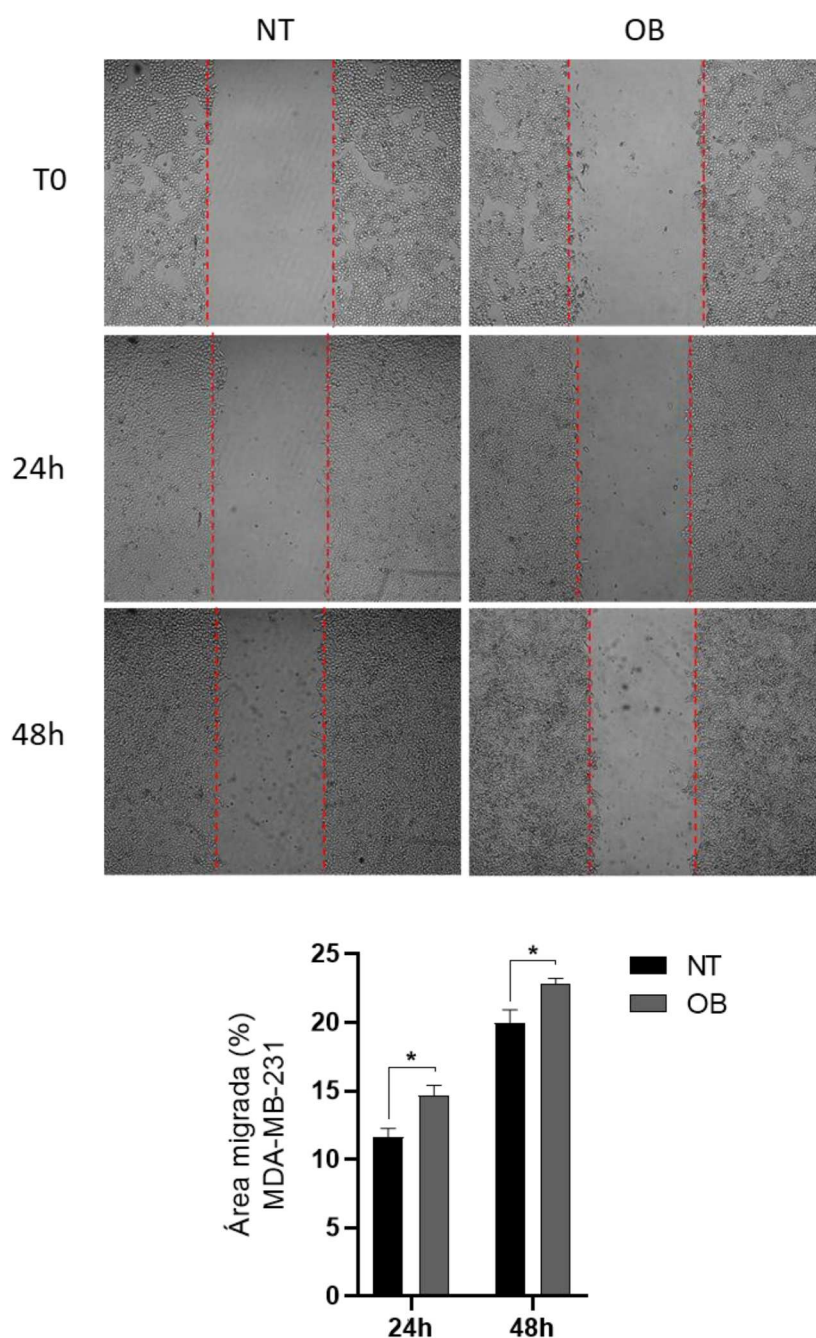
Seguindo na avaliação do efeito das VEs do TA no comportamento celular das linhagens tumorais, nós avaliamos a capacidade destas em formar colônias. Este ensaio indica, além da capacidade de crescimento celular, a capacidade das células em sobreviver na ausência de contato célula-célula. Nós observamos que houve um aumento no número de colônias da linhagem MDA-MB-231 quando tratadas com VEs do TA obeso (FIGURA 15A). Em contrapartida, estas vesículas promoveram a redução da capacidade clonogênica das células MCF-7, em conformidade com os resultados de crescimento celular (FIGURA 15B).



**Figura 15. Efeito das VEs do tecido adiposo obeso na formação de colônias em células de câncer de mama.** As células (A) MDA-MB-231 e (B) MCF-7 foram avaliadas em relação capacidade de formação de colônias. Após 7 dias de tratamento, as imagens dos poços foram adquiridas e o número de colônias analisado. NT: células não tratadas; OB: células tratadas com 5µg/mL de VEs do tecido adiposo obeso. As fotos e gráficos são de um experimento representativo de 3 independentes. Os valores foram reportados em gráficos de barras e expressos como médias  $\pm$  erro padrão. \*,  $p < 0.05$ .

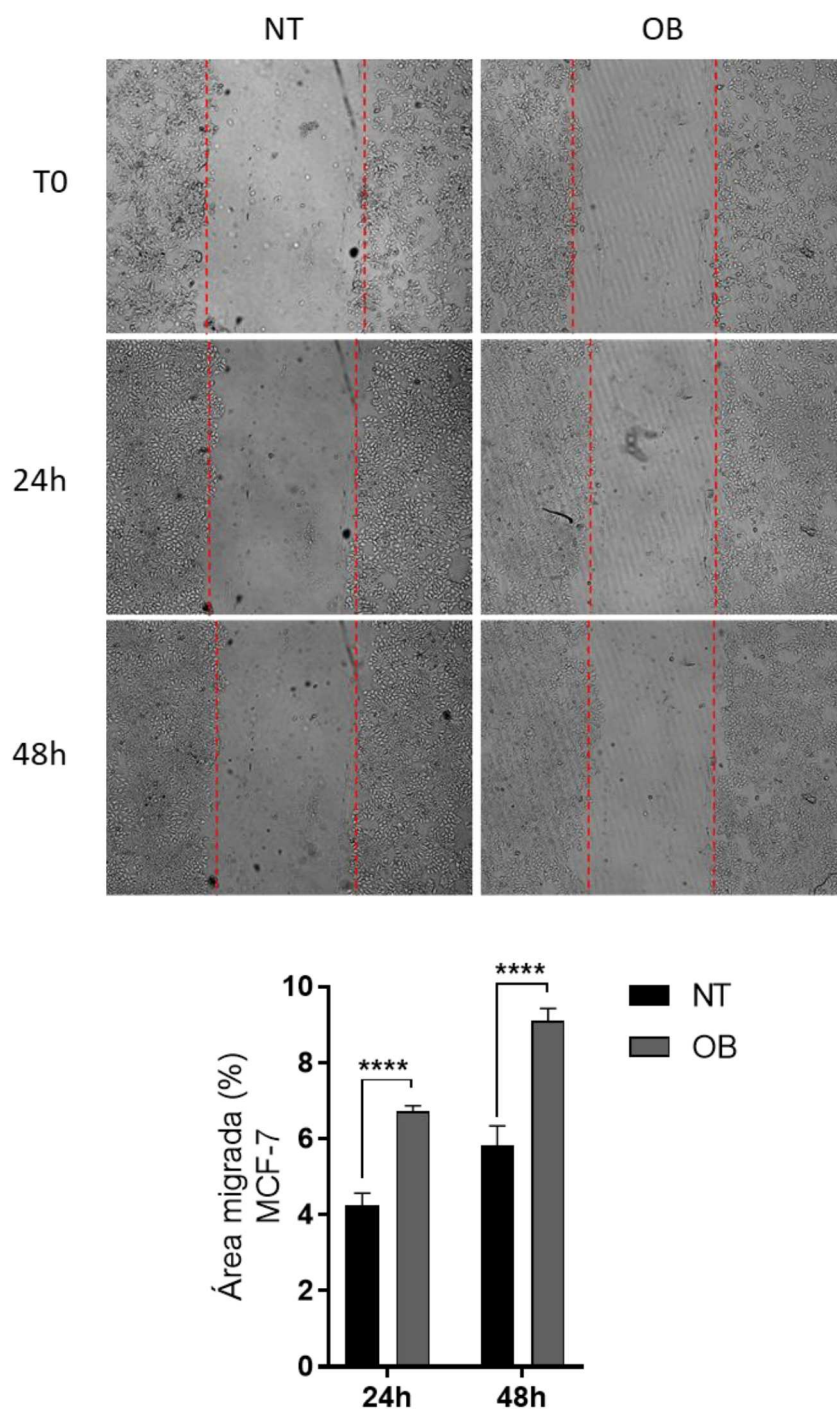
#### **4.4 AS VESÍCULAS EXTRACELULARES DO TECIDO ADIPOSEO OBESO PROMOVERAM A MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS MDA-MB-231 E MCF-7**

Nosso próximo passo foi avaliar o efeito das VEs do tecido adiposo obeso na migração celular. Através do ensaio de cicatrização, observamos que houve um aumento na capacidade de migração das células MDA-MB-231 após 24 e 48 horas de tratamento com VEs (FIGURA 16). Este aumento da migração também foi observado nas células MCF-7 tratadas com VEs quando comparadas às células não tratadas (FIGURA 17).



**Figura 16. Efeito das VEs do tecido adiposo obeso na migração das células MDA-MB-231.** As células MDA-MB-231 foram avaliadas em relação capacidade de migração. As imagens dos poços foram adquiridas em microscópio invertido no aumento 5x no momento do risco/início do tratamento (T0) e após 24h e 48h. NT: células não tratadas; OB: células tratadas com 5µg/mL de VEs do tecido adiposo obeso. Os valores foram reportados em gráficos de barras e expressos como médias  $\pm$  erro padrão de 3 experimentos independentes. \*,  $p < 0.05$ .

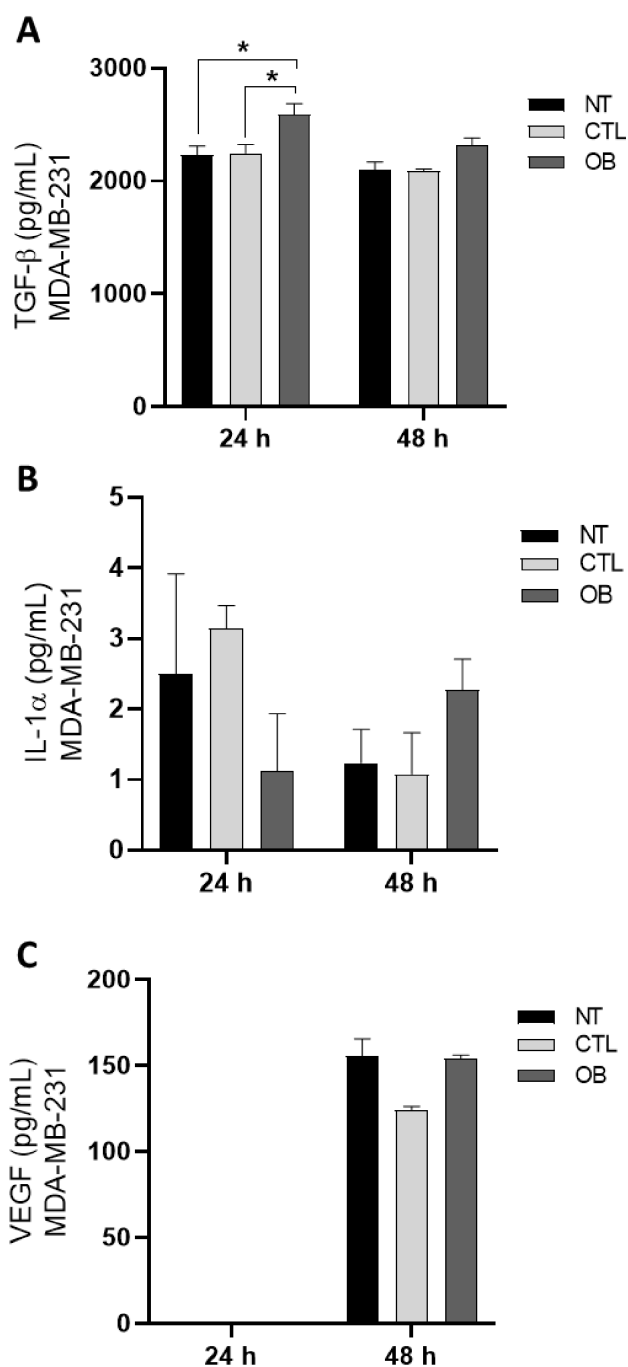




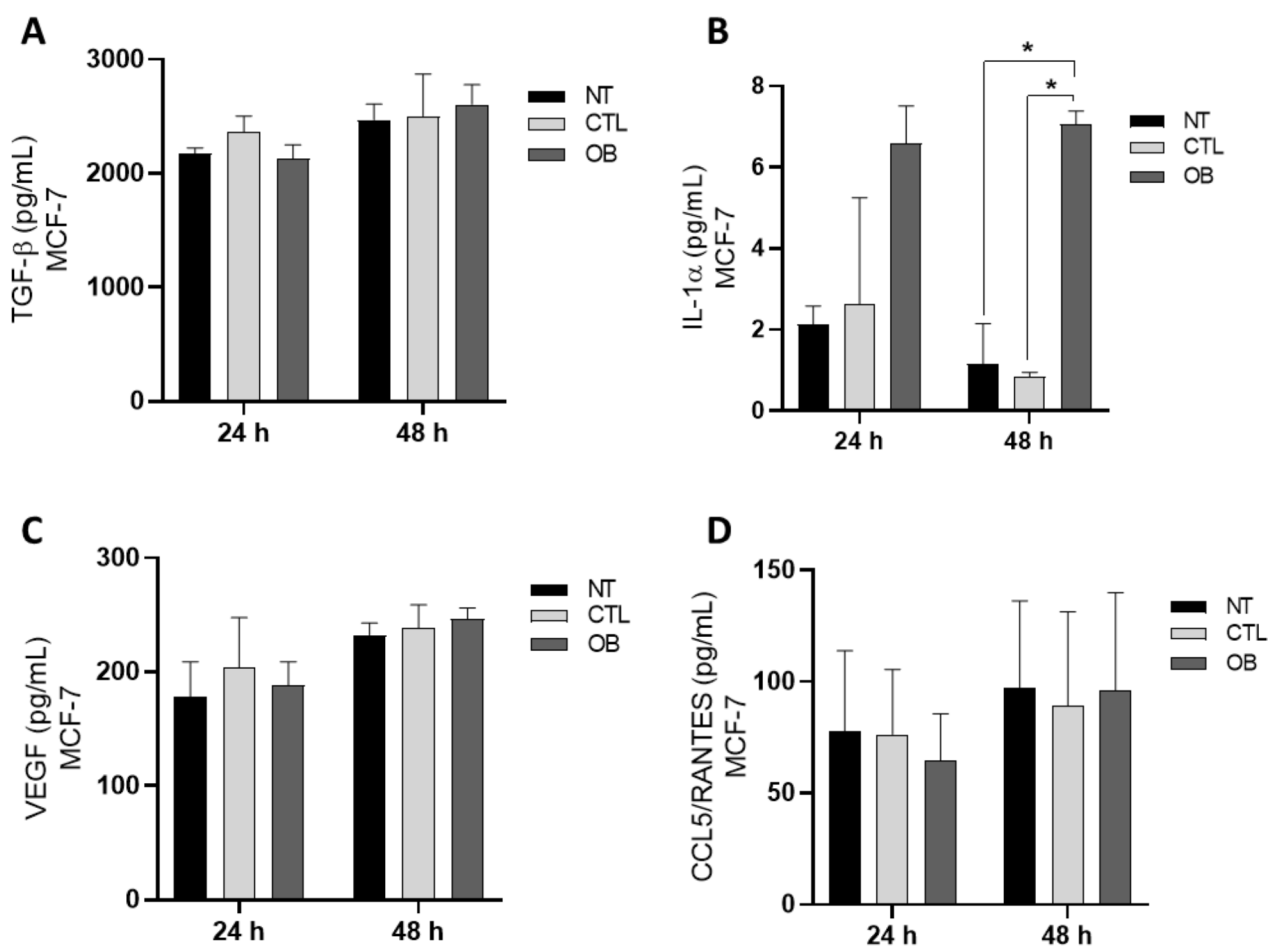
**Figura 17. Efeito das VEs do tecido adiposo obeso na migração das células MCF-7.** As células MCF-7 foram avaliadas em relação capacidade de migração. As imagens dos poços foram adquiridas em microscópio invertido no aumento 5x no momento do risco/início do tratamento (T0), após 24h e 48h. NT: células não tratadas; OB: células tratadas com 5µg/mL de VEs do tecido adiposo obeso. Os valores foram reportados em gráficos de barras e expressos como médias ± erro padrão de 4 experimentos independentes. \*\*\*\*,  $p < 0.0001$ .

#### **4.5 AS VESÍCULAS EXTRACELULARES DO TECIDO ADIPOSEO OBESO ALTERARAM A SECREÇÃO DE CITOCINAS DAS CÉLULAS MDA-MB-231 E MCF-7**

Desde que VEs do tecido adiposo obeso foram capazes de alterar o comportamento das células tumorais, procuramos avaliar o efeito destas na secreção de diferentes mediadores inflamatórios que são conhecidamente associados a migração e progressão do câncer de mama. Para isso, analisamos os níveis de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ , VEGF e CCL5/RANTES a partir do sobrenadante de células não tratadas, tratadas com VEs do TA eutrófico ou obeso, após 24 e 48 horas. Observamos um aumento nos níveis de TGF- $\beta$  das células MDA-MB-231 após 24 horas de tratamento com VEs do TA obeso quando comparadas aos demais grupos (FIGURA 18A). Não observamos diferenças nos níveis de IL-1 $\alpha$  e VEGF entre os grupos, tratados ou não, nesta linhagem (FIGURA 18B e 18C). A secreção de CCL5/RANTES e IL-1 $\beta$  não foi detectada no sobrenadante dessas células (dados não mostrados). O tratamento com VEs do tecido adiposo obeso foi capaz de aumentar os níveis de IL-1 $\alpha$  das células MCF-7 após 48 horas, quando comparado às células não tratadas e células tratadas com VEs do TA eutrófico (FIGURA 19B). Não observamos alterações nos níveis de TGF- $\beta$  e VEGF sob os diferentes tratamentos (FIGURA 19A e C). Assim como nas células MDA-MB-231, não foram detectados níveis da citocina IL-1 $\beta$  na linhagem MCF-7 (dados não mostrados).



