



**Universidade de Brasília – UnB**

**Faculdade de Medicina – FM**

**Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular**

**O PAPEL DOS TECIDOS ADIPOSOS EM CONJUNTO COM A  
VITAMINA E DELTA TOCOTRIENOL NA MODULAÇÃO DOS  
PARÂMETROS CARCINOGENÉTICOS DE CÉLULAS DO CÂNCER  
DE MAMA TRIPLO-NEGATIVO**

Igor de Oliveira Santos

Orientadora:

Kelly Grace Magalhães

Brasília

Abril de 2022



**Universidade de Brasília Faculdade de Medicina**

**Programa de Pós-Graduação  
em Patologia Molecular**

**O PAPEL DOS TECIDOS ADIPOSOS EM CONJUNTO COM A  
VITAMINA E DELTA TOCOTRIENOL NA MODULAÇÃO DOS  
PARÂMETROS CARCINOGENÉTICOS DE CÉLULAS DO CÂNCER  
DE MAMA TRIPLO-NEGATIVO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
graduação em Patologia Molecular como  
requisitos para obtenção do título de Mestre em  
Patologia Molecular – Imunologia.

**Linha de pesquisa:** Imunomodulação e carcinogênese

**Nome do aluno:** Igor de Oliveira Santos

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup> Dra. Kelly Grace Magalhães

Brasília

Abril de 2022

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

de Oliveira Santos, Igor  
ds237p O papel dos tecidos adiposos em conjunto com a Vitamina  
E delta tocotrienol na modulação dos parâmetros  
carcinogênicos de células do câncer de mama triplo-  
negativo / Igor de Oliveira Santos; orientador Kelly Grace  
Magalhães. -- Brasília, 2022.  
99 p.

dissertação (Mestrado - Mestrado em patologia Molecular)  
- Universidade de Brasília, 2022.

1. Câncer de mama triplo-negativo. 2. Delta tocotrienol.  
3. Vitamina E. 4. Tecido Adiposo. 5. Câncer de mama. I.  
Grace Magalhães, Kelly, orient. II. Título.

Este trabalho é dedicado a você familiar, amigo que acreditou em mim e contribuiu muito na minha caminhada. Em especial dedico aos cientistas do Brasil que não conseguem fazer ciência por falta de investimento.

“Quanto mais Sabemos, melhor nós percebemos que nosso conhecimento é uma pequena ilha no meio de um oceano de ignorância”.

Theodosius Dobzhansky

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente aos meus pais que sempre acreditaram em mim e fizeram de tudo para que eu pudesse conseguir alcançar meus objetivos. Desde que escolhi ser cientista, eles me apoiaram e me deram forças para que eu pudesse seguir meu sonho mesmo sem condições financeiras.

A minha amiga e orientadora Kelly Magalhães, por ter me acolhido desde 2015 na Iniciação Científica até agora no Mestrado. Agradeço por ter enxergado um potencial em mim e acreditado em mim, por ter me ensinado absolutamente tudo o que sei sobre ser cientista e pesquisador. Por momentos de partilha, nos momentos ruins e nos bons. Agradeço e tenho orgulho dessa mulher cientista que mostra seu potencial e faz com que nós nos empoderamos com nosso potencial.

Agradeço ao amigo Gabriel Pasquarelli, que foi meu parceiro em todos os momentos no laboratório me fazendo sempre acreditar em mim e me dando forças nos momentos mais difíceis que passei pelo decorrer da pós graduação. Nos ajudamos bastante e nunca esquecerei os nossos momentos de parceria e nossas madrugadas de experimentos, que foram especiais.

Ao meu amigo Rafael Corrêa, que me auxiliou desde que entrei no Laboratório e que foi uma pessoa muito importante para meu crescimento pessoal e profissional. Passamos por momentos incríveis e momentos difíceis e isso foi muito especial.

A minha amiga Dalila Ribeiro, que foi muito especial durante a minha o meu crescimento profissional e científico e sempre me cobrava os Westerns Blottings. Sempre serei grato por tudo.

As minhas amigas Heloísa e Sabrina, que foram pessoas excepcionais, que foram presentes que ganhei durante minha estadia no Laboratório. Agradeço por todos os momentos de conversas científicas e momentos de descontração. Vocês são cientistas incríveis e acredito no potencial imenso de vocês.

Aos meus amigos Nathália, Marina e Gabriel, que foram muito importantes no final do meu mestrado. Agradeço pelos momentos de conversas e descontração no laboratório, obrigado por me auxiliarem nesse momento difícil que estou passando atualmente.

Aos meus amigos do Laboratório de Imunologia e Inflamação – LIMI, Raquel Almeida, Débora Santos, Milena Nascimento, Ana Júlia, Gabriel Calixto, Ramon Buson, Julia Perin e Fernanda Lago, por todos os momentos e aprendizados compartilhados, cada um de vocês deixou lembranças e serei eternamente grato pela colaboração de todos vocês como uma segunda família.

A todos os colegas que passaram pelo LIMI e que me ajudaram durante o Mestrado e durante minha construção de cientista, Livia Sant'Ana, Luís Corrêa, Ravena Maia, Victor Cardoso, Gabriel Freire, Lucas Brandão, Victória Machado, Carine, Junior, Lucinalva, Júlia, José Assumpção, Gabriel Henrique e Augusto César.

Agradeço aos meus amigos que foram especialmente essenciais durante minha trajetória científica desde a graduação de Biologia, Waira Machida, Paris dos Santos, Fabiana Sousa, Marcus Vinicius, Lara Liz, José Henrique e Felipe Brasil por serem os melhores amigos que a Biologia poderia me conceder, obrigado por acreditarem sempre em mim e pela parceria de sempre.

Agradeço também a minha gata Amélia, que é minha parceira diária e sempre está comigo mesmo quando eu estou mal. Eu serei grato e cuidarei de você até o seu último dia.

Por fim, e o mais importante, meu marido Rafael Silva Alves (Frotgar), por sempre acreditar em mim, me dar suporte, carinho, cuidado, e me esperar mesmo que longe. Mesmo que as coisas não dando certo como gostaria.

Agradeço Diretoria de Desenvolvimento Social (DDS) por ter me proporcionado auxílio socioeconômico durante toda minha trajetória acadêmica. Sem este auxílio provavelmente eu não teria conseguido concluir meus estudos.

Agradeço a CAPES que proporcionou minha bolsa de mestrado durante toda a realização do trabalho.

A todos os camundongos que foram utilizados para desenvolver este trabalho, sem a eutnásia de vocês não seria possível a realização deste trabalho.

A Universidade de Brasília por ter sido minha segunda casa, por ter me proporcionado momentos incríveis, me fazer amadurecer como pessoa e como cientista, conhecer pessoas

incríveis que levarei para a vida, não poderia ter escolhido melhor lugar para me formar como biólogo e me tornar mestre.



## Sumário

Resumo.....	1
Abstract .....	2
Lista de abreviações .....	3
Lista de figuras .....	4
1. Introdução .....	13
1.1. Câncer de mama.....	13
1.2. <b>Tecido Adiposo e Câncer de Mama</b> .....	16
1.3. <b>Vitamina E e Câncer de Mama</b> .....	22
2. Justificativa .....	25
3. Objetivos .....	26
3.1. Objetivo geral.....	26
3.2. <b>Objetivos específicos</b> .....	26
4. Metodologia .....	27
4.1.) <b>Linhagem de células neoplásicas</b> .....	27
4.2) <b>Acondicionamento e manejo dos animais</b> .....	27
4.3) <b>Experimentação <i>in vitro</i></b> .....	27
4.3.1) <b>Delineamento experimental</b> .....	27
4.3.2) <b>Obtenção do meio condicionado para estímulo e tempo de tratamento das células</b> 28	
4.3.3) <b>Delta-Tocotrienol (<math>\delta</math>-T3)</b> .....	29
4.3.3) <b>Viabilidade mitocondrial</b> .....	29
4.3.4) <b>Citotoxicidade Celular pela Liberação de LDH</b> .....	30
4.3.5) <b>Perfil de morte celular</b> .....	30
4.3.6) <b>Morte por Apoptose (Caspase 3 e BAX)</b> .....	31

4.3.7) Níveis de LC3B e Acidificação Lisossomal.....	31
4.3.7.1) Níveis de LC3B.....	31
4.3.7.2) Acidificação Lisossomal .....	32
4.3.8) Perfil de Secreção de Citocinas.....	33
4.3.9) Espécies Reativas de Oxigênio.....	33
4.3.10) Biogênese de Corpúsculo lipídico.....	33
4.3.11) Proliferação celular .....	34
4.3.12) Apresentação de Antígeno Lipídico .....	34
4.4. Experimentação <i>ex vivo</i> .....	35
4.4.1) Delineamento experimental .....	35
4.4.2) Pesagem dos animais .....	37
4.4.3) Análise da Citogenotoxicidade dos animais .....	37
4.4.4) Análise da Viabilidade Mitocondrial .....	38
4.4.5) Análise do Perfil de Morte Celular por Anexina/PI.....	38
4.4.6) Análise do perfil de citocinas dos soros dos animais.....	39
4.4.7) Análise da Proliferação Celular por meio do CFSE.....	39
4.5) Análise estatística e confecção de gráficos .....	39
5. Resultados .....	41
5.1) Análises <i>in vitro</i> .....	41
5.1.1) Efeito de moléculas secretadas por tecidos adiposos juntamente ao $\delta$ -Tocotrienol sobre a viabilidade mitocondrial das células 4T1.....	41
5.1.2) Efeito de moléculas secretadas por tecidos adiposos juntamente ao $\delta$ -Tocotrienol sobre a citotoxicidade das células 4T1.....	43
5.1.3) Efeito de moléculas secretadas por tecidos adiposos juntamente ao $\delta$ -Tocotrienol sobre o perfil de morte celular das células 4T1 .....	45
5.1.4) Efeito de moléculas secretadas por tecidos adiposos juntamente ao $\delta$ -	

<b>Tocotrienol sobre os níveis de Caspase 3 e Bax nas células 4T1.....</b>	<b>48</b>
<b>5.1.4) Efeito de moléculas secretadas por tecidos adiposos juntamente ao <math>\delta</math>- Tocotrienol sobre os níveis de LC3B e Acidificação Lisossomal de células 4T1 .....</b>	<b>50</b>
.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>5.1.5) Efeito de moléculas secretadas por tecidos adiposos juntamente ao <math>\delta</math>- Tocotrienol sobre os níveis de secreção de Citocinas e Quimiocinas de células 4T1.....</b>	<b>53</b>
<b>5.1.6) Efeito de moléculas secretadas por tecidos adiposos juntamente ao <math>\delta</math>- Tocotrienol sobre a formação de Espécies Reativas de Oxigênio de células 4T1 .....</b>	<b>57</b>
.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>5.1.7) Efeito de moléculas secretadas por tecidos adiposos juntamente ao <math>\delta</math>- Tocotrienol sobre os níveis de Biogênese de Corpúsculos Lipídicos de células 4T1 .....</b>	<b>59</b>
<b>5.1.8) Influência de moléculas secretadas por tecidos adiposos juntamente ao <math>\delta</math>- Tocotrienol sobre a proliferação de células 4T1 .....</b>	<b>61</b>
<b>5.1.9) Efeito de moléculas secretadas por tecidos adiposos juntamente ao <math>\delta</math>-T3 sobre os níveis da molécula apresentadora de antígenos lipídicos de células 4T1 .....</b>	<b>62</b>
<b>5.2) Análises <i>ex vivo</i> .....</b>	<b>63</b>
<b>5.2.1) Avaliação da citogenotoxicidade sobre a ingestão de Tocotrienol.....</b>	<b>63</b>
<b>5.2.2) Influência de moléculas secretadas por tecidos adiposos modulados pela suplementação de Tocotrienol sobre a viabilidade mitocondrial das células 4T1.....</b>	<b>64</b>
.....	<b>66</b>
<b>5.2.4) Efeito de moléculas secretadas por tecidos adiposos modulados por animais tratados e não tratados com Tocotrienol sobre o perfil proliferação das células 4T1 ...</b>	<b>66</b>
<b>5.2.5) Efeito de citocinas secretadas por animais tratados e não tratados com Tocotrienol</b>	<b>67</b>
6. Discussão .....	69
7. Conclusão.....	75
8. Referências bibliográficas .....	77
9. Anexos .....	84

<b>I. Produções aceitas para publicação .....</b>	<b>84</b>
---	-----------

## **Resumo**

O papel dos tecidos adiposos em conjunto com a Vitamina E delta tocotrienol na modulação de parâmetros carcinogênicos de células do câncer de mama triplo-negativo

**Introdução:** Tumores do tipo triplo-negativo mostram-se mais agressivos e tendem a apresentar efeitos metastáticos letais. Os hábitos de vida e a globalização estão diretamente ligadas com o aumento do índice desta neoplasia. O tecido adiposo é um órgão endócrino, que tem funções além de armazenamento de energia e também de secreção de adipocinas para outros órgãos e tecidos adjacentes. Já se sabe que os tecidos adiposos podem polarizar para perfis pró- ou anti-inflamatórios dependendo da condição do ambiente desse tecido (hiperplasia e hipertrofia). O tecido adiposo como um órgão endócrino também armazena diversas outras moléculas e uma delas é a Vitamina E, que possui oito isoformas divididas entre tocoferóis e tocotrienóis ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ ). Já foi descrito que a Vitamina E tem poder antioxidante assim como antitumoral em diversos tipos de tumores. No presente trabalho avaliamos o papel dos tecidos adiposos em conjunto com o delta-tocotrienol na modulação de parâmetros carcinogênicos de células de mama. **Metodologia:** Utilizamos células de câncer de mama triplo-negativo 4T1, sobrenadantes de tecidos adiposos gonadal (gonWAT), inguinal (igWAT) e marrom (BAT), e o  $\delta$ -T3 (Delta-Tocotrienol) em diferentes concentrações. **Resultados e Discussão:** Visando a importância do co-tratamento dos produtos de sobrenadantes de tecidos adiposos juntamente com o  $\delta$ -T3 células de câncer de mama murino co-tratada com produtos de secreção de tecidos adiposos e  $\delta$ -T3 observamos que tiveram uma diminuição da viabilidade mitocondrial. Além disso, o co-tratamento com produtos de secreção de tecidos adiposos juntamente com o  $\delta$ -T3 aumentou significativamente a citotoxicidade celular o que levou também a uma morte por apoptose evidenciada. Descobrimos também a maior ativação da Caspase-3, mostrando o papel diferencial do co-tratamento dos sobrenadantes de tecidos adiposos juntamente com o  $\delta$ -T3. Além disso, as células co-tratadas com moléculas secretadas de igWAT com  $\delta$ -T3, tiveram ativação de apoptose maior, além da biogênese de corpúsculos lipídicos reduzida e a formação de espécies reativas de oxigênio também reduzida. Portanto, nossos dados sugerem que o co-tratamento de produtos de secreção de igWAT juntamente com  $\delta$ -T3, ativam vias de morte por apoptose além de induzir efeito antitumoral que desfavorece o microambiente tumoral, por aumentar a imunogenicidade.

**Palavras-chave:** Câncer de mama triplo-negativo,  $\delta$ -T3, Vitamina E, Tecido Adiposo

## **Abstract**

The role of adipose tissues together with vitamin E (delta tocotrienol) in modulating carcinogenic parameters of triple-negative breast cancer cells

**Introduction:** Tumors of the triple-negative type are more aggressive and tend to have lethal metastatic effects. Lifestyle and globalization are directly linked to the increase in the rate of this neoplasm. Adipose tissue is an endocrine organ, which has functions beyond energy storage and also secretion of adipokines to other organs and adjacent tissues. It is already known that adipose tissue can polarize to pro- or anti-inflammatory profiles depending on the condition of the environment of that tissue (hyperplasia and hypertrophy). Adipose tissue as an endocrine organ also stores several other molecules and one of them is Vitamin E, which has eight isoforms divided between tocopherols and tocotrienols ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  and  $\delta$ ). Vitamin E has already been described to have antioxidant as well as antitumor power in several types of tumors. In the present work we evaluated the role of adipose tissues in conjunction with delta-tocotrienol in modulating carcinogenic parameters of breast cells. **Methods:** We used triple-negative 4T1 breast cancer cells, supernatants from gonadal (gonWAT), inguinal (igWAT) and brown (BAT) adipose tissues, and  $\delta$ -T3 (Delta-Tocotrienol) at different concentrations. **Results and Discussion:** Aiming at the importance of co-treating adipose tissue supernatant products along with  $\delta$ -T3 murine breast cancer cells co-treated with adipose tissue secretion products and  $\delta$ -T3 we observed that they had a decrease in mitochondrial viability. Furthermore, co-treatment with adipose tissue secretion products along with  $\delta$ -T3 significantly increased cellular cytotoxicity which also led to an evidenced apoptosis death. We also discovered the increased activation of Caspase-3, showing the differential role of co-treatment of adipose tissue supernatants along with  $\delta$ -T3. Furthermore, cells co-treated with secreted igWAT molecules with  $\delta$ -T3, had higher apoptosis activation, in addition to reduced lipid body biogenesis and reduced reactive oxygen species formation as well. Therefore, our data suggest that co-treatment of igWAT secretion products together with  $\delta$ -T3, activate apoptosis death pathways in addition to inducing antitumor effect that disadvantages the tumor microenvironment by increasing immunogenicity.

**Keywords:** Triple-negative breast cancer,  $\delta$ -T3, Vitamin E, Adipose tissue

## **Lista de abreviações**

BAT: tecido adiposo marrom

gonWAT: tecido adiposo branco gonadal

igWAT: tecido adiposo inguinal

HER: *Human epidermal growth factor receptor*

IL-6: Interleucina 6

IL-10: Interleucina 10

IL-12: Interleucina 12

iNKT: Células T matadoras naturais invariáveis

LDL: lipoproteína de baixa densidade

NADH: dinucleótido de nicotinamida e adenina em forma reduzida

NRF2: *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*

PGC-1 $\alpha$ : *peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$*

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

SIRT6: sirtuínas

TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral

TGF- $\beta$ : Fator de crescimento e transformação

UCP1: Proteína desacopladora 1

## **Lista de figuras**

**Figura 1. Subtipos dos cânceres de mama.** Os subtipos de cancro da mama podem ser categorizados com base na sua expressão de receptores hormonais (receptor de estrogénio (ER) e receptor de progesterona (PR)), o marcador de proliferação Ki-67, e o receptor de tirosina quinase HER2. Terapias específicas, como a Herceptina (destinada à proteína HER2) e o Tamoxifeno (destinada à ER), podem ser utilizadas no tratamento de certos subtipos de câncer da mama. O prognóstico varia em função do subtipo de cancro da mama. Adaptado do Biorender™ ..... 16

**Figura 2. Diferentes tipos de células adiposas e sua influência 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 Magalhães. Cells, 2019..... 17

**Figura 3. 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. 19

**Figura 4. Os quatro principais adipócitos.** 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..... 21

**Figura 5. As oito isoformas da Vitamina E.** Os grupos metil dentro do anel cromanol determinam qual é a isoforma da vitamina: alfa, gama, beta ou delta (realçado em preto). As setas apontam para os centros quirais onde são localizadas as caudas fitil e farnesilo dos tocoferóis e tocotrienóis respectivamente. Uma cauda insaturada distingue os tocotrienóis da cauda saturada das isoformas dos tocoferóis. (Adaptado de Cardenas e Ghosh, Vitamin E: A dark horse at the crossroad of cancer management, 2013)..... 22



**Figura 6. Propriedades anticancerígenas dos Tocotrienóis.** Fonte: Molecular Mechanisms of Action of Tocotrienols in Cancer: Recent Trends and Advancements Int. J. Mol. Sci. 2019, 20, 656; doi:10.3390/ijms20030656 ..... 24

**Figura 7. Delineamento Experimental da Seção Ex vivo.** Camundongos fêmeas Balb/C com 10 semanas de vida foram eutanasiadas e posteriormente utilizados os tecidos adiposos Branco (gonadal - gonWAT e inguinal – igWAT) e Marrom (BAT). Foram confeccionados meios condicionados dos tecidos adiposos para posterior estímulo. Juntamente aos sobrenadantes dos tecidos adiposos, foram utilizados o Delta tocotrienol ( $\delta$ -T3). Células de câncer de mama triplo-negativo 4T1 foram estimuladas com os produtos de secreção de tecidos adiposos juntamente com o  $\delta$ -T3 e posteriormente foram feitas análises de Citometria de fluxo, espectrofotometria, Western Blotting e Microscópicas ..... 28

**Figura 8. Delineamento experimental da seção in vivo.** Camundongos fêmeas Balb/C com 10 semanas de vida foram segregados em dois grupos (tratado com Tocotrienol e não tratados) e posteriormente eutanasiadas e em seguida utilizados os tecidos adiposos Branco (gonadal - gonWAT e inguinal – igWAT) e Marrom (BAT). Foram confeccionados meios condicionados dos tecidos adiposos para posterior estímulo. Células de câncer de mama triplo-negativo 4T1 foram estimuladas com os produtos de secreção de tecidos adiposos e posteriormente foram feitas análises de Citometria de fluxo e Espectrofotometria..... 36

**Figura 9. Influência de moléculas secretadas por tecidos adiposos juntamente com o  $\delta$ -T3 sobre a viabilidade mitocondrial das células 4T1.** Células 4T1 foram avaliadas quanto à viabilidade mitocondrial, após estímulo com produtos de secreção de tecidos adiposos por (A) tecido adiposo branco gonadal e (B) tecido adiposo branco inguinal e (C) tecido adiposo marrom juntamente com  $\delta$ -T3. Cada grupo experimental possuía cinco animais (N=5). Resultados referentes à uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi representada com asteriscos (\*) e as diferenças entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra:  $p>0,05$  (um símbolo),  $p>0,01$  (dois símbolos) e  $p>0,001$  (três símbolos)..... 42

**Figura 10. Influência do co-tratamento de produtos de secreção de tecidos adiposos juntamente com o  $\delta$ -T3 sobre a citotoxicidade celular das células 4T1.** Células 4T1 foram avaliadas quanto à citotoxicidade celular pela liberação de LDH, após estímulo com produtos de secreção de tecidos adiposos por (A) tecido adiposo branco gonadal e (B) tecido adiposo branco

inguinal e (C) tecido adiposo marron juntamente com  $\delta$ -T3. Cada grupo experimental possuía cinco animais (N=5). Resultados referentes à uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi representada com asteriscos (\*) e as diferenças entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra:  $p>0,05$  (um símbolo),  $p>0,01$  (dois símbolos) e  $p>0,001$  (três símbolos).

