



Universidade de Brasília  
Instituto de Biologia  
Departamento de Biologia Celular  
Mestrado em Biologia Molecular

Gabriel Ribeiro Farias

**Efeitos da suplementação com dose alta ou baixa de ômega-3 (DHA) em camundongos com câncer de mama: análise de parâmetros carcinogênicos, perfil metabólico e inflamatório**

Dissertação de Mestrado

Brasília  
2022

Gabriel Ribeiro Farias

**Efeitos da suplementação com dose alta ou baixa de ômega-3 (DHA) em camundongos com câncer de mama: análise de parâmetros carcinogênicos, perfil metabólico e inflamatório**

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de pós graduação em Biologia Molecular, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular.

Orientador: Kelly Grace Magalhães

Brasília  
2022

Gabriel Ribeiro Farias

Efeitos da suplementação com dose alta ou baixa de ômega-3 (DHA) em camundongos com câncer de mama: análise de parâmetros carcinogênicos, perfil metabólico e inflamatório/ Gabriel Ribeiro Farias. – Brasília, 2022-

99 p. : il. (algumas color.) ; 30 cm.

Orientador: Kelly Grace Magalhães

Dissertação de Mestrado – Universidade de Brasília

Instituto de Biologia

Departamento de Biologia Celular

Mestrado em Biologia Molecular , 2022.

**IMPORTANTE:** Esse é apenas um texto de exemplo da Ficha Catalográfica. Deverá ser substituída pela Ficha Catalográfica fornecida pela biblioteca da sua instituição.

**Gabriel Ribeiro Farias**

**Efeitos da suplementação com dose alta ou baixa de ômega-3 (DHA) em camundongos com câncer de mama: análise de parâmetros carcinogênicos, perfil metabólico e inflamatório**

**IMPORTANTE:** ESSE É APENAS UM TEXTO DE EXEMPLO DE FOLHA DE APROVAÇÃO. VOCÊ DEVERÁ SOLICITAR UMA FOLHA DE APROVAÇÃO PARA SEU TRABALHO NA SECRETARIA DO SEU CURSO (OU DEPARTAMENTO).

Trabalho aprovado. Brasília:

---

**Kelly Grace Magalhães**  
Orientador

---

**Professor**  
Convidado 1

---

**Professor**  
Convidado 2

**Brasília**  
**2022**

Dedico à minha avó, Lúcia Ribeiro Passos, que já não está presente devido a um câncer de mama, mas que serviu como força motriz a todos os trabalhos que me dediquei na pesquisa e sempre esteve ao meu lado com todo amor, dedicação e carinho.

Ao meu pai, Eunildo ,à minha mãe, Jucileide, à minha irmã Quézia e ao meu irmão Miguel que sempre me apoiaram de todos as formas e estiveram ao meu lado em todos os momentos.

Ao meu amigo, Roberto Carvalho, que sempre me apoiou e me ajudou a expressar o melhor de mim e que com grande pesar perdi nessa pandemia de COVID-19.

Ao meu companheiro de vida e amor Marcus Aurélio por todo o apoio, paciência e dedicação.

À minha tia Aldenir e minha prima Samila por sempre terem me dado suporte e acreditarem em mim.

Aos meus construtores científicos Zulmira Lacava, César Romero, Willie Pinheiro e Laíse Andrade por toda paciência, conselhos e ensinamentos.

Por fim, dedico a todos os meus amigos, em especial Victor Mello, que me amaram, apoiaram, torceram, cuidaram de mim ao longo desses anos, pois, cada um contribuiu para que a minha vida fosse mais completa a cada dia.

## **Agradecimentos**

À minha mãe Jucileide, meu pai Eunildo, meu irmão Miguel, minha irmã Quézia por serem a mais pura e verdadeira definição de amor, compaixão, dedicação e cuidado. Agradeço por toda força e compreensão nessa minha empreitada acadêmica. Agradeço pela confiança e por sonharem isso comigo, pois, essa conquista é da nossa família, chegamos até aqui juntos. Obrigada por me ensinarem a ser sempre sincero comigo mesmo, dar valor às oportunidades e seguir com determinação. Vocês são a minha inspiração de vida! Tudo que sou é um reflexo de vocês e eu tenho muito orgulho disso!

Ao meu companheiro e amor Marcus Aurélio, que me acompanhou do início ao fim deste projeto, compartilhando tristezas, angústias, dificuldades, choros, alegrias, conquistas e vitórias. Agradeço por sempre estar ao meu lado e abdicar muitas vezes de si mesmo em prol da gente e dessa conquista, que é sua também! A cada dia me sinto mais conectado a você e quero que nos amemos com todo o nosso potencial. Obrigado por fazer parte desse momento, com a nossa família, os cachorros Lockdown, Ravena, assim como da querida Lucy Fernanda, que sinto imensa saudade, e o gato Gilsinho. Vocês fizeram sem dúvida um lar mais feliz!

Ao meu amigo Victor Mello, por todos os momentos fantásticos que tivemos, por me acolher em casa, pelos “rolês”, viagens. Você é essencial na minha vida! Obrigado pelos ensinamentos, discussões científicas e risadas, todas as formas de apoio, acreditar no meu potencial e, principalmente, por existir e fazer da minha existência uma dádiva. À minha amiga Marina Raddich por me proporcionar tantos momentos felizes e cuidar muito bem de mim, por ser essa pessoa amorosa, companheira e incrível. Ao meu amigo Walber pelos diversos momentos únicos, pelo apoio e afeto. Ao meu amigo Bruno, Brunielly, por todos os momentos alegres e cafés exclusivos.

À minha tia Aldenir, que sempre se mostrou como alicerce na minha vida, dando todo apoio, amor e carinho. À minha prima Samila que sempre está comigo nos meus piores momentos, que gritamos, choramos e sorrimos juntos. Obrigado por sempre me apoiar incondicionalmente e construir a pessoa que eu me tornei. Ao meu primo Samir, que é um irmão e está presente em todos os momentos, apoiando-me e sempre dando amor e carinho. Vocês fizeram de mim, o que eu não conseguiria sozinho e só posso agradecer grandemente.

À minha orientadora Kelly, por todo o apoio laboratorial e orientação. Agradeço por ser compreensiva e inspiradora, o que me fez crescer bastante como cientista e pessoa. Obrigada pelas oportunidades, por todos os conselhos e por acreditar em mim, especialmente nos momentos em que estive mais vulnerável, com crises de ansiedade e me sentindo bastante impotente. Você sempre será uma referência na minha vida, representando uma grande mulher na ciência.

À minha amiga Heloísa, Tôniella, que se fez bastante presente nesse trabalho, assim

como estivemos e crescemos juntos como cientistas durante a graduação e a pós-graduação. Um agradecimento especial a todos os momentos que demos risadas e tomamos café com “borra”, como também, todo apoio, amor e prestatividade, sempre acreditando na minha capacidade. À minha amiga Sabrina, Garotôna, que sempre esteve presente quando eu queria maudizê-la e sempre me encheu de alegria e belas gaitadas. Para além, todo suporte na finalização da minha dissertação, acolhimentos e todas as discussões científicas que tivemos.

À minha amiga Igor, Igoná, que trilha esse caminho da academia comigo desde a graduação e foi essencial no final do meu projeto. Agradeço a todos os momentos compartilhados, angústias, vitórias, suportes e ensinamentos. Agradeço muito por ter você comigo. À minha amiga Marina, Mariminari, por tanta alegria e momentos especiais, companheirismo e afeto, por todos os momentos na “mesinha” e nas “cachus” da vida, assim como todas as caronas. À minha amiga Nathalia, Natynátalia, por todas as trocas, carinhos, alegrias e amor durante esses anos, assim como as caronas e os “papos” das “dreigss”. Vocês são tuuudo pra mim!

Aos meus amigos da vida, que me acompanham desde a mocidade Renata, Jéssica, Luíza, Beatriz, Letícia, Rebeca e Thayná, obrigado por cada momento especial e apoio. Cada cerveja com vocês foi um paraíso na minha vida. A todos os meus amigos e familiares que me acompanharam e torceram por mim todos esses anos, saibam que eu sou muito grato.

A todos os integrantes do LIM1, que me acompanharam: Milena, Ramon, Gabriel Calixto e Juliana. Ao meu amigo Gabriel Pasquarelli por ser tão prestativo, cuidadoso e pelo suporte emocional que sempre me deu. Em especial a dona Débora, por todos os cafés de milhões e discussões científicas. À minha amiga Raquel por ser tão acolhedora, companheira e prestativa, sou muito grato por todo o conhecimento compartilhado. É um prazer compartilhar a vida pessoal e acadêmica com vocês.

Aos meus parceiros e inspirações científicas Profa. Dra. Zulmira Lacava, Prof. Dr. César Romero, Dr. Willie Pinheiro e Profa. Dra. Laíse Andrade por todos os ensinamentos e Aos meus amigos da Agronomia e da Biotecnologia pela sorte imensa de ter vivido diversos lindos anos com vocês. Aos meus amigos do ensino médio Diego, Francielle, Amanda e Victor, que também compartilharam a universidade comigo, assim como muitos momentos de felicidade e tristeza. Ao meu colaborador externo ao laboratório pelas contribuições essenciais para esse trabalho: Prof. Dr. Thomas Williams.

A Universidade de Brasília (UnB), minha segunda casa, que me acolheu e me ensinou muito sobre a vida, não só pessoal, como acadêmica, onde fui alavancado pelas experiências de graduação e pós-graduação com profissionais de excelência. Além disso, por me proporcionar as maiores emoções da vida e me mostrar o quanto posso ser grande. Aos técnicos da UnB, em especial o Chiquinho, por nos ajudar sempre que precisamos e fazer aquele café maravilhoso toda manhã. Aos servidores da UnB que desempenham seu

papel com excelência, em especial aos servidores da secretaria da Biologia Molecular, por todo o auxílio ao longo desses dois anos. Aos terceirizados que estão sempre dando o seu suor, sorrisos e abraços para um ambiente mais agradável a todos, em especial a Eloneida e a Joelma.

Por fim, as agências de fomento CNPq e CAPES pelo auxílio financeiro.



A ignorância gera mais confiança do que o conhecimento: são os que sabem pouco, e não aqueles que sabem muito, que afirmam de uma forma tão categórica que este ou aquele problema nunca será resolvido pela ciência.

***Charles Darwin***

## Resumo

Nas últimas décadas, o número de casos de câncer vem aumentando a cada ano, assim como a tendência no número de mortes. Dentre os tipos de o câncer, o de mama tornou-se o com maior número de diagnósticos em 2021. Os tratamentos clássicos utilizados para neoplasias, geralmente estão associados a diversos efeitos tóxicos sistêmicos, os quais comprometem o bem-estar dos pacientes, principalmente em cânceres de mama triplo-negativo. É nesse contexto que o ácido docosahexaenoico (DHA), que é um ácido graxo poli-insaturado da família dos ômega-3, obtido significativamente a partir do óleo de peixe, surge como uma potencial molécula para o tratamento adjuvante de neoplasias. O consumo de quantidades adequadas desse lipídio está relacionado a diversos benefícios em patologias neurológicas, cardiovasculares, metabólicas, assim como, o câncer. Esse nutriente vem se mostrando promissor pelos seus efeitos protetivos contra o desenvolvimento de neoplasias, inibição do crescimento tumoral, da angiogênese e da formação de metástases, assim como a diminuição da inflamação. Além disso, também já demonstrou ações sinérgicas com alguns quimioterápicos, tal e qual, diminuiu os efeitos não desejados dessa abordagem terapêutica *in vivo*. A ação de diferentes doses de DHA ainda é controversa na literatura é bastante escassa em relação às alterações metabólicas, decorrentes da suplementação, nos tumores em estudos '*in vivo*'. Dessa maneira, o objetivo deste estudo é avaliar os efeitos da suplementação com Ômega-3 (DHA) durante 60 dias, antes e após a inoculação do tumor, em duas doses diferentes (500 mg/Kg e 2 g/Kg), em camundongos com câncer de mama triplo-negativo: parâmetros carcinogênicos, perfil metabólico e inflamatório. As duas doses não apresentaram danos tóxicos sistêmicos, assim como não levaram a danos hepáticos e renais. Os resultados sugerem que o DHA (2 g/Kg) possui efeitos anti tumorais, reduzindo o crescimento tumoral, diminuindo os níveis de citocinas pró-inflamatórias nos tecido adiposos branco e marrom (IL-6, TNF-a e IL-33), no plasma sanguíneo (1L-1b) e no tumor (IL-6), assim como foi capaz de de reduzir o nível de citocinas que atuam no processo de evasão imunológica do tumor (TGF-b), mas sem alterações significativas no metabolismo do tumor. Caso que não se repetiu na dose baixa, a qual evidenciou um aumento de citocinas (IL-6, IL-33 e TGF-b) e não retardou o crescimento tumoral. A dose alta nos animais sem tumor, levou a uma redução dos níveis de triglicerídeos séricos, a aumento de algumas citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e IL-33) nos tecidos adiposos e a redução de TGF-b na mama, assim como uma modulação metabólica com aumento de ácido oleico, ácido palmítoleico e ácido vacênico no tecido mamário. Assim como o DHA, possuem ações antitumorais e protetivas contra o desenvolvimento de câncer de mama, o que contrariamente, a dose baixa levou uma diminuição desses ácidos graxos. Com isso, esse trabalho caracterizou o efeito da suplementação com DHA, em duas doses distintas, em parâmetros carcinogênicos, inflamatórios e metabólicos, no qual ficou evidente o papel diferencial das doses, em que ficou manifesto o papel antitumoral da dose alta. Além disso,

o perfil metabólico do tecido mamário apresentou diferenças significativas em resposta as doses de DHA, no qual foi observado o aumento de ácidos graxos que podem atuar contra o desenvolvimento tumoral, como o ácido oleico e o vacênico.

**Palavras-chave:** Câncer. Câncer de mama triplo-negativo. Ômega-3. DHA. Inflamação. Perfil metabólico.

## Abstract

In recent decades, the number of cancer cases has been increased every year, as has the trend in the number of deaths. Among the types of cancer, breast cancer has become the one with the highest number of diagnoses in 2021. In addition, the classic therapies used for neoplasms are generally associated with various systemic toxic effects, which compromise the well-being of patients, especially in triple-negative breast cancers. In that context, docosahexaenoic acid (DHA), which is a polyunsaturated fatty acid from the omega-3 family and is obtained significantly from fish oil, emerges as a potential molecule for the treatment of neoplasms. The consumption of adequate amounts of this lipid is related to several benefits in neurological, cardiovascular, and metabolic pathologies, as well as cancer. This compound has shown promise for its protective effects against the development of neoplasms, inhibition of tumor growth, angiogenesis, and metastasis formation, as well as a decrease in inflammation. In addition, it has also demonstrated synergistic actions with some chemotherapy drugs, such as, decreased unwanted effects of this therapeutic approach. The action of different doses of DHA is still controversial in the literature and it is quite scarce regarding the metabolic alterations, due to supplementation, in tumors. Thus, the aim of this study is to evaluate the effects of omega-3 (DHA) supplementation at two different doses (500 mg/Kg and 2 g/Kg) in mice with breast cancer: carcinogenic parameters, metabolic and inflammatory profile. The results suggest that DHA has anti-tumor effects, reducing tumor growth, decreasing the levels of pro-inflammatory cytokines in white and brown adipose tissue (IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-33), in blood plasma (IL-1 $\beta$ ) and in the tumor (IL-6), as well as was able to reduce the level of cytokines that act in the immune evasion process of the tumor (TGF- $\beta$ ), but without significant changes in tumor metabolism at the high dose. This was not the case with the low dose, which showed an increase in cytokines (IL-6, IL-33, and TGF- $\beta$ ) and did not slow tumor growth. The high dose in the animals without tumor, led to a reduction in serum triglyceride levels, an increase in some pro-inflammatory cytokines (IL-6 and IL-33) in the adipose tissues and a reduction in TGF- $\beta$  in the breast, as well as a metabolic modulation with an increase in oleic acid, palmitoleic acid, and vacenic acid in the breast tissue, which have antitumor and protective actions against the development of breast cancer. In contrast, the low dose led to a decrease in these fatty acids. Both doses showed no systemic toxicity, as well as no liver or kidney damage. Thus, this work characterized the impact of DHA supplementation at two different doses on carcinogenic, inflammatory and metabolic parameters, in which the differential role of the doses was evident, and the antitumor role of the high dose was manifest. In addition, the metabolic profile of the mammary tissue showed significant differences in response to the doses of DHA, in which an increase in fatty acids that can act against tumor development, such as oleic and vacenic acids, was observed.

**Keywords:** Cancer. Triple-negative breast cancer. Omega-3. DHA. Inflammation. Metabolic profile.

## Lista de ilustrações

Figura 1 – Incidência de câncer no Brasil. . . . .	22
Figura 2 – Características dos cânceres. . . . .	24
Figura 3 – Hipertrofia e Hiperplasia do tecido adiposo branco. . . . .	26
Figura 4 – Quatro principais expressões fenotípicas dos adipócitos. . . . .	27
Figura 5 – O papel dos tecidos adiposos na progressão tumoral. . . . .	28
Figura 6 – Utilização de Intermediários do Ciclo Glicólise/TCA em células em alta proliferação. . . . .	30
Figura 7 – 'Hallmarks' do metabolismo tumoral. . . . .	32
Figura 8 – Classificação molecular dos subtipos de câncer de mama. . . . .	34
Figura 9 – Linha do tempo evidenciando os passos experimentais da suplementação. . . . .	42
Figura 10 – Peso dos animais (g). . . . .	48
Figura 11 – Parâmetro bioquímicos séricos renais. . . . .	51
Figura 12 – Perfil lipídico sistêmico. . . . .	52
Figura 13 – Análises de citocinas sistêmicas. . . . .	53
Figura 14 – Peso do fígado (g). . . . .	53
Figura 15 – Histologia do fígado. . . . .	54
Figura 16 – Parâmetro bioquímicos hepáticos. . . . .	55
Figura 17 – Peso do baço. . . . .	55
Figura 18 – Histologia do baço. . . . .	56
Figura 19 – Peso do tecido adiposo marrom (BAT). . . . .	57
Figura 20 – Histologia do tecido adiposo marrom (BAT). . . . .	58
Figura 21 – Dosagem de citocinas do tecido adiposo marrom (BAT). . . . .	59
Figura 22 – Peso do tecido adiposo branco subcutâneo (sWAT). . . . .	59
Figura 23 – Histologia do tecido adiposo branco subcutâneo (sWAT). . . . .	60
Figura 24 – Dosagem de citocinas do tecido adiposo branco subcutâneo (sWAT). . . . .	61
Figura 25 – Peso do tecido adiposo branco visceral (vWAT). . . . .	61
Figura 26 – Histologia do tecido adiposo branco visceral (vWAT). . . . .	62
Figura 27 – Histologia do tecido pulmonar. . . . .	63
Figura 28 – Histologia do intestino corado com H&E. . . . .	64
Figura 29 – Volume tumoral. . . . .	65
Figura 30 – Histologia da mama e do tumor de mama. . . . .	66
Figura 31 – Dosagem de citocinas do tecido mamário e do tumor. . . . .	67
Figura 32 – 'Heatmap' e PLSDA do perfil metabólico das mamas e dos tumores de animais tratados com DHA. . . . .	68
Figura 33 – Alterações da via glicolítica, do ciclo do ácido cítrico e do metabolismo de aminoácidos da mama e do tumor. . . . .	69

Figura 34 – Alterações do metabolismo de pirimidinas e purinas e do ciclo da ureia da mama e do tumor. . . . .	70
Figura 35 – Alterações do metabolismo de creatina, colesterol e ácidos graxos da mama e do tumor. . . . .	71
Figura 36 – Efeitos significativos decorrente dos tratamentos com DHA nos animais.	83
Figura 37 – Alterações no perfil inflamatório e metabólico dos tecidos adiposos, da mama e do tumor em decorrência da suplementação. . . . .	84
Figura 38 – Efeitos da suplementação com a dose alta (2 g/Kg) no microambiente tumoral, tecidos adiposos e tumor nos animais. . . . .	85

## Lista de tabelas

Tabela 1 – Especificação dos grupos experimentais, suas siglas representativas e N amostral. . . . .	41
Tabela 2 – Tabela utilizada como base para avaliar parâmetros motores, comportamentais, condições corporais. . . . .	44
Tabela 3 – Análises hematológicas (Eritrograma). . . . .	49
Tabela 4 – Análises hematológicas (leucograma e plaquetograma). . . . .	50



## Lista de abreviaturas e siglas

A2	Tipo de estrutura cristalina
A3	Aluno 3
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ALA	Ácido alfa-linolênico
ALT	Alanina aminotransferase
AMP	Adenosina 3,5-monofosfato
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
ANOVA	Análise de Variância
ARA	Ácido araquidônico
AST	Aspartato aminotransferase
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina Trifosfato
BAT	Tecido adiposo marrom
CAC	Ciclo do ácido cítrico
CC	Controle Câncer
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
CH	Controle saudável
CHD	Câncer dose alta
CLD	Câncer dose baixa
CO2	Dióxido de Carbono
COX	ciclo-oxigenase
CRP	Proteína C-reativa
CXCL12	C-X-C Motif Chemokine Ligand 12 (quimiocina C-X-C com motivo 12)
DHA	Ácido docosahexaenoico

DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPA	Ácido Eicosapentaenóico
ER	Receptor de estrogênio
GC-MS	Gas Chromatography-Mass Spectrometry (Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas)
GLUT1	Translocador de glicose 1
HC	Controle saudável
HCT	Hematócrito
HD	Dose alta
HDL	High Density Lipoprotein (Lipoproteína de Alta Densidade)
HE	Eosina & Hematoxilina
HER2	Fator de crescimento epidérmico humano do tipo 2
HIF1 $\alpha$	Hypoxia-inducible factor 1- $\alpha$ (fator 1-alfa induzível por hipóxia)
HIF2 $\alpha$	Hypoxia-inducible factors 2 $\alpha$ (fator 1- $\alpha$ induzível por hipóxia)
HK	Hexoquinase
HO	Água
IL-1	Interleucina-1
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 $\beta$
IL-33	Interleucina 33
IL-6	Interleucina 6
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IPTSP	Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás
IV	Intravenosa

LA	Ácido Linoleico
LD	Dose baixa
LDL	Low-density Lipoprotein
LPL	Lipoproteína Lipase
M2	Macrófago do tipo 2
MCH	Hemoglobina Corpuscular Média
MCP-1	Proteína Quimioatraente de Monócitos 1
MCV	Volume Corpuscular Médio
MPV	Volume plaquetário médio
MUFA	Ácidos graxos monoinsaturados
N2	Nitrogênio
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear kappa-B
NIST	National Institute of Standards and Technology
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDH	Piruvato desidrogenase
PR	Progesterone Receptor
PTEN	phosphatase and tensin homologue (Fosfatase homóloga à tensina)
RBC	Red Blood Cells (Eritrócitos)
RER	Retículo Endoplasmático Rugoso
RPMI	Meio de cultura Roswell Park Memorial Institute
RTK	Receptor tirosina quinase
UCP1	Uncoupling protein 1 (proteína desacopladora 1)
UFG	Universidade Federal de Goiás
VCM	Volume Corpuscular Médio
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (Fator de Crescimento do Endotélio Vascular)

WAT	White Adipose Tissue (Tecido adiposo branco)
WHO	World Health Organization (Organização Mundial de Saúde )
°C	Graus Célsius

## Sumário

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>22</b>
<b>1.1</b>	<b>Câncer</b>	<b>22</b>
1.1.1	Inflamação, Câncer e Tecido Adiposo	24
1.1.2	Metabolismo e Câncer	28
<b>1.2</b>	<b>Câncer de mama</b>	<b>32</b>
<b>1.3</b>	<b>Ácidos Graxos Poliinsaturados (PUFAs)</b>	<b>35</b>
1.3.1	Ácido docosahexaenoico (DHA)	37
<b>2</b>	<b>Justificativa</b>	<b>39</b>
<b>3</b>	<b>Objetivo</b>	<b>40</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivos específicos</b>	<b>40</b>
<b>4</b>	<b>Materiais e Métodos</b>	<b>41</b>
<b>4.1</b>	<b>Delineamento Experimental</b>	<b>41</b>
<b>4.2</b>	<b>Linhagem Celular e Modelo Tumoral</b>	<b>42</b>
<b>4.3</b>	<b>Modelo Animal</b>	<b>43</b>
<b>4.4</b>	<b>Ácido Docosahexaenoico (DHA)</b>	<b>43</b>
<b>4.5</b>	<b>Observações Clínicas e Aferição do Peso dos Animais</b>	<b>43</b>
<b>4.6</b>	<b>Análises Histopatológicas e Peso dos Órgãos</b>	<b>44</b>
<b>4.7</b>	<b>Dosagem de Parâmetros Inflamatórios</b>	<b>44</b>
<b>4.8</b>	<b>Coletas e Análises de Sangue</b>	<b>45</b>
4.8.1	Análises Hematológicas	45
4.8.2	Análises Bioquímicas	45
4.8.3	Dosagem de Citocinas do Soro	45
<b>4.9</b>	<b>Análises do Tumor e Mama</b>	<b>46</b>
4.9.1	Volume Tumoral	46
4.9.2	Análises de Perfil Metabólico Tumoral por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)	46
<b>4.10</b>	<b>Análises Estatísticas</b>	<b>47</b>
<b>5</b>	<b>Resultados e Discussão</b>	<b>48</b>
<b>5.1</b>	<b>Resultados</b>	<b>48</b>
5.1.1	Observações Clínicas e Aferição do Peso dos Animais	48
5.1.2	Análises de Parâmetros do Sangue e do Soro	48
5.1.2.1	Análises Hematológicas	48
5.1.2.1.1	<i>Eritrograma</i>	48
5.1.2.1.2	<i>Leucograma e Plaquetograma</i>	49

5.1.2.2	Análises Bioquímica . . . . .	50
5.1.2.2.1	<i>Função Renal</i> . . . . .	50
5.1.2.2.2	<i>Lipidograma</i> . . . . .	51
5.1.2.3	Análise de Citocinas do Soro . . . . .	52
5.1.3	Análises do Fígado . . . . .	53
5.1.3.1	Peso . . . . .	53
5.1.3.2	Histopatologia . . . . .	54
5.1.3.3	Análise de Parâmetros Bioquímicos da Função Hepática . . . . .	54
5.1.4	Análises do Baço . . . . .	55
5.1.4.1	Peso . . . . .	55
5.1.4.2	Histopatologia . . . . .	56
5.1.5	Análises dos Tecidos Adiposos . . . . .	56
5.1.5.1	Brown Adipose Tissue (BAT) . . . . .	57
5.1.5.1.1	<i>Peso</i> . . . . .	57
5.1.5.1.2	<i>Histopatologia</i> . . . . .	57
5.1.5.1.3	<i>Análise do Perfil Inflamatório</i> . . . . .	58
5.1.5.2	Subcutaneous White Adipose Tissue (sWAT) . . . . .	59
5.1.5.2.1	<i>Peso</i> . . . . .	59
5.1.5.2.2	<i>Histopatologia</i> . . . . .	60
5.1.5.2.3	<i>Análise do Perfil Inflamatório</i> . . . . .	60
5.1.5.3	Visceral White Adipose Tissue . . . . .	61
5.1.5.3.1	<i>Peso</i> . . . . .	61
5.1.5.3.2	<i>Histopatologia</i> . . . . .	62
5.1.6	Análises Histopatológicas do Pulmão, Linfonodo Inguinal e Intestino . . .	62
5.1.7	Análises do Tumor e da Mama . . . . .	64
5.1.7.1	Volumo Tumoral . . . . .	64
5.1.7.2	Histopatologia . . . . .	65
5.1.7.3	Análise do Perfil Inflamatório . . . . .	66
5.1.7.4	Análise do Perfil Metabólico . . . . .	67
<b>5.2</b>	<b>Discussão</b> . . . . .	<b>72</b>
<b>6</b>	<b>Conclusão</b> . . . . .	<b>82</b>
	<b>Referências</b> . . . . .	<b>86</b>

## 1 Introdução

### 1.1 Câncer

O câncer é um dos grandes problemas enfrentados pela humanidade e está diretamente relacionado a pressões físicas, emocionais e financeiras sobre indivíduos, famílias, comunidades e sistemas de saúde. Nesse contexto, países que possuem sistemas de saúde limitados, pecam em relação a diagnósticos e tratamento de qualidade em tempo hábil. Por outro lado, países com sistemas de saúde mais robustos, conseguem contornar esses problemas, e demonstram taxas de sobrevivência mais elevadas. Só no ano de 2018, foram gastos \$1,16 trilhões de dólares com diagnóstico e tratamento de câncer. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer foi a segunda maior causa de morte no mundo em 2018. Sendo que, os tipos mais comuns em indivíduos do sexo masculino são os do pulmão, da próstata, do reto, do estômago e do fígado. Já do feminino, são os da mama, do reto, do pulmão, do cólon e da tireoide (WHO, 2018).

No Brasil, estima-se a ocorrência de 625 mil casos novos de câncer para cada ano do triênio 2020-2022. Dos quais, o câncer de pele não melanoma será o mais incidente (177 mil), seguido pelos cânceres de mama e próstata (66 mil cada), cólon e reto (41 mil), pulmão (30 mil) e estômago (21 mil). Nesse contexto, quando se considera o sexo feminino, e não se considera cânceres de pele não melanoma, o câncer de mama é o mais recorrente (Figura 1) e possui uma alta taxa de mortalidade (INCA, 2020).

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	Homens	Mulheres	Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%

\*Números arredondados para múltiplos de 10.

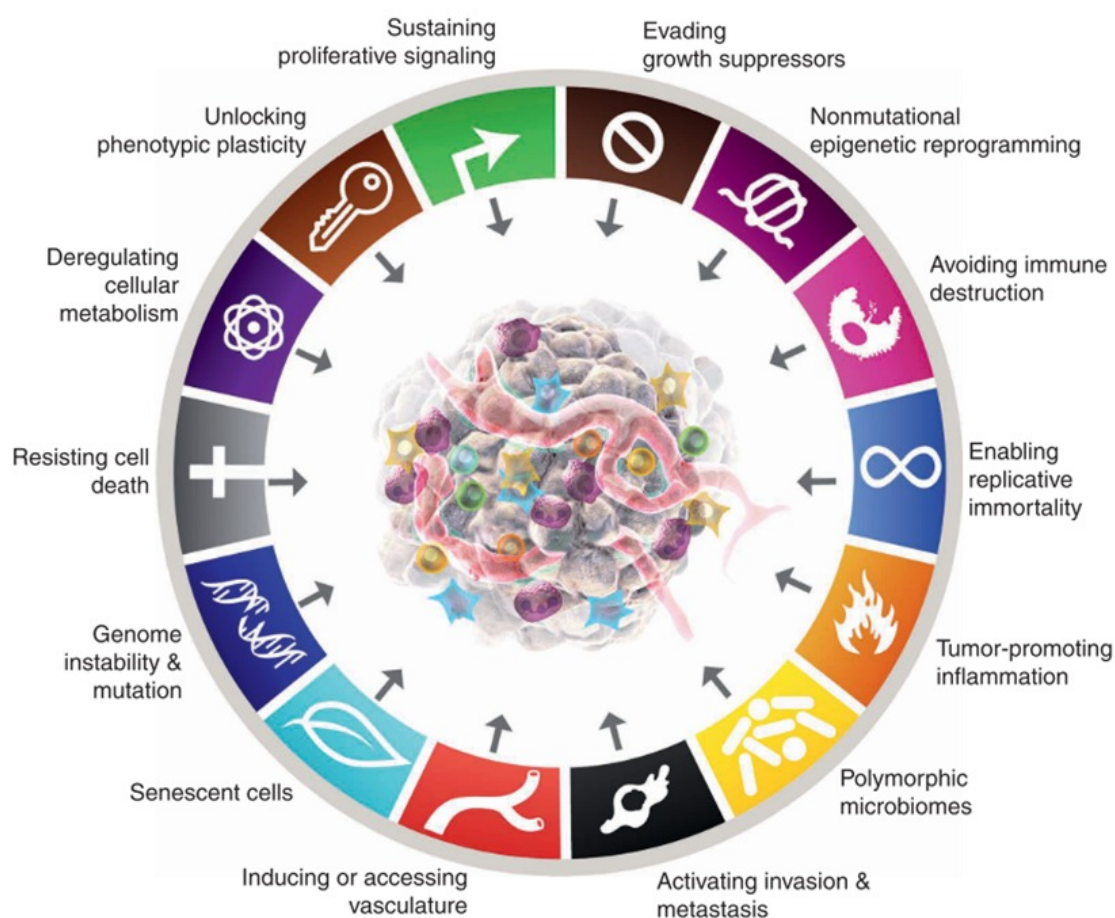
**Figura 1 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma\*. Fonte: INCA (2020)**

O câncer corresponde a um conjunto de doenças, as quais têm como principais características, o crescimento desenfreado de células, caracterizando uma alta taxa de proliferação celular, o que pode levá-lo além de seus limites usuais, invadindo partes adjacentes ao seu sítio de origem no corpo e/ou se espalhar para outros órgãos (WHO, 2018). Esse processo, chamado de metástase, advém da capacidade de as células neoplásicas de driblar os mecanismos homeostáticos do tecido, pelo qual consegue comprometer a estabilidade celular e tecidual (HANAHAN; WEINBERG, 2000; COOPER; HAUSMAN, 2007).

Diversos fatores estão relacionados com o desenvolvimento e o aumento da taxa de cânceres, desde fatores endógenos, quanto exógenos, os quais levam a mutações e ao processo de carcinogênese. Mutações em genes relacionados a processos de controle do ciclo e morte celular, conhecidos como proto-oncogenes e genes supressores de tumor, estão intrinsecamente relacionados à tumorigênese. Ao considerar fatores externos, evidencia-se principalmente o consumo de tabaco e álcool, dietas ocidentais, obesidade, sedentarismo e longevidade. Por outro lado, agentes internos, como mutações em células somáticas e germinativas, que podem comprometer mecanismos de reparo de DNA, controle do ciclo e morte celular, estão diretamente relacionados à carcinogênese (WEINBERG, 2015; WEINBERG, 2008).

Além das características já citadas, diversas outras vêm sendo descritas e estudadas para melhor compreensão do câncer (Hanahan e Weinberg (2000)). Nesse contexto, foram descritas no início dos anos 2000, as principais características adquiridas progressivamente pelas células para evoluir a um estado neoplásico, as quais foram chamadas de '*Hallmarks of Cancer*'. Essas características primeiramente compreendiam a capacidade de sustentar a sinalização proliferativa, evadir aos supressores de crescimento, a resistência a morte celular, adquirir imortalidade replicativa, a indução da angiogênese e a capacidade de invadir sítios adjacente e formar metástases. Contudo, devido às novas abordagens metodológicas nas áreas de bioquímica e biologia molecular, novos "*Hallmarks*" estão sendo compreendidos como características fundamentais as neoplasias, como, por exemplo, a evasão imunológica, a promoção da inflamação e a reprogramação metabólica celular (Figura 2) (HANAHAN; WEINBERG, 2011; HANAHAN, 2022).





**Figura 2 – Características dos cânceres, conhecidos como 'Hallmarks'. Fonte: Hanahan (2022)**

### 1.1.1 Inflamação, Câncer e Tecido Adiposo

A idade avançada é um dos principais fatores que se associam com o desenvolvimento de neoplasias mamárias (BENZ, 2008; VATTER *et al.*, 2018), sendo que, quatro em cada 5 casos ocorrem depois dos cinquenta anos. Outros fatores, que têm associação com desbalanços em vias inflamatórias, por exemplo, disfunções metabólicas como a obesidade, estão atrelados ao desenvolvimento de tumores (PICON-RUIZ *et al.*, 2017). Nesse contexto, o tecido adiposo tem um papel fundamental na homeostase energética do corpo, tendo uma atuação central como órgão endócrino (DENG *et al.*, 2016).