**Figura 18. Efeito das VEs do tecido adiposo na secreção de mediadores inflamatórios das células MDA-MB-231.** As células MDA-MB-231 foram tratadas ou não com VEs do tecido adiposo. Após 24h e 48h o sobrenadante foi recolhido e as concentrações de (A) TGF- $\beta$ , (B) IL-1 $\alpha$ , (C) VEGF e (D) CCL5/RANTES foram analisadas. NT: células não tratadas; células tratadas com 5 $\mu$ g/mL de VEs do tecido adiposo eutrófico (CTL) ou obeso (OB). Os valores foram reportados em gráficos de barras e expressos como médias  $\pm$  erro padrão de 3 experimentos independentes. \*,  $p < 0.05$ .

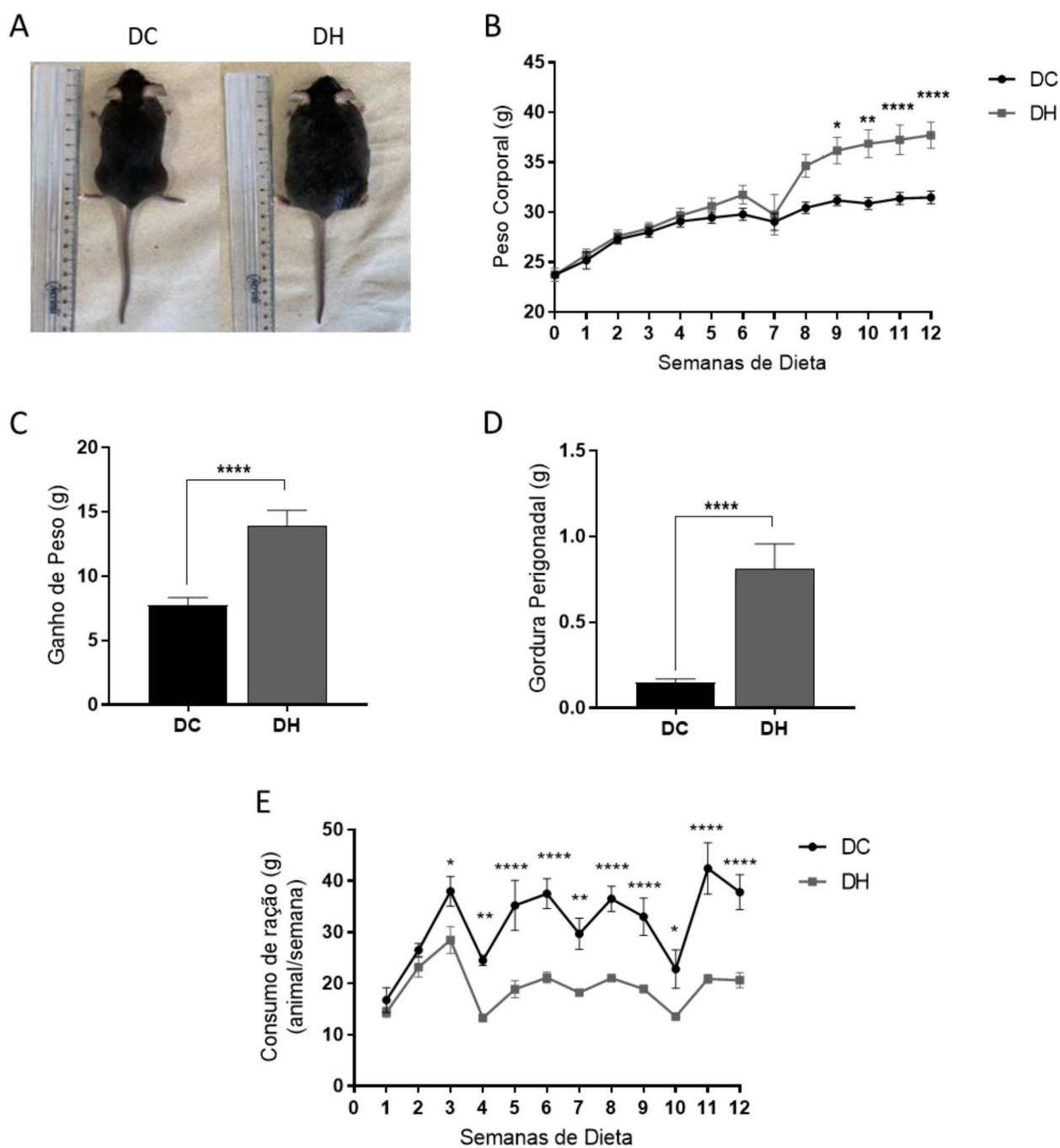


**Figura 19. Efeito das VEs do tecido adiposo na secreção de mediadores inflamatórios das células MCF-7.** As células MCF-7 foram tratadas ou não com VEs do tecido adiposo. Após 24h e 48h o sobrenadante foi recolhido e as concentrações de (A) TGF- $\beta$ , (B) IL-1 $\alpha$ , (C) VEGF e (D) CCL5/RANTES foram analisadas. NT: células não tratadas; células tratadas com 5 $\mu$ g/mL de VEs do tecido adiposo eutrófico (CTL) ou obeso (OB). Os valores foram reportados em gráficos de barras e expressos como médias  $\pm$  erro padrão de 3 experimentos independentes. \*, p < 0.05.

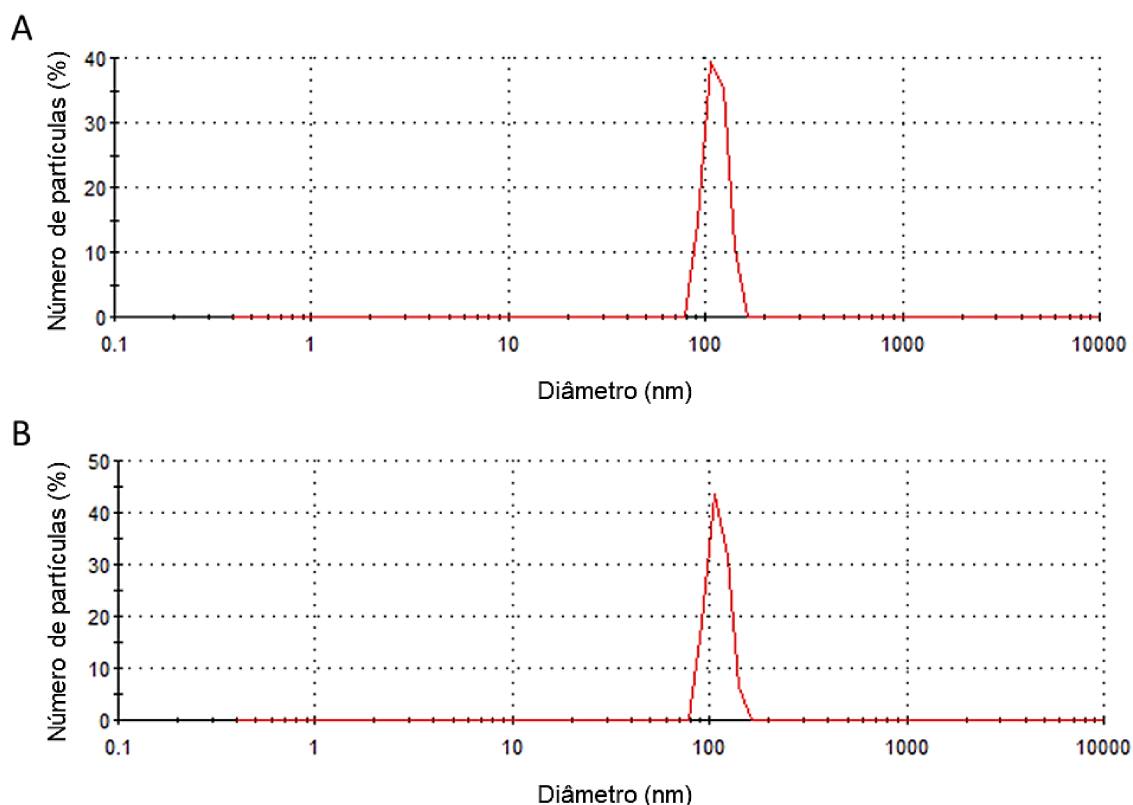
#### 4.6 OBTENÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DO TECIDO ADIPOSEO DE CAMUNDONGOS C57BL/6

Buscando estabelecer um modelo *in vivo* no nosso estudo e a partir dos resultados obtidos nos experimentos com amostras humanas, decidimos avaliar o efeito de VEs provenientes do tecido adiposo de camundongos obesos e não obesos em células murinas de câncer de mama. Para isso, utilizamos um modelo de obesidade induzido por dieta hiperlipídica. Os animais alimentados com essa dieta apresentaram maior peso corporal desde a nona semana de dieta, quando comparados aos animais alimentados com dieta padrão (denominada como controle) (FIGURA 20B). Também observamos maior ganho de peso e quantidade de tecido adiposo perigonadal nos animais alimentados com dieta hiperlipídica ao final de 12 semanas de dieta (FIGURA 20A, C e D). Estes achados estão associados à composição da dieta e não a ingesta, visto que, desde a terceira semana o consumo de ração deste grupo foi menor quando comparado ao grupo alimentado com dieta controle (FIGURA 20E). Diante destes resultados e de outros estudos que validaram o modelo de obesidade induzido por meio desta dieta (EVANGELISTA et al., 2019; KAPPE et al., 2014), consideramos estes animais como obesos.

Assim como nas amostras humanas de TA, nós verificamos o tamanho das partículas isoladas pelo processo de ultracentrifugação sequencial. De acordo com os resultados obtidos nas outras amostras, as partículas derivadas do tecido adiposo perigonadal de animais eutróficos (dieta controle) e obesos foi de  $115,7 \pm 8,2$  nm e  $112 \pm 8,2$  nm respectivamente (FIGURA 21).



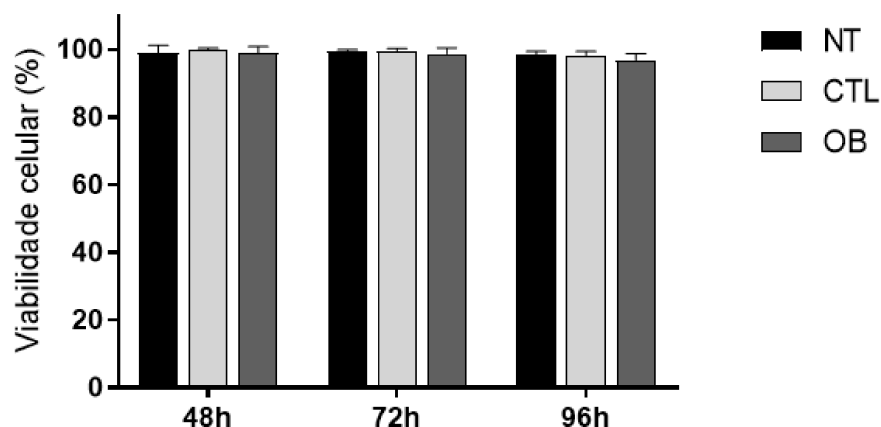
**Figura 20. Modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica.** (A) Fotografia dos camundongos após 12 semanas de dieta controle (DC) e dieta hiperlipídica (DH); (B) peso corporal dos animais ao longo do tempo de dieta; (C) ganho de peso corporal individual e (D) quantidade de gordura perigonadal ao final de 12 semanas de dieta; (E) consumo semanal de ração por animal. Os valores foram expressos como médias  $\pm$  erro padrão de 15 animais/grupo \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  e \*\*\*\*,  $p < 0.0001$ .



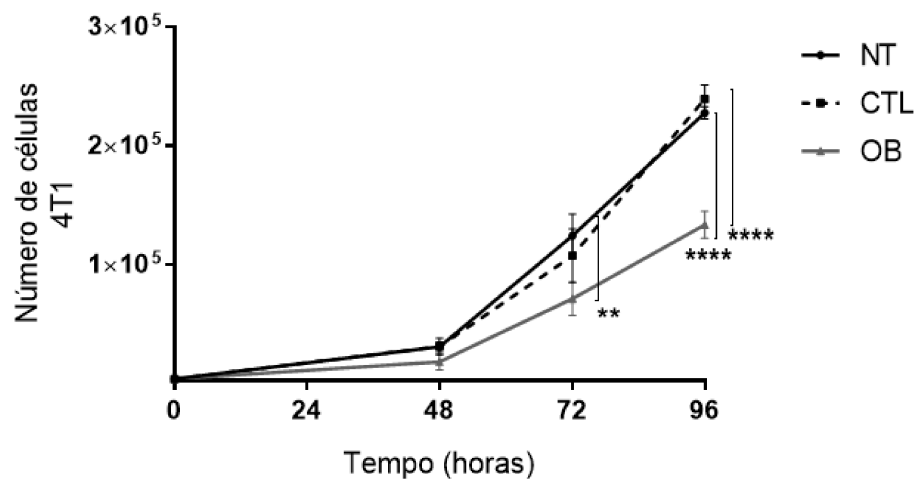
**Figura 21. Distribuição do tamanho das VEs derivadas do tecido adiposo de camundongos.** Gráfico da distribuição do tamanho das partículas encontradas nas amostras de VEs do tecido adiposo perigonadal de camundongos C57BL/6. (A) Partículas isoladas do tecido adiposo eutrófico, (B) Partículas isoladas do tecido adiposo obeso. Gráficos representativos de 2 amostras por grupo.

#### 4.7 AS VESÍCULAS EXTRACELULARES DO TECIDO ADIPOSEO OBESO PREJUDICARAM O CRESCIMENTO CELULAR DA LINHAGEM 4T1

Avaliamos a viabilidade celular das células 4T1 tratadas com 1,5 µg/mL de VEs obtidos do tecido adiposo obeso e controle, em diferentes períodos de tempo. Não observamos alterações na viabilidade celular em nenhum dos tratamentos ao longo de 96 horas (FIGURA 22). Por outro lado, houve redução no número de células após 72 horas de tratamento com VEs do TA obeso, quando comparadas às células não tratadas, e após 96h quando comparadas às células tratadas com VEs do TA controle e ao grupo não tratado (FIGURA 23). Não observamos diferença na contagem de células tratadas com VEs provenientes do TA de animais controles e células não tratadas (FIGURA 23)



**Figura 22. Efeito das VEs do tecido adiposo na viabilidade celular da linhagem 4T1.** A viabilidade celular da linhagem celular 4T1 foi analisada após 48, 72 e 96 horas de tratamento ou não. NT: células não tratadas; células tratadas com 1,5 $\mu$ g/mL de VEs do tecido adiposo eutrófico (CTL) ou obeso (OB). Os valores foram expressos como médias  $\pm$  erro padrão de 3 experimentos independentes.

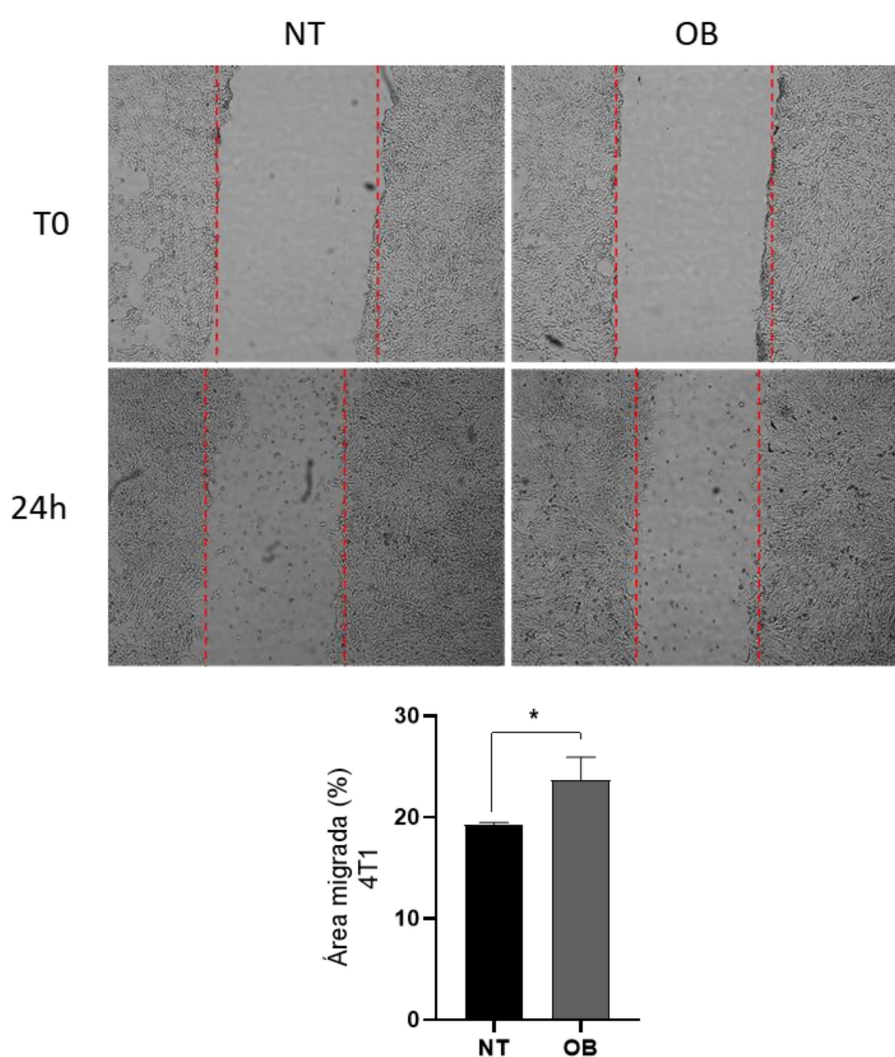


**Figura 23. Efeito das VEs do tecido adiposo no crescimento celular da linhagem 4T1.** O crescimento celular da linhagem celular 4T1 foi analisado após 48, 72 e 96 horas de tratamento ou não com VEs do tecido adiposo. NT: células não tratadas; células tratadas com 1,5 $\mu$ g/mL de VEs do tecido adiposo eutrófico (CTL) ou obeso (OB). Os valores foram expressos como médias  $\pm$  erro padrão de 3 experimentos independentes. \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*\*,  $p < 0.0001$ .