..... 44

**Figura 11. Influência do co-tratamento de produtos de secreção de tecidos adiposos juntamente com o  $\delta$ -T3 sobre o perfil de morte celular das células 4T1.** Células 4T1 foram avaliadas quanto ao perfil de morte celular pelo ensaio de Anexina V e PI por citometria de fluxo, após estímulo com produtos de secreção de tecidos adiposos juntamente com  $\delta$ -T3 (A) 20 $\mu$ M de  $\delta$ -Tocotrienol e (B) 40 $\mu$ M de  $\delta$ -Tocotrienol. Cada grupo experimental possuía cinco animais (N=5). Resultados referentes à uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi representada com asteriscos (\*) e as diferenças entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra:  $p>0,05$  (um símbolo),  $p>0,01$  (dois símbolos) e  $p>0,001$  (três símbolos). 46

**Figura 12. Influência do co-tratamento de produtos de secreção de tecidos adiposos juntamente com o  $\delta$ -T3 sobre o perfil de apoptose das células 4T1.** Células 4T1 foram avaliadas quanto ao perfil de apoptose pelo ensaio de Anexina V e PI por citometria de fluxo, após estímulo com produtos de secreção de tecidos adiposos por (A) tecido adiposo branco gonadal e (B) tecido adiposo branco inguinal e (C) tecido adiposo marron juntamente com  $\delta$ -T3. Cada grupo experimental possuía cinco animais (N=5). Resultados referentes à uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi representada com asteriscos (\*) e as diferenças entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra:  $p>0,05$  (um símbolo),  $p>0,01$  (dois símbolos) e  $p>0,001$  (três símbolos). ..... 47

**Figura 13. Influência do co-tratamento de produtos de secreção de tecidos adiposos juntamente com o  $\delta$ -T3 sobre os níveis de Caspase 3 das células 4T1.** Células 4T1 foram avaliadas quanto ao perfil de níveis de Caspase 3, após estímulo com produtos de secreção de tecidos adiposos por (A) tecido adiposo branco gonadal e (B) tecido adiposo branco inguinal e (C) tecido adiposo marron juntamente com  $\delta$ -T3. Cada grupo experimental possuía cinco animais (N=5). Resultados referentes à uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi representada com asteriscos (\*) e as diferenças entre grupos que não

são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra:  $p>0,05$  (um símbolo),  $p>0,01$  (dois símbolos) e  $p>0,001$  (três símbolos). 49

**Figura 14. Influência do co-tratamento de produtos de secreção de tecidos adiposos juntamente com o  $\delta$ -T3 sobre os níveis de BAX das células 4T1.** Células 4T1 foram avaliadas quanto ao perfil de níveis de BAX, após estímulo com produtos de secreção de tecidos adiposos por (A) tecido adiposo branco gonadal e (B) tecido adiposo branco inguinal e (C) tecido adiposo marron juntamente com  $\delta$ -T3. Cada grupo experimental possuía cinco animais (N=5). Resultados referentes à uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi representada com asteriscos (\*) e as diferenças entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra:  $p>0,05$  (um símbolo),  $p>0,01$  (dois símbolos) e  $p>0,001$  (três símbolos)..... 49

**Figura 15. Influência do co-tratamento de produtos de secreção de tecidos adiposos juntamente com o  $\delta$ -T3 sobre os níveis de LC3B das células 4T1.** Células 4T1 foram avaliadas quanto ao perfil de níveis de LC3B, após estímulo com produtos de secreção de tecidos adiposos por (A) tecido adiposo branco gonadal e (B) tecido adiposo branco inguinal e (C) tecido adiposo marron juntamente com  $\delta$ -T3. Cada grupo experimental possuía cinco animais (N=5). Resultados referentes à uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi representada com asteriscos (\*) e as diferenças entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra:  $p>0,05$  (um símbolo),  $p>0,01$  (dois símbolos) e  $p>0,001$  (três símbolos)..... 51

**Figura 16. Influência do co-tratamento de produtos de secreção de tecidos adiposos juntamente com o  $\delta$ -T3 sobre os níveis de Acidificação Lisossomal por Laranja de Acridina das células 4T1.** Células 4T1 foram avaliadas quanto ao perfil de níveis de Laranja de Acridina, após estímulo com produtos de secreção de tecidos adiposos por (A) tecido adiposo branco gonadal e (B) tecido adiposo branco inguinal e (C) tecido adiposo marron juntamente com  $\delta$ -T3. Cada grupo experimental possuía cinco animais (N=5). Resultados referentes à uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi representada com asteriscos (\*) e as diferenças entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra:  $p>0,05$  (um símbolo),  $p>0,01$  (dois símbolos) e  $p>0,001$  (três símbolos). ..... 52

**Figura 17. Influência do co-tratamento de produtos de secreção de tecidos adiposos juntamente com o  $\delta$ -T3 sobre os níveis de secreção de citocinas pró-inflamatórias por células 4T1.** Sobrenadantes de células 4T1 foram avaliadas quanto ao perfil de secreção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-12 e TNF- $\alpha$ ), após estímulo com produtos de secreção de tecidos adiposos por (A, D e G) tecido adiposo branco gonadal e (B, E e H) tecido adiposo branco inguinal e (C, F e I) tecido adiposo marron juntamente com  $\delta$ -T3. Cada grupo experimental possuía cinco animais (N=5). Resultados referentes à uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi representada com asteriscos (\*) e as diferenças entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra:  $p > 0,05$  (um símbolo),  $p > 0,01$  (dois símbolos) e  $p > 0,001$  (três símbolos). 55

**Figura 18. Influência do co-tratamento de produtos de secreção de tecidos adiposos juntamente com o  $\delta$ -T3 sobre os níveis de secreção da quimiocina MCP1 por células 4T1.** Sobrenadantes de células 4T1 foram avaliadas quanto ao perfil de secreção da quimiocina MCP1 após estímulo com produtos de secreção de tecidos adiposos por (A) tecido adiposo branco gonadal e (B) tecido adiposo branco inguinal e (C) tecido adiposo marron juntamente com  $\delta$ -T3. Cada grupo experimental possuía cinco animais (N=5). Resultados referentes à uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi representada com asteriscos (\*) e as diferenças entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra:  $p > 0,05$  (um símbolo),  $p > 0,01$  (dois símbolos) e  $p > 0,001$  (três símbolos). 55

**Figura 19. Influência do co-tratamento de produtos de secreção de tecidos adiposos juntamente com o  $\delta$ -T3 sobre os níveis de secreção de citocinas anti-inflamatórias por células 4T1.** Sobrenadantes de células 4T1 foram avaliadas quanto ao perfil de secreção de citocinas pró-inflamatórias (IL-10 e TGF- $\beta$ ), após estímulo com produtos de secreção de tecidos adiposos por (A e D) tecido adiposo branco gonadal e (B e E) tecido adiposo branco inguinal e (C e F) tecido adiposo marron juntamente com  $\delta$ -T3. Cada grupo experimental possuía cinco animais (N=5). Resultados referentes à uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi representada com asteriscos (\*) e as diferenças entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra:  $p > 0,05$  (um símbolo),  $p > 0,01$  (dois símbolos) e  $p > 0,001$  (três símbolos). 57

**Figura 20. Influência do co-tratamento de produtos de secreção de tecidos adiposos juntamente com o  $\delta$ -T3 sobre a formação de espécies reativas de oxigênio por células 4T1.**

Sobrenadantes de células 4T1 foram avaliadas quanto ao perfil de secreção da quimiocina MCP1 após estímulo com produtos de secreção de tecidos adiposos por (A) tecido adiposo branco gonadal e (B) tecido adiposo branco inguinal e (C) tecido adiposo marron juntamente com  $\delta$ -T3. Cada grupo experimental possuía cinco animais (N=5). Resultados referentes à uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi representada com asteriscos (\*) e as diferenças entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra:  $p>0,05$  (um símbolo),  $p>0,01$  (dois símbolos) e  $p>0,001$  (três símbolos). ..... 58

**Figura 21. Influência do co-tratamento de produtos de secreção de tecidos adiposos juntamente com o  $\delta$ -T3 sobre a biogênese de corpúsculos lipídicos por células 4T1.** Células 4T1 foram avaliadas quanto a biogênese de corpúsculos lipídicos, após estímulo com produtos de secreção de tecidos adiposos por (A) tecido adiposo branco gonadal e (B) tecido adiposo branco inguinal e (C) tecido adiposo marron juntamente com  $\delta$ -T3. Cada grupo experimental possuía cinco animais (N=5). Resultados referentes à uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi representada com asteriscos (\*) e as diferenças entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra:  $p>0,05$  (um símbolo),  $p>0,01$  (dois símbolos) e  $p>0,001$  (três símbolos). ..... 60

**Figura 22. Influência do co-tratamento de produtos de secreção de tecidos adiposos juntamente com o  $\delta$ -T3 sobre a proliferação celular por células 4T1.** Células 4T1 foram avaliadas quanto a proliferação celular, após estímulo com produtos de secreção de tecidos adiposos por (A) tecido adiposo branco gonadal e (B) tecido adiposo branco inguinal e (C) tecido adiposo marron juntamente com  $\delta$ -T3. Cada grupo experimental possuía cinco animais (N=5). Resultados referentes à uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi representada com asteriscos (\*) e as diferenças entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra:  $p>0,05$  (um símbolo),  $p>0,01$  (dois símbolos) e  $p>0,001$  (três símbolos). ..... 61

**Figura 23. Influência do co-tratamento de produtos de secreção de tecidos adiposos juntamente com o  $\delta$ -T3 sobre a apresentação de antígeno lipídios por células 4T1.** Células 4T1 foram avaliadas quanto a proliferação celular, após estímulo com produtos de secreção de tecidos adiposos por (A) tecido adiposo branco gonadal e (B) tecido adiposo branco inguinal e (C) tecido adiposo marron juntamente com  $\delta$ -T3. Cada grupo experimental possuía cinco animais

(N=5). Resultados referentes à uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi representada com asteriscos (\*) e as diferenças entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra:  $p>0,05$  (um símbolo),  $p>0,01$  (dois símbolos) e  $p>0,001$  (três símbolos). 63

**Figura 24. Análise da citogenotoxicidade sobre a suplementação de Tocotrienol em animais Balb/c.** Camundongos fêmeas Balb/C foram segregadas em dois grupos e suplementadas de acordo com os grupos Controle e Tocotrienol 70%. Cada grupo experimental possuía 8 animais (N=8). Resultados referentes à uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi representada com asteriscos (\*) e as diferenças entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra:  $p>0,05$  (um símbolo),  $p>0,01$  (dois símbolos) e  $p>0,001$  (três símbolos). 63

**Figura 25 Análise da Viabilidade mitocondrial de células 4T1 estimuladas com produtos de secreção de tecidos adiposos.** Células 4T1 foram avaliadas quanto a viabilidade mitocondrial, após estímulo com produtos de secreção de tecidos adiposos por (A) tecido adiposo branco gonadal e (B) tecido adiposo branco inguinal e (C) tecido adiposo marron. Cada grupo experimental possuía oito animais (N=8). Resultados referentes à uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi representada com asteriscos(\*) e as diferenças entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra:  $p>0,05$  (um símbolo),  $p>0,01$  (dois símbolos) e  $p>0,001$  (três símbolos)..... 64

**Figura 26. Análise do perfil de morte celular de células 4T1 estimuladas com produtos de secreção de tecidos adiposos.** Células 4T1 foram avaliadas quanto ao perfil de morte celular por citometria de fluxo, após estímulo com produtos de secreção de tecidos adiposos por tecido adiposo branco gonadal e tecido adiposo branco inguinal e tecido adiposo marron. Cada grupo experimental possuía oito animais (N=8). Resultados referentes à uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi representada com asteriscos (\*) e as diferenças entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra:  $p>0,05$  (um símbolo),  $p>0,01$  (dois símbolos) e  $p>0,001$  (três símbolos)...... 65

**Figura 27. Análise do perfil de apoptose de células 4T1 estimuladas com produtos de secreção de tecidos adiposos.** Células 4T1 foram avaliadas quanto ao perfil de apoptose, após

estímulo com produtos de secreção de tecidos adiposos por (A) tecido adiposo branco gonadal e (B) tecido adiposo branco inguinal e (C) tecido adiposo marron. Cada grupo experimental possuía oito animais (N=8). Resultados referentes à uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi representada com asteriscos (\*) e as diferenças entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra:  $p>0,05$  (um símbolo),  $p>0,01$  (dois símbolos) e  $p>0,001$  (três símbolos)..... 66

**Figura 28. Análise do perfil de proliferação de células 4T1 estimuladas com produtos de secreção de tecidos adiposos de animais suplementados com Tocotrienol.** Células 4T1 foram avaliadas quanto ao perfil de proliferação celular, após estímulo com produtos de secreção de tecidos adiposos por (A) tecido adiposo branco gonadal e (B) tecido adiposo branco inguinal e (C) tecido adiposo marron. Cada grupo experimental possuía oito animais (N=8). Resultados referentes à uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi representada com asteriscos (\*) e as diferenças entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra:  $p>0,05$  (um símbolo),  $p>0,01$  (dois símbolos) e  $p>0,001$  (três símbolos)..... 66

**Figura 29. Modulação da secreção de citocinas sobre a suplementação de Tocotrienol.** Soros de camundongos Balb/C foram analisados quanto a secreção de citocinas em dois grupos Untreated (Não tratados) e Vitamina E (Tocotrienol). Cada grupo experimental possuía oito animais (N=8). Resultados referentes à uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi representada com asteriscos (\*) e as diferenças entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra:  $p>0,05$  (um símbolo),  $p>0,01$  (dois símbolos) e  $p>0,001$  (três símbolos). ..... 68

**Figura 30. O co-tratamento de moléculas de secreção de igWAT juntamente com  $\delta$ -T3 induzem cascata de apoptose.** Células de câncer de mama triplo-negativo foram co-tratadas com moléculas secretadas de igWAT (tecido adiposo inguinal) juntamente com delta tocotrienol por 24h e posteriormente foram feitas análises. Há uma diminuição da viabilidade mitocondrial, um aumento da citotoxicidade celular. Ocorre uma ativação da via de morte por apoptose com a ativação da caspase 3. Acontece a diminuição de níveis de moléculas da via da autofafia (LC3B e Laranja de Acridina). Ocorre também uma diminuição na formação de espécies reativas de oxigênio bem como a diminuição da biogênese de corpúsculos lipídicos. Há uma diminuição na

apresentação de antígeno lipídico bem como um perfil próinflamatório de citocinas. O modelo sugere que é uma via antitumoral e promissor como um tratamento coadjuvante ..... 76



## **1. Introdução**

### **1.1. Câncer de mama**

O câncer é uma das doenças que leva a mais óbitos no mundo, ocupando o segundo lugar com mais casos de morte. A Organização Mundial da Saúde – OMS (do inglês *World Health Organization – WHO*), aproximadamente, 9.6 milhões de mortes ocorreram em 2018 no mundo, cerca de 1 a cada 6 mortes foram devido ao câncer. Por ser uma doença com grande variabilidade e agressividade da doença, as estatísticas crescem crescem com maior índice em países subdesenvolvidos. Esta doença afeta não apenas áreas afins a saúde, mas também na esfera econômica mundial. Mais de US\$ 1,16 trilhão foram gastos com tratamentos com tratamentos e diagnósticos decorrentes do câncer (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. Outros nomes são conhecidos para denominar esta doença, também é conhecido pelos termos - tumores malignos e - neoplasias (NIH, 2021). As neoplasias são desencadeadas, principalmente pelo descontrole na regulação da divisão celular e a insuficiência no controle de morte celular, levando a produção de massas celulares e posteriormente a metástase (THOMAS N. SEYFRIED, 2013). A principal causa de morte de pessoas com câncer é a metástase de células tumorais. Outros fatores como alterações na manutenção do processo de angiogênese, invasão e migração celular, favorecem o processo de metástase, com extravasamento de células mutadas para outros órgãos via corrente sanguínea. Após a disseminação pelo corpo, as células tumorais têm o poder de comprometer a homeostase funcional de órgãos, levando a perda de função e conseqüentemente o óbito do indivíduo (CHAMBERS; GROOM; MACDONALD, 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. Alguns fatores ambientais, pode-se citar: abuso de tabaco, ingestão de álcool, alimentação não saudável, sedentarismo, infecções virais, obesidade e outros. Alguns fatores internos como o envelhecimento e mutações contribuem para o número de casos de neoplasias (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2020).

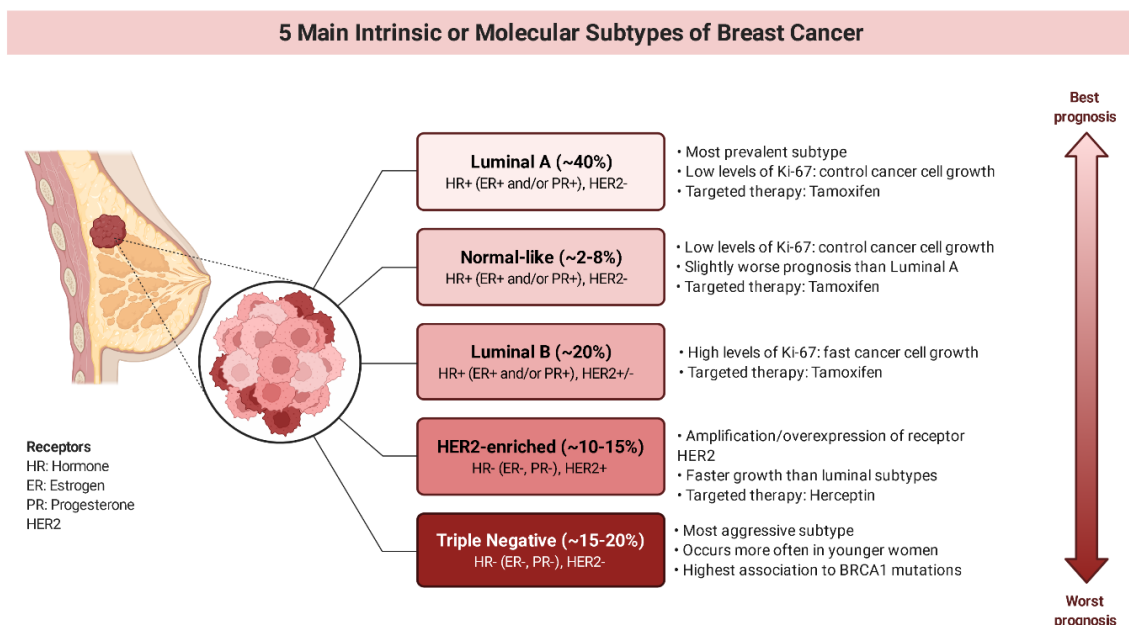
O câncer de mama triplo-negativo é a malignidade mais letal entre mulheres, apresentando efeito devastador mundialmente. Em 2020, 2,3 milhões de pacientes foram diagnosticadas com câncer de mama e 685 mil mortes foram causadas por esses tumores (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2021). Quase um terço dos tumores femininos são enquadrados como câncer de mama, a taxa de mortalidade-incidência desses tumores é de 15 % e os números relacionados à incidência de câncer de mama em locais diferentes do globo (27 em 100 000 na África e leste asiático e 97 em 100 000 na América do Norte) ressaltam que fatores de estilo de vida aumentam o risco de desenvolvimento dessas neoplasias (BRAY et al., 2018). Um estudo prospectivo informou que mais de um terço dos tumores de mama que acometem mulheres de países desenvolvidos são influenciados por fatores associados ao estilo de vida, como abuso de álcool, uso de tabaco, histórico reprodutivo, terapia hormonal menopausal e obesidade (NUR et al., 2019).

O câncer de mama é uma doença heterogênea a qual é clinicamente subdividida em três subtipos baseados na expressão de receptores de hormônios sexuais (estrógeno e progesterona) e a ausência ou presença de HER2 (*human epidermal growth factor receptor 2*): tumores luminais positivos para receptor de estrógeno, tumores positivos para o receptor de progesterona e tumores de mama triplo-negativo (DENKERT et al., 2017). O câncer de mama triplo-negativo caracteriza-se por não apresentar níveis detectáveis dos receptores hormonais de estrógeno e progesterona e de HER2 (BIANCHINI et al., 2016). Do total de tumores diagnosticados, 12% são triplo-negativos nos Estados Unidos (BIANCHINI et al., 2016)

O tratamento contra neoplasias torna-se dependente da fase que o paciente está devido a grande complexidade e variedade de tumores. Os tratamentos convencionais, visando conter o crescimento desordenado de células, como quimioterapias, radioterapias e cirurgias são utilizadas no combate a doença. Os tratamentos convencionais vêm mostrando grandes níveis de citotoxicidade atingindo fortemente células saudáveis o que impacta diretamente na qualidade de vida dos pacientes (VALASTYAN; WEINBERG, 2011). Diversos métodos antineoplásicos adjuvantes bem como imunoterapias, vêm sendo desenvolvidos com potencial para substituir métodos convencionais e invasivos como quimioterápicos. Atualmente no sistema de saúde pública, já é empregado o uso de terapias convencionais de forma gratuita pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (REFERENCIA).

Pessoas afetadas por tumores triplo-negativos tendem a apresentar pior prognóstico quando comparado com outros tipos de neoplasias mamárias (MALORNI et al., 2012), com significativa diminuição da sobrevida de até 5 anos (cerca de 8 a 16%) quando comparado com tumores positivos para receptores dos hormônios sexuais (CDC, 2022). Abordagens clássicas como o uso de quimioterápicos, que tem como toxicidade alta, é altamente utilizada como primeira linha farmacológica buscando a regressão e remissão do tumor mamário (BIANCHINI et al., 2016).

A classificação dos tumores de mama triplo-negativo é ilustrada pela heterogeneidade dos tumores, baseando-se em análises histológicas, moleculares, de expressão gênica e de metabolismo. Histologicamente a maioria dos tumores mamários triplo-negativos são agrupados como carcinomas mamários invasivos (WEIGERT; WEIS; BRÜNE, 2009). Análises moleculares agrupam os tumores triplo-negativos em *basal-like*, *luminal A* e *B* e *normal-like* (EROLEs et al., 2012). Outras classificações são baseadas na avaliação do perfil de expressão gênica, onde sugere-se a existência de seis subtipos desse tumor: dois subgrupos *basal-like-related* (*basal-like 1* (BL1) e 2 (BL2)), dois subgrupos *mesenchymal-related* (*mesenchymal* (M) e *mesenchymal stem-like* (MSL)), um subgrupo imunomodulador (IM) e um grupo *luminal androgen receptor* (LAR) (LEHMANN et al., 2011) (Figura 1).



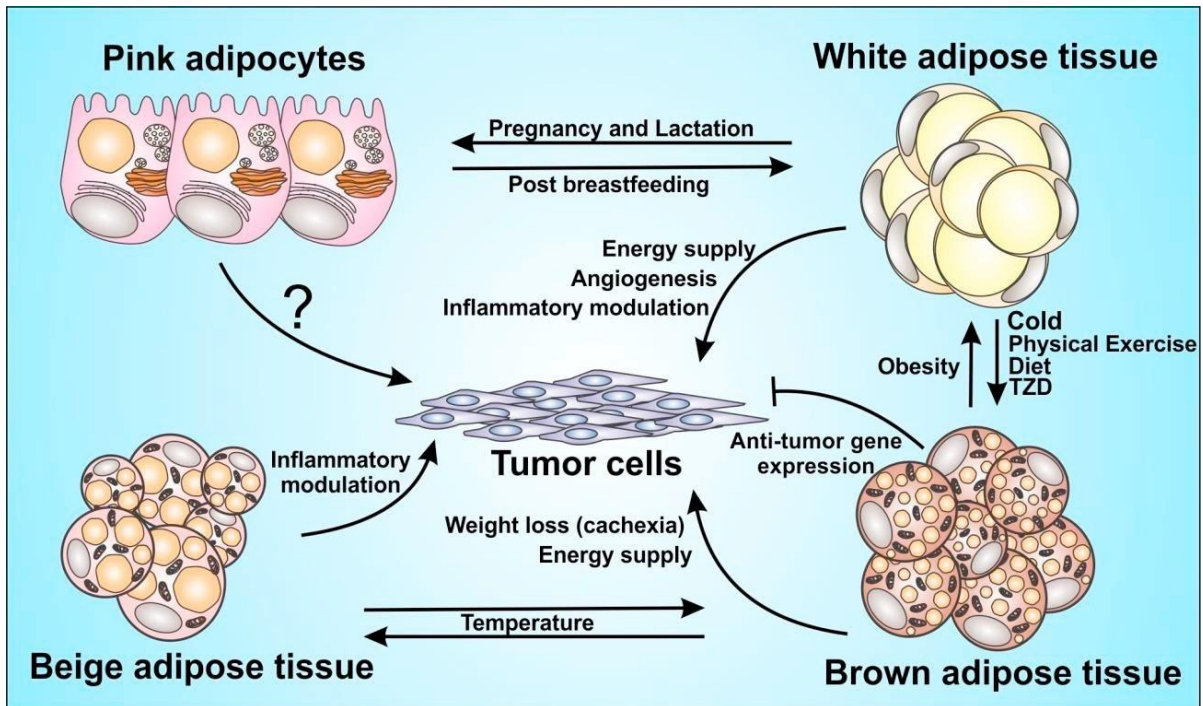
**Figura 1. Subtipos dos cânceres de mama.** Os subtipos de cancro da mama podem ser categorizados com base na sua expressão de receptores hormonais (receptor de estrogénio (ER) e receptor de progesterona (PR)), o marcador de proliferação Ki-67, e o receptor de tirosina quinase HER2. Terapias específicas, como a Herceptina (destinada à proteína HER2) e o Tamoxifeno (destinada à ER), podem ser utilizadas no tratamento de certos subtipos de cancro da mama. O prognóstico varia em função do subtipo de cancro da mama. Adaptado do Biorender™

Há também a possibilidade de subdivisão do cancro triplo-negativo baseando-se em vias metabólicas, sendo classificado por: subtipo lipogénico (MSP1), subtipo glicolítico (MPS2) e subtipo com características metabólicas mistas (MPS3)(GONG et al., 2021). Uma célula de linhagem de cancro de mama triplo-negativo murino bastante utilizada na pesquisa, a célula 4T1 foi classificada como pertencente ao subgrupo glicolítico (MSP2), o que mostra que essas células apresentam preferência metabólica pelo consumo de glicose (via glicolítica). Amplamente empregadas no estudo de tumores primários de mama murinos, a célula 4T1 é bastante utilizada como célula de linhagem (BETH A. PULASKI, 2001)

## **1.2. Tecido Adiposo e Câncer de Mama**

O tecido adiposo, atualmente já caracterizado como um órgão endócrino, possui um papel essencial na homeostade energética do corpo. Desbalanços na composição e manutenção do tecido adiposo está associada a diversas doenças metabólicas como obesidade, diabetes e cancro (DENG et al., 2016).

