



Universidade de Brasília – UnB

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular

Análise da modulação de parâmetros carcinogênicos de células de câncer de mama pelo tecido adiposo branco e marrom: O papel do Inflamassoma NLRP3 neste processo.

Luís Henrique Costa Corrêa Neto

Orientadora:

Profa. Dra. Kelly Grace Magalhães

Brasília

Outubro, 2019



Universidade de Brasília – UnB

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular

Luís Henrique Costa Corrêa Neto

Análise da modulação de parâmetros carcinogênicos de células de câncer de mama pelo tecido adiposo branco e marrom: O papel do Inflamassoma NLRP3 neste processo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular,
para a obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular.

Orientadora:

Profa. Dra. Kelly Grace Magalhães

Brasília

Outubro, 2019

Luís Henrique Costa Corrêa Neto

Análise da modulação de parâmetros carcinogênicos de células de câncer de mama pelo tecido adiposo branco e marrom: O papel do Inflamassoma NLRP3 neste processo.

Data: 22 de Outubro de 2019

Banca Examinadora

Prof.^a Dra. Kelly Grace Magalhães (Presidente)

Programa de Pós-graduação de Biologia Molecular- Universidade de Brasília

Andréa Queiroz Maranhão (Membro)

Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular - Universidade de Brasília

Andreza Fabro de Bem (Membro)

Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular - Universidade de Brasília

Lucas Francisco Ribeiro do Nascimento (Membro Suplente)

Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular - Universidade de Brasília

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a minha família e aqueles que se tornaram parte dela. Obrigado por todo suporte dado a mim, desde o início da minha vida acadêmica até a finalização deste projeto. Esta base foi fundamental para a finalização deste trabalho.

Agradeço à Professora Kelly G. Magalhães por ter sido uma amiga e orientadora para mim durante todo esse tempo, me acrescentando em diversas esferas da vida, obrigado pelo carinho, paciência e dedicação durante todos esses anos. Agradeço pela confiança depositada em mim para o desenvolvimento de um projeto tão interessante quanto esse.

Agradeço a minha família por sempre estar ao meu lado e entendendo os dias ausentes em que estive ocupado com experimentos. Obrigado Mônica Cavalcante, minha mãe, que me deu tudo que tenho, e me inspira e me motiva a sempre ser alguém melhor. Obrigado a minhas irmãs, Loraine Corrêa e Vitória Mattos por serem as melhores amigas e cúmplices, estando sempre presente quando necessário. Obrigado a todos pelo suporte e carinho: ao meu padrasto Carlos Evilásio, ao meu pai Jorkdeam Mattos, aos meus avós Irene Cavalcante e Luís Henrique Corrêa. Amo todos vocês.

Agradeço aos queridos Elisângela Medeiros, Geovane Furquim e Mateus Furquim por terem se tornado minha família. Sempre me lembrarei das inúmeras vezes que vocês me deram o suporte necessário durante toda minha graduação e mestrado, sempre me impulsionando para frente, sempre com conselhos construtivos. Vocês têm um local para sempre no meu coração.

Agradeço ao Tiago M. Furquim, meu parceiro de graduação que se tornou de vida. Obrigado por estar sempre presente na minha vida desde o primeiro dia da nossa graduação, me dando todo suporte e atenção necessária. Obrigado pelos conselhos, pelos momentos que compartilhamos e por permitir que eu faça parte da sua vida.

Agradeço as minhas amigas de laboratório, logo de vida, que estavam todos os dias ao meu lado, onde a ajuda e suporte sempre foi mútua. Obrigado Gabriela Hyen, Lívia Pimentel e Heloisa Antoniella por todo carinho e atenção.

Obrigado a todos os integrantes do Laboratório de Imunologia e Inflamação (LIMI) por todo suporte. Obrigado pelas ajudas nos experimentos, pelos conselhos e por terem me

ajudado a me construir como um pesquisador. Obrigado Gabriel Pasquarelli, Gabriel Araújo, Rafael, Dalila, Raquel, Igor, Milena, Nathalia, Debora, Ana, Sabrina e Luana e todos aqueles que já fizeram parte do LIMI junto comigo.

Agradeço as minhas amigas Laura Miazato e Rayanne Polleti que estavam comigo durante toda minha graduação e meu mestrado. Obrigado a todos os amigos pelo suporte.

Agraço ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular por ter possibilitado que eu realizasse esse trabalho, obrigado aos laboratórios do Instituto de Biologia e às agências de fomento CNPq e FAPDF pelo suporte financeiro prestado.

Sumário

Agradecimentos.....	4
Lista de abreviaturas, acrônimos, siglas e símbolos.....	11
Lista de Figuras e legendas	13
Lista de Tabelas.....	15
Introdução.....	16
Câncer.....	16
Câncer de mama	19
Obesidade e Câncer de Mama.....	21
O tecido adiposo, inflamação e o câncer.....	23
O Inflamassoma NLRP3	29
Justificativa.....	34
Objetivos	35
Objetivo geral:.....	35
Objetivos específicos:	35
Metodologia	36
Experimentos com animais	36
Culturas celulares	36
Obtenção do produto de secreção do tecido adiposo e estímulo celular.....	36
Análise de esplenócitos	37

Morte celular	37
Viabilidade celular	38
Formação de poros na membrana plasmática	38
Proliferação celular	39
Biogênese de corpúsculos lipídicos.....	39
Produção de espécies reativas de oxigênio	40
Secreção de óxido nítrico	41
Dosagens de citocinas	41
Histologia dos tecidos adiposos	41
Lipidômica dos tecidos adiposos.....	42
Proteômica das células tumorais	44
Resultados	46
Função diferencial do tecido adiposo branco e marrom na viabilidade e proliferação de células de câncer de mama.	46
O tecido adiposo branco induz uma maior ativação das células tumorais de mama	48
O tecido adiposo marrom induz maior produção de espécies reativas em células tumorais de mama	50
O Tecido adiposo marrom induz morte celular por apoptose em células de câncer de mama.	51
O tecido adiposo marrom induz poros na membrana plasmática de células tumorais com o papel das Caspases 1/11.	53
O produto de secreção do tecido adiposo branco e marrom modula o perfil proteico de 4T1 com a participação do inflamassoma NLRP3.	57

Modulação de esplenócitos pelo tecido adiposo marrom e branco	64
Tecido adiposo branco e marrom modula a polarização de macrófagos	68
A modulação da produção de citocinas nos tecidos adiposos brancos e marrons é dependente das Caspases 1/11 nestes tecidos	72
A ausência de caspase 1/11 altera o perfil global lipídico do tecido adiposo branco e marrom.	74
Discussão.....	77
Conclusão	89
Referências	90

Análise da modulação de parâmetros carcinogênicos de células de câncer de mama pelo tecido adiposo branco e marrom: O papel do Inflamassoma NLRP3 neste processo.

Resumo

Dissertação de Mestrado

Luís Henrique Costa Corrêa Neto

A influência do tecido adiposo na modulação de células tumorais tem sido altamente caracterizada. O tecido adiposo branco (WAT) e marrom (BAT) possuem a capacidade de mediar a inflamação através da secreção de citocinas inflamatórias, recrutando e polarizando células imunológicas para o microambiente, além de dar suporte energético às células tumorais, proporcionando um ambiente ideal para a progressão do tumor. No entanto, o papel do inflamassoma NLRP3 no tecido adiposo branco e marrom neste contexto é pouco conhecido. No presente trabalho, objetivamos caracterizar o papel dos componentes do inflamassoma NLRP3 no perfil lipídico do tecido adiposo branco e marrom, assim como caracterizar parâmetros celulares tumorais com ensaios de morte, viabilidade, ativação celular, além da caracterização da proteômica destas células sobre influência e tecidos adiposos. Nossos resultados mostraram que os produtos de secreção de BAT, especialmente na ausência de caspase-1/11, diminuíram a viabilidade, proliferação e ativação celular de câncer de mama em comparação com o WAT. Em adição, nossos dados sugerem que os produtos e secreção dos tecidos adiposos modulam de forma diferencial o recrutamento e polarização de células imunes como macrófagos e linfócitos. Além disso, a análise proteômica de células de câncer de mama revelou que os produtos de secreção de WAT modularam vias de proteínas de sobrevivência da linhagem celular tumoral. Análises da lipidômica de WAT e BAT mostraram que a ausência de caspase 1/11 modificou substancialmente o perfil global lipídico desses tecidos adiposos. Tomados em conjunto, nossos dados mostraram que WAT e BAT apresentaram funções opostas nos parâmetros carcinogênicos do câncer de mama. A ausência de caspase-1/11, mas não a proteína NLRP3, pode influenciar diretamente sua composição metabolômica e melhorar a capacidade do BAT de desencadear atividade antitumoral em células de câncer de mama.

Modulation analysis of carcinogenic parameters of breast cancer cells by white and brown adipose tissue: The role of the NLRP3 Inflammasome in this process

Abstract

Dissertação de Mestrado

Luís Henrique Costa Corrêa Neto

The influence of adipose tissue on tumor cell modulation has been highly characterized. White (WAT) and brown (BAT) adipose tissues have the ability to mediate inflammation by secreting inflammatory cytokines, recruiting and polarizing immune cells into the microenvironment and providing energetic support to tumor cells, providing an ideal environment for the tumor progression. However, the role of the NLRP3 inflammasome in white and brown adipose tissue in this context is poorly understood. In the present work, we aimed to characterize the role of the NLRP3 inflammasome components in the lipid profile of white and brown adipose tissue, as well as to characterize tumor cell parameters with cell death analyses, viability, cell activation, and proteomic characterization of these cells on influence and tissues. adipose. Our results showed that BAT secretion products, especially in the absence of caspase-1/11, decreased breast cancer viability, proliferation, and cellular activation compared with WAT. In addition, our data showed that adipose tissue products and secretion differentially modulate the recruitment and polarization of immune cells such as macrophages and lymphocytes. In addition, proteomic analysis of breast cancer cells revealed that WAT secretion products modulated tumor cell line survival protein pathways. WAT and BAT lipid analyzes showed that the absence of caspase 1/11 substantially modified the overall lipid profile of these adipose tissues. Taken together, our data showed that WAT and BAT had opposite functions in the carcinogenic parameters of breast cancer. The absence of caspase-1/11, but not NLRP3 protein, can directly influence its metabolomic composition and improve BAT's ability to trigger antitumor activity in breast cancer cells.

Lista de abreviaturas, acrônimos, siglas e símbolos.

AP	Proteínas adaptadoras
ATP	Trifosfato de adenosina
BAT	Tecido Adiposo Marrom
BMDM	Bone-marrow-derived macrophage
CFSE	Carboxifluoresceína succinimidil ester
CCL2	Proteína quimiotóxica de monócitos
Cf-DNA	DNA livre de células
CLS	Estrutura semelhante a coroa
CO ₂	Dióxido de carbono
DCF-DA	2',7' Diclorodihidrofluoresceína-diacetato
DP	Desvio padrão
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMEM	Meio Dulbecco MEM
ELISA	Ensaio imunoenzimático
Fig.	Figura
LD	Corpúsculo lipídico
HMGB1	High Mobility Group Box1
IL	Interleucina
HER2	Human Epidermal growth factor Receptor 2
MFI	Mediana de intensidade de fluorescência
M-CSF	Fator estimulante de colônia de macrófagos
mM	Milimolar
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio brometo
MTA1	Proteína associada a metastase 1 MTA1

NFκB	Fator nuclear κB Metastasis-associated protein MTA1
NK	Células Natural Killer
NLRP	Receptor do tipo NOD que contém domínio pirina
Nm	Nanômetro
PARP	Poli-[ADP-ribose]-polimerase
PTEN	Piruvato desidrogenase quinase 1
PGC1-	Coativador1 do receptor ativado por proliferador de peroxissoma α.
Pg	Picograma
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PBS	Tampão fosfato salina
PI	Iodeto de propídeo
PYD	Pirina
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RPMI	Meio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TGF-β	Fator de transformação de crescimento beta
TCD8+	Linfócito T citotóxico CD8+
TCD4+	Linfócito T auxiliares CD4+
μM	Micromolar
UNS	Não-estimulado
UCP-1	Proteína desacopladora 1
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
WAT	Tecido Adiposo Branco
4T1	Linhagem de célula de câncer de mama murino

Lista de Figuras e legendas

- Figura 1. Taxas de mortalidade por câncer de mama feminina, específicas por faixas etárias, por 100.000 mulheres. Brasil, 1990 a 2015.. 20
- Figura 2. Diferentes tipos de células adiposas e sua influencia no câncer. Fatores externos são capazes de modificar o fenótipo dos adipócitos e com isso, influenciar de forma diferencial o desenvolvimento tumoral.. 24
- Figura 3. Aumento da reserva lipídica em adipócitos favorece a inflamação..... 25
- Figura 4. Adipócitos associados ao tumor. Adipócitos podem estar ligados ao desenvolvimento tumoral dando suporte energético assim como modulando a inflamação no microambiente tumoral.. 27
- Figura 5. Adipócitos branco, rosa, bege e marrom. Os adipócitos são divididos em 4 tipos de células que possuem características morfológicas e funcionais diferentes.. 29
- Figura 6. Modulação da viabilidade e proliferação celular de células tumorais 4T1. .. 47
- Figura 7. Tecido adiposo branco induz biogênese de corpúsculo lipídico em células tumorais de mama.. 49
- Figura 8. Tecido adiposo marrom induz maior produção de espécies reativas em 4T1 50
- Figura 9. Indução de morte celular por apoptose e necrose em células tumorais de câncer de mama sobre influencia de produtos de secreção de tecidos adiposos brancos e marrons..... 52
- Figura 10. O tecido adiposo marrom induz poros na membrana de células tumorais com o papel das proteínas Caspase 1/11.. 54
- Figura 11. Modulação da secreção de citocinas anti e pro-inflamatória em células tumorais de mama estimuladas com tecidos adiposos brancos e marrons. 56
- Figura 12.. sPLS-DA 3D mostrando agrupamento de replicatas e diferenciação entre condições..... 59

Figura 13 VIP scores das proteínas que melhor discriminam entre as condições. VIP do inglês Variable Importance in Projection. 3.....	60
Figura 14 Mapa de correlações (heatmap) entre padrões de abundância normalizada e agrupamento de condições. Conjunto completo das 69 proteínas reguladas.	63
Figura 15. Tecido adiposo marrom modula TCD8+ e células NK..	66
Figura 16. Tecido adiposo marrom modula a população TCD4+. 4.....	67
Figura 17. Modulação da polaridade de macrófagos pelo tecido adiposo branco e marrom, o papel do inflamassoma NLRP3 neste processo.	69
Figura 18. O tecido adiposo marrom apresenta maior infiltrado de macrófagos.....	71
Figura 19. Caspase 1/11 participa da produção de mediadores inflamatórios em tecido adiposo branco e marrom.	73
Figura 20. Análise do tecido adiposo branco e marrom por Espectrometria de massa. <i>Heatmap</i> do tecidos adiposo branco e marrom selvagem.	75
Figura 21. Análise do tecido adiposo marrom e branco, selvagens e deletado para proteínas do inflamassoma NLRP3.. <i>Heatmap</i> dos tecidos adiposos branco e marrom selvagens e deletados para caspase1/11 e NLRP3.	76

Lista de Tabelas

Tabela 1. Identificação das proteínas referente aos gráficos de VIP score. Identificação das 5 proteínas com maior abundância relativa em cada grupo.	61
--	----

Introdução

Câncer

Dentre as doenças com mais casos de óbito no mundo, o câncer ocupa o segundo lugar na lista com mais casos de morte. Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde – WHO (do inglês World Health Organization - WHO), aproximadamente, 9.6 milhões de mortes ocorreram em 2018 no mundo, cerca de 1 em cada 6 mortes foram devido ao câncer. Em função da grande variabilidade e agressividade da doença, as estatísticas vêm crescendo, sendo os países de baixo-médio desenvolvimento econômico os mais atingidos. A falta de acessibilidade aos diagnósticos somados à falta de recursos suficientes para custear o tratamento, aproximadamente 70% das mortes por câncer ocorre em países de baixa e média renda. Os impactos que esta desordem metabólica pode trazer afeta não apenas áreas afins a saúde, mas interfere também na esfera econômica mundial. As últimas pesquisas feitas em 2010 referentes às movimentações financeiras decorrentes do câncer apontaram aproximadamente US \$ 1,16 trilhão gastos com tratamentos e diagnósticos (WHO, 2018).

O câncer é caracterizado como um conjunto de doenças capaz de afetar qualquer parte do corpo humano, caracterizado pelo crescimento desordenado de células. Embora o termo mais comum seja o nome câncer, este agregado de doenças também é conhecido pelos termos “tumores malignos” e “neoplasias” (NIH 2019). Dentre os principais pontos que desencadeiam o desenvolvimento das neoplasias estão o descontrole na regulação da divisão celular e a insuficiência no controle de morte celular, o que leva a produção de massas celulares e posteriormente a metástase (Huysentruyt 2014). A metástase de células tumorais é a principal causa de morte de pessoas com câncer. Alterações na manutenção do processo de angiogênese, invasão e migração celular favorecem o processo de metástase, com o espalhamento de células mutadas para outros órgãos via corrente sanguínea. Uma vez disseminada pelo corpo, células tumorais agora podem comprometer a homeostase funcional de outros órgãos, acarretando na perda funcional, levando o indivíduo a óbito (Chambers AF, Groom AC 2002).

O câncer como um conjunto de doenças é também causado por uma grande variedade de fatores, tanto internos quanto externos (por exemplo, ambientais), que podem desencadear mudanças genéticas e dar início ao processo de desenvolvimento tumoral. Entre os principais fatores ambientais pode-se citar: uso de tabaco, ingestão de bebidas alcoólicas, alimentação não saudável, falta de prática de atividades físicas, infecção por vírus, obesidade e outros. Embora fatores externos ao organismo seja um grande iniciador da doença, alguns processos internos como envelhecimento e mutações contribuem significativamente para o número de casos de neoplasias (Helena & Oliveira 2011).

Os principais pontos regulatórios que podem levar ao processo de transformação de células normais para células neoplásicas são pontos relacionados com a divisão e morte celular. Na regulação destes estágios celulares os proto-oncogenes são responsáveis pelo crescimento celular, sendo assim, qualquer alteração nestes genes como mutações, leva ao surgimento dos Oncogenes, ocasionando em uma produção excessiva de fatores de crescimento. Em contrapartida, há também os Genes Supressores de Tumor, que ao contrário dos oncogenes que apenas surgem nas células através de mutação em proto-oncogenes, os genes supressores de tumor são encontrados em todas as células. Os genes supressores de tumor são responsáveis pela parada na divisão e proliferação celular, e atuam na inibição de divisões celulares que apresentam mutações em no material genético. Com isso, tanto a geração de Oncogenes por mutações em proto-oncogenes ou um funcionamento de forma irregular de genes supressores de tumor pode facilitar o surgimento de células neoplásicas. (Leitão et al. 2003). Os oncogenes são responsáveis pela produção de oncoproteínas. Uma vez sintetizadas, as oncoproteínas agem interferindo na divisão e crescimento celular pela a intensa produção de fatores de crescimento, induzindo a divisão celular de forma parácrina e/ou autócrina, através do aumento na produção e externalização de proteínas receptoras de fatores de crescimentos, sendo este um importante fator no diagnóstico de diferentes tipos de tumores e sua agressividade, interferindo na transdução de sinais e atuando na atividade de proteínas nucleares (Shortt & Johnstone 2012).

De forma contrária a atividade dos oncogenes, os genes supressores de tumor têm a função de controlar a divisão celular. Os genes supressores de tumor desempenham um papel fundamental na regulação da apoptose, um dos tipos de morte celular induzida e anti-inflamatória, assim como também agem impedindo o ciclo celular, sendo assim uma peça crucial no controle e desenvolvimento de tumores (Marshall 1991). Atualmente pouco se

sabe sobre o mecanismo exato de genes supressores de tumor, entretanto, algumas proteínas já foram largamente caracterizadas. O gene p53, por exemplo, é um dos genes supressores de tumor mais bem caracterizado em função da sua grande atividade em humanos. O nível de expressão da proteína p53 varia de célula a célula e tem como uma de suas principais funções o controle da parada na divisão celular, realizando reparos em erros no DNA e, como ultimo mecanismo, induzir a morte nas células via apoptose (Sun & Yang 2010). Alterações em genes responsáveis por controle de vias de proliferação e morte são as principais causas de câncer, sendo responsáveis por mais da metade de casos de câncer de mama e até 70% de casos de câncer de cólon (Silva 2018).

Quando processos de reparo no DNA não são eficientes e células com material genético alterado continuam sua proliferação sem indução de morte, células neoplásicas surgem (Gary A. Boorman 2006). Entre os estágios do desenvolvimento tumoral, a metástase é um ponto fundamental no estabelecimento do tumor. Estudos mostram que diversas células tumorais migram para a corrente sanguínea, contudo, poucas células são bem sucedidas no processo metastático devido a grande complexidade do sistema (Filipe et al. 2018). A massa tumoral tem sido demonstrada com uma enorme heterogeneidade. Este fato é decorrente das alterações genética e epigenéticas que ocorrem no desenvolvimento da doença, gerando células com grandes capacidades de migração. No processo metastático, para serem bem sucedidas, células tumorais necessitam se desaderir do tumor primário, invadir e migrar para outros tecidos através da corrente circulatória (Bacac M 2008). O grande potencial seletivo do processo de metástase ocorre devido a grande quantidade de habilidades exigidas durante o processo. Dentre os principais pontos, pode-se citar a diminuição na expressão de proteínas de adesão de células tumorais, facilitando o desprendimento da massa tumoral primária. As caderinas, por exemplo, desempenham uma importante função na manutenção da integridade estrutural de tecidos. Uma formação errada desta proteína, assim como uma produção desregulada, pode facilitar o desprendimento de células tumorais e invasão para capilares e correntes sanguíneas adjacentes (Mrozik et al. 2018).

Devido a grande complexidade e variedade de tumores, o tratamento contra neoplasias torna-se dependente da fase que o paciente está. Visando conter o crescimento desordenado de células, tratamentos quimioterápicos, radioterapias e cirurgias são empregadas no combate á doença. Contudo, os tratamentos quimioterápicos convencionais vêm mostrando grandes níveis de citotoxicidade atingindo fortemente células saudáveis e

impactando diretamente na qualidade de vida dos pacientes (Weinberg 2012). Atualmente, diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas a fim de desenvolver métodos adjuvantes para tratamentos convencionais, assim como o desenvolvimento de imunoterápicos com potencial de substituir tratamentos invasivos como quimioterapias no tratamento contra o câncer. A modulação da resposta imune no controle da inflamação tem sido alvo no tratamento da doença. A inflamação sistêmica e local exerce um papel crucial no estabelecimento de tumores, tornando-se uma chave no tratamento e combate de diversos tipos de canceres.

Câncer de mama

O câncer de mama se caracteriza pelo o acúmulo de mutações em células presentes na mama, formando um tumor. Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA) existem diversos tipos diferentes de câncer de mama, acarretando em uma evolução da doença de diferentes formas e intensidades. Alguns tumores de mama se desenvolvem de forma rápida e agressiva, quantos outros têm o crescimento silencioso.

Segundo dados do INCA, o câncer de mama foi responsável por 13,22 óbitos/100.000 mulheres em 2017. A figura 1 ilustra a taxas de mortalidade de mulheres por câncer de mama, pela faixa etária, por 100.000 mulheres. . Em países desenvolvidos, o câncer de mama está atrás apenas dos canceres de pulmão e em países em desenvolvimentos o câncer de mama ocupa a primeira posição em casos de óbito (INCA 2018). Ainda segundo o INCA, o câncer de mama é considerado um câncer de bom prognóstico, se tratado ainda no início do desenvolvimento da doença, contudo, em casos de desenvolvimento silencioso, o tratamento tardio da doença é responsável pelo grande numero de mortes.

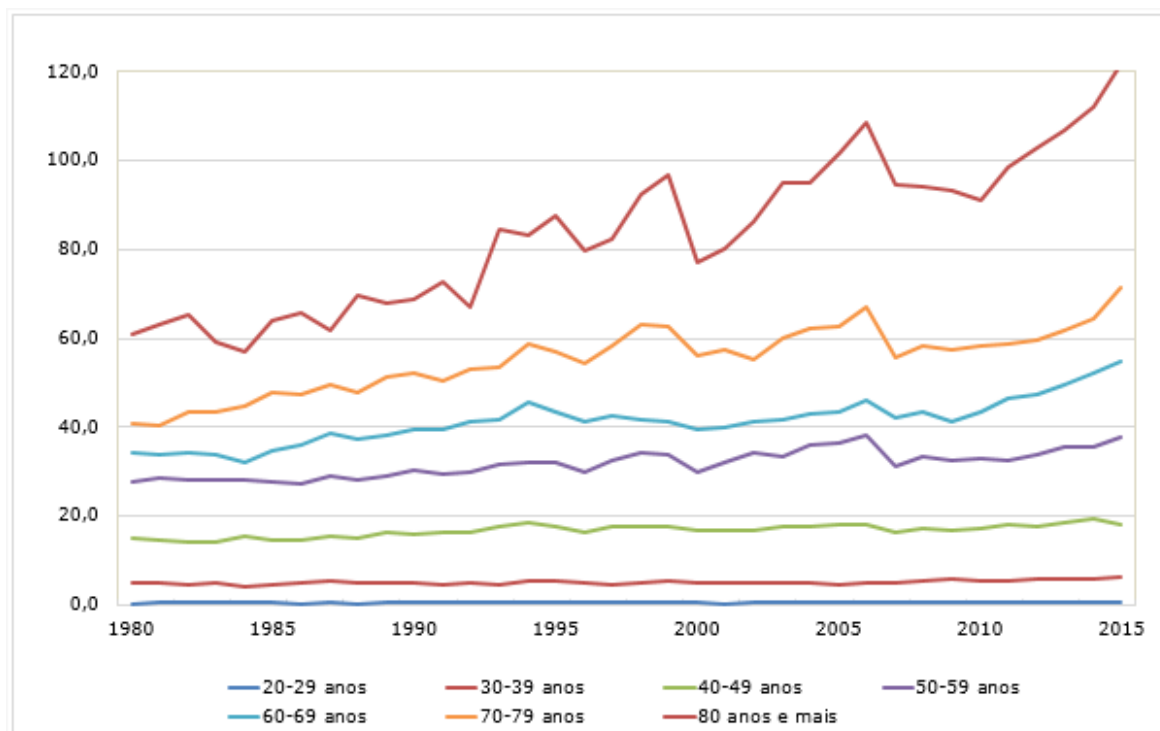


Figura 1. Taxas de mortalidade por câncer de mama feminina, específicas por faixas etárias, por 100.000 mulheres. Brasil, 1980 a 2015. O número de mortes devido ao câncer de mama tem aumentado desde 1980 até os últimos dados coletados em 2015, em que mulheres entre 30-39 anos o índice é maior. Fonte: INCA- Instituto Nacional de Câncer. <https://www.inca.gov.br/controlado-cancer-de-mama/conceito-e-magnitude>.

O câncer de mama pode ser classificado dependendo do local e agressividade das células tumorais. Atualmente são reconhecidos cinco tipos clássicos da doença: 1. Carcinoma ductal invasivo, onde as células tumorais se instalam no ducto mamário e é o tipo de câncer mais comum entre as mulheres; 2. Carcinoma ductal *in Situ*, neste caso as chances de metástases são menores, pois as células tumorais se estabelecem dentro dos ductos mamários; 3. Carcinoma lobular *in Situ*, segundo tipo mais comum entre as mulheres, onde as células tumorais se desenvolvem dentro dos lóbulos das glândulas responsáveis pela produção de leite; 4. Carcinoma lobular invasivo, também se instala nos lóbulos das glândulas produtoras de leite, porém possuem um alto nível de metástase; 5. Doença de Paget, este é o tipo mais raro da doença, onde as células tumorais se instalam no tecido conjuntivo da mama (Gobbi 2012). Tratamentos para o câncer de mama são aplicados dependendo da positividade ou negatividade da presença de receptores hormonais nas células presentes nos tumores. Especificamente é analisada a presença de receptores para progesterona (PR+) e estrógeno (ER+). Biópsias PR+ e ER+ são tumores passivos de tratamento com bloqueadores hormonais a fim de reduzir as taxas de proliferação das células tumorais, assim como tumores ER- mas PR+. Estes tipos de tumores possuem melhores prognósticos entre as pacientes. Os cânceres de mama com

receptores hormonais negativos não têm receptores de estrogênio nem de progesterona, logo o tratamento com bloqueadores hormonais não é aplicável. Nestes tipos de cânceres os tratamentos são mais invasivos e o tumor tende a crescer de forma mais rápida comparado com os tumores receptores hormonais positivos (Goldhirsch et al. 2011). Além disso, há ainda os tumores triplo negativo, que além de não possuírem receptores para progesterona e estrogênio, as células tumorais também não possuem receptores HER2 (do inglês Human Epidermal growth factor Receptor-type 2) que também é responsável pela proliferação celular. Neste último caso, os tratamentos hormonais também não são utilizados sendo aplicado, na maioria dos casos, tratamento com quimioterápicos (Pernas & Tolaney 2019).

O câncer de mama é uma doença de grande heterogeneidade, sendo significativamente modulada por sinalização hormonal, variando na expressão do receptor de estrogênio (ER), receptor de progesterona (PR) e receptor epitelial humano 2 (HER2). O câncer de mama pode ser classificado nos subtipos A luminal, B luminal, positivo em HER2 e triplo negativo (TNBC). Estudos clínicos mostram que pacientes com TNBC têm pior sobrevida global do que pacientes sem TNBC. Entre várias linhagens celulares amplamente usadas para estudos de câncer de mama, podemos destacar o MCF-7, linhagem de célula humana que é positivo para ER, PR negativas e positivas para HER2 e o MDA-MB-231, que é células triplamente negativas, assim como as células 4T1 (ER-, PR-, HER2-), porém murinas. (Pizato et al. 2019).

Obesidade e Câncer de Mama

Como já citado, o câncer de mama é gerado pelo acúmulo de diversas desordens celulares, sendo assim, vários fatores podem desencadear o surgimento de células neoplásicas nas mamas. A idade é o principal facilitador do surgimento da doença (Benz 2009), onde cerca de quatro em cinco casos ocorrem depois dos cinquenta anos. Além da idade, disfunções metabólicas como obesidade geram desbalanços em vias inflamatória sendo também uma grande fonte energética para a proliferação desordenada de células tumorais (Picon-ruiz, Morata-tarifa, & Valle-goffin 2017). Estudos recentes demonstraram que o sobrepeso e a obesidade estão associados a maiores riscos de adenocarcinoma de esôfago (Long & Beales 2014), tireoide (Ali et al. 2018), pâncreas (Paige M. Bracci 2013), ovário e mama (Engin A 2017). A disfunção de adipócitos durante a obesidade facilita o processo de estabelecimento e crescimento de células tumorais através da modulação da

inflamação (Shannon M. Reilly & Alan R. Saltiel 2017). Os adipócitos brancos quando desregulados produzem citocinas inflamatórias de forma aumentada, como TNF- α , IL-6, IL-1 β e CCL2 que levam ao recrutamento, infiltração e acúmulo direto de células inflamatórias (por exemplo, linfócitos e macrófagos), no tecido adiposo e estabelece um estado de inflamação crônica (Balkwill 2004). Os fatores iniciais que desencadeiam a inflamação crônica do tecido adiposo não estão totalmente elucidados. As evidências sugerem que pode ser mediada por hipóxia, morte lítica, aumento da secreção de fatores imunomoduladores, como citocinas, quimiocinas, hormônios e fator de crescimento, lipólise e liberação de ácidos graxos livres.

Os adipócitos associados ao tumor podem liberar diversos fatores para o microambiente do tumor (Arendt et al. 2013). Esses compostos derivados de adipócitos podem ser usados pelas células cancerígenas para promover o crescimento do tumor. Os ácidos graxos livres liberados pelos adipócitos podem ser usados pelas células cancerígenas para alimentar seu crescimento e proliferação. Além disso, os ácidos graxos livres podem ativar e modular outras células, como miócitos, macrófagos e células endoteliais vasculares, favorecendo a formação de microambiente pro-tumorigênico. O tecido adiposo inflamado pode regular o desenvolvimento do tumor de diferentes maneiras, fornecendo energia via ácidos graxos livres ou através de adipocinas, citocinas ou miRNAs (Corrêa & Magalhães. 2017). Contudo, atualmente estudos tem focado no entendimento de macrófagos recrutados pelo tecido adiposo, podendo está ligado ao pior prognóstico no câncer de mama.

Macrófagos são recrutados para o microambiente tumoral pela larga produção de quimioatrativos produzidos pelos adipócitos, como o ligante de quimiocina 2 (CCL2). Quando presentes no microambiente tumoral, células imunes são polarizadas pelas células tumorais com o intuito de dar suporte para a progressão do tumor (Arendt et al. 2013). Durante a obesidade, células adiposas em processo de morte, tanto por necrose como por piroptose, liberam fragmentos celulares que são responsáveis pela maior atração de macrófagos para o tecido. Uma vez recrutados, esses macrófagos circundam adipócitos necróticos formando uma estrutura chamada Estrutura em forma de coroa, do inglês *Crown Like Structure* (CLS). Estas estruturas têm sido estudadas em função da sua relação direta com a manutenção da inflamação local, devido ao perfil inflamatório dos macrófagos presentes em junção aos padrões intracelulares liberados pela morte lítica dos adipócitos. Estudos de casos clínicos vêm correlacionando o número de CLS no tecido adiposo

próximos a tumores de mama. Durante o processo de desenvolvimento do tumor de mama, macrófagos presentes no microambiente são responsáveis pela manutenção da inflamação podendo dar suporte para o desenvolvimento das células tumorais. Logo, a obesidade associada ao tumor é um fator de risco para a doença, em que a presença elevada de CLS é caracterizada como pior prognóstico.(Santander et al. 2015) A relação direta do tecido adiposo com o câncer tem sido cada vez mais estudada. Células adiposas com seu grande potencial de estocar energia, assim como a importante capacidade de regulação hormonal, vêm se mostrando como um grande potencial modulador do crescimento tumoral de mama, sendo alvo de vários grupos de pesquisa. (Vachharajani & Granger 2009).

O tecido adiposo, inflamação e o câncer

O tecido adiposo, atualmente já descrito e caracterizado como órgão endócrino, possui um papel fundamental na homeostase energética do corpo. Desbalanços na composição e manutenção deste órgão está associada a diversas doenças metabólicas como obesidade, diabetes e câncer (Deng et al. 2016).

Estudos recentes vêm mostrando a grande plasticidade fenotípica que este tecido pode apresentar (Panina et al. 2018). Levando isso em consideração, atualmente são descritos quatro tipos de adipócitos: o adipócito branco, o adipócito marrom, o adipócito bege e o adipócito rosa. Embora cada uma destas células sejam células de gordura, elas possuem fisiologias, atividades metabólicas e funções bem distintas, impactando em uma modulação na inflamação e o câncer de forma diferenciada (Corrêa & Magalhães 2019), como pode ser observado na Figura 2.

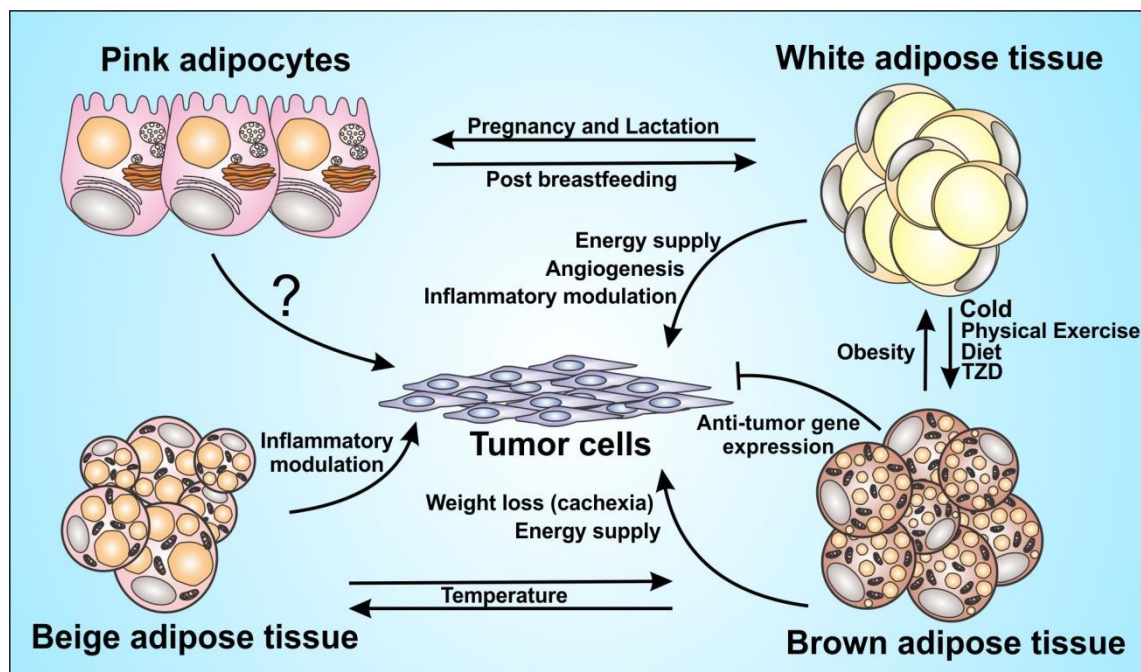


Figura 2. Diferentes tipos de células adiposas e sua influencia no câncer. Fatores externos são capazes de modificar o fenótipo dos adipócitos e com isso, influenciar de forma diferencial o desenvolvimento tumoral. Fonte: *The Impact of the Adipose Organ Plasticity on Inflammation and Cancer Progression*, Luis H Corrêa, Gabriela S Heyn e Kelly G Magalães. *Cells*, 2019.

O tecido adiposo branco, comumente conhecido pela sigla WAT (do inglês *White Adipose Tissue*) é o mais bem descrito atualmente, exercendo um enorme papel na reserva energética e na regulação hormonal do corpo. Este tecido dinâmico é altamente vascularizado e composto não apenas por adipócitos, mas também outros tipos celulares como células imunológicas, células endoteliais, fibroblastos, pericitos e pré-adipócitos (Peirce, Carobbio, & Vidal-Puig 2014). Fisiologicamente, os adipócitos presentes no tecido adiposo branco são compostos predominantemente por ácidos graxos, onde ficam armazenados em uma grande gota de gordura. Com isso, a principal função associada ao tecido adiposo branco é a reserva energética, sendo o tecido adiposo mais abundante no corpo. Entretanto, além de atuar como fonte de energia, o tecido adiposo branco também possui um papel chave no controle hormonal através da síntese e secreção de vários hormônios (Coelho, Oliveira, & Fernandes 2013). Dentre os principais, a Leptina é produzida majoritariamente por adipócitos (Van Harmelen et al. 1998). Este pequeno peptídeo é produzido pelos adipócitos e é responsável pelo controle do apetite. Entretanto, estudos têm mostrado que a leptina pode atuar muito além do controle de ingestão nutricional.

A leptina também exerce um importante papel na modulação inflamatória, impactando também no microambiente tumoral (Santander et al. 2015). A produção aumentada de

leptina é capaz de interferir na via JAK/STAT, aumentando a expressão de proteínas anti-apoptóticas, atuando também na indução e produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-6 além de induzir angiogênese com o aumento da produção de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Deep Dutta 2012). A desregulação do tecido adiposo branco leva a uma inflamação sistêmica e local, tornando-se um significativo fator para o estabelecimento e agravamento do microambiente tumoral. Além de facilitar o estabelecimento tumoral aumentando a sobrevivência de células tumorais, o tecido adiposo branco também atua no recrutamento e polarização de células imunes. (Corrêa et al. 2017) como pode ser observado na Figura 3.

Adipócitos associados a tumores (TAAs) auxiliam no recrutamento de macrófagos para o microambiente tumoral e sua polarização para a configuração alternativa M2 via CCL2, IL-1 β e CXCL12 (Arendt et al. 2013). Recentemente, Nishimoto et al. mostraram que o acúmulo de macrófagos no microambiente tumoral se deve não apenas à secreção de CCL2 pelos adipócitos, mas também à liberação de DNA por adipócitos degenerados (Nishimoto 2016b). Todos os mecanismos pelos os quais os adipócitos regulam o microambiente tumoral ainda não estão completamente descritos, entretanto, o papel da inflamação como mediador desta relação entre adipócitos brancos e células tumorais está sendo cada vez mais estudados, a fim de desenvolver métodos de modulação do tecido adiposo e combate o crescimento de tumores (Figura 4).

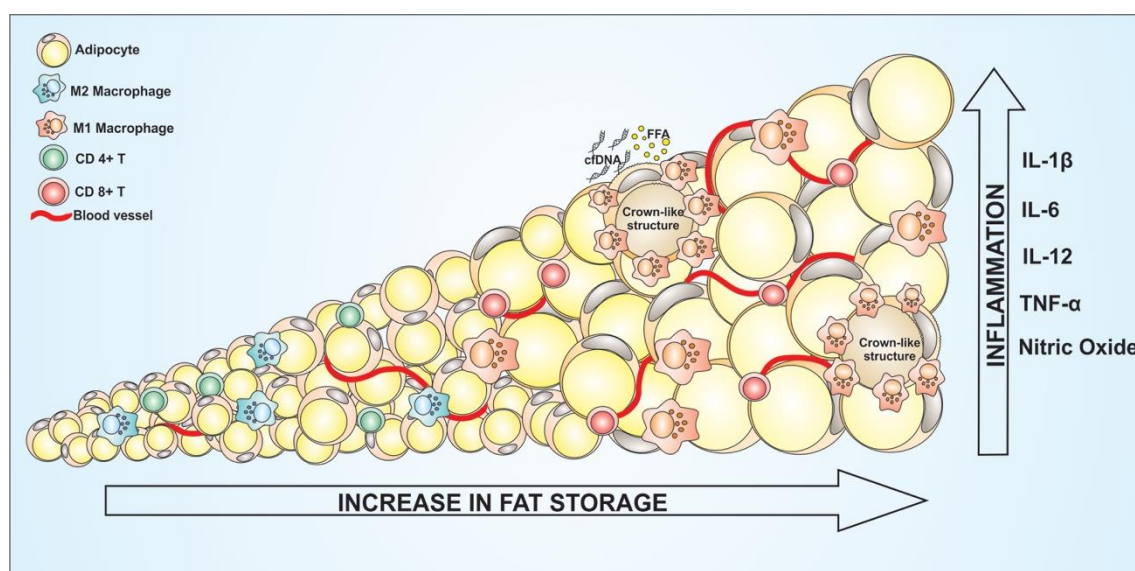


Figura 3. Aumento da reserva lipídica em adipócitos favorece a inflamação. O desequilíbrio na reserva de energia nas células adiposas causada pela obesidade é capaz de mediar a inflamação no tecido. Fonte: The Impact of the Adipose Organ Plasticity on Inflammation and Cancer Progression, Luis H Corrêa, Gabriella S Heyn e Kelly G Magalhães. Cells, 2019.

Além do tecido adiposo branco, o tecido adiposo marrom também atua no controle hormonal do corpo, em adição a regulação da temperatura corpórea (Peng, Xiao-rong; Gennemark, Peter; O'Mahony 2015). O tecido adiposo marrom, ou apenas BAT (do inglês *Brown Adiposo Tissue*) atua com um caráter predominante anti-inflamatório. Diferentemente do tecido adiposo branco, no marrom as gotículas de gordura estão dispostas de forma multilocular (Peirce et al. 2014). Além disso, fisiologicamente estas células possuem grandes números de mitocôndrias, o que garante seu principal papel no organismo: termogênese (Corrêa & Magalhães 2019).

Durante anos, acreditava-se que o tecido adiposo marrom era encontrado apenas em recém-nascidos e em pequenos roedores, contudo, estudos já mostram que adultos possuem quantidades significativas deste tecido, apresentando grande importância na modulação da inflamação (Lecoultre 2011). Nos adipócitos marrons, a elevada expressão e ativação da proteína desacopladora 1 (ou em inglês *uncoupling protein 1* (UCP1)) garante a funcionalidade dos adipócitos, em que há o desvio de elétrons da cadeia transportadora de elétrons durante a respiração celular nas mitocôndrias, ativando UCP1, e sendo um ótimo marcador para a identificação de adipócitos marrons (Oelkrug, Polymeropoulos, & Jastroch 2015). Entre os vários fatores capazes de ativar esta proteína nos adipócitos e promover a termogênese, está a sinalização da norepinefrina através dos receptores β_3 , aumentando a atividade deste tecido (Fenzl & Kiefer 2014). Assim como o tecido adiposo branco, no marrom há inúmeras células residentes além dos adipócitos, como células imunológicas, fibroblastos e uma matriz bem desenvolvida, em que há uma grande interação célula-célula, que por sua vez contribui para a grande plasticidade fenotípica deste tecido (Fenzl & Kiefer 2014) (Jong et al. 2017).

O tecido adiposo marrom é caracterizado como um tecido anti-inflamatório, contudo seu papel no câncer ainda é controverso. A indução do aumento de células marrons em função da diminuição de adipócitos brancos é caracterizada como um melhor prognóstico durante a obesidade, com redução de peso, diminuição da inflamação e promovendo um metabolismo regulado (Trayhurn 2018). Em adição, análises experimentais mostraram uma ligação entre existe uma superexpressão de genes antitumorais e um aumento de adipócitos marrons. Um dos genes ligados a maior ativação do tecido adiposo marrom e a diminuição de sobrevivência e proliferação tumoral é o gene PTEN. O gene PTEN atua na regulação do crescimento e proliferação celular, sendo um dos mais importantes reguladores antitumorais. Um estudo demonstrou que a superexpressão do gene PTEN desencadeou

resistência ao câncer, gasto energético e resistência à insulina em camundongos (Ortega-molina et al. 2010). Porém, o aumento do tecido adiposo marrom promove um agravamento em casos de caquexia, onde ocorre a perda de peso de forma excessiva, e a elevada atividade do tecido adiposo marrom pode agravar este processo, com uma utilização mais intensa das reservas energéticas na forma de lipídio na produção de calor pelas mitocôndrias nos adipócitos marrons. Além disso, o tecido adiposo marrom superativado é capaz de fornecer uma grande quantidade de energia para desenvolvimento de células neoplásicas (Kir & Spiegelman 2016).

O papel de adipócitos marrom no controle de doenças metabólicas e no câncer ainda é pouco conhecido, contudo, assim como ocorre nos tecidos adiposos brancos, o tecido adiposo marrom é responsável pela polarização e controle da inflamação e do metabolismo lipídico, sendo então um potencial alvo para pesquisas terapêuticas nos tratamentos destas doenças.

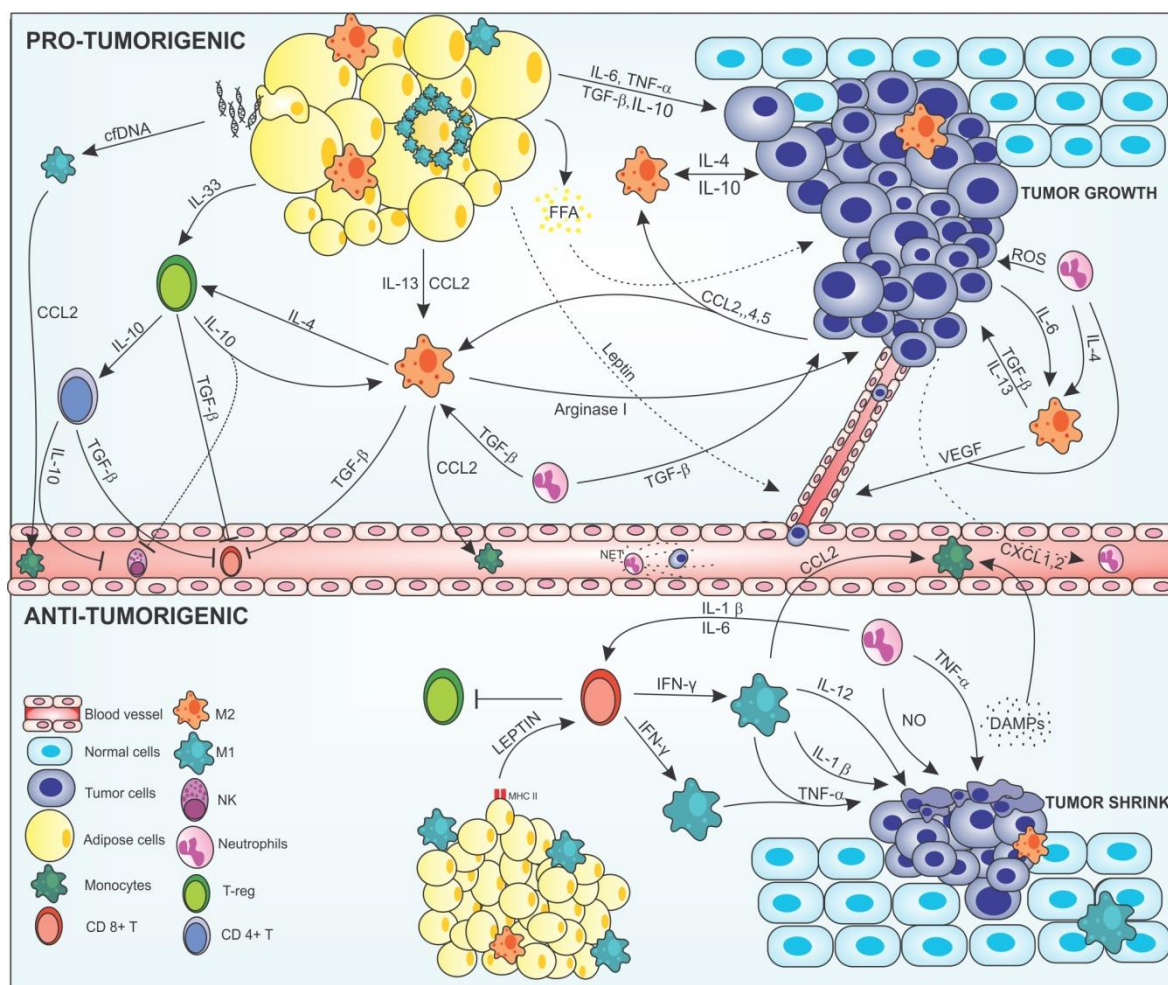


Figura 4. Adipócitos associados ao tumor. Adipócitos podem estar ligados ao desenvolvimento tumoral dando suporte energético assim como modulando a inflamação no microambiente tumoral. Fonte: *Adipocytes and Macrophages*

Interplay in the Orchestration of Tumor Microenvironment: New Implications in Cancer Progression. Luis H Correa, Rafael Correa, Cecilia M , Livia P Dourado and Kelly G Magalhães, *Frontiers in Immunology*, 2017.