Uma das características desse tecido é possuir uma grande plasticidade fenotípica e, apesar de, ser constituído principalmente por células de gordura, essas possuem atividades metabólicas, fisiologia e funções distintas. Essas impactam diferencialmente a modulação da inflamação e, conseqüentemente, o câncer. Tendo isso em vista, quatro tipos principais de adipócitos já são descritos: o branco, o rosa, o bege e o marrom (PANINA *et al.*, 2018; CORRÊA; HEYN; MAGALHAES, 2019).

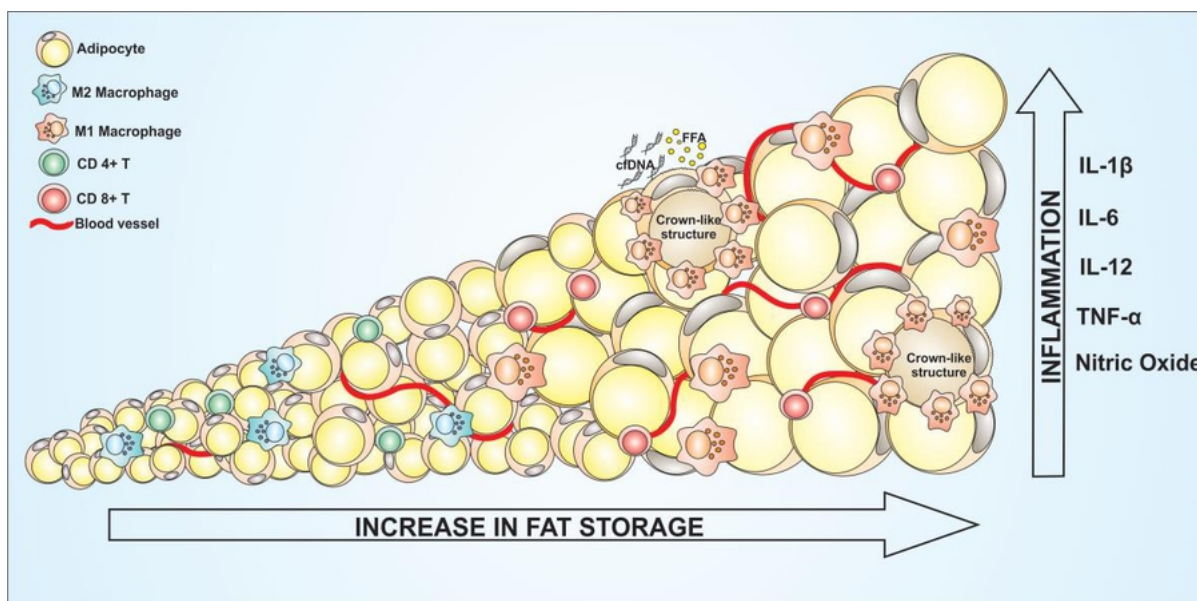
O tecido adiposo branco (WAT), do inglês *White Adipose Tissue*, é um dos mais bem estudados e descritos na literatura. Fisiologicamente, seus adipócitos são compostos majoritariamente por ácidos graxos contido em uma grande gota de gordura. Além de adipócitos, é também composto por células imunológicas, tais como, as endoteliais, os fibroblastos, os pericitos e os pré-adipócitos (PEIRCE; CAROBBIO; VIDAL-PUIG, 2014). Por ser o mais abundante de todos os tecidos adiposos, esse tecido exerce um grande papel na reserva energética, assim como na regulação hormonal do corpo, por meio da síntese e liberação de uma gama de hormônios, chamados de adipocinas (COELHO; OLIVEIRA; FERNANDES, 2013).

Dentre os hormônios produzidos pelos adipócitos, destaca-se a leptina. Esta possui como principal função o controle do apetite, assim como muitas outras funções no metabolismo energético. O sistema endócrino da leptina serve uma função evolutiva crítica ao manter a relativa constância da massa tecidual adiposa, protegendo assim os indivíduos dos riscos associados a serem muito magros (fome e infertilidade) ou muito obesos (predação)(FRIEDMAN, 2019). Ela também possui papel de destaque na modulação inflamatória e, por consequência, também no microambiente tumoral (SANTANDER *et al.*, 2015). Isso se deve a sua capacidade de interferir na via JAK/STAT, aumentando a produção de proteínas anti-apoptóticas e induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como, 'Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ' (TNF- $\alpha$ ) e Interleucina 6 (IL-6), além da indução angiogênica mediada pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (DUTTA *et al.*, 2012).

Quando há um processo de inflamação local e/ou sistêmica, decorrente de uma desregulação de WAT, há uma influência direta no microambiente tumoral, de forma que, há um favorecimento ao estabelecimento e a sobrevivência das células tumorais. Neste contexto, o microambiente tumoral é favorecido também pelo recrutamento e polarização de células imunológicas (CORRÊA *et al.*, 2017). Dentre essas células, macrófagos do tipo 2 (M2) são um dos principais tipos celulares que são recrutados por adipócitos associados a tumores por via 'monocyte chemoattractant protein-1' (MCP1), Interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e C-X-C Motif Chemokine Ligand 12 (CXCL12) (ARENDRT *et al.*, 2013).

O acúmulo de macrófagos no microambiente tumoral também já vem sendo descrito como resultado da liberação de DNA por adipócitos em degeneração (NISHIMOTO *et al.*, 2016). Dessa forma, a desregulação de WAT leva a um processo inflamatório, caracterizado pela hipertrofia e hiperplasia desse tecido, o qual facilita o estabelecimento tumoral e aumenta a sobrevivência das células cancerosas (Figura 3)(CORRÊA *et al.*, 2017). Em resumo, os mecanismos que regem o microambiente tumoral e as possíveis influências na inflamação e no câncer ainda estão sendo descritos e estudados. Dessa forma, o papel do WAT na tumorigênese pode servir como base, auxiliar no desenvolvimento de métodos para modulação

desse tecido e para um melhor prognóstico do câncer.

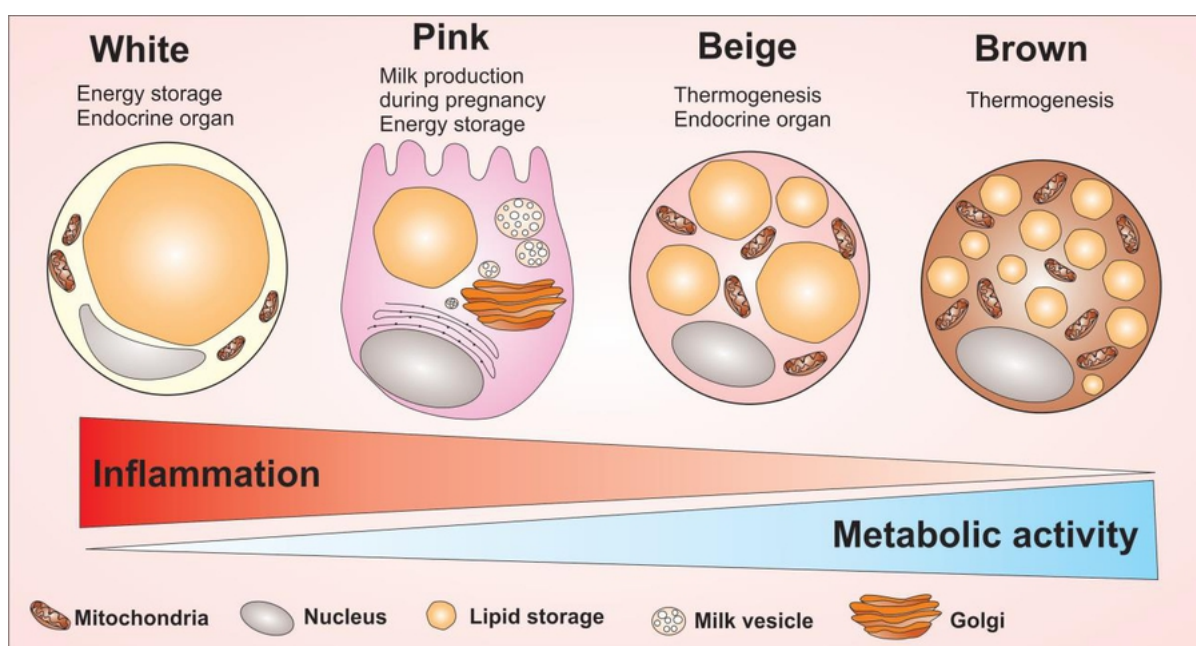


**Figura 3 – O aumento do tamanho (hipertrofia) e da quantidade (hiperplasia) de adipócitos brancos pode favorecer processos inflamatórios, de forma que induz a vascularização e facilita o recrutamento de células imunológicas. Fonte: Corrêa, Heyn e Magalhaes (2019)**

Outra expressão fenotípica dos tecidos adiposos, é o tecido adiposo marrom (BAT), do inglês *Brown Adipose Tissue*, o qual, também tem papel central na regulação hormonal do corpo. Além de ser um tecido fundamental para a regulação da temperatura corporal (PENG *et al.*, 2015). A elevada expressão e ativação da proteína desacopladora 1, do inglês *'uncoupling protein 1'* (UCP1) promove o desvio de elétrons da cadeia transportadora de elétrons durante a respiração celular nas mitocôndrias, mediante a dissipação do gradiente de prótons no espaço intermembranar, produzindo calor ao invés da convencional produção de Adenosina Trifosfato (ATP). Para mais, esse tecido possui um caráter predominantemente anti-inflamatório, o oposto do WAT. A estrutura do BAT é formada por pequenas gotas de gordura, gotículas, dispostas de forma multilocular (PEIRCE; CAROBBIO; VIDAL-PUIG, 2014) como também, possui maior número de mitocôndrias, que são agentes principais da resposta termogênica (Figura 4) (CORRÊA; HEYN; MAGALHAES, 2019). Além da atuação no controle de temperatura, a partir da oxidação de lipídeos (KOTZBECK *et al.*, 2018), esse tecido, possui diversos tipos celulares que coexistem e contribuem para sua função. O seu caráter anti-inflamatório relaciona-se com baixa produção de citocinas pró inflamatórias, assim como múltiplos fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas e a presença de células imunológicas com polarização para um perfil mais anti-inflamatório (VILLARROYA *et al.*, 2016; FENZL; KIEFER, 2014; JONG *et al.*, 2017).

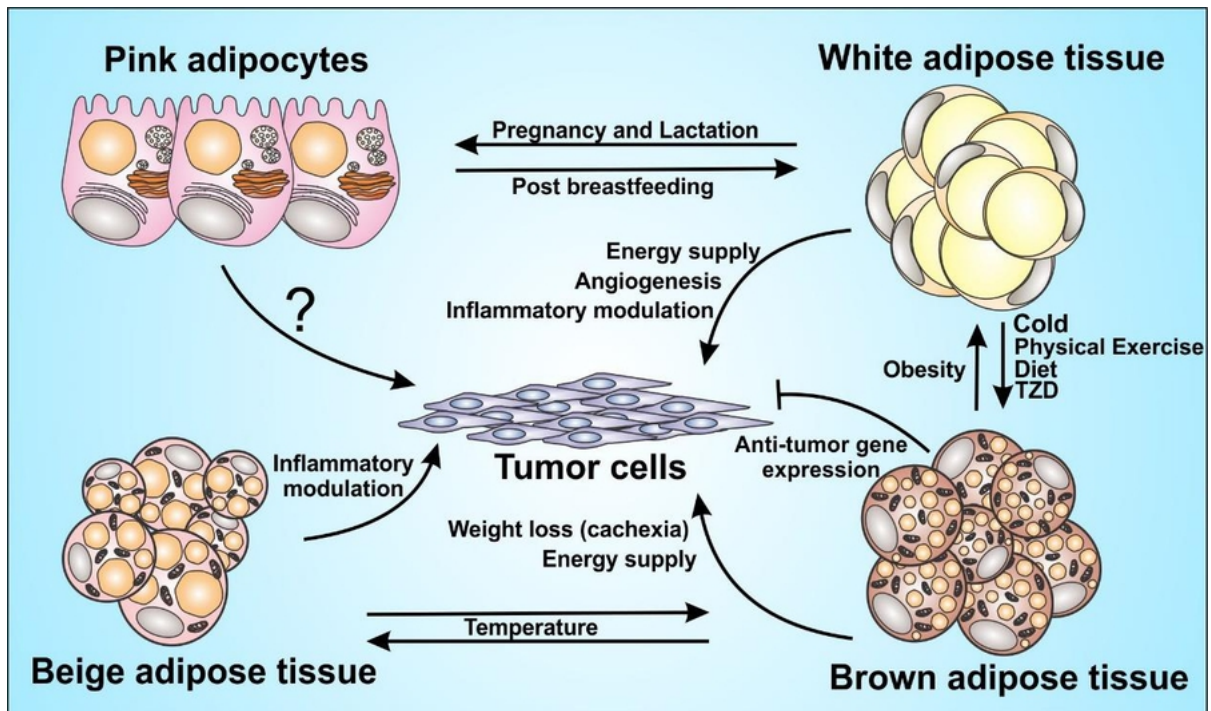
O papel do BAT no câncer ainda é cabível de controvérsias, por um lado, análises experimentais demonstraram que o aumento de adipócitos marrons está ligada a super-expressão de genes antitumorais. Como é o caso do gene *'phosphatase and tensin homologue'* (PTEN),

o qual atua na regulação da proliferação celular e na regulação de processos antitumorais (ORTEGA-MOLINA *et al.*, 2012), por outro lado, o aumento de BAT ocasionou um agravamento de casos de caquexia, em casos de tumores mais avançados, o que está ligado ao grande consumo de reservas lipídicas nesse tecido. Além do mais, o BAT superativo é capaz de fornecer energia para o desenvolvimento de células tumorais (KIR; SPIEGELMAN, 2016).



**Figura 4 – Quatro principais expressões fenotípicas dos adipócitos, os quais possuem características morfológicas e funcionais diferentes. Fonte: (CORRÊA; HEYN; MAGALHAES, 2019)**

Em continuidade, há os adipócitos bege, caracterizados idem por uma alta plasticidade e por possuírem um fenótipo intermediário entre os adipócitos branco e marrom. Esses apresentam uma quantidade intermediária de gotículas de gordura, os quais, a partir de estímulos externos como baixas temperaturas, exercícios físicos, alimentação e drogas agonistas, podem adquirir características das células adiposas marrons (Figuras 4-5). Isso se deve, principalmente, a uma maior ativação da proteína UCP1 (ROCHA-RODRIGUES *et al.*, 2016; WU; COHEN; SPIEGELMAN, 2013). Por último, há os adipócitos rosa, os quais também apresentam uma alta plasticidade, mas estão presentes apenas na mama durante a gravidez e a lactação. Essas células possuem abundantes gotículas lipídicas citoplasmáticas, superfície apical com microvilosidades, retículo endoplasmático rugoso (RER) robusto, complexo de golgi e grânulos contendo leite (Figura 4)(CINTI, 2018; GIORDANO *et al.*, 2014).



**Figura 5 – O papel dos tecidos adiposos na progressão tumoral. Os adipócitos desempenham um papel importante na modulação da inflamação e na função endócrina. A figura mostra a grande plasticidade entre os adipócitos marrons, beges e brancos com a influência de alguns indutores e a capacidade dessas células em orquestrar o microambiente tumoral, através do fornecimento de energia e da imunomodulação. Fonte:(CORRÉA; HEYN; MAGALHAES, 2019)**

### 1.1.2 Metabolismo e Câncer

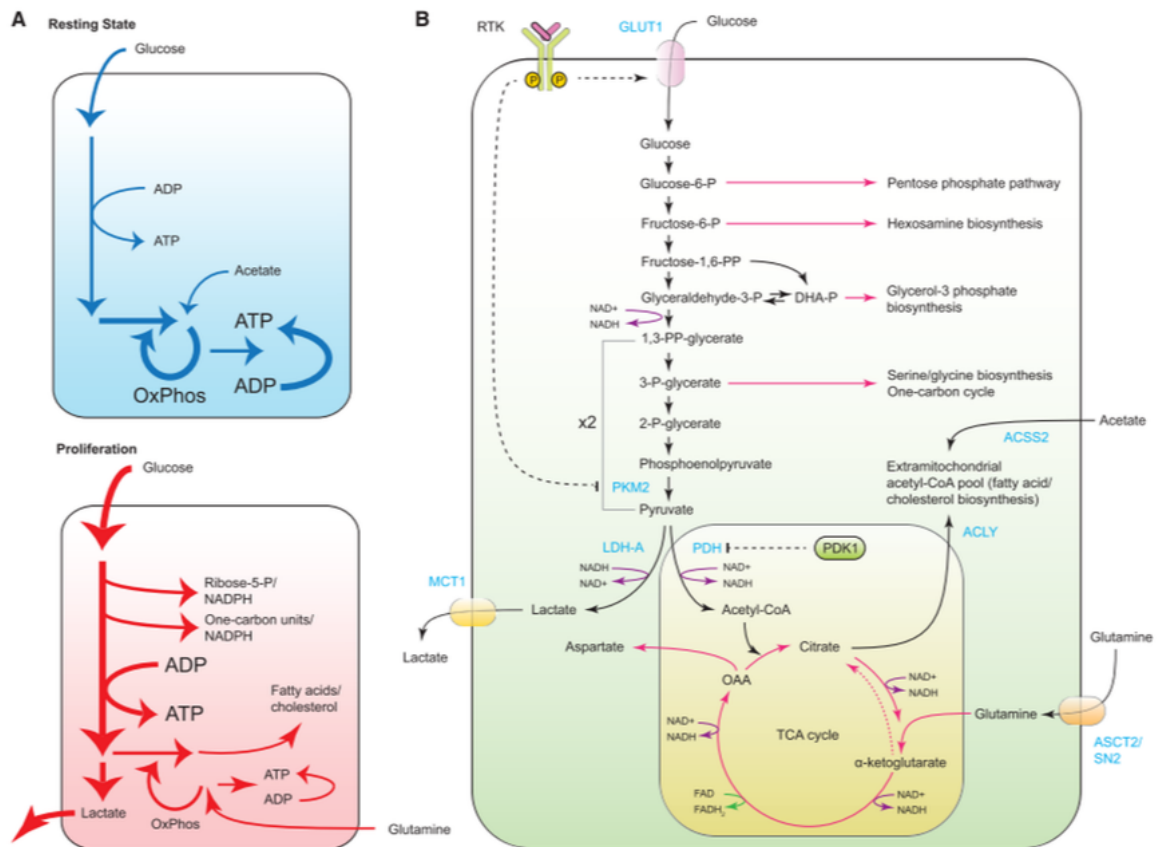
A proliferação celular descontrolada está na essência do desenvolvimento neoplásico, todavia não envolve somente a alteração de vias proliferativas, mas também, a adaptação do metabolismo energético da célula. Isso se deve à necessidade de alimentar o crescimento e a divisão celular. Em condições aeróbicas, as células normais adquirem energia majoritariamente pela oxidação de glicose a piruvato, pela glicólise no citosol, seguida pela oxidação em dióxido de carbono na mitocôndria. Já em baixas taxas de oxigênio, apenas uma pequena parte do piruvato vai para mitocôndria (BONORA *et al.*, 2012).

As células neoplásicas, por outro lado, mesmo na presença de oxigênio, podem reprogramar seu metabolismo energético, favorecendo a glicólise e a formação de lactato, ao invés da fosforilação oxidativa. Esse estado metabólico é chamado de glicose aeróbica e foi observado primeiramente por Warburg como uma característica anômala do metabolismo de células cancerosas (WARBURG, 1930; WARBURG, 1956a; WARBURG, 1956b). O efeito Warburg já foi descrito em diversas células de tecido embrionário de divisão rápida, dando suporte a alta taxa de síntese de biomoléculas dessas células. No contexto das neoplasias, o aumento da via da glicólise, permite a utilização de intermediários glicolíticos em diversas vias de biossíntese, como as de produção de ácidos graxos e colesterol, derivados de

açúcar pentoses e hexoses, glicerol, nucleótidos e aminoácidos não essenciais (HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2009).

A produção de ATP é, por volta de 18 vezes, menor pela glicólise do que pela fosforilação oxidativa mitocondrial, dessa forma, a célula cancerosa precisa contornar esse 'deficit' energético. Para isso, ela aumenta a entrada de glicose na célula, por meio do aumento da produção de transportadores de glicose 1 (GLUT1) e, também, aumenta a expressão da primeira enzima da via glicolítica, hexoquinase (HK) (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Esse metabolismo glicolítico já foi associado a ativação de alguns oncogenes, como RAS e MYC, e a ativação de genes supressores de tumor mutados, como P53, assim como, o aumento dos fatores de transcrição 'Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  e 2 $\alpha$ ' (HIF1 $\alpha$  e HIF2 $\alpha$ ), os quais favorecem a proliferação celular (DEBERARDINIS *et al.*, 2008; JONES; THOMPSON, 2009).

Outra fonte de nutrientes que também é alterada em células tumorais, é a utilização de glutamina, a qual fornece nitrogênio para a síntese de diversos compostos celulares, tais como, nucleotídeos de purina e pirimidina, além disso, auxilia na absorção de aminoácidos essenciais. Embora os aminoácidos não essenciais possam ser produzidos por células de mamíferos pela via 'de novo', os aminoácidos essenciais devem ser adquiridos de fontes externas. Nesse contexto, a importação de um aminoácido essencial, a leucina, através da membrana plasmática, realizada pelo transportador de aminoácidos L do tipo 1 (LAT1), demonstrou estar acoplado a um efluxo simultâneo de glutamina (NICKLIN *et al.*, 2009). Em suma, a maior absorção de glutamina está ligada a um maior transporte de aminoácidos essenciais para célula, assim como, é utilizada como fonte carbônica para produção de biomoléculas (Figura 6).



**Figura 6 – Utilização de Intermediários do Ciclo Glicólise/TCA para Biossíntese e Produção de NADH.** (A) Diferenças no metabolismo central do carbono de uma célula em estado quiescente em comparação com uma célula em proliferação; (B) Diversas saídas biossintéticas do metabolismo central do carbono. RTK, receptor tirosina quinase; GLUT1, transportador de glicose 1; PKM2, piruvato quinase M2; ACSS2, acetil-CoA sintetase 2; LDH-A, lactato desidrogenase A; PDH, piruvato desidrogenase 1; PDK1, piruvato desidrogenase quinase 1; ACLY, ATP-citrato lisase; MCT1, monocarboxilato transportador 1; ASCT2/SN2, transportador de glutamina. Fonte: Pavlova e Thompson (2016)

Nesse cenário, quando as células cancerosas têm uma alta taxa de consumo de nutrientes, juntamente a uma escassez no fornecimento vascular tumoral (VAUPEL; KALLINOWSKI; OKUNIEFF, 1989), certas mutações dão capacidades alternativas para lidar com a baixa de precursores anabólicos. Nessa situação, o plasma e o fluido intersticial dos tecidos, que é rico em proteínas solúveis, é utilizado por células cancerosas para adquirir aminoácidos livres englobando-os por macropinocitose, seguida da degradação lisossômica dessas moléculas extracelulares (COMMISSO *et al.*, 2013). Outras formas, de adquirir esses nutrientes, é por meio do engolfamento e digestão de células inteiras, processo chamado de entose, assim como a fagocitose de corpos apoptóticos do microambiente (KRAJCOVIC *et al.*, 2013; STOLZING; GRUNE, 2004).

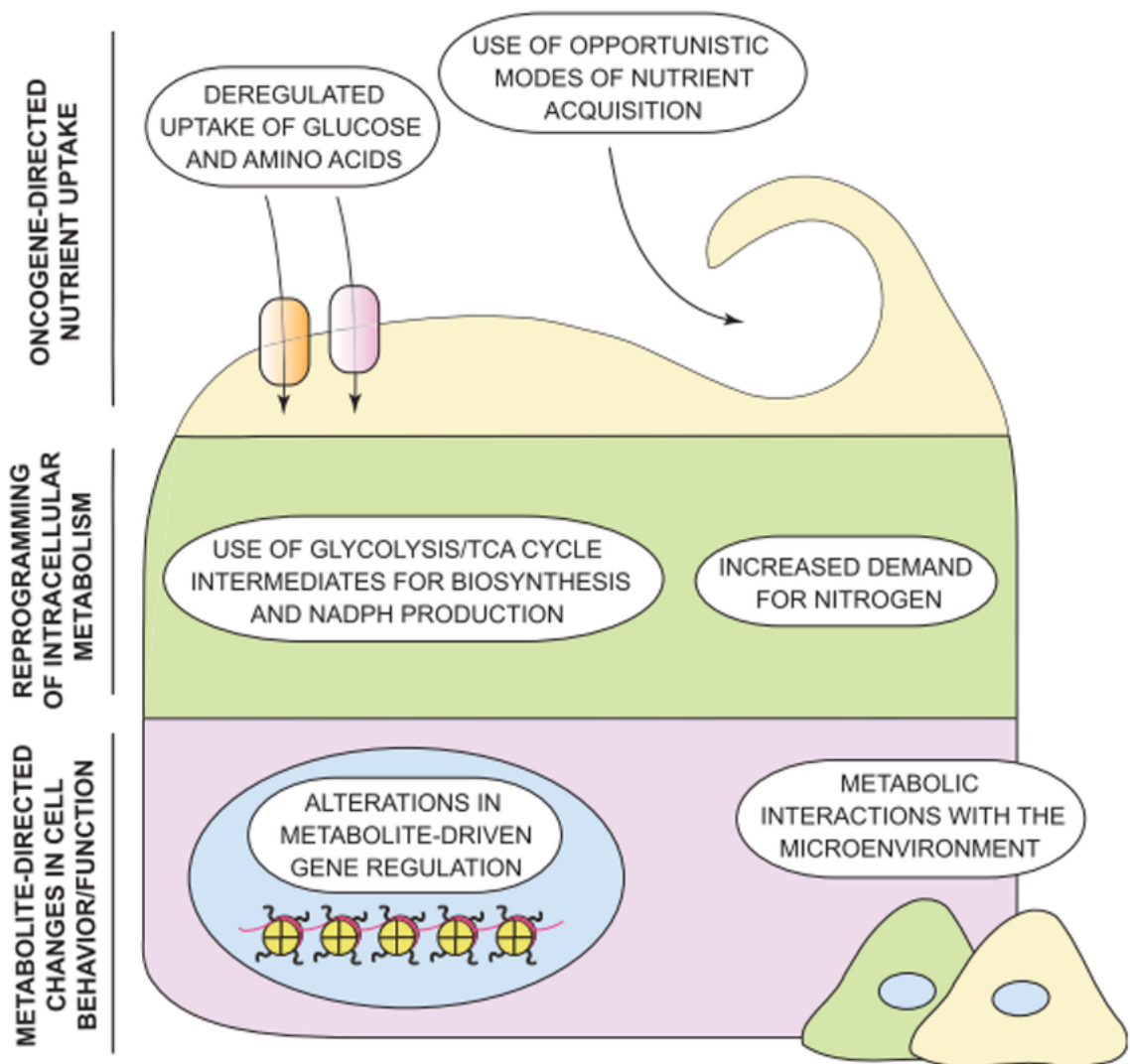
Outra consequência da falta de fornecimento de nutrientes vasculares para o tumor, é o surgimento de áreas em hipóxia, as quais acarretam prejuízos a reações biossintéticas,

que requerem oxigênio comoceptor final de elétrons. Tal como ocorre com a 'stearoyl-CoA desaturase 1' (SCD1), a qual catalisa reações envolvidas na produção de ácidos graxos pela via 'de novo'. Nessas circunstâncias, as células, importam esses ácidos graxos já "prontos" do ambiente circundante sob a forma de lisofosfolípidos de cadeia contendo unidades acilo (COMMISSO *et al.*, 2013). Enquanto alguns tipos tumorais desenvolvem adaptações para superar a baixa disponibilidade de ácidos graxos livres, outros induzem a liberação desses lipídeos das células normais vizinhas a partir da expressão da 'lipoprotein lipase' (LPL) e da 'monoacylglycerol lipase' (MAGL) (KUEMMERLE *et al.*, 2011; NOMURA *et al.*, 2010).

O estado de altas taxas de oxidação de glicose está também diretamente ligado a uma produção aumentada de acetil-CoA. Essa molécula é um substrato fundamental para enzimas que acetilam histonas e outras proteínas. Desse modo, quando as histonas estão acetiladas, a fita de DNA possui maior disponibilidade transcricional e, dessa forma, há um aumento da expressão gênica (LEI; TU, 2013; CAI *et al.*, 2011). Além desses fatores, a interação metabólica com o microambiente tumoral é alterado pelas células cancerosas, de forma que, células endoteliais, fibroblastos, assim como células componentes da resposta imune inata e adaptativa passam por mudanças fenotípicas (HANAHAN; COUSSENS, 2012). A acumulação de lactato advinda do alto consumo de glicose e glutamina, demonstrou causar uma atenuação da ativação de células T e dendríticas, a migração de monócitos, como também, leva a uma polarização de macrófagos para um perfil M2, que atua de forma imunossupressora. Além disso, induz a liberação de VEGF, por células estromais associadas ao tumor, e leva a uma acidificação do meio extracelular, favorecendo a degradação da matriz extracelular. Esses processos atuam favorecendo o processo de angiogênese e invasão do tumor (PAVLOVA; THOMPSON, 2016).

Em suma, as alterações metabólicas celulares em tumores, abrangem três principais 'Hallmarks': a alteração do influxo metabólico, garantindo uma maior capacidade de adquirir nutrientes necessários; modulando a forma pela qual os intermediários metabólicos são atribuídos a diferentes vias que contribuem para o desenvolvimento neoplásico e por último; exercendo efeitos de longa duração sobre os rumos que a célula seguirá, entre os quais se encontram alterações na diferenciação das próprias células cancerosas, bem como dos componentes do microambiente tumoral (PAVLOVA; THOMPSON, 2016)(Figura 7).





**Figura 7 – 'Hallmarks' do metabolismo tumoral.** As células cancerosas acumulam alterações metabólicas que lhes permitem ter acesso às fontes de nutrientes convencionais, bem como a fontes de nutrientes não convencionais, utilizar estes nutrientes na criação de nova biomassa para sustentar a proliferação desregulada, e tirar partido da capacidade de selecionar metabólitos para afetar o destino das próprias células cancerosas, bem como uma variedade de tipos de células normais dentro do microambiente tumoral. São representadas três camadas de interação célula-metabolito, todas elas se reprogramam no câncer. No topo estão as adaptações que envolvem a absorção de nutrientes (Hallmarks 1 e 2), seguidas de alterações das vias metabólicas intracelulares (Hallmarks 3 e 4) no meio. Finalmente, os efeitos a longo prazo da reprogramação metabólica na própria célula cancerígena (Hallmark 5), bem como em outras células do seu microambiente (Hallmark 6), são representados na parte inferior. Fonte: Pavlova e Thompson (2016)

## 1.2 Câncer de mama

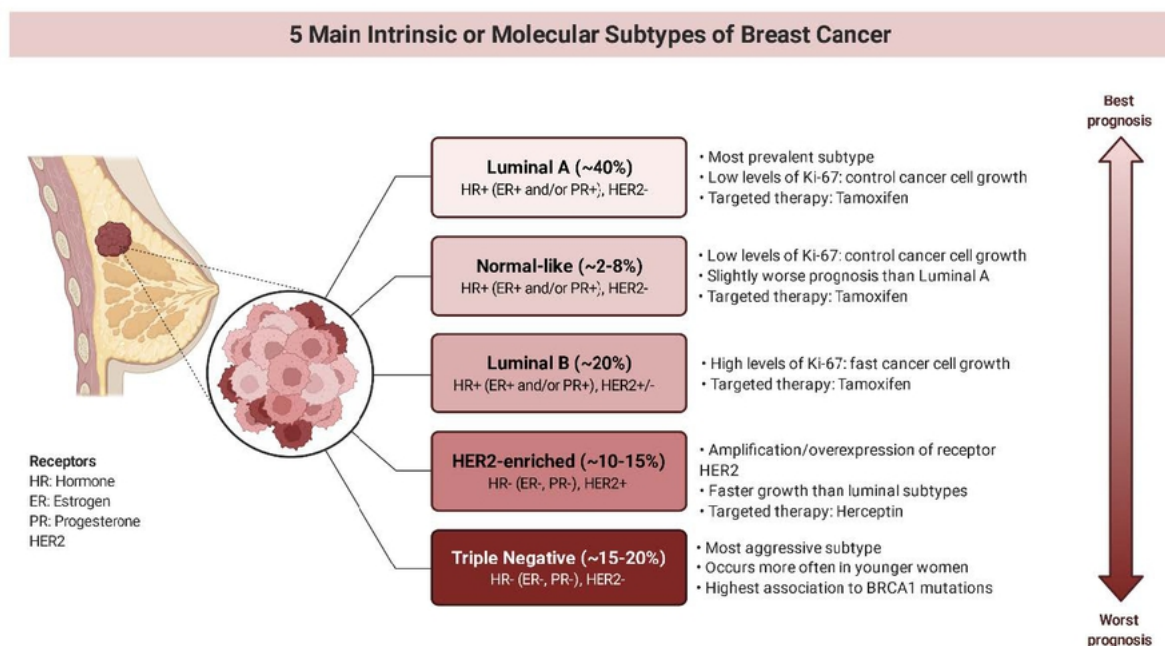
Dentre os diversos tumores malignos, o câncer de mama, destaca-se como um dos principais tipos entre as mulheres, sendo o mais comum, atrás apenas do câncer de pele não melanoma. Quase um terço dos tumores femininos são enquadrados como câncer de mama, a taxa de mortalidade-incidência desses tumores é de 15% e os números relacionados à incidência de câncer de mama em locais diferentes do globo (27 em 100 000

na África e leste asiático e 97 em 100 000 na América do Norte) ressaltam que fatores de estilo de vida aumentam o risco de desenvolvimento dessas neoplasias (BRAY *et al.*, 2018).

Estima-se que para o triênio 2020-2022, o surgimento de 66280 casos anuais de câncer de mama, ou seja, 61,61 casos a cada 100 mil habitantes no Brasil, sendo que a taxa de mortalidade, em 2019, girou em torno de 16,1% das mortes totais de câncer no país, assim como seguiu uma ascendência da curva no decorrer dos anos e no aumento da faixa etária (INCA, 2019; HARBECK; GNANT, 2017). Um estudo prospectivo informou que mais de um terço dos tumores de mama que acometem mulheres de países desenvolvidos são influenciados por fatores associados ao estilo de vida, como abuso de álcool, uso de tabaco, histórico reprodutivo, terapia hormonal, menopausal e obesidade (NUR *et al.*, 2019).

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), há diversos tipos de câncer de mama, dos quais possuem diferentes formas de evolução da doença. Alguns tumores de mama se desenvolvem de forma rápida e agressiva, já outros, possuem uma evolução mais limitada. Nesse contexto, o prognóstico do carcinoma de mama varia de acordo o tamanho tumoral, o grau de diferenciação histológica, a presença de comprometimento axilar e de invasão linfovascular (COLOZZA *et al.*, 2005). Dessa forma, se descoberto e tratados nos primeiros estágios do desenvolvimento da doença, é possível se alcançar um bom prognóstico, mas por outro lado, diagnóstico e tratamentos tardios estão diretamente ligados a um alto grau de mortalidade.