O tecido adiposo apresenta grande plasticidade fenotípica (PANINA et al., 2018). Essa plasticidade é vista quando observamos a existência de quatro adipócitos principais: o adipócito branco, o adipócito bege, o adipócito rosa e o adipócito marrom. A fisiologia e o metabolismo destas células de gordura são bastante particular, e a forma como essas células atuam no microambiente tumoral é particular (CORRÊA; HEYN; MAGALHAES, 2019).



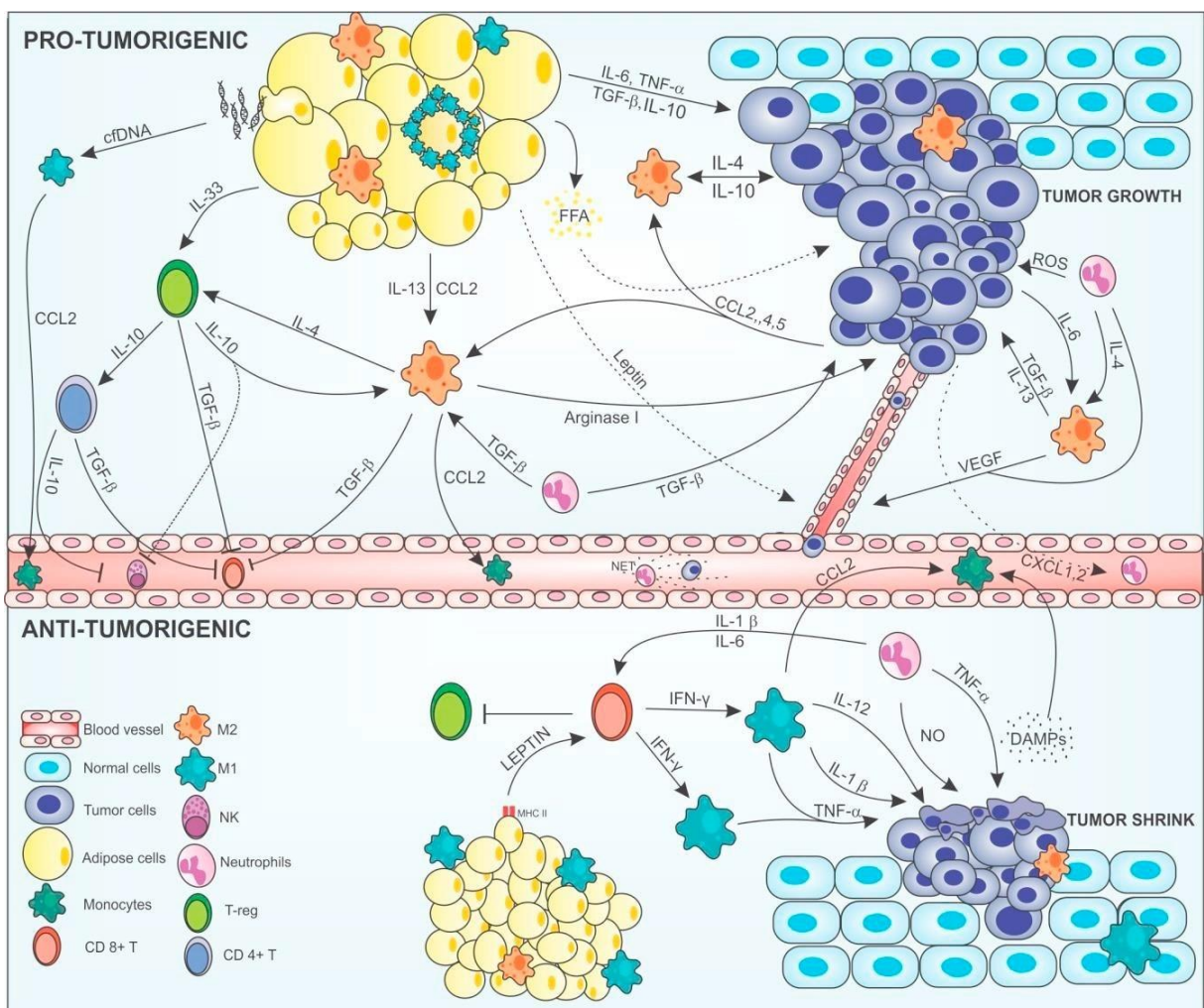
**Figura 2. Diferentes tipos de células adiposas e sua influência no câncer.** Fatores externos são capazes de modificar o fenótipo dos adipócitos e com isso, influenciar de forma diferencial o desenvolvimento tumoral. Fonte: The Impact of the Adipose Organ Plasticity on Inflammation and Cancer Progression,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

O tecido adiposo branco, conhecido com a sigla WAT (do inglês *White Adipose Tissue*), exercendo um enorme papel na reserva energética e no processo de regulação hormonal do corpo (BARTELT; HEEREN, 2013). O WAT é altamente vascularizado e composto por adipócitos e também outros tipos celulares como células imunológicas, células endoteliais fibroblastos, pericitos e pré-adipócitos (PEIRCE; CAROBBIO; VIDAL-PUIG, 2014). Os adipócitos presentes no WAT são compostos predominantemente por ácidos graxos, onde ficam armazenados em uma grande gota de gordura. Tendo como principal função o armazenamento energético, o WAT tem papel importante no controle hormonal através da síntese e secreção de vários hormônios (COELHO; OLIVEIRA; FERNANDES, 2013). A Leptina é produzida majoritariamente por adipócitos (HARMELEN et al., 1998). Este peptídeo é produzido por adipócitos e tem como função o controle de apetite.

A leptina ainda exerce um papel importante na modulação inflamatória e no microambiente tumoral (SANTANDER et al., 2015). Uma produção aumentada de leptina é capaz de interferir na via JAK/STAT, o que aumenta a expressão de proteínas anti-apoptóticas, levando a secreção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-6, além disso, induz angiogênese com o aumento da produção do fator de crescimento endotelial (VEGF) (DUTTA

et al., 2012). O processo de desregulação do WAT leva a uma inflamação sistêmica e local, fator importante para o estabelecimento e agravamento do microambiente tumoral. Além disso, o WAT atua também no recrutamento e polarização de células imunes como visto na Figura 3. **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.

Adipócitos associados a tumores (TAAs) têm a função de recrutamento de macrófagos para o microambiente tumoral e sua polarização para a configuração alternativa M2 via CCL2, IL1-β e CXCL12 (ARENDDT et al., 2014). O acúmulo de macrófagos no microambiente tumoral se deve pela secreção de CCL2 e também pela liberação de DNA por adipócitos em processo de degeneração (NISHIMOTO et al., 2016). Os mecanismos pelos quais os adipócitos regulam o microambiente tumoral ainda é pouco descrito, porém, o papel da inflamação como mediador entre



adipócitos brancos e células tumorais está em constante desenvolvimento, buscando cada vez mais desenvolver métodos de modulação do tecido adiposo e combate de tumores (Figura 3).

**Figura 3. 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.

O tecido adiposo marrom também atua no processo de controle hormonal do corpo, com adição ao controle da temperatura corpórea. Do inglês *Brown Adipose Tissue* – BAT, o tecido adiposo marrom atua normalmente com um caráter predominante anti-inflamatório. Fisiologicamente, as gotículas de gordura são dispostas de forma multilocular (Peirce et al. 2014). Possuem grandes números de mitocôndrias, o que garante seu principal papel no organismo: termogênese (CORRÊA; HEYN; MAGALHAES, 2019).

Há uma elevada expressão e ativação da proteína desacopladora 1 (do inglês *uncoupling protein 1* – UCP1), nos adipócitos marrons, garantindo a funcionalidade dos adipócitos em que há um desvio dos elétrons da cadeia transportadora de elétrons durante a respiração celular nas mitocôndrias, ativando assim a UCP1 (OELKRUG; JASTROCH, 2015). Outros fatores que ativam esta proteína nos adipócitos, está a sinalização da norepinefrina através dos receptores  $\beta_3$ , aumentando assim a atividade deste tecido (Fenzl & Kiefer 2014). Outras células estão residentes também no BAT, como as células imunológicas, fibroblastos e uma matriz bem desenvolvida, facilita uma grande interação célula-célula, o que contribui para a grande plasticidade fenotípica deste tecido (FENZL; KIEFER, 2014; JONG et al., 2021).

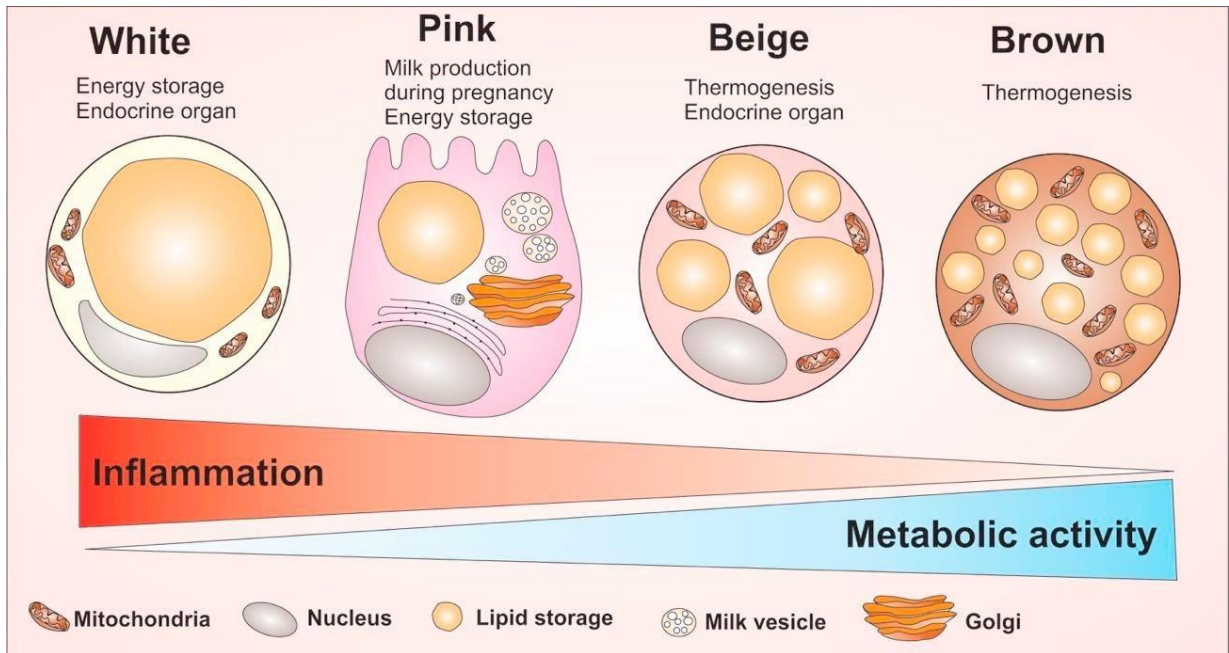
O papel do tecido adiposo marrom no câncer é controverso, sendo caracterizado como anti-inflamatório. O aumento de adipócitos marrons em função da diminuição de adipócitos brancos é caracterizado como melhor prognóstico durante a obesidade, visto que há uma redução da porcentagem de gordura corporal e uma diminuição da inflamação e promovendo um metabolismo regulado (TRAYHURN, 2018). Entretanto, o aumento de BAT promove um agravamento em casos de caquexia, onde ocorre perda de peso de forma excessiva, e a elevada atividade metabólica do tecido adiposo marrom pode piorar este processo, utilizando as reservas energéticas na forma de lipídio na produção de calor pelas mitocôndrias nos adipócitos marrons. Além disso, a superativação do BAT fornece grande quantidade de energia para o desenvolvimento de células neoplásicas (KIR; SPIEGELMAN, 2016).

Assim como o WAT, a relação do BAT no controle de doenças metabólicas e também no câncer, é pouco conhecido. O BAT é responsável pela polarização e controle da inflamação e do metabolismo lipídico, sendo um alvo potencial para pesquisas terapêuticas no tratamento destas doenças.

Ainda podemos citar os adipócitos bege e rosa, os quais também possuem grande plasticidade celular. Os adipócitos bege são extremamente plásticos, em que estímulos externos induzem a mudança para adipócitos marrons. Em temperaturas mais baixas, o aumento de norepinefrina, assim como outras vias, induz a expressão de receptores característicos de adipócitos marrons, essas células também apresentam uma quantidade intermediária de gotículas de gordura, sendo intermediárias entre células brancas e marrons (WU; COHEN; SPIEGELMAN, 2013)

Já os adipócitos rosas estão localizados especificamente na mama, surgindo durante a gravidez e lactação. Estes adipócitos são células alveolares secretoras de leite que podem surgir tanto pela transdiferenciação de adipócitos brancos durante a gravidez e lactação quanto no processo de maturação de pré-adipócitos. Adipócitos rosas são caracterizados por abundantes gotículas de gordura citoplasmáticas, superfície apical com microvilosidades, retículo endoplasmático rugoso robusto (RER), complexo de Golgi e grânulos contendo leite. A coloração rosada do adipócito durante a lactação e gestação é o motivo pelo nome ser denominado adipócito rosa (CINTI, 2018; GIORDANO et al., 2014). Pesquisas a respeito do adipócito rosa e as influências que essas células podem ter no desenvolvimento do câncer de mama são recentes e precisam ser mais exploradas. A diferença entre os quatro principais adipócitos está melhor sintetizada na Figura 4.



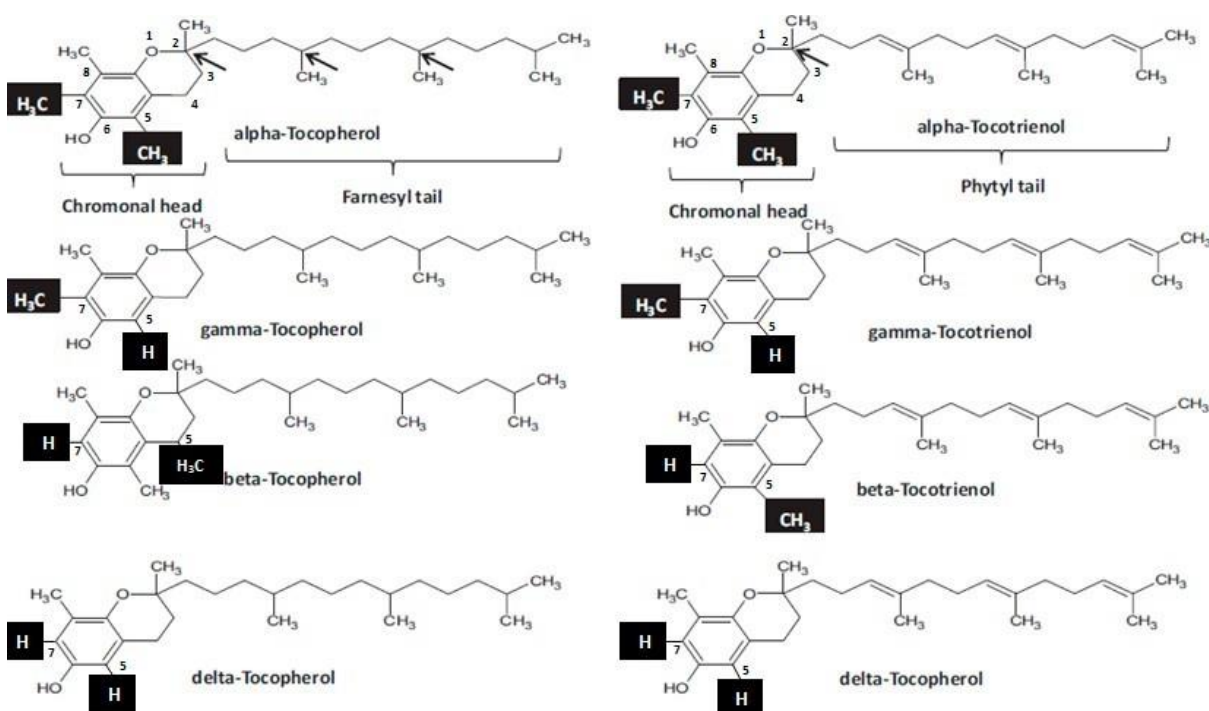


**Figura 4. Os quatro principais adipócitos.** Os adipócitos são divididos em 4 tipos de células que possuem características morfológicas e funcionais diferentes. Fonte: The Impact of the Adipose Organ Plasticity on Inflammation and Cancer Progression, Luis H Correa, Gabriella S Heyn e Kelly G Magalhães. Cells, 2019.

Algumas desordens metabólicas podem desencadear o aparecimento de cânceres e o acúmulo de tecidos adiposos é um dos fatores que podem levar o aparecimento de cânceres. A obesidade é conhecida como uma das doenças metabólicas que têm relação com o acometimento de cânceres (PICON-RUIZ; MORATA-TARIFA; VALLE-GOFFIN, 2017). Estudos recentes ainda mostram que os acúmulos de tecidos adiposos estão associados a maiores riscos de adenocarcinomas de esôfago (LONG; BEALES, 2014), tireoide (ALI et al., 2018), pâncreas (BRACCI, 2012), ovário e mama (ENGIN, 2017).

### 1.3. Vitamina E e Câncer de Mama

A ingestão dietética de Vitamina E, é estudada como fator de proteção contra o câncer devido as propriedades antioxidantes da Vitamina E (TAYLOR et al., 2003). Para estudar o potencial da Vitamina E, é importante destacar que se trata de um composto hidrofóbico, ou seja, solúvel em lipídeos. Existem oito isoformas diferentes desta vitamina divididas em dois subgrupos. Apresenta-se em quatro modelos na forma de tocoferóis ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ ) com uma calda fitil saturada, e quatro formas de tocotrienóis ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ ) composta de uma cadeia lateral isoprenóide insaturada. Ambas as isoformas apresentam um anel cromanol e a posição dos grupos metil dentro desse anel determinam qual é a isoforma da vitamina (Figura 5) (CARDENAS; GHOSH, 2013).



**Figura 5.** As oito isoformas da Vitamina E. Os grupos metil dentro do anel cromanol determinam qual é a isoforma da vitamina: alfa, gama, beta ou delta (realçado em preto). As setas apontam para os centros quirais onde são localizadas as caudas fitil e farnesilo dos tocoferóis e tocotrienóis respectivamente. Uma cauda insaturada distingue os tocotrienóis da cauda saturada das isoformas dos tocoferóis. (Adaptado de Cardenas e Ghosh, Vitamin E: A dark horse at the crossroad of cancer management, 2013).

As diferenças estruturais entre as isoformas da Vitamina E, implicam em um impacto significativo sobre o seu metabolismo, absorção e armazenamento nos tecidos. As isoformas

mais abundantes na dieta são as Alfa-Tocoferol e Delta-Tocoferol, também mais encontradas nos tecidos, por isso, Alfa-Tocoferol é considerado a vitamina E clássica (Smolarek & Suh, 2011).

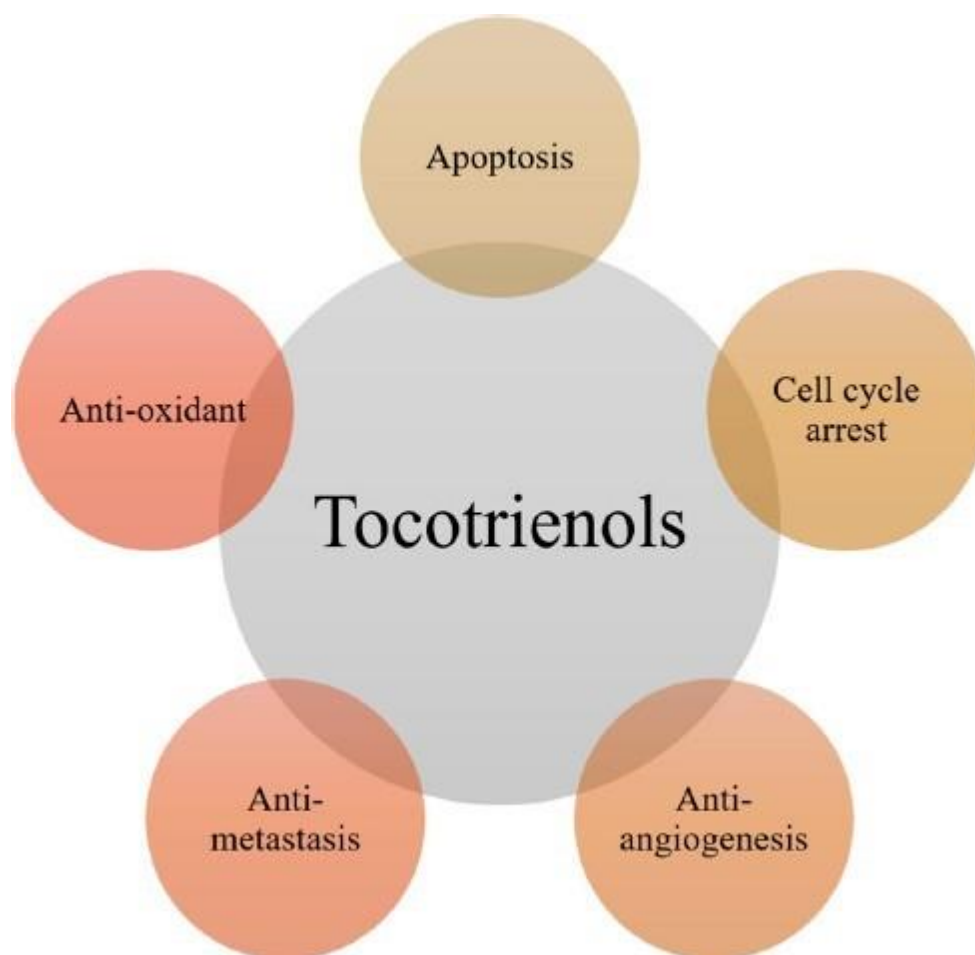
As formas naturais de Vitamina E são sintetizadas em vegetais e consumidas através da alimentação, por isso, o padrão alimentar desempenha papel importante no tipo de Vitamina E que é consumida através da dieta (CARDENAS; GHOSH, 2013). O alfa-tocoferol é predominantemente encontrado em amêndoas, sementes de girassol e amendoins, enquanto o gama-tocoferol é a principal Vitamina E nos pistaches, nozes, e sementes de gergelim (DREHER, 2012). Por essa razão, Alfa e Gama Tocoferol são encontrados em diversos óleos vegetais comerciais, por exemplo, óleo de milho, soja e amendoim. Com o uso generalizado no comércio de óleos de soja e milho, cerca de 60-70% da vitamina E consumida na dieta norte americana é representado pelo gama-tocoferol, enquanto o alfa-tocoferol é responsável por cerca de 20-25% (P.J. MCLAUGHLIN; JOHN L. WEIHRAUCH, 1979). Os tocotrienóis existem poucas fontes alimentares, com dietas mais ricas no leste asiático (TAN B., 2010), com fontes mais ricas de tocotrienóis o farelo de arroz, o óleo de palma, óleos de urucum, centeio, cevada, amaranto, noz, avelã, papoila, cártamo, milho, e as sementes de linho, sementes de uva e sementes de abóbora (KANNAPPAN et al., 2012).

A função anticancerígena da Vitamina E, é bastante investigada quanto a sua ação antioxidante, evitando assim a ação de radicais livres por dano de DNA (CARDENAS; GHOSH, 2013). A função antioxidante da Vitamina E, se deve basicamente ao hidrogênio fenólico no anel cromanol que são doados à radicais livres (BURTON et al., 1998). O alfa-tocoferol é trimetilado nas posições 5-, 7- e 8- do anel cromanol, enquanto o gama-tocoferol é dimetilado nas posições 7 e 8, e o delta-tocoferol é monometilado na posição 8 do anel cromanol. As diferenças estruturais podem ser responsáveis pelos efeitos diferenciados na atividade antioxidante de cada isoforma de tocoferol (KAMAI-ELDIN; APPELQVIST, 1996).