Embora o tecido adiposo branco e marrom sejam os mais bem descritos, ainda pode-se citar os adipócitos bege e os adipócitos rosa, os quais também possuem grande plasticidade celular, desempenhando papéis fundamentais no organismo. Os adipócitos bege são extremamente plásticos, em que estímulos externos induzem uma mudança fenotípica para adipócitos marrons. Sobre condições de baixa temperatura, o aumento de norepinefrina, assim como outras vias, induz a maior expressão de receptores característicos de células marrons, produzindo calor como consequência da maior ativação da UCP1, além disso, essas células apresentam uma quantidade intermediária de gotículas de gordura, estando entre as células marrons e brancas (Wu J1, Cohen P 2013).

Dependendo de alguns fatores como baixas temperaturas, exercícios físicos, alimentação e drogas agonistas os tecidos adiposos brancos e beges podem adquirir características das células adiposas marrons (Rocha-rodrigues et al. 2016). Este evento ocorre como uma habilidade evolutiva adquirida, para que o organismo conseguisse produzir calor mesmo em situações mais extremas. Atualmente estudos têm tentado induzir este processo chamado “amarronzamento” a fim de reduzir a quantidade de gordura armazenada e ativar, de forma mais eficiente, o tecido adiposo marrom. O amarronzamento ocorre com a ativação de receptores adrenérgicos nas membranas dos adipócitos marrons, gerando uma cascata de sinalização intracelular que resulta em uma maior produção e ativação da proteína UCP1 nas mitocôndrias destas células, aumentando assim a produção de calor pelo consumo de lipídeo no tecido adiposo (Burl et al. 2018). Este fenômeno também ocorre de forma natural nos organismos, caracterizando a elevada plasticidade do tecido adiposo.

Já adipócitos rosa estão localizados especificamente na mama, surgindo apenas durante a gravidez e lactação. Adipócitos rosa são células alveolares secretoras de leite que podem surgir da transdiferenciação de adipócitos brancos durante a gravidez e lactação. Essas células são caracterizadas por abundantes gotículas lipídicas citoplasmáticas, superfície apical com microvilosidades, retículo endoplasmático rugoso robusto (RER), complexo de Golgi e grânulos contendo leite. Como o órgão adiposo adquire uma coloração rosa durante a gestação e a lactação, essas células glandulares epiteliais foram denominadas adipócitos rosados (Cinti 2018) (Giordano et al. 2014). Estudos a respeito da biologia de adipócitos rosas são recentes, logo, pouco se sabe a respeito da influencia

dessas células no câncer, embora pesquisas estejam sendo desenvolvidas a fim de responder possíveis influências que essas células podem ter no desenvolvimento do câncer de mama. A diferença celular entre os adipócitos está sintetizada na figura 05.

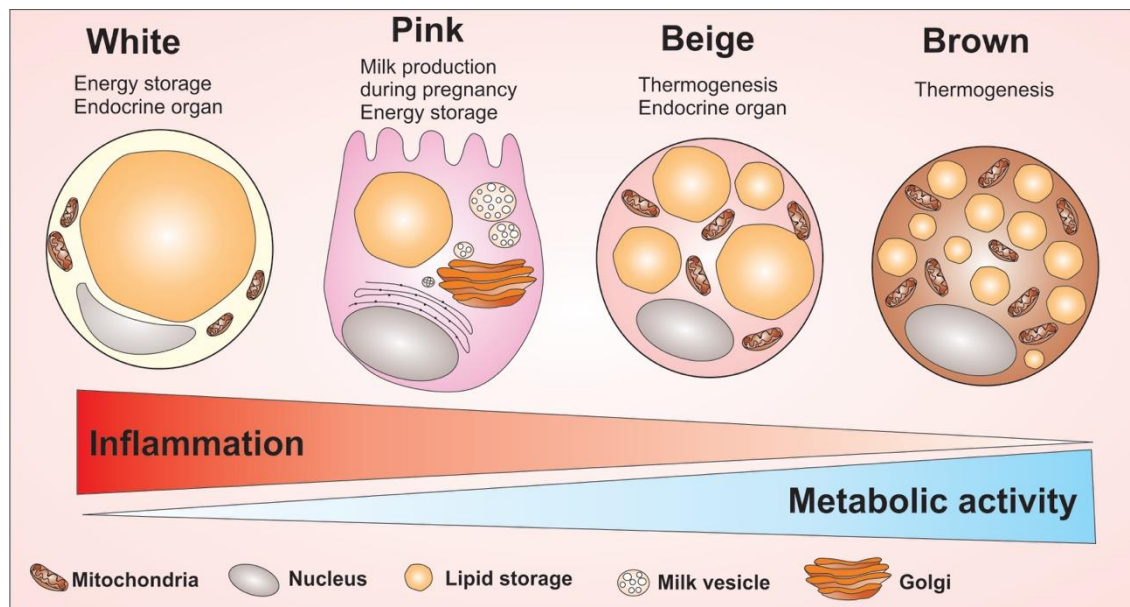


Figura 5. Adipócitos branco, rosa, bege e marrom. Os adipócitos são divididos em 4 tipos de células que possuem características morfológicas e funcionais diferentes. Fonte: *The Impact of the Adipose Organ Plasticity on Inflammation and Cancer Progression*, Luis H Correa, Gabriella S Heyn e Kelly G Magalhães. *Cells*, 2019. Tendo em vista a grande capacidade de regular a homeostase energética corporal, assim como modular o perfil inflamatório de forma local e sistêmica, os tecidos adiposos tem sido alvo de pesquisas com grande aplicabilidade no combate à obesidade, diabetes e câncer. Sendo a inflamação um dos principais meios de sinalização dos adipócitos na regulação da homeostase, tornou-se necessário o entendimento de mediadores inflamatórios e inflamassomas para elucidar como esses tecidos agem nesta regulação.

O Inflamassoma NLRP3

O Inflamassoma NLRP3, assim como outros inflamassomas, exerce um papel central no controle da inflamação pela maturação de citocinas. Os inflamassomas são descritos como um conjunto de proteínas que se agrupam intracelularmente e atuam na ativação de caspase-1 pela clivagem da pro-caspase-1 (Yang et al. 2019). Caspase-1, por sua vez, é uma enzima que age na ativação das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18, que irão induzir inflamação local e sistêmica (Liu et al. 2016).

Atualmente, alguns inflamassomas já estão bem caracterizados, podendo-se citar os NLRP3, NLRP1, AIM2 e NLRC4. Contudo o inflamassoma NLRP3 é o melhor descrito,

sendo um importante complexo imunológico que atua na linha de frente no combate a infecções pela imunidade inata (He, Hara, & Núñez 2016). O inflamassoma NLRP3 compreende três bases funcionais, uma região NOD de regulação localizada na posição central, uma região N-terminal efetora envolvida na sinalização, presente nessa região um domínio pirina (PYD), um domínio responsável pelo recrutamento de caspase (CARD), ou um domínio inibidor de baculovírus (BIR); e a região C-terminal que é composta por repetições ricas em leucina (LRRs). Para que haja a montagem e ativação correta do inflamassoma, dois sinais são necessários para a eficiente maturação de IL-1 β e IL-18. O primeiro sinal consiste da sinalização por PRRs que induzam à ativação do fator de transcrição NF- κ B, promovendo a transcrição de pró-IL-1 β e pró-IL-18; o segundo sinal, consiste no processamento proteolítico desses precursores em suas formas biologicamente ativa via caspase-1, a qual é ativada pelo inflamassoma (Eicke Latz, T. Sam Xiao 2013).

Após a ativação, a proteína NLRP3 interage com ASC via PYD, e o domínio CARD da proteína adaptadora ASC recruta o domínio CARD da pró-caspase-1 para formar o complexo NLRP3-ASC-pró-caspase-1, também chamado de inflamassoma NLRP3, e caracterizado como a via canônica de montagem do inflamassoma NLRP3 (Karen V. Swanson 2019). Além da via convencional, há também a via não-canônica, onde há a participação da caspase-11 em murinos ou a suas homólogas em humanos, caspases-4/5. Na via não-canônica, o estímulo microbiano intracelular se liga diretamente às caspases. A ativação dos receptores ou ligação das caspases com o estímulo, leva ao recrutamento das proteínas do inflamassoma e à oligomerização da pró-caspase-1, que promove sua autoproteólise e consequente ativação leva a clivagem e a secreção de IL-1 β e IL-18 ou a morte celular chamada piroptose (Kayagaki et al. 2011).

Em função da grande diversidade química e estrutural dos estímulos que ativam o NLRP3, é provável que o NLRP3 detecte um sinal celular comum induzido em resposta aos ativadores do NLRP3. Vários eventos moleculares e celulares têm sido propostos como desencadeantes da ativação do inflamassoma NLRP3, incluindo efluxo de K⁺, sinalização de Ca²⁺, espécies reativas de oxigênio (ROS), disfunção mitocondrial e ruptura lisossomal (Yang et al. 2019). Contudo, a superativação deste inflamassoma tem sido ligado ao desencadeamento de algumas doenças autoimune assim como doenças metabólicas ligadas a inflamação.

Tendo em vista a grande importância da atividade do inflamassoma NLRP3 no controle da inflamação através da maturação de IL-1 β e IL-18, estudos têm sido feitos com intuito de elucidar o papel deste inflamassoma no desenvolvimento de algumas doenças, como por exemplo, a relação inflamassoma NLRP3 e câncer (Moossavi et al. 2018). A relação da inflamação e do processo de estabelecimento e progressão tumoral já é bem estabelecida. Macrófagos, linfócitos e células assassinas naturais (NKs) podem ser recrutadas e polarizadas no microambiente tumoral a fim de favorecer o processo de desenvolvimento do tumor (Corrêa et al. 2017). Embora o papel do inflamassoma NLRP3 no câncer ainda não esteja totalmente elucidado, estudos mostram um papel dual deste complexo na tumorigênese. Foi demonstrado que a produção de IL-18 está associada com a maior produção de interferon-gama (INF- γ) e ativação de transdutor de sinal e ativador de transcrição (STAT1) envolvida na proteção contra tumorigênese de colorretal (Zaki, Md. Hasan, Peter Vogel & 2011). Em adição, grandes produções de IL-18 pelo inflamassoma NLRP3 são responsáveis por uma intensa ativação e recrutamento de células NK, desencadeando o processo de morte celular por apoptose pelo mecanismo de ligante FasL e células tumorais (Dagenais & Saleh 2016). Em complemento, em um estudo utilizando um modelo pré-clínico de câncer associado à colite (CAC), camundongos sem as proteínas adaptadoras de inflamassomas PYCARD (ASC) e caspase-1 demonstraram aumento da doença, morbidade e formação de pólipos (Wei et al. 2013).

Em contrapartida, a elevada ativação do inflamassoma NLRP3 e grande produção de IL-1 β são responsáveis por um pior prognóstico durante o câncer de mama (Kolb et al. 2014). A produção de IL-1 β é regulada positivamente durante o início do processo de desenvolvimento tumoral de mama, onde estudos recentes mostraram uma correlação entre a produção de Fator de crescimento de fibroblasto 1 (FGFR1) e a produção de IL-1 β , mostrando que a grande ativação deste inflamassoma pode ser um facilitador durante o processo de angiogênese, consequentemente facilitando o processo de metástase (Reed et al. 2009). Em adição, a ativação do inflamassoma NLRP3 no tumor de mama também está relacionada com a grande ativação de esfingosina-1-fosfato (S1P) (Tsuchida et al. 2017). A sinalização S1P está envolvida em várias vias biológicas celulares e, possivelmente, regula o crescimento, a proliferação, o desenvolvimento e a sobrevivência celular e é consideravelmente produzida por macrófagos (Weigert, Weis, & Br 2009).

Os macrófagos associados ao tumor (TAMs), entre outras células imunes que infiltram o tumor, desempenham um papel importante na propagação do tumor. Durante estágios de

desenvolvimento tumoral, grande quantidade de IL-1 β é produzida como consequência da elevada ativação do inflamassoma NLRP3 (Chanmee et al. 2014), induzido por sua vez uma ativação elevada da sinalização S1P, mostrando que uma ativação deste inflamassoma de forma desregulada pode levar um agravamento tumoral. Além disso, Observou-se que o NLRP3 promove a expansão de macrófagos imunossupressores. A ativação do NLRP3 em macrófagos conduz a diferenciação de células T CD4 +, Th2 e Th17, enquanto suprime a inflamação do tipo 1 (Daley et al. 2016). A função exata dos inflamassomas no desenvolvimento de doenças metabólicas, como câncer, está cada vez mais elucidada, em que a inibição específica de inflamassomas pode ser uma nova ferramenta para a manipulação de células tumorais, aumentando a eficácia das abordagens já empregadas na imunoterapia.

O inflamassoma NLRP3 também possui um papel chave na modulação do tecido adiposo, sendo um importante veículo para regulação da inflamação, que pela secreção de IL-1 β regula a polarização de macrófagos, assim como está relacionado com a obesidade e resistência a insulina (Esser et al. 2014). Estudos têm mostrado que a expressão de *Nlrp3* no tecido adiposo visceral está ligado a um maior ganho de peso em camundongos submetidos a dieta com alta concentração de gordura, quando comparados com a dieta com níveis normais de lipídeos, mostrando que a alta expressão deste gene está ligado com o ganho de peso destes animais (G. Betanzos-Cabrera, D. Estrada-Luna 2012). Em corroboração com estes dados, outros experimentos recentes vêm mostrando que camundongos deletados para o gene da proteína *Nlrp3* têm uma maior resistência ao ganho de peso (R. Stienstra 2011). O papel do inflamassoma NLRP3 nos tecidos adiposos vem sido cada vez mais estudado, ligando a importância das células imunes no tecido com o desenvolvimento de doenças metabólicas.

Em adição, o pesquisador Marc G. Jeschke demonstrou que a expressão de *Nlrp3* também está relacionado com o processo de amarronzamento do tecido adiposo branco. Por meio de dados experimentais, ele demonstrou que camundongos deletados para esta proteína tiveram níveis de marcadores de amarronzamento significativamente aumentados, como a expressão de PPAR γ , CIDEA, UCP1 e PGC1 em diferentes tempos (Jeschke 2019). A correlação do inflamassoma NLRP3 com a polarização de macrófagos no tecido adiposo é direta. Visto que a obesidade está ligada com um maior número de macrófagos no tecido adiposo e esse por sua vez expressando maiores quantidades deste inflamassoma,

torna-se necessário o aprofundamento no entendimento das relações moleculares entre NLRP3, tecido adiposo e o desenvolvimento de doenças metabólicas.

Justificativa

Tendo em vista a eminente importância do tecido adiposo no controle da inflamação, e essa por sua vez, exercendo um papel chave na progressão tumoral do câncer de mama, torna-se de grande importância o melhor entendimento das relações celulares entre células tumorais e adipócitos, e o microambiente envolvido neste processo. O tecido adiposo apresenta diferentes fenótipos, entre eles os mais bem descritos são os brancos e marrons. Embora ambos sejam tecidos com grande armazenamento energético, eles apresentam significantes influências na modulação da inflamação. Entretanto, mecanismos exatos de como os tecidos adiposos influenciam no estabelecimento do câncer de mama ainda necessitam de estudos.

. A expressão elevada de proteínas do inflamassoma NLRP3 pode influenciar a progressão tumoral de mama pela elevada secreção de IL-1 β , polarizando células imunes podendo desencadear uma série de eventos no microambiente tumoral (Moossavi et al. 2018) (Crispim 2017). Levando em consideração a importância do tecido adiposo na manutenção do microambiente, torna-se crucial o entendimento de como o inflamassoma NLRP3, assim como o papel das Caspases 1/11 de tecidos adiposos agem na modulação da inflamação e estabelecimento do câncer de mama para que futuramente sejam desenvolvidas moléculas com potenciais terapêuticos a fim de ser utilizadas como coadjuvante no tratamento do câncer de mama.

Objetivos

Objetivo geral:

Analisar o papel dos produtos de secreção dos tecidos adiposos brancos e marrons na modulação de parâmetros carcinogênicos de células de câncer de mama, avaliando a influência das proteínas NLRP3 e Caspase 1/11 neste processo.

Objetivos específicos:

- Verificar se os produtos de secreção de tecidos adiposos brancos e marrons, selvagens e deficientes para Caspase1/11 e NLRP3, modulam nas células de câncer de mama os seguintes parâmetros:

- Viabilidade e morte celular
- Proliferação celular
- Secreção de citocinas pró- e anti-inflamatórias
- Biogênese de corpúsculos lipídicos
- Geração de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico
- Modulação no perfil proteico das células tumorais

- Analisar se os produtos de secreção de tecidos adiposos brancos e marrons, selvagens e deficientes para Caspase1/11 e NLRP3, modulam o perfil de linfócitos TCD4+, TCD8+ e células NK

- Investigar se os produtos de secreção de tecidos adiposos brancos e marrons, selvagens e deficientes para Caspase1/11 e NLRP3, modulam a biogênese de corpúsculos lipídicos de macrófagos e sua polarização

- Caracterizar os efeitos da presença e ausência das proteínas Caspase1/11 e NLRP3 sobre os tecidos adiposos brancos e marrons, analisando:

- A morfologia destes tecidos
- A infiltração de macrófagos nestes tecidos
- A produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias
- O perfil global lipídico nestes tecidos

Metodologia

Experimentos com animais

Foram utilizados camundongos fêmeas C57BL/6 caspase 1/11 -/- , C57BL/6 Nlrp3-/- C57BL/6 selvagens a 23 ± 1 ° C em ciclo de luz / escuro de 12 horas com acesso livre a comida. Os camundongos Nlrp3 - / - e caspase-1/11 - / - foram fornecidos pela Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto, enquanto os C57BL/6 eram do biotério da Universidade de Brasília. Para experimentos *ex vivo*, foram utilizados três a seis murganhos por grupo. O Comitê de Ética em Uso Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília aprovou todos os procedimentos realizados neste trabalho.

Culturas celulares

- a) Células 4T1: Células tumorais triplo negativas da glândula mamaria, origem murina (*Mus musculus*) foram utilizadas *in vitro* cultivadas em meio DMEM adquirido da Sigma-Aldrich e suplementado com bicarbonato de sódio, 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 40µg/mL de Gentamicina em estufa úmida a 37°C a 5% CO₂.
- b) BMDM (Bone Marrow Derived Macrophage) foram utilizados a fim de avaliar a modulação destas células pelo tecido adiposo. Células totais foram retiradas dos fêmures de camundongos selvagens e cultivadas em placas de Petri na presença de 10 mL de meio RPMI 1640 (Gibco, Life Technologies, MD, EUA), 1% de penicilina e estreptomicina e 30% de sobrenadante de cultura de células L929 (LCCM - L-Cell Conditioned Media) como uma fonte de M-CSF (do inglês MAcrophage Colony-Stimulating Factor) (meio R20/30). Quatro dias depois da extração das células e plaqueamento, foram acrescentados mais 10 mL de meio R20/30. No sétimo dia de cultivo, as células foram desaderidas e utilizadas nos devidos experimentos.

Obtenção do produto de secreção do tecido adiposo e estímulo celular

O tecido adiposo branco foi obtido a partir da tuba uterina, onde estão sob influência mais imediata de hormônios femininos e tecido adiposo marrom da região supraescapular de camundongos C57BL / 6 selvagem, Caspase 1/11 - / - e Nlrp3 - / - e cultivados em meio

de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) contendo 10% soro bovino fetal (FBS), albumina de soro bovino a 1% (BSA), 10 mg de estreptomicina e 25 µg/mL de anfotericina B e incubado a 37°C e 5% CO₂ durante 24 horas. Após 24 horas de tecido adiposo incubado em meio DMEM, o sobrenadante livre de células foi coletado, centrifugado a 1500 RPM por 10 minutos e usado para estimular células de câncer de mama ou esplenócitos.

Estimulação de células de câncer de mama 4T1

4T1 foram estimuladas com o produto de secreção dos tecidos adiposos na proporção de 2:1 (duas partes de meio de cultura pra 1 parte de produto de secreção) em DMEM contendo 10% de soro bovino fetal (FBS) e 10 mg de estreptomicina e 25 / mL de anfotericina B numa incubadora a 37 e 5% de CO₂.

Análise de esplenócitos

O baço dos camundongos foi dissociado utilizando uma rede porosa e os esplenócitos foram colhidos de camundongos selvagens C56BL / 6. As células foram cultivadas em meio completo RPMI suplementado com 10% de SFB. Após 24 horas, os esplenócitos foram estimulados com meio condicionado pelo tecido adiposo branco e marrom de C56BL / 6 tipo selvagem, caspase 1/1 - / - e Nlrp3 - / - por 72 horas. Durante as últimas 4 horas de estimulação, um inibidor do transporte intracelular Brefeldina A (Invitrogen-10µg / ml) foi adicionado para bloquear a secreção de citocinas. Dependendo do experimento. Os esplenócitos foram marcados na superfície com anti-CD3 (FITC), anti-CD3 (APC) anti-CD4 (PE); anti-CD8 (APC), anti-CD8 (PE) e anti-NKT1.1 (PE). Para a marcação intracelular, as células foram permeabilizadas com saponina 0,1% e marcadas para detecção de IL-4 (FITC), IFN-γ (FITC) e Granzima B (FITC). As células foram ressuspensas em 400µL de 1% de paraformaldeído e 10% de solução de FBS. A citometria de fluxo foi realizada usando FACSVerser (BD Biosciences) e analisada pelo software FlowJo versão 9 (Treestar, Ashland, OR).

Morte celular

A apoptose e a necrose foram medidas em células 4T1 estimuladas com produto de secreção de tecido adiposo branco e marrom selvagens, Caspase 1/11 - / - e Nlrp3 - / -. A

análise de perfil de morte celular foi realizada por citometria de fluxo utilizando os agentes fluorescentes Anexina V-FITC e Iodeto de propídeo. 10^5 células foram semeadas em placas de 24 poços e após adesão foram estimuladas por 24 e 48 horas com os produtos de secreção dos tecidos adiposos descritos acima. Após os tempos de estímulo, as células foram coletadas e lavadas duas vezes com PBS 1X em centrifugação à 1500 rpm. As células foram então ressuspensas em 100 μ L de tampão de ligação 1 X (10 mM de HEPES/NaOH pH 7,4 140 mM de NaCl e 2,5 mM de CaCl_2), 2 μ L de Anexina V-FITC (quatroG) e 2 μ L de iodeto de propídeo (quatroG) e incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente ao abrigo de luz. Após essa etapa, as células foram lavadas uma vez com PBS 1 X, ressuspensas em 400 μ L de tampão de ligação 1 X e imediatamente analisadas em citômetro de fluxo (FACS VERSE, BD Biosciences) utilizando os canais FL-1 e FL-3, ambos em escala exponencial. Os dados obtidos foram analisados utilizando o software FlowJo V10 (Tree Star Inc). Como controle experimental foram utilizadas células aquecidas à 100 °C por 10 minutos.

Viabilidade celular

Para a análise de viabilidade de células de câncer de mama sobre influencia do produto de secreção vindo de tecidos adiposos brancos e marrons selvagens e deletado para proteínas do inflamassoma NLRP3, foi realizado um ensaio com MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio brometo). 5×10^5 células foram plaqueadas em placa de 96 poços e estimuladas com produto de secreção vindo de tecidos adiposos brancos e marrons por 24h. Após o tempo de estímulo, as células foram expostas à uma solução de 6,66 % MTT (Life Technologies). O sobrenadante foi descartado e os cristais de formaram foram dissolvidos utilizando-se 100 μ L de DMSO. A leitura da absorbância foi realizada em 570 nm utilizando o espectrofotômetro *Spectramax M3*. A análise dos dados de viabilidade foi feita utilizando o software *GraphPad Prism*, considerando a média do valor de absorbância do não-estimulado como 100% de viabilidade e analisando os outros grupos de forma proporcional. O controle experimental foi obtido expondo as células ao agente citotóxico DMSO.

Formação de poros na membrana plasmática

A análise da influência do produto de secreção de tecidos adiposos selvagens e deletados de proteínas do inflamassoma NLRP3 sobre a formação de poros na membrana

plasmática das células 4T1 tratadas foi realizada por meio de um ensaio de poros, que consiste na análise de emissão de fluorescência de forma cinética pelo iodeto de propídeo. 10^5 células foram plaqueadas em placas de 96 poços de paredes escuras, adicionando então o Iodeto de propídeo $3 \mu\text{g/mL}$ e os estímulos vindo dos diferentes tipos de tecido adiposo em RPMI sem vermelho de fenol suplementado com 5 % de soro fetal bovino e 1 % de Penicilina/Estreptomicina. Logo após o estabelecimento do estímulo, os valores de fluorescência do iodeto de propídeo foram detectados em espectrofotômetro Spectramax durante 12 horas em intervalos de 5 minutos entre as leituras utilizando comprimentos onda de excitação de 538 nm e de emissão de 617 nm. Os dados obtidos foram analisados utilizando o software *GraphPad Prism*.

Proliferação celular

Tendo-se como objetivo analisar o efeito do produto de secreção dos tecidos adiposos sobre a proliferação de células 4T1 foi realizado um ensaio utilizando o CFSE. Esse composto fluorescente é permeável à membrana caracteriza-se por interagir com aminas citoplasmáticas. Uma vez que a célula realiza o processo de divisão celular, as moléculas de CFSE são igualmente divididas entre as células filhas, diluindo assim a fluorescência presente em cada célula gerada. 10^5 células foram introduzidas em placas de 24 poços, após completa adesão foram lavadas uma vez com PBS 1 X e expostas à $5 \mu\text{M}$ de CFSE (eBioscience) diluído em PBS 1 X por 15 minutos à temperatura ambiente. Após incubação com o agente fluorescente, as células foram expostas a Soro Fetal Bovino à 4°C a fim de se eliminar o CFSE extracelular, lavadas uma vez com PBS 1X e estimuladas por 24 horas. As células foram então coletadas, lavadas uma vez com PBS 1 X em centrifugação à 1500 rpm e fixadas em $400 \mu\text{L}$ de paraformaldeído 1 X. As células foram analisadas em citômetro de fluxo (FACS VERSE, BD Biosciences) em canal FL-1 em escala exponencial e os dados foram analisados utilizando o software *FlowJo V10* (Tree Star Inc). O controle experimental foi obtido expondo células marcadas com CFSE à $5 \mu\text{M}$ de colchicina por 24 horas.

Biogênese de corpúsculos lipídicos

A fim de se analisar por citometria de fluxo se o tratamento com diferentes produtos de secreção dos tecidos adiposos afetam a biogênese de corpúsculo lipídico em células de câncer de mama, utilizou-se a sonda fluorescente lipofílica BODIPY 493/503 (Life

technologies), a qual interage com lipídeos neutros, abundantes no interior de corpúsculo lipídico. 10⁵ células foram semeadas em placas de 24 poços e estimuladas por 24 e 48 horas. Após tempo de estímulo, as células foram coletadas, lavadas duas vezes com PBS 1X e incubadas numa solução de Bodipy/PBS em uma proporção de 1/5000 a 4 °C ao abrigo de luz. Em seguida as células foram lavadas duas vezes com PBS 1 X e ressuspensas para fixação em 400 µL de paraformaldeído 1 X. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (FACS VERSE, BD Biosciences) utilizando o canal FL-1 em escala exponencial. Os dados foram analisados utilizando o software FlowJo V10 (Tree Star Inc).

Em complemento aos dados de citometria de fluxo, também foi verificado a biogênese de corpúsculo lipídico por microscopia óptica. Foi realizada marcação com os corantes Oil Red O e hematoxilina. 10⁵ células foram plaqueadas em placas de 24 poços contendo lamínulas tratadas para cultura celular. Depois de estarem aderidas nas lamínulas, as células foram tratadas com o produto de secreção de tecido adiposo brancos e marrons por 24 horas. Após estímulo, as células foram fixadas utilizando formalina 3,7 % por 10 minutos. A seguir as células foram lavadas três vezes com água destilada e expostas por 2 minutos a PEG 100 %. No passo seguinte, o excesso de PEG 100 % foi retirado e as células foram incubadas com Oil Red O 0,5 % por 15 minutos. As células foram novamente lavadas três vezes com água destilada e marcadas com hematoxilina por 3 segundos. Após novas lavagens, as lamínulas foram montadas em lâminas com o auxílio de esmalte transparente e as imagens foram adquiridas utilizando microscópio de luz (ZEISS) e o software Zen.

Produção de espécies reativas de oxigênio

Com o objetivo de verificar se os produtos de secreção de tecidos adiposos são capazes de modular de forma diferencial espécies reativas de oxigênio em células 4T1, realizou-se ensaio com a sonda DCF-DA. Esse ensaio se baseia no fato de que o DCF-DA é convertido em um composto não-fluorescente no interior da célula. Esse composto quando oxidado por espécies reativas de oxigênio gera um composto fluorescente (DCF). 10⁵ células foram plaqueadas em placas de 24 poços e estimuladas por 6 horas. Após tempo de estímulo, as células foram expostas a 20 µM de DCF-DA por 30 minutos a 37 °C ao abrigo da luz. Depois marcação, as células foram coletadas, lavadas três vezes com PBS 1 X e ressuspensas em 400 µL de PBS 1 X. As amostras foram imediatamente

analisadas em citômetro de fluxo (FACS VERSE, BD Biosciences) utilizando o canal FL-1 em escala exponencial. Os dados foram analisados utilizando o software *FlowJo V10* (Tree Star Inc).

Secreção de óxido nítrico

Com o intuito de analisar se o tecido adiposo é capaz de modular de forma diferenciada a secreção de óxido nítrico pelas células de câncer de mama 4T1, foi conduzida dosagem utilizando o reagente de Griess. 10^5 células foram semeadas em placa de 24 poços e estimuladas com o produto de secreção de tecidos adiposos brancos e marrons selvagens e deletados das proteínas Caspase 1/11 e Nlrp3 por 24 horas. Após os tempos de estímulo, os sobrenadantes de cultura foram coletados, transferidos para placa de cultura e expostos à solução de Griess (Sulfanilamida 14,5 M, N-1-naftiletilenediamina 9,64 M, ácido fosfórico 0,0125 % em água destilada). A curva padrão, composta por crescentes concentrações de nitrito de sódio diluído em meio de cultura DMEM, também foi exposta ao reagente de Griess. Após incubação por 10 minutos à temperatura ambiente, os valores de absorbância das amostras foram obtidos à 540 nm utilizando o espectrofotômetro *Spectramax M3*

Dosagens de citocinas

A secreção de citocina foi analisada em tecido adiposo branco e marrom de camundongos C57BL / 6 (selvagem), caspase 1/11 - / - e Nlrp3 - / -, bem como células 4T1, estimuladas com tecido adiposo branco e marrom. Para a quantificação de citocinas nos tecidos adiposos, o tecido adiposo marrom e branco foi coletado e congelado em nitrogênio líquido para posterior extração proteica. Para a quantificação da secreção de citocinas pelas células 4T1 após estímulo com o produto de secreção de tecidos adiposos brancos e marrons, após 24 horas de estímulo, o sobrenadando foi coletado e a dosagem foi realizada. A secreção de citocina foi medida por ELISA de acordo com as instruções do fabricante. As placas foram lidas após a adição da solução de parada a 450 nm usando espectrofotômetro SpectraMax M3 (Molecular Devices, Sunnyvale, EUA)

Histologia dos tecidos adiposos

Marcação com Hematoxilina e Eosina do tecido adiposo: O processo de coloração se deu pelo corte do tecido adiposo seguido do processo de marcação com Hematoxilina e Eosina.

Inicialmente foi feito a desparafinização dos tecidos utilizando Xilol I e II seguido da hidratação das amostras com álcool etílico 100%, 80% e 70% respectivamente. Após a lavagem foi feito a coloração por 3 minutos com a Hematoxilina e em seguida por 7 minutos com Eosina. Após lavagens, uma nova desidratação foi feita com álcool etílico 100%, 80% e 70% respectivamente e finalizado com a fixação com Xilol I e II. As imagens foram adquiridas obtidas utilizando o microscópio de luz (ZEISS) e software Zen.

- Infiltração de macrófagos: cortes histológicos de quarto micrometros de espessura foram obtidos a partir de material embebido em parafina e colhidos em lâminas com 3 amino-propyltriethoxy-silane (Sigma Chemical, MO/USA). Em seguida os cortes foram desparafinizados com banhos em xilol e hidratadas com banhos em etanol 100%, 95% e 70% e lavagem em agua corrente por 5min. Em seguida foi feito o bloqueio de peroxidase endógena com água oxigenada 3% por 10 min e o bloqueio de ligações inespecíficas foi feito com de leite desnatado a 10% por 30 min. Em seguida, as lâminas foram incubadas com o anticorpo anti-CD68 (cód. CNL-CD163, CA, USA) na diluição de 1:300, “overnight”. Para a revelação da marcação foi utilizado a solução cromógena *TrueBlue Peroxidase substrate* (cód. 71-00-64, KLP,USA) e água oxigenada 3%. As lâminas foram lavadas e analisadas. As imagens foram obtidas utilizando o microscópio de luz (ZEISS) e software Zen e a abundancia de macrófagos nas lâminas foi realizada utilizando o software ImageJ.

Analise da expressão gênica de marcadores de polarização de macrófagos.

A analise de expressão gênica de marcadores de polarização de macrófagos foi realizada pela analise de macrófagos estimulados com o produto de secreção de tecidos adiposos brancos e marrons selvagens e deletados para proteínas do inflamassoma NLRP3. Após estímulos, as amostras foram submetidas à extração de RNA por Trizol (Life Technologies, CA, USA). A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada a partir de 2ug de RNA,e usando a enzima M-MLV e DNase Buffer (Invitrogen™). A quantificação relativa do número de cópias do mRNA foi determinada pelo PCR em tempo real QuantStudio™ 12K Flex (Applied Biosystems™), através da determinação do $2^{-\Delta\Delta CT}$

Lipidômica dos tecidos adiposos

Procedimento de extração de lipídios

O método de extração de lipídios foi modificado por Bligh-Dyer (1959). Em que a amostra foi suspensa em 150 μL de água Milli-Q no microtubo. Em seguida, 190 μL de clorofórmio e 375 μL de metanol foram adicionados e a mistura foi agitada em vórtex durante 5 min em 1000 rpm. Assim, 190 μL de clorofórmio e 150 μL de água Milli-Q foram adicionados e agitados em vórtex durante 1 min, e a mistura foi centrifugadas a $14000 \times g$ durante 5 min para induzir a separação de fases. A camada orgânica inferior foi recolhida, concentrada num aparelho Speed-Vac e reconstitua em 100 de uma solução de clorofórmio / metanol (1:1). Infusão por ESI-MS (FIE-MSMS) foi utilizada para anise de metabólitos. A calibração do MS foi realizada utilizando uma mistura de fosfolipídios composta por DOPE, DMPG, DPPA e DPPS.

Análise Orbitrap

A análise de MS dos padrões lipídicos foi realizada por infusão direta a uma taxa de fluxo de $10\mu\text{L} / \text{min}$, em uma bomba de seringa (11 Plus, Harvard Apparatus, Holliston, MA, EUA) usando uma seringa de $500\mu\text{L}$ (Hamilton, Reno, NV, USA). Os espectros de MS (cromatograma de corrente de íon total (TIC)) foram adquiridos em tensão de pulverização de íons a -3500V e a faixa de varredura dos instrumentos foi definida em m / z 66–1000. Os perfis lipídicos foram adquiridos na varredura completa do FTMS e no modo de íons positivos. Fluxo de gás de bainha 15 unidades arbitrárias, fluxo de gás auxiliar 5 unidades arbitrárias e temperatura capilar de 300°C .

Análise multivariada de dados MALDI-MS

Íons lipídicos foram adquiridos, concentrados e processados usando o software Xcalibur (Thermo Fisher). Os íons foram alinhados com uma tolerância de massa de m / z 0,04 Da para lípidos. A intensidade relativa dos picos iônicos foi normalizada pela escala de Pareto (centrada na média e dividida pelo desvio padrão de cada variável) como pré-processamento para análise multivariada. Ambas as abordagens estatísticas não supervisionadas e supervisionadas foram aplicadas. Análise de componentes principais (PCA) e mínimos quadrados parciais - análise discriminante (PLS-DA) foi realizada nos dados usando o MetaboAnalyst (software versão 3.0) (XIA & WISHART, 2016) para discriminar as amostras com base em suas impressões digitais Orbitrap MS. Para determinar os fatores independentes e as características relevantes dentro do experimento,

utilizou-se a Importância Variável em Projeção (VIP) da análise PSL-DA. Todos os dados foram obtidos a partir de análise não paramétrica. A Base de Dados do Metabolome Humano - HMDB (WISHART et al., 2013) e a Estratégia de Metabolitos e Caminhos do LIPID - LIPID MAPS® (Wellcome Trust) foram usados para identificar os lipídios.

Proteômica das células tumorais

Espectrometria de massa:

As análises LC-MS / MS foram realizadas em um sistema Dionex Ultimate 3000 RSLCnano UPLC acoplado ao OrbitrapElite™ (Thermo Scientific; San Jose, EUA), O sistema de cromatografia foi equipado com uma embalagem interna de 2 cm × 100 µm i.d. coluna de armadilha (ReprosilPur C18, 5 µm, 120 Å, Dr. Maich GmbH) e coluna analítica de 35 cm × 75 µm i.d (ReprosilPur C18, 3 µm, 120 Å, Dr. Maich GmbH). 1 µg de peptídeos foi automaticamente carregados na coluna trap a uma taxa de fluxo de 3 µl / min em 98% de tampão A (0,1% de ácido fórmico em água) e 2% de tampão B (0,1% de ácido fórmico em acetonitrila) . Após 10 min, os peptídeos foram eluídos e separados a uma taxa de fluxo de 230 nl / min na coluna analítica por um gradiente de 155 min de 10 a 35% de tampão B, seguido de um gradiente de 35 a 90% de tampão B em 15 minutos, seguido por reequilíbrio da coluna por 19 min. A aquisição no espectrômetro de massas foi realizada no modo de aquisição dependente de dados (DDA). O ciclo DDA consistia em uma varredura completa no FTMS, compreendendo uma faixa de m/z 300-1650 sob a resolução de 120.000 largura total a metade do máximo em m/z 400. Os 15 íons mais abundantes com a intensidade de pelo menos 3000 contagens foram selecionados e fragmentado por dissociação induzida por colisão (CID). A fragmentação foi realizada com uma energia de colisão de 35%, controle automático de ganho (AGC) de 1×10^6 e adquirida no analisador de captura de íons com largura de isolamento de 2 m/z e AGC 1×10^4 . A exclusão dinâmica foi estabelecida em 90 s para favorecer a identificação de peptídeos em menor quantidade. Íons com estado de carga +1 ou indeterminado foram excluídos.

Quantificação sem marcação e identificação de proteínas

As análises proteômicas quantitativas sem marcação foram realizadas utilizando replicados biológicos dos grupos e dos controles. A quantificação foi realizada usando o Progenesis QI para software de proteômica (versão 1.0; Non-Linear Dynamics, Waters, Newcastle upon Tyne, Reino Unido). Os eventos MS1 foram alinhados e quantificados

com base na área de pico dos íons extraídos, depois normalizados e comparados entre as execuções e ventos apresentando uma diferença significativa (valor de p ANOVA <0,05) foram selecionados para identificação de peptídeos, os respectivos espectros de MS / MS foram exportados para o PEAKS Studio 7.0 (Bioinformatics Solutions Inc., Ontário, Canadá) para sequenciamento de novo e pesquisa em banco de dados usando o banco de dados de proteínas Uniprot. Os parâmetros utilizados foram tolerância de massa de peptídeo de 10 ppm, tolerância de massa de fragmento de 0,5 Da e duas clivagens perdidas permitidas. As oxidações de metionina e a acetilação dos terminais N da proteína foram especificadas como modificações variáveis, enquanto a carbamidometilação da cisteína foi especificada como uma modificação fixa. Para avaliar a taxa de identificação de falsos positivos, o banco de dados usado foi revertido durante a consulta e anexado ao banco de dados original. As proteínas identificadas com FDR <1% e pelo menos um peptídeo único foram reimportadas para o Progenesis QI, para quantificação de proteínas. As proteínas quantificadas foram avaliadas estatisticamente quanto à diferença entre as condições (ANOVA) e agrupadas por análise multivariada (PCA e agrupamento de acordo com perfis de abundância).

Considerando o grande número de proteínas quantificadas, os testes estatísticos foram corrigidos por FDR para repetição múltipla e submetidos a análises multivariadas post-hoc e posteriores usando a plataforma Metaboanalyst. Análise estatística

O GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software) foi utilizado para as análises estatísticas. Os testes utilizados foram *one-way* ou *two-way* ANOVA para comparação de médias, seguido do pós-teste de Turkey ou test t *de student* não pareado. A significância estatística foi assumida com valor de $p \leq 0,05$.

Resultados

Função diferencial do tecido adiposo branco e marrom na viabilidade e proliferação de células de câncer de mama.

Nós hipostenizamos que os tecidos adiposos brancos (WAT) e marrons (BAT) têm um papel diferencial nos parâmetros carcinogênicos do câncer de mama. Para responder esta questão, as células 4T1 foram estimuladas com produtos de secreção de WAT e BAT vindos de camundongos selvagens C56BL / 6. Em primeiro momento, analisamos a viabilidade e proliferação celular do câncer de mama 4T1. A viabilidade das células do câncer de mama 4T1 não foi modificada pelos produtos da secreção de WAT em comparação às células não estimuladas. Por outro lado, os produtos de secreção de BAT reduziram drasticamente a viabilidade das células 4T1 em comparação com as células estimuladas com os produtos de secreção de WAT e as células não estimuladas, sugerindo que o BAT, mas WAT pode ter um efeito antitumoral nas células do câncer de mama (Fig. 6A).

Continuando com as análises dos parâmetros carcinogênicos, investigamos a influência dos produtos de secreção de WAT e do BAT na proliferação celular 4T1. Além da enorme diminuição da viabilidade celular, a secreção de BAT reduziu a proliferação de células de câncer de mama em comparação com células não estimuladas e as células estimuladas com a secreção de WAT. Confirmando a função diferencial entre BAT e WAT, as células estimuladas com os produtos de secreção de WAT tiveram a taxa de proliferação aumentada quando comparadas as células não estimuladas (Fig. 6B).

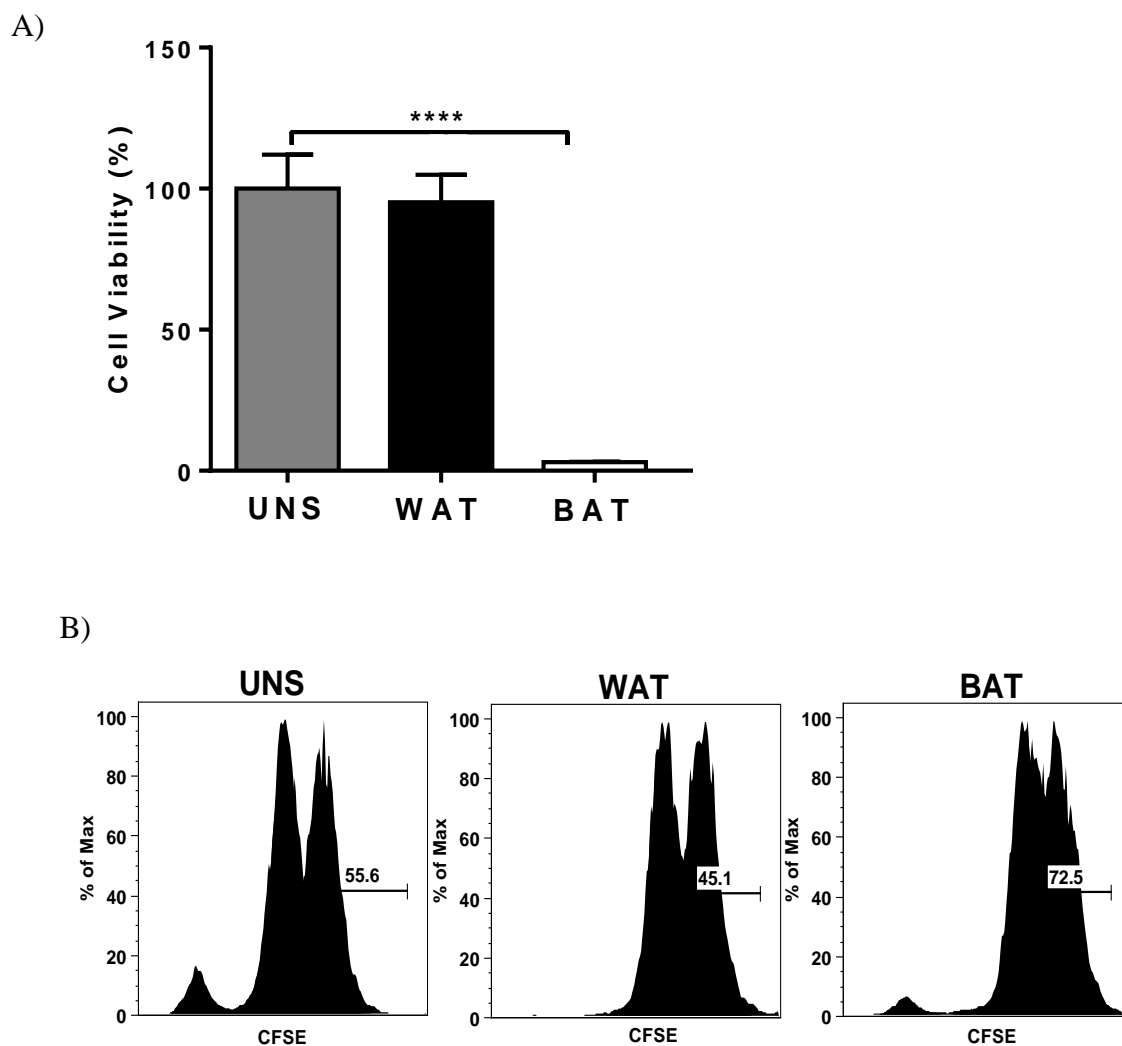


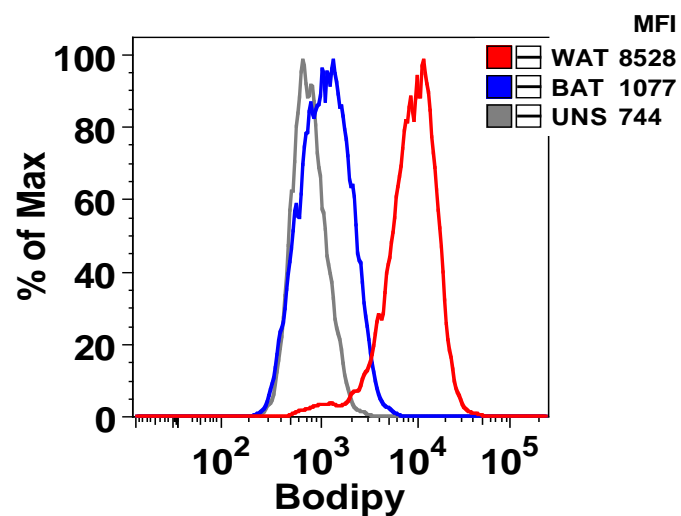
Figura 6. Modulação da viabilidade e proliferação celular de células tumorais 4T1. Células 4T1 foram plaqueadas e estimuladas com o produto de secreção de tecidos adiposos brancos e marrons por 24 horas (A)(B). Após os estímulos, as células foram analisadas no ensaio de MTT (A) e a citotoxicidade foi calculada a partir das médias dos percentuais de células vivas em relação às células não-estimuladas (UNS), a quais foram consideradas 100 % vivas. Cada barra representa a média do percentual \pm DP (n=3), o (DMSO) é o controle de morte celular e os asteriscos representam a diferença estatística significativa ($p < 0,0001$) em relação ao Não-estimulado (UNS) indicada por Teste T. Além da viabilidade celular, a proliferação celular também foi mensurada (B) utilizando o reagente CFSE, seguida da análise por citometria de fluxo (gráfico representativo de três experimentos). Deslocamento dos picos calculados com base na posição do pico do UNS.