O câncer de mama pode ser classificado em cinco tipos clássicos da doença: 1. Carcinoma ductal invasivo, em que as células tumorais se instalam no ducto mamário e é o tipo de câncer mais comum entre as mulheres; 2. Carcinoma ductal in situ, o qual possui chances de desenvolver metástases menores, porque as células tumorais se estabelecem dentro dos ductos mamários; 3. Carcinoma lobular in situ, que possui o segundo lugar entre os mais comuns em mulheres, em que a neoplasia se desenvolve dentro dos lóbulos das glândulas responsáveis pela produção de leite; 4. Carcinoma lobular invasivo, acometendo os lóbulos das glândulas produtoras de leite, mas apresenta uma alta capacidade metastática; por último: 5. Doença de Paget, onde as células tumorais se instalam no tecido conjuntivo da mama, e é o tipo mais raro da doença (SERRA *et al.*, 2014; GOBBI, 2012). A heterogeneidade da doença é clinicamente subdividida em três principais subtipos baseados na expressão de receptores hormonais, estrógeno (ER) e progesterona (PR), e a ausência ou presença de 'human epidermal growth factor receptor 2' (HER2): tumores luminais positivos para receptor de estrógeno, positivos para o receptor de progesterona e de mama triplo-negativo (TNBC) (Figura 8) (DENKERT *et al.*, 2017).



**Figura 8 – Classificação molecular dos subtipos de câncer de mama. A categorização é com base na expressão de receptores hormonais, como receptor de estrogênio (ER) e progesterona (PR), o marcador de proliferação Ki-67 e o receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2). O prognóstico varia em função do subtipo de cancro da mama, sendo que, medicamentos específicos, como Herceptina, são utilizadas em tumores positivos para HER2 e como oTamoxifeno para tumores positivos para ER. Fonte: Adaptado do Biorender<sup>TM</sup>.**

O TNBC caracteriza-se por não apresentar níveis detectáveis dos receptores hormonais de estrogênio e progesterona e de HER2 (BIANCHINI *et al.*, 2016). Esse tipo de câncer evidencia como principais características clínicas: uma alta invasividade, em que 46% dos pacientes apresentarão metástases distantes; alta taxa de reincidência após cirurgia, por volta de 25%; e está diretamente ligado a piores prognósticos e altas taxas de mortalidade da doença (YIN *et al.*, 2020). Nos Estados Unidos, 12% do total de tumores diagnosticados, são TNBC (BIANCHINI *et al.*, 2016).

Devido à heterogeneidade dos tumores TNBC, podem ser classificados a partir de análises histológicas, moleculares, metabólicas e de expressão gênica. A maior parte dos TNBC são agrupados como carcinomas mamários invasivos (LIVASY *et al.*, 2005). Nesse contexto, os TNBC, também, podem ser subdivididos considerando as alterações em vias metabólicas, por exemplo: o subtipo lipogênico (MSP1); o glicolítico (MPS2); e o metabólico misto (MPS3) (GONG *et al.*, 2021)

Quando se considera a complexidade dos tumores de mama, as abordagens terapêuticas dependem de alguns fatores, como a fase de desenvolvimento do tumor, a presença ou ausência de receptores hormonais, assim como, de fatores de crescimento. Os tratamentos

convencionais, utilizam-se de quimioterapias, radioterapias e cirurgias. Essas abordagens estão centradas na diminuição do crescimento celular e, mesmo demonstrando potentes resultados, carregam uma alta taxa de citotoxicidade, atingindo células saudáveis, devido a sua não especificidade (VALASTYAN; WEINBERG, 2011; BIANCHINI *et al.*, 2016). Por causa disso, abordagens antineoplásicas adjuvantes ou alternativas, como imunoterapias, vêm sendo estudadas e desenvolvidas para mitigar os efeitos tóxicos ou até mesmo potencializar terapias convencionais (CAO; NIU, 2020).

Indivíduos afetados por tumores triplo-negativos tendem a apresentar pior prognóstico quando comparados a outras categorias de neoplasias mamárias (MALORNI *et al.*, 2012). Isso se deve a expressões não detectáveis de ER, PR e HER2, pois, quando as células tumorais apresentam biópsias PR+ e ER+, são passíveis de tratamento com bloqueadores hormonais, assim como tumores ER-, mas PR+. Com isso, é possível tratar de forma mais direcionada e específica nesses casos. Quadro que não é aplicável aos TNBC, fazendo com os tratamentos sejam mais invasivos e tóxicos, principalmente realizados com quimioterápicos (PERNAS; TOLANEY, 2019; GOLDBIRSCHE *et al.*, 2011).

Uma célula de linhagem de câncer de mama triplo-negativo (ER-, PR-, HER2-), murino, bastante utilizada na pesquisa, é a célula 4T1 (PIZATO *et al.*, 2019), a qual é classificada como pertencente ao subgrupo glicolítico MSP2 (SIMÕES *et al.*, 2015), o que demonstra que essas células apresentam preferência metabólica pela utilização de glicose (via glicolítica). Ademais, é um modelo amplamente empregado no estudo de tumores primários de mama murinos. A célula 4T1 possui uma grande semelhança com cânceres de mama humanos em estágio IV de desenvolvimento, ao fato de ser bastante tumorigênica e metastática, o que leva a metástase em diversos sítios distantes do tumor primário, como gânglios linfáticos, sangue, fígado, pulmão, cérebro, e osso (AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION, ; PULASKI; OSTRAND-ROSENBERG, 2000).

### 1.3 Ácidos Graxos Poliinsaturados (PUFAs)

Os ácidos graxos de poli-insaturados, chamados de PUFAs, são ácidos graxos que possuem na sua cadeia de hidrocarbonetos, mais de duas ligações duplas. Duas importantes classes desses ácidos são os de ômega-3 (n:3 PUFAs) e ômega-6 (n:6 PUFAs), que possuem a primeira ligação dupla, em relação a grupo metil do final da cadeia carbônica, no terceiro e no sexto carbono, respectivamente. (YAQOOB, 2009). Esses são derivados do ácido linoleico (n:6 LA) e  $\alpha$ -linoleico (n:3 ALA), que podem levar a síntese endógena de diferentes outros PUFAs. O metabolismo de LA leva a formação do ácido araquidônico (n:6 ARA). Já o metabolismo de ALA leva a formação do ácido eicosapentanoico (EPA), que seguido de reações de alongação e dessaturação, leva a formação de ácido docosahexa-

enoico (DHA). Por não serem sintetizados pela via *de novo* da célula, são considerados essenciais e, dessa forma, precisam ser adquiridos pela dieta (MORI, 2017).

As principais fontes dos ácidos graxos de 18 carbonos se dá, majoritariamente, pela ingestão de peixes selvagens de água fria, mamíferos marinhos ou por suplementação a base de óleo de peixe (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2018). Outros alimentos, mais comuns a dieta, como os óleos de soja e de canola, chia e linhaça possuem quantidades significativas (tipicamente <50%) de ácido alfa-linoleico (ALA). Dentre estes, os que possuem maiores efeitos biológicos descritos, são o EPA e o DHA. Todavia a produção desses compostos, de forma endógena, é bastante reduzida em humanos, da mesma forma que, fatores como idade e alterações metabólicas, levam a uma maior redução dessa produção (TROESCH *et al.*, 2020).

Nesse contexto, a incorporação diária na dieta desses lipídeos, pode conduzir a uma elevação das suas concentrações plasmáticas, para que, dessa forma, possam executar suas diversas funções benéficas ao organismo. As ações protetoras envolvendo os n:3 PUFAs e diversas condições patológicas vêm sendo amplamente estudadas. Por exemplo, seu efeito antitumoral testados *in vitro* e *in vivo* (SERRA *et al.*, 2019; TEVAR *et al.*, 2002; JING; WU; LIM, 2013), em doenças cardíacas e síndromes metabólicas (ANIL, 2007; DYALL, 2015; HOLUB, 2009), como também, seus efeitos em estimular o desenvolvimento do sistema neural (CAO *et al.*, 2009) e, também, a sua capacidade neuroprotetora em alguns tipos de infecções, como é o caso de infecção pelo Zika vírus (BRAZ-DE-MELO *et al.*, 2019).

Os mecanismos de ação dos n:3 PUFAs é bastante amplo, de forma que, possuem a capacidade de modular mecanismos moleculares das células. Esses compostos modulam propriedades de dinâmica de membrana, tal como modulam a expressão de genes que atuam na produção de mediadores inflamatórios ativos (RODRÍGUEZ-CRUZ; SERNA, 2017). Tendo como exemplo, a partir do DHA, são produzidas as moléculas anti-inflamatórias resolvinas, protectinas e maresinas, as quais atuam diretamente em processos de resolução da inflamação, assim como são fundamentais para a manutenção da homeostasia celular (ZÁRATE *et al.*, 2017). Uma classe de moléculas derivadas dos PUFAs são os epoxieicosanoides, os quais já foram demonstrados, a partir de estudos pré-clínicos, suas propriedades cardioprotetoras, vasodilatadoras, anti-inflamatórias e anti-alérgicas (SCHUNCK *et al.*, 2018).

Os n:6 PUFAs, como o ARA, também evidenciam importância para o desenvolvimento físico e mental (MASHAVAVE *et al.*, 2016) atuando, também, na modulação da membrana plasmática e expressão gênica (HUERTA-YÉPEZ; TIRADO-RODRIGUEZ; HANKINSON, 2016). Todavia, o consumo desses compostos tem que ser moderada, pois, atuam na modulação de processos inflamatórios, por meio da produção de mediadores pró-inflamatórios (PATTERSON *et al.*, 2012). Dietas ocidentais são mais ricas em carnes vermelhas e ovos, tal como é pobre em carnes brancas e óleos vegetais. Desse modo, a taxa de n:6 PUFAs em relação a n:3 PUFAs é aumentada, favorecendo a competição por

enzimas que são responsáveis pela produção de mediadores inflamatórios, favorecendo um perfil mais pró-inflamatório. Nesse contexto, fica evidente a necessidade de se suplementar com dietas ricas em n:3 PUFAs para que os valores dessa taxa fiquem mais próximos (HUERTA-YÉPEZ; TIRADO-RODRIGUEZ; HANKINSON, 2016).

Outra forma de atuação dos n:3 PUFAs é a partir da modulação metabólica de células do tecido adiposo. Diversos mecanismos estão diretamente ligados a esse processo, dentre eles, o DHA e o EPA demonstraram a capacidade de ativar a proteína quinase ativada por AMP (AMPK) a promover a  $\beta$ -oxidação do tecido adiposo. Tal qual, foi capaz de prevenir a lipogênese hepática dependente de AMPK e do fator de transcrição regulados do metabolismo de glicose e de lipídeos, PPAR $\alpha$  (SIRIWARDHANA *et al.*, 2013). Por último, Chang *et al.* (2015) evidenciou o papel dos n:3 PUFAs, juntamente ao fator de transcrição PPAR $\gamma$ , na polarização de macrófagos M2 e a diminuição da inflamação.

O tecido adiposo é um dos que sofre maiores influências advindas dos PUFAs. Isso se deve ao seu papel como principal reserva de ácidos graxos no organismo (HAMES *et al.*, 2015). Os n:3 PUFAs estão envolvidos em vias celulares, que levam a hiperplasia e hipertrofia adipocitária, no qual são capazes de mitigar esses processos. Tal como, atuam na diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos maduros (SIMOPOULOS, 2016). Para mais, levam a um aumento do metabolismo energético, por meio da estimulação da biogênese mitocondrial (HENSLENER *et al.*, 2011).

Nesse contexto, a melhora de parâmetros inflamatórios está diretamente ligada a algumas ações no perfil de expressão de adipocinas, como a adiponectina, a qual desempenha um papel anti-inflamatório, a uma inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias produzidas a partir do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, como IL-6, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), proteína-1 quimioatraente de monócitos (MCP-1) e o inibidor do ativador do plasminogênio 1 (PAI-1) (NESCHEN *et al.*, 2006). Outras moléculas de caráter pró-inflamatório secretadas pelos adipócitos, são as prostaglandinas e eicosanóides. No entanto, a síntese dessas moléculas é diminuída quando se tem maiores concentrações de EPA, por exemplo. Dessa forma, EPA compete com o ácido araquidônico pela incorporação nas membranas celulares, assim como, para substrato da produção de eicosanóides a partir do ARA (WORTMAN *et al.*, 2009).

### 1.3.1 Ácido docosahexaenoico (DHA)

O DHA é uma molécula bastante flexível e pode atuar afetando propriedades físicas das membranas celulares, como fluidez, flexibilidade e espessura (HISHIKAWA *et al.*, 2017). Como já dito, é sintetizada por meio de uma série de reações enzimáticas a partir do EPA (CALDER, 2017). Esse ácido graxo essencial ômega-3 é encontrado principalmente em peixes marinhos selvagens (YAMAGATA, 2017). Os metabólitos gerados a partir dele são principalmente mediadores pró-resolução derivados de DHA, epóxidos de DHA, neuro-

prostanos, etanolaminas e acilglicerois. Esses compostos desempenham diversas funções no organismo, tais como, aumento do consumo energético, indução do catabolismo lipídico, modulação da resposta imune, resolução inflamatória, assim como atua no reparo e regeneração tecidual (KUDA, 2017).

O consumo de DHA já é relacionado na literatura científica como fator central na manutenção da função neural, sendo relacionado a saúde cerebral e a melhora de condições associadas ao sistema nervoso central, principalmente durante o desenvolvimento embrionário (SUN *et al.*, 2018). Também está relacionado a diminuição do risco de desenvolvimento da doença de Alzheimer (YASSINE *et al.*, 2017), tal e qual desordens, como depressão, bipolaridade, doença de Parkinson e Esclerose Amiotrófica Lateral (ZÁRATE *et al.*, 2017). Uma das moléculas produzidas a partir do DHA, a neuroprotectina D-1, atua na proteção do cérebro contra doenças neurodegenerativas e envelhecimento (ECHEVERRÍA *et al.*, 2017).

Além das suas ações centrais no sistema nervoso, o consumo de DHA está associado a diminuição do risco de diversas doenças, como alguns tipos de tumores (SLAGSVOLD *et al.*, 2010). Assim como, demonstrou atividade potencializadora de quimioterapias (MERENDINO *et al.*, 2013), como também, atua de forma protetora contra os efeitos adversos advindos dessa terapia (FREITAS; CAMPOS, 2019). Isso se deve as suas propriedades anti-proliferativas, pró-apoptóticas, anti-angiogênicas e anti-metastáticas, podendo ser utilizado como eficiente adjuvante em tratamentos quimioterápicos (MERENDINO *et al.*, 2013).

## 2 Justificativa

Tendo em vista os efeitos benéficos da suplementação com ômega 3 DHA em diversas patologias, principalmente em decorrência da modulação exercida sobre o metabolismo lipídico e sobre a inflamação. Assim como, devido às suas ações anti-tumorais, tais como, protetor contra o desenvolvimento de neoplasias, inibição do crescimento tumoral, da angiogênese e da formação de metástases, além do arrefecimento de sintomas dessa patologia e efeitos adversos da quimioterapia, radioterapia e cirurgia. Esse papel do DHA em processos de carcinogênese ainda não é consensual, demonstrando papéis duais. Essa dualidade pode depender do tipo de câncer, do tecido de origem, do estágio de desenvolvimento tumoral e dose utilizada. Dessa forma, fica evidente a necessidade de estudos que explorem as possíveis ações diferenciais das doses de DHA em condições patológicas ou não. Ademais, o papel que essa suplementação pode exercer sobre o metabolismo tumoral e mamário, tal qual, se essas alterações têm alguma influência das doses diferenciais é bastante escassa na literatura e se faz necessária a investigação.



### 3 Objetivo

Avaliar os efeitos da suplementação com Ômega-3 (DHA), por duas doses diferentes, sobre parâmetros carcinogênicos, perfil metabólico e inflamatório em camundongos com câncer de mama triplo-negativo.

#### 3.1 Objetivos específicos

- Avaliar a influência das doses no comportamento e em alterações clínicas dos animais;
- Avaliar o papel das doses na modulação de parâmetros bioquímicos, hematológicos e inflamatórios sistêmicos;
- Avaliar a modulação das doses no peso e nas alterações morfológicas teciduais do fígado e do baço dos animais tratados;
- Averiguar a influência das doses suplementadas na alteração morfológica dos tecidos adiposos branco subcutâneo e marrom, no peso e no perfil inflamatório desses tecidos;
- Avaliar a presença de metástase no pulmão, nos linfonodos e alterações morfológicas do intestino;
- Verificar se as doses de DHA influenciam no volume tumoral, na morfologia do tecido tumoral, na modulação do perfil inflamatório e na alteração do perfil metabólico do câncer de mama triplo-negativo 4T1 e da mama.

## 4 Materiais e Métodos

### 4.1 Delineamento Experimental

Foram utilizados camundongos fêmeas (N=60), os quais foram divididos em dois grandes grupos, saudáveis e com câncer (N=30), dos quais foram subdivididos em 6 diferentes grupos experimentais (N=10) (Tabela 1). Sendo eles, animais com e sem câncer suplementados com água filtrada, com DHA na dose de 500mg/Kg e 2g/kg (citar a tabela). Os animais foram suplementados diariamente, por via oral (pipeta), durante 60 dias. No dia 30 de suplementação, as células 4T1 foram inoculadas na mama. A eutanásia foi realizada no 60º dia de suplementação, seguida da coleta e análise de sangue e excisão dos órgãos. A avaliação para a aplicação do ponto final humanitário foi realizada a partir de alguns critérios. Primeiramente, avaliando a perda de peso dos animais, que não poderá exceder a taxa de 20%, que será utilizado como um dos parâmetros para caquexia. Assim como a massa tumoral, que não poderá exceder em 15% o peso do animal, assim como parâmetros comportamentais explicitados na seção 4.5 (WORKMAN *et al.*, 2010).

**Tabela 1 – Especificação dos grupos experimentais, suas siglas representativas e N amostral.**

<b>Grupos experimentais</b>	<b>Sigla</b>	<b>N amostral</b>
Animais saudáveis suplementados com água filtrada	HC	10
Animais saudáveis suplementados com DHA500 mg/Kg	HLD	10
Animais saudáveis suplementados com DHA 2 g/Kg	HHD	10
Animais com câncersuplementados com água filtrada	CC	10
Animais com câncersuplementados comDHA500 mg/Kg	CLD	10
Animais com câncersuplementados comDHA 2 g/Kg	CHD	10



**Figura 9** – Linha do tempo evidenciando os passos experimentais da suplementação. Passo 1: Início da suplementação de todos os animais com duas doses de DHA e água filtrada. Passo 2: Cultivo de células da linhagem 4T1 em meio RPMI com 10% de Soro Fetal Bovino. Passo 3: Inoculação das células 4T1 na quantidade de  $1 \times 10^5$ . Passo 4: Fim da suplementação e eutanásia dos animais para coleta das amostras e órgãos para análise. Passo 5: Análise e processamento dos dados adquiridos.

## 4.2 Linhagem Celular e Modelo Tumoral

Células de câncer de mama triplo-negativo murino 4T1 (número da ATCC: CRL-2539) foram cultivadas em meio RPMI (GIBCO) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (GIBCO) e 1% de penicilina/estreptomicina. O cultivo foi realizado em estufa úmida a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. As células tumorais foram implantadas por via ortotópica no ducto da quinta glândula mamária dos animais (ROMERO *et al.*, 2019), na concentração de  $1 \times 10^5$  células, contadas em câmara de Neubauer (ANDRADE *et al.*, 2020). Para a inoculação do tumor, os animais foram anestesiados com uma solução de xilazina (10 mg/kg) + quetamina (80 mg/kg). Os animais que não foram inoculados com as células 4T1, foram inoculados com solução de 'Phosphate-buffered saline' (PBS) para mimetizar os estresses sofridos durante o procedimento.

### 4.3 Modelo Animal

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem Balb/C selvagens, entre 8-12 semanas de vida, fornecidos pelo biotério do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal do Goiás (UFG). Os animais foram mantidos a  $23 \pm 1$  °C, em ciclos de luz claro/escuro de 12 horas e com acesso à água e ração 'ad libitum'. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (UnB).

### 4.4 Ácido Docosahexaenoico (DHA)

Foi utilizado para a suplementação dos animais cápsulas de ômega-3 à base de óleo de peixe, 50% DHA: 10% de EPA adquirido comercialmente. É extraído através de processo de alta tecnologia onde se isenta de impurezas e metais pesados, certificado pelo Programa Internacional de Padrões de Óleo de Peixe (IFOS™). As doses foram estabelecidas usando como base diversos estudos que exploraram o potencial de ômega-3 rico em DHA e EPA em mitigar o desenvolvimento de tumores. Fasano *et al.* (2017) compararam diversos trabalhos, os quais se utilizaram de diferentes doses, que vão desde 0,2 g/Kg até 16 g/kg de DHA+EPA, em modelos murinos de câncer de mama e próstata, evidenciando que há efeitos distintos dependendo da dose. Nesse contexto, geralmente doses mais altas, demonstram maiores efeitos antitumorais. Dessa forma, foram escolhidas duas doses, uma baixa 0,5 g/Kg e uma alta 2 g/kg, para avaliar os efeitos dessas em diversos parâmetros relacionados ao desenvolvimento tumoral.

### 4.5 Observações Clínicas e Aferição do Peso dos Animais

Foram observadas, ao longo do experimento, a atividade motora e comportamento dos animais, se estariam demonstrando uma atividade similar a observada inicialmente no seu ambiente. Assim como, foi observado se os animais estão com a postura curvada, e imóveis na gaiola. Também, foram avaliados individualmente, por inteiro, para examinar os olhos, focinho, boca, orelhas, vibrissas, a superfície corporal e a coloração de suas patas, cauda e orelhas. Por último, foi avaliada a condição da pelagem. Essas análises foram realizadas e registradas em tabela de pontuação para auxiliar na quantificação do bem-estar animal (Tabela 2). A avaliação clínica, conjuntamente, foi realizada por meio de alguns parâmetros como perda de peso, diarreia e inapetência. (WHITEHEAD *et al.*, 2014; PAULO; (CEUA), 2020).

**Tabela 2 – Tabela utilizada como base para avaliar parâmetros motores, comportamentais, condições corporais. Fonte: Paulo e (CEUA) (2020)**

Parâmetro	Escore			
	1	2	3	4
<b>Comportamento espontâneo</b>	Andando, correndo, comendo, bebendo	Grau intermediário	Grau intermediário	Imóvel, inativo, prostrado
<b>Postura</b>	Postura normal parado ou em movimento	Grau intermediário	Grau intermediário	Curvado, agachado, deitado
<b>Respiração</b>	Movimentos regulares e confortáveis	Grau intermediário	Grau intermediário	Movimentos irregulares, respiração forçada
<b>Condição da pelagem</b>	Limpa e brilhante	Grau intermediário	Grau intermediário	Suja, despenteada, piloereção
<b>Olhos</b>	Limpo, brilhante, aberto	Grau intermediário	Grau intermediário	Fechados, presença de secreção, opaco
<b>Condição corporal</b>	Boa cobertura muscular	Grau intermediário	Grau intermediário	Emagrecido, Flancos murchos, abdômen distendido
<b>Total Geral</b>				

#### 4.6 Análises Histopatológicas e Peso dos Órgãos

Foram coletadas amostras de tumor, linfonodos, mamas, pulmão, baço, fígado, rins, tecido adiposo branco visceral (vWAT) e subcutâneo (sWAT), tecido adiposo marrom (BAT), sessão do intestino. Após a excisão, os tecidos adiposos, o fígado e o baço foram pesados. Os órgãos foram fixados em paraformaldeído 4%, desidratados em soluções alcoólicas, diafanizados em xilol e emblocados em parafina. Foram feitos cortes microscópicos entre 8 e 12 micrômetros, corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE). As análises histopatológicas foram realizadas utilizando-se de microscópio óptico Olympus BX51.

#### 4.7 Dosagem de Parâmetros Inflamatórios

Após a excisão, os tecidos adiposos (sWAT, BAT), as mamas e os tumores foram congelados em nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>). Posteriormente, para extração de proteína, foram retiradas e pesadas porções desses órgãos (54±24g), por conseguinte, foi adicionada a solução de tampão de extração (KCl:0,66 g /Tris: 0,061 g /EDTA: 0,037 g /H<sub>2</sub>O q.s.p 50 ml /pH 7.5) na proporção de 9 ml/g de tecido. Conjuntamente, foi adicionado inibidor de protease (Sigma Aldrich) 50 µl/g de tecido, seguida da maceração do tecido. Por último, as amostras foram centrifugadas a 4°C, 10 000 G, por 15 minutos e o sobrenadante foi coletado e utilizado para as dosagens. Foram dosadas as citocinas IL-1β (Catalog No.: DY401), IL-6

(Catalog No.: DY406), IL-33 (Catalog No.: DY3626), TGF- $\beta$  (Ref. Number: 14-8352-68) e TNF- $\alpha$  (Catalog No.: DY410), assim como, a quimiocina MCP1 (Catalog No.: DY479), utilizando-se 'kits' de ensaio de ELISA comerciais para camundongo (R&D/eBioscience). As instruções do fabricante foram seguidas e os níveis de citocinas foram apresentados em níveis absolutos (pg/mL).

## 4.8 Coletas e Análises de Sangue

Os animais tratados e não tratados foram anestesiados com solução de xilazina e quetamina, como descrita no tópico 4.2, no dia da eutanásia para coleta de sangue por punção cardíaca. Do volume total da amostra, foram utilizados 100 $\mu$ L de sangue para análises hematológicas e 900 $\mu$ L para as análises com o soro.

### 4.8.1 Análises Hematológicas

Para avaliar possíveis processos inflamatórios, alérgicos e anêmicos decorrentes da suplementação, as amostras de sangue foram armazenadas em tubos 10% EDTA K3 MiniCollect® 0,25 ml K3E e processadas no Analisador Automático de Hematologia Sysmex pochH-100i™ Diff (Sysmex) (Curitiba / Paraná, Brasil) calibrado para camundongos. Foram avaliados os seguintes parâmetros hematológicos: eritrograma, leucograma e série plaquetária.

### 4.8.2 Análises Bioquímicas

Para avaliar a função hepática, renal, perfil lipídico e estado nutricional após a suplementação dos animais, 900  $\mu$ L de sangue foram obtidos por punção cardíaca, em tubo com gel separador MiniCollect® Z Serum Sep, que, posteriormente foi centrifugado a 1100 G por 10 min, seguido da coleta do soro. A análise foi feita em um analisador bioquímico automático Chemwell-t (Labtest, Brasil), conforme orientações do fabricante. Foram realizados os seguintes exames: Alanina aminotransferase (ALT) e Aspartato aminotransferase (AST) e Albumina para avaliação da função hepática, creatinina K, ureia para avaliação renal e Colesterol, Triglicerídios, lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de alta densidade (HDL) para avaliar o perfil lipídico.

### 4.8.3 Dosagem de Citocinas do Soro

De modo a se verificar se as diferentes condições experimentais influenciaram o perfil de citocinas presentes no soro dos animais, foram dosadas a IL-1 $\beta$  e TGF- $\beta$ , utilizando-se 'kits' comerciais para ensaio de ELISA (R&D). As instruções do fabricante foram seguidas e os níveis de citocinas foram apresentados em níveis absolutos (pg/mL).

## 4.9 Análises do Tumor e Mama

### 4.9.1 Volume Tumoral

Os tumores foram medidos (comprimento e largura) com paquímetro digital *stainless hardened*® em dias alternados até o dia da eutanásia. Para calcular o volume tumoral, o comprimento e a largura da massa do tumor foram utilizados seguindo a fórmula  $V = \frac{W^2 * L}{2}$  descrita por Faustino-Rocha *et al.* (2013). Sendo que V é o volume, W é a largura do tumor e L é o comprimento.

### 4.9.2 Análises de Perfil Metabólico Tumoral por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)

Para avaliar a alteração do perfil metabólico global da mama e do tumor dos animais suplementados com as duas doses de DHA, os tecidos foram excisados e congelados em N<sub>2</sub> e então armazenados a uma temperatura de -80 °C (N=6). Por conseguinte, foram pesados e seccionados em porções entre 18-22 mg de tecido. Posteriormente, foi adicionado 1ml da solução de extração (Isopropanol/Acetonitrila/Água (3/3/2)). As amostras, assim, foram homogenizadas e centrifugadas por 10 minutos a 10 000G. O sobrenadante foi coletado e transferido para um microtubo, seguido da adição de ribitol 0,2 g/ml, no volume 60µL, e da secagem realizada em um 'speed-vac', a 30°C. O extrato seco, então, foi ressuspensão em solução Acetonitrila:Água (1/1). Alíquotas de 200 µL foram então transferidas a outro tubo e foi adicionado 40µL de Metoxamina Hidroclorido 20 mg/ml em piridina, seguida da agitação orbital por 2h a 37°C. Após esse processo, foi adicionado N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA) e agitada em orbital por 30 min, a 37°C. Por último, uma alíquota de 100µL foi transferida para tubo de vidro de análise (BUDCZIES *et al.*, 2012) para espectrometria de massa por cromatografia em fase gasosa (CG-EM) com analisador quadrupolo (Agilent 7890-5975), equipado com uma coluna HP5-MS 30m (Agilent) e com coleta de cerca de 2,5 'scans'/segundo. A temperatura inicial de injeção foi 70 °C, durante 5 minutos, e foi aumentada para 350 °C a uma taxa de 5 °C.min<sup>-1</sup>, depois, foi imediatamente reduzida a 330 °C e foi mantida essa temperatura durante 5 minutos. Os espectros gerados foram identificados a partir do banco de dados do 'National Institute of Standards and Technology' (NIST), e foram selecionadas as que possuíam fator qualitativo

>70. Os dados foram normalizados pela massa de tecido utilizada e transformados por  $\log_2$ . Seguido da avaliação da normalidade e aplicação do teste estatístico mais recomendado para cada caso. Foram consideradas diferenças significativas com  $p \leq 0.05$  (Seção 4.10). As análises foram realizadas nos 'softwares' MetaboAnalyst 5.0, Vanted 2.8.2 e GraphPadPrism v.9.0.0.

#### **4.10 Análises Estatísticas**

A análise estatística dos dados foi realizada com a utilização do programa GraphPad-Prism v.9.0.0. A normalidade das variáveis contínuas foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Diferenças entre os grupos analisados foram investigadas através de ANOVA (para dados que seguirem a distribuição normal) ou Kruskal-Wallis (no caso de não haver distribuição normal), seguido do pós teste indicado para cada situação (Tukey ou Dunn's). Os grupos foram comparados simultaneamente para identificação de diferenças significativas representativas.

Para escolha do N amostral, segundo Moore et al. (2016) e Wang et al. (2018) é necessário um tamanho amostral de 10 animais para validações estatísticas de análises de composição da microbiota intestinal, que foi um dos objetivos do projeto. A avaliação de alteração da composição da microbiota não foi finalizada até a publicação desse documento. Além disso, esse número assegura as possíveis perdas de animais em decorrência dos procedimentos experimentais ou possíveis estresses, como também a caquexia decorrente do câncer (Hain et al. 2019, Wilson et. al. 2020).



## 5 Resultados e Discussão

### 5.1 Resultados

#### 5.1.1 Observações Clínicas e Aferição do Peso dos Animais

Os animais suplementados, HHD e CHD, apresentaram diarreia nas seis primeiras semanas, caso que foi contornado após esse período e que não foi observado nos grupos HLD e CLD (Figura 10). Além disso, apresentaram resistência em tomar a suplementação a partir da segunda semana. Não foram observadas alterações na atividade motora e no comportamento, como, por exemplo, postura curvada, imobilidade na gaiola e inapetência. Assim como, não apresentaram nenhuma modificação nos olhos, no focinho, na boca, nas orelhas, nas vibrissas, na superfície corporal e na coloração de suas patas e cauda. Tendo em vista o peso dos animais durante a suplementação, houve uma redução do peso dos animais do grupo HHD em comparação ao grupo HLD e, também, redução do peso do grupo CLD em comparação ao CC.

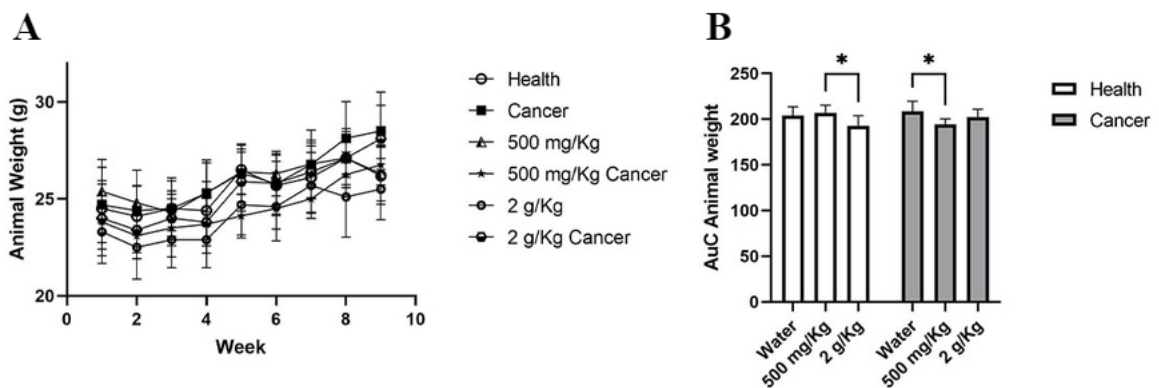


Figura 10 – Peso dos animais (g). (A) Peso dos animais no decorrer da suplementação medido semanalmente. (B) Área sobre a curva (AuC) do peso dos animais do gráfico A. \*  $p < 0,05$ .

#### 5.1.2 Análises de Parâmetros do Sangue e do Soro

##### 5.1.2.1 Análises Hematológicas

###### 5.1.2.1.1 Eritrograma

A análise do eritrograma evidenciou um aumento do número de Hemácias (RBC) e da porcentagem de Hemácias no volume de sangue total (HCT) no grupo HHD em relação

ao HC, o que não ocorreu nos grupos dose baixa. Assim como, um aumento do volume das hemácias (MCV) e da quantidade média de hemoglobina contida num glóbulo vermelho (MCH) no grupo CHD em relação ao HHD. Foi, também, observada uma diminuição de MCH e da concentração média de hemoglobina corpuscular presentes na hemácia (MCHC) no grupo HLD, comparado as HC. Por último, foi observado um aumento da largura de distribuição de glóbulos vermelhos como coeficiente de variação (RDW-CV) nos grupos HHD e CC em relação aos grupo HC e da largura de distribuição de glóbulos vermelhos como desvio padrão (RDW-SD) dos grupos com câncer comparado aos seus respectivos controles sem câncer (Tabela 3).