Diversos compostos naturais vêm sendo observados exercendo funções antioxidantes, antiproliferativas, pró-apoptóticas, anti-inflamatórias, anti-angiogênicas, e atividades anti-metastáticas, atuando como um quimiopreventivo ou até mesmo agente quimioterápico (KASHYAP et al., 2016; SHANMUGAM; ADHIKARI; SHAKYA, 2017). Um desses grupos de compostos são os tocotrienóis, os análogos insaturados de vitamina E, que são encontrados

em várias fontes naturais como farelo de arroz, sementes de urucum e óleo de palma (MEGANATHAN; FU, 2016; MONTAGNANI MARELLI et al., 2019).

Os tocotrienóis podem existir em diferentes isoformas, tais como alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), gama ( $\gamma$ ), e delta ( $\delta$ ). Várias propriedades benéficas dos tocotrienóis têm sido relatadas nos últimos anos, especialmente contra doenças crônicas, incluindo a redução do colesterol, neuroprotetor, propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anti-cancerígenas (MONTAGNANI MARELLI et al., 2019; RAJENDRAN et al., 2011). De fato, os tocotrienóis podem suprimir o crescimento de diferentes malignidades, incluindo as do ovário, fígado, gástricos, próstata, cérebro, leucêmias, pâncreas e uterino (KANCHI et al., 2017; RIZVI et al., 2014) (Figura 6).



**Figura 6. Propriedades anticancerígenas dos Tocotrienóis.** Fonte: Molecular Mechanisms of Action of Tocotrienols in Cancer: Recent Trends and Advancements Int. J. Mol. Sci. 2019, 20, 656; doi:10.3390/ijms20030656.

Os tocotrienóis mostram seu efeito superior aos tocoferóis em sua atividade antioxidante (MÜLLER; THEILE; BÖHM, 2010). Devido a sua estrutura ser transportada através dos quilomicrons e seu armazenamento se dá primeiramente no tecido adiposo, que por sua vez, é abundante no tecido mamário, sugere-se um efeito mais significativo no câncer de mama (NOGUCHI et al., 2003).

Diversos autores relatam atividades específicas em neoplasias quando utilizado Tocotrienóis (T3), mostrando a supressão do crescimento e indução de apoptose em diferentes células de câncer humano e de camundongos (AGGARWAL et al., 2019; AZZI et al., 2003; KLINE et al., 2003; MCINTYRE et al., 2000; NESARETNAM, SELVARAJAN DORASAMY, PH, 2000; SHAH; GAPOR; SYLVESTER, 2003; SYLVESTER; SHAH; SAMANT, 2005). Os Tocotrienóis possuem propriedades que não são exibidas pelos Tocoferóis e estão associadas com uma atividade antitumoral, além das propriedades antioxidantes (AGGARWAL et al., 2019).

Dessa forma, os tocoferóis apresentam proteção antioxidante e antitumoral menor. Enquanto as isoformas dos tocotrienóis ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) demonstram atividades antitumorais mais eficientes, além da tradicional atividade antioxidante (AGGARWAL et al., 2019). Neste trabalho, os efeitos anti-neoplásicos relatados de Delta-Tocotrienol sobre os produtos de secreção de tecidos adiposos sobre células de câncer de mama murino foram investigados.

## **2. Justificativa**

Terapias antitumorais convencionais antitumorais são agressivas aos pacientes portadores de neoplasias. São necessárias alternativas para que possam facilitar e diminuir os efeitos colaterais dos tratamentos antitumorais. A vitamina E, é um antioxidante natural e mostra efeito antitumoral significativo em diversos tumores, sendo um promissor adjuvante antitumoral.

Diversos estudos mostram que o Tocotrienol apresenta impacto sobre células de câncer de mama murino (AGGARWAL et al., 2019; SYLVESTER; SHAH; SAMANT, 2005), assim como a importância dos tecidos adiposos no contexto do câncer de mama (TRAYHURN, 2018). Entretanto, pouco se sabe sobre a influência do câncer de mama triplo-negativo sobre depósitos adiposos específicos e o delta-tocotrienol neste contexto.

Além disso, não se sabe o impacto de tecidos adiposos e delta tocotrienol, em co-tratamento, sobre essa neoplasia mamária. Portanto, se faz necessário investigar os mecanismos de interação entre o processo de progressão tumoral na mama, e os distintos fenótipos do tecido adiposo em co-tratamento com o delta-tocotrienol.

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo geral**

Avaliar o papel dos tecidos adiposos em conjunto com o delta-tocotrienol na modulação de parâmetros carcinogênicos de células de mama.

#### **3.2. Objetivos específicos**

**3.2.1)** Investigar a influência do co-tratamento de produtos de secreção de tecidos adiposos juntamente ao delta-tocotrienol sobre a capacidade de modulação dos parâmetros carcinogênicos de células de câncer de mama, *in vitro*.

**3.2.2)** Investigar a influência do tratamento de tocotrienol em animais sobre a capacidade de modulação dos parâmetros carcinogênicos de células de câncer de mama 4T1 por tecidos adiposos, *ex vivo*.

## **4. Metodologia**

### **4.1.) Linhagem de células neoplásicas**

Células de câncer de mama triplo-negativo murino 4T1 (número da ATCC: CRL-2539) foram cultivadas em meio RPMI (GIBCO) suplementado com 5 % de Soro Fetal Bovino (GIBCO) e 1 % Penicilina/Estreptomicina (GIBCO) e mantidas em estufa úmida a 37 °C e 5 % de CO<sub>2</sub>.

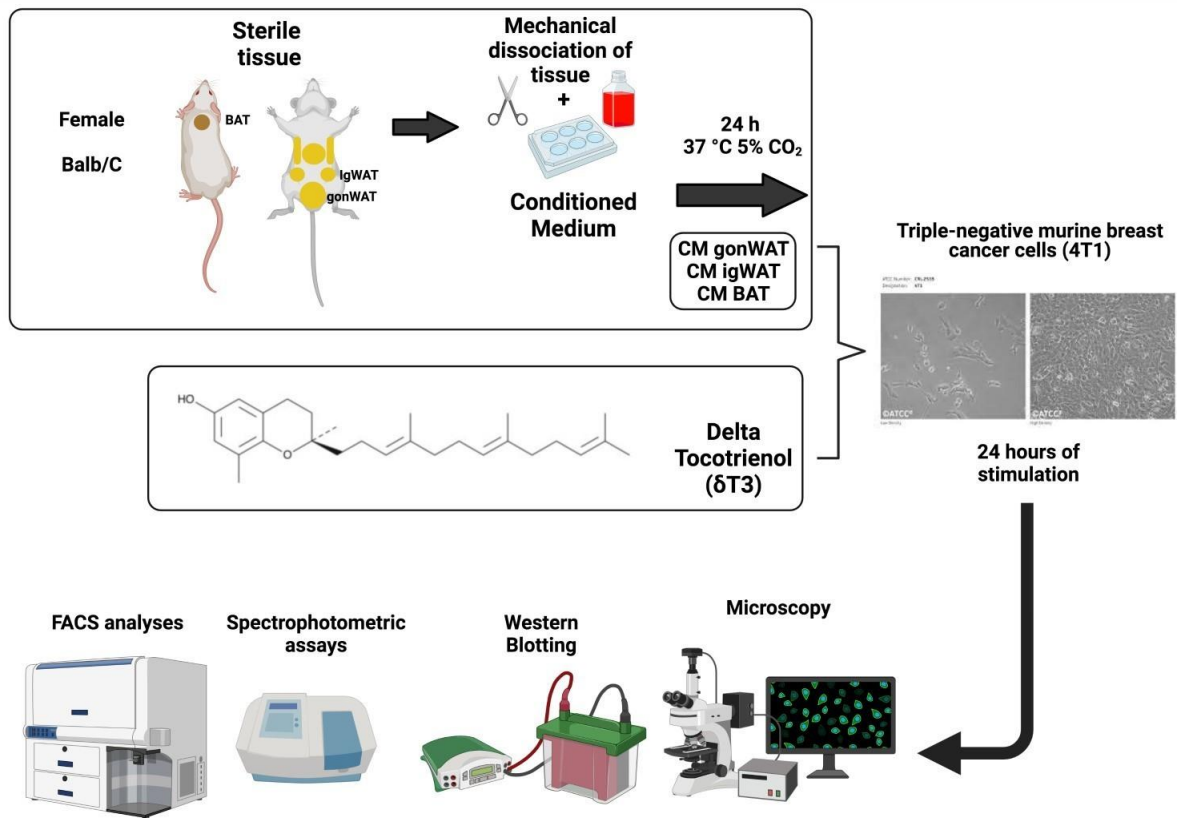
### **4.2) Acondicionamento e manejo dos animais**

Camundongos fêmeas Balb/c selvagens, fornecidos pelo biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, foram mantidos a  $23 \pm 1$  ° C em ciclo de luz/escuro de 12 horas, com livre acesso à comida. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

### **4.3) Experimentação *in vitro***

#### **4.3.1) Delineamento experimental**

Camundongos Balb/c fêmeas selvagens de 10 semanas foram eutanasiados com superdose de anestésico e relaxante muscular (Cloridrato de Cetamina/ Cloridrato de Xilasina). Foram coletados os tecidos adiposos branco inguinal (igWAT), tecidos adiposos branco gonadal (gonWAT) e tecidos adiposos marron (BAT). Assim como foi utilizado o  $\delta$ -Tocotrienol. O resumo do delineamento experimental está resumido na Figura 7.



**Figura 7. Delineamento Experimental da Seção *Ex vivo*.** Camundongos fêmeas Balb/C com 10 semanas de vida foram eutanasiadas e posteriormente utilizados os tecidos adiposos Branco (gonadal - gonWAT e inguinal – igWAT) e Marrom (BAT). Foram confeccionados meios condicionados dos tecidos adiposos para posterior estímulo. Juntamente aos sobrenadantes dos tecidos adiposos, foram utilizados o Delta tocotrienol ( $\delta$ -T3). Células de câncer de mama triplo-negativo 4T1 foram estimuladas com os produtos de secreção de tecidos adiposos juntamente com o  $\delta$ -T3 e posteriormente foram feitas análises de Citometria de fluxo, espectrofotometria, Western Blotting e Microscópicas.

#### 4.3.2) Obtenção do meio condicionado para estímulo e tempo de tratamento das células

Como primeiro passo para se investigar os efeitos de moléculas secretadas por diferentes depósitos de tecido adiposo provenientes de animais eutanasiados sobre células 4T1, os tecidos adiposos brancos inguinal (*Inguinal white adipose tissue* - IgWAT), gonadal (*gonadal white adipose tissue* – gonWAT) e o tecido adiposo marrom (*brown adipose tissue* – BAT) foram cirurgicamente retirados em condições estéreis. Em seguida, os tecidos foram mecanicamente dissociados dentro de tubos de microcentrífuga estéreis contendo meio RPMI condicionado (Albumina bovina sérica (1% (m/v)), anfotericina (0,25  $\mu$ g/mL), cloranfenicol (2  $\mu$ g/mL), gentamicina (40  $\mu$ g/mL), penicilina/streptomicina (1% (v/v) e soro fetal bovino



(10 % (v/v)) seguindo a proporção de 1 mL de meio para cada 0,05 g de tecido pesado em balança de alta precisão.

Os tecidos dissociados em RPMI condicionado foram então transferidos para placas de cultura de células de 6 poços e incubados por 24 h em estufa à 37 °C contendo 5 % CO<sub>2</sub>. A seguir, os sobrenadantes de interação foram coletados em ambiente estéril e acondicionados em freezer -80 °C. Os sobrenadantes de interação foram utilizados diluídos em 10 % para estimular células 4T1 por 24 h. Após tempo de estímulo, as células foram analisadas quanto à viabilidade mitocondrial, perfil de morte celular, detecção de Bax, proliferação celular, biogênese de corpúsculo lipídico e secreção de citocinas. Os termos “meio condicionado do tecido adiposo”, “produtos de secreção de tecido adiposo” e “produtos secretados por tecido adiposo” foram empregados como sinônimos para se referir ao material obtido após dissociação do tecido adiposo em meio suplementado com antibióticos e antifúngico (meio condicionado).

#### **4.3.3) Delta-Tocotrienol ( $\delta$ -T3)**

Foi utilizado a isoforma da Vitamina E de Delta-Tocotrienol proveniente da Sigma (Cat. 69745), os sinônimos para esta moléculas são: 8-Methyltocotrienol, [R-(E,E)]-3,4-Dihydro-2,8-dimethyl-2-(4,8,12-trimethyl-3,7,11-tridecatrienyl)-2H-1-benzopyran-6-ol, (R)- $\delta$ -Tocotrienol.

A concentração estoque do Delta-Tocotrienol foi de 2mM diluídos em etanol P.A.. As concentrações de uso nos experimentos *ex-vivo* foram: 2,5; 5; 10; 20 e 40uM. Os experimentos de MTT e LDH utilizaram todas as concentrações visando realizar um screening das concentrações citotóxicas na célula 4T1. A partir dos experimentos de morte celular, foram então selecionadas as concentrações de 20 e 40uM como concentrações padrões para os ensaios.

#### **4.3.3) Viabilidade mitocondrial**

A fim de se verificar os efeitos dos produtos secretados pelos tecidos adiposos sobre a viabilidade de células 4T1, foi realizado um ensaio com MTT. Essa análise baseia-se no fato de que o MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio brometo), quando reduzido por enzimas mitocondriais, apresenta-se com coloração arroxeada na forma de cristais de formazan.  $5 \times 10^3$  células foram semeadas em placa de 96 poços e estimuladas por 24 h. Após o tempo de estímulo, as células foram expostas à uma solução de 500  $\mu$ g/mL de MTT (Life Technologies).

O sobrenadante foi descartado e os cristais de formazan foram dissolvidos utilizando-se 100 µL de DMSO puro. A leitura da absorbância foi realizada em 570 nm utilizando o espectrofotômetro *Spectramax M3*. A análise dos dados de viabilidade foi realizada utilizando o software *GraphPad Prism*, considerando a média do valor de absorbância do não-estimulado(UNS) como 100% de viabilidade e analisando os outros grupos de forma proporcional. O controle experimental foi obtido expondo as células à 50 % do agente citotóxico DMSO.

#### **4.3.4) Citotoxicidade Celular pela Liberação de LDH**

A fim de investigar os efeitos dos produtos de secreção dos tecidos adiposos sob as células de carcinoma de mama murino 4T1, foi realizado um ensaio de liberação de Lactato Desidrogenase (LDH) seguindo o protocolo do kit comercial *CyQuant™ LDH Cytotoxicity Assay* (C20301 - Invitrogen).

O sobrenadante das células 4T1 estimuladas foi coletado e utilizado no ensaio de detecção de liberação de LDH.

#### **4.3.5) Perfil de morte celular**

A análise do perfil de morte celular das células 4T1 estimuladas com os produtos de secreção dos tecidos adiposos foi realizada por citometria de fluxo utilizando os agentes fluorescentes Anexina V-FITC e Iodeto de propídeo e baseou-se nos fatos de que Anexina V interage com o fosfolípídeo fosfatidilserina, o qual é exposto na face externa da membrana de células apoptóticas, e que Iodeto de propídeo, impermeável à membrana celular, fluoresce após interação com ácidos nucleicos, indicando perda de integridade de membrana plasmática e ocorrência de morte lítica.  $10^5$  células foram semeadas em placas de 24 poços e, após adesão, foram estimuladas por 24 h. Após tratamento, as células foram coletadas e lavadas duas vezes com PBS 1X em centrifugação à 1800 rpm. As células foram então ressuspensas em 100 µL de tampão de ligação 1 X (10 mM de HEPES/NaOH pH 7,4 140 mM de NaCl e 2,5 mM de  $\text{CaCl}_2$ ), 2 µL de Anexina V-FITC (quatroG) e 2 µL 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 µL 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 usadas células aquecidas à 100 °C por 10 minutos.

#### **4.3.6) Morte por Apoptose (Caspase 3 e BAX)**

Visando investigar o perfil de morte apoptótica, foi realizada a marcação por citometria de fluxo das proteínas BAX e Caspase 3. Para esse ensaio, 10<sup>5</sup> células foram semeadas em placas de 24 poços contendo 500uL de meio de cultura por poço. Após a aderência, células foram tratadas por 24 horas com sobrenadantes de interação de tecidos adiposos e também com o delta-tocotrienol em duas concentrações (20 e 40uM), sendo que cada poço representou uma condição experimental. Após o período de estímulo, as células foram então lavadas com PBS 1X e prosseguiram para o protocolo de marcação intracelular. Buscando manter a integridade celular foram utilizados reagentes com pH entre 7,2-7,4.

#### **4.3.7) Níveis de LC3B e Acidificação Lisossomal**

Visando investigar o perfil de acidificação lisossomal bem como avaliar os níveis da molécula LC3B, foi então realizada a marcação por citometria de fluxo das sondas fluorescentes LC3B e Laranja de Acridina.

##### **4.3.7.1) Níveis de LC3B**

Os níveis de LC3B foram mensurados a partir da marcação intracelular. As células foram coletadas das placas de 24 poços as quais foram anteriormente plaqueadas e estimuladas por 24h com os produtos de secreção de tecidos adiposos juntamente com o delta-tocotrienol. As células foram lavadas com PBS1X e posteriormente desaderidas com solução de desaderência (Tripsina 1:250 contendo EDTA, diluído em PBS1X, pH7,2). As células foram centrifugadas a velocidade de 400g, por 5min a 4°C. Após a centrifugação foi descartado o sobrenadante, e uma lavagem com PBS1X no tubo foi realizada. Após a lavagem, as células foram então fixadas com solução de Paraformaldeído (PFA) 1% com 1mL em cada tubo e foram incubadas sob agitação por 2h. Após o período de fixação, foi adicionado 500uL de PBS1X para diluir o PFA existente no tubo. Foi então realizada uma centrifugação para retirar o fixador (400g, 5min, 4°C). As células foram lavadas com PBS1X por mais duas vezes.

Após o processo de fixação das células, ocorreu então o processo de permeabilização da membrana celular, a qual foi utilizada uma solução de 0,2% de triton. Foi adicionado 100uL de solução de permeabilização por tubo e deixado incubando por 5min a temperatura ambiente.

Foram então centrifugados a 500g por 5min a 4°C. O sobrenadante foi então descartado e uma nova lavagem foi realizada seguindo os parâmetros de centrifugação anteriores.

A etapa de bloqueio ocorreu pela adição da solução de bloqueio (triton 0,2% + leite desnatado 5%) por 30min a 4°C. Após o período de incubação, as células foram centrifugadas seguindo os parâmetros de 600g por 5min a 4°C, posteriormente foi descartado o sobrenadante e seguiu-se para o próximo passo.

A marcação com o anticorpo primário seguiu adicionando 50uL de anticorpo, concentração de uso – 5ug/mL, (LC3B – Sigma Cat. L7543) por tubo, posteriormente incubando *overnight* a 4°C protegido da luz. Após o período de incubação, foi adicionado 1mL de solução de permeabilização e prosseguiu para uma centrifugação seguindo os parâmetros de 700g por 5min a 4°C, a lavagem foi repetida e seguiu-se para a incubação do anticorpo secundário.

A marcação com o anticorpo secundário (*Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor* – Invitrogen Cat. A21207), concentração de uso 5ug/mL por amostra. Foram adicionados 50uL de anticorpo secundário por amostra e foi incubado por 2h a 4°C, protegido da luz. Posteriormente a marcação com o anticorpo secundário, foi lavado com PBS1X por duas vezes e posteriormente as amostras foram enviadas para adquirir no Citômetro de fluxo (FACS BD Verse). Os dados foram plotados e analisados no programa GraphPad Prism 8.0.

#### **4.3.7.2) Acidificação Lisossomal**

Tendo como objetivo avaliar a acidificação lisossomal das células 4T1 pelo tratamento com produtos de secreção de tecidos adiposos cotratados com delta-tocotrienol, foi seguido o protocolo para a detecção por citometria de fluxo da fluorescência do corante Laranja de Acridina.

A Laranja de Acridina é uma substância lipofílica sem carga capaz de cruzar membranas biológicas por mecanismos de permeação não seletivo. O marcador fluorescente laranja de acridina (AO) é uma base fraca. Em pH ácido, bases fracas aceitam um próton e são convertidas em substâncias carregadas positivamente que não são mais capazes de atravessar livremente as membranas celulares. Em função dessa propriedade, a AO se acumula e fica retido em compartimentos ácidos. Isso permite o seu uso como um marcador de autofagossomos maduros.

Células marcadas com laranja de acridina, o citoplasma e o núcleo fluorescem em verde e enquanto que compartimentos ácidos fluorescem em vermelho. A intensidade da fluorescência vermelha é proporcional ao grau de acidez, o que permite inferir o volume de compartimentos celulares ácidos (Maiuri, M. et al. 2007).

A células 4T1 seguiram o estímulo com os tratamentos de produtos de secreção de tecidos adiposos juntamente com o delta tocotrienol. Posteriormente a isso, as células foram lavadas com PBS1X e coradas com uma solução de Laranja de Acridina diluída em PBS1X por 5min. Após a marcação, as células foram lavadas, e posteriormente fixadas com solução de PFA 1% e então adquiridas em citômetro de fluxo (FACS BD Verse). Os dados foram plotados e analisados no software Flowjo e Graphpad Prism 8.0.

#### **4.3.8) Perfil de Secreção de Citocinas**

A fim de se verificar se o estímulo de 4T1 com os produtos secretados pelos tecidos adiposos juntamente com o  $\delta$ -Tocotrienol alterava o perfil de citocinas secretadas por essas células neoplásicas, foram realizadas dosagens de IL-6, IL-10, IL-12, TGF- $\beta$  e TNF- $\alpha$  e a quimiocina MCP-1 a partir das sobrenadantes resultantes de cultura pelo método de ELISA, utilizando-se kits comerciais (R&D). As instruções do fabricante foram seguidas e os níveis de citocinas foram apresentados em níveis absolutos (pg/mL).

#### **4.3.9) Espécies Reativas de Oxigênio**

A fim de entender o efeito dos produtos de secreção dos tecidos adiposos juntamente com o  $\delta$ -Tocotrienol sobre a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), foi realizado um ensaio utilizando o CellRox<sup>TM</sup>. Foi seguido o protocolo do fabricante e posteriormente a marcação, as amostras foram adquiridas no citometro de fluxo (FACS BD Verse).

#### **4.3.10) Biogênese de Corpúsculo lipídico**

A fim de se analisar se o tratamento com os sobrenadantes de interação dos tecidos adiposos juntamente com o  $\delta$ -Tocotrienol afeta a biogênese de corpúsculo lipídico em células de 4T1, utilizou-se a sonda fluorescente lipofílica BODIPY 493/503 (Life technologies), a qual interage com lipídeos neutros, abundantes no interior de corpúsculo lipídico.  $10^5$  células foram semeadas em placas de 24 poços e estimuladas por 24 horas. Após tempo de estímulo, as células foram coletadas, lavadas duas vezes com PBS 1X e incubadas em solução de Bodipy/PBS na 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).

#### **4.3.11) Proliferação celular**

Tendo-se como objetivo analisar o efeito dos meios condicionados pelos tecidos adiposos juntamente ao  $\delta$ -Tocotrienol sobre a proliferação de células 4T1, foi realizado um ensaio utilizando o CFSE<sup>TM</sup>. Esse composto fluorescente e 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<sup>5</sup> células foram introduzidas em placas de 24 poços, após completa adesão foram lavadas uma vez com PBS 1 X e expostas à 5 µM 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 1800 rpm e fixadas em 400 µL 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).