O tecido adiposo branco induz uma maior ativação das células tumorais de mama

A presença de gotículas lipídicas (LD) nas células tumorais tem sido profundamente implicada em processos neoplásicos e inflamatórios, estando ligada a muitos aspectos da ativação celular (Bozza 2010). Com isso, analisamos a biogênese de LD em células de câncer de mama estimuladas com os produtos de secreção de WAT e BAT, a fim de verificar se, além dos tecidos adiposos atuarem de forma diferencial na viabilidade e proliferação das células 4T1, também influenciavam na agressividade tumoral.

Nossos dados mostraram que as células 4T1 estimuladas com o produto secretório da WAT aumentaram drasticamente a biogênese de LD no citoplasma de células 4T1 quando comparadas com as células estimuladas com produtos de secreção BAT e com as células não estimuladas (Fig.7A). Além disso, estes dados foram confirmados qualitativamente pela marcação das células 4T1 com Oil Red O e analisados por microscopia de luz (Fig. 7B). Assim, o tecido adiposo branco é capaz de tornar as células tumorais significativamente mais agressivas, mais proliferativas, não diminuindo a viabilidade celular das células do câncer de mama, indicando um papel pró-tumorigênico deste tecido.

A)



B)

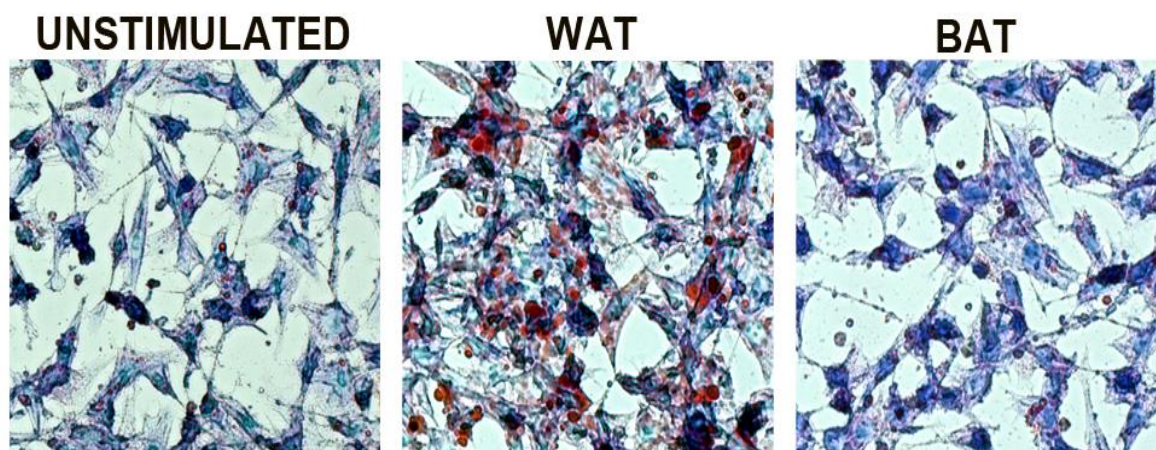


Figura 7. Tecido adiposo branco induz biogênese de corpúsculo lipídico em células tumorais de mama. 4T1 foram plaqueadas e estimuladas por 48 horas com produto de secreção de tecidos adiposos brancos e marrons. Células foram marcadas com a sonda lipofílica Bodipy (FL-1) e adquirida em citômetro de fluxo FACS Verse (A) (gráfico representativo de três experimentos). O pico vermelho é referente ao deslocamento das células tumorais estimuladas com o produto de secreção de tecido adiposo branco, enquanto o pico azul se refere ao deslocamento sofrido pelas células 4T1 estimuladas com o produto de secreção do tecido adiposo marrom, o terceiro pico cinza é referente as células não estimuladas. (UNS). Células foram marcadas com corante marcador de lipídeos neutros Oil Red O e o composto marcador de núcleo hematoxilina: (B).

O tecido adiposo marrom induz maior produção de espécies reativas (ER) em células tumorais de mama

Dando continuidade às análises de parâmetros capazes de modular o microambiente tumoral, avaliamos a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (NO). Levando em consideração o papel significativo das ROS na sinalização e na manutenção celular (Wang et al. 2017), medimos a produção dessas espécies reativas pelas células 4T1 sob influencia do produto de secreção de WAT e BAT. Os produtos da secreção de tecidos adiposos brancos e marrons induziram uma maior quantidade de geração de ER em comparação com células tumorais não estimuladas. No entanto, observamos uma taxa de produção elevada de ROS em 4T1 quando estimulada pela secreção de BAT (Fig. 8A). Este resultado mostrou que o tecido adiposo marrom pode ter atividade dual na progressão tumoral, uma vez que este tecido induz altos níveis de ER. Além disso, a secreção de BAT também induz níveis elevados de Nitrito, um indicador indireto da produção de óxido nítrico (Fig. 8B).

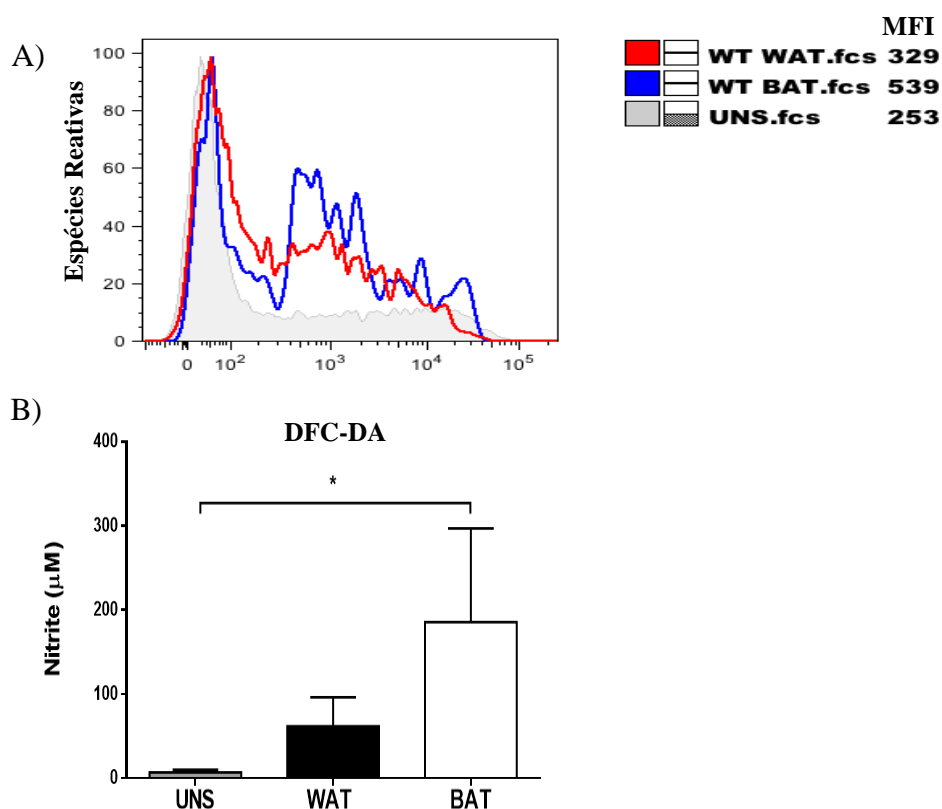


Figura 8. Tecido adiposo marrom induz maior produção de espécies reativas em 4T1. Células 4T1 foram estimuladas com os produtos de secreção de tecidos adiposos brancos e marrons por 6 horas. Após a estimulação as células foram marcadas com a sonda DFC-DA (A) e a geração de ERs nas células foi analisada por citometria de fluxo (Gráfico representativo de três experimentos). Como controle negativo foi usado células não estimuladas (UNS). A quantidade de Nitrito foi avaliada pela técnica de Griss (B). Cada barra representa a média do percentual \pm DP (n=3) e o asterisco (*) representa a diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao Não-estimulado (UNS) indicada ANOVA.

O Tecido adiposo marrom induz morte celular por apoptose em células de câncer de mama.

Para verificar se o tecido adiposo pode modular a necrose e apoptose das células 4T1, utilizamos citometria de fluxo e analisamos a população de células 4T1 necrótica e apoptótica após estímulo com produtos de secreção WAT e BAT. Os produtos da secreção de BAT selvagem induziram maior morte celular por apoptose em células 4T1 em comparação com células não estimuladas. A presença da proteína NLRP3 parece ser essencial para a indução de morte celular por apoptose em células de câncer de mama, uma vez que a falta de NLRP3 induz morte celular por apoptose de forma similar as células não estimuladas. A ausência de caspase 1/11 pode não influenciar a apoptose induzida por BAT, uma vez que não houve diferença entre BAT caspase 1/11 - / - e a BAT selvagem sobre a apoptose das células 4T1.

Os níveis de apoptose nas células tumorais estimuladas com WAT foram muito semelhantes às células não estimuladas e a ausência de caspase 1/11 e NLRP3 não modulou este efeito (Fig. 9). Este resultado mostra a diferença entre BAT e WAT no processo de morte celular de células tumorais.

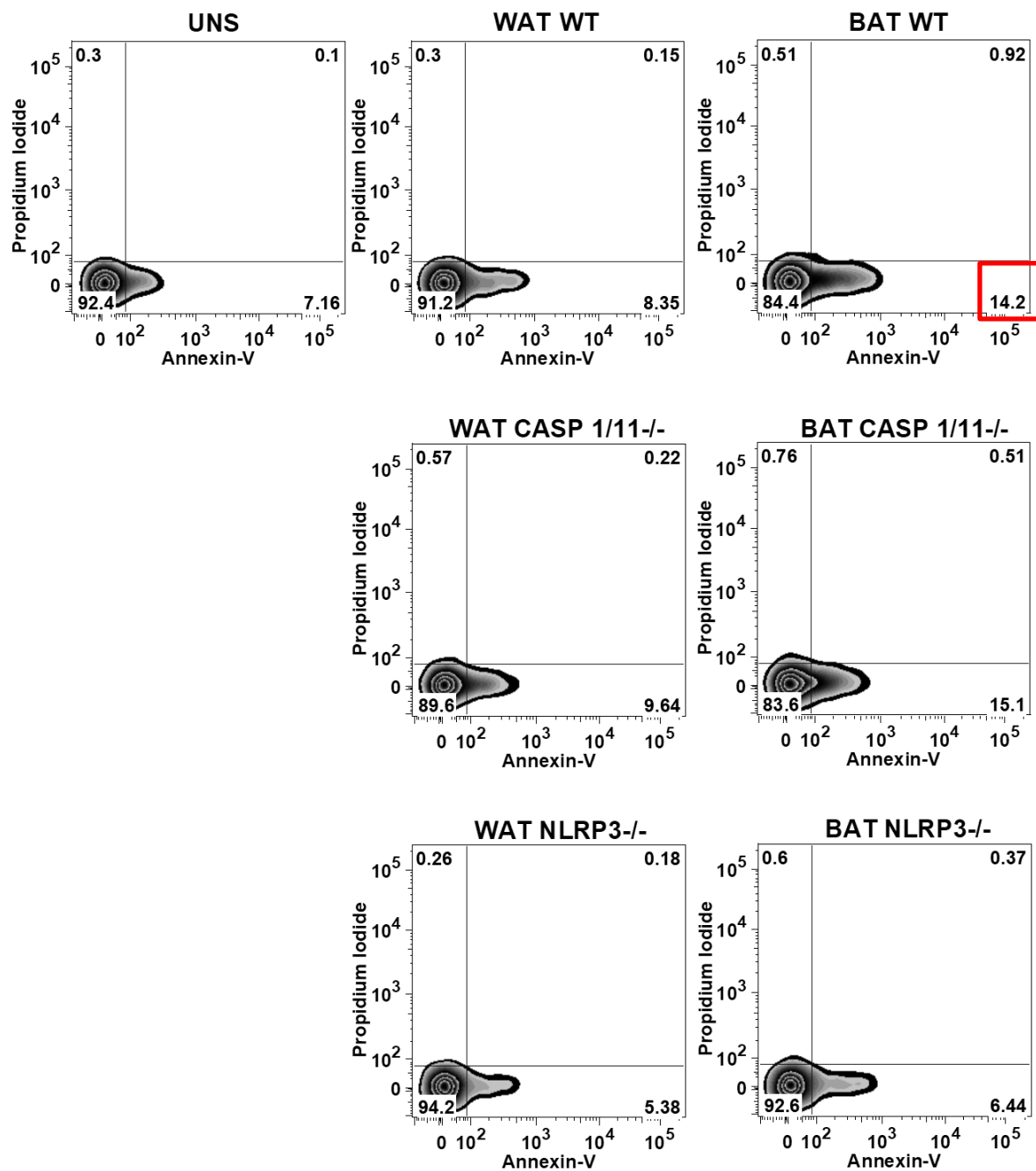


Figura 9. Indução de morte celular por apoptose e necrose em células tumorais de câncer de mama sobre influência de produtos de secreção de tecidos adiposos brancos e marrons. Células 4T1 foram estimuladas por 48 horas com o produto de secreção de tecidos adiposos brancos e marrons selvagens e deletados para as proteínas caspase 1/11 e NLRP3. Após estímulo, células foram marcadas com Anexina V e Iodeto de Propídeo. Após a citometria de fluxo, os dados foram analisados no software FlowJ. (Gráfico representativo de três experimentos).

O tecido adiposo marrom induz poros na membrana plasmática de células tumorais com o papel das Caspases 1/11.

Para avaliar se o produto de secreção de WAT e BAT poderiam causar a formação de poros na membrana, investigamos a formação de poros na membrana 4T1 usando o ensaio de captação de iodeto de propídio (PI). Os resultados mostraram uma maior formação de poros na membrana das células 4T1 estimuladas com a secreção de BAT em comparação com células estimuladas com secreção de WAT e não estimuladas (Fig. 10). Além disso, a formação de poros da membrana em células 4T1 induzida pelo tecido adiposo marrom foi intensamente aumentada com a ausência das proteínas caspase 1/11 nos tecidos adiposos marrons, mas a ausência da proteína NLRP3 não modulou a formação de poros nas células de câncer de mama. Embora a captação de PI também tenha ocorrido com a secreção de WAT em células 4T1, este evento foi significativamente mais visível com o estímulo de secreção de BAT.

Esses dados sugerem que BAT, com mais intensidade do que o estímulo vindo de WAT, tem a capacidade de desencadear a formação de poros em células de câncer de mama, e provavelmente induzir uma morte celular lítica, e a ausência de caspase 1/11 nesse tecido adiposo aumenta sua função antitumoral.

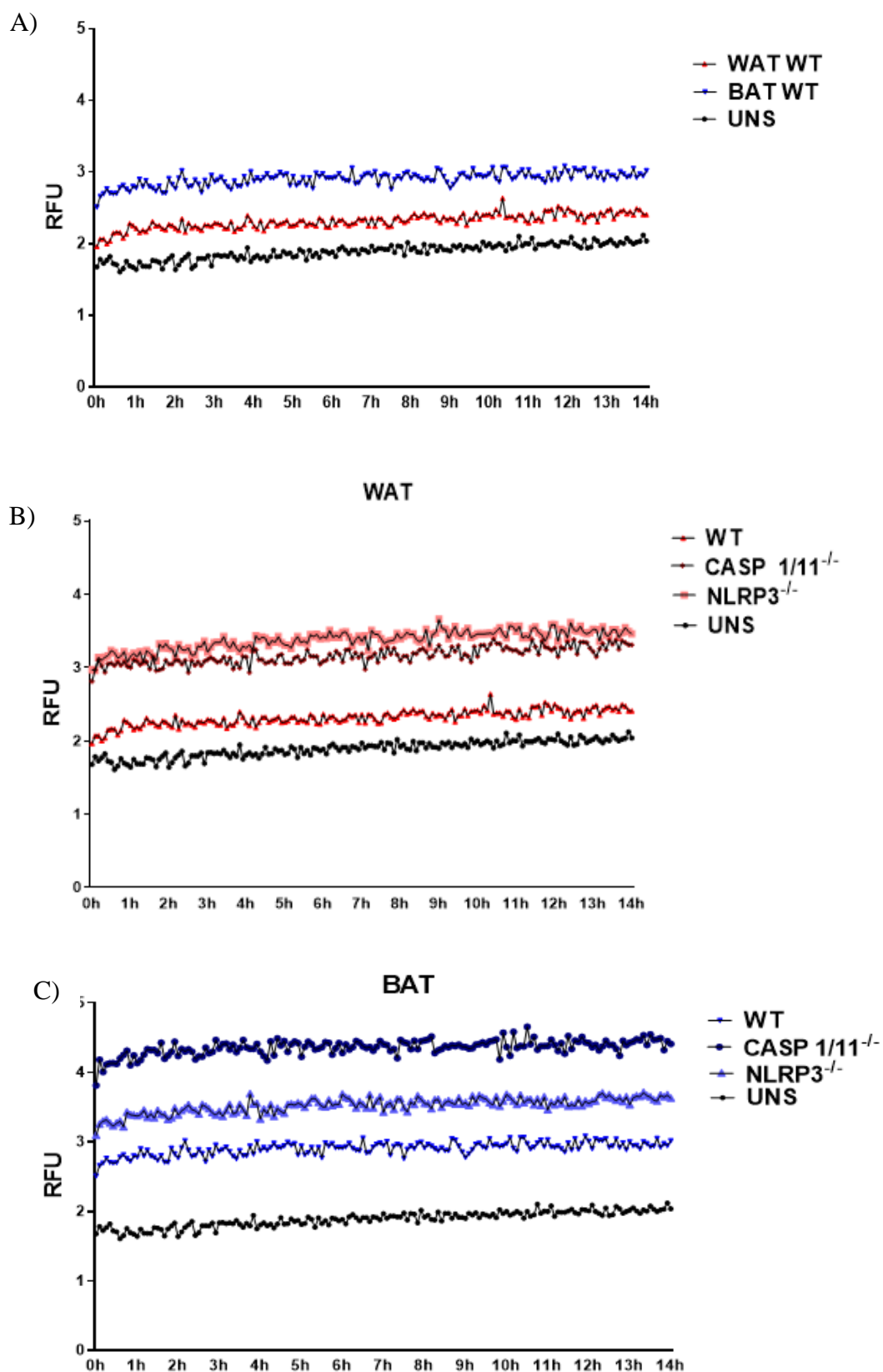


Figura 10. O tecido adiposo marrom induz poros na membrana de células tumorais com o papel das proteínas Caspase 1/11. Células 4T1 foram estimuladas com produto de secreção de tecidos adiposos durante 14 horas e a captação de PI foi detectado em espectrofotômetro. Células 4T1 foram estimuladas com WAT e BAT selvagens (A), com WAT deletado para as proteínas caspase 1/11 e NLRP3 (B) e por BAT deletado para as proteínas caspase 1/11 e NLRP3(C).

O tecido adiposo marrom modula o perfil inflamatório de células 4T1 com a participação do inflamassoma NLRP3

A capacidade de secretar mediadores inflamatórios do tecido adiposo branco já é conhecida, no entanto, nossos resultados mostraram que estas secreções podem influenciar a produção de citocinas em células tumorais de mama. Os dados de quantificação da secreção de citocinas obtidos pelo ensaio de ELISA demonstraram não haver secreção diferencial significativa da citocina anti-inflamatória do fator de crescimento Transformante ($TGF-\beta$) em células 4T1 estimuladas com secreção de WAT e BAT selvagens (Fig. 11A). No entanto, a ausência de caspase 1/11 em BAT é capaz de modular alguns parâmetros no tecido, que impactam na secreção desta citocina pelas células 4T1. O mesmo evento é observado em células 4T1 após estímulo por WAT NLRP3 - / -. Embora a citocina IL-33 tenha sido descrita como uma citocina anti-inflamatória, vários estudos já mostraram que esta citocina pode atuar na promoção da inflamação, estando ligada à maturação da IL-1 β .

Esta dupla função na modulação inflamatória da IL-33 levou-nos a investigar o papel do inflamassoma NLRP3 em WAT e em BAT e seus impactos na secreção de IL-33 por células 4T1 (Fig. 11B). Observamos que ambos WAT e BAT podem induzir a produção de IL-33 em células 4T1. Embora os valores da mensuração dada pela técnica de ELISA não tenham dado valores significativos entre a quantidade desta citocina produzida por células 4T1 na ausência de componentes do inflamassoma, pode-se notar uma tendência na diminuição da produção desta citocina quando 4T1 são estimuladas com BAT depletado para caspases 1/11, indicando um possível papel destas enzimas na modulação de BAT que talvez impacte no perfil inflamatório de células de câncer de mama.

Continuando a análise do papel de BAT e WAT na modulação da inflamação em linhagem de células de câncer de mama, focamos nossa análise na medição de citocinas pró-inflamatórias típicas, como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e IL -12. O TNF- α está intimamente ligado à modulação do microambiente tumoral através da mediação inflamatória induzindo a morte celular e aumentando a inflamação (Ham et al. 2016). Assim, analisamos a produção de TNF- α pela linhagem celular de câncer de mama 4T1 que foi estimulada com produtos de secreção de WAT e BAT de camundongos selvagens e deficientes para caspases 1/11 e NLRP3 (Fig. 11C).

Nosso resultado mostrou que o estímulo de BAT pode induzir uma produção elevada de TNF- α pelas células 4T1 em comparação com células não estimuladas. No entanto, a ausência de caspase 1/11 altera o tecido BAT levando à diminuição da quantidade desta citocina pró-inflamatória em células 4T1. A ausência da proteína NLRP3 não afetou o tecido adiposo em níveis suficientes para modular a produção de TNF- α em células 4T1. Também analisamos a produção de IL-12 por 4T1 sob estímulo de WAT e BAT (Fig. 11D). O resultado mostrou que a caspase 1/11 provavelmente tem um papel importante em WAT, uma vez que a ausência dessa proteína nesse tecido promove um enorme aumento na secreção de IL-12 por 4T1, quando a linhagem é estimulada por este tecido, promovendo a inflamação.

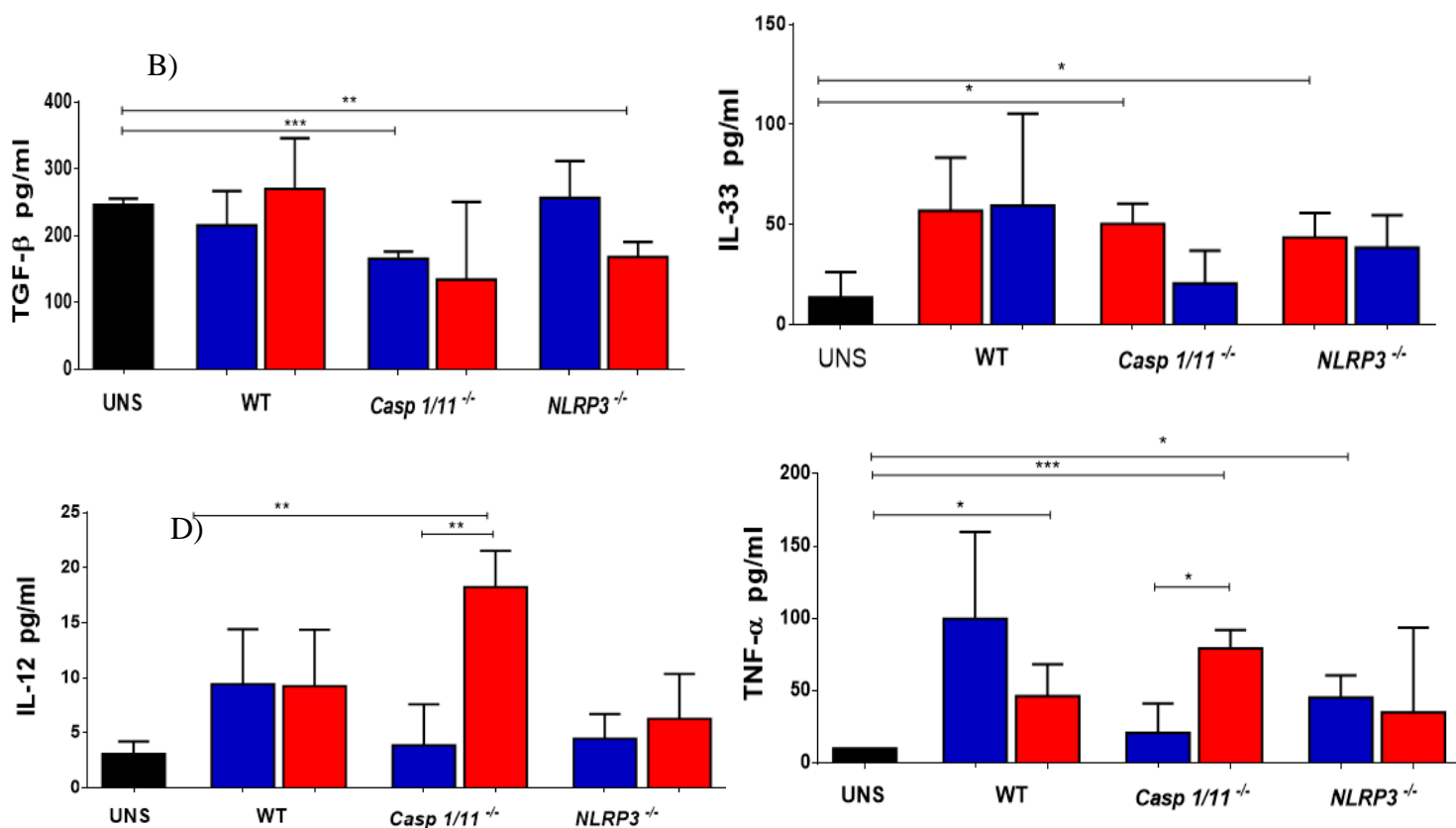


Figura 11. Modulação da secreção de citocinas anti e pro-inflamatória em células tumorais de mama estimuladas com tecidos adiposos brancos e marrons. 4T1 foram plaqueadas e estimuladas com o produto de secreção de BAT e WAT selvagens e deletados para proteínas do inflamassoma NLRP3 por 24 horas. Após os estímulos, os sobrenadantes de cultura foram coletados e a quantidade de TGF- β (A), IL-33 (B), TNF- α (C) e IL-12 (D) foram dosadas por ELISA. Barras azuis correspondem a células 4T1 estimuladas com produtos de secreção de tecidos adiposos marrons e as barras vermelhas correspondem a células 4T1 estimuladas com produtos de secreção de tecidos adiposos branco. Cada barra representa a média do percentual \pm DP (n=3), e um asterisco (*), dois asteriscos (**), e três asteriscos (***) representam uma diferença estatística significativa ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$, respectivamente) em relação ao Não-estimulado (UNS) indicada por ANOVA.

O produto de secreção do tecido adiposo branco e marrom modula o perfil proteico de 4T1 com a participação do inflamassoma NLRP3.

Os tecidos adiposos são capazes de modular a homeostase tecidual por via de secreção, tanto células adjacentes quanto células mais distantes. A modulação hormonal do tecido adiposo por via parácrina tem sido largamente caracterizada, mostrando um papel fundamental do tecido adiposo no desenvolvimento de tumores e outras doenças metabólicas (Aguilar-Salinas et al. 2008). Sendo assim, hipotetizamos que os tecidos adiposos branco e marrom são capazes de modular via secreção, proteínas nas células tumorais de câncer de mama.

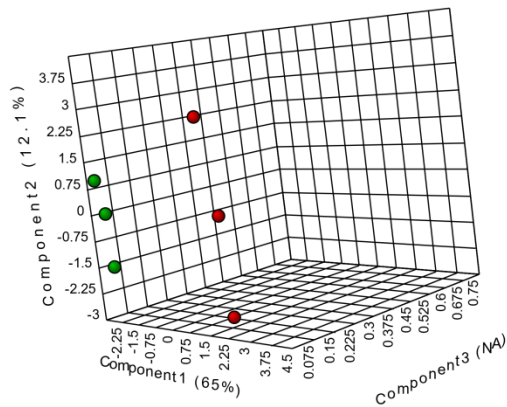
A fim de fazer uma análise geral das proteínas moduladas pelo produto de secreção do tecido adiposo branco e marrom, tanto dos tecidos selvagens quanto dos tecidos deletados para as proteínas Caspase 1/11 e NLRP3 foi analisado por LC-MS-MS o perfil proteico das células tumorais após 24 horas de estímulo. Após as análises dos dados, os gráficos indicam tanto o tecido adiposo marrom quanto o branco modulam de forma diferencial as proteínas intracelulares das células, como por ser visto pela separação dos grupos (Fig. 12A). O mesmo evento foi observado quando as células tumorais foram estimuladas com o produto de secreção do tecido adiposo branco e marrom deficientes para as proteínas Caspase 1/11 e NLRP3 (Fig. 12 A e B). É possível notar ainda, que a ausência dessas proteínas nos tecidos adiposos induziu um distanciamento maior entre os grupos comparados com os estímulos vindo dos tecidos selvagens, além de que os estímulos, de forma geral, modularam as de forma semelhante os componentes das triplicatas experimentais, como pode ser constatado pela proximidades de casa N nos gráficos. Estes dados indicam que o tecido adiposo modula de forma diferencial as proteínas intracelulares de células tumorais, com o inflamassoma NLRP3 fazendo parte deste processo. Analisando de forma mais específica, vemos a abundância relativa das principais proteínas que diferenciam quando comparada grupo a grupo.

Após a identificação das proteínas que mais varavam em relação a abundancia entre os tecidos utilizando o banco de dados UniProt, foi verificado que o estímulo proveniente do produto de secreção de WAT, quando comparado com o meio de secreção de BAT, induz na célula tumoral uma maior abundancia de proteína HMGB1, que tem como principal função a regulação genica, mas também atua ativamente em processos inflamatórios. Além da HMGB1, o estímulo com o produto de secreção de WAT também modulou positivamente a presença de Queratina, tipo II (Citoesqueleto), que tem uma grande influencia na síntese de DNA, impactando assim processos celulares como divisão celular (Fig. 13A e Tabela 1A). Com o intuito de analisar o papel do inflamassoma NLRP3 dos tecidos adiposos na influencia da modulação de proteínas em células tumorais, focamos também na análise das células tumorais quando estimulada com o tecido adiposo marrom selvagem com os tecidos deletados para as proteínas Caspase 1/11 e NLRP3.

Os Resultados mostraram que os estímulos dos tecidos deletados para a proteína NLRP3 de BAT, comparada com os outros estímulos induziu uma maior presença da proteína HMGB1, assim como as células 4T1 que foram estimuladas com esse produto de

secreção também apresentaram uma maior presença da proteína DNA helicase, tendo então, uma possível modulação no processo de divisão celular destas células (Fig. 13B e Tabela 1B). A mesma análise foi feita nas células 4T1 estimuladas com o produto de secreção de WAT selvagem e deletados para as proteínas Caspase 1/11 e NLRP3. As células 4T1 estimuladas com o produto de secreção de WAT deletados para a proteína NLRP3 tiveram a presença de proteínas que estão relacionadas com o processo de tradução proteína aumentada, comparada com os outros grupos de estímulo. Entretanto, foi notada também que o estímulo vindo de WAT deletado para Caspase 1/11 também interferiu na abundância da Isoforma 9 da proteína MTA1 associada à metástase (Fig. 13C e Tabela 1C).

De forma geral, o produto de secreção de ambos os tecidos adiposos, tanto selvagens como deletados para os componentes do inflamassoma, modularam o perfil global proteico das células tumorais de mama. As comparações entre os estímulos com o produto de secreção de WAT e BAT selvagens induzam uma grande clusterização do perfil global de proteínas em 4T1 (Fig. 14A), mostrando, como já havíamos hipotetizado, que estes tecidos adiposos exercem uma influência diferencial nas células tumorais, modulando os componentes proteicos destas células. O papel do inflamassoma NLRP3 dos tecidos adiposos nesta modulação das células tumorais também foi observado (Fig. 14B e C). Tanto os estímulos dos tecidos deletados para Caspase 1/11 e NLRP3 de BAT e WAT modularam as proteínas de forma geral nas células 4T1, de modo que foi observado uma clusterização dessas proteínas quando estimuladas com os tecidos adiposos.

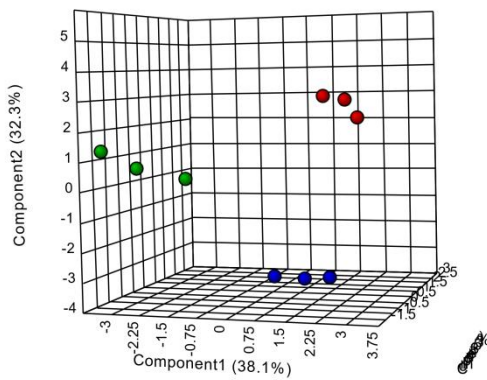
A) **BAT x WAT**

Grupo 0 (vermelho) = WAT WT

Grupo 1 (verde) = BAT WT

**BAT**

B)



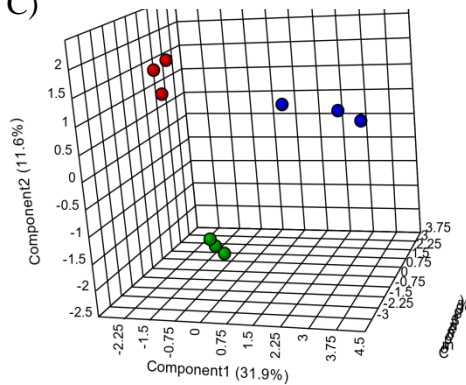
Grupo 0 (verde) = BAT WT

Grupo 1 (vermelho) = BAT CASPASE 1/11^{-/-}

Grupo 2 (azul) = BAT NLRP3^{-/-}

**WAT**

C)



Grupo 0 (vermelho) = WAT WT

Grupo 1 (verde) = WAT CASPASE 1/11^{-/-}

Grupo 2 (azul) = WAT NLRP3^{-/-}



Figura 12.. sPLS-DA 3D mostrando agrupamento de replicatas e diferenciação entre condições. Células 4T1 foram estimuladas com o produto de secreção dos tecidos adiposos selvagens e deletados para os componentes do inflamassoma NLRP3 por 24 horas. N experimental igual a 3. As proteínas quantificadas foram avaliadas estatisticamente

quanto à diferença entre as condições (ANOVA) e agrupadas por análise multivariada (PCA e agrupamento de acordo com perfis de abundância).

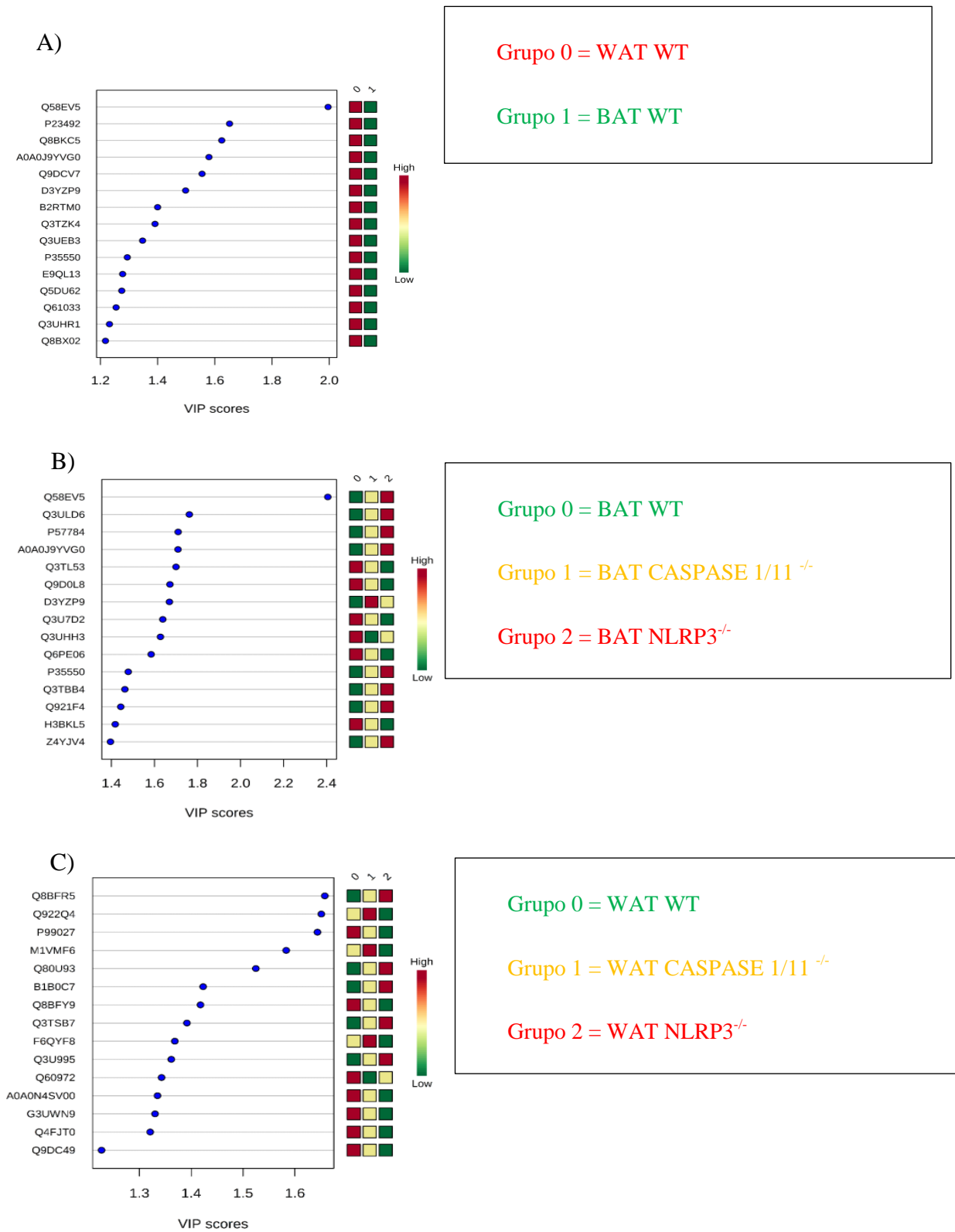


Figura 13 VIP scores das proteínas que melhor discriminam entre as condições. VIP do inglês Variable Importance in Projection.. Gráfico mostra a abundancia relativa das proteínas comparadas dentro dos grupos em questão. Análise realizada com o N experimental = 3. As proteínas quantificadas foram avaliadas estatisticamente quanto à diferença entre as condições (ANOVA) e agrupadas por análise multivariada (PCA e agrupamento de acordo com perfis de abundância)

Tabela 1. Identificação das proteínas referente aos gráficos de VIP score. Identificação das 5 proteínas com maior abundância relativa em cada grupo. WAT = do inglês White Adipose Tissue (Tecido adiposo Branco), BAT = do inglês Brown Adipose Tissue (Tecido adiposo marrom). O sinal “+” é referente à maior abundancia da proteína em questão em comparação aos outros componentes do grupo. O sinal “-” é referente à menor abundancia da proteína em questão em comparação aos outros componentes do grupo. O sinal “-/+” é referente à uma abundancia moderada da proteína em questão em comparação aos outros componentes do grupo

BAT vs WAT				
Identificação	Proteína	WAT	BAT	Função
Q58EV5	HMGB1	+	-	Regulador transcricional; também liberado por células imunes regulando a inflamação.
P23492	Purine nucleoside phosphorylase	+	-	Metabolismo de purinas que catalisam a fosforólise reversível de nucleosídeos
Q8BKC5	Importina-5	+	-	Responsável pelo tráfico de proteínas entre o núcleo e o citoplasma.
Q9DCV7	Queratina, tipo II (Citoesqueleto)	+	-	Bloqueia a interfase dependente de interferon e estimula a síntese de DNA nas células.
B2RTM0	Histona H4	+	-	Componente central do nucleossomo.

BAT: WT, Caspase 1/11 ^{-/-} , NLRP3 ^{-/-}					
Identificação	Proteína	WT	CASP	NLRP3	Função
Q58EV5	HMGB1	-	-/+	+	Regulador transcricional; também liberado por células imunes regulando a inflamação.
Q3ULD6	DNA Helicase	-	-/+	+	Promove a abertura da hélice de DNA, separando-o em duas fitas simples para que possa sofrer replicação.
P57784	U2 pequena ribonucleoproteína nuclear A'	-	-/+	+	Envolvido na junção pré-mRNA como componente do spliceossoma.
A0A0J9YVG0	Proteína Fosfatase 1G	-	-/+	+	Fosfatase é responsável pela desfosforilação dos fatores de união do pré-mRNA; Importante para a formação do spliceossoma funcional.
Q3TL53	40S proteína ribossomal	-	-/+	+	Estrutura constituinte de Ribossomos.

WAT: WT, Caspase 1/11 ^{-/-} , NLRP3 ^{-/-}					
Identificação	Proteína	WT	CASP	NLRP3	Função
Q8BFR5	Fator de alongamento Tu, mitocondrial	-	-/+	+	Promove a ligação dependente de GTP do aminoacil-tRNA ao local A dos ribossomos durante a biossíntese de proteínas

Q922Q4	Pirrolina-5-carboxilato redutase 2	-/+	+	-	Enzima que catalisa o último passo na biossíntese de prolina
P99027	60S acidic ribosomal protein P2	+	-/+	-	Desempenha um papel importante na etapa de alongamento da síntese de proteínas.
M1VMF6	Isoforma 9 da proteína MTA1 associada à metástase	-/+	+	-	Regula os processos de reparo de DNA dependentes e independentes de p53 após estresse.
Q80U93	Proteína do complexo de poros nucleares Nup214	-	-/+	+	Pode servir como um local de ancoragem na importação de substratos mediada por receptor através do complexo de poros nucleares

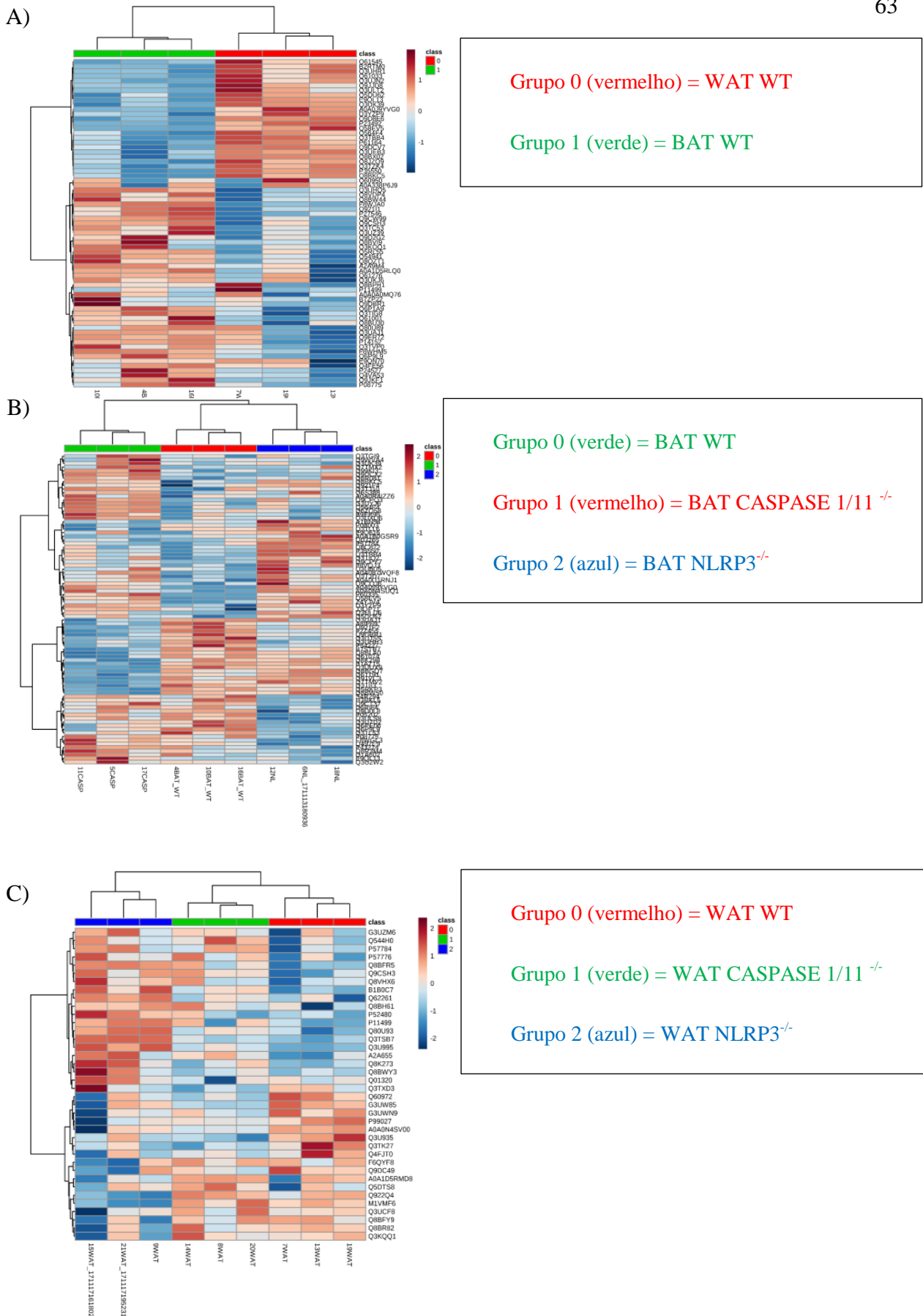


Figura 14 Mapa de correlações (heatmap) entre padrões de abundância normalizada e agrupamento de condições. Conjunto completo das 69 proteínas reguladas. As proteínas quantificadas foram avaliadas estatisticamente quanto à diferença entre as condições (ANOVA) e agrupadas por análise multivariada (PCA e agrupamento de acordo com perfis de abundância)

Modulação de esplenócitos pelo tecido adiposo marrom e branco

As células imunes presentes no microambiente tumoral exercem um papel chave no estabelecimento e progressão das células neoplásicas (Sica et al. 2008). Linfócitos T são atraídos para o microambiente tumoral e, dependendo do estágio da inflamação, os níveis de TCD8+ pode ser maior, agravando o estágio inflamatório por serem linfócitos com atividade pró-inflamatório e anti-tumoral, também chamados de linfócitos T citotóxicos. A presença de TCD4+ também pode ser observada, dependendo do estágio da inflamação no microambiente e, assim como os linfócitos, células NK também influenciam na tumorigênese, em que a elevada presença destas células, e como consequência, elevada produção de enzimas citotóxicas podem ajudar na eliminação de células mutadas (Gajewski, Schreiber, & Fu 2013).

Nos questionamos se os tecidos adiposos brancos e marrons são capazes de modular o perfil dessas populações de células imunológicas e, além disso, se o inflamassoma NLRP3 de tecidos adiposos teriam um papel neste processo. Primeiro analisamos se o produto de secreção de BAT e WAT, selvagens e deletados para proteínas caspase 1/11, seria capaz de modular a população de linfócitos CD8+ (Fig 15A). Os dados adquiridos por citometria de fluxo mostraram que linfócitos estimulados com os produtos de secreção de BAT induziram um aumento na população de células TCD8+ assim como um considerável aumento em granzima B intracelular, mostrando uma atividade anti-tumoral deste tecido, visto que ele induziu um aumento a ativação de células T citotóxicas. Em adição, os resultados também mostraram um aumento ainda maior destes parâmetros nestas células estimuladas com produtos de secreção de BAT depletados para caspases 1/11. Este resultado corrobora com os dados já mostrados, onde o tecido adiposo marrom apresenta um perfil anti-tumoral.

Em contrapartida, os estímulos com WAT não modularam esta população celular. Ainda a fim de verificar a capacidade de modular células imunes anti-tumorais, verificamos como as populações de NK se comportam sobre influencia dos tecidos adiposos (Fig. 15B). Assim como as células TCD8+, embora de forma mais branda, as células NK se tornam mais ativadas com o estímulo vindo de BAT, assim como a ausência de caspases 1/11 tornaram este fenômeno mais evidente. Células NKs sobre influencia de WAT não modulam significativamente seu perfil de ativação. Voltando agora para o perfil anti-inflamatório que tecidos adiposos podem induzir verificamos, também por citometria

de fluxo, a população positiva de CD4⁺ (Fig.16). De maneira surpreendente, produtos de secreção de BAT também induziram uma maior população positiva para CD4⁺ em linfócitos, assim como uma maior quantidade de IL-4 intracelular nestas células. Este evento se tornou ainda mais claro com a ausência de caspase1/11 nos tecidos adiposos marrons. Mais uma vez, produtos de secreção de WAT não influenciaram na modulação desta população.