#### 4.8 AS VESÍCULAS EXTRACELULARES DO TECIDO ADIPOSEO OBESO PROMOVERAM A MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS 4T1

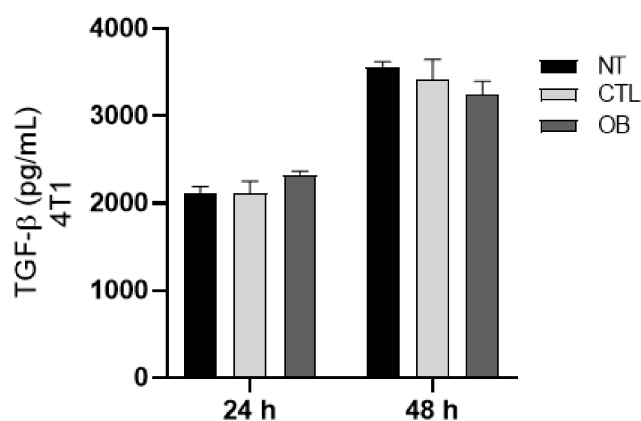
Através do ensaio de cicatrização, analisamos a capacidade de migração das células 4T1 tratadas ou não com VEs do tecido adiposo obeso. Assim como observado nas linhagens MDA-MB-231 e MCF-7, as VEs foram capazes de aumentar a taxa de migração celular na linhagem 4T1 após 24h de tratamento (FIGURA 24).



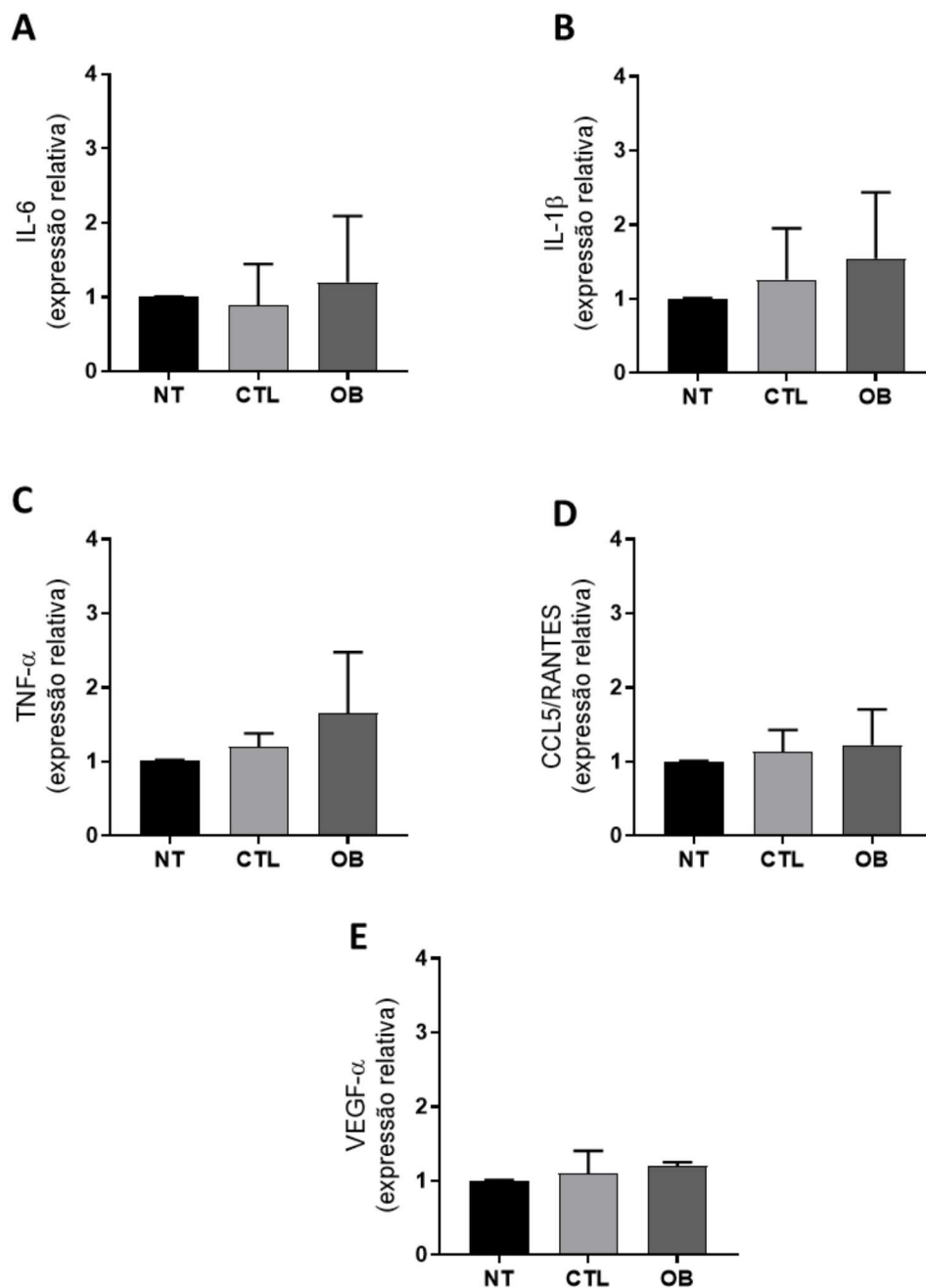
**Figura 24. Efeito das VEs do tecido adiposo obeso na migração das células 4T1.** As células 4T1 foram avaliadas em relação capacidade de migração. As imagens dos poços foram adquiridas em microscópio invertido no aumento 5x no momento do risco/início do tratamento (T0), e após 24h. NT: células não tratadas; OB: células tratadas com 1,5µg/mL de VEs do tecido adiposo obeso. Os valores foram expressos como médias  $\pm$  erro padrão de 3 experimentos independentes. \*,  $p < 0.05$ .

#### 4.9 AS VESÍCULAS EXTRACELULARES DO TECIDO ADIPOSEO NÃO ALTERARAM A SECREÇÃO DE TGF-B E A EXPRESSÃO DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS DA LINHAGEM 4T1

Visto que VEs do TA obeso aumentaram os níveis de TGF- $\beta$  da linhagem triplo negativa MDA-MB-231, avaliamos se em modelo murino teriam o mesmo efeito na linhagem também triplo negativa 4T1. Entretanto, não observamos diferença significativa nos níveis desta citocina em 24 ou 48 horas em nenhum dos tratamentos (FIGURA 25). Muitos trabalhos demonstraram que moléculas secretadas pelo tecido adiposo obeso são capazes de alterar a expressão de genes inflamatórios em células tumorais, favorecendo, ou não, a progressão do tumor de mama (DEVERICKS et al., 2022; TULOTTA; OTTEWELL, 2018). Desta forma, nós procuramos investigar se o tratamento com as VEs do TA, seria capaz de modificar a expressão gênica na linhagem 4T1. As vesículas do TA obeso ou eutrófico, não modificaram os níveis de expressão dos genes CCL5/RANTES, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e VEGF das células 4T1 após 24 horas de tratamento (FIGURA 26 A-E)



**Figura 25. Efeito das VEs do tecido adiposo na secreção de TGF- $\beta$  pelas células 4T1.** As células 4T1 foram tratadas ou não com VEs do tecido adiposo. Após 24h e 48h o sobrenadante foi recolhido e as concentrações de TGF- $\beta$  foram analisadas. NT: células não tratadas; células tratadas com 1,5 $\mu$ g/mL de VEs do tecido adiposo eutrófico (CTL) ou obeso (OB). Os valores foram reportados em gráficos de barras e expressos como médias  $\pm$  erro padrão de 3 experimentos independentes.



**Figura 26. Efeito das VEs do tecido adiposo na expressão de genes inflamatórios das células 4T1.** As células 4T1 foram tratadas ou não com VEs do tecido adiposo por 24h e os níveis relativos (ao grupo NT) de transcritos dos genes (A) IL-6, (B) IL-1 $\beta$ , (C) TNF- $\alpha$ , (D) CCL5 e (E) VEGF foram analisados. B-actina foi usada como controle endógeno de todos os genes analisados. NT: células não tratadas; células tratadas com 1,5 $\mu$ g/mL de VEs do tecido adiposo eutrófico (CTL) ou obeso (OB). Os valores foram reportados em gráficos de barras e expressos como médias  $\pm$  erro padrão de 3 experimentos independentes.

## 5 DISCUSSÃO

As alterações fisiológicas provocadas pela expansão e remodelamento patológico do tecido adiposo, no contexto da obesidade, vêm sendo associado com o desenvolvimento e progressão do câncer de mama (QUAIL; DANNENBERG, 2018). Esta correlação entre as duas doenças é atribuída principalmente a promoção de um ambiente de inflamação crônica de baixo grau, onde a comunicação entre TA e células tumorais, pode alterar processos celulares como proliferação, migração e invasão (LEE et al., 2015). Neste trabalho, nós demonstramos que VEs provenientes do tecido adiposo obeso exercem efeitos diversos no crescimento celular, mas promovem a migração de todas as linhagens de câncer de mama analisadas.

Nos últimos anos, observou-se um aumento no número de estudos relacionados a vesículas extracelulares, tendência acompanhada pelos trabalhos associados com VEs do tecido adiposo. Primeiramente, é relevante destacar que a maioria destes estudos que mencionam TA, envolvem VEs secretadas por células tronco mesenquimais. Apenas uma pequena parcela corresponde a investigações daquelas provenientes do tecido adiposo como um todo, isto é, considerando os outros tipos celulares (ZHAO et al., 2021).

No presente trabalho, VEs foram isoladas por ultracentrifugação sequencial a partir do meio condicionado do TA branco visceral, de indivíduos obesos e eutróficos. Em amostras humanas, encontramos partículas com um diâmetro médio de  $132 \pm 18,4$  nm e  $126,9 \pm 8,1$ , para o TA eutrófico e obeso, respectivamente (FIGURA 10). Assim, constatamos que o tamanho das partículas obtidas corresponde aquele descrito na literatura para vesículas extracelulares pequenas (<200 nm), ou para exossomos, isto é, de 30 a 150 nm (WILLMS et al., 2018). Jayabalan e colaboradores, obtiveram resultado semelhante de exossomos provenientes de TA humano (JAYABALAN et al., 2019). As partículas isoladas de amostras murinas também indicaram o tamanho correspondente a pequenas VEs/exossomos, com  $115,7 \pm 8,2$  nm e  $112 \pm 8,2$  nm de diâmetro para os isolados do TA eutrófico e obeso, respectivamente (FIGURA 21). Estes dados estão de acordo com resultados de outros estudos, que em modelo de obesidade induzido por dieta, obtiveram exossomos derivados do TA visceral de camundongos (KIM et al., 2022; WEI et al., 2020).

Nossas análises de Western Blot revelaram a presença de CD81 nos isolados de VEs, mas não no MC livre de VEs (FIGURA 11A). Entretanto, não

detectamos a presença deste marcador no TA de origem em nenhuma das amostras analisadas (FIGURA 11A). De fato, a presença de tetraspaninas parece estar enriquecida nas membranas de exossomos (ANDREU; YÁÑEZ-MÓ, 2014). Escola e colaboradores encontraram uma quantidade 124 vezes maior de CD81 em exossomos secretados por linfócitos B, quando comparadas ao conteúdo da célula de origem (ESCOLA et al., 1998). Assim como em outros estudos, observamos a ausência de calnexina nos isolados de VEs (FIGURA 11A), e a presença de FABP4 tanto nestas amostras, como em seu TA de origem (FIGURA 11B) (DENG et al., 2009; EZQUER et al., 2019; YUE et al., 2022)

Como mencionado anteriormente, VEs do TA são capazes de transportar adipocinas, entre outros conteúdos, constituindo uma importante via de comunicação (HARTWIG et al., 2019). Foi demonstrado que adipocinas podem ser transportadas dentro ou na superfície das VEs, onde mesmo aquelas encapsuladas, são capazes de desencadear efeitos biológicos na célula de destino (FITZGERALD et al., 2018; GOULET et al., 2018; HUSSAIN; IQBAL; NORLING, 2020).

As VEs do TA obeso não alteraram a viabilidade e crescimento celular da linhagem de câncer de mama triplo negativo MDA-MB-231, mas promoveram a formação de colônias após 7 dias de tratamento (FIGURAS 13A,14A e 15A). Em contrapartida, apesar de não observamos alteração na viabilidade, estas VEs foram capazes de diminuir o crescimento celular após 72 e 96h, além da capacidade clonogênica, das células RE+/RP+ MCF-7 (FIGURAS 13B,14B e 15B). De forma semelhante, VEs do TA obeso, mas não do eutrófico, foram capazes de reduzir o crescimento da linhagem murina triplo negativa 4T1 (FIGURA 23), sem afetar a viabilidade destas células (FIGURA 22). Utilizando uma metodologia de obtenção semelhante à nossa, Camino e colaboradores observaram que VEs de amostras do TA visceral continham mais adipocinas associadas a inflamação, como leptina e IL-6, do que aquelas do TA subcutâneo (CAMINO et al., 2022). Estudos mostraram que o estímulo com leptina promoveu a proliferação e inibiu a apoptose em células do câncer de mama, através da ativação de diferentes cascatas de sinalização (ATOUM; ALZOUGHLOOL; AL-HOURANI, 2020; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ et al., 2019). Entretanto, o efeito dessa adipocina na linhagem MCF-7, parece controverso (LINARES et al., 2019; RAY; NKHATA; CLEARY, 2007). Ray e colaboradores observaram que o tratamento com leptina promoveu a proliferação de células MDA-MB-231, mas diminuiu das células MCF-7 após 48h de tratamento. Interessantemente, Perera e

colaboradores demonstraram que o tratamento com TGF- $\beta$  foi capaz de revogar a proliferação celular promovida pela leptina, em células da linhagem MCF-7 (PERERA et al., 2008).

A secreção do TGF- $\beta$  pelo TA é aumentada na obesidade e recentemente, foi relatado que VEs provenientes do TA obeso apresentam maior quantidade desta citocina, quando comparados ao TA eutrófico (CAMINO et al., 2022; FAIN; TICHANSKY; MADAN, 2005). Sabe-se que o TGF- $\beta$  atua em diferentes processos biológicos do tumor e sua participação na progressão do câncer é controverso, dependendo por exemplo, do estágio e tipo celular (ZARZYNSKA, 2014). O tratamento com esta citocina provocou a regulação positiva de inibidores do ciclo celular, apresentando um efeito citostático em células MCF-7 (WANG; YIN, 2017). Além disso, foi demonstrado que o estímulo com TGF- $\beta$  diminuiu o número de células formadoras de colônia da linhagem MCF-7, enquanto teve efeito contrário em células MDA-MB-231 (BRUNA et al., 2012). Goulet e colaboradores observaram que o transporte desta citocina na superfície de exossomos derivados de células tumorais, foi capaz de promover a diferenciação de fibroblastos (GOULET et al., 2018). Deste modo, acreditamos que a ação do TGF- $\beta$  possa ser um dos mecanismos que esteja direcionando os comportamentos divergentes no crescimento das células 4T1, MDA-MB-231 e MCF-7, tratadas com VEs do TA obeso.

Ademais, nós observamos que VEs do TA obeso, mas não do eutrófico, provocaram um aumento os níveis de IL-1 $\alpha$  no meio de cultura das células MCF-7 (FIGURA 19B). Corroborando nossos resultados, outros estudos mostraram que esta citocina foi capaz de inibir o crescimento da linhagem MCF-7 (PACIOTTI; TAMARKIN, 1988; SGAGIAS; KASID; DANFORTH, 1991). Entre os mecanismos deste efeito, está a indução da parada do ciclo celular na fase G0/G1 (DANFORTH; SGAGIAS, 1991; HUANG et al., 2017). A capacidade antiproliferativa da IL-1 $\alpha$ , também foi demonstrada em modelo murino de câncer de mama (DAGENAIS et al., 2017).

Ferrante e colaboradores encontraram que 88 miRNAs estão expressos de formas distintas, entre exossomos do TA obeso e magro. Curiosamente, os alvos destes miRNAs, se concentram principalmente em duas vias celulares importantes nos processos da progressão do tumor: sinalização de TGF- $\beta$  e Wnt/ $\beta$ -catenina (FERRANTE et al., 2014). Os autores demonstraram que dois dos principais miRNAs presentes nessas vias, estavam regulados positivamente nos exossomos do TA obeso, miR-23b e miR-4429 (FERRANTE et al., 2014). Estudos revelaram efeitos

contrastantes do miR-23b na progressão do câncer de mama, induzindo um efeito pró ou anti-tumoral (HANNAFON et al., 2019; JIN et al., 2013; PELLEGRINO et al., 2013). Apoiando nossos resultados, Zhang e colaboradores observaram que o miR-4429 atua inibindo a proliferação de células MCF-7 (ZHANG et al., 2021).