**Tabela 3 – Análises hematológicas (Eritrograma). Os dados foram expressos como média ± desvio padrão. Os asteriscos seguidos pela sigla de cada grupo evidenciam as diferenças significativas entre eles. \* p <0,05; \*\* p <0,01. RBC - glóbulos vermelhos; HGB-Hemoglobina; HCT-Hematócrito; VCM - volume corpuscular médio; Hemoglobina corpuscular média; MCHC - Concentração média de hemoglobina corpuscular; RDW-CV - Largura de distribuição de glóbulos vermelhos como coeficiente de variação; RDW-SD - Largura de distribuição de glóbulos vermelhos como desvio padrão. HC: Controle saudável; CC: Controle câncer; HLD: Saudável dose baixa; CLD: Câncer dose baixa; HHD: Saudável dose alta; CHD: Câncer dose alta.**

Treatment Groups	RBC ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	HGB (g/dL)	HCT (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	RDW-CV (%)	RDW-SD (%)
HC	9,926± 0,4502	15,36± 0,7531	38,19± 1,793	38,47± 0,4001	15,48± 0,4341	40,23± 0,9214	17,88± 0,4022	30,21± 0,5915
CC	9,785± 0,2672	14,94± 0,2875	38,15± 1,078	38,98± 0,4301	15,28± 0,2252	39,15± 0,5880	<b>19,38±</b> <b>0,3454<sup>HC</sup></b>	<b>33,79±</b> <b>0,4824<sup>HC</sup></b>
HLD	10,45± 0,2067	15,64± 0,4551	40,20± 1,151	38,47± 0,5122	<b>14,96±</b> <b>0,2271<sup>HC</sup></b>	<b>38,91±</b> <b>0,4557<sup>HC</sup></b>	18,50± 0,2539	30,94± 0,5777
CLD	10,17± 0,4929	15,39± 0,7492	39,68± 1,995	39,04± 0,3926	15,13± 0,2053	38,80± 0,4140	<b>20,06±</b> <b>0,4207<sup>HDL</sup></b>	<b>34,25±</b> <b>0,614<sup>HDL</sup></b>
HHD	<b>11,01±</b> <b>0,885<sup>HC</sup></b>	16,61± 1,346	<b>42,48±</b> <b>3,215<sup>HC</sup></b>	38,47± 0,5122	15,08± 0,2394	39,09± 0,5043	<b>19,24±</b> <b>0,3609<sup>HC</sup></b>	31,88± 0,5633
CHD	10,02± 0,6726	15,54± 1,111	39,34± 2,607	<b>39,27±</b> <b>0,2312<sup>HHD</sup></b>	<b>15,51±</b> <b>0,1853<sup>HHD</sup></b>	39,49± 0,4999	20,22± 0,6088	<b>34,87±</b> <b>0,5638<sup>HHD</sup></b>
P-value	0,0007	0,0205	0,0016	<0,0001	0,0002	0,2209	<0,0001	<0,0001

## 5.1.2.1.2 Leucograma e Plaquetograma

A análise do leucograma mostrou um aumento de leucócitos (WBC), principalmente causada pela presença de tumor, evidenciado nos grupos CC e CLD, em relação a HC e HLD respectivamente. Fato que não ocorreu no grupo CHD. Já nas taxas de células pequenas (W-SCR) e grandes (W-LCR), na contagem absoluta de células grandes (W-LCC), houve um aumento dos grupos com câncer comparado aos seus respectivos controles sem câncer. Já em relação ao taxa de células médias (W-MCR), houve um aumento do grupo CC em relação a HC e do grupo CHD em relação a HHD. Em relação a contagem absoluta de células pequenas (W-SCC) e médias (W-MCC) ficou evidente o aumento nos grupos CLD comparado a HLD e CC comparado a HC. Por fim, não foram observadas alterações no número de plaquetas (PLT) (Tabela 4).

**Tabela 4 – Análises hematológicas (leucograma e plaquetograma). Os dados estão expressos como média ± desvio padrão. Os asteriscos seguidos pela sigla de cada grupo evidenciam as diferenças significativas entre eles. \* p <0,05; \*\* p <0,01; \*\*\* p <0,001. WBC- Leucócito total; W-SCR - taxa de células pequenas (linfócitos); W-MCR – Taxa células médias (basófilos, eosinófilos e neutrófilos); W-LCR- Taxa de células grandes (monócitos); W-SCC - Contagem absoluta de células pequenas (linfócitos); W-MCC - Contagem absoluta de células médias (basófilos, eosinófilos e monócitos); W-LCC - Contagem absoluta de células grandes (neu-trófilos); PLT - Plaquetas. HC: Controle saudável; CC: Controle câncer; HLD: Saudável dose baixa; CLD: Câncer dose baixa; HHD: Saudável dose alta; CHD: Câncer dose alta.**

Treatment Groups	WBC ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	W-SCR (%)	W-MCR (%)	W-LCR (%)	W-SCC ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	W-LCC ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	W-MCC ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	PLT ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	MPV (fl.)
HC	6,080± 2,277	70,84± 3,095	28,25± 2,902	0,9100± 0,6641	4,000± 2,189	0,04000± 0,05164	1,680± 0,4756	942,3± 168,8	7,630± 0,2584
CC	<b>63,75±</b> <b>22,21<sup>***HC</sup></b>	<b>21,49±</b> <b>5,122<sup>***HC</sup></b>	<b>70,30±</b> <b>4,605<sup>***HC</sup></b>	<b>8,213±</b> <b>2,019<sup>HC</sup></b>	<b>12,98±</b> <b>3,092<sup>***HC</sup></b>	<b>5,463±</b> <b>2,755<sup>HC</sup></b>	<b>45,38±</b> <b>17,78<sup>***HC</sup></b>	956,1± 172,7	<b>8,250±</b> <b>0,2563<sup>***HC</sup></b>
HLD	6,840± 2,978	70,40± 3,971	29,00± 3,916	0,6000± 0,5637	5,100± 2,373	0,05000± 0,07071	1,890± 0,5567	1004± 178,9	7,650± 0,3295
CLD	<b>74,01±</b> <b>22,81<sup>***HLD</sup></b>	<b>24,09±</b> <b>5,122<sup>HLD</sup></b>	66,39± 2,262	<b>9,525±</b> <b>3,091<sup>***HLD</sup></b>	<b>17,04±</b> <b>3,966<sup>***HLD</sup></b>	<b>7,588±</b> <b>4,570<sup>***HLD</sup></b>	<b>49,39±</b> <b>16,41<sup>***HL</sup></b>	994,3± 69,5	<b>8,357±</b> <b>0,2440<sup>***HLD</sup></b>
HHD	7,090± 2,344	67,84± 4,847	29,56± 2,117	2,600± 2,966	4,740± 1,407	0,2100± 0,2767	2,140± 0,7877	797,2± 315,9	<b>8,367±</b> <b>0,1528<sup>***HCLD</sup></b>
CHD	37,23± 15,82	<b>20,69±</b> <b>3,432<sup>***HHD</sup></b>	<b>69,73±</b> <b>2,546<sup>***HHD</sup></b>	<b>9,240±</b> <b>1,854<sup>***HHD</sup></b>	7,390± 2,479	<b>3,820±</b> <b>2,295<sup>HHD</sup></b>	26,02± 11,27	605,2± 304,8	8,367± 0,1528
P-value	0.7660	<0,00S01	<0,0001	0.8557	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0.0101	<0,0001

### 5.1.2.2 Análises Bioquímica

#### 5.1.2.2.1 Função Renal

Em relação aos testes bioquímicos de parâmetros da função renal, não houve alterações significativas entre os grupos analisados. Fato que, evidencia a não toxicidade das doses de DHA administradas (Figura 11).

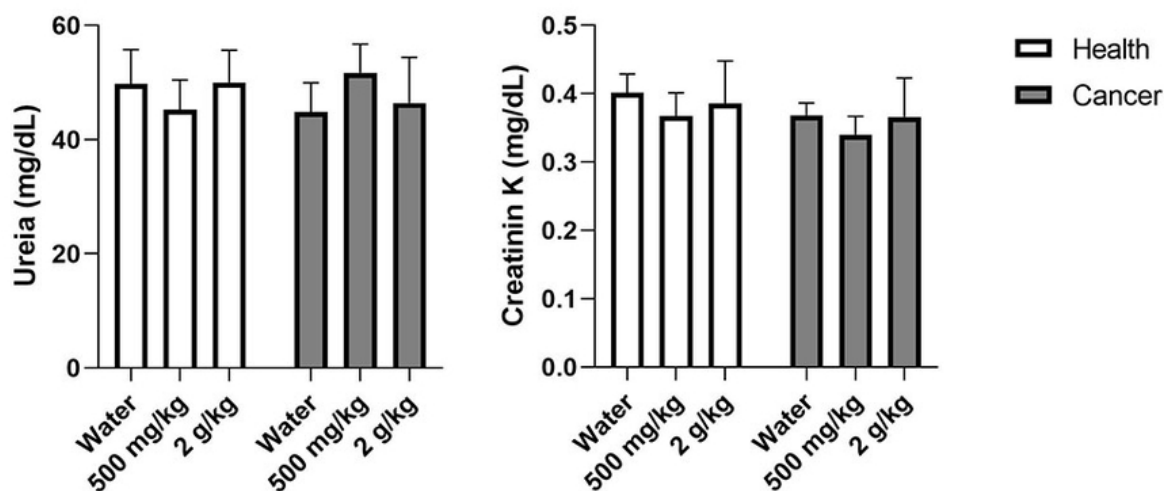


Figura 11 – Parâmetro bioquímicos séricos renais.

#### 5.1.2.2.2 Lipidograma

Tendo em vista que a suplementação com DHA é categorizada como uma dieta com alto teor lipídico e capaz de alterar o metabolismo de gordura, foi avaliado se as diferentes concentrações administradas poderiam modular sistemicamente o perfil e/ou metabolismo lipídico dos animais. Nesse sentido, foi observada uma diminuição dos níveis plasmáticos de triglicerídeos no grupo HHD em relação ao HC, fato não observado na dose baixa. Ficou evidente uma diminuição de colesterol e HDL no grupo CHD em relação ao HHD e diminuição de HDL no grupo CC em relação a HC (Figura 12).

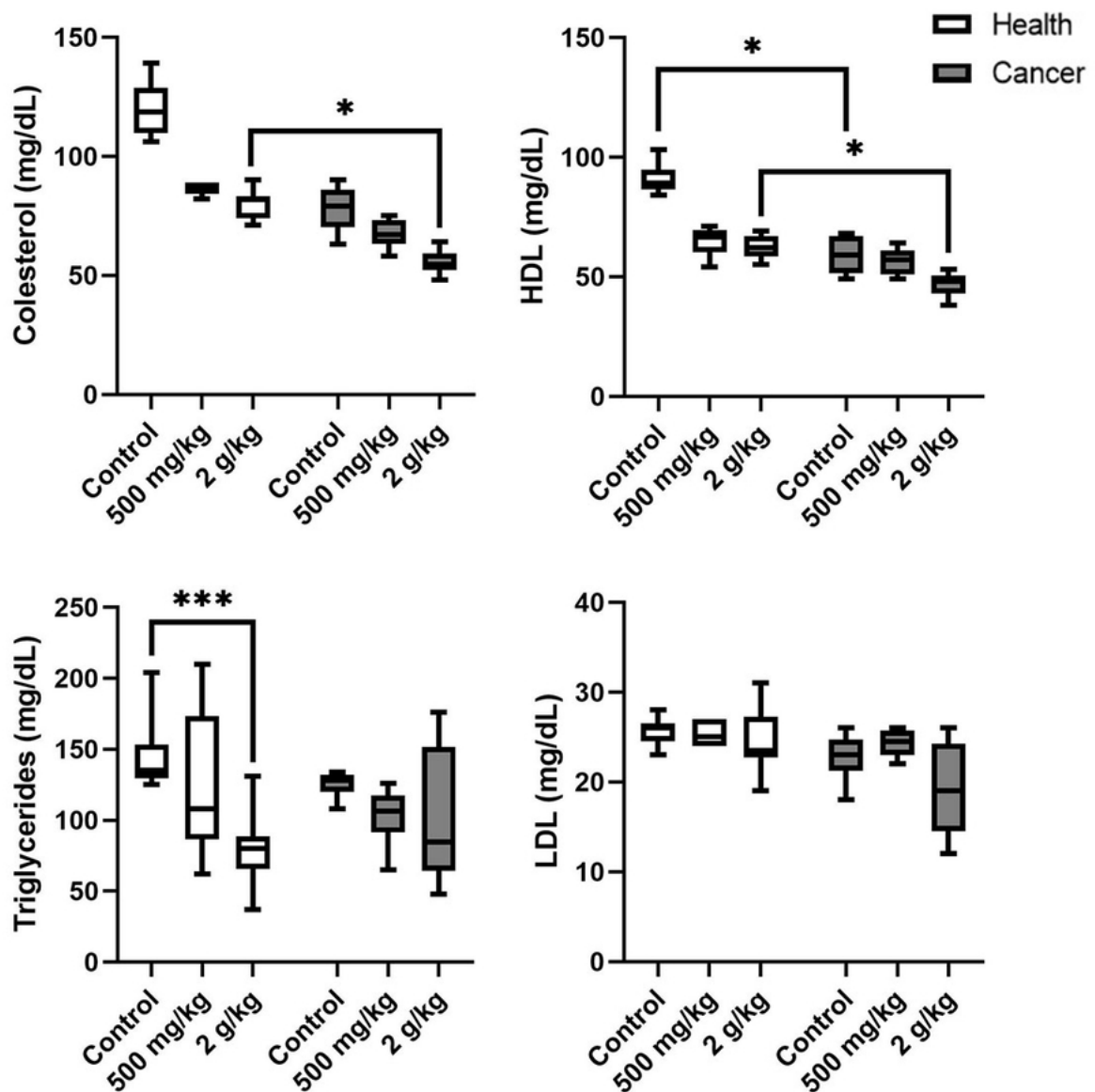


Figura 12 – Perfil lipídico sistêmico. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . HDL - Lipoproteína de alta densidade; LDL - Lipoproteína de baixa densidade.

### 5.1.2.3 Análise de Citocinas do Soro

A inflamação é um parâmetro que atua de forma dual na carcinogênese e progressão tumoral. A depender das particularidades dos mecanismos de estabelecimento e evasão imune de cada tipo de tumor, o balanço inflamatório pode promover um microambiente anti ou pró-tumorigênico. A linhagem celular 4T1 é um tumor inflamatório que se beneficia do aumento do recrutamento de células imunes, bem como da produção de citocinas pró-inflamatórias para sua progressão. Considerando as informações acima, fez-se necessária a avaliação do impacto da suplementação com DHA no perfil inflamatório sistêmico de animais com ou sem câncer. De forma geral, foi observado uma diminuição dos níveis séricos da citocina pró-inflamatória  $1L-\beta$  nos animais do grupo CHD em comparação aos do

grupos HLD e HHD. Em contrapartida, não foi observada alterações significativas dos níveis séricos da citocina anti-inflamatória TGF- $\beta$  entre os grupos (Figura 13).

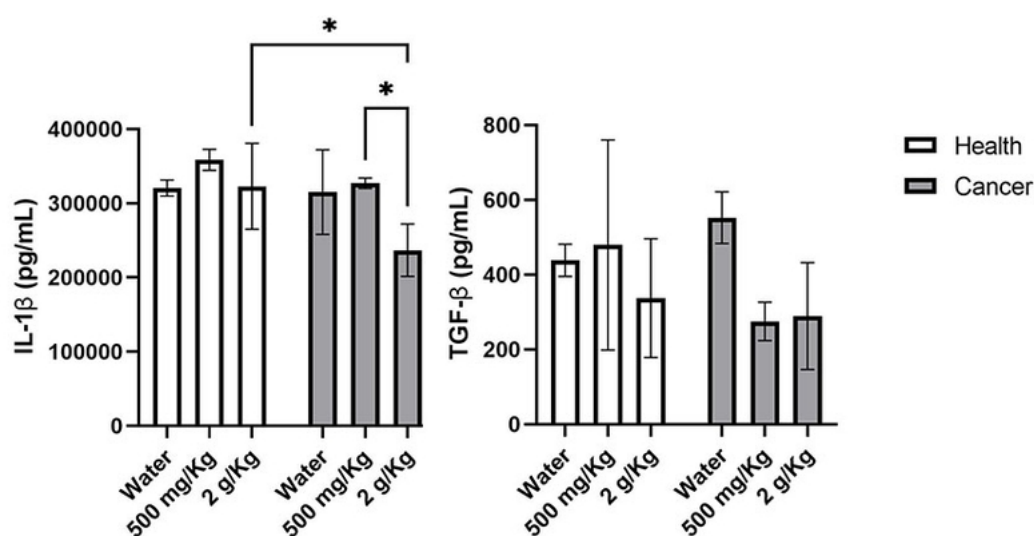


Figura 13 – Análises de citocinas sistêmicas. Dosagem realizada por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). \*  $p < 0,05$ . 1L- $\beta$  - Interleucina 1 $\beta$ ; TGF- $\beta$  - Fator de transformação do crescimento  $\beta$ .

### 5.1.3 Análises do Fígado

O risco de alterações hepáticas é um dos principais fatores considerados quando se avalia o impacto das diferentes dietas hiper lipídicas, o que inclui dietas ricas ômega-3.

#### 5.1.3.1 Peso

Dentre os parâmetros morfológicos analisados, foi avaliado o impacto da suplementação com DHA no peso do fígado dos animais. Foi observado uma redução do peso hepático do grupo HHD em comparação ao HC e CHD (Figura 14).

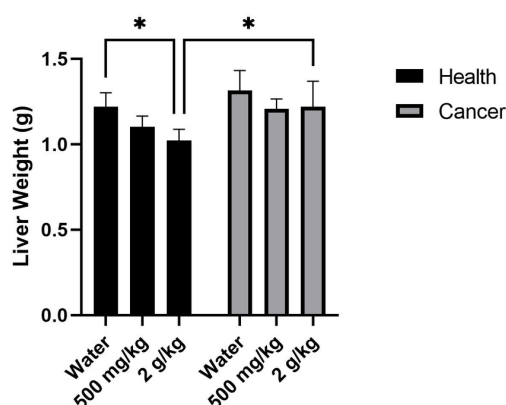
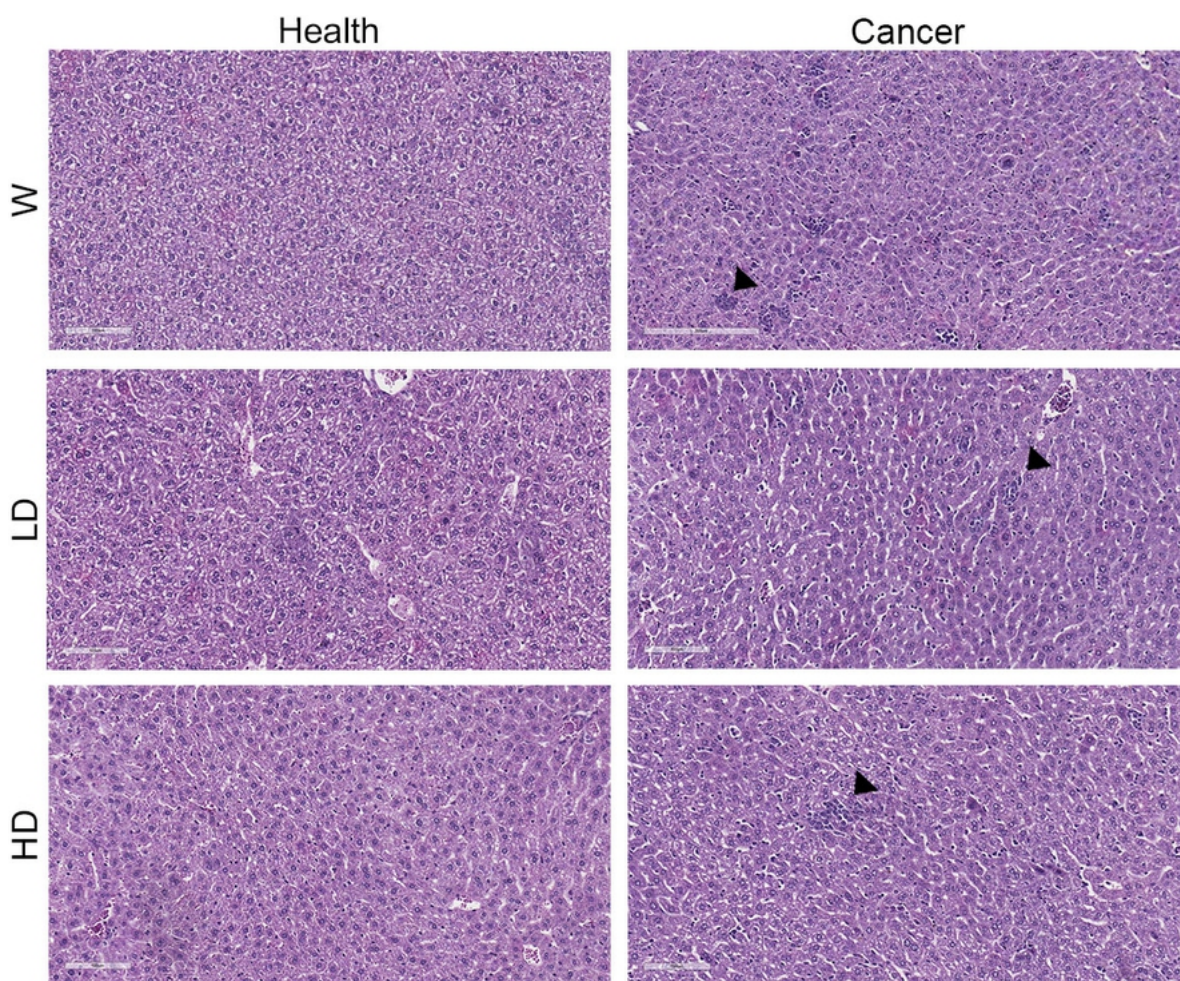


Figura 14 – Peso do fígado (g). \*  $p < 0,05$

### 5.1.3.2 Histopatologia

Foi observada hepatite nos grupos com câncer. Essa não possui critérios de especificidade como eosinófilos, balonização de hepatócitos, esteatose, granulomas ou elementos heterólogos, sendo, portanto, inespecífica. Também, não foi possível observar necrose de hepatócitos (Figura .



**Figura 15 – Histologia do fígado corada com H&E. Os triângulos pretos indicam a presença de hepatite nos tecidos. W - animais suplementados com água filtrada; LD - animais suplementados com a dose baixa (500 mg/Kg); HD - animais suplementados com a dose alta (2 g/Kg).**

### 5.1.3.3 Análise de Parâmetros Bioquímicos da Função Hepática

Visando a caracterização dos efeitos da suplementação com DHA na função hepática foram realizadas análises bioquímicas das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), uma vez que a presença dessas enzimas no sangue é indicativo de lesão ou patologias nesse tecido. Nesse sentido, foi observado uma diminuição dos níveis séricos das enzimas AST e ALT nos grupos CHD em comparação aos HHD

e uma diminuição de AST no grupo CHD em relação ao CC. Em relação aos níveis de albumina, não foram observadas alterações significativas entre os grupos (Figura 16).

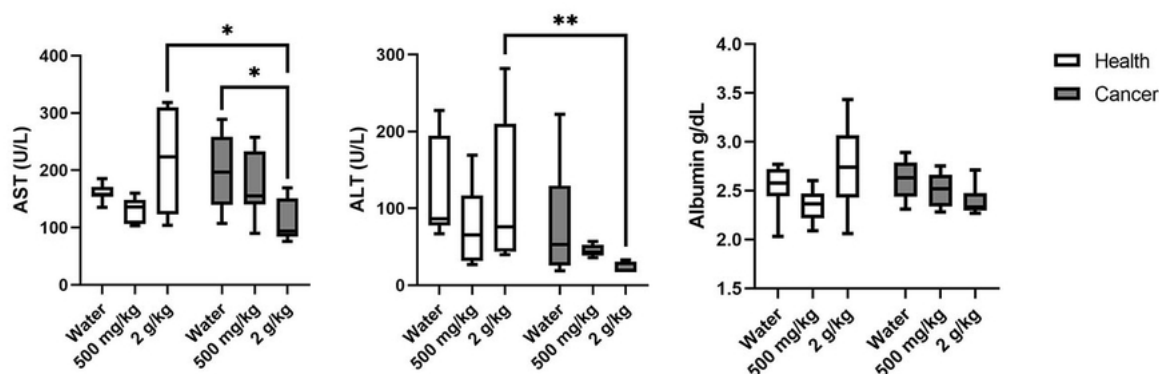


Figura 16 – Parâmetro bioquímicos hepáticos. AST - aspartato aminotransferase; ALT - alanina aminotransferase. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

#### 5.1.4 Análises do Baço

##### 5.1.4.1 Peso

Alterações morfológicas de órgãos linfoides são importantes indicativos de modulação da resposta imune do indivíduo, sendo assim, um parâmetro essencial para a avaliação do papel da suplementação com DHA em animais com ou sem câncer. Ademais, o tumor de mama 4T1 é caracterizado por levar à formação de metástase em diversos órgãos, tal como o baço, e também a casos de esplenomegalia. Tendo isso em vista, foi observado aumento do peso do baço para todos os grupos com câncer, isto é, CC, CLD e CHD. No entanto, apenas os grupos HLD e CLD apresentaram diferenças significativas. (Figura 17).

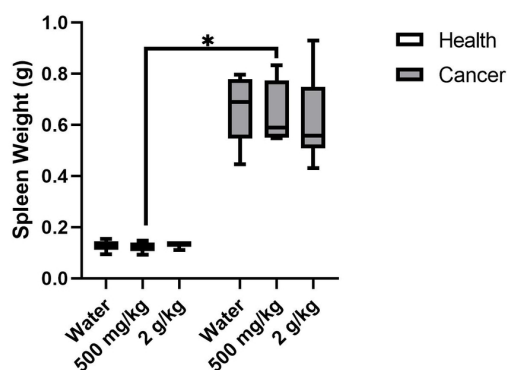
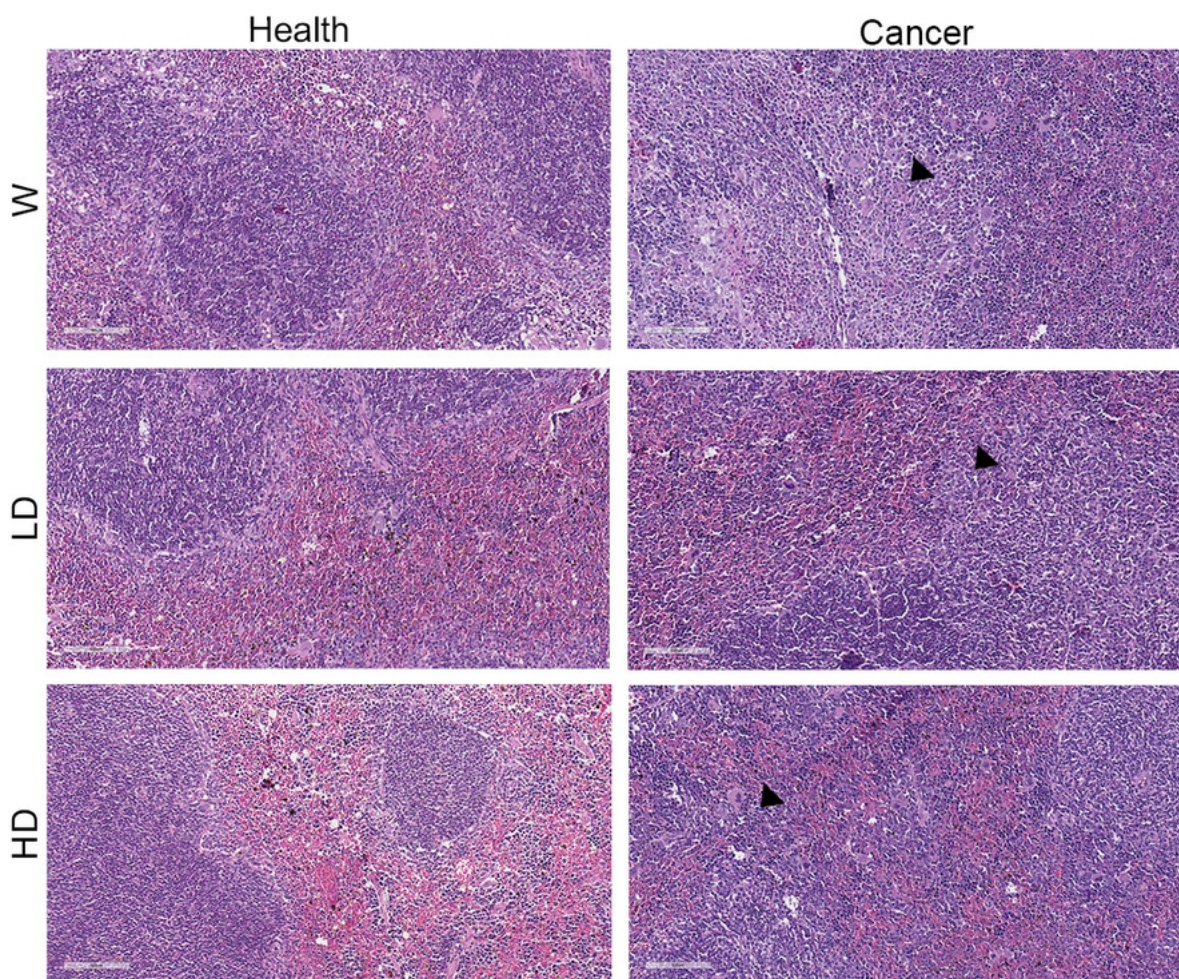


Figura 17 – Peso do baço (g). \*  $p < 0,05$ .



#### 5.1.4.2 Histopatologia

Seguindo com a análise morfológica do baço, foi realizado histologias do tecido que indicaram a presença de êmbolos tumorais metastáticos em parênquima esplênico nos grupos com câncer (CC, CLD, CHD). Contudo, não foram observadas anormalidades no tecido dos animais controle e suplementados com DHA sem câncer (HC, HLD, HHD) (Figura 18).



**Figura 18 – Histologia do baço corada com H&E. Os triângulos pretos indicam a presença de êmbolos tumorais metastático em parênquima esplênico nos tecidos. W - animais suplementados com água filtrada; LD - animais suplementados com a dose baixa (500 mg/Kg); HD - animais suplementados com a dose alta (2 g/Kg).**

#### 5.1.5 Análises dos Tecidos Adiposos

Devido à ação do n:3 PUFAs em modular o metabolismo lipídico, levar a lipólise, reduzir os depósitos de gordura, assim como levar a modulação inflamatória, ativação de BAT e ao amarronzamento, foram feitas análises do peso, histológicas e do perfil de citocinas dos tecido adiposos.

### 5.1.5.1 Brown Adipose Tissue (BAT)

#### 5.1.5.1.1 *Peso*

O peso de de BAT interescapular não foi alterado em decorrência dos tumores de mama, nem das diferentes doses de DHA (Figura 19).

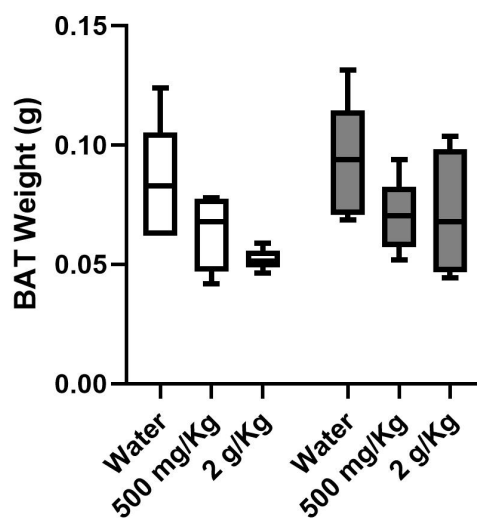
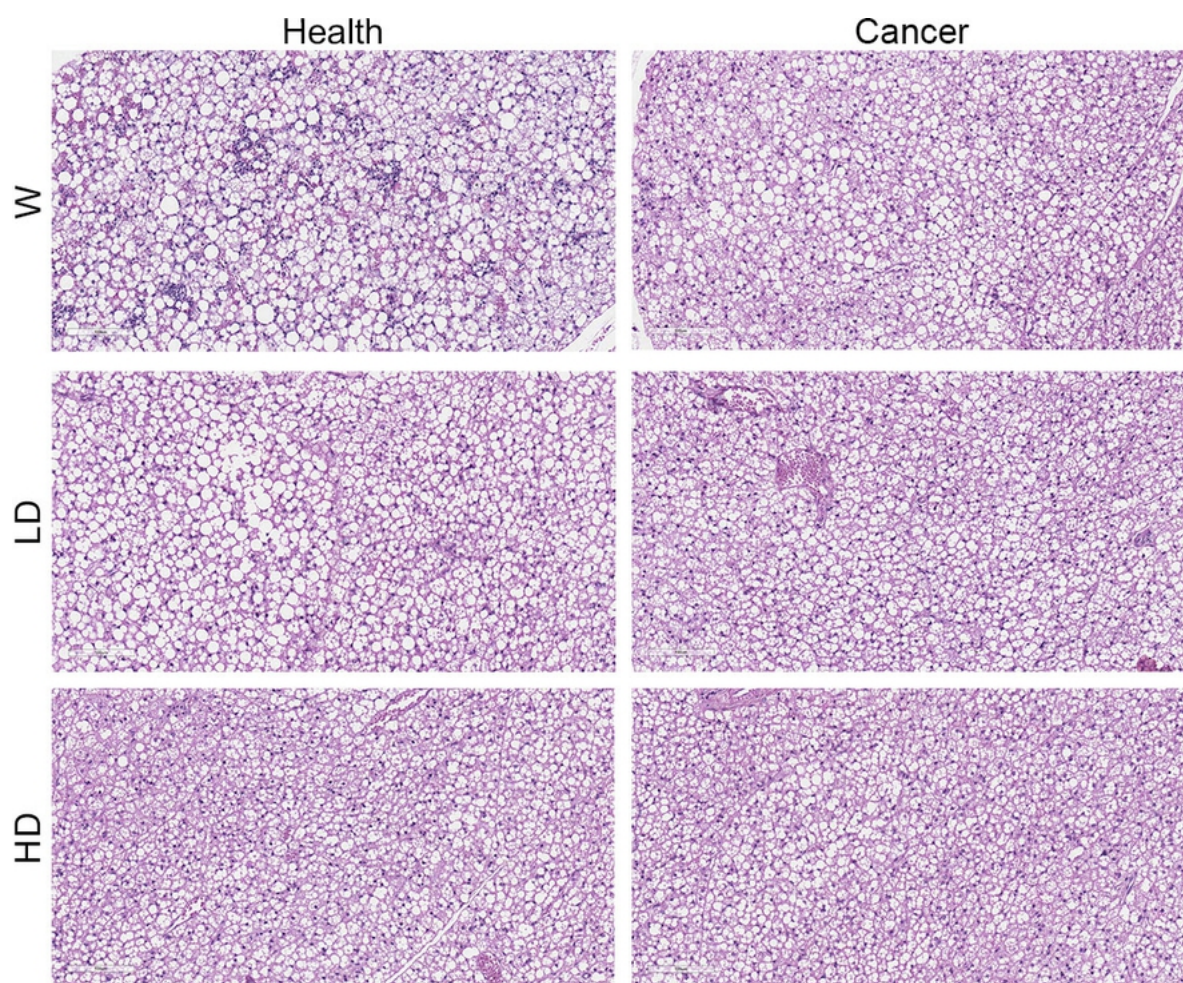


Figura 19 – Peso do tecido adiposo marrom (BAT) interescapular (g).

#### 5.1.5.1.2 *Histopatologia*

As estruturas de BAT dos tecidos demonstraram arquitetura tecidual preservada, sem influencia das condições experimentais.



**Figura 20 – Histologia do tecido adiposo marrom (BAT) interescapular corado com H&E. W - animais suplementados com água filtrada; LD - animais suplementados com a dose baixa (500 mg/Kg); HD - animais suplementados com a dose alta (2 g/Kg).**

#### 5.1.5.1.3 Análise do Perfil Inflamatório

Em relação a citocina IL-6, foi possível observar um aumento dose-dependente nos grupos sem câncer, como também um aumento no grupo CLD em relação ao CC. Por outro lado, no grupo CHD, foi observada uma diminuição em relação ao CC e uma redução acentuada em relação a CLD ( $p < 0,0001$ ). Além disso, foi verificado uma diminuição acentuada ( $p < 0,0001$ ) do grupo CHD em relação a HHD. Pegando como parâmetro IL-33, foi possível observar um aumento no grupo HHD em relação a HC, assim como, um aumento no grupo CLD em relação a CC. Já em relação ao grupo CHD, foi evidenciado uma diminuição em relação ao grupo HHD e CLD. Avaliando os níveis de  $\text{TNF-}\alpha$ , houve uma redução significativa no grupo CHD em relação aos grupos CLD e HHD. Já a quimiocina MCP1 foi reduzida no grupo CHD comparado a HHD.  $\text{TGF-}\beta$  também foi diminuída no grupo CHD em relação a CLD, CC e HHD (Figura 21).