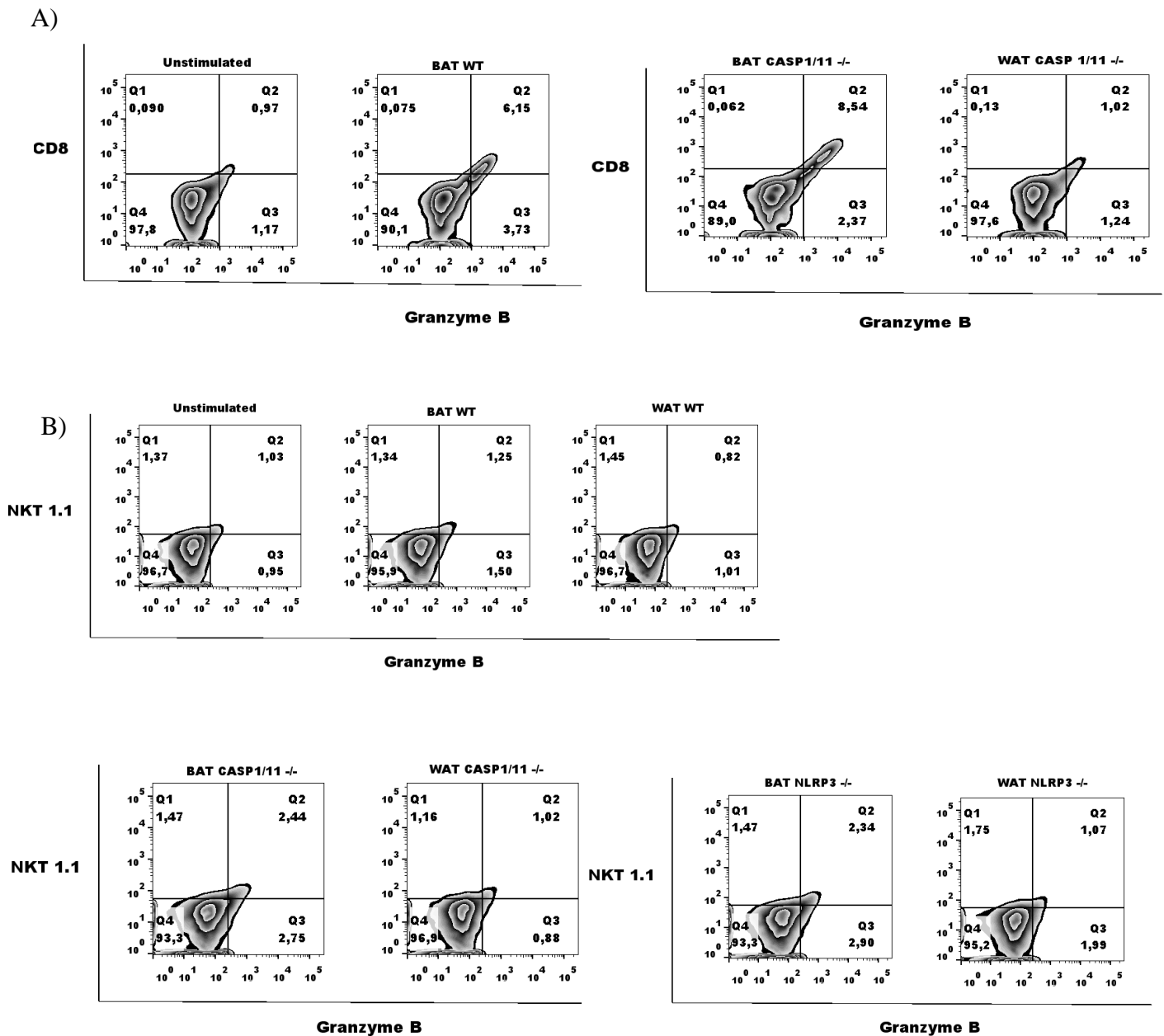


Figura 15. Tecido adiposo marrom modula TCD8+ e células NK. Linfócitos e células NK foram estimuladas por 24 horas com produtos de secreção de adipócitos brancos e marrons. Células foram marcadas na superfície e intracelular e as amostras foram adquiridas por citometria de fluxo FACS VERSE. População duplo-positiva (Q2) mostram linfócitos ativados (A) e NK ativadas (B). (Gráficos representativos de três experimentos)

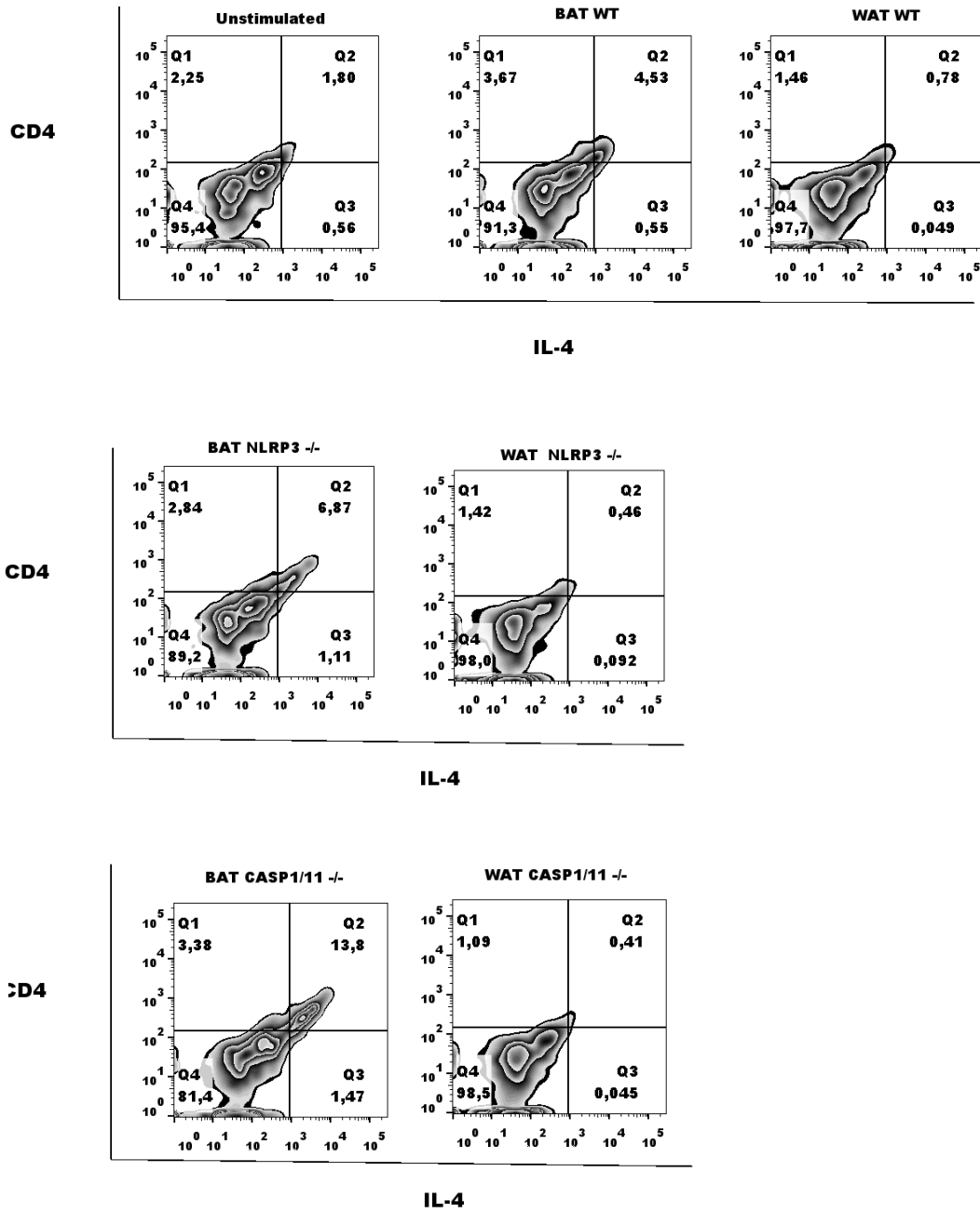


Figura 16. Tecido adiposo marrom modula a população TCD4+. Linfócitos foram estimuladas por 24 horas com produtos de secreção de adipócitos brancos e marrons. Células foram marcadas na superfície e intracelular e as amostras foram adquiridas por citometria de fluxo FACS VERSE. População duplo-positiva (Q2) mostram linfócitos positivos tanto para IL-4 quanto para a marcação de membrana com CD4. (Gráficos representativos de três experimentos)

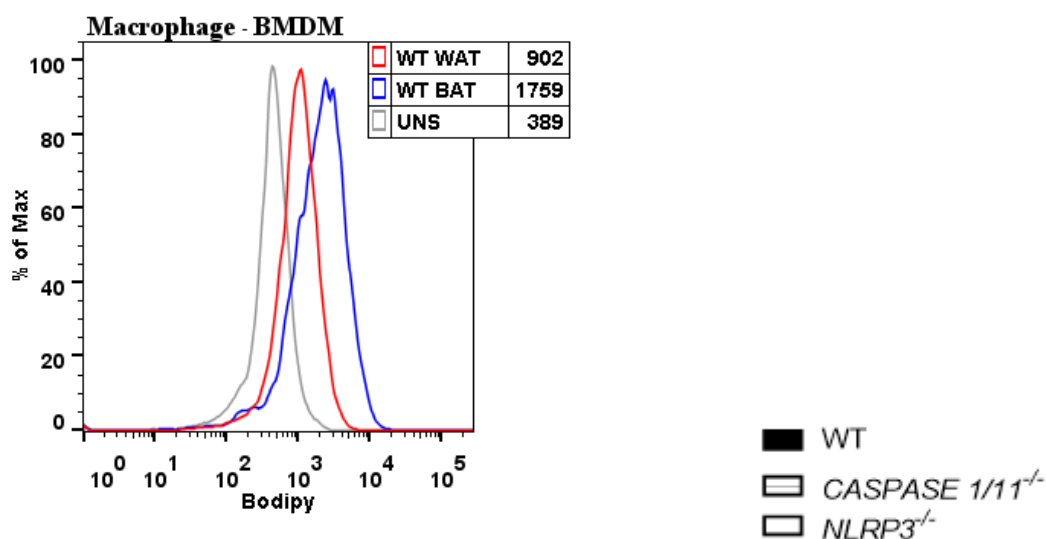
Tecido adiposo branco e marrom modula a polarização de macrófagos

Os macrófagos caracterizam-se pela sua plasticidade, flexibilidade e capacidade de integrar sinais distintos do microambiente, adquirindo fenótipos distintos (Corrêa et al. 2017). Neste contexto, os macrófagos podem ser divididos em dois subtipos: macrófagos M1, caracterizados por promover resposta pró-inflamatória e forte atividade microbicida e tumoricida; e macrófagos M2 que promovem resposta anti-inflamatória, remodelação tecidual, tolerância imunológica e progressão tumoral (Condeelis & Pollard 2006).

Considerando a importância de macrófagos na modulação do microambiente tumoral, analisamos a polarização destes macrófagos quando influenciados por tecido adiposo branco e marrom, assim como o papel dos componentes do inflamassoma neste processo. Em adição também verificamos o infiltrado de macrófagos nos tecidos adiposos brancos e marrons. Em primeiro momento verificamos se os tecidos adiposos são capazes de influenciar a biogênese de corpúsculos lipídicos (LD) em macrófagos. Os resultados obtidos por citometria de fluxo mostraram que o tecido adiposo marrom induz uma quantidade significativa de LD em macrófagos, quando comparados com os macrófagos estimulados com produto de secreção de WAT e células não estimuladas (Fig. 17A).

Em continuidade, através da técnica de RT-PCR foi feita a análise de marcadores de perfil M1 (TNF α , CD86 e iNOS) e M2 (IL-10 e Mrc1) (Fig. 17B). Foi observada uma diminuição na expressão gênica de CD86 quando estimulados com produtos de secreção dos tecidos adiposos, em que a diminuição da expressão foi ainda diferencial, quando comparado as células estimuladas com produtos de secreção de tecidos adiposos deletados para caspase 1/11 e os estímulos vindos de BAT selvagem. Em relação à expressão gênica de iNOS, os estímulos com produtos de secreção de WAT selvagens e BAT deletado para caspase 1/11 foram semelhantes, em que houve um aumento deste marcador, não houve modulação pelos outros estímulos de maneira significativa. A expressão gênica de TNF- α foi aumentada apenas com o estímulo vindo de produtos de secreção de WAT. Em relação aos marcadores de perfil M2, todos os estímulos diminuíram a expressão gênica de IL-10 pelos macrófagos, porém, ainda foi observada uma diminuição mais evidente com os produtos de secreção de WAT. Não houve modulação da expressão gênica de Mrc1. Foi observado um maior infiltrado de macrófagos em BAT.

A)



B)

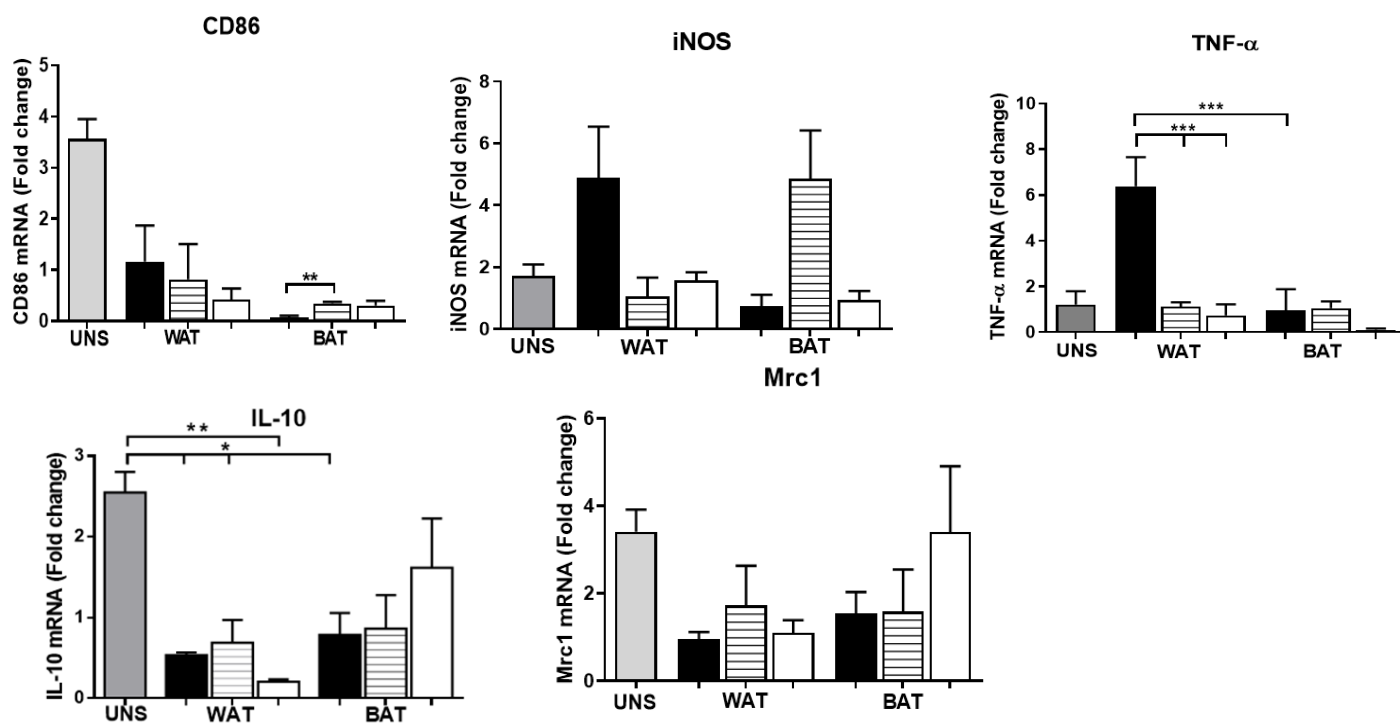


Figura 17. Modulação da polaridade de macrófagos pelo tecido adiposo branco e marrom, o papel do inflamassoma NLRP3 neste processo. Macrófagos derivados da medula de camundongos foram estimulados com o produto de secreção de tecido adiposo branco e marrom, selvagens e deletados para caspase 1/11 e a proteína NLRP3, e após 24 horas de estímulo a biogênese de CL foi analisada (A). As células foram marcadas com a sonda fluorescente Bodipy e o aumento da biogênese de CL nas células foi analisada por citometria de fluxo. Os histogramas são equivalentes à análise de células vivas. Os números são equivalentes à média de intensidade de fluorescência (MFI). A expressão de genes marcadores de polarização também foram analisados (B). mRNA de macrófagos estimulados e não-estimulados (UNS) foram extraídos e realizado RT-PCR após 24 horas de estímulo. Cada barra representa a média do percentual \pm DP (n=3), e um asterisco (*), dois asteriscos (**), e três asteriscos (***) representam a diferença estatística significativa ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$, respectivamente) em relação ao (UNS) indicada por ANOVA.

A ausência de Caspase 1/11 influencia na morfologia de adipócitos brancos e aumenta o número de macrófagos no tecido adiposo marrom

A fim de determinar se as proteínas do inflamassoma NLRP3 possuem algum papel na morfologia dos adipócitos assim como na presença de macrófagos nos tecidos, visto que os macrófagos residentes são de extrema importância na manutenção do tecido adiposo, assim como na regulação da inflamação, realizamos a análise por HE dos tecidos adiposos selvagens e deletados para as proteínas NLRP3 e Caspase 1/11 para verificar se a ausência destas proteínas pode influenciar na morfologia destes tecidos (Fig.18A).

Nossos dados mostraram que a ausência de Caspase 1/11 induz uma provável diminuição dos adipócitos brancos. A ausência da proteína NLRP3 não modulou os adipócitos do tecido adiposo branco. Também não houve modulação na morfologia do tecido adiposo marrom. Em continuação, realizamos a contagem de macrófagos nos diferentes tecidos adiposos. Os resultados mostraram que a ausência da proteína Caspase 1/11 influenciou na quantidade de macrófagos no tecido adiposo marrom, mas não no branco, mostrando que esta proteína provavelmente modula o perfil inflamatório do tecido adiposo marrom, visto que com a quantidade de macrófagos aumentando pode gerar impactos na produção de citocinas (Fig.18B).

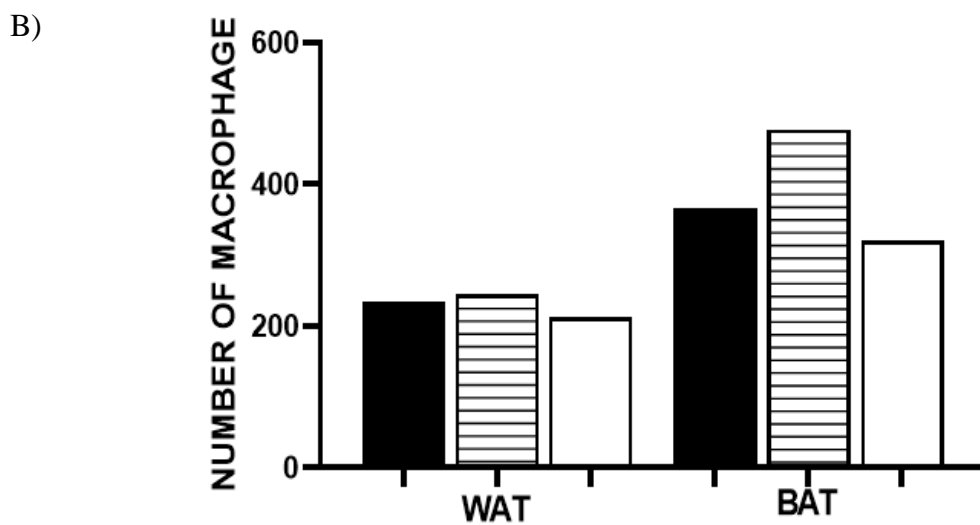
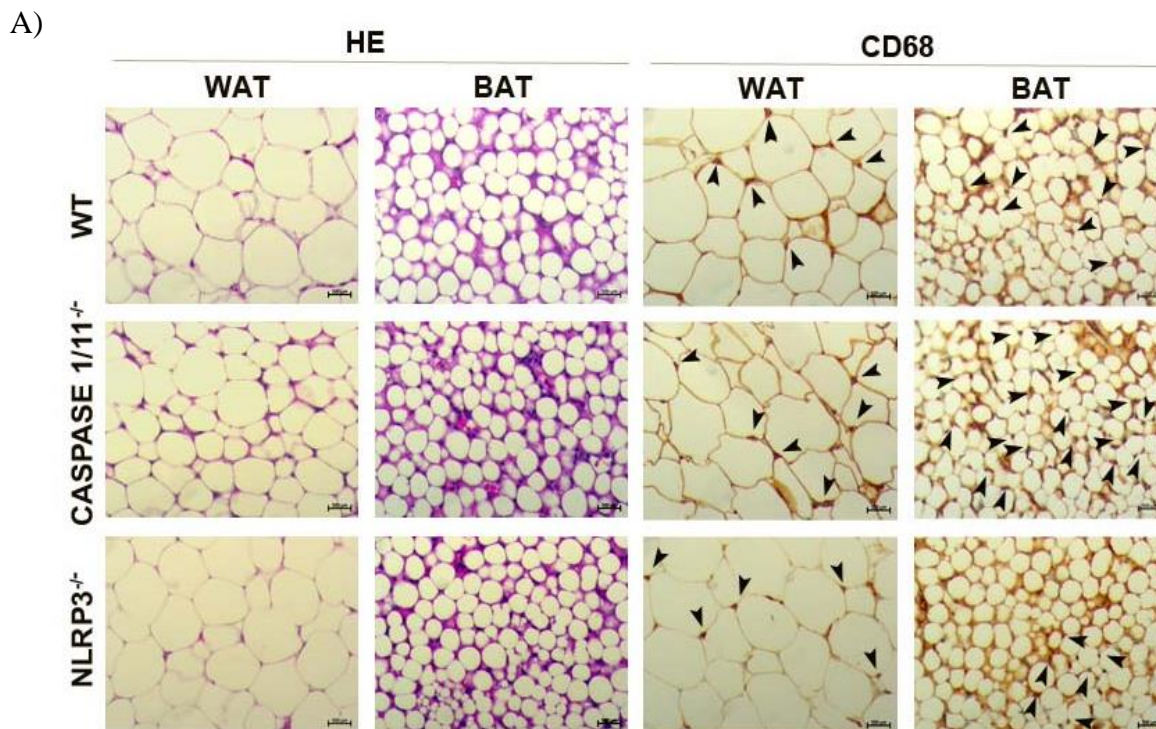


Figura 18. O tecido adiposo marrom apresenta maior infiltrado de macrófagos. Pela técnica de coloração com hematoxilina e eosina (HE), foi analisado o infiltrado de macrófagos no tecido adiposo branco e marrom, selvagens e deletados das proteínas caspase 1/11 e NLRP3. Foi analisado a morfologia dos diferentes tecidos utilizando HE, assim como a presença de macrófagos pela marcação de CD68 (A). a contagem diferencial de macrófagos foi realizada e demonstrada no gráfico feito com o software Prism (B).

A modulação da produção de citocinas nos tecidos adiposos brancos e marrons é dependente das Caspases 1/11 nestes tecidos

Tendo em vista a importância dos tecidos adiposos brancos e marrons na modulação da inflamação local e sistêmica, seguimos nossos experimentos a fim de mostrar a produção diferenciada de citocinas pelos tecidos adiposos brancos e marrons, e em adição, verificar se as enzimas caspases1/11 teriam papel neste processo. Através da extração de proteínas dos tecidos adiposos derivados de camundongos foi feita a dosagem de citocinas pela técnica de ELISA. Foi dosada a produção da quimiocina CCL2 e das citocinas IL-33, IL-1 β , TNF- α , GM-CSF e TGF- β .

Os resultados mostraram que, tanto o tecido adiposo branco, quanto marrom, produz consideráveis quantidades das citocinas e da quimiocina. Entretanto, caspase 1/11 se mostrou importante no processo de produção destas citocinas e da quimiocina, onde a ausência destas enzimas influenciou na produção. Tanto no tecido adiposo branco quanto no marrom, a ausência das caspases1/11 diminuíram a produção destas citocinas, mostrando que as caspases1/11 podem interferir na produção de outros mediadores inflamatórios (Fig. 19).

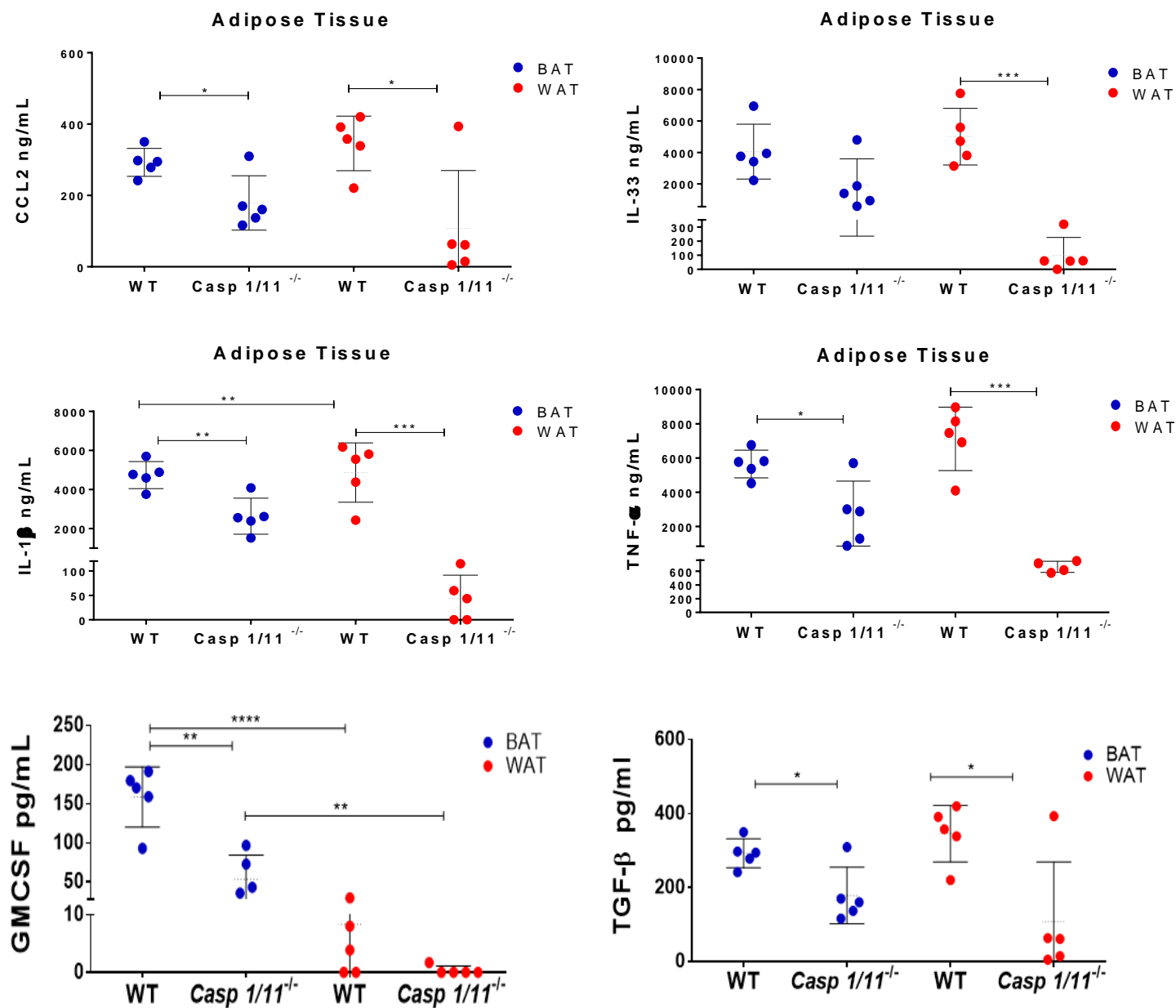


Figura 19. Caspase 1/11 participa da produção de mediadores inflamatórios em tecido adiposo branco e marrom. Tecidos adiposos foram coletados e feito a extração de proteínas. Após a quantificação das amostras, foram detectado os níveis de citocinas e da quimiocina CCL2 pela técnica de ELISA. Cada barra representa a média do percentual \pm DP (n=3), e um asterisco (*), dois asteriscos (**) e três asteriscos representam a diferença estatística significativa ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$, respectivamente) em relação ao Não-estimulado (UNS) indicada por ANOVA.

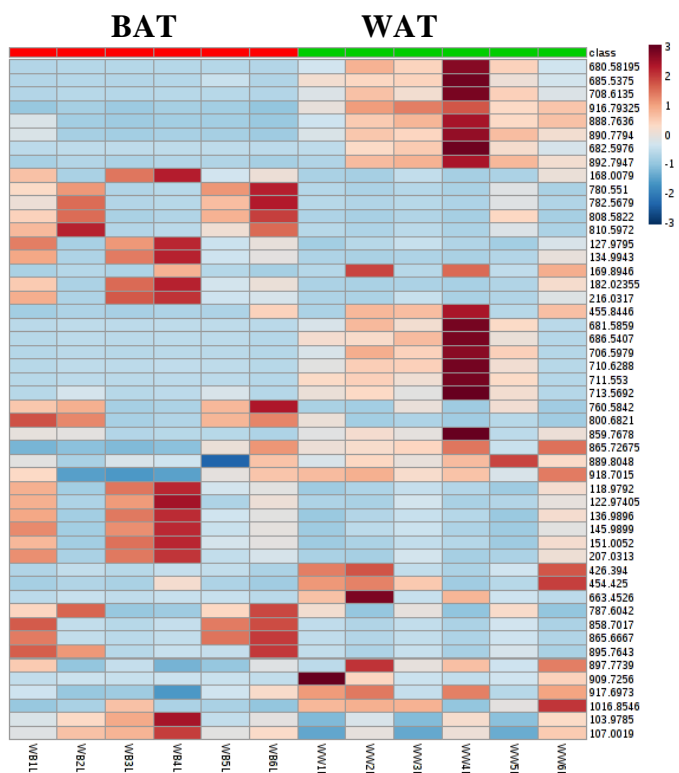
A ausência de caspase 1/11 altera o perfil global lipídico do tecido adiposo branco e marrom.

Com a considerável modulação que a ausência das proteínas caspase1/11 causam no perfil inflamatório dos tecidos adiposos, gerando impacto na carcinogênese do câncer de mama, nos questionamos se estas proteínas participariam de outros processos inflamatórios nos tecidos adiposos, modulando o metabolismo lipídico e, conseqüentemente, influenciar no produto de secreção destes tecidos.

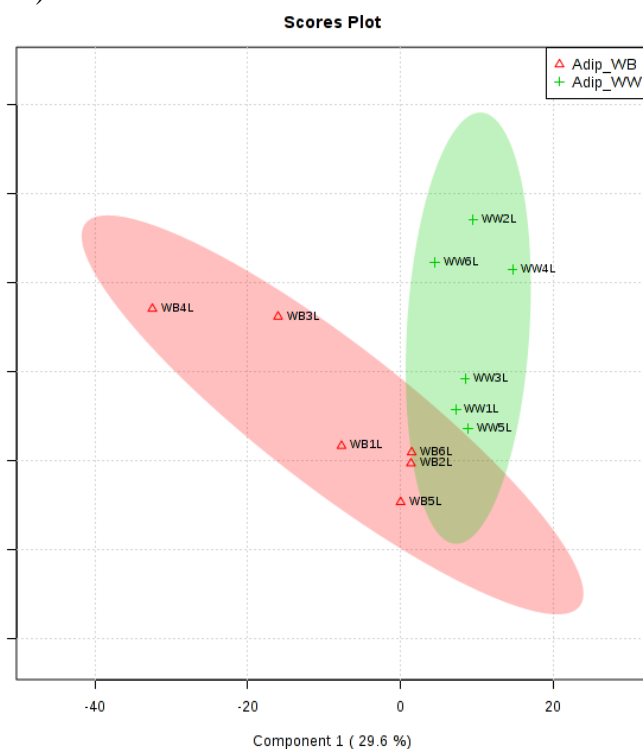
Para responder esta questão, realizamos a lipidômica dos tecidos adiposos brancos e marrons, tanto nos selvagens quanto nos deletados para as proteínas do inflamassoma NLRP3, as caspases 1/11 e a proteína NLRP3, pela técnica de espectrometria de massa, *MALDI-MS*. Após a análise do conteúdo dos tecidos (Fig. 20), a diferença no perfil lipídico do tecido adiposo branco e marrom é substancialmente diferente. Em adição, correlacionando com os resultados anteriores, a ausência das caspases1/11 gera um grande impacto no conteúdo lipídico dos tecidos adiposos comparado com os tecidos selvagens e deletado da proteína NLRP3 (Fig. 21).

Este resultado é mais evidente no tecido adiposo marrom se comparado com o tecido adiposo branco, mostrando que caspase1/11 atua de forma mais ativa em BAT comparado ao WAT.

A)



B)



C)

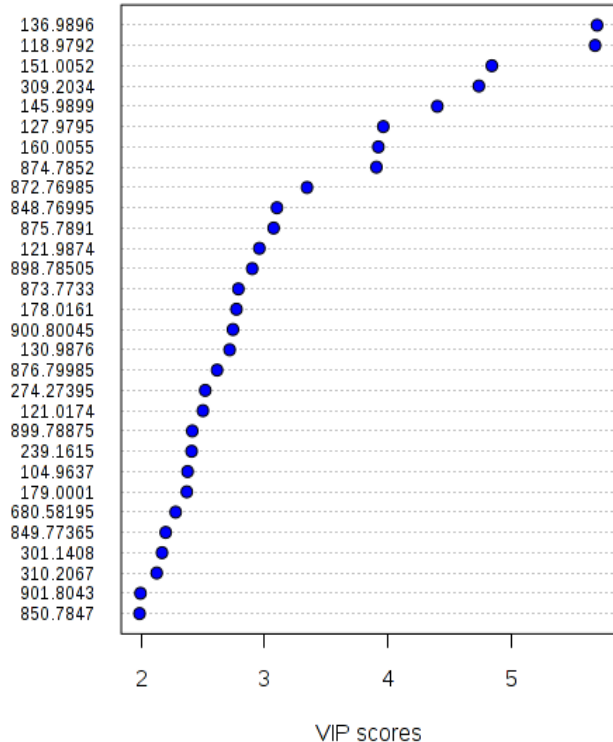


Figura 20. Análise do tecido adiposo branco e marrom por Espectrometria de massa. *Heatmap* do tecidos adiposo branco e marrom selvagem (A). Gráfico de PCA dos dois tecidos adiposos, branco e marrom. Sinal “+” corresponde ao tecido adiposo branco e o triângulo vermelho ao tecido adiposo marrom (B). Escala de VIP scores dos tecidos adiposos. A letra “B” corresponde ao secretado do tecido marrom e a letra “W” do branco (C). N experimental = 5.

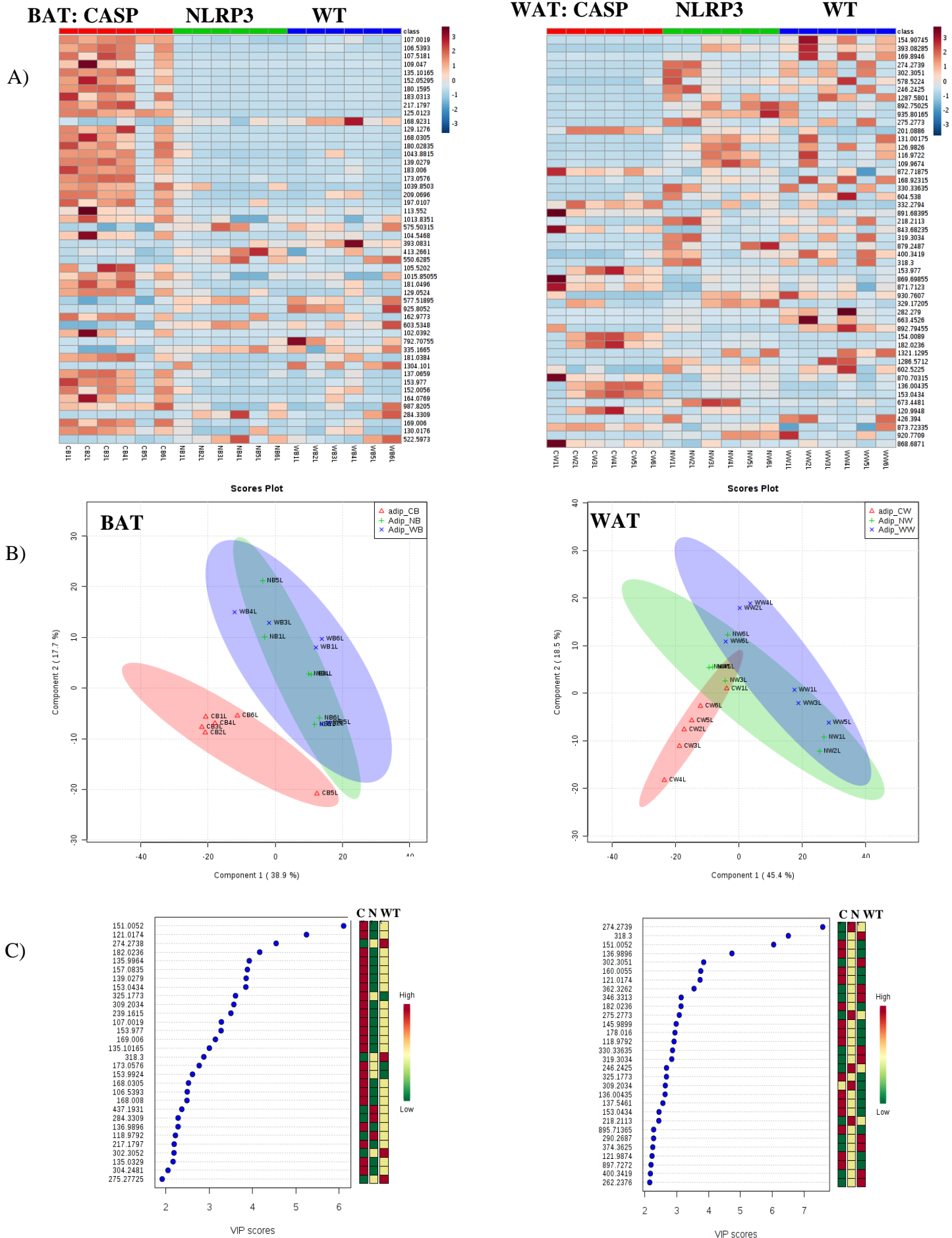


Figura 21. Análise do tecido adiposo marrom e branco, selvagens e deletado para proteínas do inflamassoma NLRP3. *Heatmap* dos tecidos adiposos branco e marrom selvagens e deletados para caspase1/11 e NLRP3 (A). Gráfico de PCA dos tecidos adiposos branco e marrom, selvagens e deletados da proteínas caspase1/11 e NLRP3(B). Escala de VIP scores dos tecidos adiposos. A letra “N” corresponde ao secretado do tecido deletado da proteína NLRP3, a letra “C” do tecido deletado para caspase1/11 e WT ao tecido selvagem (C). N experimental = 5.

Discussão

O presente trabalho visou caracterizar o papel diferencial dos tecidos adiposos marrons e brancos na modulação de células tumorais de mama, assim como a função das caspases 1/11 e da proteína NLRP3 destes tecidos adiposos como agentes importantes nesta modulação. Descrevemos pela primeira vez o importante papel das caspases 1/11 no tecido adiposo marrom, assim como a mesma é fundamental para a composição metabólica deste tecido. Descrevemos também, uma importante e diferencial modulação dos dois tecidos de gordura sobre células tumorais de mama e como o produto de secreção destes tecidos pode agir na progressão tumoral através, principalmente, da inflamação.

A princípio fomos investigar a possível influencia que os tecidos adiposos poderiam causar na sobrevivência e proliferação de células tumorais. Nosso primeiro questionamento foi a respeito desta modulação e como as células tumorais se comportariam sobre estímulos vindos de tecido adiposo marrom, visto que o branco já é bastante caracterizado. Estudos recentes têm demonstrado a importante função do tecido adiposo brancos modulando o microambiente tumoral (Deng et al. 2016). O microambiente do tumor é essencial para o estabelecimento e progressão de células neoplásicas. Células tumorais modulam a inflamação a seu favor, recrutando e polarizando para o perfil anti-inflamatório e pró-tumoral, células imunes como macrófagos e linfócitos (Williams, Yeh, & Soloff 2016). Células tumorais também utilizam as células de gordura como uma grande fonte energética, dando suporte necessário para o desenvolvimento do tumor (Santander et al. 2015).

O tecido adiposo, como um órgão endócrino, é capaz de modular o microambiente com a produção de hormônios que podem facilitar a tumorigênese. Com isso, uma disfunção dos tecidos adiposos brancos facilita o crescimento tumoral, pelo recrutamento de macrófagos, que serão polarizados para o perfil M2 pelo tumor, em conjunto, o tecido adiposo branco é descrito como a principal fonte de leptina no organismo (Corrêa et al. 2017). Entre outras funções este hormônio tem sido descrito como um facilitador da metástase atuando na produção de fatores de crescimento celular epitelial como VEGF (Santander et al. 2015). Adipócitos necróticos também modulam a inflamação pela liberação de DNA, que por sua vez recruta macrófagos e induz morte celular, gerando uma cascata inflamatória (Nishimoto 2016a). O papel do tecido adiposo branco influenciando o desenvolvimento tumoral é descrito em diversos cânceres, como câncer de ovário (T

2016), hepático (Cheung & Cheng 2016), próstata (Su et al. 2018) e mama (Williams et al. 2016). A grande produção de IL-6, TGF- β e IL-10 promove a proliferação celular, inibe a resposta imune anti-tumoral e induz a criação de novos vasos (Park et al. 2014). Entretanto, a caracterização do tecido adiposo marrom ainda é pouco descrita para câncer de mama. No presente trabalho, mostramos que o produto de secreção do tecido adiposo marrom reduz substancialmente a viabilidade de células de câncer de mama *in vitro* além de reduzir as taxas de proliferação destas células. Demostramos que tecido adiposo branco e marrom possuem papel oposto na viabilidade e proliferação do câncer de mama, onde o tecido adiposo branco não modula os níveis de proliferação e viabilidade comparada com as células não estimuladas.

A redução da viabilidade e proliferação das células tumorais quando estimuladas com BAT é possivelmente em função da grande atividade mitocondrial deste tecido, assim como a produção de citocinas por adipócitos marrons e células imunes residentes no tecido. Estudos têm mostrado a influencia deste tecido na indução de morte celular pela grande produção de TNF α no tecido, podendo implicar na proliferação de células tumorais (Villarroya et al. 2018). Outro fator que pode ser atribuído a este resultado é a grande produção de GM-CSF no tecido adiposo marrom, que também foi mostrado no presente trabalho. GM-CSF vem sendo caracterizado como um adjuvante no tratamento de câncer pelo recrutamento e ativação de linfócitos T citotóxicos e diferenciação de células dendríticas (Wan-Lun Yan, Kuan-Yin Shen, Chun-Yuan Tien 2017). Em adição, BAT pode ser capaz de reduzir a viabilidade de células tumorais pela elevada produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em função da grande quantidade de mitocôndrias presente neste tecido (Vyas, Zaganjor, & Haigis 2016). Nossos resultados mostraram que células tumorais estimuladas com BAT também apresentaram elevada produção de espécies reativas, podendo impactar na diminuição da viabilidade destas células.

Dando continuidade às análises do papel diferencial dos dois tecidos de gordura em células tumorais, agora já sabendo da influencia de BAT na proliferação e viabilidade das células de câncer de mama, analisamos a agressividade das células tumorais de câncer de mama quando estimuladas com BAT e WAT. A grande quantidade de corpúsculos lipídicos (LD) em células de câncer de mama tem sido associada a um pior prognóstico (Toni Petan, Eva Jarc 2018), em que os LD são usados pelas células tumorais como uma fonte de energia em situações de privação de nutrientes, em casos de hipóxia, e também

servir de fonte energética para a proliferação celular. Com isso, LD tornou-se um marcador para a agressividade tumoral de células de câncer de mama. Nossos dados mostraram que células 4T1 estimuladas com produto de secreção de WAT induziram de forma significativa à quantidade de LD nas células, mostrando que este tecido tem potencial de tornar estas células mais agressivas. O mesmo evento não ocorreu com o estímulo vindo de BAT, mostrando mais uma vez o distinto papel destes tecidos nas células tumorais. WAT além de não reduzir a viabilidade e proliferação, torna as células mais agressivas, mostrando o papel pró-tumoral deste tecido.

Este resultado corrobora com dados da literatura aonde este tecido já vem sendo caracterizado como um facilitador do processo inflamatório (Nieman et al. 2013) (Esser et al. 2014). A grande disponibilidade de lipídeos no meio condicionado pelo tecido adiposo branco, que é conhecido pelo enorme armazenamento energético na forma de ácido graxo, pode ser o responsável pela considerável ativação das células tumorais. Em adição, WAT é capaz de secretar citocinas inflamatórias que podem influenciar no processo de biogêneses de LD nas células tumorais (Bozza 2010).

Com esses dados iniciais, temos que o tecido adiposo marrom apresenta características anti-tumorais, reduzindo a viabilidade das células tumorais, assim como a proliferação. Em contrapartida, corroborando com o grupo de pesquisa da Sonja C. Stadler, o tecido adiposo branco apresenta um perfil pro-inflamatório e pro-tumorigênico (Nickel et al. 2018). Tendo como base a inflamação e seu grande potencial em promover o desenvolvimento tumoral (Deng et al. 2016), conduzimos nossos experimentos focando no papel do inflamassoma NLRP3 no tecido adiposo branco e marrom e a importância deste complexo no desenvolvimento tumoral.

Para melhor entender o papel dos tecidos adiposos sobre células de câncer de mama, verificando também a função das proteínas caspase1/11 e NLRP3 dos tecidos adiposos nesse processo, analisamos a morte celular por apoptose e necrose. Corroborando com nossos dados iniciais de viabilidade celular, o produto de secreção de BAT selvagem induziu uma maior população de células apoptóticas e o produto de secreção de WAT não modulou a morte nas células tumorais. Em adição, quando analisado as células tumorais estimuladas com o produto de secreção de BAT deletado para as enzimas caspase1/11, foi visto um pequeno aumento na porcentagem de células mortas por apoptose, o que não foi observado nas células estimuladas com o produto de secreção de WAT. A ausência da

proteína NLRP3 no tecido adiposo marrom também interferiu na indução de morte por apoptose nas células 4T1. Embora o nosso resultado de formação de poro na membrana celular tenha mostrado que o produto de secreção de BAT tenha induzido uma maior formação de poro nas células tumorais, estando então relacionado com um processo de morte lítica, atribuímos esta diferença do processo de morte entre apoptose e morte lítica ao tempo de estímulo que as células ficaram incubadas, sendo o ensaio de poro um tempo mais prologado.

O inflamassoma NLRP3 nos tecidos adiposos, assim como nos demais tecidos, é responsável pela maturação de IL-1 β e IL-18 (Karen V. Swanson 2019), que quando ativadas promovem inflamação. A ausência dos componentes deste inflamassoma no tecido adiposo marrom, possivelmente modulou parâmetros inflamatórios neste tecido, como polarização de macrófagos (Dagenais & Saleh 2016), gerando impactos na indução de morte nas células tumorais. Além de modular a inflamação tecidual pela maturação de citocinas pró-inflamatória, o inflamassoma NLRP3 está ligado diretamente com a morte celular lítica pela ativação de caspase-1 bem como formação de poros na membrana plasmática e clivagem de Gasdermin-D (Liu et al. 2016).

Verificamos se os tecidos adiposos seriam capazes de induzir formação de poros na membrana celular das células 4T1, a fim de correlacionar os poros com morte lítica por rompimento de membrana. Nossos resultados mostraram que o produto de secreção de BAT deletado para caspase 1/11 induziu uma maior quantidade de poros nas células 4T1. Uma vez que o inflamassoma NLRP3 nos tecidos adiposos é essencial para a maturação de IL-1 β , e tal citocina está relacionada com a diferenciação de adipócitos, resistência à insulina e modulação da inflamação (Gagnon et al. 2013), a ausência de componentes deste inflamassoma estão modulando a inflamação local nestes tecidos, gerando impactos na indução de morte em células tumorais de mama. O papel das enzimas caspase1/11 que, estão associados a primeiro momento com a indução de morte lítica e a maturação de citocinas pró-inflamatórias nas células, tem se mostrado como um importante modulador do metabolismo do tecido adiposo marrom, onde a ausência destas proteínas então influenciando diversos parâmetros carcinogênicos ainda não descritos.

A hipótese no presente trabalho, é que as caspases1/11 então, de algum modo, modulam o perfil lipídico e metabólico do tecido adiposo marrom, modulam consequentemente a inflamação, aumentam o perfil anti-tumoral do tecido adiposo

marrom, como foi mostrado pelo aumento na porcentagem de células apoptóticas assim como induzem uma maior formação de poros nestas células.

Verificamos também que o tecido adiposo é capaz de modular a secreção de citocinas pelas células tumorais, assim como, mais uma vez, os componentes do inflamassoma NLRP3 possivelmente influenciam no metabolismo dos tecidos adiposos, participando deste processo. As citocinas produzidas pelas células tumorais são essenciais para o estabelecimento e progressão do tumor, uma vez que células neoplásicas secretam quimocinas e citocinas que vão recrutar e polarizar células que darão suporte para o tumor (Balkwill 2004).

Surpreendentemente, o produto de secreção de WAT e BAT selvagens não modularam a produção de TGF- β , citocina relacionada com a sobrevivência celular e proliferação. Entretanto, a ausência da proteína NLRP3 neste tecido, diminui a resposta anti-inflamatória pelas células tumorais, mostrando que esta proteína pode estar envolvida na modulação da produção de citocinas por 4T1. De acordo com Mary Poupot (Fournié & Poupot 2018), outra citocina extremamente importante para a manutenção do tumor é a IL-33. Analisamos a produção desta citocina quando estimulados pelos tecidos adiposos e vimos que ambos os tecidos induzem a produção desta citocina em 4T1. A produção de IL-33 é muito discutida quando o assunto é desenvolvimento tumoral. IL-33 é produzida por células tumorais e induz proliferação, promovendo a maior produção de VEGF, facilitando a metástase (Molofsky, Savage, & Locksley 2016). Contudo, esta citocina também pode ser caracterizada como anti-tumoral, pois também está associada com um aumento na população de linfócitos T CD8+ no microambiente tumoral (Ziqi Jin & Haiyan Liu 2018).