Além disso, foram encontrados maiores níveis de miR-122 e miR-192 em exossomos do TA de camundongos obesos, alimentados com dieta hiperlipídica (CASTAÑO et al., 2018). Ambos miRNAs prejudicaram o crescimento celular e formação de colônias em células tumorais (CHEN et al., 2019; WANG; WANG; YANG, 2012), semelhantemente ao observado em células murinas 4T1 tratadas com VEs do TA de camundongos obesos (FIGURA 23). Desde que nós demonstramos que as células do câncer de mama foram capazes de internalizar VEs do TA (FIGURA 12), consideramos que a ação de miRNAs transportados por estas, também possam ocasionar as diferenças no comportamento celular observadas no presente estudo.

Nós encontramos um aumento nos níveis de TGF- $\beta$  no sobrenadante de células MDA-MB-231, tratadas com VEs do TA obeso (FIGURA 18A). É bem documentado que esta citocina é um dos principais indutores transição epitélio-mesenquimal, promovendo a migração, invasão e metástase no câncer de mama (WALSH; DAMJANOVSKI, 2011; WANG et al., 2019a). O TGF- $\beta$  age induzindo a ativação de fatores de transcrição e transmissores intracelulares da família *Smad*, que por sua vez estimulam a expressão de genes associados ao fenótipo mesenquimal, como *Snail*, *Slug*, *Twist*, ao passo que inibem genes relacionados ao fenótipo epitelial (ZARZYNSKA, 2014). Aqui, nós observamos que VEs do TA obeso foram capazes de promover a migração das células MDA-MB-231, MCF-7 e 4T1 (FIGURAS 16, 17 e 24). Utilizando modelo murino de câncer de mama com células 4T1, estudos *in vivo* relataram a importância do TGF- $\beta$  na invasão e metástase (MCEARCHERN et al., 2001; NAM et al., 2008). Os miRNAs miR-23a e miR-155, também apresentaram expressão aumentada em VEs do TA de camundongos obesos, em comparação aos eutróficos (WEI et al., 2020; YU et al., 2018; ZHANG et al., 2016). O miR-27a promoveu a migração celular através da indução da TEM em células do câncer de mama (JIANG et al., 2018), além de ser associado a um pior prognóstico em pacientes com este tipo de tumor (TANG et al., 2012). Da mesma forma, o papel oncogênico do miR-155 foi explorado, indicando uma correlação positiva com metástase, estágio avançado e recidiva da doença (MATTISKE et al., 2012). Kong e colaboradores, demonstraram que este miRNA promoveu a TEM, invasão e migração de células

mamárias. Interessantemente, a expressão do miR-155, bem como seus mecanismos de ação nestas células, estava associada a ativação da via TGF- $\beta$ /Smad4 (KONG et al., 2008).

Ademais, o aumento nos níveis de IL-1 $\alpha$  observado na linhagem MCF-7, também pode contribuir na promoção da migração encontrada nestas células. Isto porque esta citocina pode agir ativando a via de fatores de transcrição, como o Fator Nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), que induz a expressão de genes pró-inflamatórios e genes associados a TEM (DIEP et al., 2022; PERROTT et al., 2017). Além disso, apesar de não encontramos diferença nos níveis de TGF- $\beta$  das células MCF-7 e 4T1 tratadas com VEs do TA obeso (FIGURAS 19A e 25), é interessante considerar que o estímulo desta citocina pode vir das próprias vesículas, que como discutido anteriormente, apresentam maiores quantidades em relação às VEs do TA eutrófico. Semelhantemente, outras adipocinas que apresentam este mesmo padrão, como leptina e IL-6, também foram associadas à TEM, aumentando a migração e invasão de células do câncer de mama (MASJEDI et al., 2018; WANG et al., 2015; YAN et al., 2012). Porém, ainda são necessárias análises para identificar o conteúdo das vesículas extracelulares utilizadas no presente trabalho. Embora bem estabelecido que a obesidade induz a expressão de genes inflamatórios, seja pelo estímulo de adipocinas, ou de miRNAs (como o miR155), nós não observamos diferenças significativas na expressão de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , VEGF, IL-6 ou CCL5 em células 4T1 tratadas com VEs do TA obeso (FIGURA 26). Apesar disso, é relevante destacar que mesmo sob estímulo de concentrações menores de VEs (1,5  $\mu$ g/mL), em relação ao tratamento das linhagens celulares humanas (5  $\mu$ g/mL de VEs), a linhagem 4T1 também apresentou alterações no comportamento celular.

Corroborando nossos resultados, um estudo mostrou que a migração e invasão de células do câncer de mama foram maiores na presença de VEs do TA obeso, do que sob o estímulo daquelas provenientes do TA eutrófico. Interessantemente, as VEs do TA obeso apresentaram níveis aumentados de leptina e MMP9 (RAMOS-ANDRADE et al., 2020). Além disso, os autores observaram que o tratamento com VEs do TA obeso não alterou a viabilidade e proliferação celular da linhagem MDA-MB-231, após 24h. Entretanto, ao contrário dos nossos resultados, o tratamento foi capaz de aumentar estes parâmetros nas células MCF-7 (RAMOS-ANDRADE et al., 2020). Essas divergências podem ser atribuídas às diferentes metodologias empregadas para avaliação da viabilidade e crescimento celular. Além



disso, o isolamento das VEs também foi desenvolvido de forma diversa nos dois estudos, sendo que os autores não realizaram etapas de ultracentrifugação e assim obtiveram principalmente VEs grandes ou microvesículas (RAMOS-ANDRADE et al., 2020).

Finalmente, é importante destacar que nosso estudo apresenta algumas limitações. Pela escassez de amostras humanas de TA eutrófico, ensaios funcionais ainda não foram realizados para avaliar o comportamento das células tumorais sob estímulo das VEs deste tecido, podendo atribuir, ou não, uma maior correlação com a obesidade. Embora tenhamos mostrado que, ao contrário de VEs de camundongos obesos, aquelas provenientes do TA magro não foram capazes de alterar o crescimento da linhagem 4T1 (FIGURA 23). Além disso, a idade dos voluntários eutróficos foi significativamente maior quando comparada a voluntários obesos (TABELA 3), podendo representar um viés nos resultados observados, visto que o envelhecimento, assim como a obesidade, provoca alterações no TA do indivíduo (TRIM; TURNER; THOMPSON, 2018).

## 6 CONCLUSÕES

Embora os efeitos das vesículas extracelulares do tecido adiposo obeso no crescimento celular tenham sido divergentes, não houve alteração na viabilidade celular das linhagens MDA-MB-231, MCF-7 e 4T1. Além disso, nossos dados mostraram que estas VEs promoveram a migração das células de câncer de mama analisadas. A secreção de mediadores inflamatórios pelas células foi alterada sob tratamento das VEs do TA obeso, mas não do TA eutrófico, indicando que o conteúdo e o estímulo provocado por elas são diferentes e dependem do tipo celular. Contudo, novos estudos ainda serão necessários para compreender melhor o papel das VEs do TA na progressão do câncer de mama, identificando seu conteúdo, bem como possíveis mecanismos de ação, possibilitando correlacionar seus efeitos no contexto da obesidade.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALSHAKER, Heba et al. Leptin induces upregulation of sphingosine kinase 1 in oestrogen receptor-negative breast cancer via Src family kinase-mediated, janus kinase 2-independent pathway. **Breast Cancer Research**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 1–15, 2014. DOI: 10.1186/S13058-014-0426-6/FIGURES/7. Disponível em: <https://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13058-014-0426-6>. Acesso em: 11 set. 2022.

ANDREU, Zoraida; YÁÑEZ-MÓ, María. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 5, n. SEP, p. 442, 2014. DOI: 10.3389/FIMMU.2014.00442/BIBTEX.

ANNETT, Stephanie; MOORE, Gillian; ROBSON, Tracy. Obesity and Cancer Metastasis: Molecular and Translational Perspectives. **Cancers 2020, Vol. 12, Page 3798**, [S. l.], v. 12, n. 12, p. 3798, 2020. DOI: 10.3390/CANCERS12123798. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6694/12/12/3798/htm>. Acesso em: 7 out. 2022.

ASIEDU, Michael K.; INGLE, James N.; BEHRENS, Marshall D.; RADISKY, Derek C.; KNUTSON, Keith L. TGF $\beta$ /TNF $\alpha$ -mediated epithelial-mesenchymal transition generates breast cancer stem cells with a claudin-low phenotype. **Cancer Research**, [S. l.], v. 71, n. 13, p. 4707–4719, 2011. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-4554/649662/AM/TGF-TNF-MEDIATED-EPITHELIAL-MESENCHYMAL-TRANSITION. Disponível em: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/71/13/4707/567582/TGF-TNF-Mediated-Epithelial-Mesenchymal-Transition>. Acesso em: 25 set. 2022.

ATOUM, Manar Fayiz; ALZOUGHLOO, Foad; AL-HOURANI, Huda. Linkage Between Obesity Leptin and Breast Cancer. **Breast Cancer: Basic and Clinical Research**, [S. l.], v. 14, 2020. DOI: 10.1177/1178223419898458/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177\_1178223419898458-FIG2.JPEG. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/1178223419898458>. Acesso em: 3 nov. 2022.

BAGHBAN, Roghayyeh; ROSHANGAR, Leila; JAHANBAN-ESFAHLAN, Rana; SEIDI, Khaled; EBRAHIMI-KALAN, Abbas; JAYMAND, Mehdi; KOLAHIAN, Saeed; JAVAHERI, Tahereh; ZARE, Peyman. Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. **Cell Communication and Signaling 2020 18:1**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 1–19, 2020. DOI: 10.1186/S12964-020-0530-4. Disponível em: <https://biosignaling.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12964-020-0530-4>. Acesso em: 4 nov. 2021.

BAI, Y.; SUN, Q. Macrophage recruitment in obese adipose tissue. **Obesity Reviews**, [S. l.], v. 16, n. 2, p. 127–136, 2015. DOI: 10.1111/OBR.12242. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/obr.12242>. Acesso em: 3 nov. 2021.

BARTNESS, Timothy J.; LIU, Yang; SHRESTHA, Yogendra B.; RYU, Vitaly. Neural innervation of white adipose tissue and the control of lipolysis. **Frontiers in Neuroendocrinology**, [S. l.], v. 35, n. 4, p. 473–493, 2014. DOI: 10.1016/J.YFRNE.2014.04.001.

BEBELMAN, Maarten P.; SMIT, Martine J.; PEGTEL, D. Michiel; BAGLIO, S. Rubina. Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer. **Pharmacology & Therapeutics**, [S. l.], v. 188, p. 1–11, 2018. DOI: 10.1016/J.PHARMTHERA.2018.02.013.

BOUSQUENAUD, Mélanie; FICO, Flavia; SOLINAS, Giovanni; RÜEGG, Curzio; SANTAMARIA-MARTÍNEZ, Albert. Obesity promotes the expansion of metastasis-initiating cells in breast cancer. **Breast Cancer Research**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 1–11, 2018. DOI: 10.1186/S13058-018-1029-4/FIGURES/4. Disponível em: <https://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13058-018-1029-4>. Acesso em: 10 out. 2022.

BOWERS, Laura W. et al. Leptin signaling mediates obesity-associated CSC enrichment and EMT in preclinical TNBC models. **Molecular Cancer Research**, [S. l.], v. 16, n. 5, p. 869–879, 2018. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-17-0508/193173/AM/LEPTIN-SIGNALING-MEDIATES-OBESITY-ASSOCIATED-CSC. Disponível em: <https://aacrjournals.org/mcr/article/16/5/869/89849/Leptin-Signaling-Mediates-Obesity-Associated-CSC>. Acesso em: 11 set. 2022.

BOWERS, Laura W.; CAVAZOS, David A.; MAXIMO, Ilane XF; BRENNER, Andrew J.; HURSTING, Stephen D.; DEGRAFFENRIED, Linda A. Obesity enhances nongenomic estrogen receptor crosstalk with the PI3K/Akt and MAPK pathways to promote in vitro measures of breast cancer progression. **Breast Cancer Research** 2013 15:4, [S. l.], v. 15, n. 4, p. 1–13, 2013. DOI: 10.1186/BCR3453. Disponível em: <https://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr3453>. Acesso em: 3 nov. 2021.

BRUNA, Alejandra et al. TGF $\beta$  induces the formation of tumour-initiating cells in claudinlow breast cancer. **Nature Communications** 2012 3:1, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 1–12, 2012. DOI: 10.1038/ncomms2039. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ncomms2039>. Acesso em: 1 nov. 2022.

CAMINO, Tamara; LAGO-BAAMEIRO, Nerea; BRAVO, Susana Belén; MOLARES-VILA, Alberto; SUEIRO, Aurelio; COUTO, Iván; BALTAR, Javier; CASANUEVA, Eelipe F.; PARDO, Maria. Human obese white adipose tissue sheds depot-specific extracellular vesicles and reveals candidate biomarkers for monitoring obesity and its comorbidities. **Translational Research**, [S. l.], v. 239, p. 85–102, 2022. DOI: 10.1016/j.trsl.2021.01.006. Disponível em: <http://www.translationalres.com/article/S1931524421000062/fulltext>. Acesso em: 1 nov. 2022.

CASTAÑO, Carlos; KALKO, Susana; NOVIALS, Anna; PÁRRIZAS, Marcelina. Obesity-associated exosomal miRNAs modulate glucose and lipid metabolism in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 115, n. 48, p. 12158–12163, 2018. DOI:

10.1073/PNAS.1808855115/SUPPL\_FILE/PNAS.1808855115.SAPP.PDF.

Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.1808855115>. Acesso em: 4 nov. 2022.

CHEN, Bing; SANG, Yuting; SONG, Xiaojin; ZHANG, Dong; WANG, Lijuan; ZHAO, Wenjing; LIANG, Yiran; ZHANG, Ning; YANG, Qifeng. Exosomal miR-500a-5p derived from cancer-associated fibroblasts promotes breast cancer cell proliferation and metastasis through targeting USP28. **Theranostics**, [S. l.], v. 11, n. 8, p. 3932–3947, 2021. DOI: 10.7150/THNO.53412. Disponível em: <http://www.thno.org//creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. Acesso em: 23 out. 2022.

CHEN, Da Chung; CHUNG, Yueh Fang; YEH, Yao Tsug; CHAUNG, Hso Chi; KUO, Fu Chen; FU, Ou Yang; CHEN, Hue Yong; HOU, Ming Feng; YUAN, Shyng Shou F. Serum adiponectin and leptin levels in Taiwanese breast cancer patients. **Cancer Letters**, [S. l.], v. 237, n. 1, p. 109–114, 2006. DOI: 10.1016/J.CANLET.2005.05.047. CHEN, Hong-liang; DING, Ang; WANG, Mao-li. Impact of central obesity on prognostic outcome of triple negative breast cancer in Chinese women. **SpringerPlus** 2016 5:1, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 1–8, 2016. DOI: 10.1186/S40064-016-2200-Y. Disponível em: <https://springerplus.springeropen.com/articles/10.1186/s40064-016-2200-y>. Acesso em: 17 set. 2021.

CHEN, Juan; WEI, Yanghui; YANG, Weiqin; HUANG, Qingnan; CHEN, Yong; ZENG, Kai; CHEN, Jiawei. IL-6: The Link Between Inflammation, Immunity and Breast Cancer. **Frontiers in Oncology**, [S. l.], v. 12, p. 3472, 2022. DOI: 10.3389/FONC.2022.903800/BIBTEX.

CHEN, Pinjia; FENG, Yun; ZHANG, Haige; SHI, Xinpeng; LI, Bin; JU, Wencui; YU, Xiurong; ZHANG, Nan; LUO, Xiaoyong. MicroRNA-192 inhibits cell proliferation and induces apoptosis in human breast cancer by targeting caveolin 1. **Oncology Reports**, [S. l.], v. 42, n. 5, p. 1667–1676, 2019. DOI: 10.3892/OR.2019.7298/HTML. Disponível em: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2019.7298/abstract>. Acesso em: 4 nov. 2022.

CHUSYD, Daniella E.; WANG, Donghai; HUFFMAN, Derek M.; NAGY, Tim R. Relationships between Rodent White Adipose Fat Pads and Human White Adipose Fat Depots. **Frontiers in Nutrition**, [S. l.], v. 3, p. 10, 2016. DOI: 10.3389/FNUT.2016.00010/BIBTEX.

COHEN, Evan N. et al. Inflammation Mediated Metastasis: Immune Induced Epithelial-To-Mesenchymal Transition in Inflammatory Breast Cancer Cells. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 10, n. 7, p. e0132710, 2015. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0132710. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0132710>. Acesso em: 29 set. 2022.

DAGENAIS, Maryse; DUPAUL-CHICOINE, Jeremy; DOUGLAS, Todd; CHAMPAGNE, Claudia; MORIZOT, Alexandre; SALEH, Maya. The Interleukin (IL)-1R1 pathway is a critical negative regulator of PyMT-mediated mammary

tumorigenesis and pulmonary metastasis. **Oncolmmunology**, [S. l.], v. 6, n. 3, 2017. DOI:10.1080/2162402X.2017.1287247/SUPPL\_FILE/KONI\_A\_1287247\_SM1057.ZI P. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/2162402X.2017.1287247>. Acesso em: 3 nov. 2022.

DANFORTH, David N.; SGAGIAS, Magdalene K. Interleukin 1 $\alpha$  Blocks Estradiol-stimulated Growth and Down-regulates the Estrogen Receptor in MCF-7 Breast Cancer Cells in Vitro. **CANCER RESEARCH**, [S. l.], v. 51, 1991. Disponível em: <http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/51/5/1488/2446536/cr0510051488.pdf>. Acesso em: 3 nov. 2022.

DENG, Zhong Bin et al. Adipose Tissue Exosome-Like Vesicles Mediate Activation of Macrophage-Induced Insulin Resistance. **Diabetes**, [S. l.], v. 58, n. 11, p. 2498, 2009. DOI: 10.2337/DB09-0216. Disponível em: [/pmc/articles/PMC2768161/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19381611/). Acesso em: 5 nov. 2022.