#### **4.3.12) Apresentação de Antígeno Lipídico**

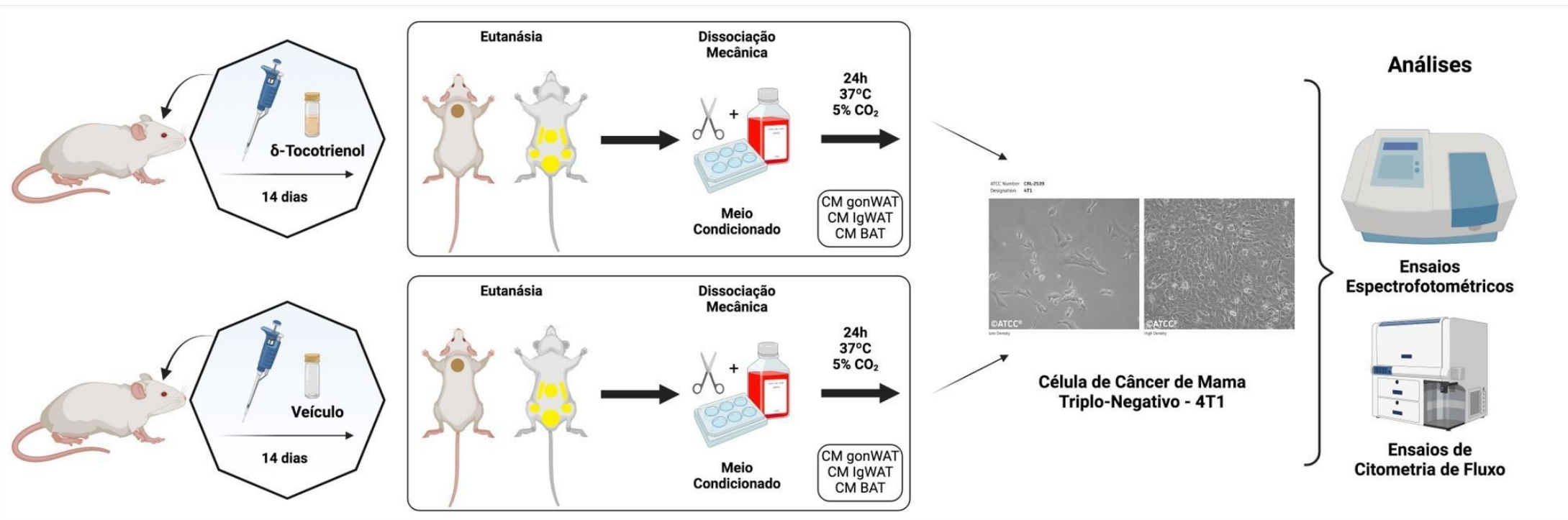
A fim de se analisar se o tratamento com os sobrenadantes de interação dos tecidos adiposos juntamente com o  $\delta$ -Tocotrienol afeta a apresentação de antígenos lipídicos por meio da detecção da molécula CD1d, o reconhecimento dos antígenos lipídicos apresentados pelo CD1d está normalmente associado às células naturais assassinas T (NKT), que se subdividem em subconjuntos de tipo I e tipo II. 10<sup>5</sup> células foram semeadas em placas de 24 poços e estimuladas por 24 horas. Após tempo de estímulo, as células foram coletadas, lavadas duas vezes com PBS 1X e incubadas em solução de anti-CD1d/PBS na proporção de 1/300 a 4 °C ao abrigo de luz por 1h. 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).

#### **4.4. Experimentação *ex vivo***

##### **4.4.1) Delineamento experimental**

Camundongos Balb/c fêmeas selvagens de 10 semanas foram segregados em dois grupos de acordo com o tratamento submetido: Grupo Tocotrienol – 320mg/kg/dia (14 dias de administração via oral de Tocotrienol proveniente do Urucum – NewMax™) e Grupo veículo (14 dias de administração de salina via oral). Após os 14 dias de tratamento, os animais foram submetidos a eutanásia (Cloridrato de Cetamina e Cloridrato de Xilasina) para coleta de amostras para posteriores análises. O resumo do delineamento experimental está ilustrado na Figura 8.



**Figura 8. Delineamento experimental da seção in vivo.** Camundongos fêmeas Balb/C com 10 semanas de vida foram segregados em dois grupos (tratado com Tocotrienol e não tratados) e posteriormente eutanasiadas e em seguida utilizados os tecidos adiposos Branco (gonadal - gonWAT e inguinal – igWAT) e Marrom (BAT). Foram confeccionados meios condicionados dos tecidos adiposos para posterior estímulo. Células de câncer de mama triplo-negativo 4T1 foram estimuladas com os produtos de secreção de tecidos adiposos e posteriormente foram feitas análises de Citometria de fluxo e Espectrofotometria.



#### **4.4.2) Pesagem dos animais**

Visando avaliar o impacto das diferentes condições experimentais sobre o peso dos camundongos, todos os animais foram pesados em dias alternados utilizando balança comum. A avaliação de área abaixo da curva (*Area under the curve* – AUC) foi realizada utilizando o programa *ImageJ*.

#### **4.4.3) Análise da Citogenotoxicidade dos animais**

Visando analisar o impacto das diferentes condições experimentais sobre a massa dos tecidos e do tumor, o ensaio de análise de citogenotoxicidade foi realizado através do protocolo de avaliação do ciclo celular de células da medula óssea.

Os animais tratados e não tratados foram eutanasiados e a medula óssea dos animais foi retirada através do método Flush, como padronizado por Marim, F. et al. 2010. O efeito da suplementação do composto de Tocotrienol 70% (New Max®) sobre ciclo celular e a fragmentação nuclear foram investigados utilizando o agente fluorescente intercalante de nucleotídeos Iodeto de propídeo, e a interpretação dessas análises baseou-se no fato de que a intensidade de fluorescência do Iodeto de propídeo é diretamente proporcional à quantidade de DNA no interior da célula. Camundongos fêmeas Balb/C com 8 a 10 semanas de vida foram suplementadas com 300mg/kg/dia durante 14 dias com o composto de Tocotrienol proveniente de Urucum ou veículo nos animais controle (N=8).

As células foram coletadas, lavadas duas vezes com PBS 1 X e fixadas a etanol 70% por 2 horas a 4 °C. As células foram então lavadas uma vez com PBS 1X em centrifugação à 1000 G por 10 minutos e expostas à solução de marcação (20 µg/mL de Iodeto de propídeo, 50 µg/mL de RNase, 0,1 % citrato de sódio, 0,1 % Triton) por 30 minutos à temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, as células foram ressuspensas em 1 mL de PBS 1X e centrifugadas à 1000 G por 10 minutos. As células foram então ressuspensas em 400 µL de PBS 1X e analisadas em citômetro de fluxo (FACS VERSE, BD Biosciences) em canal FL-2 em escala linear. Os picos relativos às células em G0/G1 e G2/M e o platô associado à fase S foram obtidos e os valores de porcentagem foram analisados. Eventos que apresentaram fluorescência inferior à encontrada nas células em G0/G1 foram considerados casos de fragmentação nuclear. Dados foram analisados utilizando o software e ModFit LT™.

#### **4.4.4) Análise da Viabilidade Mitocondrial**

A fim de se verificar os efeitos dos produtos secretados pelos tecidos adiposos de animais tratados e não tratados com Tocotrienol sobre a viabilidade de células 4T1, foi realizado um ensaio com MTT. Essa análise baseia-se no fato de que o MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio brometo), quando reduzido por enzimas mitocondriais, apresenta-se com coloração arroxeada na forma de cristais de formazan.  $5 \times 10^3$  células foram semeadas em placa de 96 poços e estimuladas por 24 h. Após o tempo de estímulo, as células foram expostas à uma solução de 500  $\mu\text{g/mL}$  de MTT (Life Technologies). O sobrenadante foi descartado e os cristais de formazan foram dissolvidos utilizando-se 100  $\mu\text{L}$  de DMSO puro. A leitura da absorbância foi realizada em 570 nm utilizando o espectrofotômetro *Spectramax M3*. A análise dos dados de viabilidade foi realizada utilizando o software *GraphPad Prism*, considerando a média do valor de absorbância do não-estimulado (UNS) como 100% de viabilidade e analisando os outros grupos de forma proporcional. O controle experimental foi obtido expondo as células à 50 % do agente citotóxico DMSO.

#### **4.4.5) Análise do Perfil de Morte Celular por Anexina/PI**

A análise do perfil de morte celular das células 4T1 estimuladas com os produtos de secreção dos tecidos adiposos de animais tratados e não tratados com Tocotrienol foi realizada por citometria de fluxo utilizando os agentes fluorescentes Anexina V-FITC e Iodeto de propídeo e baseou-se nos fatos de que Anexina V interage com o fosfolípídeo fosfatidilserina, o qual é exposto na face externa da membrana de células apoptóticas, e que Iodeto de propídeo, impermeável à membrana celular, fluoresce após interação com ácidos nucleicos, indicando perda de integridade de membrana plasmática e ocorrência de morte lítica.  $10^5$  células foram semeadas em placas de 24 poços e, após adesão, foram estimuladas por 24 h. Após tratamento, as células foram coletadas e lavadas duas vezes com PBS 1X em centrifugação à 1800 rpm. As células foram então ressuspendidas em 100  $\mu\text{L}$  de tampão de ligação 1 X (10 mM de HEPES/NaOH pH 7,4 140 mM de NaCl e 2,5 mM de  $\text{CaCl}_2$ ), 2  $\mu\text{L}$  de Anexina V-FITC (quatroG) e 2  $\mu\text{L}$  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, ressuspendidas em 400  $\mu\text{L}$  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 usadas células aquecidas à 100 °C por 10 minutos.

#### **4.4.6) Análise do perfil de citocinas dos soros dos animais**

A fim de se verificar se as diferentes condições experimentais influenciaram o perfil de citocinas secretadas pelo soro dos animais. O Sangue dos animais tratados e não tratados foram coletados no dia da eutanásia, centrifugados e, posteriormente, o soro foi armazenado sob refrigeração a temperatura de -20°C. O soro dos animais foi então utilizado para dosagens de IL-6, IL-10, IL-12, TGF- $\beta$  e TNF- $\alpha$ , assim como a quimiocina MCP1, utilizando-se kits comerciais (R&D). As instruções do fabricante foram seguidas e os níveis de citocinas foram apresentados em níveis absolutos (pg/mL).

#### **4.4.7) Análise da Proliferação Celular por meio do CFSE**

Tendo-se como objetivo analisar o efeito dos meios condicionados pelos tecidos adiposos de animais tratados e não tratados com Tocotrienol sobre a proliferação de células 4T1, foi realizado um ensaio utilizando o CFSE<sup>TM</sup>. Esse composto fluorescente e 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<sup>5</sup> células foram introduzidas em placas de 24 poços, após completa adesão foram lavadas uma vez com PBS 1 X e expostas à 5  $\mu$ 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 1800 rpm e fixadas em 400  $\mu$ 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).

#### **4.5) Análise estatística e confecção de gráficos**

A fim de se determinar se os dados seguem distribuição normal, foi utilizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Os dados que se apresentaram com distribuição normal (paramétricos) foram analisados utilizando o teste ANOVA e o pós-teste de Tukey. Já os dados que não seguiram

distribuição normal (não-paramétricos) foram analisados utilizando o teste de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn.

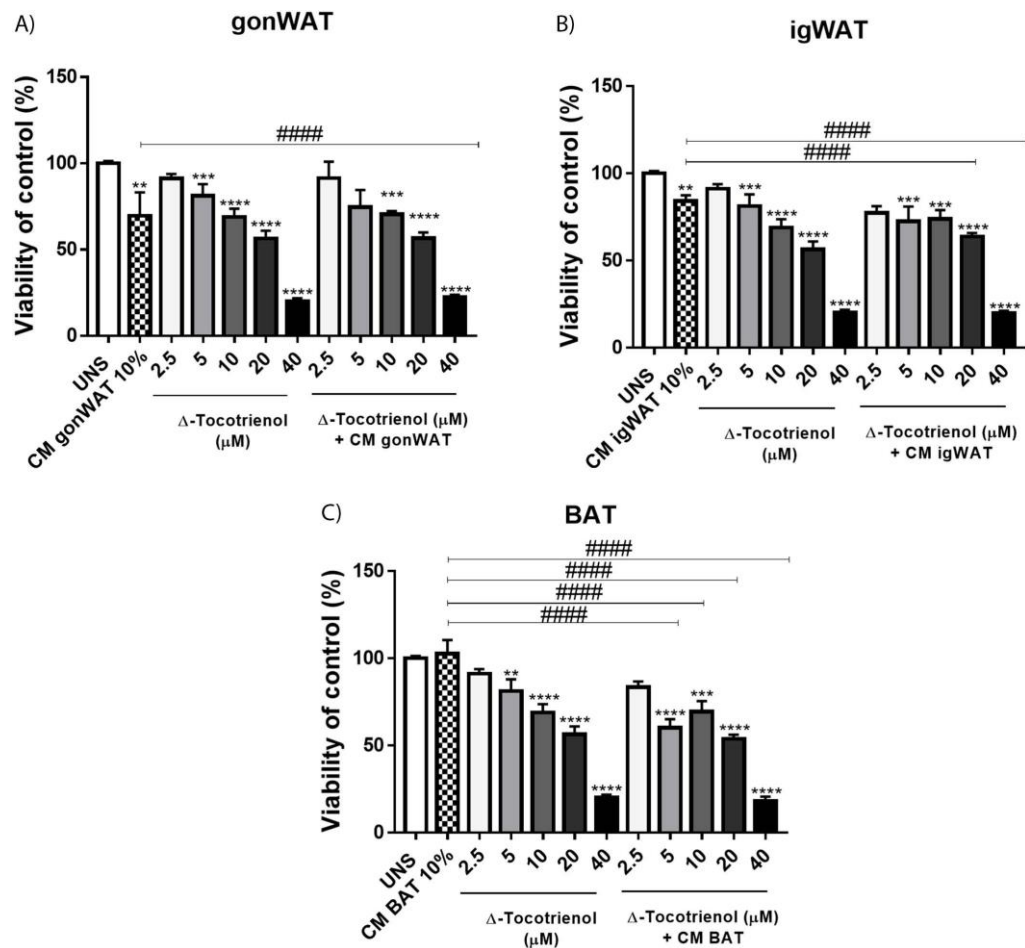
Os gráficos foram confeccionados utilizando *GraphPad Prism* 8.0. Dados paramétricos foram apresentados em gráficos de coluna enquanto que dados não-paramétricos foram mostrados em *box plot*.

## 5. Resultados

### 5.1) Análises *in vitro*

#### 5.1.1) Efeito de moléculas secretadas por tecidos adiposos juntamente ao $\delta$ -Tocotrienol sobre a viabilidade mitocondrial das células 4T1

Considerando o relevante caráter endócrino e a alta plasticidade dos tecidos adiposos influenciados pelas dietas, investigamos o impacto de moléculas derivadas desses tecidos co-tratadas com o  $\delta$ -T3 sobre parâmetros carcinogênicos de células de câncer de mama triplo-negativo 4T1. Primeiro, as células 4T1 estimuladas com produtos de secreção de depósitos de tecido adiposo branco gonadal (gonWAT), inguinal (IgWAT) e tecido adiposo marrom (BAT) co-tratadas com diferentes concentrações de  $\delta$ -T3 (2,5; 5; 10; 20 e 40 $\mu$ M) foram avaliadas quanto à viabilidade mitocondrial. As células estimuladas com os produtos de secreção dos tecidos adiposos (gonWAT, igWAT e BAT) reduziram a viabilidade mitocondrial significativamente quando comparadas as células não estimuladas (UNS). Assim como as células estimuladas com as diferentes concentrações de  $\delta$ -T3 reduziram significativamente a viabilidade mitocondrial quando comparadas ao UNS (Figura 9). Nos co-tratamentos de produtos de secreção de tecidos adiposos conjuntamente com o  $\delta$ -T3, houve redução significativa de viabilidade mitocondrial a partir de 5 $\mu$ M de  $\delta$ -T3 co-tratado com produto de secreção de gonWAT (Figura 9A), com uma redução significativa quando comparado ao tratamento sozinho com o produto de secreção de gonWAT na concentração de 40  $\mu$ M de  $\delta$ -T3. O co-tratamento com moléculas secretadas do igWAT +  $\delta$ -T3 mostrou efeito semelhante ao anterior, com redução significativa de viabilidade mitocondrial nas concentrações de 20 e 40  $\mu$ M de  $\delta$ -T3 quando comparado ao tratamento sozinho com o produto de secreção de igWAT (Figura 9B). O efeito ocorreu semelhantemente nas células co-tratadas com produtos de secreção de BAT +  $\delta$ -T3 com redução significativa de viabilidade mitocondrial (5; 10; 20 e 40 $\mu$ M) quando comparado ao tratamento sozinho com os produtos de secreção de BAT (Figura 9C).

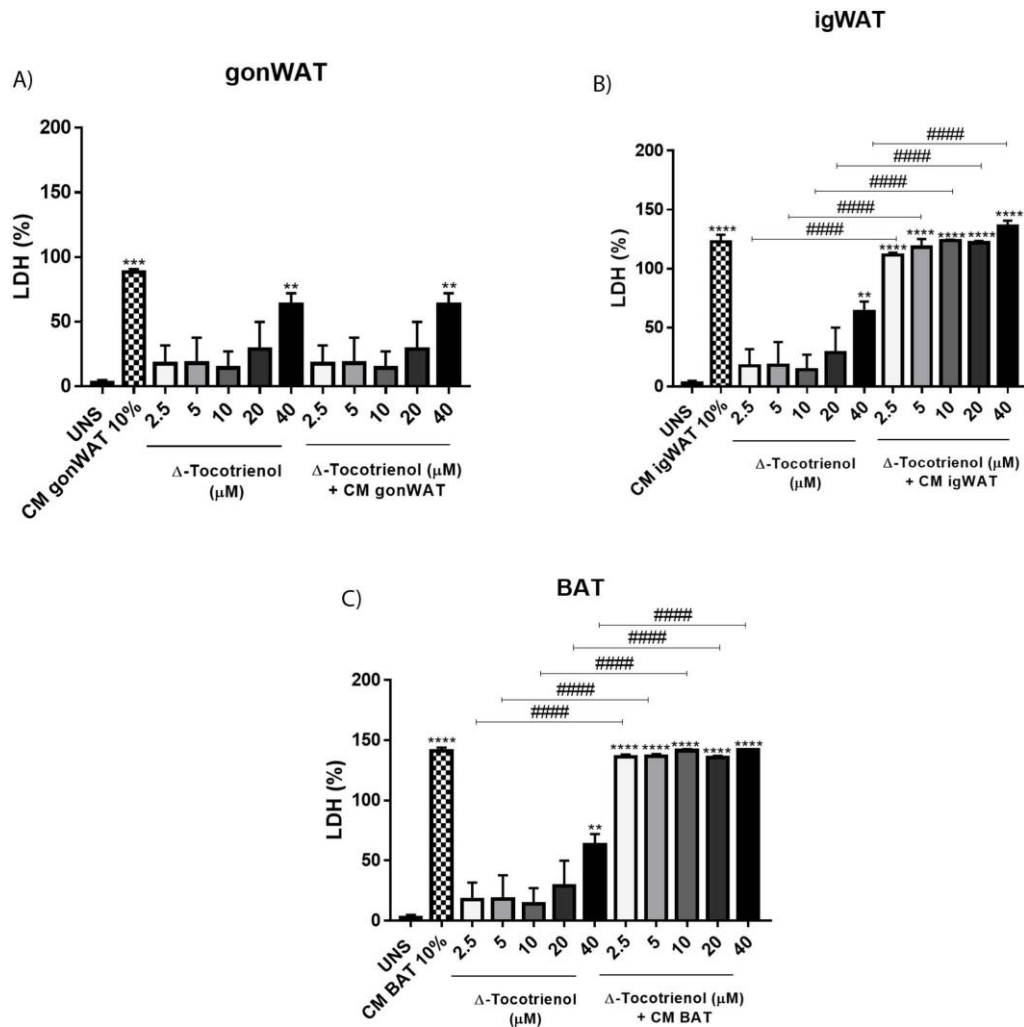


**Figura 9. Influência de moléculas secretadas por tecidos adiposos juntamente com o  $\delta$ -T3 sobre a viabilidade mitocondrial das células 4T1.** Células 4T1 foram avaliadas quanto à viabilidade mitocondrial, após estímulo com produtos de secreção de tecidos adiposos por (A) tecido adiposo branco gonadal e (B) tecido adiposo branco inguinal e (C) tecido adiposo marron juntamente com  $\delta$ -T3. Cada grupo experimental possuía cinco animais (N=5). Resultados referentes à uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi representada com asteriscos (\*) e as diferenças entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra:  $p > 0,05$  (um símbolo),  $p > 0,01$  (dois símbolos) e  $p > 0,001$  (três símbolos).

### **5.1.2) Efeito de moléculas secretadas por tecidos adiposos juntamente ao $\delta$ -Tocotrienol sobre a citotoxicidade das células 4T1**

As células 4T1 foram co-tratadas com produtos de secreção de tecidos adiposos (gonWAT, igWAT e BAT) juntamente com diferentes concentrações de  $\delta$ -T3 (2,5; 5; 10; 20 e 40 $\mu$ M) e posteriormente os sobrenadantes foram analisados quanto a citotoxicidade pela liberação de LDH. Como ilustrado pela Figura 10A, o sobrenadante de interação do tecido adiposo branco gonadal juntamente com o  $\delta$ -T3 induziu maior porcentagem de LDH na concentração de 40  $\mu$ M de  $\delta$ -T3 quando comparado a células não estimuladas. As células co-tratadas com produtos de secreção de igWAT juntamente com o  $\delta$ -T3 induziu maior porcentagem de liberação de LDH quando comparados com o tratamento sozinho com o  $\delta$ -T3 (2,5; 5; 10; 20 e 40 $\mu$ M) (Figura 10B). O efeito sinérgico foi observado também nas células co-tratadas com

produtos de secreção de BAT juntamente com  $\delta$ -T3 quando comparados com o tratamento sozinho com  $\delta$ -T3 (2,5; 5; 10; 20 e 40 $\mu$ M) (Figura 10C).



**Figura 10. Influência do co-tratamento de produtos de secreção de tecidos adiposos juntamente com o  $\delta$ -T3 sobre a citotoxicidade celular das células 4T1.** Células 4T1 foram avaliadas quanto à citotoxicidade celular pela liberação de LDH, após estímulo com produtos de secreção de tecidos adiposos por (A) tecido adiposo branco gonadal e (B) tecido adiposo branco inguinal e (C) tecido adiposo marrom juntamente com  $\delta$ -T3. Cada grupo experimental possuía cinco animais (N=5). Resultados referentes à uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi representada com asteriscos (\*) e as diferenças entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra:  $p > 0,05$  (um símbolo),  $p > 0,01$  (dois símbolos) e  $p > 0,001$  (três símbolos).