A maturação de IL-33 é dependente de caspase-1 (Cayrol & Girard 2009), logo a ausência desta enzima no tecido adiposo influenciou na modulação inflamatória dos tecidos. Uma vez que a ausência de caspase 1/11 modificou as citocinas produzidas pelo tecido adiposo, como a própria produção de IL-33, verificamos que as células 4T1 estimuladas por esse tecido tiveram uma produção reduzida de IL-33, assim como outras citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-12. Estes dados demonstram o potencial do tecido adiposo em modular a resposta imune em células tumorais sugerem que as proteínas caspase 1/11 e NLRP3 nos tecidos adiposos modulam o tecido de maneira a interferir no processo inflamatório das células 4T1.

Os resultados obtidos com a análise da proteômica das células 4T1 estimuladas com os produtos de secreção dos tecidos adiposos nos confirmaram a hipótese do papel diferencial dos tecidos adiposos na modulação proteica destas células. A elevada produção de citocinas inflamatórias pelo tecido adiposo, como a produção de TNF- α e IL-1 β possivelmente levaram a uma modulação na produção da proteína highmobility group box 1 protein (HMGB1) nas células tumorais. A expressão do mRNA que codifica HMGB1 é regulada positivamente por IL, TNF e TGF- β . No presente trabalho, detectamos a produção diferencial e significativa destas citocinas nos produtos de secreção de BAT e WAT que podem favorecer a expressão de HMGB1 nas células tumorais, tal como encontramos ao analisar a abundância relativa desta proteína nas células 4T1.

A expressão de HMGB1 é aumentada em praticamente todo tipo de tumor, assim como seu receptor de membrana RAGE, que reconhece HMGB1 extracelular e inicia uma cascata de sinalização intracelular ativando a inflamação. O Aumento dos níveis séricos da proteína HMGB1 é associado ao um pior prognóstico devido ao seu papel intracelular está associado como anti-apoptótico, em situações de estresse, assim como a superexpressão desta proteína no microambiente tumoral é reconhecido como sinal endógeno de perigo, induzindo uma resposta de reparo. Levando em considerações as funcionalidades da proteína HMGB1, podendo atuar de forma inflamatória (DAMP), a maior abundância desta proteína nas células 4T1 estimuladas com o produto de secreção de WAT comparado com o produto de secreção de BAT corrobora com os resultados que obtivemos em que o produto de secreção de WAT tende a um perfil pró-tumoral.

Em adição, o produto de secreção de WAT também mostrou uma maior abundância de Queratina, tipo II (Citoesqueleto), que está ligada a uma estimulação na síntese de DNA em células, podendo ser um agravante no caso de células tumorais. Considerando que o inflamassoma NLRP3 está diretamente ligado com o quadro inflamatório do tecido adiposo, modulando a produção de citocinas inflamatórias que irão modular o microambiente assim como as células tumorais, observamos que a ausência da proteína NLRP3 em BAT também gera uma grande presença de HMGB1 nas células 4T1 estimuladas com esse produto de secreção, visto que a ausência desta proteína, assim como a ausência das Caspases 1/11 não altera a produção de citocinas inflamatórias como TNF- α e TGF- β nos adipócitos, sendo então, o produto de secreção destes tecidos um grande indutor da proteína HMGB1.

Curiosamente, a abundância de proteínas relacionadas com divisão e proliferação celular também foi aumentado nas células 4T1 quando estimuladas com o produto de secreção de BAT deletado para a proteína NLRP3. O Grupo da pesquisadora Alessandra Britto e colaboradores mostraram que a ausência da proteína NLRP3 leva a uma redução da proteína pro-apoptótica BAX e de um aumento da proteína anti-apoptótica Bcl-2 (Irrera et al. 2017). Seguindo esta linha de pensamento, a ausência deste componente no tecido adiposo talvez leve a uma produção de proteínas que serão secretadas pelo e que podem induzir vias de proliferação nas células tumorais quando comparados aos tecidos selvagens.

O papel pro-tumoral e pro-inflamatório de WAT já vem sendo mostrado, onde este tecido por meio de secreção de citocinas influencia no processo de morte e proliferação. Além disso, mostramos aqui neste trabalho que o produto de secreção de WAT é capaz de aumentar também a abundância relativa de proteínas pro-tumorais como a Isoforma 9 da proteína MTA1 associada à metástase. Esse aumento foi ainda mais diferencial no grupo de células estimuladas com o produto de secreção de WAT deletados para as proteínas Caspase 1/11.

As proteínas MTA modulam vias de promoção do câncer, incluindo transformação, migração, invasão, sobrevivência, resposta a danos no DNA, angiogênese, inflamação, e quimio-resistência. De forma geral, as funções específicas pró-tumorais das proteínas MTA nas células cancerígenas são em grande parte resultado da modulação da expressão dos genes-alvo e / ou da atividade das proteínas que interagem com o MTA. Por exemplo, a regulação positiva do MTA1 favorece o processo de oncogênese, estimulando as vias de sinalização Ras, Wnt1 e STAT3 quando atua como um efetor da transformação mediada por cMyc e antagonizando supressores de tumores, como p53. Uma vez que o produto de secreção de WAT vem sendo descrito como pro-tumoral, a maior abundância de MTA1 pode ser uma das razões pela qual a célula tumoral 4T1 possui níveis mais ativados, levando em consideração os nossos dados já mostrados de biogêneses de corpúsculo lipídico, proliferação e viabilidade.

Em adição, a presença de proteína relacionada com a tradução de proteínas, como por exemplo, Fator de alongamento Tu, mitocondrial e 60S acidic ribosomal protein P2, estão aumentadas com a estimulação das células 4T1 com o sobrenadante de WAT. Esses dados corroboram com os dados demonstrado na literatura, assim como os resultados que

obtivemos neste trabalho. De forma geral, como mostrado no mapa de calor, os estímulos vindos do tecido adiposo são capazes de modular o perfil global de proteínas, gerando impactos em processos biológicos relacionados com morte e proliferação celular.

Tendo em vista a influência dos tecidos adiposos na modulação de parâmetros carcinogênicos, demos continuidade nos experimentos, agora tentando responder como os tecidos adiposos e o inflamassoma NLRP3 destes tecidos regulam a ativação e polarização de células imunes como linfócitos e macrófagos. Vários estudos têm saído a respeito do eminente potencial das células imunes em regular o microambiente tumoral e ser um facilitador ou não do desenvolvimento tumoral (Gajewski et al. 2013).

Linfócitos exercem um papel crucial neste cenário, podendo assumir sua polarização anti-tumoral (TCD8+) ou pro-tumoral (TCD4+). Além dos linfócitos, células NK também são atraídas para o microambiente com o objetivo de eliminar células neoplásicas (Dagenais & Saleh 2016). Karalis e colaboradores mostraram recentemente o papel de células TCD8+ e TCD4+ na adipogênese dos tecidos adiposos mostrando o importante papel destas células na homeostase dos tecidos. (Moysidou et al. 2018).

No presente trabalho mostramos o papel diferencial dos principais tecidos adiposos, branco e marrom, na modulação de TCD8+, TCD4+ e NK. Demonstramos que o produto de secreção de BAT induz uma maior polarização de linfócitos para TCD8+ assim como aumentam o número de células NK ativadas, ambas as populações aumentaram a quantidade de granzimas intracelulares com o produto de secreção deste tecido. Esse resultado mostra o papel anti-tumoral de BAT. Esse resultado pode estar associada à indução da inflamação que BAT pode assumir. Roberts-Toler et al mostraram que o BAT é capaz de regular positivamente a expressão de genes relacionados com a ativação leucocitária incluindo genes responsivos a $IFN\gamma$, a família GTPase da imunidade membro M2 (Irgm2), proteína de ligação ao guanilato 4 (Gbp4) e GTPase induzida por interferon γ (Igtg) (Berg et al. 2017), além de citocinas pró-inflamatórias como TNF, IL-6, CCL2, e CCL5 (Satoshi Nishimura, Ichiro Manabe, Mika Nagasaki 2009).

Mais uma vez, a ausência de caspase 1/11 modulou o perfil inflamatório do tecido levando a uma maior ativação destes linfócitos. O mesmo resultado não foi observado com estímulos de WAT. Logo, o tecido adiposo marrom é capaz de induzir uma resposta anti-tumoral pela ativação de TCD8+ e NK com a participação de caspase 1/11. Assim como o

produto de secreção de BAT aumentou a população e ativação de células TCD8+ e NK, também induziu um aumento na população de TCD4+ após estímulo. Este resultado já era esperado, visto que este tecido tem um perfil mais anti-inflamatório (Poekes, Lanthier, & Leclercq 2015).

Embora pareça contraditória a ativação de ambas as populações linfocitárias, nossa hipótese é que a modulação da polarização destas células por BAT ocorra de forma balanceada. Visto que em situações como de desenvolvimento tumoral, o BAT pode assumir um perfil anti-tumoral a fim de combater o crescimento das células (como já foi observado em nossos resultados prévios), porém em condições de homeostase, esse tecido pode manter o perfil anti-inflamatório com a indução de uma polarização Th2. A ausência de caspase1/11 no tecido adiposo induziu uma ativação ainda maior de linfócitos, visto que a ausência de caspase 1/11 afeta a produção de citocinas inflamatórias nos tecidos adiposos, que por sua vez, provavelmente, interfere na polarização das células imunológicas.

Em busca de melhor entender como os tecidos adiposos podem modular o microambiente tumoral e gerar impactos na progressão do tumor, além de analisarmos os impactos nas próprias células tumorais, nos linfócitos e nas células NK, também avaliamos se o produto de secreção de tecidos adiposos é capaz de modular a polarização de macrófagos, assim como se os componentes do inflamassoma NLRP3 podem gerar impactos nessa polarização. Primeiro constatamos que o produto de secreção de BAT induz uma maior biogênese de LD nos macrófagos derivados da medula de camundongos selvagens, mostrando que esse tecido pode induzir uma resposta imune diferenciada na atividade de macrófagos. Entretanto, a polarização dos macrófagos é fundamental para o entendimento do funcionamento destas células em resposta ao desenvolvimento do tumor (Mantovani et al. 2002).

Para responder essa questão, analisamos em nível de expressão gênica genes responsáveis pela polarização M1 (CD68, iNOS e TNF- α) (Em & Básica 2014) e genes característicos para o perfil M2 (IL-10, Arg1 e Mcr1) (Liu et al. 2014). Nossos resultados mostraram uma diminuição da expressão de CD68, iNOS e TNF- α em macrófagos estimulados com produto de secreção de BAT, mostrando a atividade anti-inflamatória de BAT que já é bastante caracterizada, assim como o produto de secreção de WAT induziu uma possível expressão de CD68 e TNF- α , como já mostrado na literatura (Petruzzelli et

al. 2014). Embora não tenha dado resultados significativos estatisticamente, a ausência de caspase 1/11 no tecido adiposo marrom reverteu o cenário, induzindo uma possível polarização para o perfil M1 os macrófagos estimulados, o que está de acordo com nossos dados prévios sobre a influência destas enzimas na modulação da inflamação nesse tecido. Foi analisado também o infiltrado de macrófagos no tecido adiposo branco e marrom, visto que a presença destas células no tecido pode influenciar no perfil inflamatório do tecido adiposo (Villarroya et al. 2018). A contagem mostrou um maior número de macrófagos no tecido adiposo marrom comparado com o tecido adiposo branco, porém esse resultado já era esperado levando em consideração a densidade do tecido adiposo branco comparado com o marrom (Thomas et al. 2018). Contudo, de forma interessante, o tecido adiposo marrom deletado para as proteínas caspase 1/11 apresentaram um maior infiltrado de macrófagos. Esse dado pode ser adicionado ao perfil anti-tumoral do tecido adiposo marrom, onde esses macrófagos podem atuar na modulação inflamatória deste tecido.

Uma das respostas para o recrutamento e polarização diferencial das células imunes entre o tecido adiposo branco e marrom, assim como nos tecidos deletados para as proteínas do inflamassoma NLRP3, é a secreção de citocinas pelos tecidos (Dirat et al. 2011). Nós mensuramos a secreção de mediadores inflamatórios nos tecidos adiposos para responder essa questão. Os dados mostraram que não há diferença entre a produção da quimiocina CCL2 pelos tecidos adiposos. Esta quimiocina é secretada de forma considerável pelo tecido adiposo, tanto branco quanto marrom (Arner et al. 2012). No microambiente tumoral, a produção de CCL2 é reportada como um pior prognóstico, onde há o grande recrutamento de macrófago que pode então ser polarizado pelas células tumorais (Arendt et al. 2013).

Nossos dados também mostraram que, tanto no tecido adiposo branco quanto no tecido adiposo marrom, houve uma grande redução de CCL2 nos tecidos deletados para caspase1/11. A ausência das caspase1/11 interferiu também na produção de IL-33, IL-1 β , TNF- α , GM-CSF e TGF- β em ambos tecidos. Assim como nos resultados já mostrado, a ausência de caspase 1/11 nesses tecidos modula o perfil imunológico, afetando diretamente a resposta de células imunes infiltradas, assim como podem influenciar na progressão tumoral. A elevada produção de GM-CSF pelo tecido adiposo marrom e não pelo tecido adiposo branco, pode ser um dos motivos pela diminuição da viabilidade celular de 4T1, assim como na polarização dos linfócitos (Wan-Lun Yan, Kuan-Yin Shen, Chun-Yuan

Tien 2017), incluindo a diminuição da produção desta citocina na ausência de caspase 1/11, refletindo numa polarização diferenciada por esse tecido.

Após todos os dados, fica evidente que o tecido adiposo branco e marrom exerce um importante papel na modulação da inflamação e da progressão tumoral. Nossos dados, de forma inédita, mostraram que as proteínas caspases 1/11 e NLRP3 influenciam de forma substancial a modulação metabólica dos tecidos adiposos, incluindo o produto de secreção dos tecidos. Esse fato, como já mostrado nos resultados, modulou de forma diferencial a sobrevivência e proliferação de células tumorais, a polarização e ativação de células imunes e o recrutamento de macrófagos para o tecido adiposo.

Pensando em responder se a ausência das caspases 1/11 modula o metabolismo lipídico destes tecidos, realizamos a análise da lipidômica destes tecidos. A diferença dos componentes lipídicos intracelulares, mostrou uma grande diferença quando comparado os tecidos branco e marrom. Esse dado é de extrema relevância para este trabalho, considerando que os resultados obtidos mostram uma grande diferença na produção de citocinas e outros impactos na modulação da inflamação. O dado comparando o tecido adiposo branco com o tecido adiposo marrom corroborou com dados da literatura (Roberts LD, West JA, Vidal-Puig A 2014). A ausência de caspase 1/11 modulou de forma significativa a composição lipídica entre os tecidos adiposos selvagens assim como os tecidos deletados para caspase 1/11.

Esse resultado é ainda mais visível entre os tecidos adiposos marrons. Com a comprovação pela espectrometria de massa, que a ausência de caspase 1/11 modula completamente o conteúdo lipídico do tecido adiposo marrom, fica mais claro que grande parte da modulação vista é dependente de caspase 1/11, em que estas enzimas estão relacionadas com todo o metabolismo do tecido adiposo, e não apenas com a maturação de citocinas inflamatórias.

Por fim, caracterizamos no presente trabalho, o papel diferencial do tecido adiposo branco e marrom na modulação da viabilidade, proliferação e sobrevivência de células de câncer de mama. Nós demonstramos o papel do inflamassoma NLRP3 na modulação da inflamação mediada pelo tecido adiposo branco e marrom, influenciando de forma direta e indireta a inflamação dos tecidos, que por sua vez está ligada com a manutenção do microambiente tumoral. Mostramos também a importância das Caspases 1/11 na

composição do tecido adiposo marrom, onde a sua ausência modulou de forma substancial o tecido. Portanto, além de exercerem um papel diferencial no estabelecimento e progressão tumoral, sendo o tecido adiposo marrom anti-tumoral e o branco pro-tumoral, o inflamassoma NLRP3 se mostrou um grande ponto no balanço inflamatório destes tecidos, sendo o tecido adiposo marrom um potencial alvo para a imunoterapia no tratamento do câncer de mama.

Conclusão

Pode-se concluir do presente trabalho que a regulação do tecido adiposo é fundamental para a homeostase corporal. De forma mais específica o trabalho mostrou que:

- A) O tecido adiposo branco e marrom possui papéis opostos na sobrevivência e proliferação de células de câncer de mama.
- B) O inflamassoma NLRP3 apresenta um papel central na regulação da inflamação pelo tecido adiposo.
- C) O produto de secreção do tecido adiposo marrom é capaz de induzir morte celular em células 4T1 com a participação da caspase 1/11.
- D) O produto de secreção dos tecidos adiposos modula o perfil proteico das células 4T1, em que o tecido adiposo branco induz a presença de proteínas ligas a vias de proliferação celular, assim como proteínas ligadas à inflamação.
- E) O produto de secreção do tecido adiposo marrom modula a inflamação de modo a aumentar a ativação da população de linfócitos CD8+, CD4+ e células NK com a participação de caspase 1/11.
- F) Tecido adiposo branco e marrom induzem biogênese de corpúsculos lipídicos, sendo maior pelo tecido adiposo marrom.
- G) Os tecidos adiposos branco e marrom possuem perfis inflamatórios distintos, em que as caspases 1/11 modulam a quantidade de citocinas nesses tecidos.
- H) Caspase 1/11 modifica o conteúdo lipídico dos tecidos adiposos, sendo ainda mais evidente no tecido adiposo marrom.

Referências

- Aguilar-Salinas, Carlos A., Eduardo García, Lorena Robles, Daniela Riaño, Doris Georgina Ruiz-Gomez, Ana Cristina García-Ulloa, Marco A. Melgarejo, Margarita Zamora, Luz E. Guillen-Pineda, Roopa Mehta, Samuel Canizales-Quinteros, Ma Teresa Tusie Luna, and Francisco J. Gómez-Pérez. 2008. “High Adiponectin Concentrations Are Associated with the Metabolically Healthy Obese Phenotype.” *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 93(10):4075–79.
- Ali, Adnan, Yumna Mirza, Urooj Faizan, Nida Zahid, and Muhammad S. Awan. 2018. “Association of Obesity and Thyroid Cancer at a Tertiary Care Hospital in Pakistan.” *Cureus* 10(3):1–9.
- Arendt, Lisa M., Jessica McCreedy, Patricia J. Keller, Dana D. Baker, Stephen P. Naber, Victoria Seewaldt, and Charlotte Kuperwasser. 2013. “Obesity Promotes Breast Cancer by CCL2-Mediated Macrophage Recruitment and Angiogenesis.” *Cancer Research* 73(19):6080–93.
- Arner, Erik, Niklas Mejhert, Agné Kulyté, Piotr J. Balwierz, Mikhail Pachkov, Mireille Cormont, Silvia Lorente-Cebrián, Anna Ehrlund, Jurga Laurencikiene, Per Hedén, Karin Dahlman-Wright, Jean François Tanti, Yoshihide Hayashizaki, Mikael Rydén, Ingrid Dahlman, Erik Van Nimwegen, Carsten O. Daub, and Peter Arner. 2012. “Adipose Tissue MicroRNAs as Regulators of CCL2 Production in Human Obesity.” *Diabetes* 61(8):1986–93.
- Bacac M, Stamenkovic I. 2008. “Metastatic Cancer Cell.” *Annu Rev Pathol* 3:221–47.
- Balkwill, Fran. 2004. “Cancer and the Chemokine Network.” *Nature Reviews Cancer* 4(7):540–50.
- Benz, Christopher C. 2009. “Impact of Aging on the Biology of Breast Cancer.” *Crit Rev Oncol Hematol.* 66(1):65–74.
- Berg, Susan M. Van Den, Andrea D. Van Dam, Patrick C. N. Rensen, Menno P. J. De Winther, and Esther Lutgens. 2017. “Immune Modulation of Brown(In) Adipose Tissue in Obesity.” *Endocrine Reviews* 38(February):46–68.

- Bozza, Patricia T. 2010. "Prostaglandins , Leukotrienes and Essential Fatty Acids Lipid Droplets in Inflammation and Cancer." 82:243–50.
- Burl, Rayanne B., Vanesa D. Ramseyer, Elizabeth A. Rondini, Roger Pique-regi, Yun-hee Lee, James G. Granneman, Rayanne B. Burl, Vanesa D. Ramseyer, Elizabeth A. Rondini, Roger Pique-regi, and Yun-hee Lee. 2018. "Deconstructing Adipogenesis Induced by β 3- Adrenergic Receptor Activation with Single-Cell Resource Deconstructing Adipogenesis Induced by β 3-Adrenergic Receptor Activation with Single-Cell Expression Profiling." *Cell Metabolism* 1–10.
- Cayrol, Corinne and Jean-philippe Girard. 2009. "The IL-1-like Cytokine IL-33 Is Inactivated after Maturation by Caspase-1." *PNAS* 106(22).
- Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. 2002. "Dissemination and Growth of Cancer Cells in Metastatic Sites." *Nat Rev Cancer* 2(8):563–72.
- Chanmee, Theerawut, Pawared Ontong, Kenjiro Konno, and Naoki Itano. 2014. "Tumor-Associated Macrophages as Major Players in the Tumor Microenvironment." *Cancers* 6(3):1670–90.
- Cheung, Otto K. and Alfred S. Cheng. 2016. "Gender Differences in Adipocyte Metabolism and Liver Cancer Progression." *Frontiers in Genetics* 7(September):1–17.
- Cinti, Saverio. 2018. "Pink Adipocytes." *Trends in Endocrinology & Metabolism* 29(9):651–66.
- Coelho, Marisa, Teresa Oliveira, and Ruben Fernandes. 2013. "Biochemistry of Adipose Tissue : An Endocrine Organ." *Arch Med Sci* 9(Figure 1):191–200.
- Condeelis, John and Jeffrey W. Pollard. 2006. "Macrophages: Obligate Partners for Tumor Cell Migration, Invasion, and Metastasis." *Cell* 124(2):263–66.
- Corrêa L.H, Heyn G. and Magalhães K. 2019. "The Impact of the Adipose Organ Plasticity on Inflammation and Cancer Progression." *Cells - MDPI* 8(7):1–18.
- Corrêa, Luís Henrique, Rafael Corrêa, Cecília Menezes Farinasso, Lívia Pimentel de Sant'Ana Dourado, and Kelly Grace Magalhães. 2017. "Adipocytes and Macrophages

- Interplay in the Orchestration of Tumor Microenvironment: New Implications in Cancer Progression.” *Frontiers in Immunology* 8(SEP):1–12.
- Crispim, Daisy. 2017. “Current Role of the NLRP3 Inflammasome on Obesity and Insulin Resistance: A Systematic Review.” *Metabolism* 74:1–9.
- Dagenais, Maryse and Maya Saleh. 2016. “Linking Cancer-Induced Nlrp3 in Fl Ammasome Activation to Ef Fi Cient NK Cell-Mediated Immunosurveillance.” *Oncoimmunology* 5(5):9–11.
- Daley, Donnele, Vishnu R. Mani, Navyatha Mohan, Neha Akkad, Gautam S. D. Balasubramania Pandian, Shivraj Savadkar, Ki Buom Lee, Alejandro Torres Hernandez, Berk Aykut, Brian Diskin, Wei Wang, Mohammad S. Farooq, Arif I. Mahmud, Gregor Werba, Eduardo J. Morales, Sarah Lall, Benjamin J. Wadowski, Amanda G. Rubin, Matthew E. Berman, Rajkishen Narayanan, Mautin Hundeyin, and George Miller. 2016. “NLRP3 Signaling Drives Macrophage-Induced Adaptive Immune Suppression in Pancreatic Carcinoma.” *J Exp Med* 5:1711–24.
- Deep Dutta, Sujoy Ghosh. 2012. “Leptin and Cancer: Pathogenesis and Modulation.” *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism* 16:595–670.
- Deng, Tuo, Christopher J. Lyon, Stephen Bergin, Michael A. Caligiuri, and Willa A. Hsueh. 2016. *Obesity, Inflammation, and Cancer*. Vol. 11.
- Dirat, B??atrice, Ludivine Bochet, Marta Dabek, Dani??le Daviaud, St??phanie Dauvillier, Bilal Majed, Yuan Yuan Wang, Aline Meulle, Bernard Salles, Sophie Le Gonidec, Ignacio Garrido, Ghislaine Escourrou, Philippe Valet, and Catherine Muller. 2011. “Cancer-Associated Adipocytes Exhibit an Activated Phenotype and Contribute to Breast Cancer Invasion.” *Cancer Research* 71(7):2455–65.
- Eicke Latz, T. Sam Xiao, and Andrea Stutz. 2013. “Activation and Regulation of the Inflammasomes.” *Nature Reviews Immunology* 13(6).
- Em, Programa D. E. Pós-graduação and Imunologia Básica. 2014. “Avaliação de Populações de Macrófagos M1 e M2 Em Camundongos Com Capacidade Diferente de Elaborar Resposta Imune Celular Contra Mycobacterium Tuberculosis.” 1–67.

- Engin A. 2017. "Obesity-Associated Breast Cancer: Analysis of Risk Factors." *Adv Exp Med Biol.* 906:571–606.
- Esser, Nathalie, Sylvie Legrand-Poels, Jacques Piette, André J. Scheen, and Nicolas Paquot. 2014. "Inflammation as a Link between Obesity, Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetes." *Diabetes Research and Clinical Practice* 105(2):141–50.
- Fenzl, Anna and Florian W. Kiefer. 2014. "Brown Adipose Tissue and Thermogenesis." *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation* 19(1):25–37.
- Filipe, Elyse C., Morghan C. Lucas, Paul Timpson, David Herrmann, Jessica L. Chitty, Thomas R. Cox, and Kent Hunter. 2018. "Recent Advances in Understanding the Complexities of Metastasis." *F1000Research* 7:1–18.
- Fournié, Jean-jacques and Mary Poupot. 2018. "The Pro-Tumorigenic IL-33 Involved in Antitumor Immunity: A Yin and Yang Cytokine." *Frontiers in Immunology* 9(October):1–9.
- G. Betanzos-Cabrera, D. Estrada-Luna, H. Belefant-Miller and J. C. Cancino-Díaz. 2012. "Mice Fed with a High Fat Diet Show a Decrease in the Expression of 'Toll like Receptor' (TLR)2 and TLR6 MRNAs in Adipose and Hepatic Tissues." *Nutr Hosp* 27:1196–1203.
- Gagnon, Annemarie, Charlie Foster, Anne Landry, and Alexander Sorisky. 2013. "The Role of Interleukin 1 b in the Anti-Adipogenic Action of Macrophages on Human Preadipocytes." *Endocrine Development* 6.
- Gajewski, Thomas F., Hans Schreiber, and Yang-Xin Fu. 2013. "Innate and Adaptive Immune Cells in the Tumor Microenvironment." *Nature Immunology* 14(10):1014–22.
- Gary A. Boorman, Jeffrey I. Everitt. 2006. "Neoplastic Disease." *Academic Press* 479–511.
- Giordano, Antonio, Arianna Smorlesi, Andrea Frontini, Giorgio Barbatelli, and Saverio Cinti. 2014. "Mechanisms in Endocrinology: White, Brown and Pink Adipocytes: The Extraordinary Plasticity of the Adipose Organ." *European Journal of Endocrinology*

170(5):R159–71.

Gobbi, Helenice. 2012. “Classificação Dos Tumores Da Mama : Atualização Baseada Na Nova Classificação Da Organização Mundial Da Saúde de 2012.” *J Bras Patol Med Lab* 48:463–74.

Goldhirsch, A., W. C. Wood, A. S. Coates, R. D. Gelber, and B. Thu. 2011. “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.” *Annals of Oncology* 22(June):1736–47.

Ham, Boram, Maria Celia Fernandez, Zarina D. Costa, and Pnina Brodt. 2016. “The Diverse Roles of the TNF Axis in Cancer Progression and Metastasis.” 11(1):1–27.

Van Harmelen, Vanessa, Signy Reynisdottir, Per Eriksson, Anders Thörne, Johan Hoffstedt, Fredrik Lönnqvist, and Peter Arner. 1998. “Leptin Secretion from Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue in Women.” *Diabetes* 47(6):913–17.

He, Yuan, Hideki Hara, and Gabriel Núñez. 2016. “Mechanism and Regulation of NLRP3 In Fl Ammasome Activation.” *Cell Press* 41(12):1012–21.

Helena, Maria and Rossi Oliveira. 2011. *Abordagens Para o Controle Do Cancer - Instituto Nacional de Câncer (INCA)*.

Huysentruyt, Thomas N. Seyfried and Leanne C. 2014. “On the Origin of Cancer Metastasis.” *Crit Rev Oncog* 18(1):225–49.

INCA. 2018. “Estatísticas Para Câncer de Mama.” *Estatísticas Para Câncer de Mama*. Retrieved (<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/estatisticas-para-cancer-de-mama/6562/34/>).

Irrera, Natasha, Gabriele Pizzino, Margherita Calò, Giovanni Pallio, Federica Mannino, Fausto Famà, Vincenzo Arcoraci, Vincenzo Fodale, Antonio David, Cosentino Francesca, Letteria Minutoli, Emanuela Mazzon, Placido Bramanti, Francesco Squadrito, Domenica Altavilla, and Alessandra Bitto. 2017. “Lack of the Nlrp3 Inflammasome Improves Mice Recovery Following Traumatic Brain Injury.” *Frontiers in Pharmacology* 8(July):1–10.

- Jeschke, Marc G. 2019. "NLRP3 Inflammasome Mediates White Adipose Tissue Browning After Burn." *Physiological Reviews* 4:27–56.
- Jong, Jasper M. A. De, René T. F. Wouters, Nathalie Boulet, and Barbara Cannon. 2017. "The β 3 -Adrenergic Receptor Is Dispensable for Browning of Adipose Tissues."
- Karen V. Swanson, Meng Deng & Jenny P. Y. Ting. 2019. "The NLRP3 Inflammasome: Molecular Activation and Regulation to Therapeutics." *Nature Reviews Immunology* volume 19:477–489.
- Kayagaki, Nobuhiko, Søren Warming, Mohamed Lamkanfi, Lieselotte Vande Walle, Salina Louie, and Jennifer Dong. 2011. "Non-Canonical Inflammasome Activation Targets Caspase-11." *Nature* 479(7371):117–21.
- Kir, Serkan and Bruce M. Spiegelman. 2016. "Cachexia and Brown Fat: A Burning Issue in Cancer." *Trends in Cancer* 2(9):461–63.
- Kolb, Ryan, Guang-hui Liu, Ann M. Janowski, Fayyaz S. Sutterwala, and Weizhou Zhang. 2014. "Inflammasomes in Cancer : A Double-Edged Sword." *Protein Cel* 5(1):12–20.
- Lecoultre, Ravussin E. 2011. "Brown Adipose Tissue and Aging." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 14:1–6.
- Leitão, Aline H., Rafael Lobato, Ana Luiza Maia, and Proto-oncogene Expression. 2003. "Aumento Da Expressão Do Proto-Oncogene Ras No Bócio Multinodular: Possível Envolvimento Na Patogênese." *Arq Bras Endocrinol Metab* 47(1):721–27.
- Liu, Xing, Zhibin Zhang, Jianbin Ruan, Youdong Pan, Venkat Giri Magupalli, Hao Wu, and Judy Lieberman. 2016. "Inflammasome-Activated Gasdermin D Causes Pyroptosis by Forming Membrane Pores." *Nature* 535(7610):153–58.
- Liu, Yan Cun, Xian Biao Zou, Yan Fen Chai, and Yong Ming Yao. 2014. "Macrophage Polarization in Inflammatory Diseases." *International Journal of Biological Sciences* 10(5):520–29.
- Long, Elizabeth and Ian L. P. Beales. 2014. "The Role of Obesity in Oesophageal Cancer Development." *Therapeutic Advances in Gastroenterology* 7:247–68.

- Mantovani, Alberto, Silvano Sozzani, Massimo Locati, Paola Allavena, and Antonio Sica. 2002. "Macrophage Polarization: Tumor-Associated Macrophages as a Paradigm for Polarized M2 Mononuclear Phagocytes." *Trends in Immunology* 23(11):549–55.
- Marshall, Christopher J. 1991. "Tumor Suppressor Genes." *Cell Reports J. Mark Brown* 64(2):313–26.
- Molofsky, Ari B., Adam Savage, and Richard M. Locksley. 2016. "Interleukin-33 in Tissue Homeostasis, Injury and Inflammation." *Immunity* 42(6):1005–19.
- Moossavi, Maryam, Negin Parsamanesh, Afsane Bahrami, and Stephen L. Atkin. 2018. "Role of the NLRP3 Inflammasome in Cancer." *Molecular Cancer* 17:1–13.
- Moysidou, Maria, Sevasti Karaliota, Elisavet Kodela, Maria Salagianni, Yassemi Koutmani, Antonia Katsouda, Konstantia Kodella, Panagiotis Tsakanikas, Styliani Ourailidou, Evangelos Andreakos, Nikolaos Kostomitsopoulos, Dimitris Skokos, Antonios Chatzigeorgiou, Kyoung-jin Chung, Stefan Bornstein, Mark W. Sleeman, Triantafyllos Chavakis, and Katia P. Karalis. 2018. "CD8 + T Cells in Beige Adipogenesis and Energy Homeostasis." *JCI Insight* 3(5):1–17.
- Mrozik, Krzysztof Marek, Orest William Blaschuk, Chee Man Cheong, Andrew Christopher, William Zannettino, and Kate Vandyke. 2018. "N-Cadherin in Cancer Metastasis , Its Emerging Role in Haematological Malignancies and Potential as a Therapeutic Target in Cancer." *BMC Cancer* 18:1–16.
- Nickel, Annina, Christina Blücher, Omaeir Al Kadri, Nancy Schwagarus, Silvana Müller, Michael Schaab, Joachim Thiery, Ralph Burkhardt, and Sonja C. Stadler. 2018. "Adipocytes Induce Distinct Gene Expression Profiles in Mammary Tumor Cells and Enhance Inflammatory Signaling in Invasive Breast Cancer Cells." *Scientific Reports* (October 2017):1–13.
- Nieman, Kristin M., Iris L. Romero, Bennett Van Houten, and Ernst Lengyel. 2013. "Adipose Tissue and Adipocytes Support Tumorigenesis and Metastasis." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1831(10):1533–41.
- NIH. 2019. "What Is Cancer ? Differences between Cancer Cells and Normal Cells." *NIH* 1(1):1–8.

- Nishimoto, Sachiko. 2016a. "Obesity-Induced DNA Released from Adipocytes Stimulates Chronic Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance." *Science Advances* 2(3):1–11.
- Nishimoto, Sachiko. 2016b. "Obesity-Induced DNA Released from Adipocytes Stimulates Chronic Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance." *Science Advances* 2(3):1–11.
- Oelkrug, R., E. T. Polymeropoulos, and M. Jastroch. 2015. "Brown Adipose Tissue: Physiological Function and Evolutionary Significance." *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 185(6):587–606.
- Ortega-molina, Ana, Alejo Efeyan, Elena Lopez-guadamillas, Maribel Mun, Francisca Mulero, Joaquin Pastor, Sonia Martinez, Eduardo Romanos, and M. Mar Gonzalez-barroso. 2010. "Pten Positively Regulates Brown Adipose Function , Energy Expenditure , and Longevity." *Cell Metabolism* 15(3):382–94.
- Paige M. Bracci. 2013. "Obesity and Pancreatic Cancer: Overview of Epidemiologic Evidence and Biologic Mechanisms." *Mol Carcinog* 51(1):53–63.
- Panina, Yulia A., Anton S. Yakimov, Yulia K. Komleva, Andrey V. Morgun, Olga L. Lopatina, Natalia A. Malinovskaya, Anton N. Shuvaev, Vladimir V. Salmin, Tatiana E. Taranushenko, and Alla B. Salmina. 2018. "Plasticity of Adipose Tissue-Derived Stem Cells and Regulation of Angiogenesis." *Frontiers in Physiology* 9:1656.
- Park, Jiyoung, Thomas S. Morley, Min Kim, Deborah J. Clegg, and Philipp E. Scherer. 2014. "Obesity and Cancer--Mechanisms Underlying Tumour Progression and Recurrence." *Nature Reviews. Endocrinology* 10(8):455–65.
- Peirce, Vivian, Stefania Carobbio, and Antonio Vidal-Puig. 2014. "The Different Shades of Fat." *Nature*.
- Peng, Xiao-rong; Gennemark, Peter; O'Mahony, Gavin. 2015. "Unlock the Thermogenic Potential of Adipose Tissue : Pharmacological Modulation and Implications for Treatment of Diabetes and Obesity." 6(November):1–15.

- Pernas, Sonia and Sara M. Tolaney. 2019. "HER2-Positive Breast Cancer: New Therapeutic Frontiers and Overcoming Resistance." *Therapeutic Advances in Medical Oncology* 11:1–16.
- Petruzzelli, Michele, Martina Schweiger, Renate Schreiber, Ramon Campos-Olivas, Maria Tsoli, John Allen, Michael Swarbrick, Stefan Rose-John, Mercedes Rincon, Graham Robertson, Rudolf Zechner, and Erwin F. Wagner. 2014. "A Switch from White to Brown Fat Increases Energy Expenditure in Cancer-Associated Cachexia." *Cell Metabolism* 20(3):433–47.
- Picon-ruiz, Manuel, Cynthia Morata-tarifa, and Janeiro J. Valle-goffin. 2017. "Obesity and Adverse Breast Cancer Risk and Outcome: Mechanistic Insights and Strategies for Intervention." *CA CANCER J CLIN* 67(5).
- Pizato, Nathalia, Larissa Fernanda, Melo Vasconcelos, and Beatriz Christina Luzete. 2019. "Omega 3-DHA and Delta-Tocotrienol Modulate Lipid Droplet Biogenesis and Lipophagy in Breast Cancer Cells: The Impact in Cancer Aggressiveness." *Nutrients* (Ld):1–18.
- Poekes, L., N. Lanthier, and I. A. Leclercq. 2015. "Brown Adipose Tissue: A Potential Target in the Fight against Obesity and the Metabolic Syndrome." *Clinical Science* 129(11):933–49.
- R. Stienstra, J. A. van Diepen. 2011. "Inflammasome Is a Central Player in the Induction of Obesity and Insulin Resistance." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:15324–29.
- Reed, Johanna R., Ronald P. Leon, Majken K. Hall, and Kathryn L. Schwertfeger. 2009. "Interleukin-1beta and Fibroblast Growth Factor Receptor 1 Cooperate to Induce Cyclooxygenase-2 during Early Mammary Tumourigenesis." *Breast Cancer Research* 11(2):1–14.
- Roberts LD, West JA, Vidal-Puig A, Griffin JL. 2014. "Methods for Performing Lipidomics in White Adipose Tissue." *Methods Enzymol* 8:211–31.
- Rocha-rodrigues, Sílvia, Amaia Rodríguez, Alexandra M. Gouveia, Inês O. Gonçalves, Sara Becerril, Beatriz Ramírez, Jorge Beleza, Gema Frühbeck, António Ascensão, and José Magalhães. 2016. "Effects of Physical Exercise on Myokines Expression and

- Brown Adipose-like Phenotype Modulation in Rats Fed a High-Fat Diet.” *Life Sciences* 165:100–108.
- Santander, Ana M., Omar Lopez-Ocejo, Olivia Casas, Thais Agostini, Lidia Sanchez, Eduardo Lamas-Basulto, Roberto Carrio, Margot P. Cleary, Ruben R. Gonzalez-Perez, and Marta Torroella-Kouri. 2015. *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*. Vol. 7.
- Satoshi Nishimura, Ichiro Manabe, Mika Nagasaki, & Ryozi Nagai. 2009. “CD8+ Effector T Cells Contribute to Macrophage Recruitment and Adipose Tissue Inflammation in Obesity.” *Nature Medicine* 15:914–920.
- Shannon M. Reilly & Alan R. Saltiel. 2017. “Adapting to Obesity with Adipose Tissue Inflammation.” *Nature Reviews* 13:633–643.
- Shortt, Jake and Ricky W. Johnstone. 2012. “Oncogenes in Cell Survival and Cell Death.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 53:1–135.
- Sica, Antonio, Paola Larghi, Alessandra Mancino, Luca Rubino, Chiara Porta, Maria Grazia Totaro, Monica Rimoldi, Subhra Kumar Biswas, Paola Allavena, and Alberto Mantovani. 2008. “Macrophage Polarization in Tumour Progression.” *Seminars in Cancer Biology* 18(5):349–55.
- Silva, José de Alencar Gomes da. 2018. *Incidência de Câncer No Brasil*.
- Su, Fei, Songyeon Ahn, Achinto Saha, John Digiovanni, and Mikhail G. Kolonin. 2018. “Adipose Stromal Cell Targeting Suppresses Prostate Cancer Epithelial-Mesenchymal Transition and Chemoresistance.” *Oncogene* 38:1979–1988.
- Sun, Wanpeng and Jian Yang. 2010. “Functional Mechanisms for Human Tumor Suppressors.” *Journal of Cancer* (7):136–40.
- T, Tworoger and Huang. 2016. “Obesity and Ovarian Cancer.” *Recent Results Cancer Res.* 208:155–76.
- Thomas, Dylan, Caroline M. Apovian, Weight Management, and Weight Management.

2018. “Macrophage Functions in Lean and Obese Adipose Tissue.” *Metabolism* 72:120–43.
- Toni Petan, Eva Jarc, and Maida Jusovi'. 2018. “Lipid Droplets in Cancer : Guardians of Fat in a Stressful World.” *MDPI Molecules* 11–15.
- Trayhurn, Paul. 2018. “Brown Adipose Tissue — A Therapeutic Target in Obesity?” *Frontiers in Physiology* 9(November):1–5.
- Tsuchida, Junko, Masayuki Nagahashi, Kazuaki Takabe, and Toshifumi Wakai. 2017. “Clinical Impact of Sphingosine-1-Phosphate in Breast Cancer.” *Hindawi* 2017:1–9.
- Vachharajani, Vidula and D. Neil Granger. 2009. “Adipose Tissue: A Motor for the Inflammation Associated with Obesity.” *IUBMB Life* 61(4):424–30.
- Villarroya, F., R. Cereijo, A. Gavald, J. Villarroya, and M. Giralt. 2018. “Inflammation of Brown / Beige Adipose Tissues in Obesity and Metabolic Disease.” *JIM* 6:13.
- Vyas, Sejal, Elma Zaganjor, and Marcia C. Haigis. 2016. “Review Mitochondria and Cancer.” *Cell* 166(3):555–66.
- Wan-Lun Yan, Kuan-Yin Shen, Chun-Yuan Tien, Yu-An Chen & Shih-Jen Liu. 2017. “Recent Progress in GM-CSF-Based Cancer Immunotherapy.” *Future Medicine* 9.
- Wang, Jiankang, Bingling Luo, Xiaobing Li, Wenhua Lu, Jing Yang, Yumin Hu, Peng Huang, and Shijun Wen. 2017. “Inhibition of Cancer Growth in Vitro and in Vivo by a Novel ROS-Modulating Agent with Ability to Eliminate Stem-like Cancer Cells.” *Nature Publishing Group*.
- Wei, Qing, Kun Mu, Tao Li, Ying Zhang, Zhaowen Yang, Xiaoqing Jia, Wei Zhao, and Wanwan Huai. 2013. “Deregulation of the NLRP3 Inflammasome in Hepatic Parenchymal Cells during Liver Cancer Progression.” *Laboratory Investigation* 94(1):52–62.
- Weigert, Andreas, Nicole Weis, and Bernhard Br. 2009. “Regulation of Macrophage Function by Sphingosine-1-Phosphate.” *Immunobiology* 214:748–60.
- Weinberg, Scott Valastyan and Robert A. 2012. “Tumor Metastasis : Molecular Insights

and Evolving Paradigms.” *Cell* 147(2):275–92.

Williams, Carly Bess, Elizabeth S. Yeh, and Adam C. Soloff. 2016. “Tumor-Associated Macrophages: Unwitting Accomplices in Breast Cancer Malignancy.” *Npj Breast Cancer* 2(September 2015):15025.

Wu J1, Cohen P, Spiegelman BM. 2013. “Adaptive Thermogenesis in Adipocytes: Is Beige the New Brown?” *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:234–50.

Yang, Yang, Huanan Wang, Mohammed Kouadir, Houhui Song, and Fushan Shi. 2019. “Recent Advances in the Mechanisms of NLRP3 in Fl Ammasome Activation and Its Inhibitors.” *Cell Death and Disease* 10.

Zaki, Md. Hasan, Peter Vogel and, Thirumala-Devi. 2011. “IL-18 Production Downstream of the Nlrp3 Inflammasome Confers Protection against Colorectal Tumor Formation.” *J Immunol.* 185(8):4912–20.

Ziqi Jin and Haiyan Liu. 2018. “IL-33 Inhibits Tumor Growth through the Activation of Anti-Tumor CD8+ T Cell Response in Hepatocellular Carcinoma.” *The Journal of Immunology* 200:57–04.

ANEXOS



Adipocytes and Macrophages Interplay in the Orchestration of Tumor Microenvironment: New Implications in Cancer Progression

*Luís Henrique Corrêa, Rafael Corrêa, Cecília Menezes Farinasso, Lívia Pimentel de Sant'Ana Dourado and Kelly Grace Magalhães**

Laboratory of Immunology and Inflammation, Department of Cell Biology, University of Brasília, Brasília, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Fabrizio Mattei,
Istituto Superiore di Sanità, Italy

Reviewed by:

Carlos Alfaro,
Universidad de Navarra, Spain
Zong Sheng Guo,
Harvard University,
United States

*Correspondence:

Kelly Grace Magalhães
kellymagalhaes@unb.br

Specialty section:

This article was submitted
to Cancer Immunity
and Immunotherapy,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 05 July 2017

Accepted: 28 August 2017

Published: 19 September 2017

Citation:

Corrêa LH, Corrêa R, Farinasso CM,
de Sant'Ana Dourado LP and
Magalhães KG (2017) Adipocytes
and Macrophages Interplay in the
Orchestration of Tumor
Microenvironment: New Implications
in Cancer Progression.
Front. Immunol. 8:1129.
doi: 10.3389/fimmu.2017.01129

Inflammation has been known as one of the main keys to the establishment and progression of cancers. Chronic low-grade inflammation is also a strategic condition that underlies the causes and development of metabolic syndrome and obesity. Moreover, obesity has been largely related to poor prognosis of tumors by modulating tumor microenvironment with secretion of several inflammatory mediators by tumor-associated adipocytes (TAAs), which can modulate and recruit tumor-associated macrophages. Thus, the understanding of cellular and molecular mechanisms that underlay and link inflammation, obesity, and cancer is crucial to identify potential targets that interfere with this important route. Knowledge about the exact role of each component of the tumor microenvironment is not yet fully understood, but the new insights in literature highlight the essential role of adipocytes and macrophages interplay as key factor to determine the fate of cancer progression. In this review article, we focus on the functions of adipocytes and macrophages orchestrating cellular and molecular mechanisms that lead to inflammatory modulation in tumor microenvironment, which will be crucial to cancer establishment. We also emphasized the mechanisms by which the tumor promotes itself by recruiting and polarizing macrophages, discussing the role of adipocytes in this process. In addition, we discuss here the newest possible anticancer therapeutic treatments aiming to retard the development of the tumor based on what is known about cancer, adipocyte, and macrophage polarization.

Keywords: adipocytes, cancer, tumor microenvironment, obesity, inflammation, tumor-associated macrophages, tumor-associated adipocytes, macrophage polarization

INTRODUCTION

The Tumor Microenvironment

Tumor is not composed only of the cancer cells. Instead, there is a dynamic and mutualist relationship between tumor cells and the surrounding stroma (1). Studies have shown an intimate relationship between tumor mass cells and their extracellular matrix correlating this interaction with cancer establishment, progression, and metastasis. The extracellular matrix is responsible not only for the structural support of the cells but also for storing important signaling molecules, such as chemokines (2).

Cancer cells recruit non-malignant cells into their microenvironment, where reciprocal modulation takes place: tumor cells configure several cell types and change their metabolism to favor tumor promotion, resulting in a more anti-inflammatory environment and the avoidance of antitumor immune cells. Each non-malignant cell type exerts a function in the microenvironment in order to support tumor growth and development, which leads to metastasis (3).

An important component recruited for the tumor stroma is the tumor-associated macrophage (TAM). These cells have an extremely important action for tumor progression (4). Macrophages are recruited and polarized to the M2 configuration in which they act to compose the tumor microenvironment mediating an immunosuppression phenome. TAMs are chemoattracted to the microenvironment mainly by chemokines such as CCL2, which are produced in high quantities by malignant cells (5). In the tumor site of action, TAMs produce cytokines such as IL-10, IL-4, and IL-13 that will act to repair tissues and attract other auxiliary cells that can activate TAM and hence, promoting tumor growth (6).

Similarly, neutrophils are also part of the tumor microenvironment, being an important source of cytokines and reactive oxygen species (ROS). T cells are also found acting in an immunosuppressive manner, secreting TGF- β and IL-10 that inhibit the antitumor activity of cytotoxic T-cells and natural killer cells (2). Fibroblasts associated with the tumor have a fundamental participation in the production of vascular endothelial growth factor (VEGF), that induces angiogenesis, along with vascular endothelial cells that are responsible for forming blood vessels that support tumor growth and metastasis (1).

In addition to immunological cells, the tumor microenvironment is composed of adipose tissue. Adipose tissue has been widely studied and it has a great potential as an endocrine organ (7), since this tissue is known to be able to secrete a huge variety of different adipokines, such as leptin, hepatocyte growth factor, and adiponectin. Adipocytes can stimulate the growth and the survival of tumor cells (8) and then are able to perform a

crosstalk with the surrounding cells, releasing fatty acids that can be metabolized by tumor cells and used as energy source.