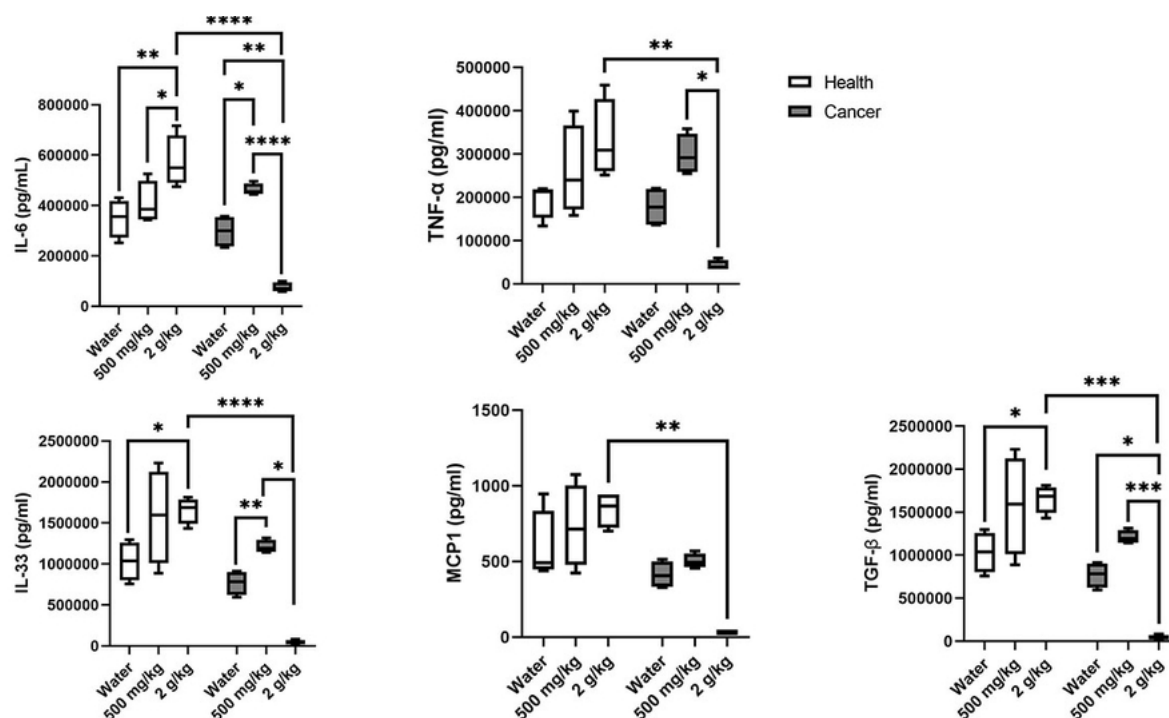


Figura 21 – Dosagem de citocinas do tecido adiposo marrom (BAT) interescapular realizada pelo método de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . IL-6 - Interleucina 6; IL-33 - Interleucina 33; TNF- $\alpha$  - fator de necrose tumoral  $\alpha$ ; MCP1 - proteína quimioatrativa de monócito 1; TGF- $\beta$  - Fator de transformação do crescimento  $\beta$ .

### 5.1.5.2 Subcutaneous White Adipose Tissue (sWAT)

#### 5.1.5.2.1 Peso

Foi observado apenas uma redução de sWAT no grupo HHD em relação ao HLD (Figura 22) .

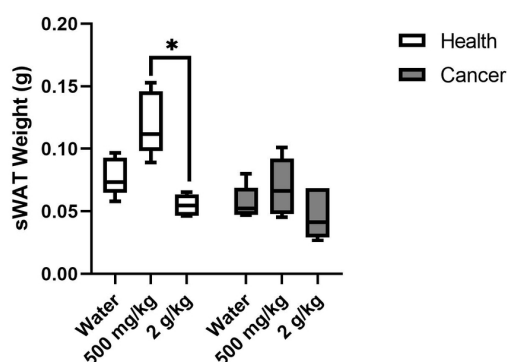
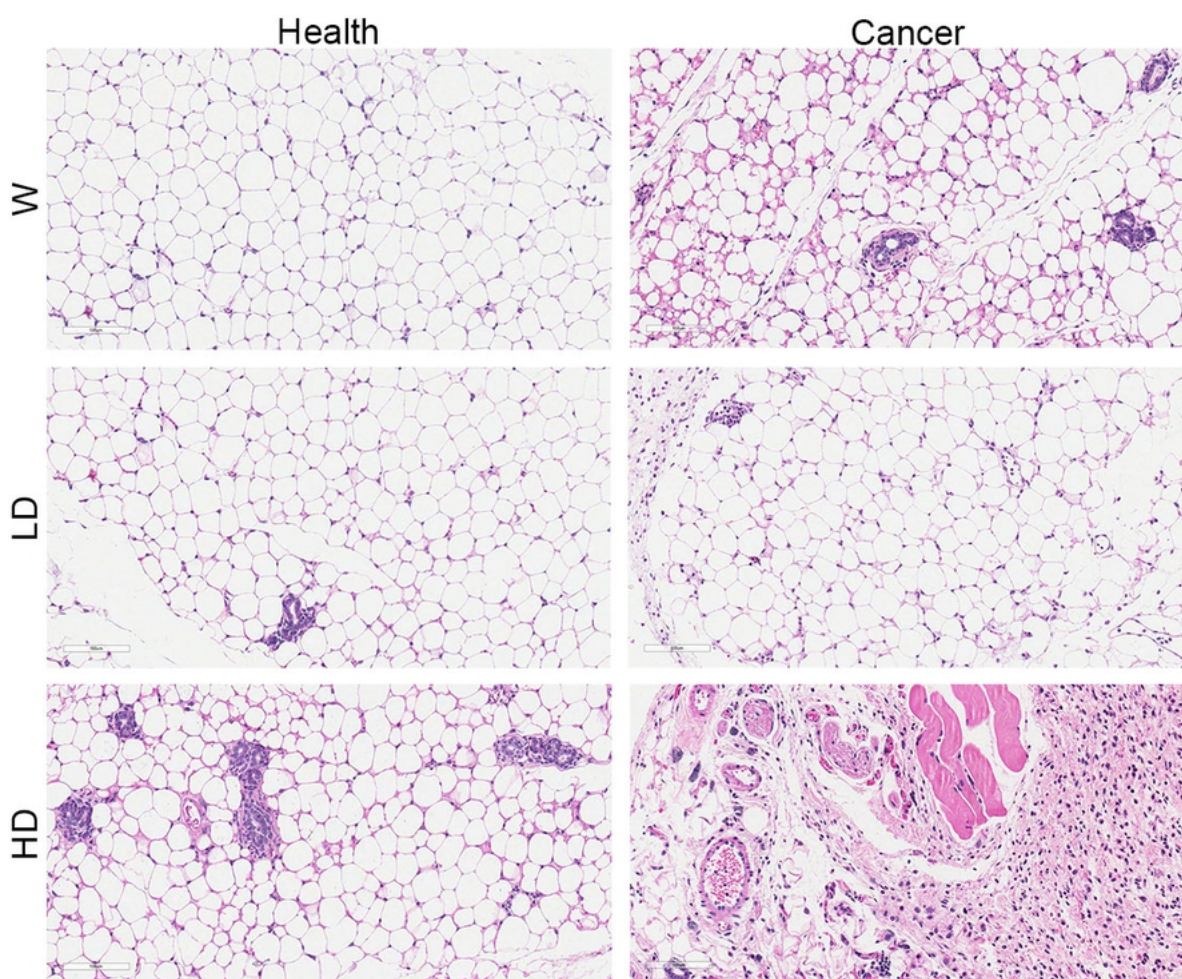


Figura 22 – Peso do tecido adiposo branco subcutâneo (sWAT). \*  $p < 0,05$ .

### 5.1.5.2.2 Histopatologia

O sWAT apresentou uma fibrose no grupo CHD, mas os demais tecidos demonstraram arquitetura tecidual preservada (Figura 23).



**Figura 23** – Histologia do tecido adiposo branco subcutâneo (sWAT) corado com H&E. W - animais suplementados com água filtrada; LD - animais suplementados com a dose baixa (500 mg/Kg); HD - animais suplementados com a dose alta (2 g/Kg).

### 5.1.5.2.3 Análise do Perfil Inflamatório

Não foram observadas alterações nos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-33 nos grupos analisados. Todavia, ao avaliar IL-6, foi observado um aumento dose dependente nos grupos sem câncer, juntamente a um aumento no grupo CLD em relação ao HLD. Foi possível identificar também uma diminuição no grupo CHD em relação aos grupos CLD e HHD (Figura 24).

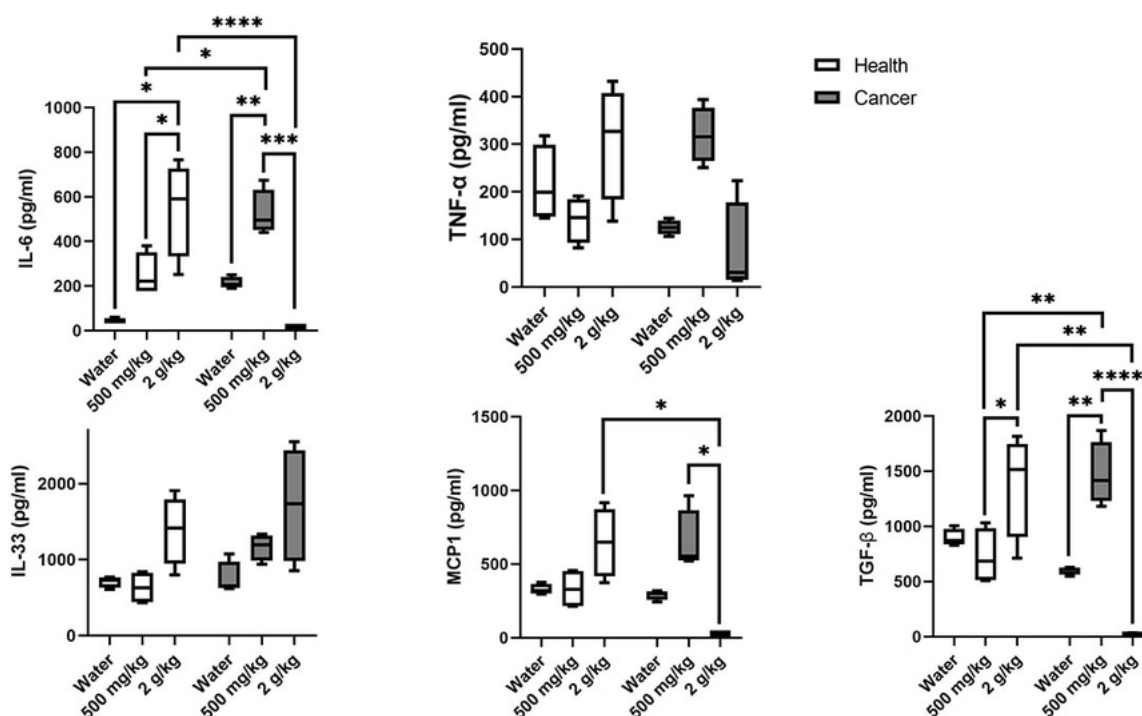


Figura 24 – Dosagem de citocinas do tecido adiposo branco subcutâneo (sWAT) realizada pelo método de ensaio de imun absorção enzimática (ELISA). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . IL-6 - Interleucina 6; IL-33 - Interleucina 33; TNF- $\alpha$  - fator de necrose tumoral  $\alpha$ ; MCP1 - proteína quimioatrativa de monócito 1; TGF- $\beta$  - Fator de transformação do crescimento  $\beta$ .

### 5.1.5.3 Visceral White Adipose Tissue

#### 5.1.5.3.1 Peso

Não foram observadas variações significativas no peso de vWAT, o que revela a não influência das doses de DHA, tal e qual, to tumor (Figura 25).

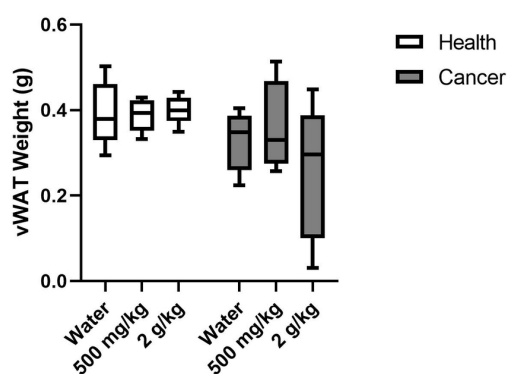
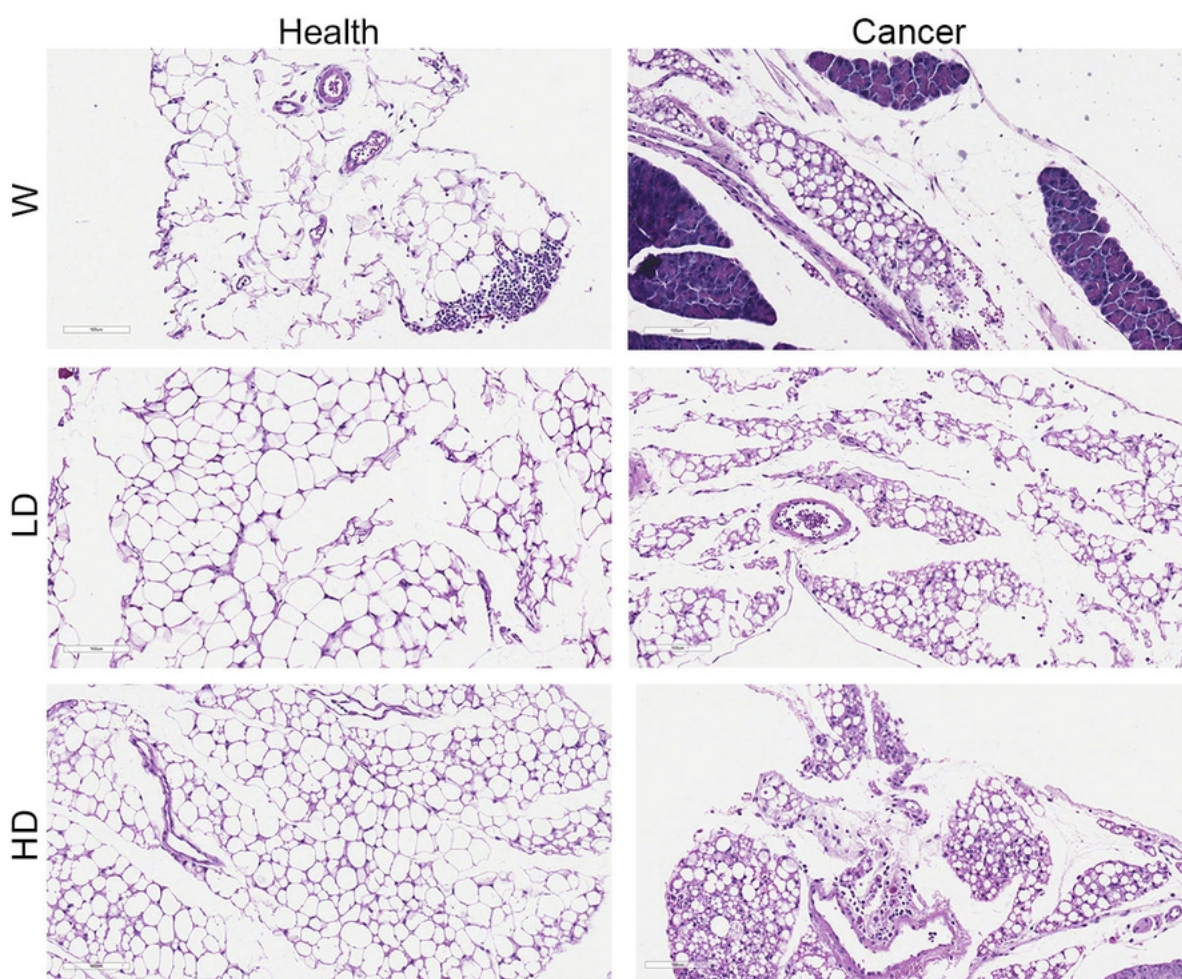


Figura 25 – Peso do tecido adiposo branco visceral (vWAT) (g).

### 5.1.5.3.2 Histopatologia

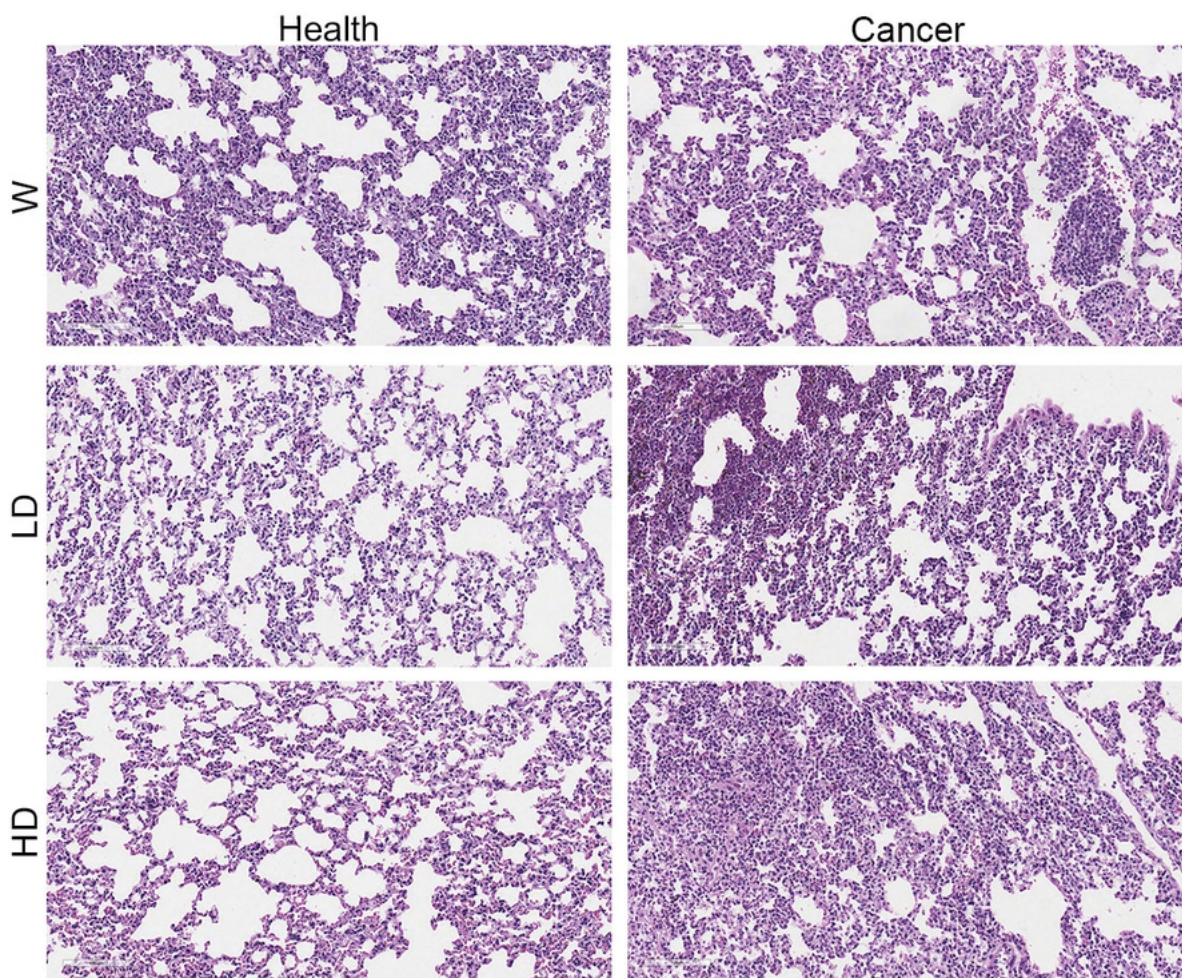
Os órgãos amostrados e analisados apresentam arquitetura preservada, sem alterações marcantes (Figura 26).



**Figura 26 – Histologia do tecido adiposo branco visceral (vWAT) corado com H&E. W - animais suplementados com água filtrada; LD - animais suplementados com a dose baixa (500 mg/Kg); HD - animais suplementados com a dose alta (2 g/Kg).**

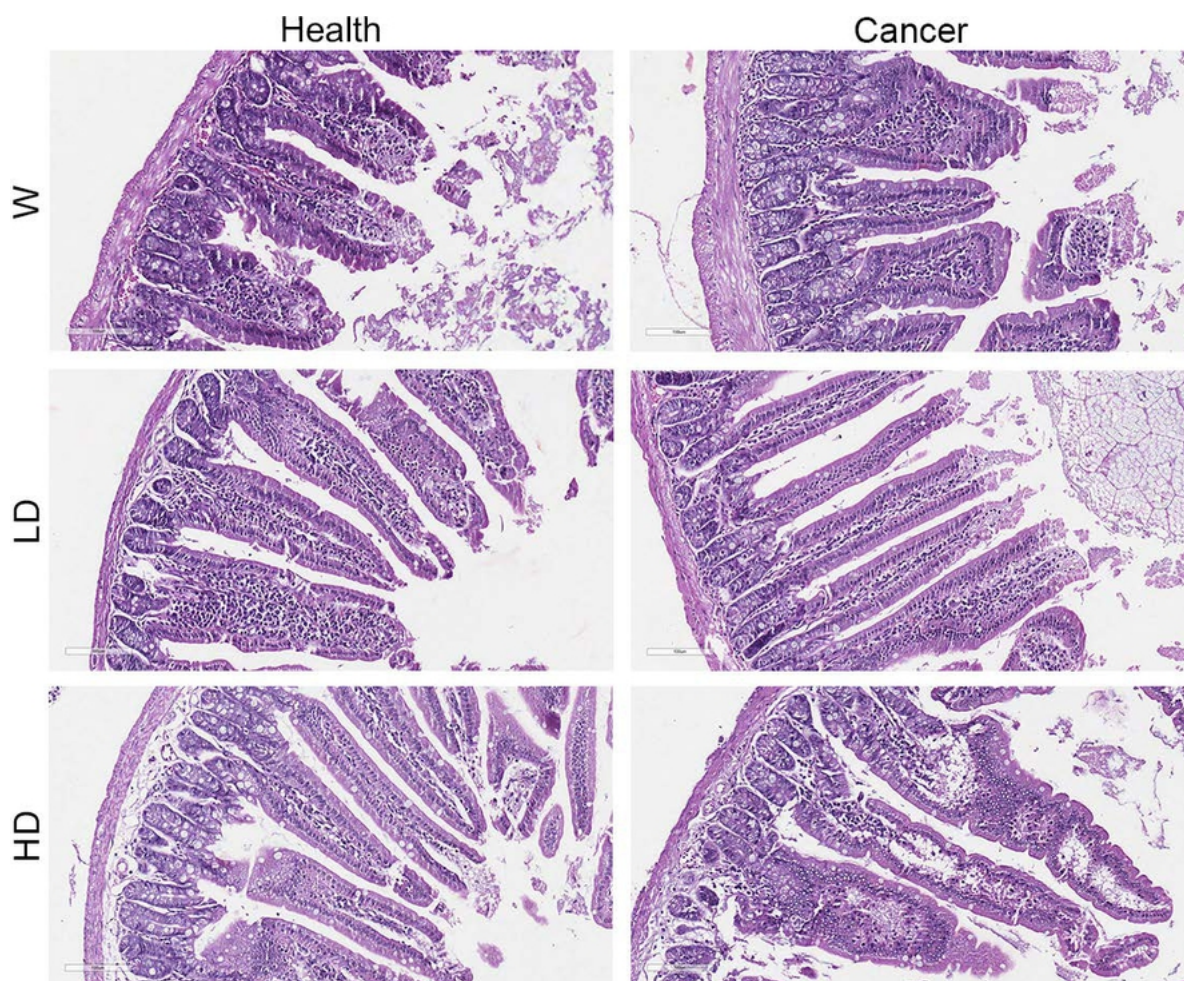
### 5.1.6 Análises Histopatológicas do Pulmão, Linfonodo Inguinal e Intestino

Os órgãos, pulmão, intestino e linfonodo analisados apresentam arquitetura preservada, sem alterações histopatológicas marcantes (Figuras 27 e 28 ).



**Figura 27** – Histologia do tecido pulmonar corado com H&E. W - animais suplementados com água filtrada; LD - animais suplementados com a dose baixa (500 mg/Kg); HD - animais suplementados com a dose alta (2 g/Kg).





**Figura 28 – Histologia do intestino corado com H&E. W - animais suplementados com água filtrada; LD - animais suplementados com a dose baixa (500 mg/Kg); HD - animais suplementados com a dose alta (2 g/Kg).**

### 5.1.7 Análises do Tumor e da Mama

#### 5.1.7.1 Volume Tumoral

Os tumores medidos não apresentaram diferenças significativas no decorrer da suplementação (Figura 29A e 29B). Por outro lado, houve uma diminuição significativa do volume tumoral final no grupo CHD em relação ao CC (Figura 29C).

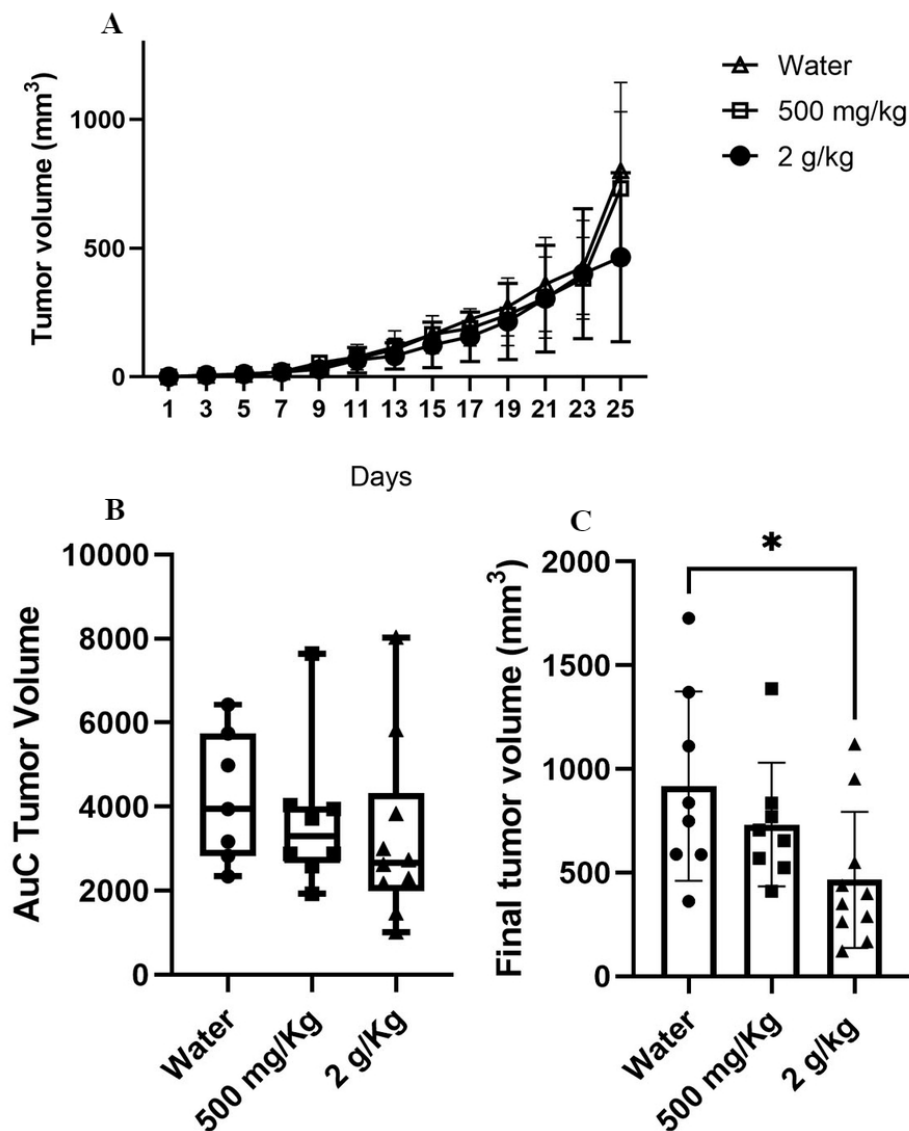
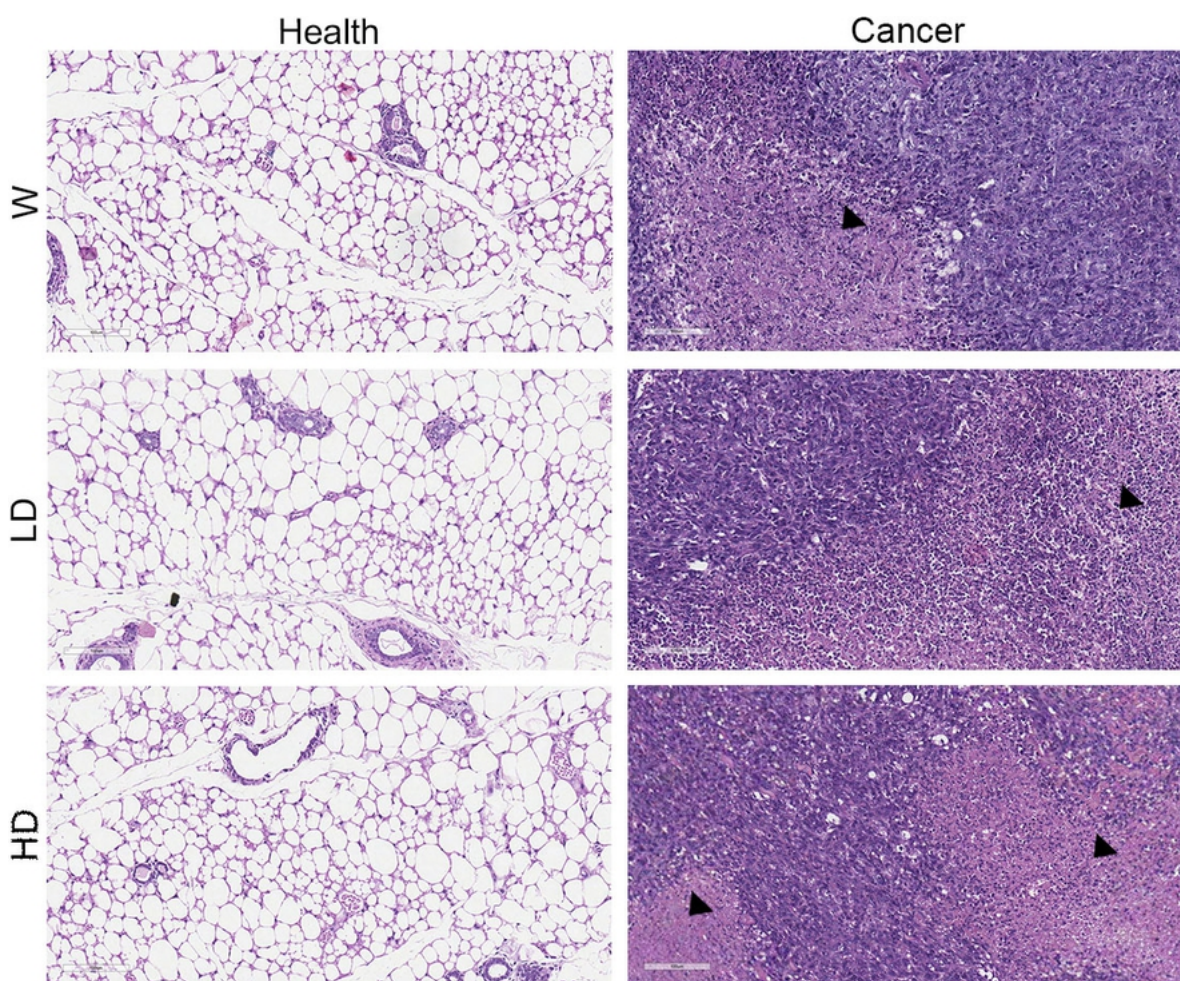


Figura 29 – Volume tumoral (mm<sup>3</sup>). A. As medidas (comprimento e largura) foram feitas em dias alternados a partir da detecção do tumor sólido. O volume foi calculado pela fórmula  $V = \frac{W^2 * L}{2}$  detalhada por Faustino-Rocha *et al.* (2013). B. Área sobre a curva do gráfico A. C. Volume tumoral final. \* p < 0,05.

#### 5.1.7.2 Histopatologia

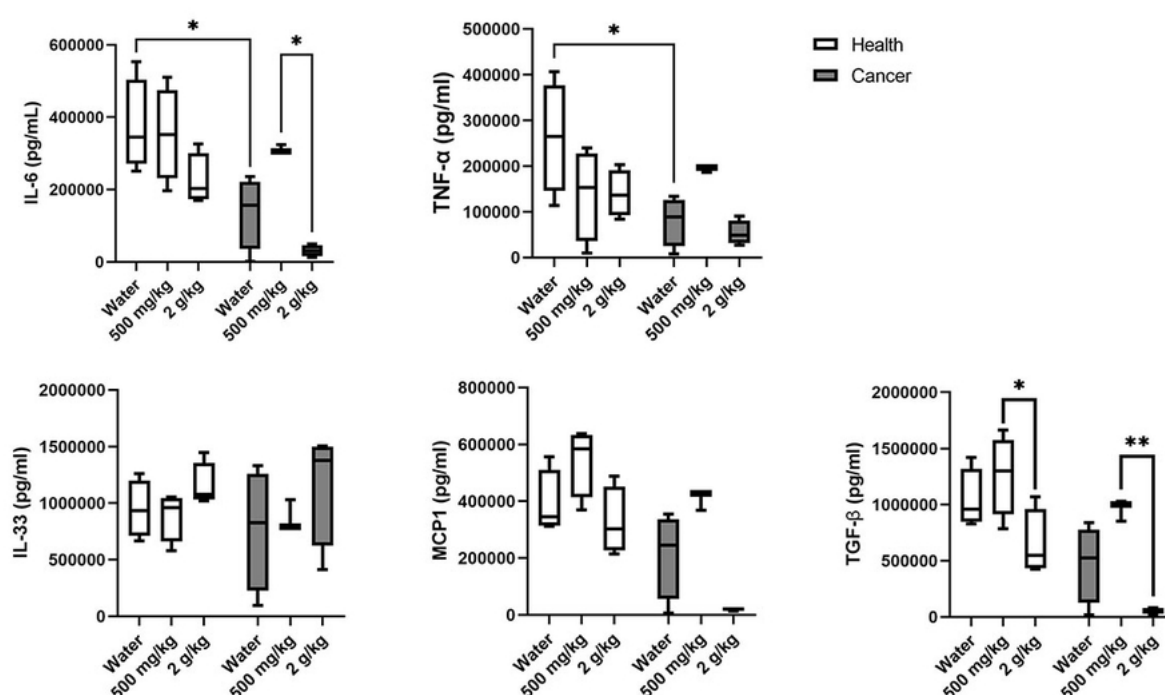
As análises histopatológicas da mama não demonstraram nenhuma alteração marcante, a presença de ácinos de revestimento colunar simples, sem atipias, organizados em lóbulos, demonstrando uma arquitetura preservada. Já em relação aos tumores, foram observadas células médias e grandes, de núcleos megálicos, irregulares, com cromatina aberta, macronucleolados e citoplasma amplo e anfófilico, organizadas em tubos malformados. Há presença de necrose liquefativa, infiltrado inflamatório peritumoral associado a edema intersticial, congestão vascular e extravasamento de hemácias (Figura 30).