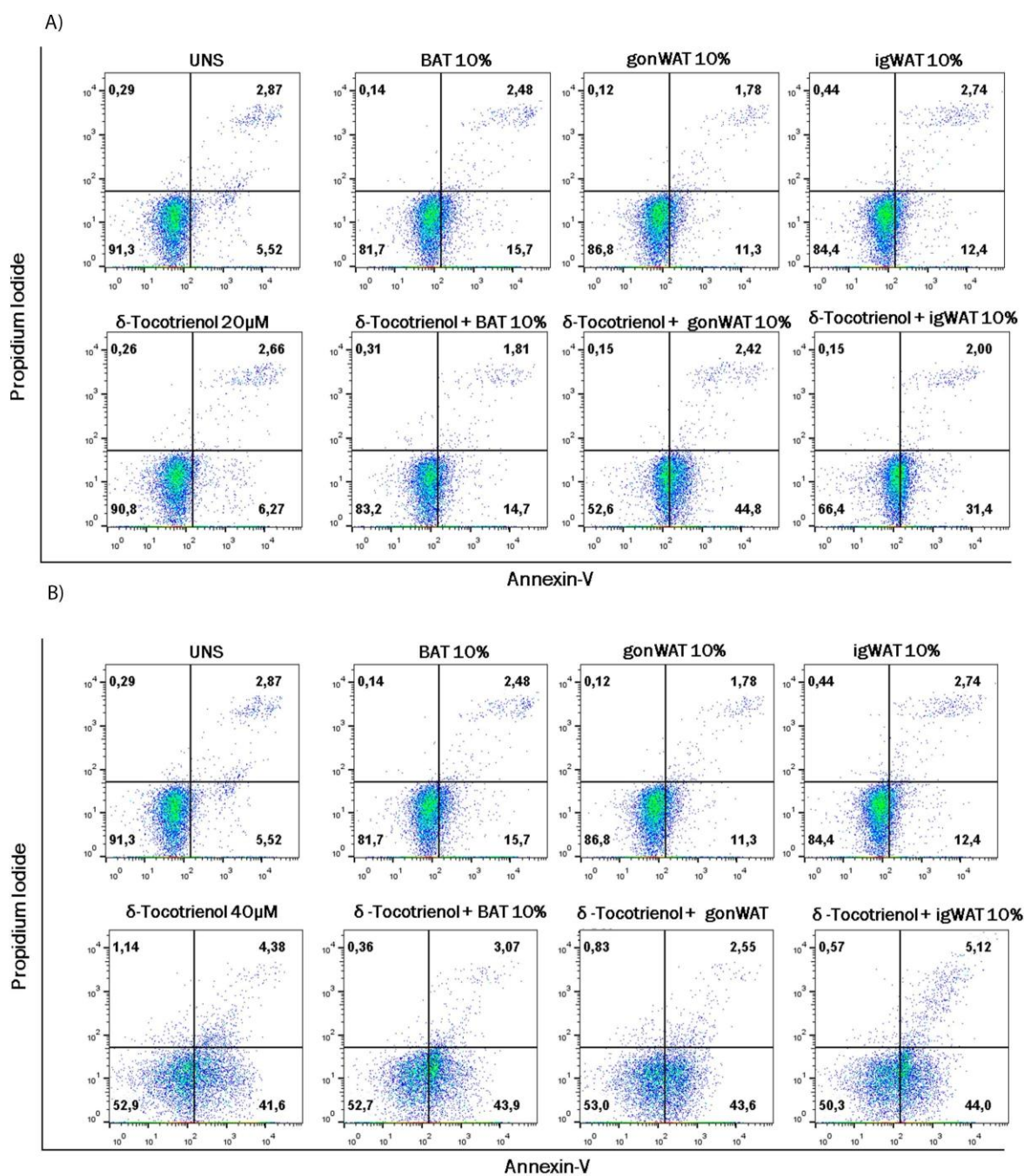


### **5.1.3) Efeito de moléculas secretadas por tecidos adiposos juntamente ao $\delta$ -Tocotrienol sobre o perfil de morte celular das células 4T1**

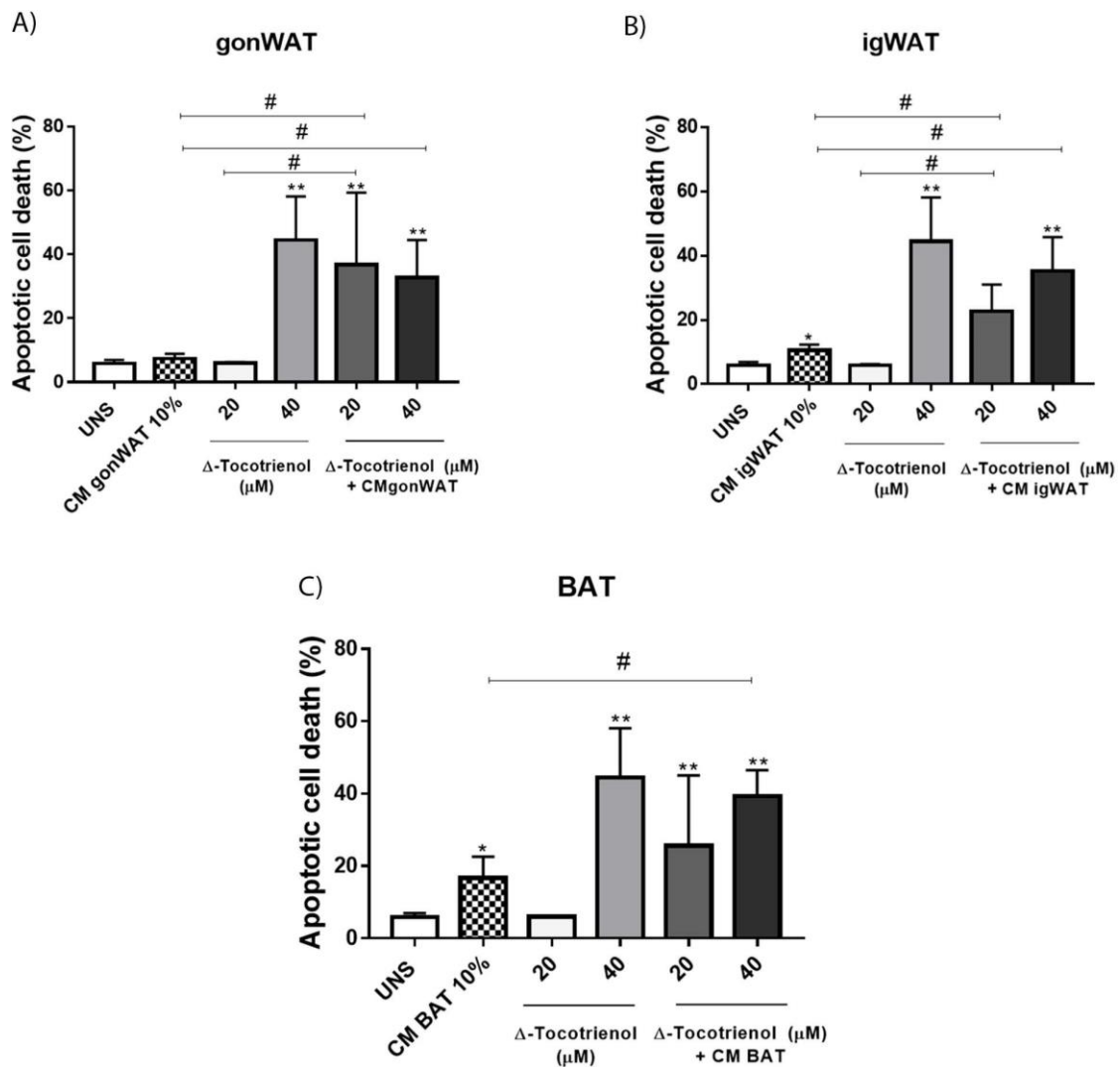
A fim de investigar o perfil de morte celular sobre as células 4T1 no contexto do co-tratamento de produtos de secreção de tecidos adiposos (gonWAT, igWAT e BAT) juntamente com o  $\delta$ -T3. Foi investigado através do ensaio de citometria de Fluxo (Anexina V/Pi) para avaliar o perfil de morte celular das células de câncer de mama murino.

As células co-tratadas com produtos de secreção gonWAT juntamente com  $\delta$ -T3(20 $\mu$ M) induziram maior porcentagem de morte por apoptose quando comparado às células não estimuladas e as células tratadas apenas com o tratamento sozinho (Figura 11A e Figura 12A). O efeito sinérgico foi observado nas células co-tratadas com produtos de secreção de igWAT juntamente com o  $\delta$ -T3 (Figura 11A e Figura 12B), porém não foi observado efeito sinérgico nas células co-tratadas com produtos de secreção de BAT juntamente com  $\delta$ -T3 na concentração de 20 $\mu$ M (Figura 11A e Figura 12C).

Aumentando a concentração de  $\delta$ -T3 (40 $\mu$ M), o efeito sinérgico se mantém nos co-tratamentos anteriormente mencionados (gonWAT+ $\delta$ -T3 e igWAT+ $\delta$ -T3) (Figura 11B e Figuras 12A e B). No co-tratamento com produtos de secreção de BAT juntamente com  $\delta$ -T3, há um aumento significativo de morte por apoptose, mostrando efeito potencializador do co-tratamento (Figura 11B e Figura 12C).



**Figura 11. Influência do co-tratamento de produtos de secreção de tecidos adiposos juntamente com o  $\delta$ -T3 sobre o perfil de morte celular das células 4T1.** Células 4T1 foram avaliadas quanto ao perfil de morte celular pelo ensaio de Anexina V e PI por citometria de fluxo, após estímulo com produtos de secreção de tecidos adiposos juntamente com  $\delta$ -T3 (A) 20 $\mu$ M de  $\delta$ -Tocotrienol e (B) 40 $\mu$ M de  $\delta$ -Tocotrienol. Cada grupo experimental possuía cinco animais (N=5). Resultados referentes à uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi representada com asteriscos (\*) e as diferenças entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra:  $p > 0,05$  (um símbolo),  $p > 0,01$  (dois símbolos) e  $p > 0,001$  (três símbolos).



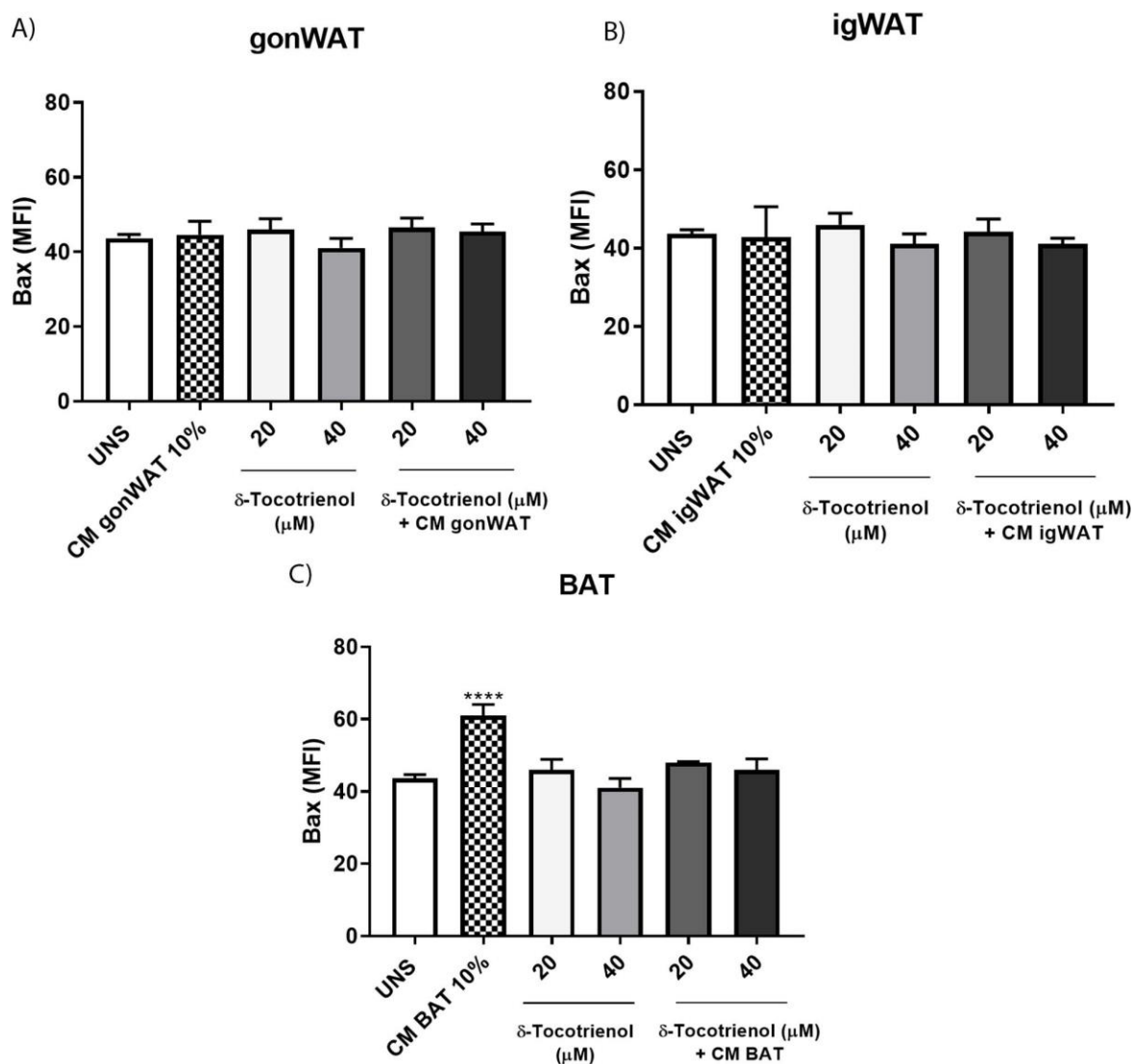
**Figura 12. Influência do co-tratamento de produtos de secreção de tecidos adiposos juntamente com o  $\delta$ -T3 sobre o perfil de apoptose das células 4T1.** Células 4T1 foram avaliadas quanto ao perfil de apoptose pelo ensaio de Anexina V e PI por citometria de fluxo, após estímulo com produtos de secreção de tecidos adiposos por (A) tecido adiposo branco gonadal e (B) tecido adiposo branco inguinal e (C) tecido adiposo marron juntamente com  $\delta$ -T3. Cada grupo experimental possuía cinco animais (N=5). Resultados referentes à uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi representada com asteriscos (\*) e as diferenças entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra:  $p > 0,05$  (um símbolo),  $p > 0,01$  (dois símbolos) e  $p > 0,001$  (três símbolos).

#### **5.1.4) Efeito de moléculas secretadas por tecidos adiposos juntamente ao $\delta$ -Tocotrienol sobre os níveis de Caspase 3 e Bax nas células 4T1**

Verificando o papel diferencial dos tecidos adiposos sobre o câncer de mama murino, assim como, o papel do  $\delta$ -T3 sobre a morte celular por apoptose. Células 4T1, foram co-tratadas com produtos de secreção de tecidos adiposos (gonWAT, igWAT e BAT) juntamente com o  $\delta$ -T3 (20 e 40 $\mu$ M) a fim de investigar os níveis de moléculas da via de apoptose (Bax e Caspase 3).

Como ilustrado na Figura 13A, células co-tratadas com produtos de secreção de gonWAT juntamente com  $\delta$ -T3, aumentam os níveis de Caspase 3, significativamente, quando comparados com células não tratadas, e tratadas apenas com o produto de secreção. O co-tratamento de produtos de secreção de igWAT juntamente com  $\delta$ -T3 em células 4T1, aumentou significativamente os níveis de Caspase 3 quando comparadas às células não tratadas e tratadas apenas com o sobrenadante de interação (40 $\mu$ M) ou apenas com o  $\delta$ -T3 (20 e 40 $\mu$ M) (Figura 13B). O co-tratamento de produtos de secreção de BAT juntamente com  $\delta$ -T3, mostrou efeito sinérgico significativo, quando comparado ao tratamento sozinho com o sobrenadante de interação de BAT (Figura 13C).

Os níveis de BAX não foram modulados pelos co-tratamentos, mostrando uma possível ausência de função na interação com produtos de secreção e  $\delta$ -T3 (Figura 14A,B e C).



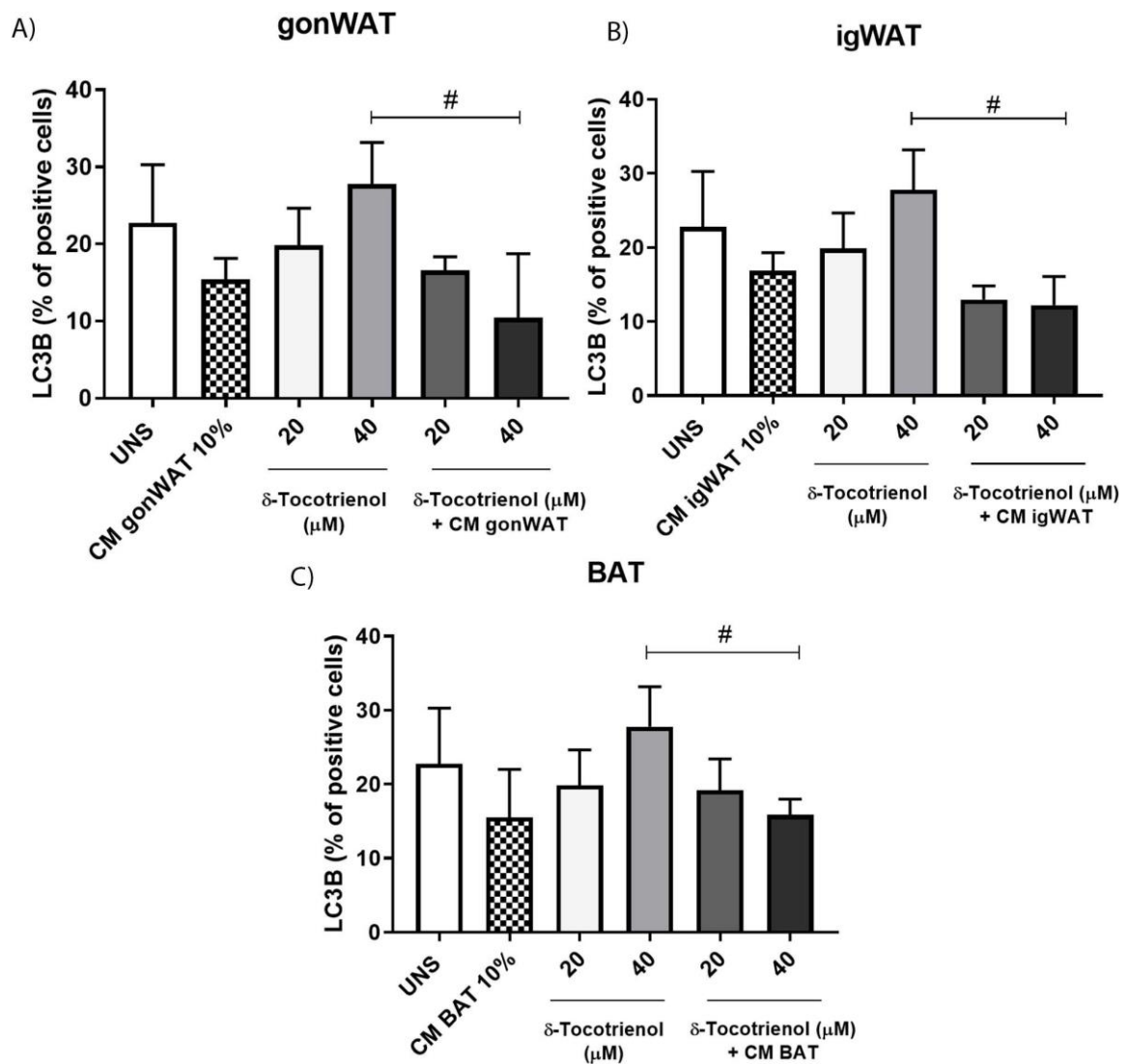
**Figura 14. Influência do co-tratamento de produtos de secreção de tecidos adiposos juntamente com o  $\delta$ -T3 sobre os níveis de BAX das células 4T1.** Células 4T1 foram avaliadas quanto ao perfil de níveis de BAX, após estímulo com produtos de secreção de tecidos adiposos por (A) tecido adiposo branco gonadal e (B) tecido adiposo branco inguinal e (C) tecido adiposo marron juntamente com  $\delta$ -T3. Cada grupo experimental possuía cinco animais (N=5). Resultados referentes à uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi representada com asteriscos (\*) e as diferenças entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra:  $p > 0,05$  (um símbolo),  $p > 0,01$  (dois símbolos) e  $p > 0,001$  (três símbolos).

#### **5.1.4) Efeito de moléculas secretadas por tecidos adiposos juntamente ao $\delta$ -Tocotrienol sobre os níveis de LC3B e Acidificação Lisossomal de células 4T1**

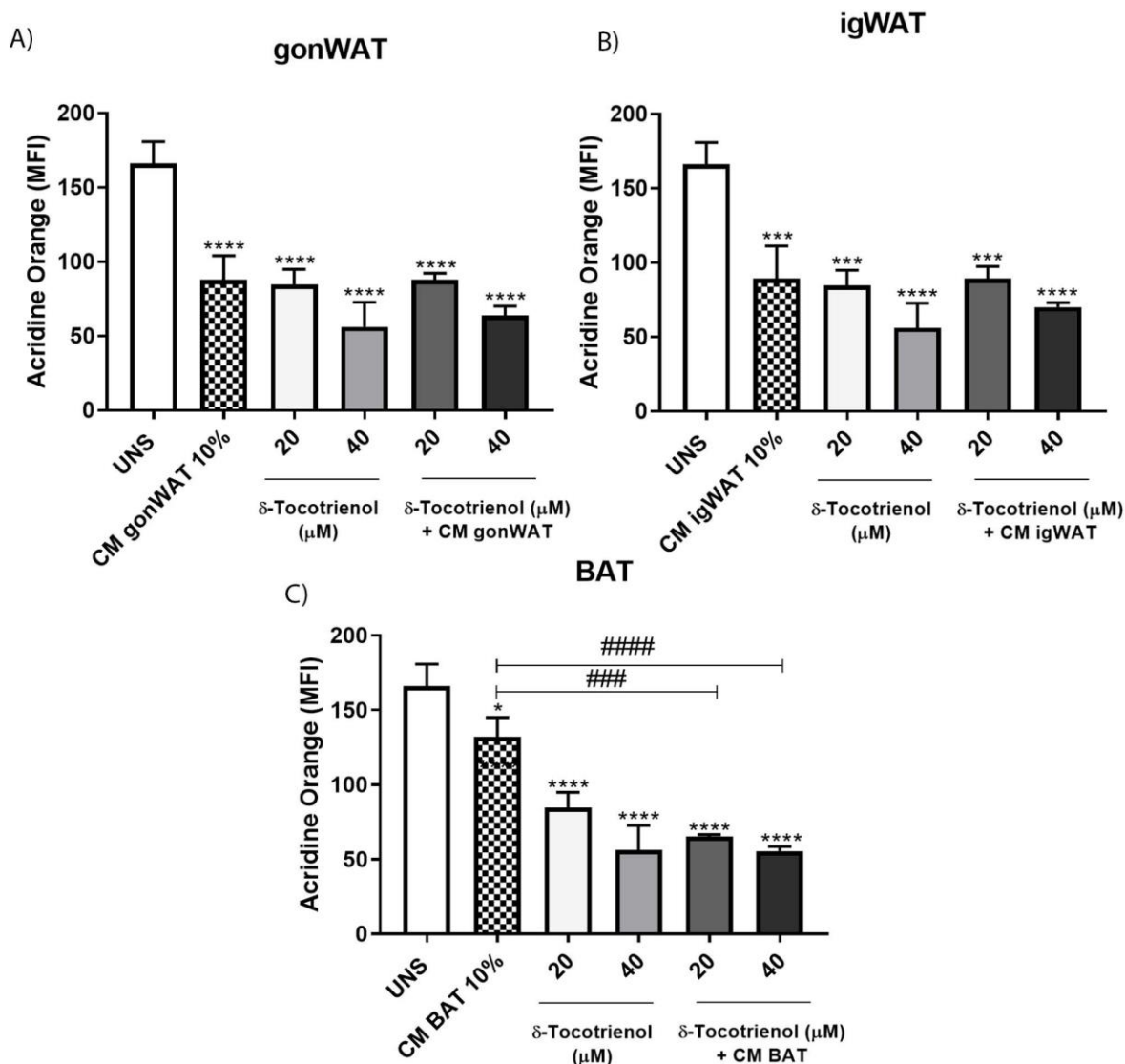
A fim de investigar o papel dos níveis da proteína LC3B, assim como os níveis de acidificação lisossomal, células 4T1 foram co-tratadas com produtos de secreção de tecidos adiposos (gonWAT, igWAT e BAT) juntamente com o  $\delta$ -T3.

Células co-tratadas com sobrenadantes de interação de gonWAT juntamente com o  $\delta$ -T3, mostraram diminuição significativa nos níveis de LC3B quando comparados com células não estimuladas, assim como, com células tratadas apenas com o  $\delta$ -T3 (40 $\mu$ M) (Figura 15A). O co-tratamento de sobrenadantes de interação de igWAT juntamente com  $\delta$ -T3, mostrou efeito sinérgico significativo na diminuição dos níveis de LC3B, quando comparados ao tratamento sozinho com  $\delta$ -T3 (40 $\mu$ M) (Figura 15B). O co-tratamento de produtos de secreção de BAT juntamente com  $\delta$ -T3, mostrou efeito sinérgico significativo com a diminuição de níveis de LC3B quando comparados ao tratamento sozinho de  $\delta$ -T3 (40 $\mu$ M) (Figura 15C).

A acidificação lisossomal foi avaliada através da sonda fluorescente Laranja de Acridina. As células co-tratadas com produtos de secreção de gonWAT juntamente com  $\delta$ -T3 mostraram diminuição significativa de níveis de acidificação lisossomal quando comparadas às células não estimuladas (Figura 16A). As células co-tratadas com produtos de secreção de igWAT juntamente com  $\delta$ -T3, mostraram diminuição significativa de níveis de acidificação lisossomal quando comparadas às células não estimuladas (Figura 16B). O co-tratamento de células 4T1 com produtos de secreção de BAT juntamente com  $\delta$ -T3, mostrou efeito sinérgico, significativo, na diminuição dos níveis de acidificação lisossomal quando comparadas ao tratamento sozinho com o produto de secreção dos tecidos adiposos (Figura 16C).