DEVERICKS, Emily N.; CARSON, Meredith S.; MCCULLOUGH, Lauren E.; COLEMAN, Michael F.; HURSTING, Stephen D. The obesity-breast cancer link: a multidisciplinary perspective. **Cancer and Metastasis Reviews** 2022 41:3, [S. l.], v. 41, n. 3, p. 607–625, 2022. DOI: 10.1007/S10555-022-10043-5. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10555-022-10043-5>. Acesso em: 25 set. 2022.

DIEP, Sydney; MADDUKURI, Mahita; YAMAUCHI, Stephanie; GESHOW, Ganamee; DELK, Nikki A. Interleukin-1 and Nuclear Factor Kappa B Signaling Promote Breast Cancer Progression and Treatment Resistance. **Cells** 2022, Vol. 11, Page 1673, [S. l.], v. 11, n. 10, p. 1673, 2022. DOI: 10.3390/CELLS11101673. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/11/10/1673/htm>. Acesso em: 4 nov. 2022.

DOU, Dongwei; REN, Xiaoyang; HAN, Mingli; XU, Xiaodong; GE, Xin; GU, Yuanting; WANG, Xinxing. Cancer-Associated Fibroblasts-Derived Exosomes Suppress Immune Cell Function in Breast Cancer via the miR-92/PD-L1 Pathway. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 11, p. 2026, 2020. DOI: 10.3389/FIMMU.2020.02026/BIBTEX.

DOYLE, Laura M.; WANG, Michael Zhuo. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. **Cells** 2019, Vol. 8, Page 727, [S. l.], v. 8, n. 7, p. 727, 2019. DOI: 10.3390/CELLS8070727. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/8/7/727/htm>. Acesso em: 3 nov. 2021.

EMENS, Leisha A. Breast cancer immunotherapy: Facts and hopes. **Clinical Cancer Research**, [S. l.], v. 24, n. 3, p. 511–520, 2018. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-3001/274462/AM/BREAST-CANCER-IMMUNOTHERAPY-FACTS-AND-HOPEBREAST. Disponível em: <https://aacrjournals.org/clincancerres/article/24/3/511/81112/Breast-Cancer-Immunotherapy-Facts-and-HopesBreast>. Acesso em: 25 out. 2022.

ESCOLA, Jean Michel; KLEIJMEER, Monique J.; STOORVOGEL, Willem;

GRIFFITH, Janice M.; YOSHIE, Osamu; GEUZE, Hans J. Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 273, n. 32, p. 20121–20127, 1998. DOI: 10.1074/jbc.273.32.20121. Disponível em: <http://www.jbc.org/article/S0021925818490345/fulltext>. Acesso em: 2 nov. 2022.

EVANGELISTA, Gabriela Coeli Menezes et al. 4T1 Mammary Carcinoma Colonization of Metastatic Niches Is Accelerated by Obesity. **Frontiers in Oncology**, [S. l.], v. 9, p. 685, 2019. DOI: 10.3389/FONC.2019.00685/BIBTEX.

EZQUER, Fernando; QUINTANILLA, María Elena; MORALES, Paola; SANTAPAU, Daniela; EZQUER, Marcelo; KOGAN, Marcelo J.; SALAS-HUENULEO, Edison; HERRERA-MARSCHITZ, Mario; ISRAEL, Yedy. Intranasal delivery of mesenchymal stem cell-derived exosomes reduces oxidative stress and markedly inhibits ethanol consumption and post-deprivation relapse drinking. **Addiction Biology**, [S. l.], v. 24, n. 5, p. 994–1007, 2019. DOI: 10.1111/ADB.12675. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/adb.12675>. Acesso em: 5 nov. 2022.

FAIN, John N.; TICHANSKY, David S.; MADAN, Atul K. Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 release by human adipose tissue is enhanced in obesity. **Metabolism: Clinical and Experimental**, [S. l.], v. 54, n. 11, p. 1546–1551, 2005. DOI: 10.1016/j.metabol.2005.05.024. Disponível em: <http://www.metabolismjournal.com/article/S0026049505002325/fulltext>. Acesso em: 1 nov. 2022.

FARKHONDEH, Tahereh; LLORENS, Silvia; POURBAGHER-SHAHRI, Ali Mohammad; ASHRAFIZADEH, Milad; TALEBI, Marjan; SHAKIBAEI, Mehdi; SAMARGHANDIAN, Saeed. An Overview of the Role of Adipokines in Cardiometabolic Diseases. **Molecules** 2020, Vol. 25, Page 5218, [S. l.], v. 25, n. 21, p. 5218, 2020. DOI: 10.3390/MOLECULES25215218. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/21/5218/htm>. Acesso em: 24 out. 2022.

FERRANTE, Sarah C. et al. Adipocyte-derived exosomal miRNAs: a novel mechanism for obesity-related disease. **Pediatric Research** 2015 77:3, [S. l.], v. 77, n. 3, p. 447–454, 2014. DOI: 10.1038/pr.2014.202. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/pr2014202>. Acesso em: 2 nov. 2022.

FITZGERALD, Wendy; FREEMAN, Michael L.; LEDERMAN, Michael M.; VASILIEVA, Elena; ROMERO, Roberto; MARGOLIS, Leonid. A System of Cytokines Encapsulated in ExtraCellular Vesicles. **Scientific Reports** 2018 8:1, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-27190-x. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-27190-x>. Acesso em: 3 nov. 2022.

FONG, Miranda Y. et al. Breast-cancer-secreted miR-122 reprograms glucose metabolism in premetastatic niche to promote metastasis. **Nature Cell Biology** 2014 17:2, [S. l.], v. 17, n. 2, p. 183–194, 2015. DOI: 10.1038/ncb3094. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ncb3094>. Acesso em: 21 out. 2022.

FUNCKE, Jan-Bernd; SCHERER, Philipp E. Thematic Review Series: Adipose Biology: Beyond adiponectin and leptin: adipose tissue-derived mediators of inter-

organ communication. **Journal of Lipid Research**, [S. l.], v. 60, n. 10, p. 1648, 2019. DOI: 10.1194/JLR.R094060. Disponível em: /pmc/articles/PMC6795086/. Acesso em: 3 nov. 2021.

GARRIDO-CASTRO, Ana C.; LIN, Nancy U.; POLYAK, Kornelia. Insights into molecular classifications of triple-negative breast cancer: Improving patient selection for treatment. **Cancer Discovery**, [S. l.], v. 9, n. 2, p. 176–198, 2019. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-18-1177/333711/P/INSIGHTS-INTO-MOLECULAR-CLASSIFICATIONS-OF-TRIPLE. Disponível em: <https://aacrjournals.org/cancerdiscovery/article/9/2/176/10730/Insights-into-Molecular-Classifications-of-Triple>. Acesso em: 25 out. 2022.

GOOSSENS, Gijs H. The Metabolic Phenotype in Obesity: Fat Mass, Body Fat Distribution, and Adipose Tissue Function. **Obesity Facts**, [S. l.], v. 10, n. 3, p. 207, 2017. DOI: 10.1159/000471488. Disponível em: /pmc/articles/PMC5644968/. Acesso em: 22 ago. 2022.

GOULET, Cassandra Ringuette; BERNARD, Genevieve; TREMBLAY, Sarah; CHABAUD, Stephane; BOLDUC, Stephane; POULIOT, Frederic. Exosomes induce fibroblast differentiation into cancer-associated fibroblasts through TGF $\beta$  signaling. **Molecular Cancer Research**, [S. l.], v. 16, n. 7, p. 1196–1204, 2018. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-17-0784/81263/AM/EXOSOMES-INDUCE-FIBROBLAST-DIFFERENTIATION-INTO. Disponível em: <https://aacrjournals.org/mcr/article/16/7/1196/268788/Exosomes-Induce-Fibroblast-Differentiation-into>. Acesso em: 3 nov. 2022.

GROSSMANN, Michael E.; RAY, Amitabha; NKHATA, Katai J.; MALAKHOV, Dmitry A.; ROGOZINA, Olga P.; DOGAN, Soner; CLEARY, Margot P. Obesity and breast cancer: status of leptin and adiponectin in pathological processes. **Cancer and Metastasis Reviews** 2010 29:4, [S. l.], v. 29, n. 4, p. 641–653, 2010. DOI: 10.1007/S10555-010-9252-1. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10555-010-9252-1>. Acesso em: 26 set. 2022.

GUO, Jian et al. Mouse 4T1 Breast Cancer Cell-Derived Exosomes Induce Proinflammatory Cytokine Production in Macrophages via miR-183. **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 205, n. 10, p. 2916–2925, 2020. DOI: 10.4049/JIMMUNOL.1901104/-/DCSUPPLEMENTAL. Disponível em: <https://www.jimmunol.org/content/205/10/2916>. Acesso em: 21 out. 2022.

GUPTA, Piyush B.; PROIA, David; CINGOZ, Oya; WEREMOWICZ, Janusz; NABER, Stephen P.; WEINBERG, Robert A.; KUPERWASSER, Charlotte. Systemic Stromal Effects of Estrogen Promote the Growth of Estrogen Receptor-Negative Cancers. **Cancer Research**, [S. l.], v. 67, n. 5, p. 2062–2071, 2007. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3895. Disponível em: <https://cancerres.aacrjournals.org/content/67/5/2062>. Acesso em: 17 set. 2021.

GURUNG, Sonam; PEROUCHEAU, Dany; TOURAMANIDOU, Loukia; BARUTEAU, Julien. The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. **Cell Communication and Signaling** 2021 19:1, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 1–19, 2021.



DOI: 10.1186/S12964-021-00730-1. Disponível em:  
<https://biosignaling.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12964-021-00730-1>. Acesso em: 19 out. 2022.

GYAMFI, Jones; LEE, Yun Hee; EOM, Minseob; CHOI, Junjeong. Interleukin-6/STAT3 signalling regulates adipocyte induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells. **Scientific Reports** 2018 8:1, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 1–13, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-27184-9. Disponível em:  
<https://www.nature.com/articles/s41598-018-27184-9>. Acesso em: 25 set. 2022.

HAM, Sunyoung; LIMA, Luize G.; CHAI, Edna Pei Zhi; MULLER, Alexandra; LOBB, Richard J.; KRUMEICH, Sophie; WEN, Shu Wen; WIEGMANS, Adrian P.; MÖLLER, Andreas. Breast cancer-derived exosomes alter macrophage polarization via gp130/STAT3 signaling. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 9, n. MAY, p. 871, 2018. DOI: 10.3389/FIMMU.2018.00871/BIBTEX.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, [S. l.], v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011. DOI: 10.1016/J.CELL.2011.02.013. Disponível em:  
<http://www.cell.com/article/S0092867411001279/fulltext>. Acesso em: 3 nov. 2021.

HANNAFON, Bethany N.; CAI, Angela; CALLOWAY, Cameron L.; XU, Yi Fan; ZHANG, Roy; FUNG, Kar Ming; DING, Wei Qun. MiR-23b and miR-27b are oncogenic microRNAs in breast cancer: Evidence from a CRISPR/Cas9 deletion study. **BMC Cancer**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 1–12, 2019. DOI: 10.1186/S12885-019-5839-2/FIGURES/4. Disponível em:  
<https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-019-5839-2>. Acesso em: 2 nov. 2022.

HARBECK, Nadia; PENAULT-LLORCA, Frédérique; CORTES, Javier; GNANT, Michael; HOUSSAMI, Nehmat; POORTMANS, Philip; RUDDY, Kathryn; TSANG, Janice; CARDOSO, Fatima. Breast cancer. **Nature Reviews Disease Primers** 2019 5:1, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 1–31, 2019. DOI: 10.1038/s41572-019-0111-2. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41572-019-0111-2>. Acesso em: 25 out. 2022.

HARTWIG, Sonja; DE FILIPPO, Elisabetta; GÖDDEKE, Simon; KNEBEL, Birgit; KOTZKA, Jorg; AL-HASANI, Hadi; RODEN, Michael; LEHR, Stefan; SELL, Henrike. Exosomal proteins constitute an essential part of the human adipose tissue secretome. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, [S. l.], v. 1867, n. 12, p. 140172, 2019. DOI: 10.1016/J.BBAPAP.2018.11.009.

HILL, Andrea A.; BOLUS, W. Reid; HASTY, Alyssa H. A decade of progress in adipose tissue macrophage biology. **Immunological Reviews**, [S. l.], v. 262, n. 1, p. 134–152, 2014. DOI: 10.1111/IMR.12216. Disponível em:  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/imr.12216>. Acesso em: 3 nov. 2021.

HOWE, Louise R.; SUBBARAMAIAH, Kotha; HUDIS, Clifford A.; DANNENBERG, Andrew J. Molecular pathways: Adipose inflammation as a mediator of obesity-associated cancer. **Clinical Cancer Research**, [S. l.], v. 19, n. 22, p. 6074–6083, 2013. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2603/85346/AM/MOLECULAR-

PATHWAYS-ADIPOSE-INFLAMMATION-AS-A. Disponível em: <https://aacrjournals.org/clincancerres/article/19/22/6074/208657/Molecular-Pathways-Adipose-Inflammation-as-a>. Acesso em: 12 out. 2022.

HUANG, J.; WOODS, P.; NORMOLLE, D.; GOFF, J. P.; BENOS, P. V.; STEHLE, C. J.; STEINMAN, R. A. Downregulation of estrogen receptor and modulation of growth of breast cancer cell lines mediated by paracrine stromal cell signals. **Breast Cancer Research and Treatment**, [S. l.], v. 161, n. 2, p. 229–243, 2017. DOI: 10.1007/S10549-016-4052-0/FIGURES/7. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10549-016-4052-0>. Acesso em: 3 nov. 2022.

HUSSAIN, Mohammed Tayab; IQBAL, Asif Jilani; NORLING, Lucy Victoria. The Role and Impact of Extracellular Vesicles in the Modulation and Delivery of Cytokines during Autoimmunity. **International Journal of Molecular Sciences** 2020, Vol. 21, Page 7096, [S. l.], v. 21, n. 19, p. 7096, 2020. DOI: 10.3390/IJMS21197096. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/19/7096/htm>. Acesso em: 3 nov. 2022.

IBRAHIM, M. Mohsen. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. **Obesity Reviews**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 11–18, 2010. DOI: 10.1111/J.1467-789X.2009.00623.X. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1467-789X.2009.00623.x>. Acesso em: 24 out. 2022.

INCIO, Joao et al. Obesity promotes resistance to anti-VEGF therapy in breast cancer by up-regulating IL-6 and potentially FGF-2. **Science Translational Medicine**, [S. l.], v. 10, n. 432, 2018. DOI: 10.1126/SCITRANSLMED.AAG0945/SUPPL\_FILE/AAG0945\_SM.PDF. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.aag0945>. Acesso em: 25 set. 2022.

JAFARI, Naser et al. Adipocyte-derived exosomes may promote breast cancer progression in type 2 diabetes. **Science Signaling**, [S. l.], v. 14, n. 710, 2021. DOI: 10.1126/SCISIGNAL.ABJ2807/SUPPL\_FILE/SCISIGNAL.ABJ2807\_DATA\_FILES\_S1\_TO\_S11.ZIP. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/scisignal.abj2807>. Acesso em: 23 out. 2022.

JAYABALAN, Nanthini et al. Adipose Tissue Exosomal Proteomic Profile Reveals a Role on Placenta Glucose Metabolism in Gestational Diabetes Mellitus. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [S. l.], v. 104, n. 5, p. 1735–1752, 2019. DOI: 10.1210/JC.2018-01599. Disponível em: <https://academic.oup.com/jcem/article/104/5/1735/5224750>. Acesso em: 26 out. 2022.

JIANG, Guobin; SHI, Weiwu; FANG, Hongyan; ZHANG, Xiaohua. MiR-27a promotes human breast cancer cell migration by inducing EMT in a FBXW7-dependent manner. **Molecular Medicine Reports**, [S. l.], v. 18, n. 6, p. 5417–5426, 2018. DOI: 10.3892/MMR.2018.9587/HTML. Disponível em: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2018.9587/abstract>. Acesso em: 5 nov. 2022.

JIN, Lianjin; WESSELY, Oliver; MARCUSSON, Eric G.; IVAN, Cristina; CALIN, George A.; ALAHARI, Suresh K. Prooncogenic factors miR-23b and miR-27b are regulated by Her2/Neu, EGF, and TNF-A in breast cancer. **Cancer Research**, [S. l.], v. 73, n. 9, p. 2884–2896, 2013. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2162/650662/AM/PRO-ONCOGENIC-FACTORS-MIR-23B-AND-MIR-27B-ARE. Disponível em: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/73/9/2884/592679/Prooncogenic-Factors-miR-23b-and-miR-27b-Are>. Acesso em: 2 nov. 2022.

KAHN, C. Ronald; WANG, Guoxiao; LEE, Kevin Y. Altered adipose tissue and adipocyte function in the pathogenesis of metabolic syndrome. **The Journal of Clinical Investigation**, [S. l.], v. 129, n. 10, p. 3990–4000, 2019. DOI: 10.1172/JCI129187. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI129187>. Acesso em: 3 nov. 2021.

KAJIMURA, Shingo. Advances in the understanding of adipose tissue biology. **Nature Reviews Endocrinology** 2016 13:2, [S. l.], v. 13, n. 2, p. 69–70, 2017. DOI: 10.1038/nrendo.2016.211. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrendo.2016.211>. Acesso em: 22 ago. 2022.

KALLURI, Raghu; LEBLEU, Valerie S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. **Science**, [S. l.], v. 367, n. 6478, 2020. DOI: 10.1126/SCIENCE.AAU6977/ASSET/0D942D3E-7BB0-410E-B762-FEC151E57E74/ASSETS/GRAPHIC/367\_AAU6977\_FA.JPEG. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aau6977>. Acesso em: 19 out. 2022.