**Figura 30 – Histologia da mama (lado esquerdo) e do tumor (lado direito) corados com H&E. Os triângulos pretos indicam a presença necroses tumorais. W - animais suplementados com água filtrada; LD - animais suplementados com a dose baixa (500 mg/Kg); HD - animais suplementados com a dose alta (2 g/Kg).**

### 5.1.7.3 Análise do Perfil Inflamatório

Em relação IL-6, foi observada uma diminuição no grupo CC em relação ao HC, além disso, uma diminuição do grupo CHD em relação ao CLD. Ficou evidenciada uma diminuição de TGF- $\beta$  no grupo HHD em comparação a HLD e no grupo CHD em relação a CLD. Tendo em vista TNF- $\alpha$ , foi observada uma diminuição de no grupo CC em consideração a HC. Por fim, não foram evidenciadas alterações estatisticamente significativas na citocina IL-33 e na quimiocina MCP1 entre os grupos (Figura 31).

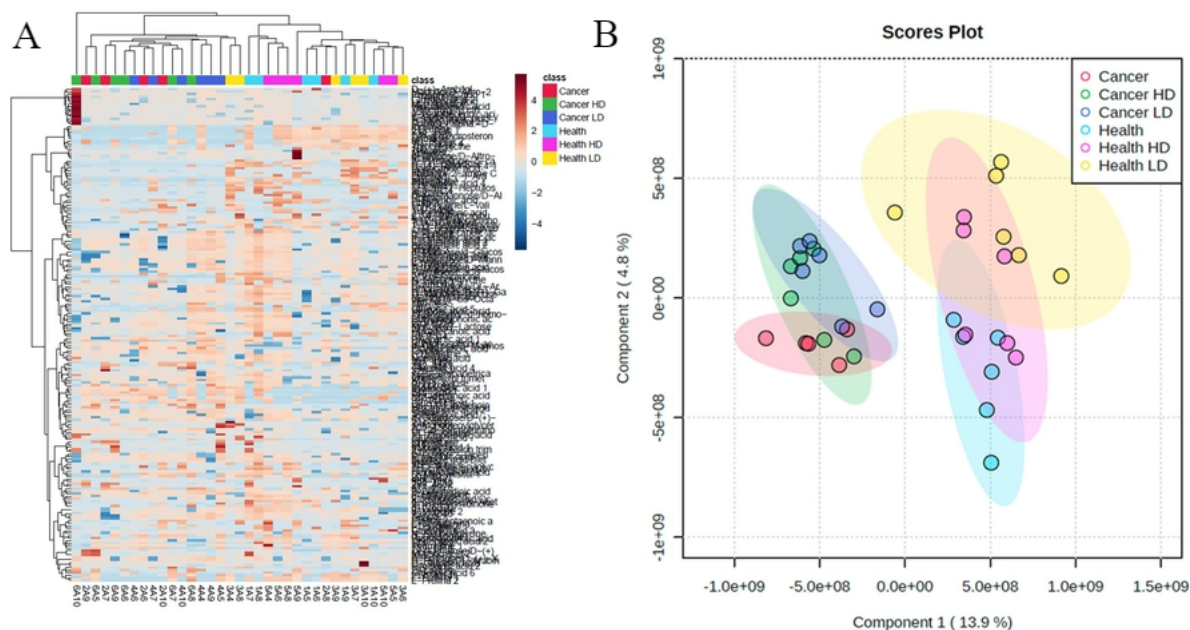


**Figura 31 – Dosagem de citocinas do tecido mamário (barras não hachuradas) e do tumor (barras hachuradas) realizada pelo método de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ . IL-6 - Interleucina 6; IL-33 - Interleucina 33; TNF- $\alpha$  - fator de necrose tumoral  $\alpha$ ; MCP1 - proteína quimioatrativa de monócito 1; TGF- $\beta$  - Fator de transformação do crescimento  $\beta$ .**

#### 5.1.7.4 Análise do Perfil Metabólico

Para avaliar as diferenças do perfil metabólico global da mama e do tumor dos animais suplementados com as duas doses de DHA, foi feita análise de GC-MS para detecção de diferentes metabólitos. Ao todo, foram identificadas 40993 variáveis, as quais foram identificadas a partir do banco de dados do 'National Institute of Standards and Technology' (NIST) e, a partir disso, 202 moléculas foram selecionadas com fator qualitativo  $>70$ , dentre essas 52 foram diferencialmente alteradas entre os grupos, com  $p \leq 0.05$ .

A partir da análise de 'clusterização' hierárquica, foi possível observar uma aglomeração do perfil de metabólitos decorrente do tipo de tecido avaliado, mama ou câncer, e que não demonstrou relação com as doses de ômega-3. Ficou evidente no 'heatmap' a aglomeração dos grupos com câncer no lado esquerdo e do tumor no lado direito. Semelhantemente, a partir do PLSDA, também é possível observar as distâncias entre metabólicas entre os grupos, utilizando-se dos principais metabólitos que com abundância distinta e, da mesma forma, ficou evidente a segregação dos grupos com e sem câncer (Figura 32A).



**Figura 32 – Perfil metabólico das mamas e dos tumores de animais tratados com DHA. Os animais foram suplementados durante 60 dias com duas doses distintas, 500 mg/Kg e 2 g/Kg. As amostras de mama e tumor foram então submetidas à GC-MS, os dados foram normalizados pela massa de tecido e transformados por log 2 com posterior análise pelo 'software' MetaboAnalyst, pelo qual foi plotado 'Hierarchical Clustering Heatmap' (A) e o 'score' Partial Least Squares - Discriminant Analysis (PLS-DA) (B). LD: dose baixa; HD dose alta.**

Cada metabólito foi analisado separadamente, conforme a normalidade de cada um, e foi possível encontrar diferenças significativas de metabólitos, como aminoácidos, carboidratos, ácidos graxos, nucleotídeos, hormônios e ácidos orgânicos, os quais estão associados com a via glicolítica, ciclo do ácido cítrico, metabolismo de aminoácidos, de colesterol, de creatina, de purina, de pirimidinas e de ácidos graxos.

As diferenças significativas foram moduladas principalmente em relação ao tecido analisado, mama e tumor, do que uma modulação das doses de DHA. A via glicolítica foi uma das que mais apresentaram uma maior quantidade de diferenças significativas entre os grupos dos metabólitos. Isso já se era esperado pelas alterações nas células em decorrência do processo de carcinogênese, caso clássico do efeito Warburg. Assim, foi possível observar uma alteração do metabolismo de carboidratos, no qual fica evidente uma tendência de aumento nos níveis de tagatofuranose, galactose, maltose, manose e frutose. Contrariamente, foi observado uma diminuição de glicose. O efeito Warburg também é caracterizado pela modulação de intermediários do CAC e foi possível observar um aumento de fumarato e do ácido tricarbálico, inibidor da enzima aconitase, a qual catalisa a reação de citrato a isocitrato. Os intermediários do CAC são substratos para produção de diversas biomoléculas, o que inclui a síntese de aminoácidos, sendo assim, observou-se, também, uma tendência de aumento nos grupos com câncer dos aminoácidos prolina, aspartato e treonina, tal como de 5-oxoprolina, derivada do glutamato. Outros aminoácidos,

advindo de intermediários da glicose, também foram aumentados nos mesmos grupos, como serina, glicina, valina, leucina, alanina, tirosina e fenilalanina (Figura 33).

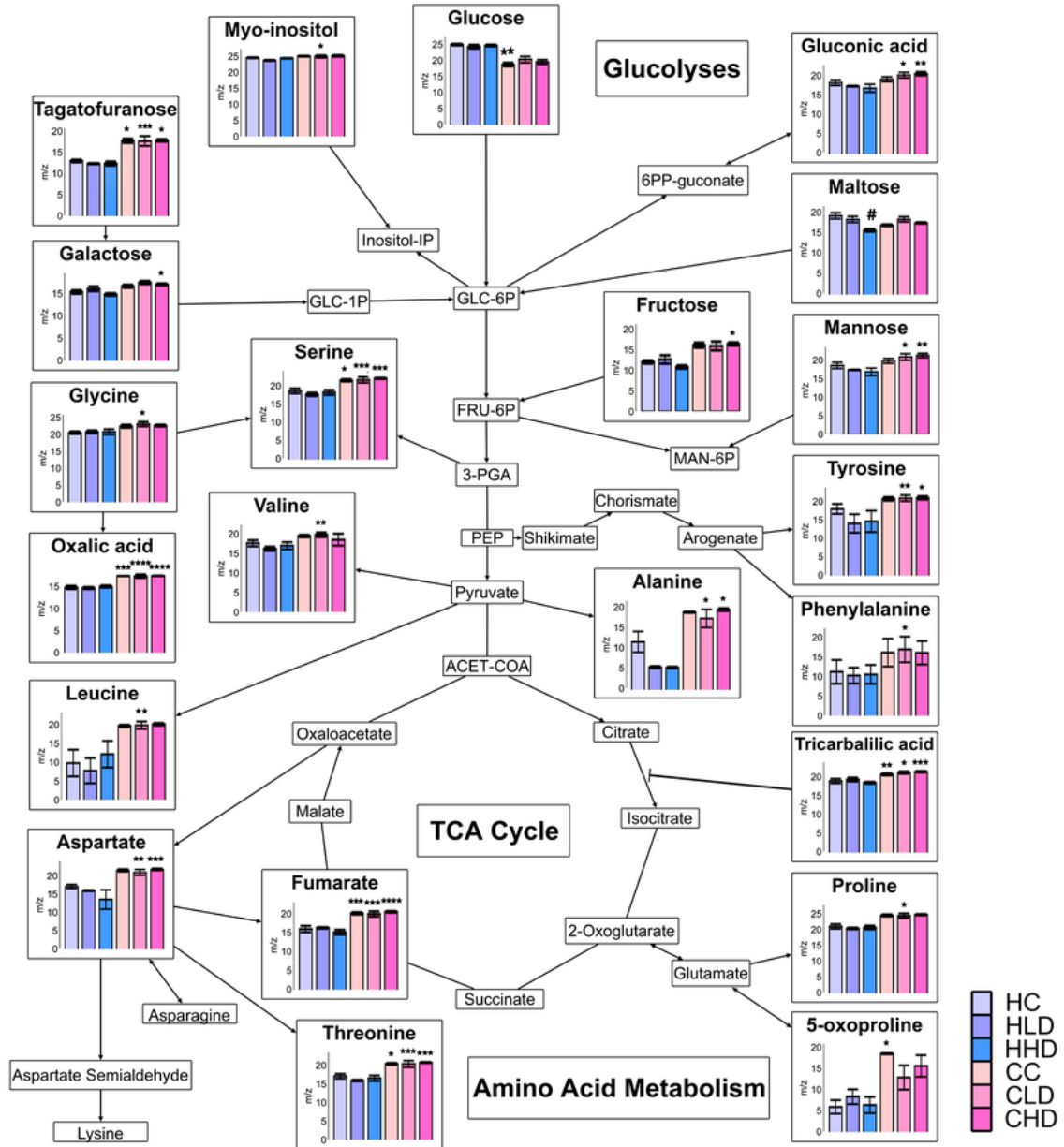
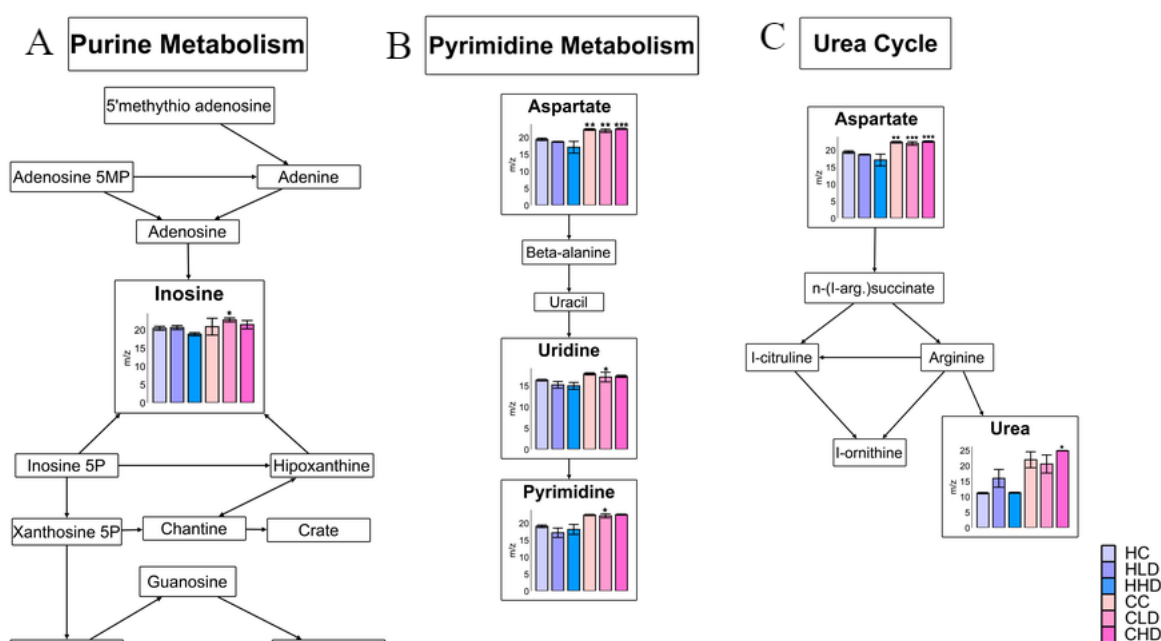


Figura 33 – Alterações da via glicolítica, do ciclo do ácido cítrico e do metabolismo de aminoácidos da mama e do tumor. \*Os asteriscos correspondem às diferenças significativas nos grupos com a mesma dose de suplementação, mas com ou sem tumor. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . #As hashtags correspondem às diferenças dos grupos dose alta (HHD) em relação ao controle saudável (HC). #  $p < 0,05$ . HC: Controle saudável; CC: Controle câncer; HLD: Saudável dose baixa; CLD: Câncer dose baixa; HHD: Saudável dose alta; CHD: Câncer dose alta.

Para mais, houve modulação do metabolismo de bases nitrogenadas, o que é evidenciado pelo aumento de inosina, um intermediário da síntese de purinas (adenina e guanina). Nesse caso, foi observado um aumento significativo no grupo CLD em relação a HLD (Figura A). Ainda mais, houve alterações no metabolismo de pirimidinas, visto que foi possível observar um aumento de uridina e pirimidinas no grupo CLD em comparação a HLD também (Figura B). Foi possível observar também a alteração nos níveis de ureia, produzida a partir da degradação de aminoácidos, a partir do ciclo da ureia, o que foi evidenciado pela tendência de aumento nos grupos com câncer, mas apenas significativa no grupo CHD em relação a HLD (Figura 34C).

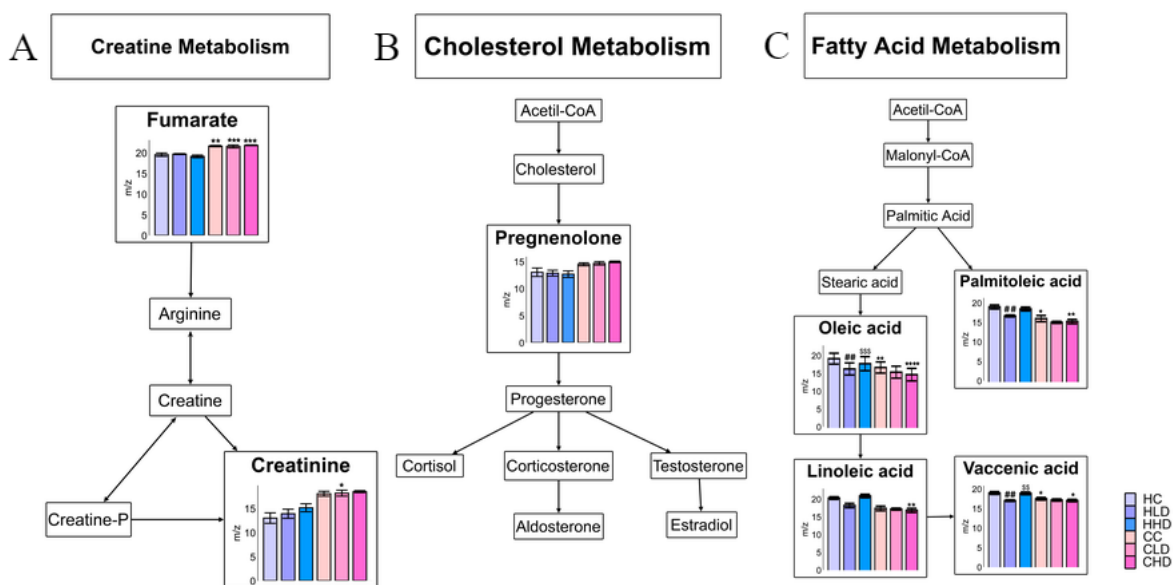


**Figura 34 – Alterações do metabolismo de pirimidinas e purinas e do ciclo da ureia da mama e do tumor. \*Os asteriscos correspondem às diferenças significativas nos grupos com a mesma dose de suplementação, mas com ou sem tumor. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . HC: Controle saudável; CC: Controle câncer; HLD: Saudável dose baixa; CLD: Câncer dose baixa; HHD: Saudável dose alta; CHD: Câncer dose alta.**

Outros metabólitos que também sofreram alteração foram relacionados ao ciclo metabolismo de creatina. Dessa forma é possível observar uma tendência de aumento de creatinina nos grupos com câncer. Esse composto é gerado a partir do metabolismo de creatina, que ocorre em altas taxas de consumo energético, sendo fundamental para o transporte de ATP entre membranas celulares, o que pode levar a formação de creatinina irreversivelmente. Contudo, só foi possível observar diferença significativa no grupo CLD em comparação a HLD (Figura 35A). Já em relação ao metabolismo de colesterol, foi possível observar um aumento de pregnenolona, esse composto é fundamental para a produção de hormônios esteróides e é o principal precursor de hormônios corticosteróides, andrógenos e estrógenos. Foi possível observar um aumento nos grupos com câncer, mas com aumento significativo nos grupos CHD e CLD em relação a HHD e HLD, respectivamente (Figura

35B).

Já em relação ao metabolismo de ácidos graxos, foi observado uma diminuição nos grupos CHD e CC em relação a HHD e CH, respectivamente de ácido oleico e palmitoleico. Além disso, ficou evidente a alteração desses lipídeos no tecido mamário, caso que foi correlacionado com as doses de DHA. Assim, foi observada a diminuição significativa de ácido oleico no grupo dose baixa (HLD) em comparação ao controle saudável (HC) e um aumento da dose alta (HHD) em comparação a dose baixa (HLD). Também, foi observada uma diminuição significativa de ácido palmitoleico na dose baixa (HLD) em relação ao controle saudável (HC). Esse ácidos graxos são da família dos monoinsaturados e tem papéis centrais na carcinogênese. Para mais, foi observada uma redução significativa de ácido linoleico, um ácido graxo essencial, o qual tem um papel central no metabolismo de ARA, no grupo CHD em relação a HHD. Por último, foi observado uma diminuição de ácido vacênico nos grupos CHD e CC em relação a HHD e HC, respectivamente. Já nas mamas, também foi observado uma diminuição no grupo HLD em relação a HC e um aumento no grupo HHD em relação a HLD. Nesse contexto, fica evidente uma atividade diferencial das duas doses nesses ácidos graxos, no tecido mamário (Figura 35C).



**Figura 35 – Alterações do metabolismo de creatina, colesterol e ácidos graxos da mama e do tumor.**  
 \*Os asteriscos correspondem às diferenças significativas nos grupos com a mesma dose de suplementação, mas com ou sem tumor. \* p <0,05; \*\* p <0,01; \*\*\* p <0,001. #As hashtags correspondem a diferenças dos grupos dose alta (HHD) em relação ao controle saudável (HC). # p <0,05; ## p <0,01. \$ Os cifrões representam as diferenças dos grupos (HHD) em relação a (HLD). \$ p <0,05; \$\$ p <0,01. HC: Controle saudável; CC: Controle câncer; HLD: Saudável dose baixa; CLD: Câncer dose baixa; HHD: Saudável dose alta; CHD: Câncer dose alta.



## 5.2 Discussão

Nas últimas duas décadas o número de diagnósticos de câncer praticamente dobrou, saiu de 10 milhões em 2000 para 19,3 milhões em 2020. Nos dias atuais, 1 em cada 5 pessoas irão desenvolver câncer na vida e a tendência nesses números é de aumento. Conjuntamente, o número de mortes também possuem tendência de aumento, de 6,2 milhões em 2000 para 10 milhões em 2020. Nesse contexto, o câncer de mama tornou-se a neoplasia mais diagnosticada, ultrapassando o câncer de pulmão (WORLD HEALTH ORGANIZATION, ). O TNBC é caracterizado por uma alta invasividade, levar a formação de metástases e, conseqüentemente estar associado a altas taxas de mortalidade (YIN *et al.*, 2020).

Na busca por terapias com menor nível de toxicidade, fardo característico da quimioterapia e radioterapia, ou de terapias adjuvantes, que possam potencializar essas abordagens clássicas, diversos compostos já demonstraram potencialidade para o tratamento de neoplasias. Nesse cenário, os n:3 PUFAs apresentam ações capazes de mitigar o crescimento tumoral (FASANO *et al.*, 2017), diminuir os efeitos adversos da quimioterapia, evidenciando efeitos analgésicos, antidepressivos e mitigando a síndrome de anorexia-caquexia (FREITAS; CAMPOS, 2019). Nesse contexto, durante a suplementação, foram avaliadas alterações na atividade motora, no comportamento, alterações clínicas morfológicas, assim como perda de peso, diarreia e inapetência dos animais. Os resultados demonstraram uma resistência em tomar a suplementação dos animais, a partir da segunda semana de experimento, assim como presença de diarreia nos animais suplementados, todos com a dose alta (2g/Kg). Devido a isso, foram feitas lâminas histológicas do intestino desses animais e não foram encontradas alterações histopatológicas marcantes. Os efeitos dos n:3 PUFAs já vem sendo descrito em diversos estudos, principalmente a sua capacidade de alterar a composição da microbiota, manter a integridade da parede intestinal e interagir com as células imunes locais (COSTANTINI *et al.*, 2017). A diarreia em decorrência da injesta de DHA/EPA também já foi descrita como consequência da suplementação, o que se deve a mudanças na microbiota intestinal, todavia, não se sabe exatamente a relação da dose com essa condição. Porém, apesar de terem sido demonstradas as alterações no perfil do microbioma intestinal, essas alterações não foram moduladas de forma significativa (WATSON *et al.*, 2018). Essa condição a qual foi contornada a partir da sexta semana de suplementação (Colocar que as análises de microbiota do meu estudo ainda estão sendo realizadas ?).

Os efeitos do n:3 PUFAs vão além da alteração da microbiota, eles também conseguem diminuir a porcentagem de massa gorda e diminuir a perda de massa magra em modelos de HFD. Esses efeitos são diretamente ligados ao aumento da sensibilidade a insulina (CHO *et al.*, ), na modulação do metabolismo lipídico, como na formação de eicosanoides, na diminuição da adipogênese (HENSLER *et al.*, 2011), no aumento da termo-

gênese e na regulação de adipocinas, alterando a concentração plasmática de adiponectina e leptina (ALBRACHT-SCHULTE *et al.*, 2018). Para verificar as alterações possivelmente decorrentes desses processos, foi avaliado o peso dos animais no decorrer da suplementação e foi possível observar uma diminuição do peso nos animais sem câncer na dose alta em relação a dose baixa, evidenciando que o efeito da diminuição de peso ocorreu apenas na dose alta. Esse efeito pode ser devido a diminuição de depósitos de WAT, que ocorreu principalmente no subcutâneo nos mesmos grupos, assim como a diminuição de apetite, geralmente relacionada ao consumo de n:3 PUFA (ALBRACHT-SCHULTE *et al.*, 2018).

Por outro lado, quando se tem a presença de neoplasias, os efeitos desses ácidos graxos são, de certa forma, controversos, efeitos tais que dependem do tipo de câncer avaliado, as fontes desses ácidos graxos (ALA, EPA, DHA), a dose e a taxa n:6/n:3 e fatores genéticos (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2018; FREITAS; CAMPOS, 2019). Alguns estudos demonstram a não interferência da suplementação no processo de caquexia, assim como, não são indicados em alguns tipos de câncer e quadros caquéticos muito avançados (RIES *et al.*, ). Em contrapartida, por conseguir equilibrar o metabolismo energético, impedir a perda de massa magra e ter efeitos anti-inflamatórios, pode auxiliar em casos de caquexia decorrente de cânceres avançados (FREITAS; CAMPOS, 2019). Fato que, foi possível observar pela diminuição do peso dos animais CLD, mas não nos CHD, demonstrado que o efeito protetivo pode ter ocorrido na maior dose, mas não na menor dose, também evidenciado pela não alteração das massas dos tecidos adiposos avaliados. O peso dos animais é apenas um dos fatores que se avalia em casos de caquexias, sendo necessária a avaliação do perfil inflamatório, assim como a perda de massa muscular, dessa forma seriam necessárias outras avaliações para se ter melhores conclusões.

A avaliação de fatores hematológicos é um importante método para diagnosticar doenças, diversos parâmetros podem ser utilizados para prever severidade, mortalidade e possíveis abordagens terapêuticas em pacientes com câncer de mama (DIVSALAR *et al.*, 2021a), além disso, são importantes marcadores para inflamação sistêmica (CETIN *et al.*, 2014). Devido a isso, foram realizados exames hematológicos nos animais no final da suplementação e foi possível observar que nos resultados do eritrograma as alterações significativas ocorreram principalmente devido à presença ou não de câncer, evidenciadas principalmente nos níveis de RDW, característicos de condições que levam a degradação de eritrócitos em situações de caráter inflamatório (SALVAGNO *et al.*, 2015), sem influência das doses de n:3 PUFA. Outro fato importante é que houve um aumento de Eritrócitos no grupo HHD em relação ao controle saudável, evidenciado pelos resultados de RBC e HCT. A eritropoiese, aumento de hemácias, já foi relatada por Al-Daraji *et al.* (2010) em galinhas suplementadas com óleo de peixe, por outro lado, Nnamonu *et al.* (2020) demonstrou a não alteração de RBC em ratos suplementados com doses <250 mg/Kg. O mecanismo como os n:3 PUFA podem influenciar no aumento de hemácias ainda não é bem elucidado, mas é importante evidenciar que houve influência da dose alta, mas não na dose baixa desse

parâmetro.

No que se refere ao leucograma, a maior parte das diferenças significativas, também foram em relação a presença de tumor nos animais, não havendo relação com as doses de n:3 PUFAs. Isso foi evidenciado nos valores de W-SCR, W-LCR e W-LCC, todavia, em relação a WBC, as diferenças só foram encontradas entre os grupos CC e HC, como também, entre CLD e HLD, fato qual não ocorreu entre grupos dose alta, CHD e HHD. Essa tendência de diminuição de WBC foi impulsionada, provavelmente pela contagem de células pequenas, no caso, leucócitos (W-LCC) e de células médias, representadas por basófilos, eosinófilos e neutrófilos (W-MCC). O aumento de WBC já é algo evidenciado em pacientes com câncer de mama, assim como, os níveis de linfócitos e neutrófilos são ferramentas importantes para o diagnóstico da fase e monitorização do cancro da mama (DIVSALAR *et al.*, 2021b). Deste modo, é possível observar que na dose alta, apesar de haver a presença de tumor nos animais, não levou a um aumento significativo dessas células, o que pode caracterizar um perfil menos inflamatório (KHAN SA KHOSO, 2017).

Já em relação ao plaquetograma, não foi observada diferença significativa na contagem de plaquetas (PLT), todavia, o volume plaquetário médio (MPV) está aumentado nos grupos com câncer CC e CLD em relação ao HC e HLD respectivamente. O MPV é um importante parâmetro para avaliar a função e a ativação plaquetária, pois, plaquetas com maiores volumes são mais ativas metabólica e enzimaticamente do que as menores e desempenham um papel central na angiogênese tumoral, assim como, plaquetas jovens possuem maiores volumes. As células malignas produzem citocinas, tais como a interleucina-1 e outros fatores de crescimento, que induzem a produção de plaquetas. Há evidências crescentes de que tumores e células endoteliais são influenciadas por VEGF, fatores de crescimento e interleucinas secretadas por plaquetas (HERAS *et al.*, 2010). Um fato importante é que MPV também está aumentado no grupo dose alta sem câncer (HHD), comparado ao HC e HLD, em que não há presença de tumor. Caso que pode estar relacionado com o aumento de citocinas, principalmente IL-6 (KASER *et al.*, 2001) observado nos tecidos adiposos, o qual induz a formação de plaquetas. As plaquetas são um tipo celular bastante sensível as alterações ambientais, e esse aumento de volume pode não estar necessariamente ligado a suplementação, sendo necessárias outras análises para corroborar com esses achados. Contudo, a trombopoiese, ou seja, formação e liberação de plaquetas, é relacionada aos níveis de IL-6, que estimula esse processo por meio da trombopoietina (KASER *et al.*, 2001). Isso corrobora com os níveis aumentados dessa citocina nos grupos HHD em BAT e WAT, podendo ser uma possível explicação para esse fato.

Outro parâmetro importante para avaliar inflamação sistêmica e síndromes metabólicas é a alteração da produção citocinas, e quimiocinas inflamatórias nos tecidos adiposos e no plasma, assim como de moléculas de adesão (RANGEL-HUERTA *et al.*, 2012). A administração de PUFAs n-3 em cultura celular e modelos animais demonstrou efeitos

anti-inflamatórios, diminuindo a liberação das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e proteína C-reativa (CRP) e reduzindo os níveis dos marcadores inflamatórios MCP-1 e TNF- $\alpha$  no tecido adiposo (KALUPAHANA *et al.*, 2010). Todavia, alguns estudos têm relatado a indução de mediadores inflamatórios, como MCP-1, IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (DEWELL *et al.*, 2011). Esses efeitos duais não devem ser interpretados necessariamente como algo não benéfico, pois, o aumento de citocinas pró-inflamatórias em tecidos adiposos, já foi relacionado ao aumento da atividade lipolítica, diminuindo a atividade lipogênica e, aumentando assim, a utilização de gordura e diminuindo a sua deposição (KALUPAHANA *et al.*, 2010). Isso demonstra o efeito dual que esses ácidos graxos podem exercer sobre parâmetros inflamatórios e que ser benéfico ou não, vai depender de diversos fatores.

Sabendo disso, foram avaliados os pesos, o perfil de citocinas e possíveis alterações histopatológicas do BAT e do sWAT. A partir desses dados, não foi possível observar diferença significativa no peso de BAT, assim como, nenhuma alteração histológica evidente. Todavia, foi possível observar um aumento de IL-6 dose dependente nos animais sem tumor, e um aumento no grupo CLD em relação ao CC e uma diminuição do grupo CHD em relação ao CLD e ao CC. A sinalização de IL-6 no BAT promove a polarização de macrófagos para o fenótipo M2 (MAUER *et al.*, 2014), assim como a sua depleção em camundongos, levou a indução de obesidade e resistência a insulina e aumento de FGF21 (STANFORD *et al.*, 2013), demonstrando possível regulação indireta ou direta dessa citocina, nesse tecido. Esses dados entram em contradição com os efeitos clássicos pró-inflamatórios já descritos dessa citocinas, relacionados com obesidade e diabete. Além disso, IL-6 está relacionada a ativação de 'browning', assim como lipólise em WAT. Com isso, fica evidente o papel pró e anti-inflamatório dessa citocina nos tecidos adiposos (OMRAN; CHRISTIAN, 2020). De maneira similar, as citocinas IL-33 e TGF- $\beta$ , nos grupos sem tumor, aumentaram no grupo dose alta em relação ao controle. A primeira é um citocina que também está relacionada ao processo de 'browning' e a ativação de BAT, pois, leva ao aumento do consumo energético e diminui o acúmulo de gordura (OLIVEIRA; TALVANI; ROCHA-VIEIRA, 2019). Isso ocorre porque a quantidade de IL-33 afeta a expressão de UCP-1 (MATHIS, 2016). A segunda, também está relacionada a alteração de adipócitos, pois está relacionada a inibição da adipogênese e a indução de adipócitos marrons pela ativação da via TGF- $\beta$ /Smad3 (YADAV; RANE, 2012).

Já nos grupos com câncer, IL-33 aumentou no grupo CLD em relação ao CC e diminuiu no grupo CHD em relação ao grupo CLD. O aumento de IL-33 é relacionado com um pior prognóstico e correlaciona-se com aumento de VEGF em tumores. Além disso, contribui para evasão imunitária tumoral ao promover a expansão e função imunossupressora das células supressoras derivadas de mielóide. Isso evidencia IL-33 como uma importante citocina pró-câncer no desenvolvimento do cancro da mama (XIAO *et al.*, 2015). Nesse contexto, ficou evidente que a dose baixa levou a um aumento dessa citocina, caracterizando um perfil mais pró-inflamatório e favorecedor do tumor, todavia, a dose alta levou a uma

redução expressiva, caracterizando uma ação antitumoral. Essa diminuição em CHD também foi mantida para TNF- $\alpha$  e MCP-1, que também estão associadas a um perfil mais inflamatório e pró-tumoral, assim como para TGF- $\beta$ , que está associada a promoção de processos que induzem a progressão do tumor, como a invasão de células tumorais, a disseminação e a evasão imunológica em cânceres de mama (MEULMEESTER; DIJKE, 2011).

De forma semelhante, no sWAT, IL-6 foi aumentada de forma dose dependente nos grupos sem câncer e TGF- $\beta$  foi aumentada no grupo CHD em relação à CLD, o que pode estar associado ao processo de amarronzamento do tecido como já descrito. Assim como o aumento na dose baixa em relação ao controle câncer e a diminuição dessas no grupo CHD. Todavia, nesse tecido foi possível observar uma diminuição de MCP-1, nos grupos com câncer, da dose alta em relação à baixa. Essa quimiocina induz uma resposta quimiotática em monócitos e células endoteliais, sendo fundamental para o recrutamento de monócitos inflamatórios para o microambiente tumoral, tal qual desempenha um papel essencial no processo de formação de metástases do câncer de mama (MOHAMED *et al.*, 2020).

A linhagem de carcinoma de mama 4T1 é uma linhagem celular altamente tumorigênica e invasiva, gerando metástases espontâneas a partir do tumor primário na glândula mamária para diversos sítios distantes, os quais incluem os linfonodos, o sangue, fígado, pulmão, cérebro, osso, baço, Intestino, rins e glândulas adrenais (TAO *et al.*, 2008; PASCHALL; LIU, 2016; YANG *et al.*, 2020; PULASKI; OSTRAND-ROSENBERG, 2000). Por outro lado, os n:3 PUFAs possuem atividade anti-angiogênica e anti-metastática (MERENDINO *et al.*, 2013). Devido a isso, foram analisados cortes histológicos do linfonodo inguinal, pulmão e baço para avaliar se as doses utilizadas teriam algum efeito protetor contra o desenvolvimento de metástases. Como resultado, foi possível observar a presença de êmbolos tumorais metastáticos em parênquima esplênico em todos os grupos com câncer, fato que não foi observado para os demais órgãos. Dessa forma, fica evidente que a suplementação não demonstrou atividade protetiva à metástase.