Tumor-associated adipocytes (TAAs) assist in the recruitment of macrophages to the microenvironment and their polarization to the alternative M2 configuration *via* CCL2, IL-1 β , and CXCL12 (9). Recently, Nishimoto et al. showed that macrophage accumulation in the microenvironment is due to not only the secretion of CCL2 by adipocytes but also the release of degenerate adipocyte DNA (10).

The complex cellular arrangement that constitutes the tumor microenvironment is dynamic. Malignant cells are dependent on the cells of the immune system and fat cells to maintain and develop. Therefore, including all factors, the tumor microenvironment possesses the proliferative abilities to evade suppression, resist cell death, develop replicative immortality, induce angiogenesis, and stimulate not only invasion but also metastasis. A variety of cells and cytokines can be found in tumor microenvironment and they have different implications in cancer progression (Table 1).

Tumor-Associated Adipocytes

Cancer cells usually activate wound-healing response of the host to generate a supportive microenvironment to favor tumor development (4). It has been described that cancer progression is promoted by stromal cells, such as cancer-associated fibroblasts (CAFs) or TAMs, which secrete extracellular matrix components, chemokines, and growth factors that stimulates cell migration and metastasis (2). The contribution of fibroblasts, endothelial, and inflammatory cells to cancer establishment has been extensively studied (1). However, the comprehension of the real role of adipocytes in cancer environment is still poorly understood since adipocytes were mainly considered an energy storage depot until recently. Only recently, adipocytes started to be beheld as endocrine and inflammatory cells producing hormones, growth factors, cytokines, and other molecules such as adipokines (5). Moreover, early local tumor invasion results in immediate proximity of cancer cells to adipocytes in breast cancers (3). Hence,

TABLE 1 | Cellular composition of the tumor microenvironment and the implication of the cytokines secretion in the tumor development.

Cell type	Cytokines	Function
Classical macrophages (M1)	IL-1 β , IL-12, TNF- α	Proinflammatory M1 profile. It makes the environment prone to inflammation and tumor cells elimination can be triggered by secretion of IL-1 β , IL-12, and TNF- α cytokines
Alternative macrophages (M2)	IL-4, IL-10, TGF- β	Anti-inflammatory M2 profile. It maintains the tumor by cytokines secretion involved in tissue regeneration and remodeling, such as TGF- β , IL-10, IL-4, increasing the tumor cells viability, facilitating tissue invasion by tumor cells, and metastasis
Adipose cells	IL-6, IL-10, IL-13, IL-33, TGF- β , TNF- α	Adipose tissue can favor tumor growth and development by producing anti- and proinflammatory mediators in a deregulated manner. Proinflammatory cytokines, such as IL-6 and TNF- α , are secreted, promoting cell proliferation and angiogenesis. Other cytokines, such as IL-13, IL-10, and TGF- β are also produced and their role is to maintain the tumor, regenerating tissues, and inhibit anticancer immune cells recruitment
CD8+ T cells	IFN- γ	CD8+ T secrete large amounts of cytotoxic granules and IFN- γ , which polarizes macrophages into the proinflammatory M1 profile and inhibits Treg lymphocytes
CD4+ T and Treg cells	IL-10, TGF- β	These cells can assist in the suppression of other immune cells: IL-10 and TGF- β secretion inhibits antitumor NK and CD8+ T cells
Neutrophils	TGF- β , TNF- α , IL-4, IL-6, IL-1 β	Neutrophils have both pro- and antitumor functions. They help to maintain the M2 profile by producing IL-4 and TGF- β , which support the tumor cells growth. These cells can also play an anticancer role, secreting TNF- α , IL-6 and IL-1 β to prolong the CD8+ T population

adipocytes represent extraordinary candidates to regulate tumor behavior through heterotypic signaling processes.

The interaction of adipose tissue with tumor cells is widely described and characterized as poor prognosis. Adipose tissue is a very dynamic and complex tissue, mostly composed of adipocytes but it also contains macrophages, lymphocytes, endothelial cells, pericytes, and adipocyte progenitor cells. Cancer development and progression is improved by both adipocytes and stromal vascular cells in adipose tissue (11). The enhance of the adipose tissue, leading to a series of metabolic deregulations, is a key characteristic of obesity and a greater risk of cancer (12). It is known that inflammation is closely linked to obesity. Likewise, obesity is intimately related to cancer evolution. Thus, obesity, inflammation, and tumor comprise an important triangle that can orchestrate a critical modulation in tumor microenvironment through the action of its mainly players: adipocytes and macrophages.

Adipocytes produce inflammatory cytokines, such as TNF- α , IL-6, IL-1 β , and CCL2 (9, 13), which leads to directly inflammatory cell (e.g., lymphocytes and macrophages) recruitment, infiltration and accumulation in adipose tissue, and establishes a state of low grade chronic inflammation (14, 15). Macrophage infiltration was reduced in CCL2 knockout mice, or its receptor CCR2, as well as the obesity-induced inflammation in visceral adipose tissue (16, 17). Visceral adipose tissue from obese people are frequently associated with increased levels of CCL2, TNF- α , IL-1, IL-6, and inducible nitric oxide synthase (iNOS) (18). In subcutaneous fat pads, both macrophage recruitment and expression of CCL2 were elevated when mice was ovariectomized, suggesting that increase inflammation in postmenopausal breast tissue may be due to CCL2 (18). Moreover, the amount of CCL2 produced is increased due to recognition of cell-free DNA (cfDNA) from degenerate adipocytes. Obese mice showed an increase in cfDNA release leading to a higher accumulation of macrophages, which aggravates inflammation (10). In response to CCL2 and IL-1 β , recruited macrophages secrete CXCL12 in order to induce angiogenesis and support the expanding tissue (9).

Reactive oxygen species are also involved in the tumorigenic process. When a state of chronic inflammation is established in adipose tissue, the generation of ROS is observed (19). In low concentrations, ROS has mitogenic properties and can be considered as a tumor promoter (20).

Comparing adipose tissue macrophages (ATMs) and monocyte-derived macrophages (MDMs) from the same obese patients, ATM secreted soluble factors that induce inflammation and lipid accumulation in cancer cells (T47D and HT-29), but MDM did not. Additionally, functional clusters, such as cytokine-cytokine receptor interaction (particularly CXC chemokine) signaling, and cancer-related pathways are overexpressed only in ATM. Gene expression profiles of TAMs were more similar to ATM than MDM. Interestingly, MDM also acquired an ATM phenotype and modulated the secretion of factors by preadipocytes but not by mature adipocytes (21).

White adipose tissue from obese individuals present abundant crown-like structures (CLSs) which are constituted by infiltrating macrophages surrounding dead adipocytes. Enhanced rates of CLS in white adipose tissue are often associated with increased

production of the inflammatory mediators in obese individuals. Macrophages from CLS trigger adipocyte cell death, aggravating the tissue inflammatory condition and attracting more infiltrated macrophages to the tumor microenvironment (22). Additionally, obese adipose cells produce the nuclear protein high mobility group box 1 in large quantities (23), a danger signal that attracts and activates immune cells (24).

The initial factors that trigger chronic inflammation of adipose tissue in obesity are unclear. Evidence suggests it might be mediated by hypoxia, necrosis, increased secretion of immunomodulatory factors (such as cytokines, chemokines, hormones, and growth factor), lipolysis, and free-fatty acids release (25).

Tumor-associated adipocytes can be delipidated, shedding elements of adipose tissue into tumor microenvironment. Those adipocyte-derived elements can be used by cancer cells to promote tumor growth. TAA can potentially dedifferentiate into fibroblast-like cells. Free-fatty acids released by adipocytes can be used by cancer cells to fuel its growth and proliferation. In addition, free-fatty acids can activate and modulate other cells such as myocytes, macrophages, and vascular endothelial cells favoring the formation of protumorigenic microenvironment (4, 26). Likewise, CAFs, in conjunction with others stromal cells, promote tumor progression (27). Obese adipose tissue can regulate tumor development in different ways, either by providing energy *via* free-fatty acids or through adipokines, cytokines, or miRNAs. An increasing number of miRNAs has been associated with several diseases, such as cancer, diabetes, and obesity. Recently, Thomou et al. (28) which shows the ability of adipose tissue to regulate gene expression in other tissues through circulating exosomes containing miRNAs showing the enormous influence that adipose tissue can exerts on other tissues by directly silencing genes.

Malignant cells around adipose tissue secrete sufficient amounts of cytokines that will polarize macrophages to the M2 alternative profile, promoting the establishment of an environment more conducive to the development of a tumor (6). Macrophages tend to switch from an initial M1 profile to a later M2 profile (29). In obese mammary adipose tissue, macrophages showed a decreased IL-10 expression and increased iNOS and CD11c expression consistent with a M1 polarization phenotype, on the other hand, the cells showed an increase of CD206 expression, suggesting a mixed polarization phenotype in obese mammary glands (9). The coculture of adipocytes with macrophages (THP-1-derived cells) induces a shift of THP-1 macrophages to a M2 phenotype (30). Since in this experiment there was no contact between the cell types, the findings suggest that the crosstalk is mediated by soluble factors secreted by adipocytes promoting macrophage polarization.

Tumor-Associated Macrophages

The macrophages polarization occurs through different ligands that act modulating their metabolism. This macrophage plasticity is essential for the establishment of an antitumor immune system functionality. These cells can vary from a configuration that inhibit tumor growth and induce cell death (the classical M1 profile) to a configuration that stimulates cancer progression and tissue repair (the alternative M2 profile) (31).

Cancer development and progression are deeply regulated by immune system. It is known that the immune cells infiltration at the tumor site may affect the progression of malignancy and metastasis (32), where macrophages are the most abundant immune cells in the tumor microenvironment (33). Macrophages are characterized by their plasticity, flexibility and ability to integrate distinct signals from the microenvironment acquiring distinct phenotypes (34). In this context, macrophages can be divided into two subtypes: M1 macrophages, characterized as promoting Th1 response and strong microbicidal and tumoricidal activity; and M2 macrophages that promote Th2 response, tissue remodeling, immune tolerance, and tumor progression (35, 36).

Activated macrophage population phenotype can change occasionally. In obesity, for instance, there is a macrophage phenotype switch from M2 to M1 (37). Contrarily, tumor progression is often associated with macrophage phenotype changes from classically activated (M1) to alternatively activated (M2) (6). Macrophage plasticity occur in consequence of a dedifferentiation of the original cells back to their resting state or the migration of a new population of macrophages into the tissue site to replace the original cells. Other studies have indicated that changes in cell stimuli directly impact the macrophage polarization (M1 or M2) (38). Then, macrophages are capable of repolarizing in response to modifications in the local microenvironment, permitting them to shape the local inflammatory milieu to adjust to different sources of stimuli.

M1 macrophages are stimulated by microbial products or proinflammatory cytokines (IFN- γ and TNF- α) (34). M1 macrophages are known sources of proinflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12, and type I IFN; chemokines such as CXCL1-3, CXCL-5, and CXCL8-10; and high antigen presentation function, nitric oxide, and ROS generation (39). Classically activated macrophages are deeply involved in the recognition and destruction of cancer cells. After recognition by M1 macrophages, tumor cells can be killed through several mechanisms, which include contact-dependent phagocytosis and cytotoxicity (40).

M2 macrophages are anti-inflammatory cells which aid in the process of angiogenesis and tissue repair. These cells are characterized by the upregulation of Dectin-1, mannose receptor, scavenger receptors, CD163, CCR2, CXCR1, and CXCR2, in addition to the production of large quantities of IL-10 and other anti-inflammatory cytokines (35, 41). The expression of IL-10 by M2 macrophages promotes a Th2 response, and Th2 cells, in turn, upregulate the production of IL-3 and IL-4. Furthermore, M2 macrophages are not capable of efficient antigen presentation (42, 43). M2 macrophages have different subsets, each induced by a different set of molecules and different activation responses. For this, M2 macrophages can be further divided into subgroups called M2a, M2b, M2c, and M2d. M2a macrophages are induced by the Th2 cytokines, IL4 and IL13; their function is to activate Th2 response by producing IL-10, TGF- β , and IL-1ra, with the purpose of promoting type II inflammation to kill parasites. M2b cells are induced by immune complexes, lipopolysaccharides, IL-1R and TLRs ligands; they produce cytokines such as IL-1, IL-6, TNF- α , and IL-10, acting in the metastasis control, suppressing tumor growth and inducing a Th1 response. IL-10, TGF- β , and glucocorticoids can induce macrophages to

differentiate to M2c phenotype, which is involved in immune suppression, tissue repair, and matrix remodeling (34, 44). Recent research has demonstrated that TAMs exhibit functions like those of M2 macrophages and can be classified as M2d subtype. M2d or TAMs exhibit functions that may help tumor progression by allowing the growth of new blood vessels growth, which feeds the malignant mass of cells, further promoting their growth (45).

The most important characteristic of TAM is the ability to promote the establishment and progression of cancer. This promotion occurs through secretion of cytokines that can act directly on tumor cells or indirectly, by recruiting auxiliary cells. The alternative M2 configuration is the most abundant cell type present in the tumor microenvironment being directly related to inhibition of proinflammatory cell recruitment and inhibition of polarization to the classic M1 type (46).

Tumor cells produce cytokines responsible for the recruitment and polarization of macrophages to M2 profile such as IL-4, IL-10, IL-13, and TGF- β , as well as chemokines such as CCL2 (MCP-1), CCL3, and CCL14. When infiltrated, macrophages increase the expression of mannose and galactose receptors as well as the production of VEGF, cyclooxygenase-2 (COX-2)-derived prostaglandin E₂ (PGE₂), and IL-10, thus rendering the microenvironment against inflammation and favorable to tumor development (47). Moreover, TAM phenotype expresses Arg1 and TGF- β in order to recruit Th2 lymphocytes to the tumor site leading to an increase in IL-4 production and maintenance of the M2 population (7).

Tumor-associated macrophage cells have an immunosuppressive role inhibiting the antitumor response of T cells. At the site of the tumor, the high production of IL-10 derived from TAMs indirectly inhibits T cell activation by down regulating IL-12 production by dendritic cells, which, in turn, prevents the TCD8+ response. Furthermore, IL-10 and TGF- β production by TAM promotes induction of regulatory T cells that are installed locally and make the environment even more immunosuppressed (48).

Studies have shown that TAMs do more than rendering an anti-inflammatory microenvironment. TAMs are also related to cancer promotion, angiogenesis induction, as well as tumor cell migration and metastasis (45). Angiogenesis is the first step involved in the occurrence of metastasis. In addition to nourishing tumor mass, TAMs are present throughout the process. TAMs can reorganize the extracellular matrix. Among the list of proangiogenic growth factors secreted by TAMs, the following factors can be highlighted: epidermal growth factor, VEGF, platelet-derived growth factor, migration inhibitory factor, TNF- α , TGF- β , IL-8, and IL-1 β , thymidine phosphorylase, and the chemokines CCL2 and CXCL8 (49). These factors can induce the formation of a network in which tumor cells can benefit by receiving nutrients and migrating to other sites.

Monocytes/macrophages recruitment into tumor microenvironment is mainly controlled by cytokines, chemokines and growth factors produced by stromal and malignant cells (45) (**Figure 1**). Many cancers like breast (50), prostate (51), ovarian (52), and non-small lung cancers (53), use the release of CCL2 for recruitment and polarization of M2 macrophages (54). Others chemokines such as CXCL12, CXCL8, CXCL1, CXCL13, CCL4, CCL5 (55), CCL17, and CCL22 (56), have been identified in

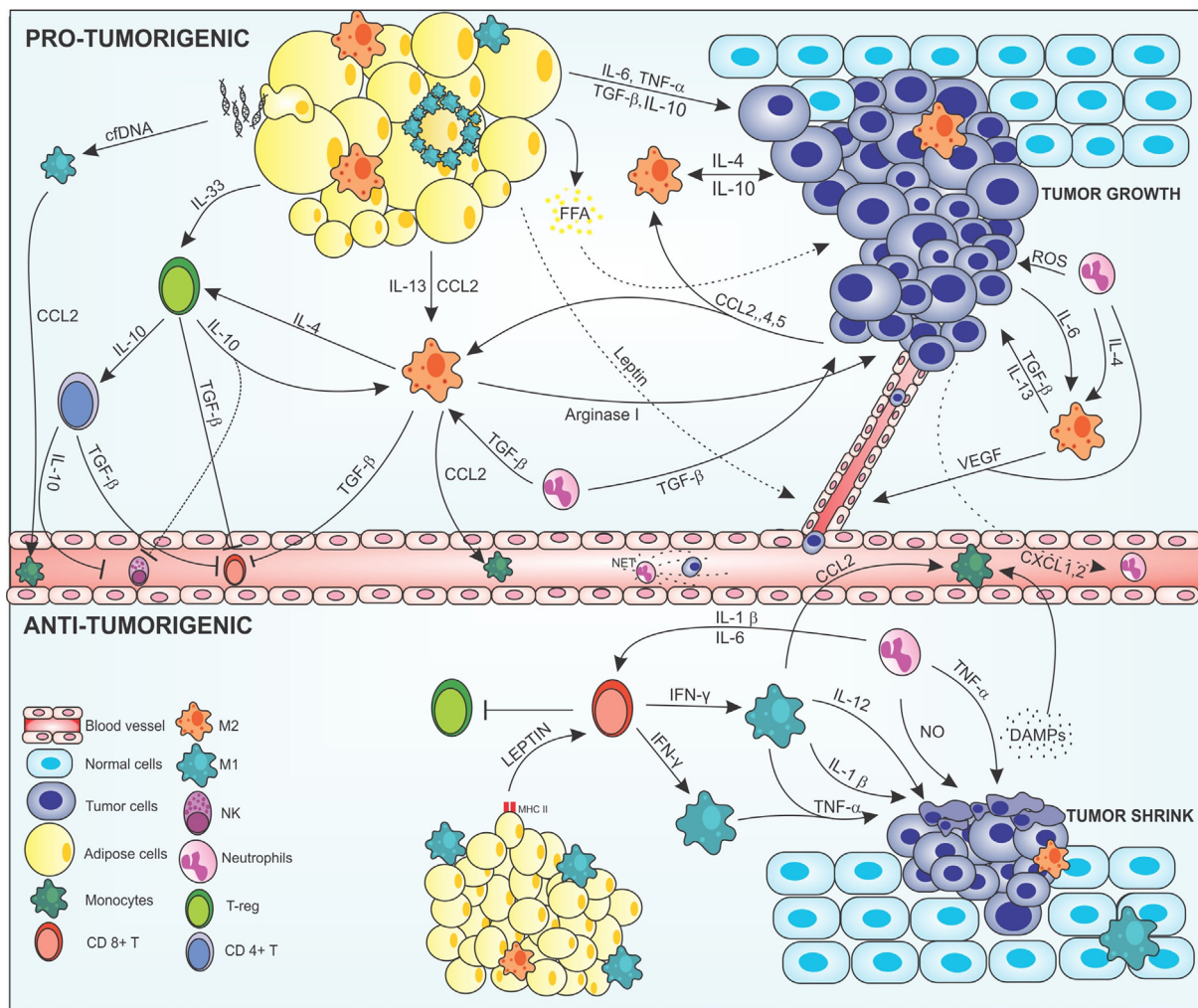


FIGURE 1 | Cross-talk between adipocytes, macrophages, and cancer cells modulating the tumor microenvironment. In the *protumorigenic* state, macrophages are attracted to the tumor site *via* chemokines, such as CCL-2, -4, and -5 produced by malignant cells, resident macrophages, and inflamed adipose tissue. Obese adipose tissue can favor tumor growth and development by producing anti- and proinflammatory mediators in a deregulated way. Proinflammatory cytokines, such as IL-6 and TNF- α , are secreted by adipose cells acting on the tumor modulating the Janus kinase/STAT pathway promoting cell proliferation and angiogenesis. Anti-inflammatory cytokines, such as IL-13, IL-10, and TGF- β are also produced by this tissue and maintain the tumor, regenerating tissues, and inhibiting the recruitment of immune anticancer cells. In addition, inflamed adipocytes produce leptin in large amounts, which act on epithelial cells leading to neovascularization, thus increasing tumor invasion. Degenerate adipose cells attract M1 macrophages that can form a crown-like structure around the inflamed adipose cell to eliminate them. This elimination can lead to FFA release that will nourish the tumor giving energetic support to the malignant cells. In addition, degenerate adipose cells release cfDNA that are recognized by macrophage TLR9 receptors, thus increasing the production of CCL2 in these cells, leading to increased recruitment of monocytes. Macrophages are attracted to the tumor microenvironment and polarized to the M2 alternative profile. Tumor cells produce IL-4, IL-10, and IL-6; adipose cells produce IL-13, IL-10, and TGF- β ; and neutrophils IL-4 and TGF- β polarizing and maintaining the macrophages in the M2 configuration. More macrophages are attracted into the microenvironment *via* CCL2, and help to maintain the tumor by producing cytokines that act on tissue regeneration, such as TGF- β , IL-10, IL-4, and arginase-1, increasing the viability of the tumor cells, leading to invasion and metastasis. The M2 configuration regulates the recruitment of immune cells, inhibiting the recruitment of CD8+ T and NK cells *via* TGF- β in addition to maintaining Treg cells by IL-4 production along with production of IL-33 produced by adipocytes. Treg cells act by maintaining the M2 configuration producing IL-10 and TGF- β which also activated CD4+ T activation. CD4+ T cells assist in the inhibition of anticancer cells through IL-10 and TGF- β secretion inactivating NK cells and CD8+ T cells. Neutrophils are also found in the tumor microenvironment. Cancer cells produce CXCL2 in large numbers, recruiting neutrophils that help maintain the M2 profile by producing IL-4 and TGF- β , which also help the growth of tumor cells. Tumor-associated neutrophils are responsible for increasing the mutagenic level of cells by the production of reactive oxygen species (ROS), which cause damage to the DNA of cells, in addition to M2 macrophages, to produce VEGF, and increasing angiogenesis. Neutrophils in blood vessels may form structures such as NETs that help malignant cells stabilize in place and enter the metastatic phase. In the *antitumorigenic* state, normal adipose cells secrete leptin which, together with MHCII, have acted in the recruitment of CD8+ T cells. CD8+ T secrete large amounts of IFN- γ polarizing macrophages into the proinflammatory M1 profile and inhibit Treg cells. M1-like cells act on the secretion of cytokines that have the function of making the surroundings more and more inflamed and destroy tumor cells, such as IL-1 β , IL-12, and TNF- α , and recruit more macrophages to the site *via* CCL2. Tumor cells, when destroyed, release DAMPs, which recruiting more macrophages and neutrophils into the site, which aid in inflammation secreting nitric oxide (NO) and causing severe damage to cells. Abbreviations: IFN- γ , interferon γ ; IL, interleukin; MHCII, class II major histocompatibility complex; TNF- α , tumor necrosis factor α ; TGF- β , transforming growth factor β ; CCL2, 4 and 5, chemokine (C-C motif) ligand 2, 4, and 5; CXCL2, chemokine (C-X-C motif); VEGF, vascular endothelial growth factor; NK, natural killer; T-reg, regulatory T cell; CD8 and CD4, cluster of differentiation 8 and 4; cfDNA, cell-free DNA; FFA, free-fatty acid.

neoplastic tissues as tumor cells products. Moreover, growth factors can be released by tumor cells, like VEGF, placental growth factor, and macrophage-colony stimulating factor (M-CSF). These have also been described as promoters of monocyte/macrophage recruitment (57, 58).

Tumor microenvironmental factors, such as leukemia inhibitory factor, IL-6, and M-CSF, were shown to promote TAM generation. IL-6 can activate the signal transducer and the activator of transcription 3 (STAT3), which is a signal transduction molecule that converges to many oncogenic signaling pathways, and controls the M2-polarization of macrophages as well (59). STAT3 is a constitutive activator in tumor cells (60) and is involved in the initiation and progression of epithelial ovarian carcinoma (61). IL-6/STAT3 pathway further regulates M2 macrophage polarization and promotes tumorigenesis (62).

Macrophage polarization in the tumor inflammatory microenvironment can be regulated by COX-2 and its downstream arachidonic acid metabolite product, PGE₂ (63). IL-6 can mediate COX-2 expression in a variety of tumors, including colorectal cancer (CRC) (64), breast cancer (65), melanoma (66) and prostate cancer (67); additionally, it induces PGE₂ production in mesenchymal stem cells, lung cancer, and cervical carcinoma (68, 69). Both molecules contribute to carcinogenesis by stimulating cancer cell proliferation, inhibiting apoptosis, increasing invasiveness, and modulating inflammation and immunity through the induced release of Th2 cytokines, such as IL-10, TGF- β , IL-4, and IL-13, by TAMs and the tumor cells (70).

Analysis of the molecular basis of the TAM phenotype has identified the transcriptional factors NF- κ B and hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) as central regulators of tumor progression and metastasis (71). NF- κ B activation is crucial for cancer-related inflammation and is associated with M1 macrophages during the early phase of tumorigenesis. However, at the late phase of tumorigenesis, macrophages are reprogrammed to TAMs or M2-like macrophages presenting low NF- κ B activation but increased immunosuppressive capacity (72). Hypoxia executes its effect on macrophages through two isoforms of HIF, HIF-1 α , and HIF2 (73). It was demonstrated that high lactic acid produced by tumor cells in this hypoxic environment has a critical function in signaling; specifically, it induces the expression of VEGF and produces hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) and HIF-2 α , which regulate the transcription of genes associated with angiogenesis. Moreover, recent studies also showed tumor hypoxia enhances non-small cell lung cancer metastasis by promoting macrophage M2 polarization through the activation of ERK signaling (29, 74).

Numerous miRNAs have been shown to be highly expressed in polarized macrophages, particularly, miRNA-155, miRNA-125, and miRNA-378 for M1 polarization also as miRNA-let-7c, miRNA-9, miRNA-21, miRNA-146, miRNA147, and miRNA-187 for M2 polarization (75, 76). New studies demonstrated a novel miR-155-mediated mechanism for promoting the M1 phenotype of macrophage polarization. Because miR-155-modified TAMs can regain tumor-killing capacity, this study provides a potential therapeutic approach in cancer treatment (77).

Malignant fibrous histiocytoma amplified sequence 1 (MFHAS1) is a predicted oncoprotein that demonstrates tumorigenic activity *in vivo* (78). In recent studies, it was detected a

positive association between MFHAS1 expression in TAMs and human CRC, where CRC cells induced M2 polarization of TAMs through MFHAS1 induction and subsequent STAT6 and KLF4 activation to promote CRC progress. Therefore, the role of MFHAS1 is a regulator of macrophages polarization and CRC development (79).

Macrophages may play an important role in a process called epithelial-mesenchymal transition (EMT). Studies demonstrated that M2-polarized TAMs promoted EMT in pancreatic cancer cells, suggesting a novel mechanism by which M2-polarized TAMs may contribute to the aggressive behavior of pancreatic cancer cells by TLR4/IL-10 signaling (80).

Modulation of Cancer Microenvironment As Pharmacological Therapy Target

Many factors can contribute to tumorigenesis, tumor progression, and metastasis. Amongst these, the tumor microenvironment is crucial when determining cellular behavior and secretion pattern. Macrophages present in the tumor microenvironment can display different phenotypes as a product of the cytokines they are exposed to. TAMs represent a prevalent hybrid population within tumor microenvironment which usually exhibit an M2-like phenotype (81). The tumor microenvironment and its components, TAMs and their M2-polarized characteristics included, have been extensively studied as therapeutic targets both in conventional treatments and innovative ones.

Morphine is a traditional opioid drug used in clinical practice for pain management of cancer patients. However, it has been discussed whether its effects boost or hinder tumor growth and metastatic behavior (82). Khabbazi et al. developed an approach to enlighten the role morphine treatment might play on the modulation of the tumor microenvironment. Macrophages RAW264.7 and bone marrow derived were polarized either using IL-4 or 4T1 breast cancer cells, as a paracrine communication, toward the M2 profile. Thus, there was a significant escalation in MMP-9 expression, which can uphold invasiveness and angiogenesis. Morphine was shown to prevent said increase, and, therefore, it was hypothesized that the drug might be able to inhibit matrix degradation in the tumor microenvironment. The opioid also lowered arginase-1 expression, which can also be beneficial since its activity boosts breast cancer cell proliferation (83, 84).

Along with new found mechanisms for commonly used drugs, intravenous immunoglobulin (IVIg) is a treatment licensed for a variety of chronic autoimmune diseases such as Kawasaki's disease and Idiopathic thrombocytopenia purpura, and used "off-label" for a number of other conditions (85). Studies show that IVIg can either have anti-inflammatory action (as expected in clinical practice) on M1 macrophages, or induce phenotype shift from M2 to M1. The drug can elicit either pro- or anti-inflammatory reactions, conditional to the state of macrophage polarization. It has been demonstrated that IVIg significantly hindered secretion of TNF- α , IL-12p40, and CCL2 after M1 macrophages were stimulated with LPS without, nonetheless, affecting their property to inhibit tumor growth. Curiously, when M2 macrophages received the same treatment, the expression of TNF- α , IL-12p40 was boosted. IVIg is now considered to be an

immunomodulatory agent, whose effects vary according to the status of the macrophages treated. Such modulatory properties can be extremely valuable in cancer treatments, for it has been demonstrated that IVIg halted tumor progression and metastasis in a model of tumor-associated myeloid cells (86). Another new discovery about an old ally is the evidence that administration of moderate doses of dopamine challenges tumor growth and contributes to vascular stabilization in a rat C6 glioma model. This new property found by Qin et al. can influence TAMs with M2 profile toward the M1 phenotype. Dopamine boosts vascular normalization in tumors by reprogramming M2 macrophages partly *via* dopamine receptor 2 and partly *via* downregulation of the VEGF/VEGFR2 pathway (87).

Moreover, regarding the immunomodulatory properties of substances which can promote polarization of macrophages, the research of Shiri and collaborators can also be highlighted. Their study used curcumin, a fat-soluble substance extracted from *Curcuma longa*, which was bioengineered to enhance its bioavailability into DNC-dendrossomal curcumin (88). The DNC formulation has promoted beneficial effects on a murine metastatic breast cancer model, providing an enhanced population of M1 macrophages in detriment of the M2 population (89).

Approved treatments are different in every country, depending on their culture and technological development. For instance, cantharidin is one active ingredient of blister beetles, which is used traditionally in China for cancer treatment (90). Due to toxicity, a demethylated molecule was engineered, the norcantharidin (NCTD), which is routinely used against hepatoma, colorectal carcinoma and breast cancer (91, 92). An interesting new found feature regarding NCTD is its ability to suppress tumor growth through conversion of M2 polarized macrophages to M1 phenotype in a model of murine hepatoma. TAMs extracted from murine tissue of hepatocellular carcinoma could prevent further tumor invasion. When the pathway was investigated, results suggested that the modulation of macrophage polarization by NCTD is somewhat mediated by miR-214 overexpression. TAMs from the same study showed downregulation of STAT3 phosphorylation, a mechanism that has been implicated in the shift of macrophage polarization from M2 to M1 in order to inhibit tumor growth and metastasis (93, 94). In fact, the STAT3 signaling pathway is now considered to be a crucial molecular target when it comes to pancreatic cancer. Arpin et al. have made that evident with their study using a 3D pancreatic ductal adenocarcinoma model and p-STAT3 inhibitors, which was effective even alongside CAFs. They suggest further study on STAT3 inhibition using the same model as an important tool to uncover alternative pathways to be explored in pancreatic cancer treatment (95).

One of the most traditional Chinese medicine, emodin is a natural anthraquinone obtained from *Rheum palmatum L* and other Chinese herbs (96). Interestingly, studies have confirmed that Emodin subdues breast cancer lung metastasis hindering the recruitment and polarization of macrophages toward M2 phenotype in metastatic lung cancer. The substance had no influence over the primary tumor growth, however. Noted, TAMs have a particular subpopulation called metastasis-associated macrophages, which can support metastatic growth (97–99). These cells are also a potential therapeutic target, since

metastasis is generally non-responsive to current treatments. Another finding is that the regulation Emodin exhibited over macrophage polarization is through the p-STAT6 and C/EBP β pathways (100).

The bioflavonoid Wogonin, isolated from *Scutellaria radix*, presents an antitumor properties based on its ability to modulate the tumor microenvironment. In previous studies, Wogonin showed activity through downregulation of MMP-9, which halted invasion of human breast carcinoma cells (101). Wogonin also prevented migration of A549 cells from human alveolar adenocarcinoma, which were used to study EMT, and, therefore, metastasis. The pathway involved in such response was once more *via* IL-6/STAT3, and Wogonin prevented the transition, which demonstrates its potential activity in metastasis (102).

Yet another plant extract shown to have modulation properties on macrophage polarization is isoliquiritigenin (ISL), a flavonoid from licorice. Is has been demonstrated that this substance acts in a chemo preventive manner *via* inhibition of M2 macrophage polarization, in a AOM/DSS-induced colitis-associated tumorigenesis (both *in vivo* and *in vitro*). In this case, the modulation occurs through downregulation of the interaction among IL-6 and PGE₂. Furthermore, the results also proved a diminished COX-2 expression after stimulation with ISL and a decreased presence of M2 markers such as arginase-1 and CD206 in the lineage macrophages. Evidence showed that ISL inhibited M2 polarization at least partially by the downregulation of the IL-6/STAT3 pathway (103).

Another innovative research regarding modulation of macrophage polarization are cancer vaccines made of *Listeria monocytogenes*. The bacteria are attenuated by deletion of virulence factors, for instance, ActA and Internalin B (Δ ActA/ Δ InIB) (104). Studies have indicated that treatment with this attenuated strain targets mainly TAMs and reprograms them from M2 phenotype to M1, which activates antitumor responses (105). Results showed that the antitumor function of reprogrammed TAMs was due to nitric oxide production *via* Nos2 (105, 106). This antitumor response mediated by iNOS in repolarized macrophages is so strong that even in the absence of NK cells and CD8 T cells, viability is still maintained (105).

On the other hand, nanotechnology has also been developed to respond to several new-found cancer targets. Carbosilane dendrimer 2G-03NN24 can cause polarization M2 to M1 polarization, decreasing the expression of several M2-related genes, which, in turn, increases the expression of M1 characteristics. These results were confirmed by functional assays, given the M1-oriented pro-inflammatory and antitumor responses (107). The mechanism involved inhibits phosphorylation of STAT3, which boosts the capacity of macrophages to promote cytotoxic response and presentation of tumor antigens (107, 108). Furthermore, it has been demonstrated that a system composed of gold nanoparticles adapted with MUC-1 protein fragment was capable of promoting macrophage activation and M1 polarization, characterized by increased antigen presentation and M1-like cytokine expression (109). This mucin glycoprotein, MUC-1 or CD227, has been found to be a target for cytotoxic T lymphocytes, and possibly for immunotherapy, hence its use in a possible cancer vaccine (109, 110). Of note, the impact of chemotherapy has been investigated

to ascertain what can influence recurrence of cancer. In a study of MCF-7 cells, after apoptosis induced by chemotherapy, there was activation of cancer stem-like cells (CD44+/CD24-) and upregulation of MUC-1 (111). Furthermore, it has been further demonstrated that, when macrophages were cocultured with MCF-7 cells suffering apoptosis, they secreted IL-6, activating STAT3 phosphorylation, and therefore performed a role on the activation of cancer stem cells and cancer promotion. Thus, there is accumulating evidence that blockage of the IL-6/STAT3 pathway is an interesting new approach for metastatic cancer after chemotherapy (112).

Regarding resistance to chemotherapy, there is an increasing body of evidence suggesting the inherent role of the tumor microenvironment in providing cancer cells with means to do so. In this matter, SFRP2 has been identified as Wnt pathway regulator secreted by fibroblasts and an active agonist of WNT16B, which intermediates cancer sensitivity to chemotherapy (113). It has been reported that SFRP2, secreted by stromal cells, triggers the canonical *Wnt* pathway and increases the WNT16B signaling, supporting resistance to chemotherapy. Furthermore, this effect can be abrogated by treatment with antibody as an adjuvant to the chemotherapy. Interestingly, this study considers WNT16B to be a novel biomarker to monitor the response of the tumor microenvironment to therapy (114).

Remarkably, it has increased the number of studies that emphasizes the crucial role of the crosstalk between the adipose tissue and cancer, as an important immunopharmacological target to tumor microenvironment, especially in breast cancer. Qin et al. explored that link by demonstrating the high fat diet cancer latency in C3(1)-Tag GEMMs, which is considered a coherent model to study basal-like breast cancer, was postponed by weight loss when the mice were swapped to low fat diet instead. These interventions could effectively prevent atypical ductal hyperplasia and ductal carcinoma *in situ* to the points observed in healthy mice. In the same study, the weight loss caused decreased activity of several kinases, which, in turn, caused abrogation of the MAPK pathway, which is related to tumor proliferation (115). Another study set out to explore this connection, studying breast cancer cells with overexpression of the HER-2 protein treated with trastuzumab, particularly regarding its ADCC mechanism, that is, the antibody-dependent cellular cytotoxicity. In this setting, it was demonstrated that not only adipocytes and preadipocytes prevented trastuzumab caused NK cell-tumor lysis *in vitro* but also adipose tissue abrogates the drug effect *in vivo* (116). Such effect can be expected once it has been reported that NK cell functions and characteristics can be swayed by the tumor microenvironment (117, 118). Interestingly, they not only display receptors for adipokines but also can have their cytotoxicity modulated by leptin and adiponectin (119, 120). Therefore, the results of Duong et al. suggest that factors expressed by the adipose tissue are responsible for decreasing the sensitivity of HER-2 expressing breast cancer cells to trastuzumab. However, despite testing for several adipokines such as leptin, adiponectin, IL-6, and TNF- α , none were able to account for the ADCC inhibition observed (116).

The investigation of the crosstalk between adipose tissue and breast cancer led to interesting findings, using 3T3-L1 adipocytes and 4T1 breast cancer cells as a model and aspirin as the intervention. It has been demonstrated that aspirin inhibited the proliferation and migration of 4T1 cells and blocked communication between the two cell types *in vitro*, effect observed by the decrease in MCP-1 and PAI-1 expression in the cultured supernatant. Therefore, aspirin is expected to suppress the proliferation of breast cancer cells in an environment shared with obesity (121).

Given the influence the adipose tissue has on cancer promotion, adipokines such as leptin are investigated to uncover their role on the matter. For instance, leptin and its receptor have been demonstrated to facilitate the interaction between cells from the tumor microenvironment, such as cancer-associated fibroblasts and adipocytes, and breast cancer stem cells (BCSCs). Both the pharmacological inhibition of leptin signaling and immunodepletion in the conditioned media used in the experiment both yielded the same result: decreased mammosphere formation in cells obtained from patients with metastatic breast cancer. Therefore, aiming for either leptin or signaling mediated by leptin receptor might eliminate BCSCs or even avert recurrences and metastasis completely in breast cancer patients (122). In a similar study considering the effect of leptin on TAMs and breast cancer cells, the adipokine has been shown to induce IL-18 expression on both, eventually leading the breast cancer cells to invasion and metastasis. In order to confirm the results, cells were co-incubated with IL-18 siRNA or IL-18BP-Fc chimeras and the effect of TAMs to promote migration and proliferation of breast cancer cells when stimulated by leptin was abrogated, thus proving the link between the process (123).

CONCLUSION

Adipocytes, macrophages, and tumor cells can orchestrate several signaling pathways that are crucial to the establishment of a microenvironment that can favor cancer progression. Immunomodulatory factors or free-fatty acids released by adipocytes in lipolysis process can fuel tumor cells proliferation, trigger macrophages activation and polarization and control the fate of cancer development. Adipocytes and macrophages regulate themselves, generating an anti-inflammatory tumor microenvironment, preventing immune antitumor response cells from reaching the cancer site. Thus, abundance of white adipocytes and TAM with M2 profile can indicate poor prognosis for patients. Hence, the intimate signaling pathways triggered by those cells can function as a valuable pharmacological target to develop more efficient cancer treatments and should be further explored.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

LC prepared the main body of the manuscript, figure, and the table. RC, CF, and LD wrote different sections of the manuscript. KM revised, wrote, and prepare the manuscript. All authors listed have made a substantial, direct, and intellectual contribution to the work and approved it for publication.

REFERENCES

- Adjei IM, Blanka S. Modulation of the tumor microenvironment for cancer treatment: a biomaterials approach. *J Funct Biomater* (2015) 6:81–103. doi:10.3390/jfb6010081
- Turley SJ, Cremasco V, Astarita JL. Immunological hallmarks of stromal cells in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* (2015) 15:669–82. doi:10.1038/nri3902
- Condeelis J, Pollard JW. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* (2006) 124:263–6. doi:10.1016/j.cell.2006.01.007
- Dirat B, Bochet L, Dabek M, Daviaud D, Dauvillier S, Majed B, et al. Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. *Cancer Res* (2011) 71:2455–65. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-3323
- Santander AM, Lopez-Ocejo O, Casas O, Agostini T, Sanchez L, Lamas-Basulto E, et al. Paracrine interactions between adipocytes and tumor cells recruit and modify macrophages to the mammary tumor microenvironment: the role of obesity and inflammation in breast adipose tissue. *Cancers (Basel)* (2015) 7:143–78. doi:10.3390/cancers7010143
- Sica A, Larghi P, Mancino A, Rubino L, Porta C, Totaro MG, et al. Macrophage polarization in tumour progression. *Semin Cancer Biol* (2008) 18:349–55. doi:10.1016/j.semcancer.2008.03.004
- Deng T, Lyon CJ, Bergin S, Caligiuri MA, Hsueh WA. Obesity, inflammation, and cancer. *Annu Rev Pathol* (2016) 11:421–49. doi:10.1146/annurev-pathol-012615-044359
- Dirat B, Bochet L, Escourrou G, Valet P, Muller C. Unraveling the obesity and breast cancer links: a role for cancer-associated adipocytes? *Endocr Dev* (2010) 19:45–52. doi:10.1159/000316896
- Arendt LM, McCreedy J, Keller PJ, Baker DD, Naber SP, Seewaldt V, et al. Obesity promotes breast cancer by CCL2-mediated macrophage recruitment and angiogenesis. *Cancer Res* (2013) 73:6080–93. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-0926
- Nishimoto S, Fukuda D, Higashikuni Y, Tanaka K, Hirata Y, Murata C, et al. Obesity-induced DNA released from adipocytes stimulates chronic adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Sci Adv* (2016) 2:e1501332. doi:10.1126/sciadv.1501332
- Park J, Morley TS, Kim M, Clegg DJ, Scherer PE. Obesity and cancer – mechanisms underlying tumour progression and recurrence. *Nat Rev Endocrinol* (2014) 10:455–65. doi:10.1038/nrendo.2014.94
- Iyengar NM, Gucalp A, Dannenberg AJ, Hudis CA. Obesity and cancer mechanisms: tumor microenvironment and inflammation. *J Clin Oncol* (2016) 34:4270–6. doi:10.1200/JCO.2016.67.4283
- Zeyda M, Stulnig TM. Adipose tissue macrophages. *Immunol Lett* (2007) 112:61–7. doi:10.1016/j.imlet.2007.07.003
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* (2003) 112:1796–808. doi:10.1172/JCI19246
- Sartipy P, Loskutoff DJ. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2003) 100:7265–70. doi:10.1073/pnas.1133870100
- Weisberg SP, Hunter D, Huber R, Lemieux J, Slaymaker S, Vaddi K, et al. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest* (2006) 116:115–24. doi:10.1172/JCI24335
- Kanda H. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest* (2006) 116:1494–505. doi:10.1172/JCI26498
- Rogers NH, Perfield JW, Strissel KJ, Obin MS, Greenberg AS. Reduced energy expenditure and increased inflammation are early events in the development of ovariectomy-induced obesity. *Endocrinology* (2009) 150:2161–8. doi:10.1210/en.2008-1405
- Kim YJ, Kim E-H, Hahm KB. Oxidative stress in inflammation-based gastrointestinal tract diseases: challenges and opportunities. *J Gastroenterol Hepatol* (2012) 27:1004–10. doi:10.1111/j.1440-1746.2012.07108.x
- Ziech D, Franco R, Pappa A, Panayiotidis ML. Reactive oxygen species (ROS)-induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis. *Mutat Res* (2011) 711:167–73. doi:10.1016/j.mrfmmm.2011.02.015
- Mayi TH, Daoudi M, Derudas B, Gross B, Bories G, Wouters K, et al. Human adipose tissue macrophages display activation of cancer-related pathways. *J Biol Chem* (2012) 287:21904–13. doi:10.1074/jbc.M111.315200
- Boutens L, Stienstra R. Adipose tissue macrophages: going off track during obesity. *Diabetologia* (2016) 59:879–94. doi:10.1007/s00125-016-3904-9
- Gunasekaran MK, Viranaicken W, Girard AC, Festy F, Cesari M, Roche R, et al. Inflammation triggers high mobility group box 1 (HMGB1) secretion in adipose tissue, a potential link to obesity. *Cytokine* (2013) 64:103–11. doi:10.1016/j.cyto.2013.07.017
- Shang D, Peng T, Gou S, Li Y, Wu H, Wang C, et al. High mobility group box protein 1 boosts endothelial albumin transcytosis through the RAGE/Src/Caveolin-1 pathway. *Sci Rep* (2016) 6:32180. doi:10.1038/srep32180
- Dalmas E, Clément K, Guerre-Millo M. Defining macrophage phenotype and function in adipose tissue. *Trends Immunol* (2011) 32:307–14. doi:10.1016/j.it.2011.04.008
- Andarawewa KL, Motrescu ER, Chenard MP, Gansmuller A, Stoll I, Tomasetto C, et al. Stromelysin-3 is a potent negative regulator of adipogenesis participating to cancer cell-adipocyte interaction/crosstalk at the tumor invasive front. *Cancer Res* (2005) 65:10862–71. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1231
- Motrescu ER, Rio M-C. Cancer cells, adipocytes and matrix metalloproteinase 11: a vicious tumor progression cycle. *Biol Chem* (2008) 389:1037–41. doi:10.1515/BC.2008.110
- Thomou T, Mori MA, Dreyfuss JM, Konishi M, Sakaguchi M, Wolfrum C, et al. Adipose-derived circulating miRNAs regulate gene expression in other tissues. *Nature* (2017) 542:450–5. doi:10.1038/nature21365
- Colegio OR, Chu N-Q, Szabo AL, Chu T, Rhebergen AM, Jairam V, et al. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature* (2014) 513:559–63. doi:10.1038/nature13490
- Spencer M, Yao-Borengasser A, Unal R, Rasouli N, Gurley CM, Zhu B, et al. Adipose tissue macrophages in insulin-resistant subjects are associated with collagen VI and fibrosis and demonstrate alternative activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* (2010) 299:E1016–27. doi:10.1152/ajpendo.00329.2010
- Italiani P, Boraschi D. From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation. *Front Immunol* (2014) 5:514. doi:10.3389/fimmu.2014.00514
- Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* (2010) 140:883–99. doi:10.1016/j.cell.2010.01.025
- Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* (2010) 141:39–51. doi:10.1016/j.cell.2010.03.014
- Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* (2012) 122:787–95. doi:10.1172/JCI59643
- Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* (2005) 5:953–64. doi:10.1038/nri1733
- Mantovani A, Germano G, Marchesi F, Locatelli M, Biswas SK. Cancer-promoting tumor-associated macrophages: new vistas and open questions. *Eur J Immunol* (2011) 41:2522–5. doi:10.1002/eji.201141894
- Suganami T, Ogawa Y. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. *J Leukoc Biol* (2010) 88:33–9. doi:10.1189/jlb.0210072
- Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* (2008) 8:958–69. doi:10.1038/nri2448
- Verreck FAW, de Boer T, Langenberg DML, Hoeve MA, Kramer M, Vaisberg E, et al. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2004) 101:4560–5. doi:10.1073/pnas.0400983101
- Sinha P, Clements V, Ostrand-Rosenberg S. Reduction of myeloid-derived suppressor cells and induction of M1 macrophages facilitate the rejection of established metastatic disease. *J Immunol* (2005) 174:636–45. doi:10.4049/jimmunol.174.2.636
- Wang N, Liang H, Zen K. Molecular mechanisms that influence the macrophage M1–M2 polarization balance. *Front Immunol* (2014) 5:614. doi:10.3389/fimmu.2014.00614
- Noël W, Raes G, Ghassabeh GH, De Baetselier P, Beschin A. Alternatively activated macrophages during parasite infections. *Trends Parasitol* (2004) 20:126–33. doi:10.1016/j.pt.2004.01.004
- Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2

- mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* (2002) 23:549–55. doi:10.1016/S1471-4906(02)02302-5
44. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* (2014) 41:14–20. doi:10.1016/j.immuni.2014.06.008
 45. Chanmee T, Ontong P, Konno K, Itano N. Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers (Basel)* (2014) 6:1670–90. doi:10.3390/cancers6031670
 46. Röszer THP. Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms. *Mediators Inflamm* (2015) 2015: 816460. doi:10.1155/2015/816460
 47. Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity* (2015) 41:49–61. doi:10.1016/j.immuni.2014.06.010. Tumor-associated
 48. Williams CB, Yeh ES, Soloff AC. Tumor-associated macrophages: unwitting accomplices in breast cancer malignancy. *NPJ Breast Cancer* (2016) 2:15025. doi:10.1038/nnpjbcancer.2015.25
 49. Riabov V, Gudima A, Wang N, Mickley A, Orekhov A, Kzhyshkowska J. Role of tumor associated macrophages in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. *Front Physiol* (2014) 5:75. doi:10.3389/fphys.2014.00075
 50. Qian B, Li J, Zhang H, Kitamura T, Zhang J, Liang R, et al. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast tumor metastasis. *Nature* (2012) 475:222–5. doi:10.1038/nature10138. CCL2
 51. Mizutani K, Sud S, McGregor NA, Martinovski G, Rice BT, Craig MJ, et al. The chemokine CCL2 increases prostate tumor growth and bone metastasis through macrophage and osteoclast recruitment. *Neoplasia* (2009) 11: 1235–42. doi:10.1593/neo.09988
 52. Negus RP, Stamp GW, Relf MG, Burke F, Malik ST, Bernasconi S, et al. The detection and localization of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in human ovarian cancer. *J Clin Invest* (1995) 95:2391–6. doi:10.1172/JCI117933
 53. Arenberg DA, Keane MP, DiGiorgio B, Kunkel SL, Strom SRB, Burdick MD, et al. Macrophage infiltration in human non-small-cell lung cancer: the role of CC chemokines. *Cancer Immunol Immunother* (2000) 49:63–70. doi:10.1007/s002620050603
 54. Gu L, Tseng S, Horner RM, Tam C, Loda M, Rollins BJ. Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. *Nature* (2000) 404:407–11. doi:10.1038/35006097
 55. Azenshtein E, Luboshits G, Shina S. The CC chemokine RANTES in breast carcinoma progression: regulation of expression and potential mechanisms of promalignant activity. *Cancer Res* (2002) 62:1093–102.
 56. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* (2001) 357:539–45. doi:10.1016/S0140-6736(00)04046-0
 57. Lin EY, Nguyen AV, Russell RG, Pollard JW. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J Exp Med* (2001) 193:727–40. doi:10.1084/jem.193.6.727
 58. Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res* (2006) 66:605–12. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4005
 59. Silver DL, Naora H, Liu J, Cheng W, Montell DJ. Activated signal transducer and activator of transcription (STAT) 3: localization in focal adhesions and function in ovarian cancer cell motility. *Cancer Res* (2004) 64:3550–8. doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-3959
 60. Yu H, Kortylewski M, Pardoll D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* (2007) 7:41–51. doi:10.1038/nri1995
 61. Duan Z, Foster R, Bell DA, Mahoney J, Wolak K, Vaidya A, et al. Signal transducers and activators of transcription 3 pathway activation in drug-resistant ovarian cancer. *Clin Cancer Res* (2006) 12:5055–63. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0861
 62. Takaishi K, Komohara Y, Tashiro H, Ohtake H, Nakagawa T, Katabuchi H, et al. Involvement of M2-polarized macrophages in the ascites from advanced epithelial ovarian carcinoma in tumor progression via Stat3 activation. *Cancer Sci* (2010) 101:2128–36. doi:10.1111/j.1349-7006.2010.01652.x
 63. Vendramini-Costa DB, Carvalho JE. Molecular link mechanisms between inflammation and cancer. *Curr Pharm Des* (2012) 18:3831–52. doi:10.2174/138161212802083707
 64. Seno H, Oshima M, Ishikawa TO, Oshima H, Takaku K, Chiba T, et al. Cyclooxygenase 2- and prostaglandin E2 receptor EP2-dependent angiogenesis in Apc Δ 716 mouse intestinal polyps. *Cancer Res* (2002) 62:506–11.
 65. Li H, Yang B, Huang J, Lin Y, Xiang T, Wan J, et al. Cyclooxygenase-2 in tumor-associated macrophages promotes breast cancer cell survival by triggering a positive-feedback loop between macrophages and cancer cells. *Oncotarget* (2015) 6:29637–50. doi:10.18632/oncotarget.4936
 66. Bianchini F, Massi D, Marconi C, Franchi A, Baroni G, Santucci M, et al. Expression of cyclo-oxygenase-2 in macrophages associated with cutaneous melanoma at different stages of progression. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* (2007) 83:320–8. doi:10.1016/j.prostaglandins.2007.03.003
 67. Tsai CS, Chen FH, Wang CC, Huang HL, Jung SM, Wu CJ, et al. Macrophages from irradiated tumors express higher levels of iNOS, arginase-I and COX-2, and promote tumor growth. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (2007) 68:499–507. doi:10.1016/j.ijrobp.2007.01.041
 68. Liu L, Ge D, Ma L, Mei J, Liu S, Zhang Q, et al. Interleukin-17 and prostaglandin E2 are involved in formation of an M2 macrophage-dominant microenvironment in lung cancer. *J Thorac Oncol* (2012) 7:1091–100. doi:10.1097/JTO.0b013e3182542752
 69. Heusinkveld M, de Vos van Steenwijk PJ, Goedemans R, Ramwadhoebe TH, Gorter A, Welters MJP, et al. M2 macrophages induced by prostaglandin E2 and IL-6 from cervical carcinoma are switched to activated M1 macrophages by CD4+ Th1 cells. *J Immunol* (2011) 187:1157–65. doi:10.4049/jimmunol.1100889
 70. Chen EP, Smyth EM. COX-2 and PGE2-dependent immunomodulation in breast cancer. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* (2011) 96:14–20. doi:10.1016/j.prostaglandins.2011.08.005
 71. Sica A, Bronte V. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *J Clin Invest* (2007) 117:1155–66. doi:10.1172/JCI31422
 72. Biswas SK, Gangi L, Paul S, Schioppa T, Saccani A, Sironi M, et al. A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF- κ B and enhanced IRF-3/STAT1 activation). *Blood* (2006) 107:2112–22. doi:10.1182/blood-2005-01-0428
 73. Intiyaz HZ, Simon MC. Hypoxia-inducible factors as essential regulators of inflammation. *Curr Top Microbiol Immunol* (2010) 345:105–20. doi:10.1007/82-2010-74
 74. Zhang J, Cao J, Ma S, Dong R, Meng W, Ying M. Tumor hypoxia enhances non-small cell lung cancer metastasis by selectively promoting macrophage M2 polarization through the activation of ERK signaling. *Oncotarget* (2014) 5:9664–77.
 75. Mazumder A, Bose M, Chakraborty A, Chakrabarti S, Bhattacharyya SN. A transient reversal of miRNA-mediated repression controls macrophage activation. *EMBO Rep* (2013) 14:1008–16. doi:10.1038/embor.2013.149
 76. Essandoh K, Li Y, Huo J, Fan GC. miRNA-mediated macrophage polarization and its potential role in the regulation of inflammatory response. *Shock* (2016) 46:122–31. doi:10.1097/shk.0000000000000604
 77. Cai X, Yin Y, Li N, Zhu D, Zhang J, Zhang CY, et al. Letter to the editor re-polarization of tumor-associated macrophages to pro-inflammatory M1 macrophages. *J Mol Cell Biol* (2012) 4:341–3. doi:10.1093/jmcb/mjs044
 78. Dihanich S. MASL1: a neglected ROCCO protein. *Biochem Soc Trans* (2012) 40:1090–4. doi:10.1042/BST20120127
 79. Chen W, Xu Y, Zhong J, Wang H, Weng M, Cheng Q, et al. MFHAS1 promotes colorectal cancer progress by regulating polarization of tumor-associated macrophages via STAT6 signaling pathway. *Oncotarget* (2016) 7:78726–35. doi:10.18632/oncotarget.12807
 80. Liu CY, Xu JY, Shi XY, Huang W, Ruan TY, Xie P, et al. M2-polarized tumor-associated macrophages promoted epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells, partially through TLR4/IL-10 signaling pathway. *Lab Invest* (2013) 93:844–54. doi:10.1038/labinvest.2013.69
 81. Chen P, Bonaldo P. Role of macrophage polarization in tumor angiogenesis and vessel normalization. Implications for new anticancer therapies. *Int Rev Cell Mol Biol* (2013) 301:1–35. doi:10.1016/B978-0-12-407704-1.00001-4
 82. Afsharimani B, Cabot P, Parat M-O. Morphine and tumor growth and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* (2011) 30:225–38. doi:10.1007/s10555-011-9285-0
 83. Chang CI, Liao JC, Kuo L. Macrophage arginase promotes tumor cell growth and suppresses nitric oxide-mediated tumor cytotoxicity. *Cancer Res* (2001) 61:1100–6.
 84. Khabbazi S, Goumon Y, Parat M-O. Morphine modulates interleukin-4- or breast cancer cell-induced pro-metastatic activation of macrophages. *Sci Rep* (2015) 5:11389. doi:10.1038/srep11389

85. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Anti-inflammatory actions of intravenous immunoglobulin. *Annu Rev Immunol* (2008) 26:513–33. doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090232
86. Dominguez-Soto A, de las Casas-Engel M, Bragado R, Medina-Echeverz J, Aragoneses-Fenoll L, Martin-Gayo E, et al. Intravenous immunoglobulin promotes antitumor responses by modulating macrophage polarization. *J Immunol* (2014) 193:5181–9. doi:10.4049/jimmunol.1303375
87. Qin T, Wang C, Chen X, Duan C, Zhang X, Zhang J, et al. Dopamine induces growth inhibition and vascular normalization through reprogramming M2-polarized macrophages in rat C6 glioma. *Toxicol Appl Pharmacol* (2015) 286:112–23. doi:10.1016/j.taap.2015.03.021
88. Alizadeh AM, Khaniki M, Azizian S, Mohagheghi MA, Sadeghizadeh M, Najafi F. Chemoprevention of azoxymethane-initiated colon cancer in rat by using a novel polymeric nanocarrier – curcumin. *Eur J Pharmacol* (2012) 689:226–32. doi:10.1016/j.ejphar.2012.06.016
89. Shiri S, Alizadeh AM, Baradaran B, Farhanghi B, Shanehbandi D, Khodayari S, et al. Dendrosomal curcumin suppresses metastatic breast cancer in mice by changing m1/m2 macrophage balance in the tumor microenvironment. *Asian Pac J Cancer Prev* (2015) 16:3917–22. doi:10.7314/APJCP.2015.16.9.3917
90. Rauh R, Kahl S, Boechzelt H, Bauer R, Kaina B, Efferth T. Molecular biology of cantharidin in cancer cells. *Chin Med* (2007) 2:8. doi:10.1186/1749-8546-2-8
91. Chen Y-N, Chen J-C, Yin S-C, Wang G-S, Tsauer W, Hsu S-F, et al. Effector mechanisms of norcantharidin-induced mitotic arrest and apoptosis in human hepatoma cells. *Int J Cancer* (2002) 100:158–65. doi:10.1002/ijc.10479
92. Yeh C-B, Hsieh M-J, Hsieh Y-H, Chien M-H, Chiou H-L, Yang S-F. Antimetastatic effects of norcantharidin on hepatocellular carcinoma by transcriptional inhibition of MMP-9 through modulation of NF- κ B activity. *PLoS One* (2012) 7:e31055. doi:10.1371/journal.pone.0031055
93. Zhang X, Tian W, Cai X, Wang X, Dang W, Tang H, et al. Hydrazinocurcumin encapsulated nanoparticles “re-educate” tumor-associated macrophages and exhibit anti-tumor effects on breast cancer following STAT3 suppression. *PLoS One* (2013) 8:e65896. doi:10.1371/journal.pone.0065896
94. Lu S, Gao Y, Huang X, Wang X. Cantharidin exerts anti-hepatocellular carcinoma by Mir-214 modulating macrophage polarization. *Int J Biol Sci* (2014) 10:415–25. doi:10.7150/ijbs.8002
95. Arpin CC, Mac S, Jiang Y, Cheng H, Grimard M, Page BDG, et al. Applying small molecule signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3) protein inhibitors as pancreatic cancer therapeutics. *Mol Cancer Ther* (2016) 15:794–805. doi:10.1158/1535-7163.MCT-15-0003
96. Shang XY, Yuan ZB. Determination of six effective components in Rheum by cyclodextrin modified micellar electrokinetic chromatography. *Yao Xue Xue Bao* (2002) 37:798–801.
97. Qian B-Z, Li J, Zhang H, Kitamura T, Zhang J, Campion LR, et al. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* (2011) 475:222–5. doi:10.1038/nature10138
98. Qian B, Deng Y, Im JH, Muschel RJ, Zou Y, Li J, et al. A distinct macrophage population mediates metastatic breast cancer cell extravasation, establishment and growth. *PLoS One* (2009) 4:e6562. doi:10.1371/journal.pone.0006562
99. Said N, Smith S, Sanchez-Carbayo M, Theodorescu D. Tumor endothelin-1 enhances metastatic colonization of the lung in mouse xenograft models of bladder cancer. *J Clin Invest* (2011) 121:132–47. doi:10.1172/JCI42912
100. Jia X, Yu F, Wang J, Iwanowycz S, Saaoud F, Wang Y, et al. Emodin suppresses pulmonary metastasis of breast cancer accompanied with decreased macrophage recruitment and M2 polarization in the lungs. *Breast Cancer Res Treat* (2014) 148:291–302. doi:10.1007/s10549-014-3164-7
101. Chen P, Lu N, Ling Y, Chen Y, Hui H, Lu Z, et al. Inhibitory effects of wogonin on the invasion of human breast carcinoma cells by downregulating the expression and activity of matrix metalloproteinase-9. *Toxicology* (2011) 282:122–8. doi:10.1016/j.tox.2011.01.018
102. Zhao Y, Yao J, Wu X-P, Zhao L, Zhou Y-X, Zhang Y, et al. Wogonin suppresses human alveolar adenocarcinoma cell A549 migration in inflammatory microenvironment by modulating the IL-6/STAT3 signaling pathway. *Mol Carcinog* (2015) 54:E81–93. doi:10.1002/mc.22182
103. Zhao H, Zhang X, Chen X, Li Y, Ke Z, Tang T, et al. Isoliquiritigenin, a flavonoid from licorice, blocks M2 macrophage polarization in colitis-associated tumorigenesis through downregulating PGE2 and IL-6. *Toxicol Appl Pharmacol* (2014) 279:311–21. doi:10.1016/j.taap.2014.07.001
104. Brockstedt DG, Giedlin MA, Leong ML, Bahjat KS, Gao Y, Luckett W, et al. Listeria-based cancer vaccines that segregate immunogenicity from toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2004) 101:13832–7. doi:10.1073/pnas.0406035101
105. Lizotte PH, Baird JR, Stevens CA, Lauer P, Green WR, Brockstedt DG, et al. Attenuated *Listeria monocytogenes* reprograms in ovarian cancer leading to iNOS-mediated tumor cell lysis. *Oncimmunology* (2014) 3:e28926. doi:10.4161/onci.28926
106. Spear P, Barber A, Rynda-Apple A, Sentman CL. Chimeric antigen receptor T cells shape myeloid cell function within the tumor microenvironment through IFN- γ and GM-CSF. *J Immunol* (2012) 188:6389–98. doi:10.4049/jimmunol.1103019
107. Perisé-Barríos AJ, Gómez R, Corbí AL, de la Mata J, Domínguez-Soto A, Muñoz-Fernández MA. Use of carboxilane dendrimer to switch macrophage polarization for the acquisition of antitumor functions. *Nanoscale* (2015) 7:3857–66. doi:10.1039/C4NR04038D
108. Cheng F, Wang H-W, Cuenca A, Huang M, Ghansah T, Brayer J, et al. A critical role for Stat3 signaling in immune tolerance. *Immunity* (2003) 19:425–36. doi:10.1016/S1074-7613(03)00232-2
109. Mocan T, Matea C, Tabaran F, Iancu C, Orasan R, Mocan L. In vitro administration of gold nanoparticles functionalized with MUC-1 protein fragment anticancer vaccine response via macrophage activation and polarization mechanism. *J Cancer* (2015) 6:583–92. doi:10.7150/jca.11567
110. Drake CG, Lipson EJ, Brahmer JR. Breathing new life into immunotherapy: review of melanoma, lung and kidney cancer. *Nat Rev Clin Oncol* (2014) 11:24–37. doi:10.1038/nrclinonc.2013.208
111. Zhou N, Wang R, Zhang Y, Lei Z, Zhang X, Hu R, et al. Staurosporine induced apoptosis may activate cancer stem-like cells (CD44(+)/CD24(-)) in MCF-7 by upregulating Mucin1 and EpCAM. *J Cancer* (2015) 6:1049–57. doi:10.7150/jca.12501
112. Zhou N, Zhang Y, Zhang X, Lei Z, Hu R, Li H, et al. Exposure of tumor-associated macrophages to apoptotic MCF-7 cells promotes breast cancer growth and metastasis. *Int J Mol Sci* (2015) 16:11966–82. doi:10.3390/ijms160611966
113. Östman A. The tumor microenvironment controls drug sensitivity. *Nat Med* (2012) 18:1332–4. doi:10.1038/nm.2938
114. Sun Y, Zhu D, Chen F, Qian M, Wei H, Chen W, et al. SFRP2 augments WNT16B signaling to promote therapeutic resistance in the damaged tumor microenvironment. *Oncogene* (2016) 35:4321–34. doi:10.1038/ncr.2015.494
115. Qin Y, Sundaram S, Essaid L, Chen X, Miller SM, Yan F, et al. Weight loss reduces basal-like breast cancer through kinase reprogramming. *Cancer Cell Int* (2016) 16:26. doi:10.1186/s12935-016-0300-y
116. Duong MN, Cleret A, Matera E-L, Chettab K, Mathé D, Valsesia-Wittmann S, et al. Adipose cells promote resistance of breast cancer cells to trastuzumab-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Breast Cancer Res* (2015) 17:57. doi:10.1186/s13058-015-0569-0
117. Mamessier E, Sylvain A, Thibault M-L, Houvenaeghel G, Jacquemier J, Castellano R, et al. Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. *J Clin Invest* (2011) 121:3609–22. doi:10.1172/JCI45816
118. Saito H, Osaki T, Ikeguchi M. Decreased NKG2D expression on NK cells correlates with impaired NK cell function in patients with gastric cancer. *Gastric Cancer* (2012) 15:27–33. doi:10.1007/s10120-011-0059-8
119. Zhao Y, Sun R, You L, Gao C, Tian Z. Expression of leptin receptors and response to leptin stimulation of human natural killer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* (2003) 300:247–52. doi:10.1016/S0006-291X(02)02838-3
120. Kim K-Y, Kim JK, Han SH, Lim J-S, Kim KI, Cho DH, et al. Adiponectin is a negative regulator of NK cell cytotoxicity. *J Immunol* (2006) 176:5958–64. doi:10.4049/jimmunol.176.10.5958

121. Hsieh C-C, Huang Y-S. Aspirin breaks the crosstalk between 3T3-L1 adipocytes and 4T1 breast cancer cells by regulating cytokine production. *PLoS One* (2016) 11:e0147161. doi:10.1371/journal.pone.0147161
122. Giordano C, Chemi F, Panza S, Barone I, Bonofiglio D, Lanzino M, et al. Leptin as a mediator of tumor-stromal interactions promotes breast cancer stem cell activity. *Oncotarget* (2016) 7:1262–75. doi:10.18632/oncotarget.6014
123. Li K, Wei L, Huang Y, Wu Y, Su M, Pang X, et al. Leptin promotes breast cancer cell migration and invasion via IL-18 expression and secretion. *Int J Oncol* (2016) 48:2479–87. doi:10.3892/ijo.2016.3483

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Corrêa, Corrêa, Farinasso, de Sant'Ana Dourado and Magalhães. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Review

The Impact of the Adipose Organ Plasticity on Inflammation and Cancer Progression

Luís Henrique Corrêa , Gabriella Simões Heyn  and Kelly Grace Magalhaes * 

Laboratory of Immunology and Inflammation, Department of Cell Biology, University of Brasilia, Brasilia 70910-900, Brazil

* Correspondence: kellymagalhaes@unb.br; Tel.: +55-61-3107-3099/3103

Received: 2 May 2019; Accepted: 22 June 2019; Published: 30 June 2019



Abstract: Obesity is characterized by chronic and low-grade systemic inflammation, an increase of adipose tissue, hypertrophy, and hyperplasia of adipocytes. Adipose tissues can be classified into white, brown, beige and pink adipose tissues, which display different regulatory, morphological and functional characteristics of their adipocyte and immune cells. Brown and white adipocytes can play a key role not only in the control of energy homeostasis, or through the balance between energy storage and expenditure, but also by the modulation of immune and inflammatory responses. Therefore, brown and white adipocytes can orchestrate important immunological crosstalk that may deeply impact the tumor microenvironment and be crucial for cancer establishment and progression. Recent works have indicated that white adipose tissues can undergo a process called browning, in which an inducible brown adipocyte develops. In this review, we depict the mechanisms involved in the differential role of brown, white and pink adipocytes, highlighting their structural, morphological, regulatory and functional characteristics and correlation with cancer predisposition, establishment, and progression. We also discuss the impact of the increased adiposity in the inflammatory and immunological modulation. Moreover, we focused on the plasticity of adipocytes, describing the molecules produced and secreted by those cells, the modulation of the signaling pathways involved in the browning phenomena of white adipose tissue and its impact on inflammation and cancer.

Keywords: brown adipose tissue; white adipose tissue; pink adipose tissue; browning; cancer

1. Introduction

There is a strong correlation of cancer and obesity [1–3]. Considering the widespread occurrence of obesity and associated diseases, such as several types of cancer [4], numerous efforts are ongoing to lower the body weight gain through modulating the energy intake and/or expenditure [5]. It has been demonstrated that intentional weight loss can be an important tool to prevent cancer incidence [6–9].

Obesity is characterized by a chronic low-grade inflammation, and during the weight loss-process several changes in adipose organ can occur and modify the tissue's composition and function, also remodeling of the immune cell landscape [10]. Weight loss can increase the presence of brown-like adipocytes in subcutaneous white adipose tissue, a process also known as browning or beiging [11], and this may have a significant impact in tumor microenvironment [12]. White adipose tissue from individuals with obesity can secrete a variety of inflammatory molecules that can strongly fuel cancer. Whereas brown adipose tissue can a therapeutic potential against cancer [13]. Cancer cell biology is directly affected by multiple cellular players present in the adipose tissue microenvironment. Therefore, cancer establishment and progression may be differentially influenced the different types of adipocytes, which have diverse morphologies and opposite functional roles (Figure 1). Since there are numerous complex biological processes underlying adipose organ and obesity, a detailed and accurate

understanding about how obesity affects tumor biology at the molecular and cellular levels, can be useful to define the driving forces behind the obesity–cancer relationship.

Here, we will discuss the cellular and molecular pathways involved in the adipose organ plasticity and their different impact in cancer progression.

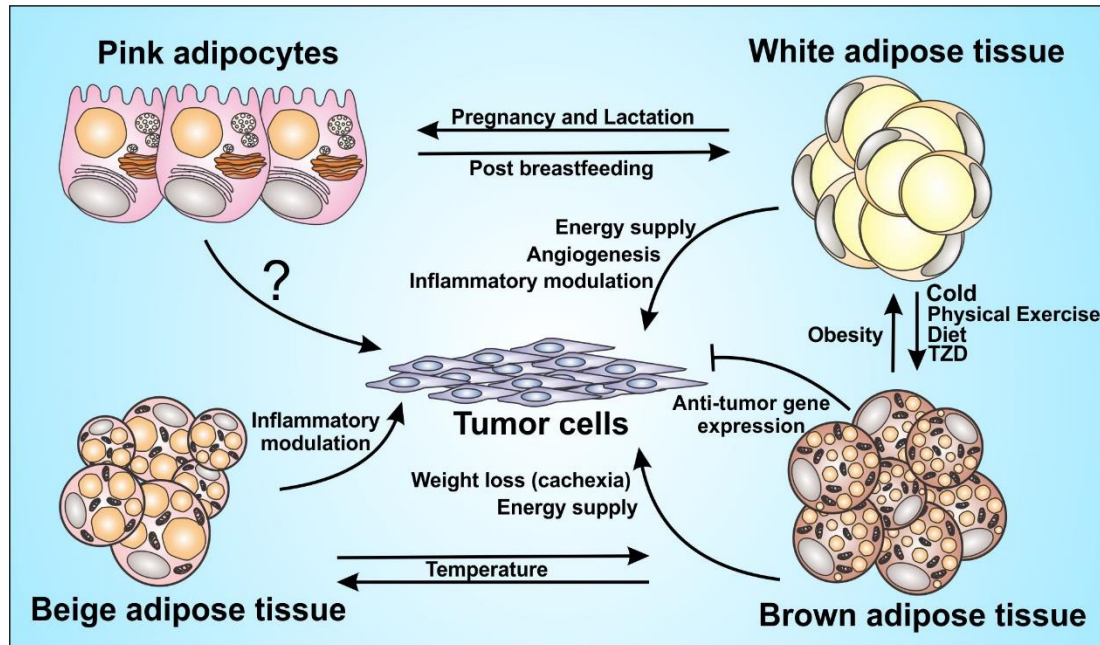


Figure 1. Adipocytes function in tumor progression. Adipocytes play a major role in the inflammatory modulation and endocrine function. It acts directly and/or indirectly on tumor progression, although some mechanisms are still unknown, such as the role of pink adipocytes on the tumor cells. The figure shows the great plasticity between brown, beige and white adipocytes with the influence of some inducers and the capacity of those cells to orchestrate the tumor microenvironment, through energy supply and immunomodulation.

2. The Adipose Organ

The adipose organ consists of several subcutaneous and visceral depots [14] of adipose tissues with metabolic, regulatory, and plastic roles [15]. This adipose organ is mainly composed by adipocytes and several other cells and components such as lymphocytes, macrophages, fibroblasts, endothelial cells, and extracellular matrix. In the areas where this organ is mainly composed by white adipocytes it is called white adipose tissue (WAT) and where brown adipocytes are predominant it is called brown adipose tissue (BAT).

White adipocytes are characterized by its ability to store and release energy in form of lipids as a large and unilocular lipid droplet in the cytoplasm. WAT is the most abundant tissue in the body, and is not only related to the energy source of the body, but also acts as an important endocrine organ [16]. It is an active metabolic organ secreting several adipokines, such as leptin and adiponectin [17].

Brown adipocytes are characterized by the presence of high content of mitochondria and several small lipid droplets in the cytoplasm. BAT plays an important role in uncoupled respiration, via the uncoupling proteins (UCPs) present in their mitochondria. BAT is also a central location in the body for heat production (thermogenesis) [18] and it is deeply related to weight loss promotion [19]. It was initially believed that brown adipose tissue was found only in small mammals, hibernating animals and newborns. However, recent research has shown functional BAT present in adults at limited sites, such as the interscapular region and neck [20].

The adipose organ has prominent plasticity ability. White adipocytes can differentiate into brown-like adipocytes in WAT [21] in a process called beiging. Beige adipocytes are characterized

by their multilocular lipid droplet morphology, high number of mitochondria and the expression of brown adipocytes genes (UCP-1, CIDEA, PGC1- α) [18]. Brown adipocytes raised in WAT are also identified as brite. These brite (brown-in-white) adipocytes are also known as beige, inducible brown or brown-like adipocytes [21]. Brite adipocytes can express UCP-1 and are originated in WAT in response to various stimuli. For instance, large unilocular white adipocytes can differentiate into beige adipocytes in response to cold or β 3-adrenergic agonists [22]. However, these differentiated beige adipocytes can lose UCP-1 expression after mice are moved back to warmer conditions, demonstrating that the thermogenic profile of beige adipocytes is reversible [23].

A fourth type of adipocytes has been described; the pink adipocytes [24,25]. Pink adipocytes are milk-secreting alveolar cells that can arise from transdifferentiation of white adipocytes during pregnancy and lactation. These cells are characterized by abundant cytoplasmic lipid droplets, apical surface with microvilli, roundish and large nucleus centrally located, a robust rough endoplasmic reticulum (RER), Golgi complex, and milk-containing granules. Since the adipose organ acquires a pink color during pregnancy and lactation, these epithelial glandular cells were named pink adipocytes [24]. Evidence has supported the hypothesis of white-to-pink transdifferentiation, pink-to-brown transdifferentiation, and reversible brown-to-myoe epithelial cell conversion [25], demonstrating once again the intense plasticity characteristic of adipose organ. The morphological differences among white, brown, beige and pink adipocytes are summarized in Figure 2.

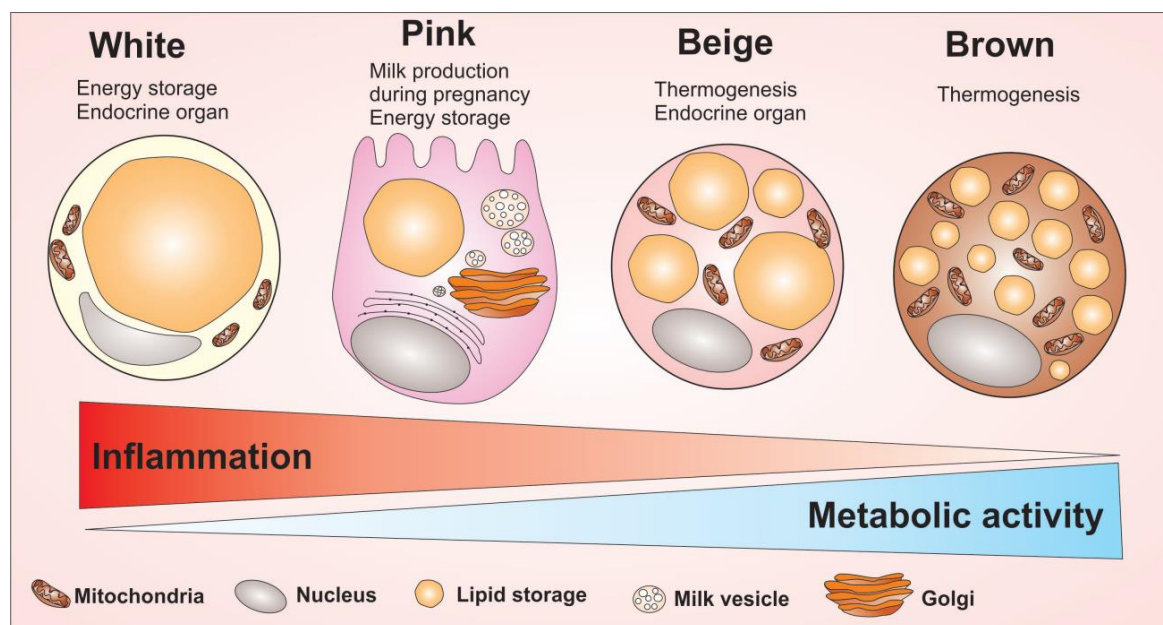


Figure 2. Adipocytes cells and their main morphological and cellular activity differences. Adipocytes are divided into four cell types that have different morphological and functional characteristics: the white, pink, beige and brown adipocytes. The white adipocyte is described as a cell with great energy storage ability, high pro-inflammatory profile, capable of producing several adipokines related to inflammation modulation. The pink adipocyte is described as a cell with a great potential for energy storage as well. However, this cell has a higher metabolic activity compared to white adipocytes, but low ability to regulate inflammation, compared to white adipocytes. Unlike white adipocytes, the brown adipocyte acts to maintain body temperature due to its high amount of mitochondria enriched with UCP1 protein. Brown adipocytes have small fat droplets spread throughout the cell and have a high metabolic activity. Between the two extremes of the white adipocyte to the brown, there is the beige adipocyte. The beige adipocyte has the ability to produce heat due to the high number of mitochondria, with the highest metabolic activity among all four types of adipocytes. Overall, the figure shows the morphological difference between the adipocytes cells as well as indicate the capacity to modulate inflammation and the metabolic activity of adipocytes.

Macrophages play an important role in adipose organ regarding the inflammation establishment. As adipocytes, macrophages can change their phenotypes dependent on stimulus. Adipocytes can recruit macrophages and polarize them to classical macrophage profile (M1) or alternative macrophage profile (M2) depending on the adipocyte status of inflammation [26]. In this context, M1 macrophages, characterized as pro-inflammatory, can induce Th1 response and strong microbicidal and anti-tumoral activity. The M1 or classical macrophage are sources of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12 and; and chemokines such as CXCL1–3, CXCL-5, and CXCL8–10. On the other hand, M2 or alternative macrophage can promote Th2 response, tissue repair, Treg recruitment, and tumor survival [27]. The levels of anti-inflammatory cytokines such as IL-10, IL-4 and TGF- β are elevated in this phenotype, promoting a favorable microenvironment for tumor development. In the context of tumor progression, the crosstalk between obese adipose tissue, macrophage polarization, and tumor cells is crucial for struggle tumor progression [28].

3. Brown Adipocytes and the Browning Process

The increase of brown adipocytes in adipose organ promotes an anti-inflammatory phenotype characterizing a healthy tissue development, decreasing insulin resistance, increasing thermogenesis, and consequently reducing obesity. The adipose tissue, when exposed to certain stimuli, such as cold, microbiota modifications [29] or adrenergic receptors (ADRB3) activation may undergo morphological and functional changes, in which white adipose tissue acquires characteristics of brown adipose tissue. This process is called browning [30]. The browning process has been highly studied due to its great anti-obesity and anti-tumor pharmaceutical potential. Recent studies have sought to target receptors in white adipocytes capable to induce the browning process in these cells, in order to reduce excessive fat accumulation, increase heat production and struggle metabolic diseases related to obesity.

Brown adipose tissue plays a major role in the hormonal regulation through the production and secretion of several adipokines, as well as the production of heat when exposed to cold. These characteristics were acquired throughout the evolution, turning possible the remodeling of white adipose tissue to beige/brown [30]. As previously described, BAT is characterized by a high number of mitochondria. In those organelles, located on the inner membrane, the amount of uncoupling protein 1 (UCP1) is enriched and its large number gives the brown color of the adipocytes [18].

The UCP1 protein is responsible for the production of heat in the brown adipocytes and its presence is increased in the browning process, being a great marker for the identification of the process [31]. Among the several factors capable to activate this protein in adipocytes and promoting thermogenesis, is Norepinephrine signaling through β 3-Receptors [32]. Norepinephrine can interact with three different types of receptors in brown adipose tissue. However, the interaction with β -adrenergic receptors is better described. The signaling cascade of norepinephrine is mediated via adenylyl cyclase activation, in which norepinephrine induces cAMP formation followed by a cascade of phosphorylation, including the activated protein kinase A [33]. Protein kinase A, in turn, can phosphorylate some transcription factors, including cAMP-response element binding protein (CREB) that will induce the transcription of some genes, including the UCP1 gene. UCP1 uncouples electron transport from ATP production, which in turn leads to controlled exothermic resolution of the electrochemical gradient and generation of heat to maintain body core temperature [19].

An important factor that may contribute to the remodeling of adipose tissue is the role of hormones, both paracrine and autocrine pathways. In addition to cold exposure, some hormones are produced in response to activate β 3-adrenergic receptor and promote browning. Among the most studied hormones, we can mention catecholamines [34]. Peptide hormones such as fibroblast growth factor 21 (FGF21), are largely produced at lower temperatures and can bind to β 3-adrenergic receptor, inducing the brown adipocyte phenotype in WAT. Studies have shown the important physiological role of FGF21 in the thermogenic process of WAT[35]. Mice deletion of FGF21 protein exhibits a large difficult adaptation when exposed to cold, resulting from the less efficient remodeling of white adipocytes to brown cells. FGF21 has the ability to act paracrine and autocrine in the adipocytes, to elevate the

expression and activity of UCP1 in mitochondria. This regulation is due to the increase of adipose tissue PGC-1 α protein levels [36]. Expression of UCP1 is controlled by some factors including PGC-1 α . Thus, at low temperatures, the high production of FGF21 can induce the increase of UCP1 in adipocytes by increasing the expression of PGC-1 α protein levels independently of mRNA expression.

In addition to FGF21, we can highlight the adipokine leptin, known for its function on hypothalamus receptors, controls energy expenditure and body weight. Leptin triggers browning of WAT through a network innervation of sympathetic nervous system fibers in BAT and WAT. Leptin promotes browning through peripheral and central mechanisms. Leptin-induced sympathetic activation increases energy expenditure in BAT, also leading to browning in WAT. Leptin also acts in skeletal muscle regulating of myogenic factors, such as the irisin, released after exercise, promoting browning [37]. The blockage of neural sympathetic fibers located in inguinal WAT prevents the development of brite adipocytes after cold exposure. The sympathetic tone is differentially regulated in adipose depots [38].

Thyroid hormones (TH) also orchestrate a key role in browning of adipose tissue. Studies have shown that THs act on the ventromedial nucleus of the hypothalamus (VMH) to inhibit AMP-activated protein kinase (AMPK), thereby regulating the browning process in adipose tissue, leading to increased thermogenesis and weight loss [39]. The participation of TH in this process has been experimentally proven. Studies have shown that hypothyroid mice had significantly decreased in interscapular BAT and hyperthyroid mice had significantly increased in this tissue activities, compared to euthyroid controls [40]. Furthermore, THs can interact with norepinephrine by controlling the process. Among factors that also may control UCP1 levels in adipose tissue is the concentration of triiodothyronine (T3) in adipocytes. T3 can be generated by the conversion of thyroxine (T4) to T3 by type II iodothyronine 5'-deiodinase (DIO2). In adipose tissue cells, DIO2 is activated through the sympathetic nervous system (SNS), in addition, adrenergic signals can be enhanced by THs which leads to an increase in thermogenic precession by the activation of UCP1 due to the increase in T3 concentrations [41].

In summary, several mediators are capable to change the adipocyte phenotype, inducing the production of some mediators that will act on the activation of UCP1 in the mitochondria of fat cells. Some of these factors are being extensively studied due the role of brown cells in the maintenance of tumor microenvironment, being a great target on the control of cancer progression.

4. Browning Process: Inductors and Mechanism

The multilocular distribution of lipids droplet, associated with the high amount of mitochondria, besides the expression of some characteristic BAT genes such as *Ucp1*, proliferator-activated receptor-gamma coactivator (*Pgc1 α*) and *Cidea*, are some markers of the browning process [42]. The canonical process of browning in white adipose tissue begins with the sympathetic activation and norepinephrine release that will act by binding to β -3 adrenergic receptors in adipose tissue. After receptor activation, there is an increase in cAMP that will act by activating protein kinase A (PKA) [43]. Once activated, PKA will induce lipolysis by the phosphorylation of perilipin, which recovers the lipids by protecting them from the action of lipases on adipose tissue cells, releasing fatty acids (FA) [44]. This FA will be transported into mitochondria via carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1) which will then act in some ways to produce heat [45]. FAs can act both to regulate the expression of genes associated with thermogenesis, as well as to act regulating the activity of UCP1 proteins. After passing through the β -oxidation, FADH and NADH electron carriers will be generated, which will pass through the electron transport chain, generating a proton-motive force [46]. The protons pumped into the mitochondrial matrix through UCP1 generates energy that is released as heat [47]. When inside the mitochondria, the FAs also act modulating the activity of the UCP1s removing the purine inhibition, which generates an influx of H⁺ protons into the mitochondrial matrix, uncoupling oxidative phosphorylation and energy from the proton motive force dissipated as heat.

Cellular changes occur in adipose tissue to induce the thermogenic process. Several factors trigger the activation of β -3 adrenergic receptors increasing lipolysis, reducing the accumulation of FA concomitant with increased expression and activity of the UCP1 protein, leading WAT to a BAT profile.

The thermogenesis process of adipose tissue is orchestrated by several transcription factors and co-activators present in adipose tissue cells. These transcription factors act by regulating the genes responsible for production and activation of the proteins that play an important role in the production of heat and lipolysis of adipose tissues. Genetic transcription cascades have been widely studied and the mechanisms of action of some transcriptional regulators are already well defined, both for WAT and BAT [48]. Among the most studied regulators are mitochondrial protein transcription enhancers, as well as proteins related to the stability and formation of lipid corpuscles [49].

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) coactivator 1-alpha (PGC1 α) complex is one of the main mechanisms of genetic regulation of the browning process [50]. Like most of the browning process regulators of adipose tissue, this complex is induced by external stimuli such as cold, exercise and fasting. The high concentration of PGC1 α in adipose tissue is related to a higher production of UCP1 in the cells, as well as the expression of enzymes, are important for the respiratory chain in mitochondria [51]. Studies have shown that the specific tissue deletion of PGC1 α followed by submission to cold leads to a decrease in the body temperature [52]. These results suggest that PGC1 α exerts a role in the induction of browning, generating a physiological impact on the maintenance of corporal temperature. Although PGC1 α is increased in WAT in the browning process, PGC1 α is not required for differentiation of brown adipose tissue [53], however, PGC1 α plays an important role in insulin sensitivity in adipocytes. In addition, studies suggest that PGC1 α -deficient cells have an increased susceptibility to insulin resistance and type 2 diabetes in humans [54].

Regarding the importance of PGC1 α in the remodeling of adipose tissue, there are several transcriptional regulators that control browning [55]. Other co-inducers of genes that are related to this process is PR (PRD1-BF1-RIZ1 homologous) -domain, containing 16 (Prdm16) [56]. In *ob/ob* mice model, Prdm16 is down-regulated. The leptin-deficient mice showed hyperphagia, impairment of insulin function, obesity and hypothermia. Prdm16 allows the activation of UCP-1 during BAT differentiation and specific genes related to browning [57]. The high fat diet-induced obese rats presented a downregulation of PRDM16 in a recent work which focused on physical activity and diets to modulate browning phenotype [58].

PRDM16 has been described as an important transcriptional regulator regulating browning in WAT [18]. Studies in mice have shown that an increase in the expression of PRDM16 is associated with the differentiation of WAT to beige adipose tissue in addition to the decrease of metabolic diseases. On the other hand, the deletion of this gene leads to a decrease in brown adipose tissue and an increase in some metabolic syndromes such as obesity [59].

As with PGC-1 α , PRDM16 activity is also increased in cold exposure by acting on genes related to the production of mitochondrial-related proteins as well as in other gene regulators related to heat production [60]. Studies have shown that different depots of adipose tissue in the body of the organism have different abilities to undergo the browning process. Experimental data on murine models have shown that both epididymal and visceral have less browning ability compared to subcutaneous WAT [61]. This different capacity of remodeling of the adipose tissue is due to the presence of regulatory genes in the adipocytes [62]. PRDM16 is one of these important genes that are found differentially in adipose tissues. PRDM16 can interact with WAT gene promoters by repressing its activity. Carboxy-terminal binding proteins 1 and 2 (CtBP1/2) are examples of genes reported as important promoters in WAT [63]. PRDM16 interact with these genes to inhibit the production of key proteins for the differentiation and functioning of WAT. PRDM16 significantly augments the amount of UCP1, CIDEA mRNA expression and FGF21 in epididymal WAT [62]. In addition, PRDM16 is required together with PGC-1 α in the activation of PPAR γ [64]. Both BAT and WAT require PPAR γ for the differentiation and functionality of the adipocyte cells [65]. The post treatment with PPAR γ

agonist, rosiglitazone, shows an increase of UCP1 (main hallmark gene responsible for thermogenesis), which BAT and WAT participation is related.

The molecular mechanisms of browning control of adipose tissue have been the subject of studies for the development of pharmacological agents. Due to the key role of genes related to the biogenesis of mitochondria, as well as β -adrenergic receptors and inducers of UCP1 expression, agonists have appeared to induce WAT browning without the need for intensive exposure to cold and diets, through the molecular modulation of the process, aimed against obesity.

Due to the potential target of brown adipose tissue in the use of fat stock to produce heat, and consecutively to weight loss, ways of regulating the browning process of adipose tissue have been studied. The development of new browning inducers, as well as the use of thyroid target drugs to activate gene promoters has been described to boost WAT remodeling [66].

The practice of physical exercise modulate inflammatory factors in the body, including those that can act on the regulation of adipose tissue, increasing mitochondrial biogenesis [67]. This important regulatory ability turns physical exercise practice into a great contributor to the browning process. The practice of exercise may start browning by reducing inflammation as well as increasing pro-opiomelanocortin (POMC) neuron gene expression [68]. Initially, it was believed that POMC was a homogeneous population and responded similarly to hormones and nutrients, however, studies have shown its heterogeneity to responses to peripheral hormones, such as insulin and leptin responses [69]. Recent data have confirmed the performance of POMC in the browning process showing the synergistic performance of POMC, leptin and insulin. The practice of physical activities leads to a hypothalamic activation of the POMC population as well as a higher production of leptin and insulin that acted in the adipocytes, stimulating some fundamental genes for the remodeling of WAT, such as Ucp1, Cidea and Prdm16 [70]. In addition, periodic physical activity induces a greater production of FGF21 by muscle cells, which will act on the adipose tissues, promoting the greater expression of PGC1 α [71].

Recently, several studies have shown the importance of the gut microbiota in the initiation of the browning process [29]. As well as the importance of physical exercises practice, the diet should also be controlled to reach a healthy microbiota. The connection of the gut microbiota interfering with the plasticity of adipose tissue became evident with the depletion of microbiota in mice, both with antibiotic treatment and in germ-free mice (GF) [72]. The absence of gut microbiota induced a significant increase in both inguinal subcutaneous and perigonadal visceral adipose tissue. The absence of the microbiota induces a high level of IL-4 and IL-13, as well as an increase in circulating eosinophils [73]. Both the presence of interleukin and eosinophils contribute to the attraction and polarization of macrophages to the M2 profile. Alternative activation of macrophages has been described as a contributing agent of the browning process in WAT, due to M2 polarization inducing the expression of tyrosine hydroxylase (TH) [74]. This enzyme plays an active role in synthesizing catecholamines on adipocytes, promoting lipolysis and consequently the production of heat through the mitochondria.

Furthermore, the gut microbiota triggers browning through the products of its metabolism. The gut microbiota-initiated trimethylamine (TMA)/flavin-containing monooxygenase 3(FMO3)/trimethylamine N-oxide (TMAO) pathway has been characterized as one of the major regulators of the process [75]. The flavin-containing monooxygenase 3 (FMO3) is a hepatic enzyme that, among its functions, acts on the metabolism of metabolites gut microbe-derived TMA to produce TMAO. As the end product of metabolism, circulating TMAO is indicative of cardiovascular disease [76]. In addition, high expression of FMO3 is also associated with obesity, and FMO3 knockdown or genetic deletion showed a higher positivity of UCP1 in WAT [77]. Although the role of the microbiota in the browning process is avid, little is known about its pathways of induction. However, several studies have been conducted to understand how products of bacteria metabolism induces browning of adipose tissue.

Further findings regarding the browning process induction pathways are making possible the use of pharmacological agonists that may activate the browning process. In addition, to the practice of physical activities, feeding and cold, hormonal regulators act at several key points in the body promoting greater expression of UCP1 (Figure 3). The main target of browning induction is through β 3

adrenergic receptor [78]. CL 316,243 (disodium (*R,R*)-5-[2-[2-(3-chlorophenyl)-2-hydroxyethyl]amino]propyl]-1,3-benzodioxole-2,2-dicarboxylate) is a potent β -adrenergic agonist [79]. Considering that β -adrenergic receptor is significantly related to the onset of the browning process, the CL 316,243 (CL) has been studied as a potential anti-obesity treatment. CL-treated adipocytes have increased UCP1 expression, as well as treatment reduced lipid storage in these cells, thus showing that CL induced lipolysis in adipose tissue, followed by significant expression and activation of UCP1, leading to heat production.

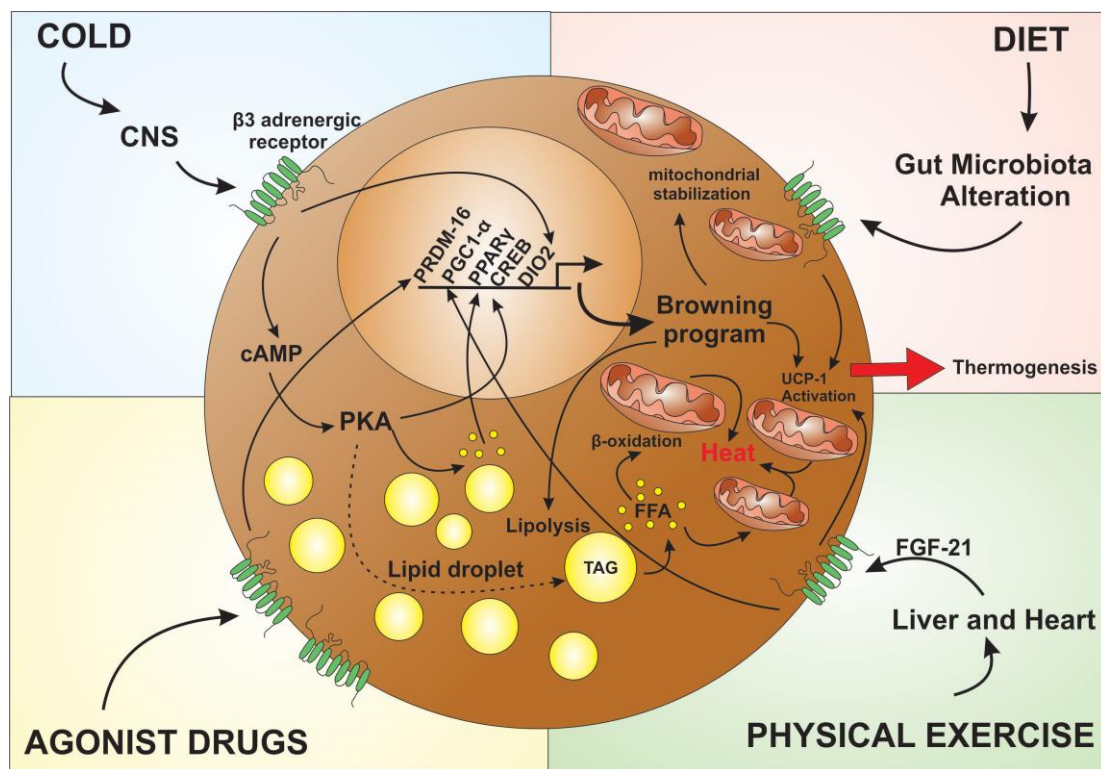


Figure 3. External agents capable of inducing the browning process in adipose tissue. β 3 receptor activation regulate the transcription and activation of genes linked to mitochondrial activity and fat storage. The exposure to excessive cold induces release of catecholamines by the central nervous system (CNS), which will act on β 3 adrenergic receptors on adipocytes initiating the signaling cascade. Activation of cAMP through the binding of catecholamines at adipocytes receptors will activate protein kinase A (PKA), which will then induce lipid droplet lipolysis. This lipolysis will induce thermogenesis by β oxidation in the mitochondria, as well as activation of the UCP1 protein, and the activation of important genes linked to the browning process like peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), cAMP-response element binding protein (CREB) and Type II iodothyronine deiodinase (DIO2). Similarly to the cold, the food also influences the thermogenic process by the production of metabolites by the gut microbiota that will act both indirectly, acting in the liver, and directly in the adipocytes inducing the activation of the UCP1 protein in the mitochondria. The liver and heart act in the process being regulated by the practice of physical exercises increasing the release of fibroblast growth factor 21 (FGF-21), which will regulate the activity of the gene PGC1. In order to enhance the process, several agonist drugs are also used, both in the increase of β 3 adrenergic receptors expression and in the regulation of genes like PR (PRD1-BF1-RIZ1 homologous)-domain containing 16 PRDM16, acting in the regulation of expression and activation of UCP1, which will then potentiate the thermogenic process in the adipocytes, characterizing the browning process.