**Figura 15. Influência do co-tratamento de produtos de secreção de tecidos adiposos juntamente com o  $\delta$ -T3 sobre os níveis de LC3B das células 4T1.** Células 4T1 foram avaliadas quanto ao perfil de níveis de LC3B, após estímulo com produtos de secreção de tecidos adiposos por (A) tecido adiposo branco gonadal e (B) tecido adiposo branco inguinal e (C) tecido adiposo marron juntamente com  $\delta$ -T3. Cada grupo experimental possuía cinco animais (N=5). Resultados referentes à uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi representada com asteriscos (\*) e as diferenças entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra:  $p > 0,05$  (um símbolo),  $p > 0,01$  (dois símbolos) e  $p > 0,001$  (três símbolos).



**Figura 16. Influência do co-tratamento de produtos de secreção de tecidos adiposos juntamente com o  $\delta$ -T3 sobre os níveis de Acidificação Lisossomal por Laranja de Acridina das células 4T1.** Células 4T1 foram avaliadas quanto ao perfil de níveis de Laranja de Acridina, após estímulo com produtos de secreção de tecidos adiposos por (A) tecido adiposo branco gonadal e (B) tecido adiposo branco inguinal e (C) tecido adiposo marrom juntamente com  $\delta$ -T3. Cada grupo experimental possuía cinco animais (N=5). Resultados referentes à uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi representada com asteriscos (\*) e as diferenças entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra:  $p > 0,05$  (um símbolo),  $p > 0,01$  (dois símbolos) e  $p > 0,001$  (três símbolos).

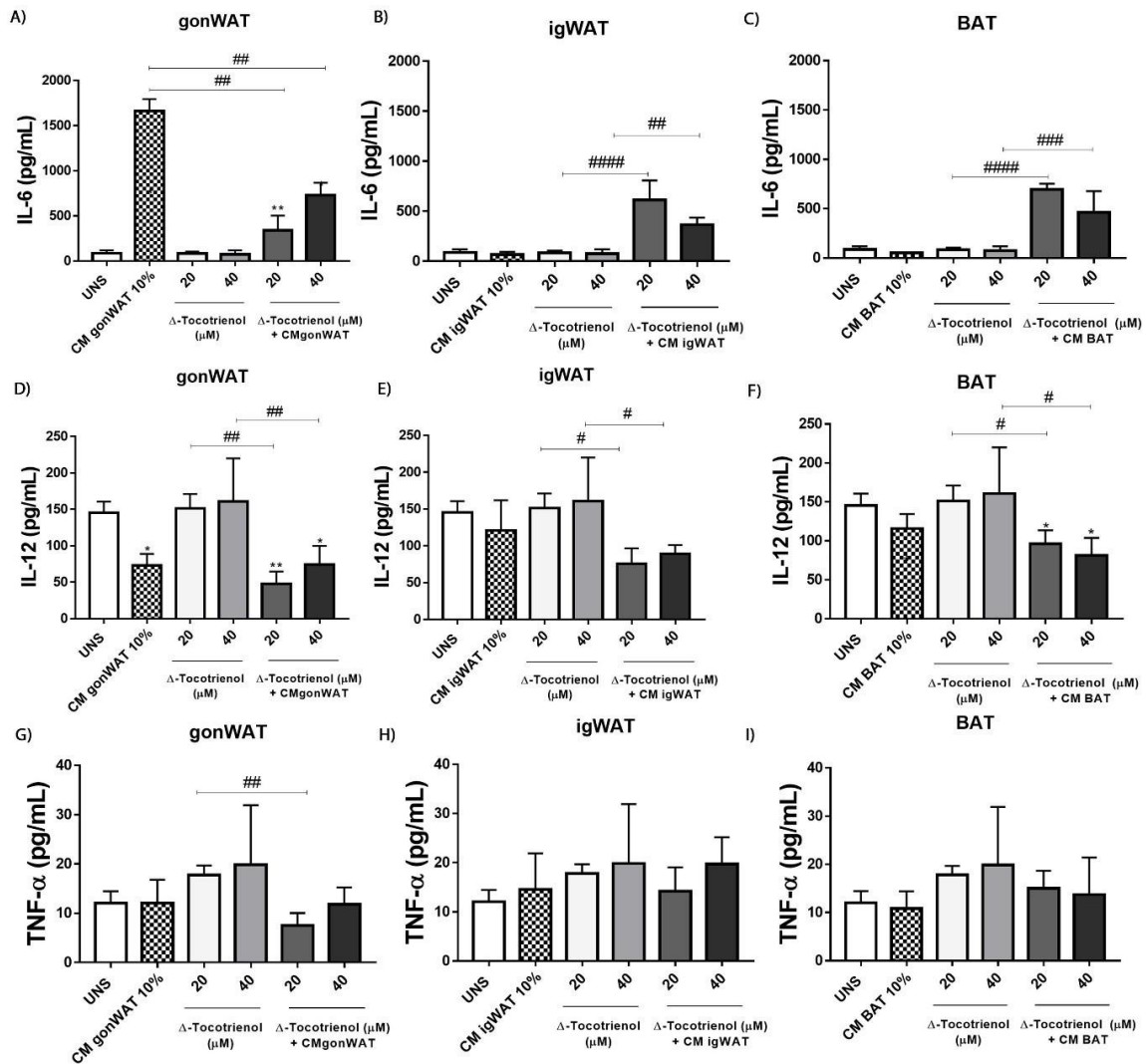


### **5.1.5) Efeito de moléculas secretadas por tecidos adiposos juntamente ao $\delta$ -Tocotrienol sobre os níveis de secreção de Citocinas e Quimiocinas de células 4T1**

Considerando a relevância dos tecidos adiposos e do  $\delta$ -T3 na imunidade sistêmica, foi observada a influência dos produtos de secreção dos tecidos adiposos juntamente com o  $\delta$ -T3 sobre os níveis de citocinas liberadas pelas células 4T1. A Figura 17A, B e C, ilustra o perfil de secreção da citocina IL-6. Quando as células foram tratadas com sobrenadante de tecidos adiposos brancos gonadais, houve um aumento da secreção da citocina pró tumoral IL-6, o co-tratamento diminuiu a secreção de IL-6 em células 4T1 quando comparado ao tratamento sozinho com os produtos de secreção de gonWAT (Figura 17A). O tratamento com produtos de secreção de tecido adiposo branco inguinal não aumentou significativamente a secreção de IL-6, porém o co-tratamento aumentou significativamente a secreção da citocina IL-6 quando comparada com células não estimuladas e células tratadas com um dos tratamentos sozinhos (igWAT ou  $\delta$ -T3) (Figura 17B). Já o tratamento de células 4T1 com produtos de secreção de BAT, tiveram o mesmo efeito que as células tratadas com igWAT, aumentando a secreção da citocina IL-6 quando co-tratadas comparado à células não tratadas e a células com tratamento sozinho (igWAT ou  $\delta$ -T3) (Figura 17C).

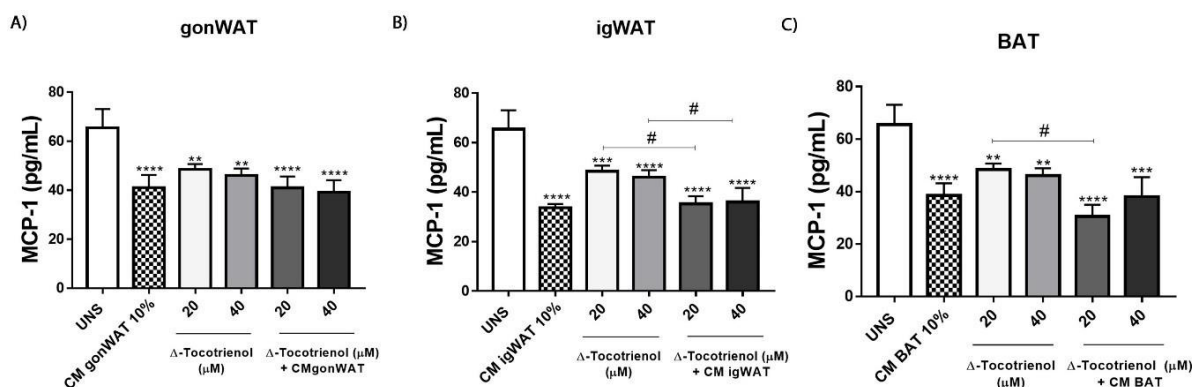
Já quando células 4T1 foram estimuladas com os produtos de secreção de tecidos adiposos gonadais, houve diminuição da secreção da citocina do mediador inflamatório IL-12 quando comparado com células não estimuladas, assim como, células conjuntamente tratadas com produtos de secreção de gonWAT e  $\delta$ -T3, diminuíram a secreção da citocina IL-12 quando comparado a células tratadas apenas com  $\delta$ -T3 (Figura 17D). O padrão de secreção aconteceu semelhantemente nas células estimuladas com produtos de secreção de igWAT e BAT (Figura 17E e F), ocorrendo efeito sinérgico no co-tratamento de produtos de secreção juntamente com o  $\delta$ -T3 em ambas as concentrações (20 e 40 $\mu$ M).

A secreção da citocina TNF- $\alpha$  foi avaliada nas células estimuladas com sobrenadantes de tecidos adiposos gonadais (Figura 17G), inguinais (Figura 17H) e marrons (Figura 17I), conjuntamente tratadas com o  $\delta$ -T3 em duas concentrações (20 e 40 $\mu$ M). Células estimuladas com produtos de secreção de tecidos adiposos gonadais juntamente tratadas com  $\delta$ -T3 na concentração de 20 $\mu$ M foi significativamente diferente de células apenas tratadas com o  $\delta$ -T3 (Figura 17G).



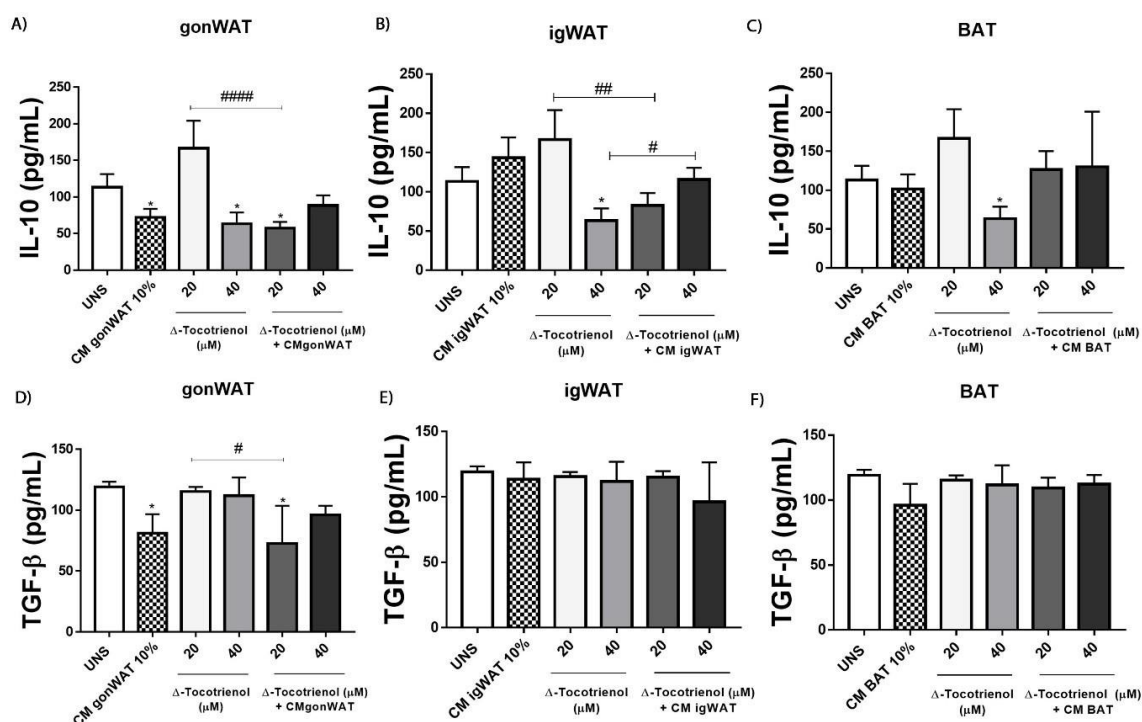
**Figura 17. Influência do co-tratamento de produtos de secreção de tecidos adiposos juntamente com o  $\delta$ -T3 sobre os níveis de secreção de citocinas pró-inflamatórias por células 4T1.** Sobrenadantes de células 4T1 foram avaliadas quanto ao perfil de secreção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-12 e TNF- $\alpha$ ), após estímulo com produtos de secreção de tecidos adiposos por (A, D e G) tecido adiposo branco gonadal e (B, E e H) tecido adiposo branco inguinal e (C, F e I) tecido adiposo marron juntamente com  $\delta$ -T3. Cada grupo experimental possuía cinco animais (N=5). Resultados referentes à uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi representada com asteriscos (\*) e as diferenças entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra: p>0,05 (um símbolo), p>0,01 (dois símbolos) e p>0,001 (três símbolos).

A secreção da quimiocina quimioatrativa MCP1 (CCL2) também foi avaliada nas células tratadas com sobrenadantes de tecidos adiposos gonadais, inguinais e marrons. Células tratadas com sobrenadantes de gonWAT reduziram significativamente a secreção de MCP1 quando comparado as células não estimuladas (Figura 18A). Já as células tratadas com sobrenadantes de igWAT, reduziram sigficamente a secreção de MCP1 em todas as condições quando comparada as células não estimuladas e houve potencialização da diminuição quando houve o co-tratamento de  $\delta$ -T3 juntamente com o sobrenadante do tecido adiposo, quando comparado as células estimuladas apenas com  $\delta$ -T3 (Figura 18B). O mesmo efeito ocorreu nas células estimuladas com produtos de secreção de tecido adiposo marrom (Figura 18C).



**Figura 18. Influência do co-tratamento de produtos de secreção de tecidos adiposos juntamente com o  $\delta$ -T3 sobre os níveis de secreção da quimiocina MCP1 por células 4T1.** Sobrenadantes de células 4T1 foram avaliadas quanto ao perfil de secreção da quimiocina MCP1 após estímulo com produtos de secreção de tecidos adiposos por (A) tecido adiposo branco gonadal e (B) tecido adiposo branco inguinal e (C) tecido adiposo marron juntamente com  $\delta$ -T3. Cada grupo experimental possuía cinco animais (N=5). Resultados referentes à uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi representada com asteriscos (\*) e as diferenças entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra: p>0,05 (um símbolo), p>0,01 (dois símbolos) e p>0,001 (três símbolos).

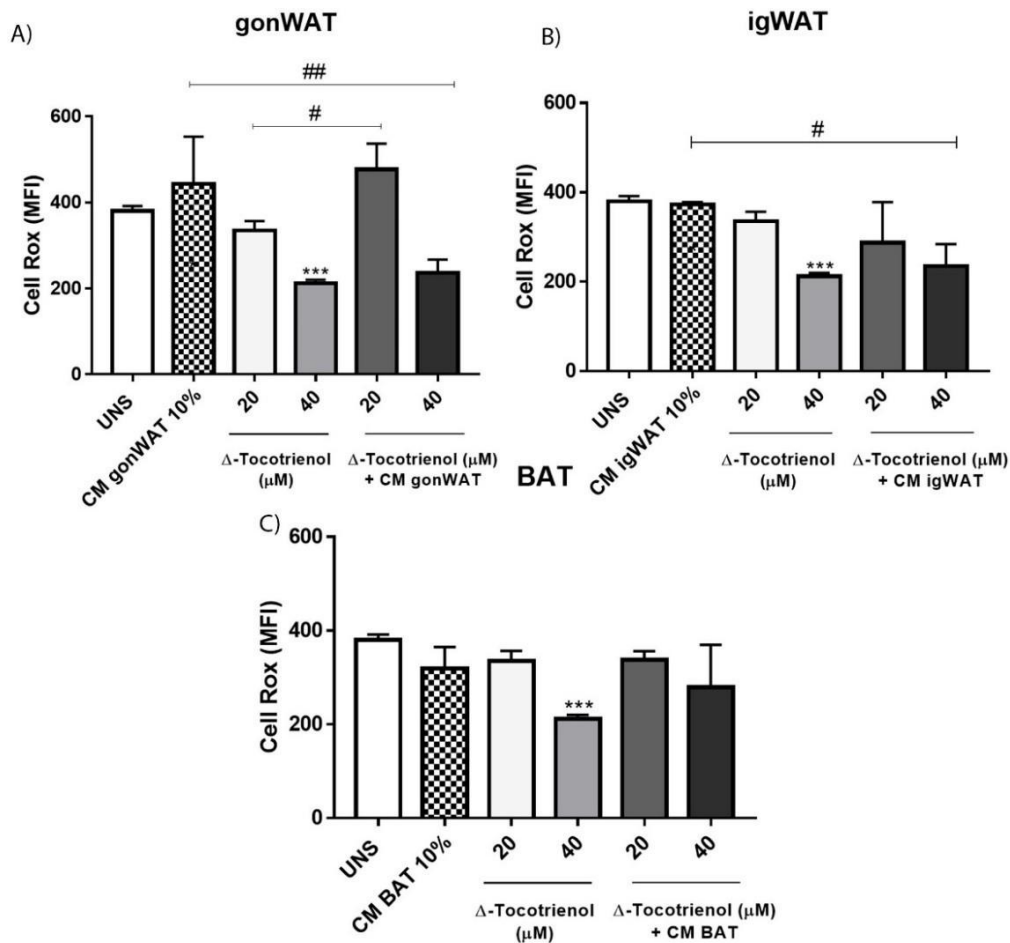
O perfil de secreção de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- $\beta$ ) foi investigado nas células estimuladas com produtos de secreção de tecidos adiposos, bem como, com o  $\delta$ -T3. Células estimuladas com produtos de secreção de tecidos adiposos gonadais reduziram a secreção das citocinas IL-10 e TGF- $\beta$  quando comparadas as células não estimuladas (Figura 19A e D), houve redução significativa do co-tratamento quando comparado as células tratadas apenas com  $\delta$ -T3 (Figura 19A e D). Já as células tratadas com sobrenadantes de igWAT, reduziram a secreção de IL-10 quando comparadas as células não estimuladas, porém não houve diferença na secreção de TGF- $\beta$  quando comparado as células não estimuladas (Figura 19B e E). As células tratadas com produtos de secreção de BAT não tiveram diferença significativa de secreção de IL-10, com exceção das células tratadas apenas com  $\delta$ -T3 em comparação as células não estimuladas. E não alteração no perfil de secreção de TGF- $\beta$  nas células tratadas com produtos de secreção de BAT quando comparadas as células não estimuladas (Figura 19C e F).



**Figura 19. Influência do co-tratamento de produtos de secreção de tecidos adiposos juntamente com o  $\delta$ -T3 sobre os níveis de secreção de citocinas anti-inflamatórias por células 4T1.** Sobrenadantes de células 4T1 foram avaliadas quanto ao perfil de secreção de citocinas pró-inflamatórias (IL-10 e TGF- $\beta$ ), após estímulo com produtos de secreção de tecidos adiposos por (A e D) tecido adiposo branco gonadal e (B e E) tecido adiposo branco inguinal e (C e F) tecido adiposo marron juntamente com  $\delta$ -T3. Cada grupo experimental possuía cinco animais (N=5). Resultados referentes à uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi representada com asteriscos (\*) e as diferenças entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra:  $p > 0,05$  (um símbolo),  $p > 0,01$  (dois símbolos) e  $p > 0,001$  (três símbolos).

#### **5.1.6) Efeito de moléculas secretadas por tecidos adiposos juntamente ao $\delta$ -Tocotrienol sobre a formação de Espécies Reativas de Oxigênio de células 4T1**

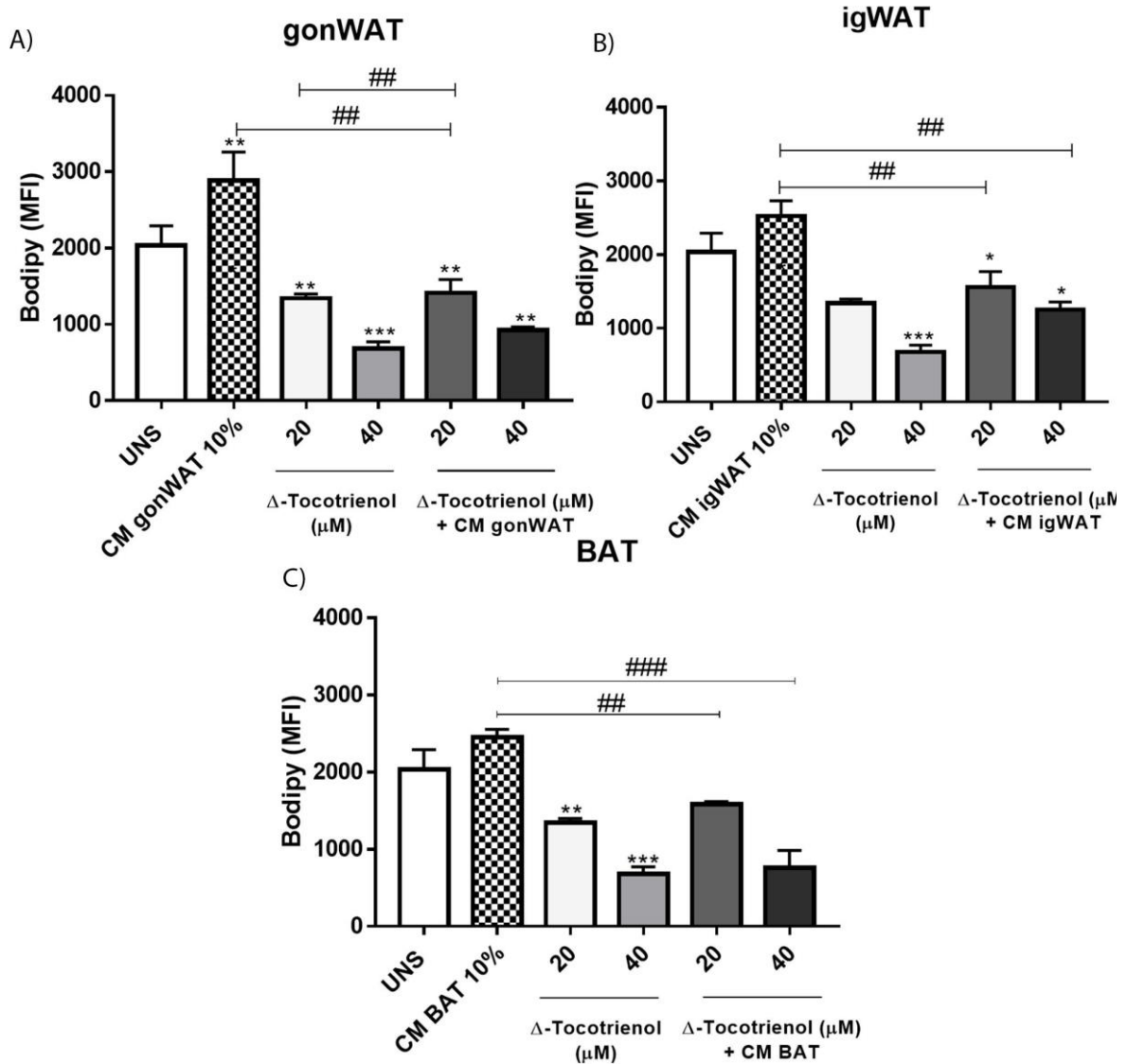
Visando verificar os efeitos do co-tratamento dos produtos de secreção de tecidos adiposos juntamente com o  $\delta$ -T3 sobre a formação de Espécies Reativas de Oxigênio sob as células 4T1. O tratamento com produtos de secreção de gonWAT induziu uma redução da formação de espécies reativas de oxigênio quando co-tratadas com  $\delta$ -T3 quando comparada ao tratamento apenas com sobrenadante de gonWAT (Figura 20A). O efeito de também ocorreu nas células estimuladas com produtos de secreção de igWAT co-tratadas com  $\delta$ -T3 (40 $\mu$ M) quando comparadas com células tratadas apenas com produtos de secreção de igWAT (Figura 20B). Nas células tratadas com produtos de secreção de BAT, apenas as células estimuladas com  $\delta$ -T3 (40 $\mu$ M) diminuíram a formação de espécies reativas de oxigênio quando comparada as células não estimuladas (Figura 20C).