O consumo de uma dieta rica em gordura, ou sejam, dietas 'high fat' é relacionado ao acúmulo de lipídios renais, aumento de citocinas inflamatórias, a indução da retração dos glomérulos e a disfunção renal (MULLER *et al.*, 2019). Nesse contexto, foram realizados exames bioquímicos para avaliar a função renal e não foi possível observar alterações nos níveis de Ureia e Creatinina K no soro dos animais, evidenciando a não toxicidade renal da suplementação. Essas dietas também já foram relacionadas a danos hepáticos, como hepatite e esteatose, todavia, os n:3 PUFAs possuem efeitos contrários, como a diminuição da inflamação do órgão e redução de depósitos de gordura (ALBRACHT-SCHULTE *et al.*, 2019). Devido a isso, foram realizadas análises histológicas desse tecido, as quais evidenciaram a presença de focos de hepatite em todos os grupos com câncer. Todavia, essa condição não evidencia critérios de especificidade, como a presença de eosinófilos, balonização de hepatócitos, esteatose, granulomas ou elementos heterólogos, sendo, portanto, inespecífica e leve. Além disso, não foi possível observar necrose de hepatócitos.

Foi também avaliado o peso desse órgão e foi possível observar uma redução no grupo HHD em relação ao controle câncer, esse efeito já foram descritos devido à ação de n:3 PUFAs, que são metabolizados no fígado, e conseguem reduzir níveis inflamatórios e depósitos de WAT (PATTERSON *et al.*, 2012).

Já no grupo CHD, a massa do fígado não foi reduzida em decorrência da ação da dose alta, provavelmente em decorrência da presença de hepatite nos grupos com câncer. Também foram realizadas dosagens bioquímicas de parâmetros hepáticos do soro desses animais. As enzimas ALT e AST são parâmetros bastante utilizados para avaliar a toxicidade gerada nesse órgão, em que AST geralmente está mais associado a alterações histopatológicas. Contudo, esses dois parâmetros geralmente são utilizados em conjunto pra determinar danos hepáticos (KHATTAB *et al.*, 2015). Nesse cenário, os resultados mostraram uma diminuição de AST no grupo HHD em relação ao HC, o que pode corroborar com os dados de hepatite presente nesse grupo, mas como não ocorreu em conjunto com ALT, não caracteriza grandes danos teciduais, sendo assim, um dano leve. Alterações nos níveis de albumina também estão relacionados a casos avançados de patologias hepáticas, o que se deve a sua atuação na regulação de respostas imunológicas e inflamatórias, de liberação de citocinas e transporte de proteínas (JAGDISH; MARAS; SARIN, 2021) Os dados mostraram que não houve alteração dos níveis plasmáticos dessa proteína entre os grupos, o que corrobora com os baixos níveis de inflamação nesse órgão.

Diversos estudos já demonstraram, utilizando modelos de câncer de mama genéticos e transplantados em camundongos, os efeitos anti-tumorais dos n:3 PUFAs, principalmente DHA e EPA. Esses efeitos dependem da origem, da proporção e da alteração da taxa n:3/n:6 desses ácidos graxos. Já foram descritos efeitos de inibição do crescimento e aumento de morte celular e diminuição do aparecimento de metástases em doses que variam de 0,2 a 16 g/Kg (FASANO *et al.*, 2017). As medidas do volume tumoral, durante a suplementação, evidenciaram o aumento do tumor em todos os grupos, sem diferenças significativas ao calcular a área da curva de crescimento. Contudo, o volume final desses tumores foi diminuído nos grupos suplementados, havendo diferença significativa no grupo dose alta (CHD). Fica evidente, nesse contexto, que efeito antitumoral só passou a ser evidente a partir da oitava semana de suplementação e não se repetiu no grupo dose baixa (CLD).

As ações anti-tumorais desses ácidos graxos são bastante amplas e estão diretamente ligadas a suas ações anti-inflamatórias. Dessa forma, mecanismos que modulam a expressão de citocinas derivadas de NF- $\kappa$ B, como IL-6, TNF- $\alpha$  e MCP-1 (FAN; ZIRPOLI; QI, 2013), são utilizados como parâmetros para avaliar a agressividade e avanço tumoral. Por isso, foi avaliada a presença de citocinas no tumor, as quais podem ser originadas nas células tumorais, endoteliais ou imunológicas presentes. E foi possível observar uma diminuição significativa de IL-6 no grupo dose alta (CHD) em relação à CLD. Essa citocina é conhecida por causar carcinogênese e metástase através de várias vias de sinal.

A IL-6 induz a proliferação e diferenciação de células progenitoras precoces, primeiros megacariócitos progenitores, e tem um efeito direto sobre os megacariócitos utilizando receptores específicos (ADILI; HAWLEY; HOLINSTAT, 2018). Nos mesmos grupos, também foi observada uma redução de TGF- $\beta$ , que apesar de ter um perfil anti-inflamatório, está relacionada com o bloqueio da sinalização TGF- $\beta$ /Smad3, que aumenta a sensibilidade à insulina e previne a obesidade induzida pela dieta, promove o amarronzamento de WAT e diminui a infiltração de macrófagos inflamatórios (OMRAN; CHRISTIAN, 2020). Nesse contexto, a diminuição de IL-6 e TGF- $\beta$  corrobora com um perfil mais anti-inflamatório e, nesse caso, anti-tumoral. Alterações nas citocinas TNF- $\alpha$ , IL33 e MCP-1 em decorrência da suplementação nas mamas e nos tumores, não foram observadas, contudo, no tecido mamário houve uma diminuição de TGF- $\beta$  no grupo dose alta (HHD) em relação à dose baixa (HLD), o que sugere, um ambiente menos imunossuprimido, o que pode ajudar com um microambiente desfavorável a carcinogênese.

Devido à proliferação exacerbada, as células tumorais também possuem adaptações metabólicas que vão dar sustentação a esse crescimento, desse modo, as células neoplásicas passam por um 'shift', alteração, no metabolismo energético. A grande demanda energética e de biomoléculas é suprida por alterações na absorção de glicose e glutamina, assim como alterações na via glicolítica e do ciclo do ácido cítrico, mesmo em condições aeróbicas, de forma a desviar esqueletos carbônicos que iriam fosforilação oxidativa para biossíntese de diversas moléculas, como aminoácidos e ácidos graxos e nucleicos, característico do efeito Warburg (PAVLOVA; THOMPSON, 2016). Nesse contexto, foram feitas análises do perfil metabólico global dos tumores 4T1 e da mama, utilizando-se a análise GC-MS para, de modo a avaliar as possíveis modulações metabólicas decorrentes das diferentes doses da suplementação e quais separam o tumor do tecido mamário saudável. Foram encontradas 52 moléculas com diferenças significativas entre os grupos, dentre essas, aminoácidos, carboidratos, ácidos graxos, nucleotídeos, hormônios e ácidos orgânicos. A partir disso, foi possível observar um perfil metabólico distinto entre os grupos com e sem câncer. Alguns fármacos têm como alvo essas diferenças metabólicas, principalmente do metabolismo energético e já estão em desenvolvimento e investigação em estudos clínicos (TENNANT; DURÁN; GOTTLIEB, 2010). Foram também observadas algumas alterações em alguns ácidos graxos na mama dos animais sem câncer.

O câncer é considerado uma doença de base genética, no entanto, um dos principais motivos dessas alterações genéticas e de expressão gênica é criar um fenótipo metabólico essencial para o desenvolvimento tumoral (GATENBY; GILLIES, 2004). O tecido neoplásico demonstrou um aumento, em relação ao mamário, de pentoses relacionadas a via glicolítica, como galactose, manose, maltose e frutose, todavia uma diminuição de glicose. A modulação do metabolismo de carboidrato já é um das principais alterações metabólicas em cânceres (BOSE; LE, 2018), o que não é diferente em cânceres de mama, nesse contexto, as alterações de diversas pentoses já são conhecidas, assim como a diminuição de glicose,

como observada no presente estudo. A glicose é uma das principais fontes energéticas em neoplasias sendo fundamental como característica do efeito Warbor, dessa forma, a sua redução já é bem descrita na literatura (BUDCZIES *et al.*, 2012). Já em relação as outras pentoses, as alterações não podem ser delimitadas com precisão, devido à similaridade das moléculas e limitações da técnica. Dessa forma, novas abordagens experimentais se fazem necessárias para uma melhor identificação e discussão dessas moléculas. Foi observado também que a suplementação não influenciou no perfil desses carboidratos.

Outra desregulação metabólica presente em células tumorais é a do metabolismo de aminoácidos, principalmente de glutamato. O glutamato é produzido a partir de glutamina, que tem sua absorção aumentada em células de câncer, o qual é utilizado, também, como fonte energética ao ser metabolizado a piruvato, lactato e para produção de nucleotídeos. Dessa forma, a glutamina entra no CAC e, então, leva a produção de glutamato, gerando outros aminoácidos como prolina e arginina (DEBERARDINIS *et al.*, 2007). O glutamato derivado de glutamina funciona como um doador de nitrogênio para a síntese de diversos aminoácidos não essenciais por transaminação, principalmente advindos do CAC. A produção dessas moléculas é essencial para sustentar a proliferação das células tumorais (ZHANG *et al.*, 2014). Neste contexto, observamos que o tecido tumoral levou a uma tendência de aumento dos aminoácidos alanina, fenilalanina, tirosina, prolina treonina, valina, aspartato, leucina, serina, glicina e fumarato em relação aos tecidos mamários, fato característico das neoplasias e que não foi evidenciada influência das doses de n:3 PUFAS.

O metabolismo de nucleotídeos é também desregulado em processos de carcinogênese, fato diretamente relacionado a utilização de glutamina. Esta é usada para produção de uracila e timina, citosina e adenina, pois, a montagem dos anéis de pirimidina e purina utiliza de aspartato, o qual deriva do metabólito do CAC oxalacetato e do ácido glutâmico, que são catabólitos de glutamina. Dessa forma, a glutamina demonstra um papel central na síntese dessas biomoléculas, de forma que a sua escassez leva a parada célula na fase S, limitando a a progressão do ciclo celular (FONTENELLE; HENDERSON, 1969; GAGLIO *et al.*, 2009). Os resultados do perfil metabólico também evidenciaram uma alteração no metabolismo de nucleotídeos, de modo que, foi observada uma tendência de aumento de pirimidinas, uridinas e inosina nos grupos com câncer, todavia, as diferenças significativas foram restritas ao aumento no grupo CLD em comparação ao HLD, fato que não foi observado comparando as doses altas e os controles não suplementados. Isso demonstra que a suplementação por si só, nem a presença do câncer levou a aumentos dessas moléculas, somente a dose baixa com câncer (CHD) teve um aumento significativo. Isso pode ser em decorrência de um efeito sinérgico da dose baixa e o tumor.

A mama e o câncer de mama são considerados tecidos endócrinos. Diversos hormônios já foram estudados e demonstraram ter relação com o desenvolvimento, progressão e agressividade tumoral. Dentre eles, os hormônios sexuais esteroides, produzidos a partir de colesterol, estrógenos e andrógenos, são cruciais para o desenvolvimento de câncer



de mama a partir da interação com receptores específicos. A ação dos estrógenos está ligada a uma 'up' regulação de oncogenes, já os andrógenos, na 'down' regulação de proto-oncogenes (CACERES *et al.*, 2018). Desse modo, o colesterol é primeiramente convertido à pregnenolona e, a partir dela, dá origem aos demais hormônios esteróis (HARTENECK, 2013). Nesse contexto, foi observado uma tendência de aumento de pregnenolona nos grupos com câncer em relação ao tecido mamário, todavia, somente nos grupos que foram suplementados (CLD e CHD) em relação os suplementados sem câncer (HLD e HHD). O consumo de n:3 PUFAs já foi relacionado a uma melhora no perfil lipídico, principalmente pela diminuição de triglicerídeos e LDL. Todavia, os níveis de colesterol não foram influenciados ou foram minimamente (ABDELHAMID *et al.*, 2020). Dessa forma, essas diferenças possivelmente decorrem da influência no metabolismo lipídico em conjunto com a influência dos próprios tumores nos grupos com câncer e suplementação.

O tecido adiposo é o principal órgão responsável pela estocagem de lipídeos e possui uma grande plasticidade fenotípica. Juntamente a isso, exerce diversas atividades metabólicas, fisiológicas, as quais conferem funções distintas, atuando diretamente em vias inflamatórias e no estabelecimento e desenvolvimento tumoral (PICON-RUIZ *et al.*, 2017). A incorporação de ácidos graxos nas células modula diversos fatores no metabolismo lipídico, como os níveis plasmáticos de colesterol e triglicerídios, assim como a produção de mediadores lipídicos e citocinas (RODRÍGUEZ-CRUZ; SERNA, 2017). Nesse contexto, a partir do perfil metabólico, foi possível identificar alguns ácidos graxos com abundância diferenciada em decorrência da suplementação. Por exemplo, o ácido oleico, que é um ácido graxo de ômega 9, e o ácido palmitoleico, o qual representa os ácidos de ômega-7, não essenciais e ambos da classe dos ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs). Esses ácidos desempenham diversas funções no organismo, desde modulação da inflamação e do estresse oxidativo, homeostase de coagulação, de glicose e da pressão sanguínea (BERMUDEZ *et al.*, 2011).

O consumo de ácido oleico, principalmente a partir de azeite de oliva, é associado a diminuição do risco de desenvolver pelo aumento dos níveis de leucotrieno A3, um potente inibidor do LTB4 pró-inflamatório (BERBERT *et al.*, 2005), assim como levou a apoptose e a diminuição da expressão de COX e Bcl-2 em células HT-29 de câncer colorretal (LLOR *et al.*, 2003) e em relação ao câncer de mama, ele levou a uma redução da expressão do oncogene Her-2 (MENENDEZ *et al.*, 2005). O consumo de MUFAs e o seu armazenamento no tecido adiposo é relacionado com um menor risco de desenvolvimento de câncer de mama (GUO *et al.*, 2021). Um aumento de ácido palmitoleico, também já foi associado a um risco diminuído de câncer de mama (POUCHIEU *et al.*, ). Isso evidencia um potencial efeito protetor desses compostos quando presente no tecido adiposo associado as mamas. Nesse contexto, foi possível observar uma redução desses lipídeos na mama do grupo dose baixa em relação ao CH e um aumento na dose alta em relação à baixa. Dessa forma, fica evidente que apenas a dose alta conseguiu garantir maior efeito protetor nessas mamas. O

ácido vacênico foi outro ácido graxo que demonstrou uma redução na mama do grupo HLD em relação a CC e um aumento no grupo HHD em relação a HLD. Esse lipídeo participa na transdução de sinal do citoplasma para as membranas celulares, e ativa enzimas e receptores de membrana que protegem as células do hospedeiro e mantêm a homeostase celular. Além disso, já demonstrou um efeito em reduzir a proliferação de células de câncer colorretal *in vitro* (CICHOSZ; CZECZOT; BIELECKA, 2020).

Dessa forma, ficou evidente a influência do DHA nos animais suplementados, que vão desde papéis duais no crescimento tumoral, assim como na modulação dos tecidos adiposos, alterações inflamatórias e metabólicas no microambiente tumoral. Contudo, análises complementares são fundamentais para corroborar e enriquecer o trabalho. Para isso, como próximos passos, serão feitas análises de microbiota das fezes e dosagem de metabólitos bacterianos do intestino dos animais para melhor explicar o episódio de diarreia nos animais suplementados com a dose alta. Tal como, realizar análises de hipertrofia e hiperplasia, a partir da histologia por microscopia, dos tecidos adiposos para confirmar a indução de 'browning' em WAT e nos adipócitos associados a mama.

## 6 Conclusão

Em suma, foram observadas diferenças, as quais tiveram influências das duas doses de DHA utilizadas, em alguns casos, efeitos duais, assim como diferenças em relação à presença ou não do câncer de mama. Dentro desse contexto, foi possível observar que a suplementação com dose alta, em animais sem câncer (HHD), foi capaz de promover a redução do peso dos animais. Por outro lado, foi observado o mesmo fenômeno para os animais com câncer suplementados com baixa dose de DHA. Contrariamente, não foi observada diferença significativa no peso dos animais HHD o que pode se mostrar como uma vantagem clínica, uma vez que a caquexia, síndrome metabólica irreversível associada a perda de massa magra, podendo ou não estar associada a perda de tecido adiposo, é um prognóstico clínico fatal e característico da progressão da linhagem 4T1. Ademais, todos os animais com câncer apresentaram hepatite no fígado e metástase no baço, sem haver alguma influência do DHA, o que mostra que nenhuma das concentrações foi capaz de inibir a formação de metástase. Assim como todos os grupos suplementados com a dose alta, apresentaram diarreia. Já em relação às alterações sistêmicas, houve redução de IL-1 $\beta$ , no grupo com câncer dose alta ratificando a capacidade de modulação do perfil inflamatório mediado pelo DHA. As diferenças significativas dos testes hematológicos e bioquímicos, função renal e hepática, aconteceram de forma isolada e dentro das taxas de variação aceitáveis de cada parâmetro, pondo em voga, a não toxicidade das doses administradas nos animais com ou sem câncer, em destaque a não toxicidade da dose alta. Tendo em vista o lipidograma, houve a diminuição de triglicerídeos em resposta a dose alta nos animais sem câncer (Figura 36).

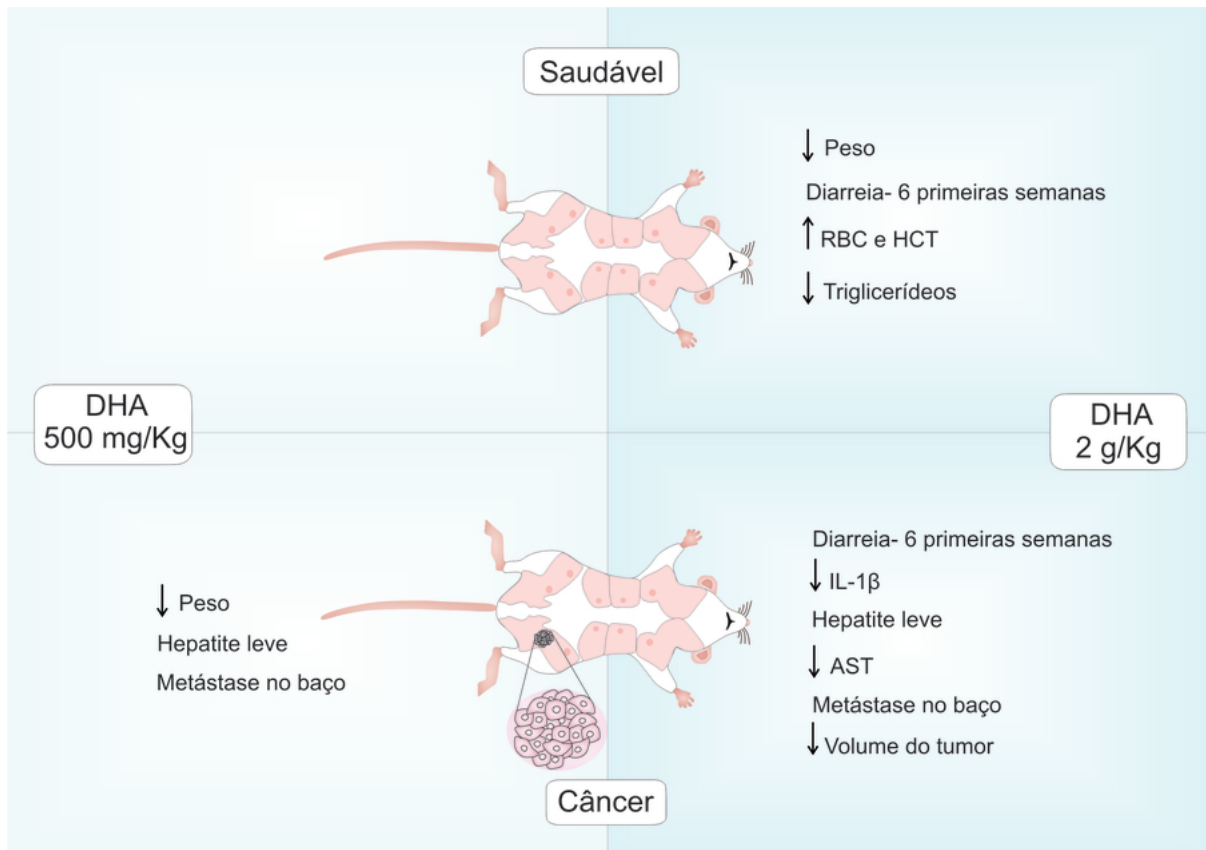
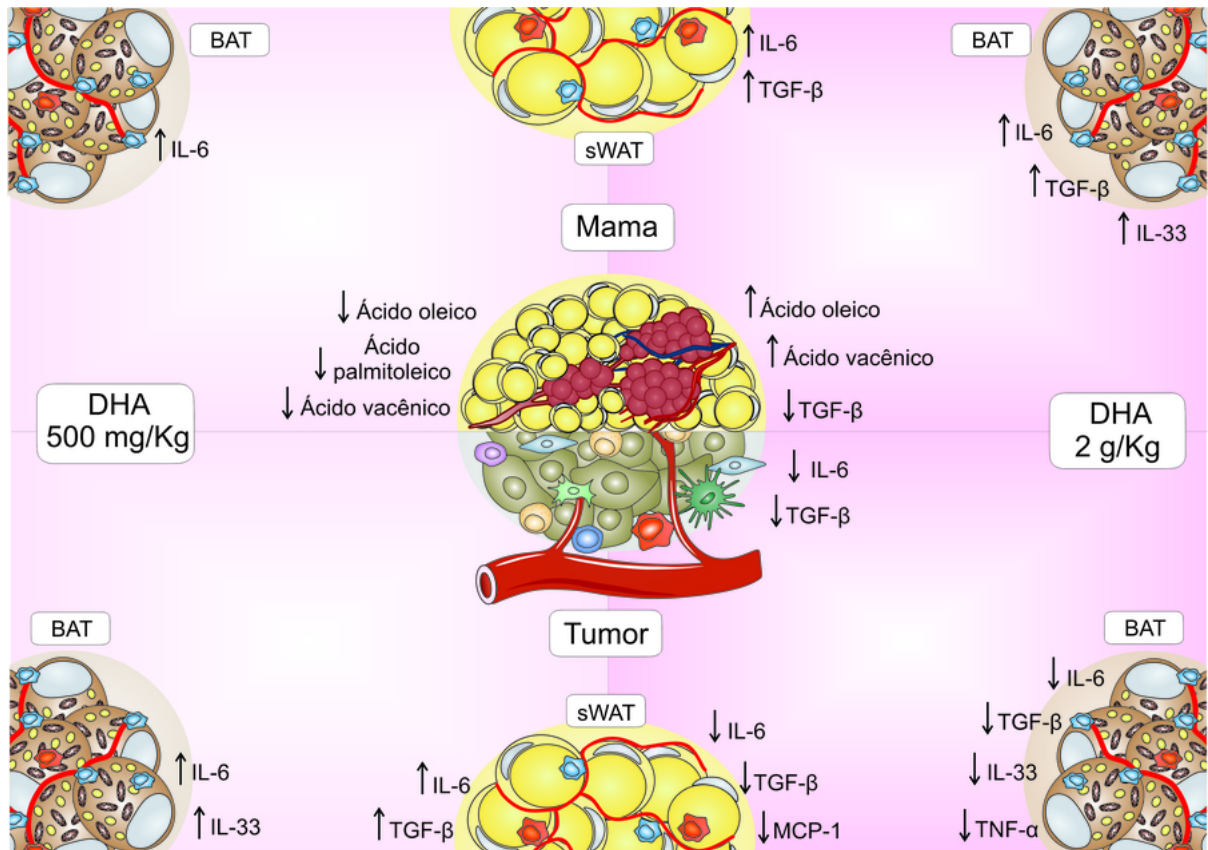


Figura 36 – Efeitos significativos decorrente dos tratamentos com DHA nos animais. RBC: Eritrócitos; HCT: Hematócrito; AST: Aspartato aminotransferase; IL: Interleucina.

Levando em consideração a dose alta, ficou evidente a diminuição de citocinas pró-inflamatórias nos tecidos adiposos dos animais com câncer, o que pode ser característico da inibição de NF- $\kappa$ B ou da modulação da produção de eicosanoides promovida pelo DHA, todavia são necessárias mais análises para confirmar esses processos. Contrariamente, algumas citocinas foram aumentadas nos tecidos adiposos dos animais sem câncer e, apesar dos efeitos esperados do DHA em reduzi-las, elas são fundamentais para a possível ativação de BAT e do 'browning', que também é induzido pelo DHA. Em continuação, o volume final do tumor foi diminuído na dose alta, tal como, as diferenças significativas do perfil metabólico aconteceram principalmente devido às alterações metabólicas adquiridas por células neoplásicas. Por outro lado, o perfil metabólico do tecido mamário, demonstrou diferenças significativas em resposta as doses de DHA, no qual foi observado o aumento de ácidos graxos que podem atuar contra o desenvolvimento tumoral, como o ácido oleico e o vacênico. Levando em consideração a dose baixa, ficou evidente o aumento de citocinas nos tecidos adiposos, o que pode estar relacionado a característica termogênicas e lipolíticas adquiridas por essas células, como já descrito. Além disso, o perfil metabólico mamário evidenciou a redução dos ácidos oleico, palmitoleico e vacênico, os quais estão envolvidos em processos antineoplásico (Figura 37).



**Figura 37 – Alterações no perfil inflamatório e metabólico dos tecidos adiposos, da mama e do tumor em decorrência da suplementação. BAT: Tecido adiposo marrom; sWAT: Tecido adiposo branco subcutâneo; IL-6 - Interleucina 6; IL-33 - Interleucina 33; TNF- $\alpha$  - fator de necrose tumoral  $\alpha$ ; MCP1 - proteína quimioatrativa de monócito 1; TGF- $\beta$  - Fator de transformação do crescimento  $\beta$ .**

A partir de todos os dados apresentados, fica evidente o papel diferencial das doses, em que foi observado a ação da dose alta em conseguir atenuar o crescimento tumoral, evitar a perda de peso, levar a um perfil mais anti-inflamatório nos tecidos adiposos e no tumor dos animais com câncer. Por último, nos animais saudáveis, foi capaz de modular o metabolismo da mama, levando a um aumento de ácidos graxos com ações anti-tumorais, assim como ao aumento de citocinas envolvidas na ativação de BAT e de 'browning', o que leva a um microambiente desfavorável a carcinogênese, caracterizando um efeito protetor contra o desenvolvimento de câncer de mama.

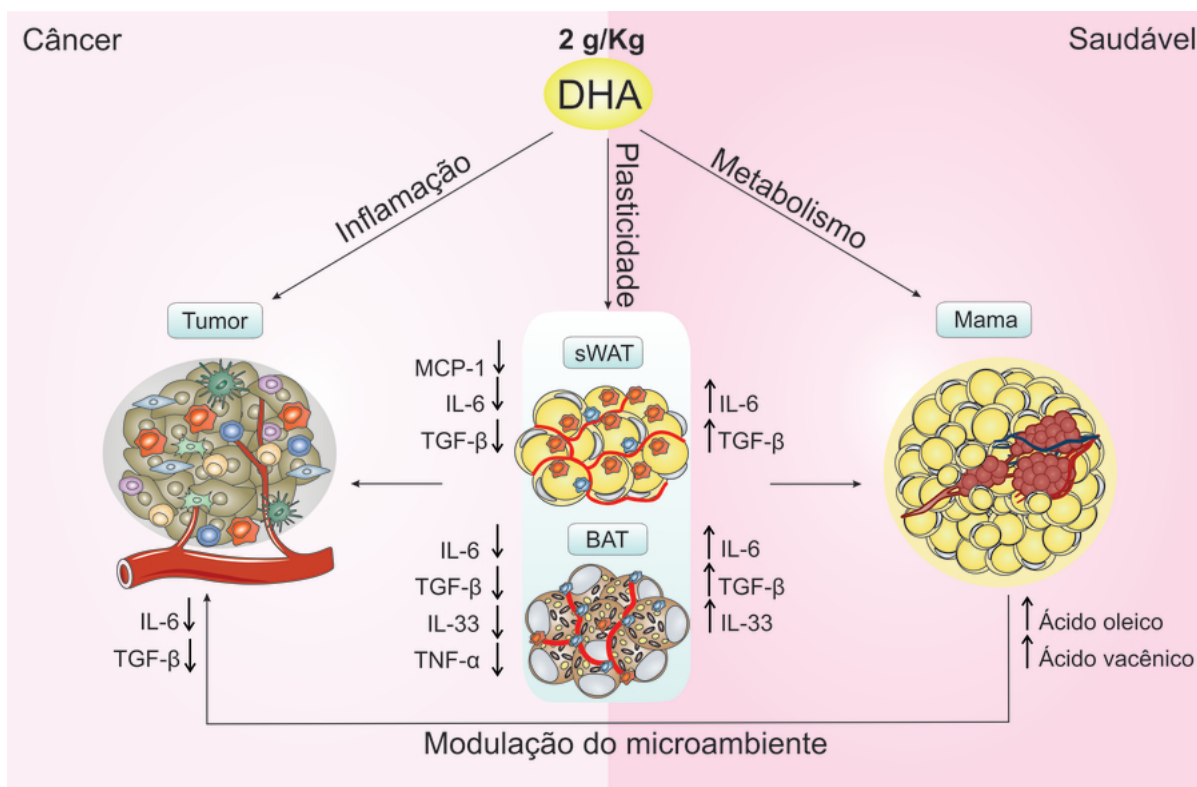


Figura 38 – Efeitos da suplementação com a dose alta (2 g/Kg) no microambiente tumoral, tecidos adiposos e tumor nos animais. BAT: Tecido adiposo marrom; sWAT: Tecido adiposo branco subcutâneo; IL-6 - Interleucina 6; IL-33 - Interleucina 33; TNF- $\alpha$  - fator de necrose tumoral  $\alpha$ ; MCP1 - proteína quimioatrativa de monócito 1; TGF- $\beta$  - Fator de transformação do crescimento  $\beta$ .

## Referências

ABDELHAMID, A. S. *et al.* Omega-3 fatty acids for the primary and secondary prevention of cardiovascular disease. v. 2020, n. 3, 2 2020. Disponível em: [/pmc/articles/PMC7049091/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3749091/)  
[/pmc/articles/PMC7049091/?report=abstracthttps://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7049091/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3749091/?report=abstracthttps://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7049091/). Acesso em: 2022-07-16T00:00:00+00:00.

ADILI, R.; HAWLEY, M.; HOLINSTAT, M. Regulation of platelet function and thrombosis by omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids. v. 139, p. 10 – 11 2018. Disponível em: [/pmc/articles/PMC6242736/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30242736/)  
[/pmc/articles/PMC6242736/?report=abstracthttps://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6242736/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30242736/?report=abstracthttps://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6242736/). Acesso em: 2022-07-14T00:00:00+00:00.

AL-DARAJI, H. J. *et al.* Effect of dietary supplementation with sources of omega-3 and omega-6 fatty acids on certain blood characteristics of laying quail. v. 9, n. 7, p. 689 – 694, 2010.

ALBRACHT-SCHULTE, K. *et al.* Eicosapentaenoic Acid Improves Hepatic Metabolism and Reduces Inflammation Independent of Obesity in High-Fat-Fed Mice and in HepG2 Cells. v. 11, n. 3, 3 2019. Disponível em: [/pmc/articles/PMC6471632/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32471632/)  
[/pmc/articles/PMC6471632/?report=abstracthttps://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6471632/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32471632/?report=abstracthttps://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6471632/). Acesso em: 2022-07-24T00:00:00+00:00.

ALBRACHT-SCHULTE, K. *et al.* Omega-3 fatty acids in obesity and metabolic syndrome: a mechanistic update. v. 58, p. 1 – 16, 8 2018. Acesso em: 2022-07-11T00:00:00+00:00.

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. **4T1** | **ATCC**. Disponível em: <https://www.atcc.org/products/crl-2539>. Acesso em: 2022-06-12T00:00:00+00:00.

ANDRADE, L. R. D. *et al.* Tumor cell death in orthotopic breast cancer model by NanoALA: a novel perspective on photodynamic therapy in oncology. v. 15, n. 10, p. 1019 – 1036, 4 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32264766/>. Acesso em: 2022-05-16T00:00:00+00:00.

ANIL, E. The impact of EPA and DHA on blood lipids and lipoprotein metabolism: influence of apoE genotype. v. 66, n. 1, p. 60 – 68, 2 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17343773/>. Acesso em: 2022-06-09T00:00:00+00:00.

ARENDRT, L. M. *et al.* Obesity promotes breast cancer by CCL2-mediated macrophage recruitment and angiogenesis. v. 73, n. 19, p. 6080 – 6093, 10 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23959857/>. Acesso em: 2022-06-07T00:00:00+00:00.

BENZ, C. C. Impact of aging on the biology of breast cancer. v. 66, n. 1, p. 65 – 74, 4 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17949989/>. Acesso em: 2022-06-07T00:00:00+00:00.

BERBERT, A. A. *et al.* Supplementation of fish oil and olive oil in patients with rheumatoid arthritis. v. 21, n. 2, p. 131 – 136, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15723739/>. Acesso em: 2022-07-24T00:00:00+00:00.

BERMUDEZ, B. *et al.* Oleic Acid in Olive Oil: From a Metabolic Framework Toward a Clinical Perspective. v. 17, n. 8, p. 831 – 843, 4 2011. Acesso em: 2022-07-24T00:00:00+00:00.

- BIANCHINI, G. *et al.* Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. v. 13, n. 11, p. 674 – 690, 11 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27184417/>. Acesso em: 2022-06-11T00:00:00+00:00.
- BONORA, M. *et al.* ATP synthesis and storage. v. 8, n. 3, p. 343 –, 9 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23360099/>. Acesso em: 2022-06-07T00:00:00+00:00.
- BOSE, S.; LE, A. Glucose Metabolism in Cancer. v. 1063, p. 3 – 12, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29946772/>. Acesso em: 2022-07-15T00:00:00+00:00.
- BRAY, F. *et al.* 394 CA: A Cancer Journal for Clinicians Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. v. 68, p. 394 – 424, 2018.
- BRAZ-DE-MELO, H. A. *et al.* Potential neuroprotective and anti-inflammatory effects provided by omega-3 (DHA) against Zika virus infection in human SH-SY5Y cells. v. 9, n. 1, p. 1 – 12, 12 2019. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-56556-y>. Acesso em: 2022-06-07T00:00:00+00:00.
- BUDCZIES, J. *et al.* Remodeling of central metabolism in invasive breast cancer compared to normal breast tissue - a GC-TOFMS based metabolomics study. v. 13, n. 1, p. 1 – 11, 7 2012. Disponível em: <https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-13-334>. Acesso em: 2022-06-07T00:00:00+00:00.
- CACERES, S. *et al.* In vitro and in vivo effect of flutamide on steroid hormone secretion in canine and human inflammatory breast cancer cell lines. v. 16, n. 1, p. 148 – 158, 3 2018. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/vco.12324><https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/vco.12324><https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/vco.12324>. Acesso em: 2022-07-15T00:00:00+00:00.
- CAI, L. *et al.* Acetyl-CoA induces cell growth and proliferation by promoting the acetylation of histones at growth genes. v. 42, n. 4, p. 426 – 437, 5 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21596309/>. Acesso em: 2022-06-17T00:00:00+00:00.
- CALDER, P. C. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: from molecules to man. v. 45, n. 5, p. 1105 – 1115, 10 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28900017/>. Acesso em: 2022-06-12T00:00:00+00:00.
- CAO, D. *et al.* Docosahexaenoic acid promotes hippocampal neuronal development and synaptic function. **Journal of neurochemistry**, v. 111, n. 2, p. 510 – 521, 10 2009. ISSN 0022-3042. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19682204/>. Acesso em: 2022-06-10T00:00:00+00:00.
- CAO, L.; NIU, Y. Triple negative breast cancer: special histological types and emerging therapeutic methods. v. 17, n. 2, p. 293 –, 5 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3309458/>. Acesso em: 2022-05-25T00:00:00+00:00.
- CETIN, G. Y. *et al.* Evaluation of the Mean Platelet Volume and Red Cell Distribution Width in FMF: Are They Related to Subclinical Inflammation or Not? v. 2014, p. 1 – 5, 2014. Acesso em: 2022-07-12T00:00:00+00:00.