Due to the fundamental role of PPAR γ in adipogenesis, the use of PPAR γ ligands as a cell differentiation control has become the target of several researches [80]. The role of PPAR γ in lipid modulation is well established. PPAR γ cooperates with other transcription factor families, including

the C/EBPs and SREBPs, to regulate adipocyte differentiation. The role of PPAR γ increasing BAT was shown by treatment with a potent PPAR γ ligands such as rosiglitazone, an antidiabetic drug from thiazolidinedione pharmaceutical class (TZD) [64]. The treatment with this agonist leads to an increase in mitochondrial genes, such as UCP-1 and enzymes important for mitochondrial function such as cytochrome c oxidase (Cox), subunit VIIIb (Cox8b), and subunit VIIa1 (Cox7a1). Thiazolidinediones are important PPAR γ agonists leading to browning.[81]. TZD has been shown to be a major PPAR γ activator in white adipose tissue, leading to the induction of PRDM16 complex with PGC-1 α/β [82]. Although WAT already has a basal production of PGC-1 α/β , studies have shown a large increase in the production of this protein, showing that increased activation of PPAR γ via TZD can promote browning in WAT, via PRDM16.

5. Cancer and Adipose Organ

Among the many functions of adipose tissue, its main role is the energy storage. Especially the white adipose tissue, stores lipids in the form of triglycerides, to be used in the future as an energy source. However, imbalance in the storage of lipids from fat cells can lead to a metabolic dysfunction [83]. In view of the endocrine character of adipose tissue, a disorder may be associated with various metabolic diseases such as cancers, cardiovascular as well as liver tissues. As already described, adipose tissue is composed not only of adipocytes, but also of several other immune cells that act to maintain the tissue homeostasis [84]. The polarization profile of these immune cells in the tissue depends on the health status of the adipocytes. The type of inflammation predominant in the tissue can be important to define malignancy progress. Immunological cells can be recruited and polarized by external stimulus and modified to two different inflammatory profiles: type 1 and type 2 inflammatory phenotype [26]. The type 1 inflammation is described as a pro-inflammatory profile, and the immune cells polarized to this kind of inflammation is responsible for release pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-6, and IL-1 β among another [85]. Deregulation on WAT leads to intense macrophage recruitment through chemokines release, followed by the polarization of these cells to M1 phenotype. The amount of CD8+ lymphocytes and natural killer are also increased in this tissue. On the other hand, the type 2 of inflammation is characterized by the presence of anti-inflammatory phenotypes, with the production and secretion of cytokines such as IL-10, IL-4, and TGF- β [86]. On the opposite way to type 1 inflammation, a higher amount of CD4+ lymphocytes and Treg cells can be found in the anti-inflammatory type 2 profile [87]. The interplay between adipocytes and immunological cells, such as macrophages and lymphocytes, may facilitate the establishment of several pathologies [88] (Figure 4). White adipose tissue from people with obesity display a crucial role in the increase of immunological cells infiltrate characterized by an intense presence of type 1 inflammation. Thus, deregulation of adipose tissue leading to obesity, can promote immunological polarization and adipokines and chemokines production. In addition, it can serve as energy source for tumor cells proliferation. A study showed that the gene expression profile from periprostatic adipose tissue of people with obesity and overweight patients is correlated with the risk for prostate cancer. The results showed changes in genes regulating adipogenesis, lipolysis, apoptosis and proliferation. It was observed that a downregulation of FADS1 (fatty acid desaturase) and an upregulation of LEP (gene encoding leptin), which is associated with adipogenesis, lipogenesis and ANGTP1 (Angiopietin 1), is associated with vascular development. Periprostatic adipose tissues of obese or overweight patients presented altered expression of genes linked to adipose tissue activity, especially an increased inflammatory profile [89]. There is a crosstalk of adipose tissues and carcinomas through an increase of angiogenesis corroborated by higher expression of VEGF, proinflammatory cytokines such as IL-6 and TNF- α . The WAT, specially the visceral WAT, exerts a central role to develop a pro-tumoral secretome, associated to a higher risk for cancer in obesity [90].

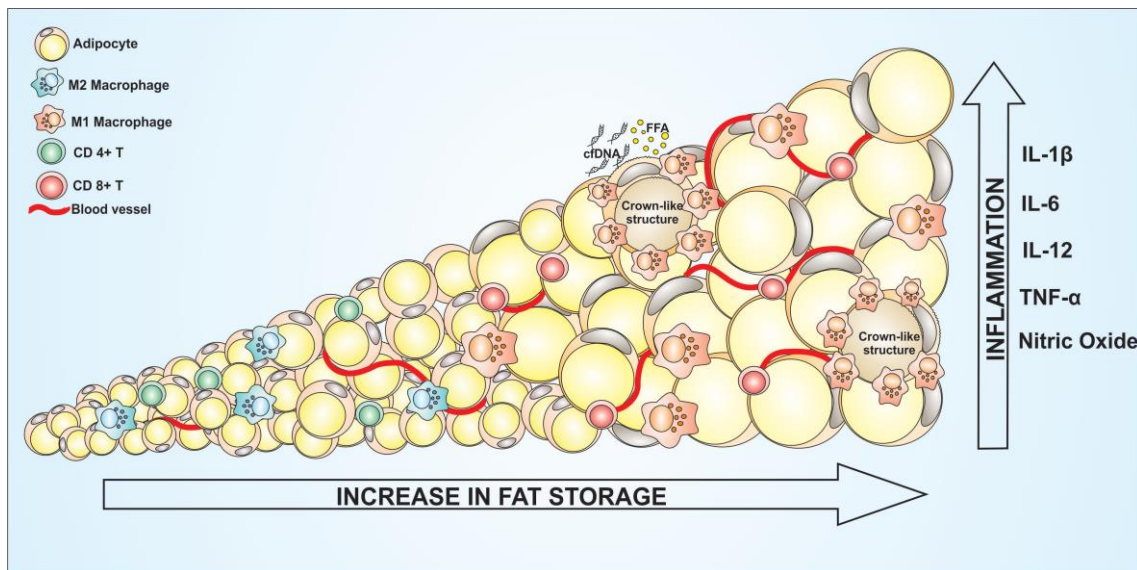


Figure 4. Increased lipid reserve in white adipocytes can favor inflammation. The imbalance in the energy reserve in fat cells leading to obesity is capable of mediating inflammation in tissue. Adipose tissue hypertrophy and hyperplasia can induce increase in vascularization, facilitating the recruitment of immune cells. Due to the secretion of various inflammatory mediators in a deregulated form in obese adipose tissues, there is an increasing polarization of immune cells to their pro inflammatory profile. The number of macrophages recruited into obese adipose tissue increases as well as its polarization to the M1 profile. Once polarized, macrophages are able to form crown-like structures (CLS) around adipocytes in the degeneration process, inducing their death with the release of cytoplasmic components into the extra cellular environment, this fact increases inflammation in the tissue, where more macrophages will be recruited and polarized. The release of cell-free DNA (cfDNA) by necrotic adipocytes increases the macrophages recruitment, which will then be polarized. In addition, the release of free fatty acids (FFA) may favor the development of some metabolic diseases such as cancer. Unlike healthy tissue, where a larger macrophage population is found in its M2 profile and CD4+ T cells maintaining tissue homeostasis, the obese tissue has an increased presence of CD8+ T cells, favoring the inflammatory process.

The dysfunction of adipose tissue, due to obesity, associated with the tumor is characterized as a worse prognosis [91]. Due to the fact that obese adipose tissue is linked to an inflammatory condition, the modulation of the tumor microenvironment is influenced by the production of cytokines by adipocytes as well as immunological cells that are recruited and polarized at the site [92]. Obesity shows a deregulation of adipokines secretion, specially promoting a pro-inflammatory profile, as a result of higher adiposity and adipocytes dysfunction. In addition to the secretion of cytokines, adipokines are related to lipid metabolism, glucose and cardiovascular homeostasis. There is a group represented by acute-phase reactants, as C-reactive protein, plasminogen activator inhibitor 1, haptoglobin and amyloid A serum. The chemokines also exert a differential role, with higher secretion of MCP-1, CCL2, CCL5, MIP-2 (macrophage inflammatory protein-2). In addition to these factors, damage-associated molecular pattern (DAMP) or alarmins as HMGB1, heat shock proteins, tenascin C. Altogether, it can lead to an inflammatory microenvironment in obesity [93]

Cancers in general require a favorable environment for their progress as well as energy sources, as result of their high metabolic activity. Obese adipose tissue can provide these tumor growth and development factors through the large production of cytokines such as TNF- α , IL-6, IL-1 β , and CCL2 [94]. These cytokines, among other functions, can establish an inflammatory environment by the recruitment of lymphocytes and macrophages. Once recruited into the tumor microenvironment (where there is interaction between adipocytes, matrix and tumor cells) by the deregulated adipocytes, macrophages tend to be polarized to their anti-inflammatory M2 profile by tumor cells [26]. Most tumors are characterized by high production of IL-4, IL-10 and IL-13. The association between

the intense release of anti-inflammatory cytokines with the production of the chemokine leads to a substantial macrophage polarization on the tumor microenvironment. Once in the tumor site, the M2 macrophage profile is controlled by the tumor cells, in addition to an inhibition of the activity of anti-tumor immune cells, such as inhibition of TCD 8+ lymphocyte and NKT activation [95]. Moreover, adipocytes also play a role in this process. Studies have shown a significant reduction of macrophages in CCL2 knockout mice in the obesity-induced model [96]. This inflammatory profile is aggravated by the large infiltration of macrophages in WAT due to high levels of cell-free DNA (cfDNA). Obese adipose tissue in degeneration processes release DNA into the extracellular environment that leads to macrophage accumulation in the tissue [97]. Once in the tissue, macrophages can be polarized to the M1 profile leading to the formation of crown-like structures (CLS) [98]. Such structures are formed by the accumulation of macrophages M1 around adipocytes in degeneration. The macrophages then induce the death of these adipose, which leads to the release of cell components in the tissue, aggravating the inflammation. Furthermore, the cell death of these adipocytes will trigger the release of the fatty acids to the extracellular environment, which will be used as energy source by tumor cells [99]. Thus, obese white adipose tissue has an intimate relationship with the tumor, where there is the attraction of macrophages that will be, consecutively, polarized by the tumor as well as by the adipose tissue, aggravating the inflammatory state and favoring the tumor. Of note, adipose-derived stromal cells (ASCs) represent a crucial adjuvant in the context of cancer development [100]. Desmoplasia, the extracellular matrix and stromal microenvironment remodeling process, impacts significantly on local inflammation, causing homeostasis disruption and facilitating the malignancy process [101]. On the tumor microenvironment, the extracellular matrix is stiffer than normal tissues. This happened in function of the high activity of myofibroblasts, the principal soldier in the desmoplasia process [12]. During the obesity, there is a significant increase in the myofibroblasts, which will acts depositing stiff matrix components such as fibronectin and fibrillar collagen, supporting the tumor establishment and inducing fibrosis on WAT [102]. ASCs, or just pre-adipocytes, have been described as a target to tumor progression because of the multipotent mesenchymal progenitor action. Tumor cells can release cytokines and chemokines such as IL-8 and growth-related α -protein (CXCL1), respectively. These cytokines and chemokines will recruit ASCs from WAT into the tumor microenvironment [103]. People with these two metabolic diseases, obesity and cancer, have been reported presenting a dysfunction on the IL-8 production, releasing higher amount of this cytokines by the tumor cells, resulting in an excessive ASCs recruitment to the tumor site. Once in the site, malignant cells induce the differentiation of ASCs into myofibroblasts via transforming growth factor- β (TGF β)-mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling [104]. The presence of ASCs cells are related to a worse prognostic. Besides the ability to remold the extracellular matrix, the myofibroblasts can also give support to tumor cells by producing VEGF and inducing angiogenesis [104]. Moreover, cancer cells that remain following surgery can induce resident ASCs to promote tumor angiogenesis, exacerbating cancer growth and aggressiveness [105]. This is an important point to be considered, especially regarding the use of adipose tissue engraftment to build up the mammary glands following mastectomy surgeries.

Although the negative regulation that obese adipose tissue associated with the tumor may cause, the exacerbated secretion of leptin by adipose tissue form may be a crucial factor for cancer progression [106]. Leptin is mainly produced by adipocytes, although levels of leptin have already been detected by other tissues, such as skeletal tissue and placenta, but at lower levels. The main role of leptin is the regulation of appetite, acting on the central nervous system, reducing the appetite [107]. Leptin acts predominantly by binding to the full-length receptor OB-Rb, which will then induce the activation of the Janus kinase/signal transducer and activator of transcription (JAK/STAT) pathway, which will then induce the activity of phosphatidylinositol 3- kinase (PI3K) which promotes cellular growth, migration and invasion. In addition, the deregulated production of leptin by obese adipocytes leads to the production and secretion of inflammatory cytokines such as TNF- α and IL-6 by macrophage, modulating the polarization of lymphocytes, with the shifts the T-helper (TH) balance toward TH1 [108]. This action of leptin remodeling the tumor microenvironment has been increasingly studied, due to

its great importance establishing low grade inflammation in obese individuals, increasing the risks of cancer.

Due to the great functionality of BAT and its high metabolic activity in the control of energetic homeostasis, this tissue has been studied for its ability to influence tumors development. This thermogenic capacity, the induction of lipolysis as well as the modulation of the inflammatory profile, are the main targets of the studies. Experimental analyses have shown a link between a super expression of anti-tumor genes and an increase of brown adipocytes cells in the adipose organ. One of the genes linked with browning and cancer is the PTEN gene. The PTEN gene acts on the regulation of cell growth and proliferation, being one of the most important anti-tumor regulators. This gene is considered a tumor suppressor for the action of its phosphatase protein product that is related with the regulation of cell cycle and the reduction of cell proliferation. With this in mind, a study demonstrated that overexpression of PTEN gene triggered resistance to cancer, energy expenditure and insulin resistance in mice [109]. In addition, the mice had high expression of UCP1, showing high BAT activity [109]. Although BAT has been reported as a healthy tissue, recent studies have shown its relation to cancer cachexia [110]. Cancer-associated cachexia (CAC) is a complex, multifactorial syndrome characterized by the loss of adipose and skeletal muscle tissues that leads to great weight loss, which is associated with a negative impact on patients' survival. Studies in animal model of cachexia showed a great increase in the expression of genes associated with the browning process, such as UCP-1, Prdm16 and Pgc1 α in patients with cancer [111]. Although this relationship with BAT promoting cancer-associated cachexia, suggesting adipose tissue dysfunction associated with a worse prognosis, further studies should be done to better elucidate the function of BAT in the tumor establishment.

The pink adipose tissue arises during lactation, changing the breast tissue microenvironment and promoting impact on the modulation of local immune cells [25]. Therefore, pink adipocytes could have a direct influence in breast cancer establishment. In breast tissue, white adipocytes can transdifferentiate into pink adipocytes, in a process called pinking, which is a reversible phenomenon. During this process, mammary epithelial secretory cells can lose the expression of PPAR γ creating a pro-breast tumorigenic microenvironment [112], facilitating the establishment of breast cancer at this phase. However, the function of the pink fat cells on cancer progress, especially on breast cancer, need to be better characterized.

6. Conclusions

As a metabolic syndrome, people with obesity show a deregulation on the inflammatory profile. Changes of cytokines and adipokines secretion by adipocytes on the adipose organ may influence the immune system response, which is related to a worse prognostic on cancer development. In this context, the modulation of adipose organ has been studied, looking for a better treatment to use in association with a conventional treatment against cancer [113].

The white adipose tissue has been deeply implicated in cancer, whereas the increase of this tissue is highly related to a pro-tumorigenic microenvironment. Several pre-clinical, clinical and epidemiologic data [90] suggest that the increase of WAT characteristics is accompanied by a growth-promoting and pro-inflammatory microenvironment linked to increased cancer risk and/or progression.

BAT can work as a double-edged sword during obesity, since the induction of browning of the WAT can be a powerful tool to reduce the weight of people with obesity, facilitate weight loss and improve metabolic health, as we previously mentioned here. At the same time, the reduction of activation of the BAT can soften the cachexia status of an individual by inducing weight gain in muscle and increasing muscle mitochondrial biogenesis. Then, this last characteristic of BAT can be of great importance in cancer perspective. The inhibition of browning of the WAT can ameliorate the severity of cachexia that can occur in several types of cancer by increasing the energy expenditure [114]. Therefore, treatments that associate the reduction of inflammation with the blockade of β -adrenergic receptors could potentially ameliorate the severity of cachexia by reducing the browning of WAT. On the other hand, the activation of the brown adipose metabolism, as well as the induction of the

browning of the WAT, can improve insulin resistance, reduce inflammation and increase the secretion of anti-inflammatory molecules, creating anti-tumorigenic microenvironment.

The plasticity of adipose organ components has been a target of the pharmaceutical industry and the medical research, aiming for the profile remodeling of the fat cells to a medicinal anti-cancer target. Therefore, the adipose organ is highly plastic, and this plasticity may be a useful pharmacological tool to combat cancer progression and support cancer therapeutic treatments.

Author Contributions: Conceptualization, L.H.C., G.S.H. and K.G.M.; investigation, L.H.C., G.S.H. and K.G.M.; writing—original draft preparation, L.H.C.; writing—review and editing, K.G.M.; supervision, K.G.M.; project administration, K.G.M.

Funding: This research received no external funding.

Conflicts of Interest: The authors declared no conflict of interest.

References

1. Renehan, A.G.; Zwahlen, M.; Egger, M. Adiposity and cancer risk: new mechanistic insights from epidemiology. *Nat. Rev. Cancer* **2015**, *8*, 484–498. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Avgerinos, K.I.; Spyrou, N.; Mantzoros, C.S.; Dalamaga, M. Obesity and cancer risk: Emerging biological mechanisms and perspectives. *Metabolism* **2019**, *92*, 121–135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Nyasani, E.; Munir, I.; Perez, M.; Payne, K.; Khan, S. Linking obesity-induced leptin-signaling pathways to common endocrine-related cancers in women. *Endocrine* **2019**, *63*, 3–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Tahergerabi, Z.; Khazaei, M.; Moodi, M.; Chamani, E. From obesity to cancer: a review on proposed mechanisms. *Cell Biochem. Funct.* **2016**, *34*, 533–545. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Lauby-Secretan, B.; Scoccianti, C.; Loomis, D.; Grosse, Y.; Bianchini, F.; Straif, K. Body Fatness and Cancer—Viewpoint of the IARC Working Group. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *375*, 794–798. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Birks, S.; Peeters, A.; Backholer, K.; O'Brien, P.; Brown, W. A systematic review of the impact of weight loss on cancer incidence and mortality. *Obes. Rev.* **2012**, *13*, 868–891. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Schauer, D.P.; Feigelson, H.S.; Koebnick, C.; Caan, B.; Weinmann, S.; Leonard, A.C.; Powers, J.D.; Yenumula, P.R.; Arterburn, D.E. Association Between Weight Loss and the Risk of Cancer after Bariatric Surgery. *Obesity* **2017**, *25*, S52–S57. [[CrossRef](#)]
8. Luo, J.; Chlebowski, R.T.; Hendryx, M.; Rohan, T.; Wactawski-Wende, J.; Thomson, C.A.; Felix, A.S.; Chen, C.; Barrington, W.; Codday, M.; et al. Intentional Weight Loss and Endometrial Cancer Risk. *J. Clin. Oncol.* **2017**, *35*, 1189–1193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Xu, M.; Jung, X.; Hines, O.J.; Eibl, G.; Chen, Y. Obesity and Pancreatic Cancer. *Pancreas* **2018**, *47*, 158–162. [[CrossRef](#)]
10. Brestoff, J.R.; Artis, D. Immune Regulation of Metabolic Homeostasis in Health and Disease. *Cell* **2015**, *161*, 146–160. [[CrossRef](#)]
11. Stanford, K.I.; Middelbeek, R.J.W.; Goodyear, L.J. Exercise Effects on White Adipose Tissue: Being and Metabolic Adaptations. *Diabetes* **2015**, *64*, 2361–2368. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Quail, D.F.; Dannenberg, A.J. The obese adipose tissue microenvironment in cancer development and progression. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2019**, *15*, 139–154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Lee, Y.-H.; Jung, Y.-S.; Choi, D. Recent advance in brown adipose physiology and its therapeutic potential. *Exp. Mol. Med.* **2014**, *46*, e78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Cinti, S. The adipose organ: morphological perspectives of adipose tissues. *Proc. Nutr. Soc.* **2001**, *60*, 319–328. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Panina, Y.A.; Yakimov, A.S.; Komleva, Y.K.; Morgun, A. V.; Lopatina, O.L.; Malinovskaya, N.A.; Shuvaev, A.N.; Salmin, V. V.; Taranushenko, T.E.; Salmina, A.B. Plasticity of Adipose Tissue-Derived Stem Cells and Regulation of Angiogenesis. *Front. Physiol.* **2018**, *9*, 1656. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Stolarczyk, E. Adipose tissue inflammation in obesity: a metabolic or immune response? *Curr. Opin. Pharmacol.* **2017**, *37*, 35–40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Sarmiento-Cabral, A.; Peinado, J.R.; Halliday, L.C.; Malagon, M.M.; Castaño, J.P.; Kineman, R.D.; Luque, R.M. Adipokines (Leptin, Adiponectin, Resistin) Differentially Regulate All Hormonal Cell Types in Primary Anterior Pituitary Cell Cultures from Two Primate Species. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 43537. [[CrossRef](#)]

18. Harms, M.; Seale, P. Brown and beige fat: Development, function and therapeutic potential. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 1252–1263. [[CrossRef](#)]
19. Srivastava, S.; Veech, R.L. Brown and Brite: The Fat Soldiers in the Anti-obesity Fight. *Front. Physiol.* **2019**, *10*, 1–13. [[CrossRef](#)]
20. Wankhade, U.D.; Shen, M.; Yadav, H.; Thakali, K.M. Novel Browning Agents, Mechanisms, and Therapeutic Potentials of Brown Adipose Tissue. *Biomed Res. Int.* **2016**, *2016*. [[CrossRef](#)]
21. Chu, D.-T.; Gawronska-Kozak, B. Brown and brite adipocytes: Same function, but different origin and response. *Biochimie* **2017**, *138*, 102–105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Vitali, A.; Murano, I.; Zingaretti, M.C.; Frontini, A.; Ricquier, D.; Cinti, S. The adipose organ of obesity-prone C57BL/6J mice is composed of mixed white and brown adipocytes. *J. Lipid Res.* **2012**, *53*, 619–629. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Rosenwald, M.; Perdikari, A.; Rüllicke, T.; Wolfrum, C. Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nat. Cell Biol.* **2013**, *15*, 659–667. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Giordano, A.; Smorlesi, A.; Frontini, A.; Barbatelli, G.; Cinti, S. Mechanisms in Endocrinology: White, brown and pink adipocytes: the extraordinary plasticity of the adipose organ. *Eur. J. Endocrinol.* **2014**, *170*, R159–R171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Cinti, S. Pink Adipocytes. *Trends Endocrinol. Metab.* **2018**, *29*, 651–666. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Corrêa, L.H.; Corrêa, R.; Farinasso, C.M.; de Sant’Ana Dourado, L.P.; Magalhães, K.G. Adipocytes and macrophages interplay in the orchestration of tumor microenvironment: New implications in cancer progression. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 1–12. [[CrossRef](#)]
27. Noy, R.; Pollard, J.W. Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy. *Immunity* **2014**, *41*, 49–61. [[CrossRef](#)]
28. Zhuang, G.; Meng, C.; Guo, X.; Cheruku, P.S.; Shi, L.; Xu, H.; Li, H.; Wang, G.; Evans, A.R.; Safe, S.; et al. A novel regulator of macrophage activation: MiR-223 in obesity-associated adipose tissue inflammation. *Circulation* **2012**, *125*, 2892–2903. [[CrossRef](#)]
29. Suárez-zamorano, N.; Fabbiano, S.; Chevalier, C.; Stojanović, O.; Colin, D.J.; Stevanović, A.; Veyrat-durebex, C.; Tarallo, V.; Rigo, D.; Germain, S.; et al. Microbiota depletion promotes browning of white adipose tissue and reduces obesity. *Nat Commun.* **2015**, *21*, 1497–1501. [[CrossRef](#)]
30. Bartelt, A.; Heeren, J. Adipose tissue browning and metabolic health. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2014**, *10*, 24–36. [[CrossRef](#)]
31. Cui, X.; Chen, S. White adipose tissue browning and obesity. *J. Biol. Chem.* **2017**, *31*, 1–2.
32. Singh, R. Regulation of brown adipocyte metabolism by myostatin/follistatin signaling. *Front Cell Dev Biol.* **2014**, *2*, 1–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Peng, X.; Gennemark, P.; O’Mahony, G. Unlock the Thermogenic Potential of Adipose Tissue: Pharmacological Modulation and implications for Treatment of Diabetes and Obesity. *Front. Endocrinol.* **2015**, *6*, 1–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Tamucci, K.A.; Namwanje, M.; Fan, L.; Qiang, L. The dark side of browning. *Protein Cell* **2018**, *9*, 152–163. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Itoh, N. FGF21 as a hepatokine, adipokine, and myokine in metabolism and diseases. *Front. Endocrinol.* **2014**, *5*, 4–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Fisher, F.F.; Kleiner, S.; Douris, N.; Fox, E.C.; Mepani, R.J.; Verdeguer, F.; Wu, J.; Kharitonkov, A.; Flier, J.S.; Maratos-Flier, E.; et al. FGF21 regulates PGC-1 α and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev.* **2012**, *26*, 271–281. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Maalouf, G.; Khoury, D. El Exercise-Induced Irisin, the Fat Browning Myokine, as a Potential Anticancer Agent. *J. Obes.* **2019**, *2019*, 1–8. [[CrossRef](#)]
38. Caron, A.; Lee, S.; Elmquist, J.K.; Gautron, L. Leptin and brain–adipose crosstalks. *Nat. Rev. Neurosci.* **2018**, *19*, 153–165. [[CrossRef](#)]
39. Weiner, J.; Kranz, M.; Klötting, N.; Kunath, A.; Steinhoff, K.; Rijntjes, E.; Köhrle, J.; Zeisig, V.; Hankir, M.; Gebhardt, C.; et al. Thyroid hormone status defines brown adipose tissue activity and browning of white adipose tissues in mice. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–10. [[CrossRef](#)]
40. Martínez-Sánchez, N.; Moreno-Navarrete, J.M.; Contreras, C.; Rial-Pensado, E.; Fernø, J.; Nogueiras, R.; Diéguez, C.; Fernández-Real, J.-M.; López, M. Thyroid hormones induce browning of white fat. *J. Endocrinol.* **2017**, *232*, 351–362. [[CrossRef](#)]

41. Jesus, L.A. De; Carvalho, S.D.; Ribeiro, M.O.; Schneider, M.; Kim, S.; Harney, J.W.; Larsen, P.R.; Bianco, A.C. The type 2 iodothyronine deiodinase is essential for adaptive thermogenesis in brown adipose tissue. *J. Clin. Investig.* **2001**, *108*, 1379–1385. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Bargut, T.C.L.; Souza-Mello, V.; Aguila, M.B.; Mandarin-De-Lacerda, C.A. Browning of white adipose tissue: Lessons from experimental models. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* **2017**, *31*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Richard, J.E.; López-Ferreras, L.; Chanclón, B.; Eerola, K.; Micallef, P.; Skibicka, K.P.; Wernstedt Asterholm, I. CNS β 3 -adrenergic receptor activation regulates feeding behavior, white fat browning, and body weight. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2017**, *313*, E344–E358. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Liu, D.; Bordicchia, M.; Zhang, C.; Fang, H.; Wei, W.; Li, J.; Guilherme, A.; Guntur, K.; Czech, M.P.; Collins, S. Activation of mTORC1 is essential for β -adrenergic stimulation of adipose browning. *J. Clin. Investig.* **2016**, *126*, 1704–1716. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Calderon-dominguez, M.; Sebastián, D.; Fucho, R.; Weber, M. Carnitine Palmitoyltransferase 1 Increases Lipolysis, UCP1 Protein Expression and Mitochondrial Activity in Brown Adipocytes. *PLoS ONE* **2016**, *11*, 1–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Kalinovich, A.V.; de Jong, J.M.A.; Cannon, B.; Nedergaard, J. UCP1 in adipose tissues: two steps to full browning. *Biochimie* **2017**, *134*, 127–137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Peyrin-Biroulet, L.; Beisner, J.; Wang, G.; Nuding, S.; Oommen, S.T.; Kelly, D.; Parmentier-Decrucq, E.; Dessein, R.; Merour, E.; Chavatte, P.; et al. Adaptive thermogenesis in adipocytes: Is beige the new brown? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *107*, 234–250.
48. Fenzl, A.; Kiefer, F.W. Brown adipose tissue and thermogenesis. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* **2014**, *19*, 25–37. [[CrossRef](#)]
49. Puigserver, P.; Wu, Z.; Park, C.W.; Graves, R.; Wright, M.; Spiegelman, B.M. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* **1998**, *92*, 829–839. [[CrossRef](#)]
50. Balzola, F.; Bernstein, C.; Ho, G.T.; Lees, C. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation is required for maintenance of innate antimicrobial immunity in the colon: Commentary. *Inflamm. Bowel Dis. Monit.* **2010**, *11*, 77.
51. Uldry, M.; Yang, W.; St-Pierre, J.; Lin, J.; Seale, P.; Spiegelman, B.M. Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation. *Cell Metab.* **2006**, *3*, 333–341. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Lin, J.; Wu, P.H.; Tarr, P.T.; Lindenberg, K.S.; St-Pierre, J.; Zhang, C.Y.; Mootha, V.K.; Jäger, S.; Vianna, C.R.; Reznick, R.M.; et al. Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1 α null mice. *Cell* **2004**, *119*, 121–135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Leone, T.C.; Lehman, J.J.; Finck, B.N.; Schaeffer, P.J.; Wende, A.R.; Boudina, S.; Courtois, M.; Wozniak, D.F.; Sambandam, N.; Bernal-Mizrachi, C.; et al. PGC-1 α deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: Muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. *PLoS Biol.* **2005**, *3*, 0672–0687. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Kleiner, S.; Mepani, R.J.; Laznik, D.; Ye, L.; Jurczak, M.J.; Jornayvaz, F.R. Development of insulin resistance in mice lacking PGC-1 α in adipose tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 9635–9640. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Hallberg, M.; Morganstein, D.L.; Kiskinis, E.; Shah, K.; Kralli, A.; Dilworth, S.M.; White, R.; Parker, M.G.; Christian, M. A Functional Interaction between RIP140 and PGC-1 Regulates the Expression of the Lipid Droplet Protein CIDEA. *Mol Cell Biol.* **2008**, *28*, 6785–6795. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Harms, M.J.; Ishibashi, J.; Wang, W.; Lim, H.W.; Goyama, S.; Sato, T.; Kurokawa, M.; Won, K.J.; Seale, P. Prdm16 is required for the maintenance of brown adipocyte identity and function in adult mice. *Cell Metab.* **2014**, *19*, 593–604. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Sa, N.; Ramı, B.; Catala, V.; Fru, G. Deletion of Inducible Nitric-Oxide Synthase in Leptin- Deficient Mice Improves Brown Adipose Tissue Function. *PLoS ONE* **2010**, *5*, 1–12.
58. Rocha-rodrigues, S.; Rodríguez, A.; Gouveia, A.M.; Gonçalves, I.O.; Becerril, S.; Ramírez, B.; Beleza, J.; Frühbeck, G.; Ascensão, A.; Magalhães, J. Effects of physical exercise on myokines expression and brown adipose-like phenotype modulation in rats fed a high-fat diet. *Life Sci.* **2016**, *165*, 100–108. [[CrossRef](#)]
59. Seale, P.; Conroe, H.M.; Estall, J.; Kajimura, S.; Frontini, A.; Ishibashi, J.; Cohen, P.; Cinti, S.; Spiegelman, B.M. Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *J. Clin. Investig.* **2011**, *121*, 53–56. [[CrossRef](#)]

60. Seale, P.; Kajimura, S.; Yang, W.; Chin, S.; Rohas, L.M.; Uldry, M.; Langin, D.; Spiegelman, B.M. Transcriptional Control of Brown Fat Determination by PRDM16. *Cell Metab.* **2007**, *6*, 38–54. [[CrossRef](#)]
61. Waldén, T.B.; Hansen, I.R.; Timmons, J.A.; Cannon, B.; Nedergaard, J. Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, “brite”, and white adipose tissues. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* **2012**, *302*, E19–E31.
62. Lo, K.A.; Sun, L. Turning WAT into BAT: a review on regulators controlling the browning of white adipocytes Bioscience Reports. *Biosci. Rep.* **2013**, *33*, 711–719. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Vernochet, C.; Peres, S.B.; Davis, K.E.; McDonald, M.E.; Qiang, L.; Wang, H.; Scherer, P.E.; Farmer, S.R. C/EBP and the Corepressors CtBP1 and CtBP2 Regulate Repression of Select Visceral White Adipose Genes during Induction of the Brown Phenotype in White Adipocytes by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Agonists. *Mol. Cell. Biol.* **2009**, *29*, 4714–4728. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Ohno, H.; Shinoda, K.; Spiegelman, B.M.; Kajimura, S. PPAR γ agonists induce a white-to-brown fat conversion through stabilization of PRDM16 protein. *Cell Metab.* **2012**, *15*, 395–404. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Handschin, C.; Spiegelman, B.M. Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism. *Endocr. Rev.* **2014**, *27*, 728–735. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Broeders, E.P.M.; Vijgen, G.H.E.J.; Havekes, B.; Bouvy, N.D. Thyroid Hormone Activates Brown Adipose Tissue and Increases Non-Shivering Thermogenesis—A Cohort Study in a Group of Thyroid Carcinoma Patients. *PLoS ONE* **2016**, *11*, 1–15. [[CrossRef](#)]
67. Kellen, C.; Rodrigues, C.; Pereira, R.M.; Campos, T.D.P. De The Role of Physical Exercise to Improve the Browning of White Adipose Tissue via POMC Neurons. *Front. Cell. Neurosci.* **2018**, *12*, 1–7.
68. Zhu, Y.; Gao, Y.; Tao, C.; Williams, K.W.; Lin, H.V.; Scherer, P.E.; Zhu, Y.; Gao, Y.; Tao, C.; Shao, M.; et al. Connexin 43 Mediates White Adipose Tissue Beiging by Facilitating the Propagation of Sympathetic Neuronal Signals Article Connexin 43 Mediates White Adipose Tissue Beiging by Facilitating the Propagation of Sympathetic Neuronal Signals. *Cell Metab.* **2016**, *24*, 420–433. [[CrossRef](#)]
69. Varela, L.; Horvath, T.L. Leptin and insulin pathways in POMC and AgRP neurons that modulate energy balance and glucose homeostasis. *EMBO Rep.* **2012**, *13*, 1079–1086. [[CrossRef](#)]
70. Labbé, S.M.; Caron, A.; Lanfray, D.; Monge-Rofarello, B.; Bartness, T.J.; Richard, D. Hypothalamic control of brown adipose tissue thermogenesis. *Front. Syst. Neurosci.* **2015**, *9*, 1–13. [[CrossRef](#)]
71. Sanchez-delgado, G.; Martinez-tellez, B.; Olza, J. Role of Exercise in the Activation of Brown Adipose Tissue. *Nutr. Metab.* **2015**, *67*, 21–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Hwang, I.; Park, Y.J.; Kim, Y.; Kim, Y.N.; Ka, S.; Lee, H.Y.; Seong, J.K.; Seok, Y.; Kim, J.B. Alteration of gut microbiota by vancomycin and bacitracin improves insulin resistance via glucagon-like peptide 1 in diet-induced obesity. *FASEB J.* **2015**, *29*, 2397–2411. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Qiu, Y.; Nguyen, K.D.; Odegaard, J.I.; Cui, X.; Tian, X.; Locksley, R.M.; Palmiter, R.D.; Chawla, A. Eosinophils and type 2 cytokine signaling in macrophages orchestrate development of functional beige fat. *Cell* **2014**, *157*, 1292–1308. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Vargovic, P.; Ukropec, J.; Laukova, M.; Cleary, S.; Manz, B.; Pacak, K.; Kvetnansky, R. Adipocytes as a new source of catecholamine production. *FEBS Lett.* **2011**, *585*, 2279–2284. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Schugar, R.C.; Shih, D.M.; Warriar, M.; Lusic, A.J.; Hazen, S.L.; Brown, J.M. The TMAO-Producing Enzyme Flavin-Containing Monooxygenase 3 Regulates Obesity and the Beiging of White Adipose Tissue Report The TMAO-Producing Enzyme Flavin-Containing Monooxygenase 3 Regulates Obesity and the Beiging of White Adipose Tissue. *Cell Rep.* **2017**, *19*, 2451–2461. [[CrossRef](#)]
76. Miao, J.; Ling, A.V.; Manthena, P.V.; Gearing, M.E.; Graham, M.J.; Crooke, R.M.; Croce, K.J.; Esquejo, R.M.; Clish, C.B.; Obesity, M.; et al. Flavin-containing monooxygenase 3 as a potential player in diabetes-associated atherosclerosis. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 1–10. [[CrossRef](#)]
77. Risk, T.; Zhu, W.; Gregory, J.C.; Org, E.; Brown, J.M.; Lusic, A.J.; Hazen, S.L.; Zhu, W.; Gregory, J.C.; Org, E.; et al. Gut Microbial Metabolite TMAO Enhances Platelet Article Gut Microbial Metabolite TMAO Enhances Platelet Hyperreactivity and Thrombosis Risk. *Cell* **2016**, *165*, 111–124.
78. Miao, Y.; Su, W.; Dai, Y.; Wu, W.; Huang, B.; Barros, R.P.A.; Nguyen, H.; Maneix, L.; Guan, Y.; Warner, M.; et al. An ER β agonist induces browning of subcutaneous abdominal fat pad in obese female mice. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–11. [[CrossRef](#)]
79. Szentirmai, É.; Kapás, L. The role of the brown adipose tissue in β 3-adrenergic receptor activation-induced sleep, metabolic and feeding responses. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–14. [[CrossRef](#)]

80. Nedergaard, J.; Petrovic, N.; Lindgren, E.M.; Jacobsson, A.; Cannon, B. PPAR γ in the control of brown adipocyte differentiation. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Basis Dis.-Mol. Basis Dis.* **2005**, *1740*, 293–304. [[CrossRef](#)]
81. Beck, G.R.; Khazai, N.B.; Bouloux, G.F.; Camalier, C.E.; Lin, Y.; Garneys, L.M.; Siqueira, J.; Peng, L.; Pasquel, F.; Umpierrez, D.; et al. The effects of thiazolidinediones on human bone marrow stromal cell differentiation in vitro and in thiazolidinedione-treated patients with type 2 diabetes. *Transl. Res.* **2013**, *161*, 145–155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Wilson-fritch, L.; Nicoloso, S.; Chouinard, M.; Lazar, M.A.; Chui, P.C.; Leszyk, J.; Straubhaar, J.; Czech, M.P.; Corvera, S. Mitochondrial remodeling in adipose tissue associated with obesity and treatment with rosiglitazone. *J. Clin. Investig.* **2004**, *114*, 1281–1289. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Park, J.; Morley, T.S.; Kim, M.; Clegg, D.J.; Scherer, P.E. Obesity and cancer—Mechanisms underlying tumour progression and recurrence. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2014**, *10*, 455–465. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Kershaw, E.E.; Flier, J.S. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2018**, *89*, 2548–2556. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Li, C.; Xu, M.M.; Wang, K.; Adler, A.J.; Vella, A.T.; Zhou, B. Macrophage polarization and meta-inflammation. *Transl. Res.* **2018**, *191*, 29–44. [[CrossRef](#)]
86. Sica, A.; Larghi, P.; Mancino, A.; Rubino, L.; Porta, C.; Totaro, M.G.; Rimoldi, M.; Biswas, S.K.; Allavena, P.; Mantovani, A. Macrophage polarization in tumour progression. *Semin. Cancer Biol.* **2008**, *18*, 349–355. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. De Pergola, G.; Silvestris, F. Obesity as a major risk factor for cancer. *J. Obes.* **2013**, *2013*. [[CrossRef](#)]
88. Weisberg, S.P.; Mccann, D.; Desai, M.; Rosenbaum, M.; Leibel, R.L.; Ferrante, A.W. Obesity is associated with macrophage accumulation. *J. Clin. Investig.* **2003**, *112*, 1796–1808. [[CrossRef](#)]
89. Ribeiro, R.; Monteiro, C.; Catalán, V.; Hu, P.; Cunha, V.; Rodríguez, A.; Gómez-ambrosi, J.; Fraga, A.; Príncipe, P.; Lobato, C.; et al. Obesity and prostate cancer: gene expression signature of human periprostatic adipose tissue. *BMC Med.* **2012**, *10*, 1–13. [[CrossRef](#)]
90. Himbert, C.; Delphan, M.; Scherer, D.; Bowers, L.W.; Hursting, S.; Ulrich, C.M. Signals from the Adipose Microenvironment and the Obesity–Cancer Link—A Systematic Review. *Cancer Prev. Res.* **2017**, *10*, 494–506. [[CrossRef](#)]
91. Dirat, B.; Bochet, L.; Dabek, M.; Daviaud, D.; Dauvillier, S.; Majed, B.; Wang, Y.Y.; Meulle, A.; Salles, B.; Le Gonidec, S.; et al. Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 2455–2465. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Santander, A.M.; Lopez-Ocejo, O.; Casas, O.; Agostini, T.; Sanchez, L.; Lamas-Basulto, E.; Carrio, R.; Cleary, M.P.; Gonzalez-Perez, R.R.; Torroella-Kouri, M. Paracrine interactions between adipocytes and tumor cells recruit and modify macrophages to the mammary tumor microenvironment: the role of obesity and inflammation in breast adipose tissue. *Cancers* **2015**, *7*, 143–178. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Rodríguez, A.; Ezquerro, S.; Méndez-giménez, L.; Becerril, S.; Frühbeck, G. Revisiting the adipocyte: a model for integration of cytokine signaling in the regulation of energy metabolism. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* **2015**, *309*, 691–714.
94. Rogers, N.H.; Li, J.W.P.; Strissel, K.J.; Obin, M.S.; Greenberg, A.S. Reduced Energy Expenditure and Increased Inflammation Are Early Events in the Development of Ovariectomy-Induced Obesity. *Endocrinology* **2009**, *150*, 2161–2168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Qian, B.; Pollard, J.W. Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. *Cell* **2010**, *141*, 39–51. [[CrossRef](#)]
96. Weisberg, S.P.; Hunter, D.; Huber, R.; Lemieux, J.; Slaymaker, S.; Vaddi, K.; Charo, I.; Leibel, R.L.; Jr, A.W.F. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J. Clin. Investig.* **2006**, *116*, 115–124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Nishimoto, S.; Fukuda, D.; Higashikuni, Y.; Tanaka, K.; Hirata, Y.; Murata, C.; Kim-Kaneyama, J.-R.; Sato, F.; Bando, M.; Yagi, S.; et al. Obesity-induced DNA released from adipocytes stimulates chronic adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Sci. Adv.* **2016**, *2*, 1–11. [[CrossRef](#)]
98. Boutens, L.; Stienstra, R. Adipose tissue macrophages: going off track during obesity. *Diabetologia* **2016**, *59*, 879–894. [[CrossRef](#)]

99. Nieman, K.M.; Romero, I.L.; Van Houten, B.; Lengyel, E. Biochimica et Biophysica Acta Adipose tissue and adipocytes support tumorigenesis and metastasis. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Mol. Cell Biol. Lipids* **2013**, *1831*, 1533–1541. [[CrossRef](#)]
100. Growth, C. Obesity-Activated Adipose-Derived Stromal Cells Promote Breast. *Neoplasia* **2018**, *20*, 1161–1174.
101. Levental, K.R.; Yu, H.; Kass, L.; Lakins, J.N.; Ertler, J.T.; Fong, S.F.T.; Csiszar, K.; Giaccia, A.; Yamauchi, M.; Gasser, D.L.; et al. Matrix Crosslinking Forces Tumor Progression by Enhancing Integrin signaling. *Cell* **2009**, *139*, 891–906. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Tanaka, M.; Ikeda, K.; Suganami, T.; Komiya, C.; Ochi, K.; Shirakawa, I.; Hamaguchi, M.; Nishimura, S.; Manabe, I.; Matsuda, T.; et al. Macrophage-inducible C-type lectin underlies obesity-induced adipose tissue fibrosis. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Zhang, T.; Tseng, C.; Zhang, Y.; Sirin, O.; Corn, P.G.; Li-ning-tapia, E.M.; Troncoso, P.; Davis, J.; Pettaway, C.; Ward, J.; et al. CXCL1 mediates obesity-associated adipose stromal cell trafficking and function in the tumour microenvironment. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 1–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Su, F.; Ahn, S.; Saha, A.; Digiovanni, J.; Kolonin, M.G. Adipose stromal cell targeting suppresses prostate cancer epithelial-mesenchymal transition and chemoresistance. *Oncogene* **2018**, *38*, 1979–1988. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Paino, F.; La Noce, M.; Di Nucci, D.; Nicoletti, G.F.; Salzillo, R.; De Rosa, A.; Ferraro, G.A.; Papaccio, G.; Desiderio, V.; Tirino, V. Human adipose stem cell differentiation is highly affected by cancer cells both in vitro and in vivo: Implication for autologous fat grafting. *Cell Death Dis.* **2017**, *8*, e2568-10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Uddin, S.; Hussain, A.R.; Siraj, A.K.; Khan, O.S.; Bavi, P.P.; Al-Kuraya, K.S. Role of leptin and its receptors in the pathogenesis of thyroid cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2011**, *4*, 637–643. [[PubMed](#)]
107. Brennan, A.M.; Mantzoros, C.S. Drug Insight: The role of leptin in human physiology and pathophysiology—Emerging clinical applications. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* **2006**, *2*, 318–327. [[CrossRef](#)]
108. Zhao, Y.; Sun, R.; You, L.; Gao, C.; Tian, Z. Expression of leptin receptors and response to leptin stimulation of human natural killer cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *300*, 247–252. [[CrossRef](#)]
109. Ortega-molina, A.; Efeyan, A.; Lopez-guadamillas, E.; Mun, M.; Mulero, F.; Pastor, J.; Martinez, S.; Romanos, E.; Gonzalez-barroso, M.M. Pten Positively Regulates Brown Adipose Function, Energy Expenditure, and Longevity. *Cell Metab.* **2010**, *15*, 382–394. [[CrossRef](#)]
110. Kir, S.; Spiegelman, B.M. Cachexia and Brown Fat: A Burning Issue in Cancer. *Trends Cancer* **2016**, *2*, 461–463. [[CrossRef](#)]
111. Vaitkus, J.A.; Celi, F.S. The role of adipose tissue in cancer-associated cachexia. *Exp. Biol. Med.* **2017**, *242*, 473–481. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Apostoli, A.J.; Skelhorne-Gross, G.E.A.; Rubino, R.E.; Peterson, N.T.; Di Lena, M.A.; Schneider, M.M.; SenGupta, S.K.; Nicol, C.J.B. Loss of PPAR γ expression in mammary secretory epithelial cells creates a pro-breast tumorigenic environment. *Int. J. Cancer* **2014**, *134*, 1055–1066. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Goodwin, P.J.; Stambolic, V. Impact of the Obesity Epidemic on Cancer. *Annu. Rev. Med.* **2015**, *66*, 281–296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Petruzzelli, M.; Schweiger, M.; Schreiber, R.; Campos-Olivas, R.; Tsoli, M.; Allen, J.; Swarbrick, M.; Rose-John, S.; Rincon, M.; Robertson, G.; et al. A Switch from White to Brown Fat Increases Energy Expenditure in Cancer-Associated Cachexia. *Cell Metab.* **2014**, *20*, 433–447. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