KAPPE, Camilla; ZHANG, Qimin; NYSTRÖM, Thomas; SJÖHOLM, Åke. Effects of high-fat diet and the anti-diabetic drug metformin on circulating GLP-1 and the relative number of intestinal L-cells. **Diabetology and Metabolic Syndrome**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 1–8, 2014. DOI: 10.1186/1758-5996-6-70/FIGURES/3. Disponível em: <https://dmsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1758-5996-6-70>. Acesso em: 24 out. 2022.

KAWAI, Tatsuo; AUTIERI, Michael V.; SCALIA, Rosario. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, [S. l.], v. 320, n. 3, p. C375–C391, 2021. DOI: 10.1152/AJPCELL.00379.2020/ASSET/IMAGES/LARGE/AJ-ACEL210014F002.JPEG. Disponível em: <https://journals.physiology.org/doi/10.1152/ajpcell.00379.2020>. Acesso em: 19 out. 2022.

KIM, Hoe Suk; JUNG, Minji; CHOI, Sul Ki; WOO, Jisu; PIAO, Yin Ji; HWANG, Eun Hye; KIM, Hyelim; KIM, Seung Ja; MOON, Woo Kyung. IL-6-mediated cross-talk between human preadipocytes and ductal carcinoma in situ in breast cancer progression. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, [S. l.], v. 37, n. 1, p. 1–13, 2018. DOI: 10.1186/S13046-018-0867-3/FIGURES/5. Disponível em: <https://jeccr.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13046-018-0867-3>. Acesso em: 11 set. 2022.

KIM, Yujeong; SON, Taesang; PARK, Jeongjin; JUN, Woojin; KIM, Ok Kyung. Role of Exosomes Derived from Adipose Tissue under Obese Conditions in Skeletal Muscle and Liver Cells: Commonalities and Differences. **Molecular Nutrition & Food Research**, [S. l.], p. 2200358, 2022. DOI: 10.1002/MNFR.202200358.

Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/mnfr.202200358>.

Acesso em: 26 out. 2022.

KONG, William; YANG, Hua; HE, Lili; ZHAO, Jian-jun; COPPOLA, Domenico; DALTON, William S.; CHENG, Jin Q. MicroRNA-155 Is Regulated by the Transforming Growth Factor  $\beta$ /Smad Pathway and Contributes to Epithelial Cell Plasticity by Targeting RhoA. **Molecular and Cellular Biology**, [S. l.], v. 28, n. 22, p. 6773–6784, 2008. DOI: 10.1128/MCB.00941-08/ASSET/F2B64C96-58CC-4E5D-9223-0B44F2BD48A0/ASSETS/GRAPHIC/ZMB0220877770006.JPEG. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/MCB.00941-08>. Acesso em: 5 nov. 2022.

LAFONTAN, Max. Differences between subcutaneous and visceral adipose tissues. **Physiology and Physiopathology of Adipose Tissue**, [S. l.], v. 9782817803432, p. 329–349, 2013. DOI: 10.1007/978-2-8178-0343-2\_23/COVER. Disponível em: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-2-8178-0343-2\\_23](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-2-8178-0343-2_23). Acesso em: 24 out. 2022.

LEE, C. H.; WOO, Y. C.; WANG, Y.; YEUNG, C. Y.; XU, A.; LAM, K. S. L. Obesity, adipokines and cancer: an update. **Clinical Endocrinology**, [S. l.], v. 83, n. 2, p. 147–156, 2015. DOI: 10.1111/CEN.12667. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/cen.12667>. Acesso em: 3 nov. 2021.

LEE, Kyuwan; KRUPER, Laura; DIELI-CONWRIGHT, Christina M.; MORTIMER, Joanne E. The Impact of Obesity on Breast Cancer Diagnosis and Treatment. **Current Oncology Reports 2019 21:5**, [S. l.], v. 21, n. 5, p. 1–6, 2019. DOI: 10.1007/S11912-019-0787-1. Disponível em:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s11912-019-0787-1>. Acesso em: 27 set. 2022.

LI, Irene; NABET, Barzin Y. Exosomes in the tumor microenvironment as mediators of cancer therapy resistance. **Molecular Cancer**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 1–10, 2019. DOI: 10.1186/S12943-019-0975-5/FIGURES/2. Disponível em: <https://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12943-019-0975-5>. Acesso em: 19 out. 2022.

LIANG, Mei; ZHANG, Ping; FU, Jian. Up-regulation of LOX-1 expression by TNF- $\alpha$  promotes trans-endothelial migration of MDA-MB-231 breast cancer cells. **Cancer Letters**, [S. l.], v. 258, n. 1, p. 31–37, 2007. DOI: 10.1016/J.CANLET.2007.08.003.

LINARES, Rodolfo López; BENÍTEZ, Jonnathan Guadalupe Santillán; REYNOSO, Mariana Ortiz; ROMERO, Carlos González; SANDOVAL-CABRERA, Antonio. Modulation of the leptin receptors expression in breast cancer cell lines exposed to leptin and tamoxifen. **Scientific Reports 2019 9:1**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 1–9, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-55674-x. Disponível em:

<https://www.nature.com/articles/s41598-019-55674-x>. Acesso em: 1 nov. 2022.

LLORENTE, Alicia; SKOTLAND, Tore; SYLVÄNNE, Tuulia; KAUKANEN, Dimple; RÓG, Tomasz; ORŁOWSKI, Adam; VATTULAINEN, Ilpo; EKROOS, Kim; SANDVIG, Kirsten. Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, [S. l.], v. 1831, n. 7, p. 1302–1309, 2013. DOI: 10.1016/J.BBALIP.2013.04.011.

LONGO, Michele; ZATTERALE, Federica; NADERI, Jamal; PARRILLO, Luca; FORMISANO, Pietro; RACITI, Gregory Alexander; BEGUINOT, Francesco; MIELE, Claudia. Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications. **International Journal of Molecular Sciences** 2019, Vol. 20, Page 2358, [S. l.], v. 20, n. 9, p. 2358, 2019. DOI: 10.3390/IJMS20092358. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/9/2358/htm>. Acesso em: 22 ago. 2022.

ŁUKASIEWICZ, Sergiusz; CZECZELEWSKI, Marcin; FORMA, Alicja; BAJ, Jacek; SITARZ, Robert; STANISŁAWEK, Andrzej. Breast Cancer—Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies—An Updated Review. **Cancers** 2021, Vol. 13, Page 4287, [S. l.], v. 13, n. 17, p. 4287, 2021. DOI: 10.3390/CANCERS13174287. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6694/13/17/4287/htm>. Acesso em: 27 set. 2022.

LUONG, Quyen; HUANG, Jun; LEE, Kevin Y. Deciphering White Adipose Tissue Heterogeneity. **Biology** 2019, Vol. 8, Page 23, [S. l.], v. 8, n. 2, p. 23, 2019. DOI: 10.3390/BIOLOGY8020023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-7737/8/2/23/htm>. Acesso em: 22 ago. 2022.

MAJED, Bilal; MOREAU, Thierry; SENOUCI, Kamel; SALMON, Rémi J.; FOURQUET, Alain; ASSELAIN, Bernard. Is obesity an independent prognosis factor in woman breast cancer? **Breast Cancer Research and Treatment** 2007 111:2, [S. l.], v. 111, n. 2, p. 329–342, 2007. DOI: 10.1007/S10549-007-9785-3. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10549-007-9785-3>. Acesso em: 3 nov. 2021.

MANCUSO, Peter. The role of adipokines in chronic inflammation. **ImmunoTargets and Therapy**, [S. l.], v. 5, p. 47, 2016. DOI: 10.2147/ITT.S73223. Disponível em: </pmc/articles/PMC4970637/>. Acesso em: 24 out. 2022.

MASJEDI, Ali; HASHEMI, Vida; HOJJAT-FARSANGI, Mohammad; GHALAMFARSA, Ghasem; AZIZI, Gholamreza; YOUSEFI, Mehdi; JADIDI-NIARAGH, Farhad. The significant role of interleukin-6 and its signaling pathway in the immunopathogenesis and treatment of breast cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S. l.], v. 108, p. 1415–1424, 2018. DOI: 10.1016/J.BIOPHA.2018.09.177.

MATTISKE, Sam; SUETANI, Rachel J.; NEILSEN, Paul M.; CALLEN, David F. The oncogenic role of miR-155 in breast cancer. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, [S. l.], v. 21, n. 8, p. 1236–1243, 2012. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-12-0173/66801/AM/THE-ONCOGENIC-ROLE-OF-MIR-155-IN-BREAST-CANCERMIR. Disponível em: <https://aacrjournals.org/cebp/article/21/8/1236/69421/The-Oncogenic-Role-of-miR-155-in-Breast-CancermiR>. Acesso em: 5 nov. 2022.

MCEARCHERN, Julie A. et al. INVASION AND METASTASIS OF A MAMMARY TUMOR INVOLVES TGF-SIGNALING. *[S. l.]*, 2001. DOI: 10.1002/1097-0215. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions>. Acesso em: 5 nov. 2022.

MEDEIROS, Braeden; ALLAN, Alison L. Molecular Mechanisms of Breast Cancer Metastasis to the Lung: Clinical and Experimental Perspectives. **International Journal of Molecular Sciences** 2019, Vol. 20, Page 2272, *[S. l.]*, v. 20, n. 9, p. 2272, 2019. DOI: 10.3390/IJMS20092272. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/9/2272/htm>. Acesso em: 21 out. 2022.

MULYA, Anny; KIRWAN, John P. Brown and Beige Adipose Tissue: Therapy for Obesity and Its Comorbidities? **Endocrinology and metabolism clinics of North America**, *[S. l.]*, v. 45, n. 3, p. 605, 2016. DOI: 10.1016/J.ECL.2016.04.010. Disponível em: [/pmc/articles/PMC5206678/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2706678/). Acesso em: 3 nov. 2021.

NAM, Jeong Seok et al. An Anti-Transforming Growth Factor  $\beta$  Antibody Suppresses Metastasis via Cooperative Effects on Multiple Cell Compartments. **Cancer Research**, *[S. l.]*, v. 68, n. 10, p. 3835–3843, 2008. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0215. Disponível em: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/68/10/3835/540712/An-Anti-Transforming-Growth-Factor-Antibody>. Acesso em: 5 nov. 2022.

NEGRINI, Simona; GORGOULIS, Vassilis G.; HALAZONETIS, Thanos D. Genomic instability — an evolving hallmark of cancer. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** 2010 11:3, *[S. l.]*, v. 11, n. 3, p. 220–228, 2010. DOI: 10.1038/nrm2858. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrm2858>. Acesso em: 3 nov. 2021.

NUTTER, Faith et al. Different molecular profiles are associated with breast cancer cell homing compared with colonisation of bone: evidence using a novel bone-seeking cell line. **Endocrine-Related Cancer**, *[S. l.]*, v. 21, n. 2, p. 327–341, 2014. DOI: 10.1530/ERC-13-0158. Disponível em: <https://erc.bioscientifica.com/view/journals/erc/21/2/327.xml>. Acesso em: 25 set. 2022.

O'ROURKE, Robert W. Adipose tissue and the physiologic underpinnings of metabolic disease. **Surgery for obesity and related diseases : official journal of the American Society for Bariatric Surgery**, *[S. l.]*, v. 14, n. 11, p. 1755, 2018. DOI: 10.1016/J.SOARD.2018.07.032. Disponível em: [/pmc/articles/PMC6289667/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3006667/). Acesso em: 4 nov. 2021.

OBRADOVIC, Milan; SUDAR-MILOVANOVIC, Emina; SOSKIC, Sanja; ESSACK, Magbubah; ARYA, Swati; STEWART, Alan J.; GOJOBORI, Takashi; ISENOVIC, Esma R. Leptin and Obesity: Role and Clinical Implication. **Frontiers in Endocrinology**, *[S. l.]*, v. 12, p. 563, 2021. DOI: 10.3389/FENDO.2021.585887/BIBTEX.

OUCHI, Noriyuki; PARKER, Jennifer L.; LUGUS, Jesse J.; WALSH, Kenneth. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nature reviews. Immunology**, *[S. l.]*, v. 11, n. 2, p. 85, 2011. DOI: 10.1038/NRI2921. Disponível em:

/pmc/articles/PMC3518031/. Acesso em: 3 nov. 2021.

PACIOTTI, Giulio F.; TAMARKIN, Lawrence. Interleukin-1 Directly Regulates Hormone-Dependent Human Breast Cancer Cell Proliferation in Vitro. **Molecular Endocrinology**, [S. l.], v. 2, n. 5, p. 459–464, 1988. DOI: 10.1210/MEND-2-5-459. Disponível em: <https://academic.oup.com/mend/article/2/5/459/2713555>. Acesso em: 3 nov. 2022.

PARK, Jiyong; MORLEY, Thomas S.; KIM, Min; CLEGG, Deborah J.; SCHERER, Philipp E. Obesity and cancer—mechanisms underlying tumour progression and recurrence. **Nature Reviews Endocrinology** 2014 10:8, [S. l.], v. 10, n. 8, p. 455–465, 2014. DOI: 10.1038/nrendo.2014.94. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrendo.2014.94>. Acesso em: 3 nov. 2021.

PATEL, Payal S.; BURAS, Eric D.; BALASUBRAMANYAM, Ashok. The role of the immune system in obesity and insulin resistance. **Journal of Obesity**, [S. l.], v. 2013, 2013. DOI: 10.1155/2013/616193.

PELLEGRINO, Loredana et al. miR-23b regulates cytoskeletal remodeling, motility and metastasis by directly targeting multiple transcripts. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 41, n. 10, p. 5400–5412, 2013. DOI: 10.1093/NAR/GKT245. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article/41/10/5400/1079173>. Acesso em: 2 nov. 2022.

PERERA, Candida N.; CHIN, Hwei G.; DURU, Nadire; CAMARILLO, Ignacio G. Leptin-regulated gene expression in MCF-7 breast cancer cells: mechanistic insights into leptin-regulated mammary tumor growth and progression. **Journal of Endocrinology**, [S. l.], v. 199, n. 2, p. 221–233, 2008. DOI: 10.1677/JOE-08-0215. Disponível em: <https://joe.bioscientifica.com/view/journals/joe/199/2/221.xml>. Acesso em: 1 nov. 2022.

PERROTT, Kevin M.; WILEY, Christopher D.; DESPREZ, Pierre Yves; CAMPISI, Judith. Apigenin suppresses the senescence-associated secretory phenotype and paracrine effects on breast cancer cells. **GeroScience**, [S. l.], v. 39, n. 2, p. 161–173, 2017. DOI: 10.1007/S11357-017-9970-1/FIGURES/5. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11357-017-9970-1>. Acesso em: 4 nov. 2022.

PIAO, Yin Ji et al. Breast cancer cell-derived exosomes and macrophage polarization are associated with lymph node metastasis. **Oncotarget**, [S. l.], v. 9, n. 7, p. 7398–7410, 2017. DOI: 10.18632/ONCOTARGET.23238. Disponível em: <https://www.oncotarget.com/article/23238/text/>. Acesso em: 21 out. 2022.

PORTER, Geoffrey A.; INGLIS, Karen M.; WOOD, Lori A.; VEUGELERS, Paul J. Effect of Obesity on Presentation of Breast Cancer. **Annals of Surgical Oncology** 2006 13:3, [S. l.], v. 13, n. 3, p. 327–332, 2006. DOI: 10.1245/ASO.2006.03.049. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1245/ASO.2006.03.049>. Acesso em: 3 nov. 2021.

PRAT, Aleix; PARKER, Joel S.; KARGINOVA, Olga; FAN, Cheng; LIVASY, Chad; HERSCHKOWITZ, Jason I.; HE, Xiaping; PEROU, Charles M. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer.

**Breast Cancer Research**, [S. l.], v. 12, n. 5, p. 1–18, 2010. DOI: 10.1186/BCR2635/FIGURES/7. Disponível em: <https://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr2635>. Acesso em: 11 set. 2022.

QIU, Yufan et al. Activated T cell-derived exosomal PD-1 attenuates PD-L1-induced immune dysfunction in triple-negative breast cancer. **Oncogene** **2021** **40:31**, [S. l.], v. 40, n. 31, p. 4992–5001, 2021. DOI: 10.1038/s41388-021-01896-1. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41388-021-01896-1>. Acesso em: 23 out. 2022.

QUAIL, Daniela F.; DANNENBERG, Andrew J. The obese adipose tissue microenvironment in cancer development and progression. **Nature Reviews Endocrinology** **2018** **15:3**, [S. l.], v. 15, n. 3, p. 139–154, 2018. DOI: 10.1038/s41574-018-0126-x. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41574-018-0126-x>. Acesso em: 26 out. 2022.

RAMOS-ANDRADE, Isadora; MORAES, João; BRANDÃO-COSTA, Renata Machado; DA SILVA, Simone Vargas; DE SOUZA, Antônio; DA SILVA, César; RENOVATO-MARTINS, Mariana; BARJA-FIDALGO, Christina. Obese adipose tissue extracellular vesicles raise breast cancer cell malignancy. **Endocrine-Related Cancer**, [S. l.], v. 27, n. 10, p. 571–582, 2020. DOI: 10.1530/ERC-19-0507. Disponível em: <https://erc.bioscientifica.com/view/journals/erc/27/10/ERC-19-0507.xml>. Acesso em: 31 out. 2022.

RAPOSO, Graça; STLOORVOGEL, Willem. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. **Journal of Cell Biology**, [S. l.], v. 200, n. 4, p. 373–383, 2013. DOI: 10.1083/JCB.201211138. Disponível em: [www.jcb.org/cgi/doi/10.1083/jcb.201211138JCB373](http://www.jcb.org/cgi/doi/10.1083/jcb.201211138JCB373). Acesso em: 3 nov. 2021.

RAY, Amitabha; NKHATA, Katai J.; CLEARY, Margot P. Effects of leptin on human breast cancer cell lines in relationship to estrogen receptor and HER2 status. **International Journal of Oncology**, [S. l.], v. 30, n. 6, p. 1499–1509, 2007. DOI: 10.3892/IJO.30.6.1499/HTML. Disponível em: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.30.6.1499/abstract>. Acesso em: 3 nov. 2022.