- CHANG, H. Y. *et al.* Docosahexaenoic acid induces M2 macrophage polarization through peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  activation. v. 120, p. 39 – 47, 1 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25445227/>. Acesso em: 2022-06-12T00:00:00+00:00.
- CHO, H. J. *et al.* Free Fatty Acid Receptor 4 Mediates the Beneficial Effects of n-3 Fatty Acids on Body Composition in Mice. v. 101.
- CICHOSZ, G.; CZECZOT, H.; BIELECKA, M. The anticarcinogenic potential of milk fat. v. 27, n. 4, p. 512 – 518, 2020. Disponível em: [www.aaem.pl](http://www.aaem.pl).
- CINTI, S. Pink Adipocytes. v. 29, n. 9, p. 651 – 666, 9 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30017740/>. Acesso em: 2022-06-07T00:00:00+00:00.
- COELHO, M.; OLIVEIRA, T.; FERNANDES, R. Biochemistry of adipose tissue: An endocrine organ. v. 9, n. 2, p. 191 – 200, 4 2013. Acesso em: 2022-06-07T00:00:00+00:00.
- COLOZZA, M. *et al.* Proliferative markers as prognostic and predictive tools in early breast cancer: where are we now? v. 16, n. 11, p. 1723 – 1739, 11 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15980158/>. Acesso em: 2022-05-24T00:00:00+00:00.
- COMMISSO, C. *et al.* Macropinocytosis of protein is an amino acid supply route in Ras-transformed cells. v. 497, n. 7451, p. 633 – 637, 5 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23665962/>. Acesso em: 2022-06-11T00:00:00+00:00.
- COOPER, G. M.; HAUSMAN, R. E. The Development and Causes of Cancer. p. 743 –, 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>. Acesso em: 2020-03-10T00:00:00+00:00.
- CORRÊA; HEYN; MAGALHAES. The Impact of the Adipose Organ Plasticity on Inflammation and Cancer Progression. v. 8, n. 7, p. 662 –, 6 2019. Acesso em: 2020-04-16T00:00:00+00:00.
- CORRÊA, L. H. *et al.* Adipocytes and Macrophages Interplay in the Orchestration of Tumor Microenvironment: New Implications in Cancer Progression. v. 8, n. SEP, 9 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28970834/>. Acesso em: 2022-06-07T00:00:00+00:00.
- COSTANTINI, L. *et al.* **Impact of omega-3 fatty acids on the gut microbiota.** 2017. Disponível em: [/pmc/articles/PMC5751248//pmc/articles/PMC5751248/?report=abstracthttps://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5751248/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35751248/). Acesso em: 2021-04-08T00:00:00+00:00.
- DEBERARDINIS, R. J. *et al.* The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. v. 7, n. 1, p. 11 – 20, 1 2008. Acesso em: 2022-05-19T00:00:00+00:00.
- DEBERARDINIS, R. J. *et al.* Beyond aerobic glycolysis: Transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. v. 104, n. 49, p. 19345 – 19350, 12 2007. Disponível em: [www.pnas.org/cgi/content/full/](http://www.pnas.org/cgi/content/full/). Acesso em: 2022-07-15T00:00:00+00:00.
- DENG, T. *et al.* Obesity, Inflammation, and Cancer. v. 11, p. 421 – 449, 5 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27193454/>. Acesso em: 2022-06-07T00:00:00+00:00.

- DENKERT, C. *et al.* Molecular alterations in triple-negative breast cancer-the road to new treatment strategies. v. 389, n. 10087, p. 2430 – 2442, 6 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27939063/>. Acesso em: 2022-06-11T00:00:00+00:00.
- DEWELL, A. *et al.* Low- and high-dose plant and marine (n-3) fatty acids do not affect plasma inflammatory markers in adults with metabolic syndrome. v. 141, n. 12, p. 2166 – 2171, 12 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22031659/>. Acesso em: 2022-07-19T00:00:00+00:00.
- DIVSALAR, B. *et al.* Hematological Parameters Changes in Patients with Breast Cancer. v. 67, n. 8, p. 1832 – 1840, 8 2021a. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34383417/>. Acesso em: 2022-07-12T00:00:00+00:00.
- DIVSALAR, B. *et al.* Hematological parameters changes in patients with breast cancer. v. 67, n. 8, p. 1832 – 1840, 8 2021b. Acesso em: 2022-07-19T00:00:00+00:00.
- DUTTA, D. *et al.* Leptin and cancer: Pathogenesis and modulation. v. 16, n. Suppl 3, p. 596 – , 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23565495/>. Acesso em: 2022-06-07T00:00:00+00:00.
- DYALL, S. C. Long-chain omega-3 fatty acids and the brain: a review of the independent and shared effects of EPA, DPA and DHA. v. 7, n. APR, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25954194/>. Acesso em: 2022-06-09T00:00:00+00:00.
- ECHEVERRÍA, F. *et al.* Docosahexaenoic acid (DHA), a fundamental fatty acid for the brain: New dietary sources. v. 124, p. 1 – 10, 9 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28870371/>. Acesso em: 2022-06-12T00:00:00+00:00.
- FAN, C.; ZIRPOLI, H.; QI, K. N-3 fatty acids modulate adipose tissue inflammation and oxidative stress. v. 16, n. 2, p. 124 – 132, 3 2013. Disponível em: [https://journals.lww.com/clinicalnutrition/Fulltext/2013/03000/n\\_3\\_fatty\\_acids\\_modulate\\_adipose\\_tissue.3.aspx](https://journals.lww.com/clinicalnutrition/Fulltext/2013/03000/n_3_fatty_acids_modulate_adipose_tissue.3.aspx). Acesso em: 2022-07-04T00:00:00+00:00.
- FASANO, E. *et al.* Long-chain n-3 PUFA against breast and prostate cancer: Which are the appropriate doses for intervention studies in animals and humans? v. 57, n. 11, p. 2245 – 2262, 7 2017. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2013.850060>. Acesso em: 2022-06-08T00:00:00+00:00.
- FAUSTINO-ROCHA, A. *et al.* Estimation of rat mammary tumor volume using caliper and ultrasonography measurements. v. 42, n. 6, p. 217 – 224, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/labon.254>.
- FENZL, A.; KIEFER, F. W. Brown adipose tissue and thermogenesis. v. 19, n. 1, p. 25 – 37, 7 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25390014/>. Acesso em: 2022-06-07T00:00:00+00:00.
- FONTENELLE, L. J.; HENDERSON, J. F. Sources of nitrogen as rate-limiting factors for purine biosynthesis de novo in Ehrlich ascites tumor cells. v. 177, n. 1, p. 88 – 93, 2 1969. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4305525/>. Acesso em: 2022-07-15T00:00:00+00:00.

- FREITAS, R. D.; CAMPOS, M. M. Protective Effects of Omega-3 Fatty Acids in Cancer-Related Complications. v. 11, n. 5, 5 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31035457/>. Acesso em: 2021-11-25T00:00:00+00:00.
- FRIEDMAN, J. M. Leptin and the endocrine control of energy balance. v. 1, n. 8, p. 754 – 764, 8 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32694767/>. Acesso em: 2022-05-26T00:00:00+00:00.
- GAGLIO, D. *et al.* Glutamine Deprivation Induces Abortive S-Phase Rescued by Deoxyribonucleotides in K-Ras Transformed Fibroblasts. v. 4, n. 3, p. e4715 –, 3 2009. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0004715>. Acesso em: 2022-07-15T00:00:00+00:00.
- GATENBY, R. A.; GILLIES, R. J. Why do cancers have high aerobic glycolysis? v. 4, n. 11, p. 891 – 899, 11 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15516961/>. Acesso em: 2022-07-15T00:00:00+00:00.
- GIORDANO, A. *et al.* White, brown and pink adipocytes: the extraordinary plasticity of the adipose organ. v. 170, n. 5, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24468979/>. Acesso em: 2022-06-07T00:00:00+00:00.
- GOBBI, H. Classificação dos tumores da mama: atualização baseada na nova classificação da Organização Mundial da Saúde de 2012. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, scielo, v. 48, n. 6, p. 463 – 474, 12 2012. ISSN 1676-2444. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/jbpm/a/TrwKCnFgcr6bZ438KJFLKLc/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 2022-06-11T00:00:00+00:00.
- GOLDHIRSCH, A. *et al.* Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. v. 22, n. 8, p. 1736 –, 8 2011. Disponível em: [/pmc/articles/PMC3144634/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3144634/)[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3144634/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3144634/?report=abstracthttps://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3144634/). Acesso em: 2022-05-25T00:00:00+00:00.
- GONG, Y. *et al.* Metabolic-Pathway-Based Subtyping of Triple-Negative Breast Cancer Reveals Potential Therapeutic Targets. v. 33, n. 1, p. 51 – 64.e9, 1 2021. Acesso em: 2022-05-25T00:00:00+00:00.
- GUO, F. *et al.* The association between fatty acid intake and breast cancer based on the NHANES and Mendelian randomization study. v. 73, 8 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34146915/>. Acesso em: 2022-07-24T00:00:00+00:00.
- HAMES, K. C. *et al.* Adipose Tissue Fatty Acid Storage Factors: Effects of Depot, Sex and Fat Cell Size. v. 39, n. 6, p. 884 –, 6 2015. Disponível em: [/pmc/articles/PMC4464947/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4464947/)[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4464947/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4464947/?report=abstracthttps://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4464947/). Acesso em: 2022-06-10T00:00:00+00:00.
- HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. v. 12, n. 1, p. 31 – 46, 1 2022. Disponível em: <https://aacrjournals.org/cancerdiscovery/article/12/1/31/675608/Hallmarks-of-Cancer-New-DimensionsHallmarks-of>. Acesso em: 2022-04-30T00:00:00+00:00.

- HANAHAHAN, D.; COUSSENS, L. M. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. v. 21, n. 3, p. 309 – 322, 3 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22439926/>. Acesso em: 2022-06-17T00:00:00+00:00.
- HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. v. 144, n. 5, p. 646 – 674, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. **The Hallmarks of Cancer**. [S.l.], 2000. 57 – 70 p. Disponível em: <http://www.cell.com/article/S0092867400816839/fulltext><http://www.cell.com/article/S0092867400816839/abstract>[https://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674\(00\)81683-9](https://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674(00)81683-9). Acesso em: 2022-04-30T00:00:00+00:00.
- HARBECK, N.; GNANT, M. Breast cancer. v. 389, n. 10074, p. 1134 – 1150, 2017. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31891-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31891-8).
- HARTENECK, C. Pregnenolone Sulfate: From Steroid Metabolite to TRP Channel Ligand. v. 18, n. 10, p. 12012 –, 10 2013. Disponível em: </pmc/articles/PMC6270300/></pmc/articles/PMC6270300/?report=abstract><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6270300/>. Acesso em: 2022-07-15T00:00:00+00:00.
- HEIDEN, M. G. V.; CANTLEY, L. C.; THOMPSON, C. B. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 324, n. 5930, p. 1029 – 1033, 5 2009. ISSN 0036-8075. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2849637/>.
- HENSLER, M. *et al.* The inhibition of fat cell proliferation by n-3 fatty acids in dietary obese mice. v. 10, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21810216/>. Acesso em: 2022-06-12T00:00:00+00:00.
- HERAS, P. *et al.* Platelet count and tumor progression in gastric cancer patients. v. 45, n. 7-8, p. 1005 – 1006, 8 2010. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/00365521003797221>. Acesso em: 2022-07-13T00:00:00+00:00.
- HISHIKAWA, D. *et al.* Metabolism and functions of docosahexaenoic acid-containing membrane glycerophospholipids. v. 591, n. 18, p. 2730 – 2744, 9 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28833063/>. Acesso em: 2022-06-12T00:00:00+00:00.
- HOLUB, B. J. Docosahexaenoic acid (DHA) and cardiovascular disease risk factors. v. 81, n. 2-3, p. 199 – 204, 8 2009. Acesso em: 2022-06-09T00:00:00+00:00.
- HUERTA-YÉPEZ, S.; TIRADO-RODRIGUEZ, A. B.; HANKINSON, O. Role of diets rich in omega-3 and omega-6 in the development of cancer. v. 73, n. 6, p. 446 – 456, 11 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29421289/>. Acesso em: 2022-06-12T00:00:00+00:00.
- INCA. **Estimativa 2020**: Incidência de Cancer no Brasil. RIO DE JANEIRO: Serviço de Educação e Informação Técnico-Científica Área de Edição e Produção de Materiais Técnico-Científicos, 2020. 120 p. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>. Acesso em: 05/08/2021.
- INCA, I. N. do C. **O que é câncer ?** 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>. Acesso em: 2020-03-10T00:00:00+00:00.

JAGDISH, R. K.; MARAS, J. S.; SARIN, S. K. Albumin in Advanced Liver Diseases: The Good and Bad of a Drug! v. 74, n. 5, p. 2021 –, 2021.

JING, K.; WU, T.; LIM, K. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Cancer. v. 13, n. 8, p. 1162 – 1177, 2013.

JONES, R. G.; THOMPSON, C. B. Tumor suppressors and cell metabolism: A recipe for cancer growth. v. 23, n. 5, p. 537 – 548, 2009.

JONG, J. M. de *et al.* The  $\beta$ 3-adrenergic receptor is dispensable for browning of adipose tissues. v. 312, n. 6, p. E508 – E518, 6 2017. Disponível em: <https://journals.physiology.org/doi/10.1152/ajpendo.00437.2016>. Acesso em: 2022-06-07T00:00:00+00:00.

KALUPAHANA, N. S. *et al.* Eicosapentaenoic acid prevents and reverses insulin resistance in high-fat diet-induced obese mice via modulation of adipose tissue inflammation. v. 140, n. 11, p. 1915 – 1922, 11 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20861209/>. Acesso em: 2022-07-19T00:00:00+00:00.

KASER, A. *et al.* Interleukin-6 stimulates thrombopoiesis through thrombopoietin: role in inflammatory thrombocytosis. v. 98, n. 9, p. 2720 – 2725, 11 2001. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article/98/9/2720/53485/Interleukin-6-stimulates-thrombopoiesis-through>. Acesso em: 2022-07-22T00:00:00+00:00.

KHAN SA KHOSO, S. M. A. A. G. N. S. Study of some haematological parameters as biomarker for breast cancer populations of Sindh. **Sindh Univ. Res. Jour.**, v. 49, n. 1, p. 23 – 28, 2017.

KHATTAB, H. *et al.* Relation of ALT and AST levels to the histopathological changes in liver biopsies of patients with chronic hepatitis C genotype 4. v. 16, n. 2, p. 50 – 53, 6 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26184441/>. Acesso em: 2022-07-26T00:00:00+00:00.

KIR, S.; SPIEGELMAN, B. M. CACHEXIA & BROWN FAT: A BURNING ISSUE IN CANCER. v. 2, n. 9, p. 461 – 463, 9 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28459108/>. Acesso em: 2022-06-07T00:00:00+00:00.

KOTZBECK, P. *et al.* Brown adipose tissue whitening leads to brown adipocyte death and adipose tissue inflammation. v. 59, n. 5, p. 784 –, 2018. Disponível em: [/pmc/articles/PMC5928436/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5928436/)[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5928436/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5928436/?report=abstracthttps://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5928436/). Acesso em: 2022-05-27T00:00:00+00:00.

KRAJCOVIC, M. *et al.* mTOR regulates phagosome and entotic vacuole fission. 2013.

KUDA, O. Bioactive metabolites of docosahexaenoic acid. v. 136, p. 12 – 20, 5 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28087294/>. Acesso em: 2022-06-12T00:00:00+00:00.

KUEMMERLE, N. B. *et al.* Lipoprotein lipase links dietary fat to solid tumor cell proliferation. v. 10, n. 3, p. 427 – 436, 3 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21282354/>. Acesso em: 2022-06-11T00:00:00+00:00.

LEI, S.; TU, B. P. Acetyl-CoA induces transcription of the key G1 cyclin CLN3 to promote entry into the cell division cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. v. 110, n. 18, p. 7318 – 7323, 4 2013. Disponível em: [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1302490110](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1302490110). Acesso em: 2022-06-17T00:00:00+00:00.

LIVASY, C. A. *et al.* Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. v. 19, n. 2, p. 264 – 271, 12 2005. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/3800528>. Acesso em: 2022-06-17T00:00:00+00:00.

LLOR, X. *et al.* The effects of fish oil, olive oil, oleic acid and linoleic acid on colorectal neoplastic processes. v. 22, n. 1, p. 71 – 79, 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12553953/>. Acesso em: 2022-07-24T00:00:00+00:00.

MALORNI, L. *et al.* Clinical and biologic features of triple-negative breast cancers in a large cohort of patients with long-term follow-up. v. 136, n. 3, p. 795 – 804, 12 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23124476/>. Acesso em: 2022-05-25T00:00:00+00:00.

MASHAVAVE, G. *et al.* Dried blood spot omega-3 and omega-6 long chain polyunsaturated fatty acid levels in 7–9 year old Zimbabwean children: a cross sectional study. **BMC Clinical Pathology**, BioMed Central, v. 16, p. 14 –, 2016. ISSN 1472-6890. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4974798/>.

MATHIS, D. IL-33, Imprimatur of Adipocyte Thermogenesis. v. 166, n. 4, p. 794 – 795, 8 2016. Acesso em: 2022-07-22T00:00:00+00:00.

MAUER, J. *et al.* Signaling by IL-6 promotes alternative activation of macrophages to limit endotoxemia and obesity-associated resistance to insulin. v. 15, n. 5, p. 423 – 430, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24681566/>. Acesso em: 2022-07-21T00:00:00+00:00.

MENENDEZ, J. A. *et al.* Oleic acid, the main monounsaturated fatty acid of olive oil, suppresses Her-2/neu (erbB-2) expression and synergistically enhances the growth inhibitory effects of trastuzumab (Herceptin) in breast cancer cells with Her-2/neu oncogene amplification. v. 16, n. 3, p. 359 – 371, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15642702/>. Acesso em: 2022-07-24T00:00:00+00:00.

MERENDINO, N. *et al.* Dietary  $\omega$ -3 Polyunsaturated Fatty Acid DHA: A Potential Adjuvant in the Treatment of Cancer. v. 2013, 2013. Disponível em: [/pmc/articles/PMC3676987/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3676987/) [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3676987/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3676987/?report=abstracthttps://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3676987/). Acesso em: 2022-06-12T00:00:00+00:00.

MEULMEESTER, E.; DIJKE, P. T. The dynamic roles of TGF- $\beta$  in cancer. v. 223, n. 2, p. 206 – 219, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20957627/>. Acesso em: 2022-07-26T00:00:00+00:00.

MOHAMED, H. T. *et al.* IL-8 and MCP-1/CCL2 regulate proteolytic activity in triple negative inflammatory breast cancer a mechanism that might be modulated by Src and Erk1/2. v. 401, 8 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32512068/>. Acesso em: 2022-07-26T00:00:00+00:00.

MORI, T. A. Marine OMEGA-3 fatty acids in the prevention of cardiovascular disease. v. 123, p. 51 – 58, 11 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28964873/>. Acesso em: 2022-06-10T00:00:00+00:00.

- MULLER, C. R. *et al.* Post-weaning exposure to high-fat diet induces kidney lipid accumulation and function impairment in adult rats. v. 6, p. 60 – 5 2019. Acesso em: 2022-07-20T00:00:00+00:00.
- NESCHEN, S. *et al.* Fish oil regulates adiponectin secretion by a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-dependent mechanism in mice. v. 55, n. 4, p. 924 – 928, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16567512/>. Acesso em: 2022-06-12T00:00:00+00:00.
- NICKLIN, P. *et al.* Bidirectional Transport of Amino Acids Regulates mTOR and Autophagy. **Cell**, v. 136, n. 3, p. 521 – 534, 2 2009. ISSN 0092-8674. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3733119/>.
- NISHIMOTO, S. *et al.* Obesity-induced DNA released from adipocytes stimulates chronic adipose tissue inflammation and insulin resistance. v. 2, n. 3, 3 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27051864/>. Acesso em: 2022-06-07T00:00:00+00:00.
- NNAMONU, E. I. *et al.* Omega-3 fatty acids as feed supplement modulates blood formation and body weight in Rattus norvegicus model. v. 81, n. 1, 12 2020. Acesso em: 2022-07-19T00:00:00+00:00.
- NOMURA, D. K. *et al.* Monoacylglycerol lipase regulates a fatty acid network that promotes cancer pathogenesis. v. 140, n. 1, p. 49 – 61, 1 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20079333/>. Acesso em: 2022-06-11T00:00:00+00:00.
- NUR, U. *et al.* A prospective investigation of oral contraceptive use and breast cancer mortality: Findings from the Swedish women's lifestyle and health cohort. v. 19, n. 1, p. 1 – 9, 8 2019. Disponível em: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-019-5985-6>. Acesso em: 2022-05-24T00:00:00+00:00.
- OLIVEIRA, M. F. A. D.; TALVANI, A.; ROCHA-VIEIRA, E. IL-33 in obesity: where do we go from here? v. 68, p. 185 – 194, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00011-019-01214-2>.
- OMRAN, F.; CHRISTIAN, M. Inflammatory Signaling and Brown Fat Activity. v. 11, p. 156 – 3 2020. Disponível em: [/pmc/articles/PMC7105810/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7105810/)[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7105810/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7105810/?report=abstracthttps://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7105810/). Acesso em: 2022-07-21T00:00:00+00:00.
- ORTEGA-MOLINA, A. *et al.* Pten positively regulates brown adipose function, energy expenditure, and longevity. v. 15, n. 3, p. 382 – 394, 2012.
- PANINA, Y. A. *et al.* Plasticity of Adipose Tissue-Derived Stem Cells and Regulation of Angiogenesis. **Frontiers in physiology**, v. 9, p. 1 – 13, 11 2018. ISSN 1664-042X. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30534080/>. Acesso em: 2022-06-07T00:00:00+00:00.
- PASCHALL, A. V.; LIU, K. An Orthotopic Mouse Model of Spontaneous Breast Cancer Metastasis. v. 2016, n. 114, 8 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27584043/>. Acesso em: 2022-07-27T00:00:00+00:00.
- PATTERSON, E. *et al.* Health implications of high dietary omega-6 polyunsaturated fatty acids. v. 2012, 2012. Acesso em: 2022-06-12T00:00:00+00:00.

- PAULO, U. F. de S.; (CEUA), C. de Ética no Uso de A. **Guia para a implementação de Ponto Final Humanitário**. [S.l.: s.n.], 2020.
- PAVLOVA, N. N.; THOMPSON, C. B. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. v. 23, n. 1, p. 27 – 47, 1 2016. Acesso em: 2022-05-15T00:00:00+00:00.
- PEIRCE, V.; CAROBBIO, S.; VIDAL-PUIG, A. The different shades of fat. v. 510, n. 7503, p. 76 – 83, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24899307/>. Acesso em: 2022-06-07T00:00:00+00:00.
- PENG, X. R. *et al.* Unlock the Thermogenic Potential of Adipose Tissue: Pharmacological Modulation and Implications for Treatment of Diabetes and Obesity. v. 6, n. NOV, p. 174 –, 2015. Disponível em: [/pmc/articles/PMC4657528//pmc/articles/PMC4657528/?report=abstracthttps://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4657528/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4657528/). Acesso em: 2022-06-07T00:00:00+00:00.
- PERNAS, S.; TOLANEY, S. M. HER2-positive breast cancer: new therapeutic frontiers and overcoming resistance. v. 11, 3 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30911337/>. Acesso em: 2022-06-12T00:00:00+00:00.
- PICON-RUIZ, M. *et al.* Obesity and adverse breast cancer risk and outcome: Mechanistic insights and strategies for intervention. v. 67, n. 5, p. 378 – 397, 9 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28763097/>. Acesso em: 2022-06-07T00:00:00+00:00.
- PIZATO *et al.* Omega 3-DHA and Delta-Tocotrienol Modulate Lipid Droplet Biogenesis and Lipophagy in Breast Cancer Cells: the Impact in Cancer Aggressiveness. v. 11, n. 6, p. 1199 –, 5 2019.
- POUCHIEU, C. *et al.* Prospective Associations between Plasma Saturated, Monounsaturated and Polyunsaturated Fatty Acids and Overall and Breast Cancer Risk-Modulation by Antioxidants: A Nested Case-Control Study. Disponível em: [www.plosone.org](http://www.plosone.org).
- PULASKI, B. A.; OSTRAND-ROSENBERG, S. Mouse 4T1 Breast Tumor Model. v. 39, n. 1, p. 20.2.1 – 20.2.16, 10 2000. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/0471142735.im2002s39https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/0471142735.im2002s39https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471142735.im2002s39>. Acesso em: 2022-05-25T00:00:00+00:00.
- RANGEL-HUERTA, O. D. *et al.* Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids supplementation on inflammatory biomarkers: a systematic review of randomised clinical trials. v. 107 Suppl 2, n. SUPPL. 2, 6 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22591890/>. Acesso em: 2022-07-19T00:00:00+00:00.
- RIES, A. *et al.* A systematic review on the role of fish oil for the treatment of cachexia in advanced cancer: An EPCRC cachexia guidelines project. **Palliative Medicine**, p. 294 – 304.
- ROCHA-RODRIGUES, S. *et al.* Effects of physical exercise on myokines expression and brown adipose-like phenotype modulation in rats fed a high-fat diet. v. 165, p. 100 – 108, 11 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27693382/>. Acesso em: 2022-06-07T00:00:00+00:00.



- RODRÍGUEZ-CRUZ, M.; SERNA, D. S. Nutrigenomics of  $\omega$ -3 fatty acids: Regulators of the master transcription factors. v. 41, p. 90 – 96, 9 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28760435/>. Acesso em: 2022-06-12T00:00:00+00:00.
- ROMERO, S. S. C. *et al.* Experimental orthotopic breast cancer as a model for investigation of mechanisms in malignancy and metastasis to the lymph nodes. v. 5, n. 2, p. 046 – 057, 2019.
- SALVAGNO, G. L. *et al.* Red blood cell distribution width: A simple parameter with multiple clinical applications. v. 52, n. 2, p. 86 – 105, 4 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25535770/>. Acesso em: 2022-07-12T00:00:00+00:00.
- SANTANDER, A. M. *et al.* Paracrine Interactions between Adipocytes and Tumor Cells Recruit and Modify Macrophages to the Mammary Tumor Microenvironment: The Role of Obesity and Inflammation in Breast Adipose Tissue. v. 7, n. 1, p. 143 – 178, 1 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25599228/>. Acesso em: 2022-06-09T00:00:00+00:00.
- SCHUNCK, W. H. *et al.* Therapeutic potential of omega-3 fatty acid-derived epoxyeicosanoids in cardiovascular and inflammatory diseases. v. 183, p. 177 – 204, 3 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29080699/>. Acesso em: 2022-06-12T00:00:00+00:00.
- SERRA, J. L. *et al.* Alternative sources of oils and fats from Amazonian plants: Fatty acids, methyl tocols, total carotenoids and chemical composition. v. 116, p. 12 – 19, 2 2019.
- SERRA, K. P. *et al.* Nova classificação dos carcinomas da mama: procurando o luminal A The new classification of breast cancers: finding the luminal A SuSana ramalho 2 renato torreSan 1 Palavras-chave Neoplasias da mama Prognóstico Receptores estrogênicos Keywords Breast neop. 2014.
- SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Their Health Benefits. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-food-111317->. Acesso em: 2021-11-25T00:00:00+00:00.
- SIMÕES, R. V. *et al.* Metabolic Plasticity of Metastatic Breast Cancer Cells: Adaptation to Changes in the Microenvironment. v. 17, n. 8, p. 671 – 684, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neo.2015.08.005>.
- SIMOPOULOS, A. An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. v. 8, n. 3, p. 128 –, 3 2016.
- SIRIWARDHANA, N. *et al.* Modulation of adipose tissue inflammation by bioactive food compounds. v. 24, n. 4, p. 613 – 623, 4 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23498665/>. Acesso em: 2022-06-12T00:00:00+00:00.
- SLAGSVOLD, J. E. *et al.* DHA Alters Expression of Target Proteins of Cancer Therapy in Chemotherapy Resistant SW620 Colon Cancer Cells. v. 62, n. 5, p. 611 – 621, 2010. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01635580903532366>. Acesso em: 2022-06-12T00:00:00+00:00.
- STANFORD, K. I. *et al.* Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. v. 123, n. 1, p. 215 – 223, 1 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23221344/>. Acesso em: 2022-07-21T00:00:00+00:00.

- STOLZING, A.; GRUNE, T. Neuronal apoptotic bodies: phagocytosis and degradation by primary microglial cells. v. 18, n. 6, p. 743 – 745, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14766802/>. Acesso em: 2022-06-11T00:00:00+00:00.
- SUN, G. Y. *et al.* Docosahexaenoic acid (DHA): An essential nutrient and a nutraceutical for brain health and diseases. v. 136, p. 3 – 13, 9 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28314621/>. Acesso em: 2022-06-12T00:00:00+00:00.
- TAO, K. *et al.* Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer. v. 8, n. 1, p. 1 – 19, 8 2008. Disponível em: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-8-228>. Acesso em: 2022-07-27T00:00:00+00:00.
- TENNANT, D. A.; DURÁN, R. V.; GOTTLIEB, E. Targeting metabolic transformation for cancer therapy. v. 10, n. 4, p. 267 – 277, 4 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20300106/>. Acesso em: 2022-07-15T00:00:00+00:00.
- TEVAR, R. *et al.* Omega-3 fatty acid supplementation reduces tumor growth and vascular endothelial growth factor expression in a model of progressive non-metastasizing malignancy. v. 26, n. 5, p. 285 – 289, 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12216707/>. Acesso em: 2022-06-07T00:00:00+00:00.
- TROESCH, B. *et al.* Expert Opinion on Benefits of Long-Chain Omega-3 Fatty Acids (DHA and EPA) in Aging and Clinical Nutrition. v. 12, n. 9, p. 1 – 25, 9 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32846900/>. Acesso em: 2022-06-10T00:00:00+00:00.
- VALASTYAN, S.; WEINBERG, R. A. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. v. 147, n. 2, p. 275 – 292, 10 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22000009/>. Acesso em: 2022-05-25T00:00:00+00:00.
- VATTER, F. A. P. *et al.* High-Dimensional Phenotyping Identifies Age-Emergent Cells in Human Mammary Epithelia. v. 23, n. 4, p. 1205 – 1219, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.114>.
- VAUPEL, P.; KALLINOWSKI, F.; OKUNIEFF, P. BLOOD FLOW, OXYGEN CONSUMPTION AND TISSUE OXYGENATION OF HUMAN TUMORS. Boston, MA 02114, USA, p. 895 – 905, 1989.
- VILLARROYA, F. *et al.* Brown adipose tissue as a secretory organ. v. 13, n. 1, p. 26 – 35, 9 2016. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrendo.2016.136>. Acesso em: 2022-05-27T00:00:00+00:00.
- WARBURG, O. On Respiratory Impairment in Cancer Cells. v. 124, n. 3215, p. 269 – 270, 8 1956a. Disponível em: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.124.3215.269>. Acesso em: 2022-05-19T00:00:00+00:00.
- WARBURG, O. On the origin of cancer cells. v. 123, n. 3191, p. 309 – 314, 2 1956b. Disponível em: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.123.3191.309>. Acesso em: 2022-05-19T00:00:00+00:00.
- WARBURG, O. **The metabolism of tumours**. London: [s.n.], 1930. Acesso em: 2022-06-10T00:00:00+00:00.

- WATSON, H. *et al.* Gut microbiota A randomised trial of the effect of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplements on the human intestinal microbiota. v. 67, p. 1974 – 1983, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2017-314968>.
- WEINBERG, R. A. **A Biologia do Câncer**. 1. ed. [S.l.: s.n.], 2008.
- WEINBERG, R. A. **A biologia do câncer**. [S.l.: s.n.], 2015.
- WHITEHEAD, J. C. *et al.* A clinical frailty index in aging mice: comparisons with frailty index data in humans. v. 69, n. 6, p. 621 – 632, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24051346/>. Acesso em: 2022-06-23T00:00:00+00:00.
- WHO, W. H. O. . **Cancer**. 2018. Disponível em: [https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1). Acesso em: 2022-04-30T00:00:00+00:00.
- WORKMAN, P. *et al.* SR Wedge 16 , SA Eccles \* ,1 , An ad hoc committee of the National Cancer Research Institute 19 , Observers: V Navaratnam 17. v. 18, p. 1555 – 1577, 2010. Disponível em: <http://www.ncri.org.ukwww.bjcancer.com>.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Breast cancer now most common form of cancer: WHO taking action**. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/03-02-2021-breast-cancer-now-most-common-form-of-cancer-who-taking-action>. Acesso em: 2022-07-11T00:00:00+00:00.
- WORTMAN, P. *et al.* n3 and n6 polyunsaturated fatty acids differentially modulate prostaglandin E secretion but not markers of lipogenesis in adipocytes. v. 6, n. 1, p. 1 – 10, 1 2009. Disponível em: <https://nutritionandmetabolism.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-7075-6-5>. Acesso em: 2022-06-12T00:00:00+00:00.
- WU, J.; COHEN, P.; SPIEGELMAN, B. M. Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown? v. 27, n. 3, p. 234 – 250, 2 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23388824/>. Acesso em: 2022-06-07T00:00:00+00:00.
- XIAO, P. *et al.* Interleukin 33 in tumor microenvironment is crucial for the accumulation and function of myeloid-derived suppressor cells. v. 5, n. 1, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26942079/>. Acesso em: 2022-07-22T00:00:00+00:00.
- YADAV, H.; RANE, S. G. TGF- $\beta$ /Smad3 Signaling Regulates Brown Adipocyte Induction in White Adipose Tissue. **Frontiers in Endocrinology**, Frontiers Research Foundation, v. 3, p. 35 –, 2012. ISSN 1664-2392. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3356034/>.
- YAMAGATA, K. Docosahexaenoic acid regulates vascular endothelial cell function and prevents cardiovascular disease. v. 16, n. 1, p. 1 – 13, 6 2017. Disponível em: <https://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12944-017-0514-6>. Acesso em: 2022-06-12T00:00:00+00:00.
- YANG, L. *et al.* Disease progression model of 4T1 metastatic breast cancer. v. 47, n. 1, p. 105 – 116, 2 2020. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10928-020-09673-5>. Acesso em: 2022-07-26T00:00:00+00:00.
- YAQOOB, P. Understanding Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids. v. 121, n. 6, p. 148 – 157, 2009.

YASSINE, H. N. *et al.* Association of Docosahexaenoic Acid Supplementation With Alzheimer Disease Stage in Apolipoprotein E  $\epsilon$ 4 Carriers: A Review. v. 74, n. 3, p. 339 – 347, 3 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28114437/>. Acesso em: 2022-06-12T00:00:00+00:00.

YIN, L. *et al.* Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. v. 22, n. 1, 6 2020. Disponível em: </pmc/articles/PMC7285581//pmc/articles/PMC7285581/?report=abstracthttps://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7285581/>. Acesso em: 2022-05-25T00:00:00+00:00.

ZÁRATE, R. *et al.* Significance of long chain polyunsaturated fatty acids in human health. v. 6, n. 1, p. 1 – 19, 7 2017. Disponível em: <https://clintransmed.springeropen.com/articles/10.1186/s40169-017-0153-6>. Acesso em: 2022-06-12T00:00:00+00:00.

ZHANG, J. *et al.* Asparagine plays a critical role in regulating cellular adaptation to glutamine depletion. v. 56, n. 2, p. 205 – 218, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25242145/>. Acesso em: 2022-07-15T00:00:00+00:00.