RECORD, Michel; SILVENTE-POIROT, Sandrine; POIROT, Marc; WAKELAM, Michael J. O. Extracellular vesicles: lipids as key components of their biogenesis and functions. **Journal of Lipid Research**, [S. l.], v. 59, n. 8, p. 1316–1324, 2018. DOI: 10.1194/JLR.E086173. Disponível em: <http://www.jlr.org/article/S002227520330455/fulltext>. Acesso em: 3 nov. 2021.

REILLY, Shannon M.; SALTIEL, Alan R. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. **Nature Reviews Endocrinology** **2017** **13:11**, [S. l.], v. 13, n. 11, p. 633–643, 2017. DOI: 10.1038/nrendo.2017.90. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrendo.2017.90>. Acesso em: 22 ago. 2022.

REN, Jun; WU, Ne N.; WANG, Shuyi; SOWERS, James R.; ZHANG, Yingmei. Obesity cardiomyopathy: evidence, mechanisms, and therapeutic implications. **Physiological Reviews**, [S. l.], v. 101, n. 4, p. 1745, 2021. DOI: 10.1152/PHYSREV.00030.2020. Disponível em: [/pmc/articles/PMC8422427/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38422427/). Acesso em: 4 nov. 2021.



SAITOH, Masao. Involvement of partial EMT in cancer progression. **The Journal of Biochemistry**, [S. l.], v. 164, n. 4, p. 257–264, 2018. DOI: 10.1093/JB/MVY047. Disponível em: <https://academic.oup.com/jb/article/164/4/257/4992040>. Acesso em: 10 out. 2022.

SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, Flora; PÉREZ-PÉREZ, Antonio; DE LA CRUZ-MERINO, Luis; SÁNCHEZ-MARGALET, Víctor. Obesity and Breast Cancer: Role of Leptin. **Frontiers in Oncology**, [S. l.], v. 0, p. 596, 2019. DOI: 10.3389/FONC.2019.00596.

SANTOS, Juliana Carvalho; LIMA, Natália Da Silva; SARIAN, Luis Otavio; MATHEU, Ander; RIBEIRO, Marcelo Lima; DERCHAIN, Sophie Françoise Mauricette. Exosome-mediated breast cancer chemoresistance via miR-155 transfer. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 8, n. 1, 2018. DOI: 10.1038/S41598-018-19339-5. Disponível em: </pmc/articles/PMC5770414/>. Acesso em: 21 out. 2022.

SGAGIAS, Magdalene K.; KASID, Attan; DANFORTH, David N. Interleukin-1 $\alpha$  and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) Inhibit Growth and Induce TNF Messenger RNA in MCF-7 Human Breast Cancer Cells. **Molecular Endocrinology**, [S. l.], v. 5, n. 11, p. 1740–1747, 1991. DOI: 10.1210/MEND-5-11-1740. Disponível em: <https://academic.oup.com/mend/article/5/11/1740/2714291>. Acesso em: 3 nov. 2022.

SHARMA, Shikhar; KELLY, Theresa K.; JONES, Peter A. Epigenetics in cancer. **Carcinogenesis**, [S. l.], v. 31, n. 1, p. 27, 2010. DOI: 10.1093/CARCIN/BGP220. Disponível em: </pmc/articles/PMC2802667/>. Acesso em: 3 nov. 2021.

SINGH, Rajshri; SHANKAR, Bhavani S.; SAINIS, Krishna B. TGF- $\beta$ 1–ROS–ATM–CREB signaling axis in macrophage mediated migration of human breast cancer MCF7 cells. **Cellular Signalling**, [S. l.], v. 26, n. 7, p. 1604–1615, 2014. DOI: 10.1016/J.CELLSIG.2014.03.028.

SONI, Sneha; TORVUND, Meaghan; MANDAL, Chandi C. Molecular insights into the interplay between adiposity, breast cancer and bone metastasis. **Clinical and Experimental Metastasis**, [S. l.], v. 38, n. 2, p. 119–138, 2021. DOI: 10.1007/S10585-021-10076-0/FIGURES/3. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10585-021-10076-0>. Acesso em: 26 set. 2022.

SUAREZ-CARMONA, Meggy; LESAGE, Julien; CATALDO, Didier; GILLES, Christine. EMT and inflammation: inseparable actors of cancer progression. **Molecular Oncology**, [S. l.], v. 11, n. 7, p. 805–823, 2017. DOI: 10.1002/1878-0261.12095. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/1878-0261.12095>. Acesso em: 29 set. 2022.

SULTANA, Rizwana; KATAKI, Amal Ch; BORTHAKUR, Bibhuti Bhusan; BASUMATARY, Tarun K.; BOSE, Sujoy. Imbalance in leptin-adiponectin levels and leptin receptor expression as chief contributors to triple negative breast cancer progression in Northeast India. **Gene**, [S. l.], v. 621, p. 51–58, 2017. DOI: 10.1016/J.GENE.2017.04.021.

SUN, Heng; ZOU, Jing; CHEN, Ling; ZU, Xuyu; WEN, Gebo; ZHONG, Jing. Triple-negative breast cancer and its association with obesity (Review). **Molecular and Clinical Oncology**, [S. l.], v. 7, n. 6, p. 935–942, 2017. DOI: 10.3892/MCO.2017.1429. Disponível em: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/mco.2017.1429/abstract>. Acesso em: 17 set. 2021.

TANG, Wei; ZHU, Jiujun; SU, Shicheng; WU, Wei; LIU, Qiang; SU, Fengxi; YU, Fengyan. MiR-27 as a Prognostic Marker for Breast Cancer Progression and Patient Survival. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 7, n. 12, p. e51702, 2012. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0051702. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0051702>. Acesso em: 5 nov. 2022.

TEMPLETON, Zach S. et al. Breast Cancer Cell Colonization of the Human Bone Marrow Adipose Tissue Niche. **Neoplasia**, [S. l.], v. 17, n. 12, p. 849–861, 2015. DOI: 10.1016/J.NEO.2015.11.005.

THÉRY, Clotilde et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>, [S. l.], v. 7, n. 1, 2018. DOI: 10.1080/20013078.2018.1535750. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/20013078.2018.1535750>. Acesso em: 27 out. 2022.

TRIM, William; TURNER, James E.; THOMPSON, Dylan. Parallels in immunometabolic adipose tissue dysfunction with ageing and obesity. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 9, n. FEB, p. 169, 2018. DOI: 10.3389/FIMMU.2018.00169/BIBTEX.

TULOTTA, Claudia; OTTEWELL, Penelope. The role of IL-1B in breast cancer bone metastasis. **Endocrine-Related Cancer**, [S. l.], v. 25, n. 7, p. R421–R434, 2018. DOI: 10.1530/ERC-17-0309. Disponível em: <https://erc.bioscientifica.com/view/journals/erc/25/7/ERC-17-0309.xml>. Acesso em: 25 set. 2022.

TUMMINIA, Andrea; VINCIGUERRA, Federica; PARISI, Miriam; GRAZIANO, Marco; SCIACCA, Laura; BARATTA, Roberto; FRITTITTA, Lucia. Adipose Tissue, Obesity and Adiponectin: Role in Endocrine Cancer Risk. **International Journal of Molecular Sciences** 2019, Vol. 20, Page 2863, [S. l.], v. 20, n. 12, p. 2863, 2019. DOI: 10.3390/IJMS20122863. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/12/2863/htm>. Acesso em: 19 out. 2022.

TURNER, Kevin M.; YEO, Syn Kok; HOLM, Tammy M.; SHAUGHNESSY, Elizabeth; GUAN, Jun Lin. Heterogeneity within molecular subtypes of breast cancer. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, [S. l.], v. 321, n. 2, p. C343–C354, 2021. DOI:10.1152/AJPCCELL.00109.2021/ASSET/IMAGES/LARGE/AJPCCELL.00109.2021\_F003.JPEG. Disponível em: <https://journals.physiology.org/doi/10.1152/ajpcell.00109.2021>. Acesso em: 27 set. 2022.

WALSH, Logan A.; DAMJANOVSKI, Sashko. IGF-1 increases invasive potential of MCF 7 breast cancer cells and induces activation of latent TGF- $\beta$ 1 resulting in epithelial to mesenchymal transition. **Cell Communication and Signaling**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 1–11, 2011. DOI: 10.1186/1478-811X-9-10/FIGURES/6. Disponível em: <https://biosignaling.biomedcentral.com/articles/10.1186/1478-811X-9-10>. Acesso em: 2 nov. 2022.

WANG, Biyun; WANG, Hong; YANG, Ziang. MiR-122 Inhibits Cell Proliferation and Tumorigenesis of Breast Cancer by Targeting IGF1R. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 7, n. 10, p. e47053, 2012. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0047053. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0047053>. Acesso em: 4 nov. 2022.

WANG, Bo; MAO, Jia hui; WANG, Bing ying; WANG, Ling xia; WEN, Hui yan; XU, Long jiang; FU, Jin xiang; YANG, Huan. Exosomal miR-1910-3p promotes proliferation, metastasis, and autophagy of breast cancer cells by targeting MTMR3 and activating the NF- $\kappa$ B signaling pathway. **Cancer Letters**, [S. l.], v. 489, p. 87–99, 2020. DOI: 10.1016/J.CANLET.2020.05.038.

WANG, Guoping; YIN, Tao. Rapamycin enhances the antiproliferative effect of transforming growth factor- $\beta$  on MCF-7 human breast cancer cells. **Experimental and Therapeutic Medicine**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 748, 2017. DOI: 10.3892/ETM.2017.4557. Disponível em: [/pmc/articles/PMC5488720/](https://pmc/articles/PMC5488720/). Acesso em: 1 nov. 2022.

WANG, Li et al. TGF- $\beta$ 1 stimulates epithelial-mesenchymal transition and cancer-associated myoepithelial cell during the progression from in situ to invasive breast cancer. **Cancer Cell International**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 1–13, 2019. a. DOI: 10.1186/S12935-019-1068-7/FIGURES/7. Disponível em: <https://cancer-ci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12935-019-1068-7>. Acesso em: 2 nov. 2022.

WANG, Lin et al. Activation of IL-8 via PI3K/Akt-dependent pathway is involved in leptin-mediated epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer cells. <https://doi.org/10.1080/15384047.2015.1056409>, [S. l.], v. 16, n. 8, p. 1220–1230, 2015. DOI: 10.1080/15384047.2015.1056409. Disponível em: <https://cogentoa.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15384047.2015.1056409>. Acesso em: 4 nov. 2022.

WANG, Shihua; SU, Xiaodong; XU, Meiqian; XIAO, Xian; LI, Xiaoxia; LI, Hongling; KEATING, Armand; ZHAO, Robert Chunhua. Exosomes secreted by mesenchymal stromal/stem cell-derived adipocytes promote breast cancer cell growth via activation of Hippo signaling pathway. **Stem Cell Research & Therapy** 2019 10:1, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 1–12, 2019. b. DOI: 10.1186/S13287-019-1220-2. Disponível em: <https://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13287-019-1220-2>. Acesso em: 4 nov. 2021.

WANG, Wenshan; SEALE, Patrick. Control of brown and beige fat development. **Nature reviews. Molecular cell biology**, [S. l.], v. 17, n. 11, p. 691, 2016. DOI: 10.1038/NRM.2016.96. Disponível em: [/pmc/articles/PMC5627770/](https://pmc/articles/PMC5627770/). Acesso em: 3

nov. 2021.

WEI, Mengying et al. Visceral Adipose Tissue Derived Exosomes Exacerbate Colitis Severity via Pro-inflammatory MiRNAs in High Fat Diet Fed Mice. **ACS nano**, [S. l.], v. 14, n. 4, p. 5099–5110, 2020. DOI: 10.1021/ACSNANO.0C01860/SUPPL\_FILE/NN0C01860\_SI\_001.PDF. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acsnano.0c01860>. Acesso em: 26 out. 2022.

WERNSTEDT ASTERHOLM, Ingrid; TAO, Caroline; MORLEY, Thomas S.; WANG, Qiong A.; DELGADO-LOPEZ, Fernando; WANG, Zhao V.; SCHERER, Philipp E. Adipocyte Inflammation is Essential for Healthy Adipose Tissue Expansion and Remodeling. **Cell metabolism**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 103, 2014. DOI: 10.1016/J.CMET.2014.05.005. Disponível em: </pmc/articles/PMC4079756/>. Acesso em: 22 ago. 2022.

WILLMS, Eduard; CABAÑAS, Carlos; MÄGER, Imre; WOOD, Matthew J. A.; VADER, Pieter. Extracellular Vesicle Heterogeneity: Subpopulations, Isolation Techniques, and Diverse Functions in Cancer Progression. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 0, n. APR, p. 738, 2018. DOI: 10.3389/FIMMU.2018.00738.

WITWER, Kenneth W.; THÉRY, Clotilde. Extracellular vesicles or exosomes? On primacy, precision, and popularity influencing a choice of nomenclature. **Journal of Extracellular Vesicles**, [S. l.], v. 8, n. 1, 2019. DOI: 10.1080/20013078.2019.1648167. Disponível em: </pmc/articles/PMC6711079/>. Acesso em: 27 out. 2022.

XUN, Jing et al. Cancer-derived exosomal miR-138-5p modulates polarization of tumor-associated macrophages through inhibition of KDM6B. **Theranostics**, [S. l.], v. 11, n. 14, p. 6847–6859, 2021. DOI: 10.7150/THNO.51864. Disponível em: <http://www.thno.org//creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. Acesso em: 21 out. 2022.

YAN, Dan; AVTANSKI, Dimiter; SAXENA, Neeraj K.; SHARMA, Dipali. Leptin-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells requires  $\beta$ -catenin activation via Akt/GSK3- and MTA1/Wnt1 protein-dependent pathways. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 287, n. 11, p. 8598–8612, 2012. DOI: 10.1074/jbc.M111.322800. Disponível em: <http://www.jbc.org/article/S0021925820610043/fulltext>. Acesso em: 4 nov. 2022.

YANG, Shan Shan; MA, Shuang; DOU, He; LIU, Feng; ZHANG, Shi Yuan; JIANG, Cong; XIAO, Min; HUANG, Yuan Xi. Breast cancer-derived exosomes regulate cell invasion and metastasis in breast cancer via miR-146a to activate cancer associated fibroblasts in tumor microenvironment. **Experimental Cell Research**, [S. l.], v. 391, n. 2, p. 111983, 2020. DOI: 10.1016/J.YEXCR.2020.111983.

YANG, Yi et al. Exosomal PD-L1 harbors active defense function to suppress T cell killing of breast cancer cells and promote tumor growth. **Cell Research** 2018 28:8, [S. l.], v. 28, n. 8, p. 862–864, 2018. DOI: 10.1038/s41422-018-0060-4. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41422-018-0060-4>. Acesso em: 21 out. 2022.

YEO, Syn Kok; GUAN, Jun Lin. Breast Cancer: Multiple Subtypes within a Tumor? **Trends in Cancer**, [S. l.], v. 3, n. 11, p. 753–760, 2017. DOI: 10.1016/j.trecan.2017.09.001. Disponível em: <http://www.cell.com/article/S2405803317301759/fulltext>. Acesso em: 27 set. 2022.

YIN, Li; DUAN, Jiang Jie; BIAN, Xiu Wu; YU, Shi Cang. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. **Breast Cancer Research**, [S. l.], v. 22, n. 1, p. 1–13, 2020. DOI: 10.1186/S13058-020-01296-5/TABLES/3. Disponível em: <https://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13058-020-01296-5>. Acesso em: 27 set. 2022.

YU, Yang; DU, Hongwei; WEI, Shengnan; FENG, Linjing; LI, Junnan; YAO, Fan; ZHANG, Ming; HATCH, Grant M.; CHEN, Li. Adipocyte-Derived Exosomal MiR-27a Induces Insulin Resistance in Skeletal Muscle Through Repression of PPAR $\gamma$ . **Theranostics**, [S. l.], v. 8, n. 8, p. 2171–2188, 2018. DOI: 10.7150/THNO.22565. Disponível em: <http://www.thno.org>. Acesso em: 5 nov. 2022.

YUE, Binglin; WANG, Hui; CAI, Xin; WANG, Jiabo; CHAI, Zhixin; PENG, Wei; SHU, Shi; FU, Changqi; ZHONG, Jincheng. Adipose-Secreted Exosomes and Their Pathophysiologic Effects on Skeletal Muscle. **International Journal of Molecular Sciences** 2022, Vol. 23, Page 12411, [S. l.], v. 23, n. 20, p. 12411, 2022. DOI: 10.3390/IJMS232012411. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/20/12411/htm>. Acesso em: 5 nov. 2022.

ZARZYNSKA, Joanna Magdalena. Two faces of TGF-beta1 in breast cancer. **Mediators of Inflammation**, [S. l.], v. 2014, 2014. DOI: 10.1155/2014/141747. ZENG, Jun; SAUTER, Edward R.; LI, Bing. FABP4: A New Player in Obesity-Associated Breast Cancer. **Trends in Molecular Medicine**, [S. l.], v. 26, n. 5, p. 437–440, 2020. DOI: 10.1016/j.molmed.2020.03.004. Disponível em: <http://www.cell.com/article/S1471491420300769/fulltext>. Acesso em: 20 out. 2022.

ZHANG, Jian; LI, Sha; LI, Lu; LI, Meng; GUO, Chongye; YAO, Jun; MI, Shuangli. Exosome and Exosomal MicroRNA: Trafficking, Sorting, and Function. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 17–24, 2015. DOI: 10.1016/J.GPB.2015.02.001.

ZHANG, Xiaoxue; XIE, Xianxin; GAO, Kuiran; WU, Xiaoming; CHEN, Yanwei; YU, Tao. ILF3-AS1 promotes cell proliferation and inhibits cell apoptosis of breast cancer by binding with miR-4429 to upregulate RAB14. **Human and Experimental Toxicology**, [S. l.], v. 40, n. 7, p. 1183–1193, 2021. DOI: 10.1177/0960327121989422/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177\_0960327121989422-FIG2.JPEG. Disponível em: [https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0960327121989422?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub++0pubmed](https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0960327121989422?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed). Acesso em: 2 nov. 2022.

ZHANG, Yaqin; MEI, Hongliang; CHANG, Xiaoai; CHEN, Fang; ZHU, Yunxia; HAN, Xiao. Adipocyte-derived microvesicles from obese mice induce M1 macrophage phenotype through secreted miR-155. **Journal of Molecular Cell Biology**, [S. l.], v. 8, n. 6, p. 505–517, 2016. DOI: 10.1093/JMCB/MJW040. Disponível em:

<https://academic.oup.com/jmcb/article/8/6/505/2647856>. Acesso em: 2 nov. 2022.  
ZHANG, Yuan; LIU, Yunfeng; LIU, Haiying; TANG, Wai Ho. Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. **Cell & Bioscience** **2019** **9:1**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 1–18, 2019. DOI: 10.1186/S13578-019-0282-2. Disponível em: <https://cellandbioscience.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13578-019-0282-2>. Acesso em: 3 nov. 2021.

ZHAO, Chongru; WU, Min; ZENG, Ning; XIONG, Mingchen; HU, Weijie; LV, Wenchang; YI, Yi; ZHANG, Qi; WU, Yiping. Cancer-associated adipocytes: emerging supporters in breast cancer. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research** **2020** **39:1**, [S. l.], v. 39, n. 1, p. 1–17, 2020. DOI: 10.1186/S13046-020-01666-Z. Disponível em: <https://jeccr.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13046-020-01666-z>. Acesso em: 4 nov. 2021.

ZHAO, Rui; ZHAO, Tiantian; HE, Zhaozhao; CAI, Rui; PANG, Weijun. Composition, isolation, identification and function of adipose tissue-derived exosomes. <https://doi.org/10.1080/21623945.2021.1983242>, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 587–604, 2021. DOI: 10.1080/21623945.2021.1983242. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/21623945.2021.1983242>. Acesso em: 26 out. 2022.

ZHAO, Shangang; KUSMINSKI, Christine M.; SCHERER, Philipp E. Adiponectin, Leptin and Cardiovascular Disorders. **Circulation Research**, [S. l.], v. 128, n. 1, p. 136–149, 2021. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.120.314458. Disponível em: <https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/CIRCRESAHA.120.314458>. Acesso em: 19 out. 2022.

ZHOU, W.; GUO, S.; GONZALEZ-PEREZ, R. R. Leptin pro-angiogenic signature in breast cancer is linked to IL-1 signalling. **British Journal of Cancer** **2011** **104:1**, [S. l.], v. 104, n. 1, p. 128–137, 2010. DOI: 10.1038/sj.bjc.6606013. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/6606013>. Acesso em: 25 set. 2022.  
ZHOU, Weiying et al. Cancer-Secreted miR-105 Destroys Vascular Endothelial Barriers to Promote Metastasis. **Cancer Cell**, [S. l.], v. 25, n. 4, p. 501–515, 2014. DOI: 10.1016/J.CCR.2014.03.007.

ZORENA, Katarzyna; JACHIMOWICZ-DUDA, Olga; ŚLĘZAK, Daniel; ROBAKOWSKA, Marlena; MRUGACZ, Małgorzata. Adipokines and Obesity. Potential Link to Metabolic Disorders and Chronic Complications. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 21, n. 10, 2020. DOI: 10.3390/IJMS21103570. Disponível em: [/pmc/articles/PMC7278967/](https://pmc/articles/PMC7278967/). Acesso em: 3 nov. 2021.

ZWICK, Rachel K.; GUERRERO-JUAREZ, Christian F.; HORSLEY, Valerie; PLIKUS, Maksim V. Anatomical, physiological and functional diversity of adipose tissue. **Cell metabolism**, [S. l.], v. 27, n. 1, p. 68, 2018. DOI: 10.1016/J.CMET.2017.12.002. Disponível em: [/pmc/articles/PMC6050204/](https://pmc/articles/PMC6050204/). Acesso em: 3 nov. 2021.

## 8 ANEXOS

**ANEXO A – GONÇALVES, D. A., RIBEIRO, V., GUALBERTO, A., ET AL. "COVID-19 AND OBESITY: AN EPIDEMIOLOGIC ANALYSIS OF THE BRAZILIAN DATA", INTERNATIONAL JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY, V. 2021, 2021.**

Hindawi  
International Journal of Endocrinology  
Volume 2021, Article ID 6667135, 10 pages  
<https://doi.org/10.1155/2021/6667135>



### Research Article

## COVID-19 and Obesity: An Epidemiologic Analysis of the Brazilian Data

**Diego Assis Gonçalves** <sup>1,2</sup> **Victória Ribeiro** <sup>1</sup> **Ana Gualberto** <sup>1</sup> **Fernanda Peres** <sup>3</sup> **Michaela Luconi** <sup>2</sup> and **Jacy Gameiro** <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Parasitology, Microbiology and Immunology, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil

<sup>2</sup>Department of Experimental and Clinical Biomedical Sciences "Mario Serio", University of Florence, Florence, Italy

<sup>3</sup>Department of Pharmacology, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Correspondence should be addressed to Diego Assis Gonçalves; diegoassisg@gmail.com

Received 24 December 2020; Revised 3 March 2021; Accepted 22 April 2021; Published 7 May 2021

Academic Editor: Hou De Zhou

Copyright © 2021 Diego Assis Gonçalves et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Brazil has the second highest number of deaths due to COVID-19. Obesity has been associated with an important role in disease development and a worse prognosis. We aimed to explore epidemiological data from Brazil, discussing the potential relationships between obesity and COVID-19 severity in this country. We used a public database made available by the Ministry of Health of Brazil (182700 patients diagnosed with COVID-19). Descriptive statistics were used to characterize our database. Continuous data were expressed as median and analyzed by the nonparametric tests Mann–Whitney or one-sample Wilcoxon. The frequencies of categorical variables have been analyzed by chi-square tests of independence or goodness-of-fit. Among the number of deaths, 74% of patients were 60 years of age or older. Patients with obesity who died of COVID-19 were younger (59 years (IQR = 23)) than those without obesity (71 years (IQR = 20),  $P < 0.001$ , and  $\eta^2 = 0.0424$ ). Women with obesity who died of COVID-19 were older than men (55 years (IQR = 25) vs. 50 (IQR = 22),  $P < 0.001$ , and  $\eta^2 = 0.0263$ ). Furthermore, obesity increases the chances of needing intensive care unit (OR: 1.783, CI: 95%, and  $P < 0.001$ ), needing ventilatory support (OR: 1.537, CI: 95%, and  $P < 0.001$  and OR: 2.302, CI: 95%, and  $P < 0.001$ , for noninvasive and invasive, respectively), and death (OR: 1.411, CI: 95%, and  $P < 0.001$ ) of patients hospitalized with COVID-19. Our analysis supports obesity as a significant risk factor for the development of more severe forms of COVID-19. The present study can direct a more effective prevention campaign and appropriate management of subjects with obesity.

### 1. Introduction

The COVID-19 (coronavirus disease 2019) has been declared as a pandemic in March 2020 by the World Health Organization [1]. The disease is caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), which belongs to the Coronaviridae family. To date, more than 70 million people worldwide have been confirmed to be infected, with 1,599,704 deaths [2–4]. Currently, Brazil is the country with the second highest number of fatalities and third highest total cases, 180,437 and 6,836,227, respectively [2, 5]. More than 50,000 new cases keep on being reported

per day in the country [5], and a high number of adults are considered at risk for severe COVID-19 in Brazil [6].

Since the beginning of the pandemic, studies have shown that the number of patients requiring intensive care, as well as the number of deaths, is greater among individuals over 60 years of age. Furthermore, these studies showed that some preexisting diseases can be considered risk factors, such as hypertension, diabetes, and cardiovascular disease [7–9]. Although obesity has not previously been reported among the main comorbidities related to COVID-19, it has an important role in the disease development and a worse prognosis [10–12]. This discussion proves to be very



**ANEXO B – GONÇALVES, D. A., JASIULIONIS, M. G., DE MELO, F. H. M. "THE ROLE OF THE BH4 COFACTOR IN NITRIC OXIDE SYNTHASE ACTIVITY AND CANCER PROGRESSION: TWO SIDES OF THE SAME COIN", INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES 2021, VOL. 22, PAGE 9546, V. 22, N. 17, P. 9546, 2 SET. 2021.**



International Journal of  
Molecular Sciences



Review

## The Role of the BH4 Cofactor in Nitric Oxide Synthase Activity and Cancer Progression: Two Sides of the Same Coin

Diego Assis Gonçalves <sup>1,2</sup>, Miriam Galvonas Jasiulionis <sup>3</sup> and Fabiana Henriques Machado de Melo <sup>4,5,\*</sup>

<sup>1</sup> Micro-Imuno-Parasitology Department, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo 04023-062, Brazil; diegoassisg@gmail.com

<sup>2</sup> Department of Parasitology, Microbiology and Immunology, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora 36036-900, Brazil

<sup>3</sup> Pharmacology Department, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo 04023-062, Brazil; mjasulionis@gmail.com

<sup>4</sup> Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Science, University of São Paulo, São Paulo 05508-000, Brazil

<sup>5</sup> Institute of Medical Assistance to Public Servants of the State (IAMSPE), São Paulo 04039-000, Brazil

\* Correspondence: fabihmmelo2020@gmail.com or fabihmmelo@usp.br

**Abstract:** Cancer development is associated with abnormal proliferation, genetic instability, cell death resistance, metabolic reprogramming, immunity evasion, and metastasis. These alterations are triggered by genetic and epigenetic alterations in genes that control cell homeostasis. Increased reactive oxygen and nitrogen species (ROS, RNS) induced by different enzymes and reactions with distinct molecules contribute to malignant transformation and tumor progression by modifying DNA, proteins, and lipids, altering their activities. Nitric oxide synthase plays a central role in oncogenic signaling modulation and redox landscape. Overexpression of the three NOS isoforms has been found in innumerable types of cancer contributing to tumor growth and development. Although the main function of NOS is the production of nitric oxide (NO), it can be a source of ROS in some pathological conditions. Decreased tetrahydrobiopterin (BH4) cofactor availability is involved in NOS dysfunction, leading to ROS production and reduced levels of NO. The regulation of NOSs by BH4 in cancer is controversial since BH4 has been reported as a pro-tumoral or an antitumoral molecule. Therefore, in this review, the role of BH4 in the control of NOS activity and its involvement in the capabilities acquired along tumor progression of different cancers was described.

**Keywords:** cancer; nitric oxide synthase; tetrahydrobiopterin; sepiapterin



**Citation:** Gonçalves, D.A.; Jasiulionis, M.G.; Melo, F.H.M. The Role of the BH4 Cofactor in Nitric Oxide Synthase Activity and Cancer Progression: Two Sides of the Same Coin. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 9546. <https://doi.org/10.3390/ijms22179546>

Academic Editor: Tzong-Shyuan Lee

Received: 1 August 2021

Accepted: 25 August 2021

Published: 2 September 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

### 1. Background

Cancers are a set of diseases characterized by genetic instability, abnormal cell proliferation, cell death resistance, metabolic reprogramming, angiogenesis, metastasis capability, and immune response evasion caused by genetic and epigenetic alterations in oncogenes and tumor suppressor genes [1]. These alterations contribute to malignant transformation and tumor development with the consequent acquisition of an increasingly aggressive phenotype through dysregulation of signaling pathways that maintain cell homeostasis. Despite the advancement of medical technology and the development of new target therapies [2,3], the incidence of different cancers is rising worldwide and will continue to increase over the course of this century according to the International Agency for the Research on Cancer (IARC) GLOBOCAN database within the Global Cancer Observatory (COSMIC v94, released 28-MAY-21). This scenario is mainly attributed to high life expectancy, the obesity epidemic, increased ultraviolet (UV) radiation exposure, and infectious pathogens classified as human carcinogens [4–6].

Among other cause effects, tobacco, obesity, and related metabolic syndromes, infections, and UV are associated with inflammation, loss of redox homeostasis, and oxidative



ANEXO C – SOARES, J. P. M., GONÇALVES, D. A., DE SOUSA, R. X., ET AL. "DISRUPTION OF REDOX HOMEOSTASIS BY ALTERATIONS IN NITRIC OXIDE SYNTHASE ACTIVITY AND TETRAHYDROBIOPTERIN ALONG WITH MELANOMA PROGRESSION", INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES, V. 23, N. 11, P. 5979, 1 JUN. 2022.



International Journal of  
Molecular Sciences



Article

## Disruption of Redox Homeostasis by Alterations in Nitric Oxide Synthase Activity and Tetrahydrobiopterin along with Melanoma Progression

Jaqueline Pereira Moura Soares <sup>1,†</sup>, Diego Assis Gonçalves <sup>2,3,†</sup>, Ricardo Xisto de Sousa <sup>1</sup>, Margareth Gori Mouro <sup>4</sup>, Elisa M. S. Higa <sup>4</sup>, Leticia Paulino Sperandio <sup>5</sup>, Carolina Moraes Vitoriano <sup>6</sup>, Elisa Bachir Santa Rosa <sup>6</sup>, Fernanda Oliveira dos Santos <sup>6</sup>, Gustavo Nery de Queiroz <sup>6</sup>, Roberta Sessa Stilhano Yamaguchi <sup>1</sup>, Gustavo Pereira <sup>5</sup>, Marcelo Yudi Icimoto <sup>7</sup> and Fabiana Henriques Machado de Melo <sup>6,8,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Physiological Sciences, Santa Casa de São Paulo School of Medical Sciences, São Paulo 01224-001, Brazil; jperms1995@outlook.com (J.P.M.S.); xisto1987@hotmail.com (R.X.d.S.); robertasessa@gmail.com (R.S.S.Y.)

<sup>2</sup> Department of Parasitology, Microbiology and Immunology, Juiz de Fora Federal University, Juiz de Fora 36036-900, Brazil; diegoassisg@gmail.com

<sup>3</sup> Micro-Imuno-Parasitology Department, Federal University of Sao Paulo, São Paulo 05508-090, Brazil

<sup>4</sup> Nefrology Discipline, Federal University of Sao Paulo, São Paulo 05508-090, Brazil; margaret\_gori@hotmail.com (M.G.M.); emshiga@gmail.com (E.M.S.H.)

<sup>5</sup> Department of Pharmacology, Federal University of Sao Paulo, São Paulo 05508-090, Brazil; leticiasperandio7@gmail.com (L.P.S.); gustavo.pereira@unifesp.br (G.P.)

<sup>6</sup> Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Science, Universidade de São Paulo, São Paulo 05505-000, Brazil; car.vitoriano@gmail.com (C.M.V.); elisa.bsr@hotmail.com (E.B.S.R.); fernanda.sts00@outlook.com (F.O.d.S.); guhner0@gmail.com (G.N.d.Q.)

<sup>7</sup> Biophysics Department, Federal University of Sao Paulo, São Paulo 05508-090, Brazil; icimoto@unifesp.br

<sup>8</sup> Institute of Medical Assistance to Public Servants of the State (IAMSPE), São Paulo 04039-000, Brazil

\* Correspondence: fabihmmelo2020@gmail.com

† These authors contributed equally to this work.



**Citation:** Soares, J.P.M.; Gonçalves, D.A.; de Sousa, R.X.; Mouro, M.G.; Higa, E.M.S.; Sperandio, L.P.; Vitoriano, C.M.; Rosa, E.B.S.; Santos, F.O.d.; de Queiroz, G.N.; et al. Disruption of Redox Homeostasis by Alterations in Nitric Oxide Synthase Activity and Tetrahydrobiopterin along with Melanoma Progression. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 5979. <https://doi.org/10.3390/ijms23115979>

Academic Editor: Zrong-Shyuan Lee  
Received: 23 April 2022  
Accepted: 20 May 2022  
Published: 26 May 2022

Academic Editor: Zrong-Shyuan Lee

Received: 23 April 2022

Accepted: 20 May 2022

Published: 26 May 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Cutaneous melanoma emerges from the malignant transformation of melanocytes and is the most aggressive type of skin cancer. The progression can occur in different stages: radial growth phase (RGP), vertical growth phase (VGP), and metastasis. Reactive oxygen species contribute to all phases of melanomagenesis through the modulation of oncogenic signaling pathways. Tetrahydrobiopterin (BH4) is an important cofactor for NOS coupling, and an uncoupled enzyme is a source of superoxide anion ( $O_2^{\bullet-}$ ) rather than nitric oxide (NO), altering the redox homeostasis and contributing to melanoma progression. In the present work, we showed that the BH4 amount varies between different cell lines corresponding to distinct stages of melanoma progression; however, they all presented higher  $O_2^{\bullet-}$  levels and lower NO levels compared to melanocytes. Our results showed increased NOS expression in melanoma cells, contributing to NOS uncoupling. BH4 supplementation of RGP cells, and the DAHP treatment of metastatic melanoma cells reduced cell growth. Finally, Western blot analysis indicated that both treatments act on the PI3K/AKT and MAPK pathways of these melanoma cells in different ways. Disruption of cellular redox homeostasis by the altered BH4 concentration can be explored as a therapeutic strategy according to the stage of melanoma.

**Keywords:** melanoma; tetrahydrobiopterin; redox homeostasis; nitric oxide synthase; nitric oxide; reactive oxygen species

### 1. Introduction

Cutaneous melanoma is the most aggressive type of skin cancer due to its high heterogeneity and resistance capability. The incidence of melanoma has been rising dramatically over past the few years, which has been associated with increased life expectancy and