**Figura 20. Influência do co-tratamento de produtos de secreção de tecidos adiposos juntamente com o  $\delta$ -T3 sobre a formação de espécies reativas de oxigênio por células 4T1.** Sobrenadantes de células 4T1 foram avaliadas quanto ao perfil de secreção da quimiocina MCP1 após estímulo com produtos de secreção de tecidos adiposos por (A) tecido adiposo branco gonadal e (B) tecido adiposo branco inguinal e (C) tecido adiposo marron juntamente com  $\delta$ -T3. Cada grupo experimental possuía cinco animais (N=5). Resultados referentes à uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi representada com asteriscos (\*) e as diferenças entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra:  $p > 0,05$  (um símbolo),  $p > 0,01$  (dois símbolos) e  $p > 0,001$  (três símbolos).

### **5.1.7) Efeito de moléculas secretadas por tecidos adiposos juntamente ao $\delta$ -Tocotrienol sobre os níveis de Biogênese de Corpúsculos Lipídicos de células 4T1**

Observando a importância dos corpúsculos lipídicos no contexto do microambiente tumoral e a fisiologia celular, avaliou-se o processo de biogênese de corpúsculo lipídico das células tratadas com produtos de secreção de tecidos adiposos juntamente com o  $\delta$ -T3. As moléculas secretadas pelo gonWAT induziu aumento da biogênese de corpúsculo quando comparado com as células não estimuladas, entretanto, as células tratadas com  $\delta$ -T3 diminuíram a biogênese de corpúsculo lipídico em comparação as células não estimuladas, e quando co-tratadas as células mantêm o mesmo efeito de diminuição de biogênese de corpúsculo lipídico (Figura 21A). O co-tratamento de moléculas secretadas de igWAT conjuntamente tratadas com  $\delta$ -T3, mostram diminuição significativa quando comparadas as células tratadas apenas com moléculas de igWAT (Figura 20B). O mesmo efeito ocorreu nas células tratadas com moléculas secretadas de BAT, diminuindo significativamente a biogênese de corpúsculo lipídico quando comparado ao tratamento apenas com moléculas de BAT (Figura 20C).

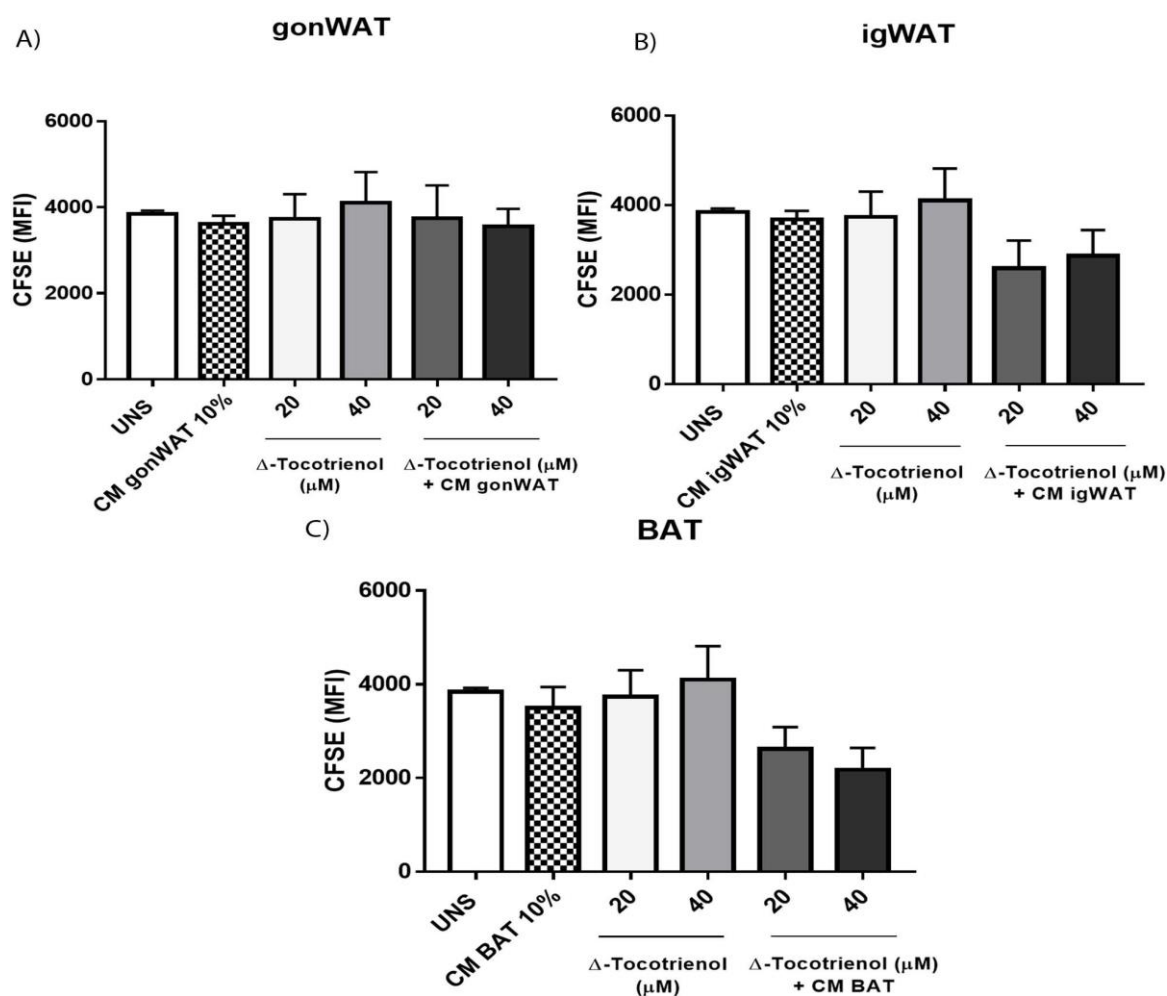


**Figura 21. Influência do co-tratamento de produtos de secreção de tecidos adiposos juntamente com o  $\delta$ -T3 sobre a biogênese de corpúsculos lipídicos por células 4T1.** Células 4T1 foram avaliadas quanto a biogênese de corpúsculos lipídicos, após estímulo com produtos de secreção de tecidos adiposos por (A) tecido adiposo branco gonadal e (B) tecido adiposo branco inguinal e (C) tecido adiposo marron juntamente com  $\delta$ -T3. Cada grupo experimental possuía cinco animais (N=5). Resultados referentes à uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi representada com asteriscos (\*) e as diferenças entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra:  $p > 0,05$  (um símbolo),  $p > 0,01$  (dois símbolos) e  $p > 0,001$  (três símbolos).



### 5.1.8) Influência de moléculas secretadas por tecidos adiposos juntamente ao $\delta$ -Tocotrienol sobre a proliferação de células 4T1

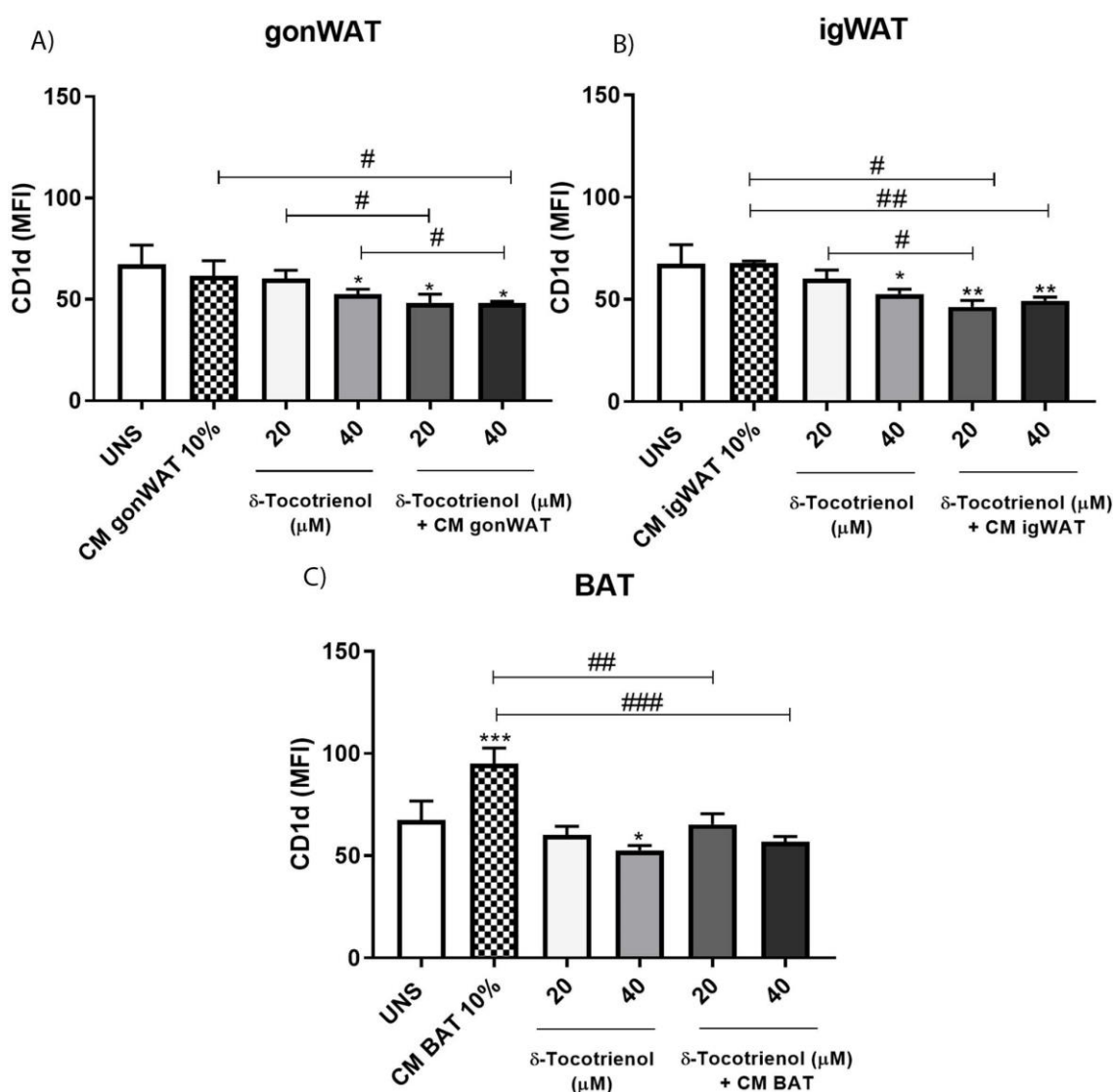
Levando em consideração o impacto do tratamento de moléculas secretadas de tecidos adiposos juntamente com o  $\delta$ -T3 sobre as células 4T1, foi analisado os efeitos deste tratamento sob a proliferação celular das células de tumor de mama. Como ilustrado pela Figura 22, o tratamento com produtos secretados de tecidos adiposos juntamente com o  $\delta$ -T3 não modularam a proliferação de células 4T1.



**Figura 22. Influência do co-tratamento de produtos de secreção de tecidos adiposos juntamente com o  $\delta$ -T3 sobre a proliferação celular por células 4T1.** Células 4T1 foram avaliadas quanto a proliferação celular, após estímulo com produtos de secreção de tecidos adiposos por (A) tecido adiposo branco gonadal e (B) tecido adiposo branco inguinal e (C) tecido adiposo marron juntamente com  $\delta$ -T3. Cada grupo experimental possuía cinco animais (N=5). Resultados referentes à uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi representada com asteriscos (\*) e as diferenças entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra:  $p > 0,05$  (um símbolo),  $p > 0,01$  (dois símbolos) e  $p > 0,001$  (três símbolos).

### 5.1.9) Efeito de moléculas secretadas por tecidos adiposos juntamente ao $\delta$ -T3 sobre os níveis da molécula apresentadora de antígenos lipídicos de células 4T1

Considerando o importante papel dos tecidos adiposos na imunidade, foi investigado a influência dos produtos de secreção dos tecidos adiposos juntamente com o  $\delta$ -T3 em células 4T1 sobre a apresentação de antígenos lipídicos. A apresentação de lipídios foi reduzida nas células tratadas com moléculas secretadas de tecidos adiposos gonadais juntamente com o  $\delta$ -T3 quando comparado a células com o tratamento sozinho (Figura 23A). O mesmo efeito foi observado nas células tratadas com moléculas secretadas de tecidos adiposos inguinais e marrons, observando efeito sinérgico do co-tratamento do  $\delta$ -T3 juntamente com os produtos de secreção de tecidos adiposos (Figura 23 B e C).

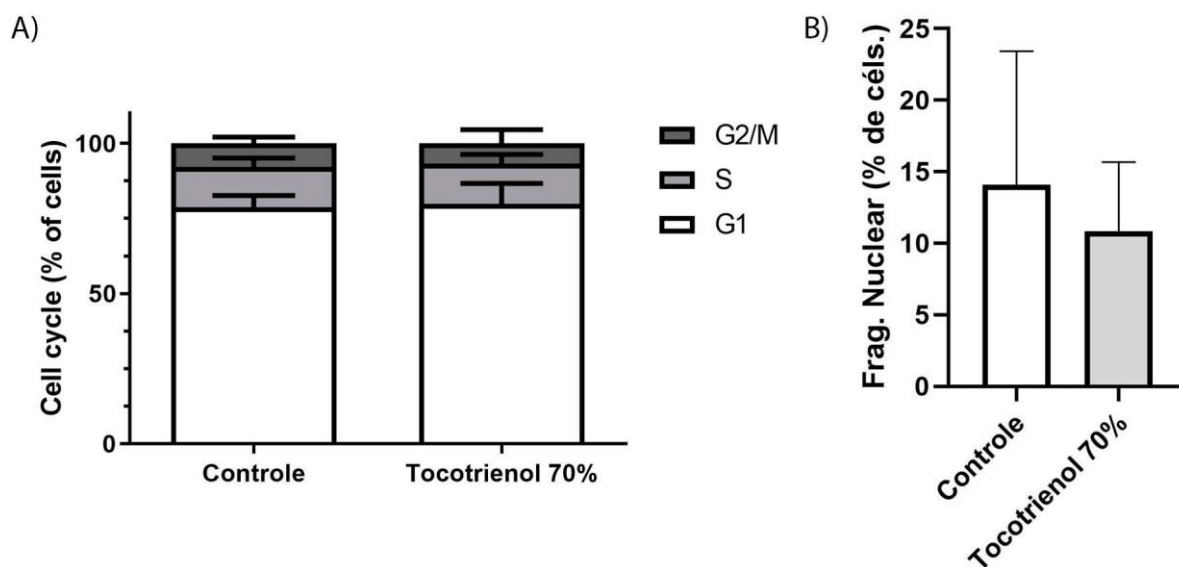


**Figura 23. Influência do co-tratamento de produtos de secreção de tecidos adiposos juntamente com o  $\delta$ -T3 sobre a apresentação de antígeno lipídios por células 4T1.** Células 4T1 foram avaliadas quanto a proliferação celular, após estímulo com produtos de secreção de tecidos adiposos por (A) tecido adiposo branco gonadal e (B) tecido adiposo branco inguinal e (C) tecido adiposo marron juntamente com  $\delta$ -T3. Cada grupo experimental possuía cinco animais (N=5). Resultados referentes à uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi representada com asteriscos (\*) e as diferenças entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra:  $p>0,05$  (um símbolo),  $p>0,01$  (dois símbolos) e  $p>0,001$  (três símbolos).

## 5.2) Análises *ex vivo*

### 5.2.1) Avaliação da citogenotoxicidade sobre a ingestão de Tocotrienol

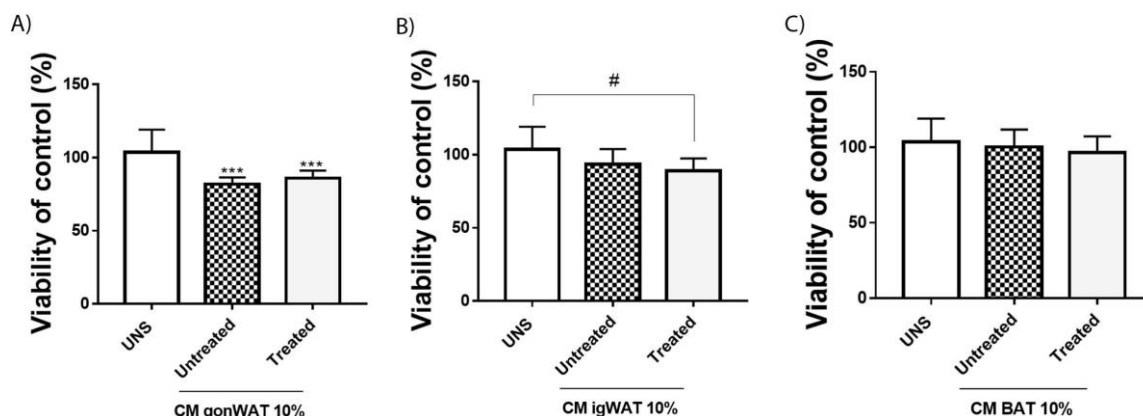
Tendo como objetivo analisar se a suplementação com o composto de Tocotrienol (New Max ®) altera a progressão do ciclo celular em células da medula de camundongos bem como a citogenotoxicidade, as células foram expostas ao marcador iodeto de propídeo para aquisição em citômetro de fluxo. Como ilustrado pela Figura 24, a suplementação com Tocotrienol não inibe progressão do ciclo celular nem a fragmentação nuclear em células da medula óssea de camundongos fêmeas Balb/C. Essa conclusão pode ser observada por não ocorrer diferença significativa entre o grupo controle e o grupo suplementado com o Tocotrienol.



**Figura 24. Análise da citogenotoxicidade sobre a suplementação de Tocotrienol em animais Balb/c.** Camundongos fêmeas Balb/C foram segregadas em dois grupos e suplementadas de acordo com os grupos Controle e Tocotrienol 70%. Cada grupo experimental possuía 8 animais (N=8). Resultados referentes à uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi representada com asteriscos (\*) e as diferenças entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra:  $p>0,05$  (um símbolo),  $p>0,01$  (dois símbolos) e  $p>0,001$  (três símbolos).

### 5.2.2) Influência de moléculas secretadas por tecidos adiposos modulados pela suplementação de Tocotrienol sobre a viabilidade mitocondrial das células 4T1

Células 4T1 foram estimuladas com produtos de secreção de tecidos adiposos de animais suplementados com Tocotrienol por 14 dias, e foi observado o perfil de viabilidade mitocondrial sobre as células de câncer de mama murino. Como observado na Figura 25, células 4T1 estimuladas com produtos de secreção de gonWAT de animais tratados e não tratados mostraram uma diminuição significativa comparada com células não estimuladas. Já células estimuladas com produtos de secreção de igWAT, mostrou uma diminuição de viabilidade mitocondrial em células tratadas com moléculas de tecidos adiposos de animais tratados em comparação com células não estimuladas. Células tratadas com moléculas de secreção de BAT não modularam a viabilidade mitocondrial.

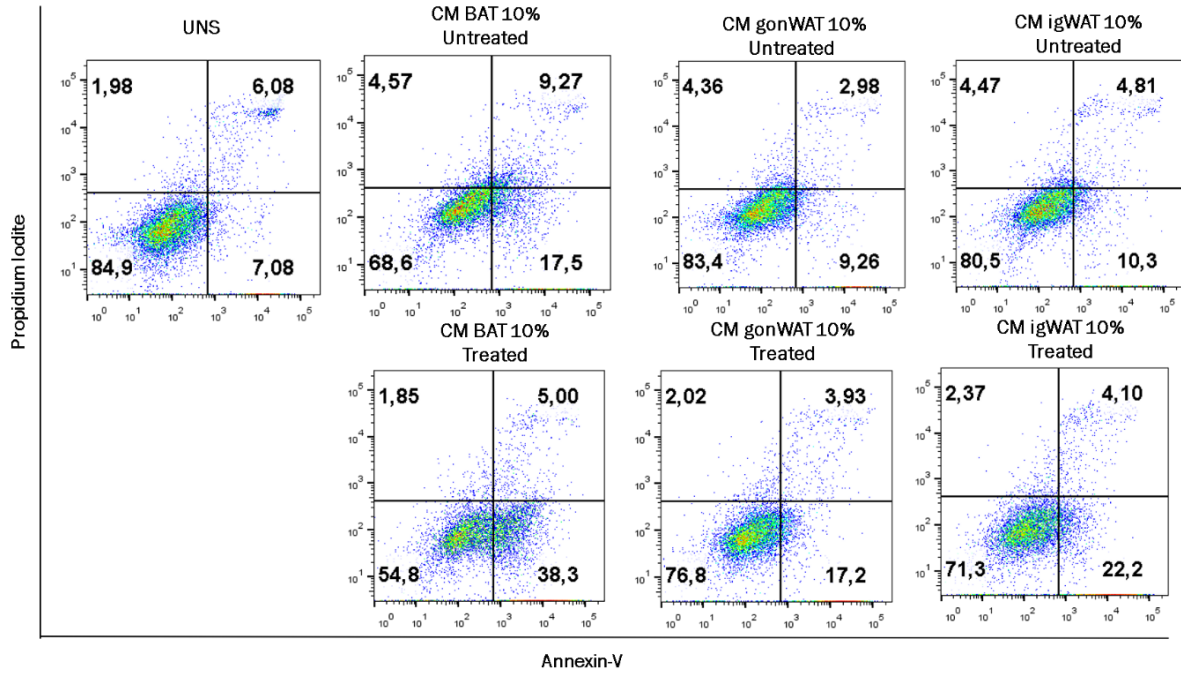


**Figura 25 Análise da Viabilidade mitondrial de células 4T1 estimuladas com produtos de secreção de tecidos adiposos.** Células 4T1 foram avaliadas quanto a viabilidade mitondrial, após estímulo com produtos de secreção de tecidos adiposos por (A) tecido adiposo branco gonadal e (B) tecido adiposo branco inguinal e (C) tecido adiposo marron. Cada grupo experimental possuía oito animais (N=8). Resultados referentes à uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi representada com asteriscos (\*) e as diferenças entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra:  $p > 0,05$  (um símbolo),  $p > 0,01$  (dois símbolos) e  $p > 0,001$  (três símbolos).

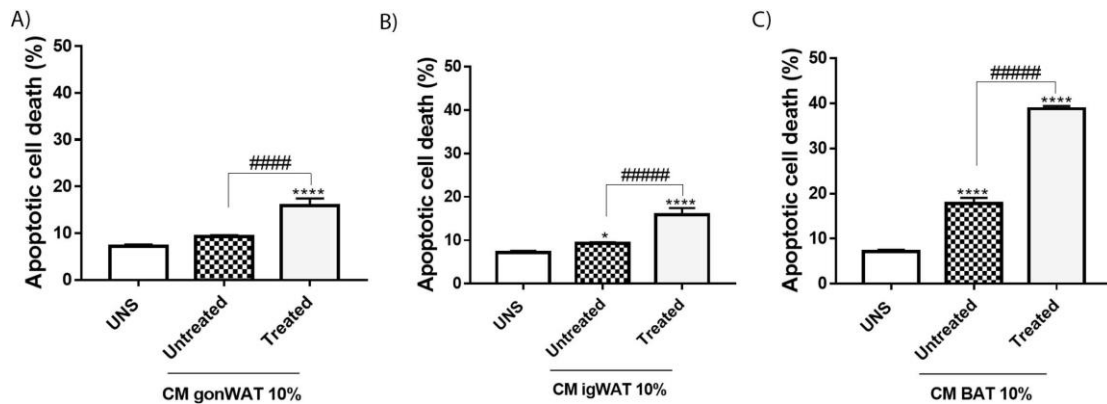
### 5.2.3) Efeito de moléculas secretadas por tecidos adiposos modulados por animais tratados e não tratados com Tocotrienol sobre o perfil de morte das células 4T1

A fim de investigar o perfil de morte celular sobre as células 4T1 no contexto do tratamento de produtos de secreção de tecidos adiposos (gonWAT, igWAT e BAT) de animais suplementados com tocotrienol. Foi investigado através do ensaio de citometria de Fluxo (Anexina V/Pi) para avaliar o perfil de morte celular das células de câncer de mama murino.

Moléculas secretadas de tecidos adiposos gonadais de animais tratados, aumentou a morte por apoptose comparado as células não tratadas. O mesmo efeito aconteceu também nas células estimuladas com produtos de secreção de tecidos adiposos inguinais e marrons quando comparados as células não tratadas (Figura 26 e 27).



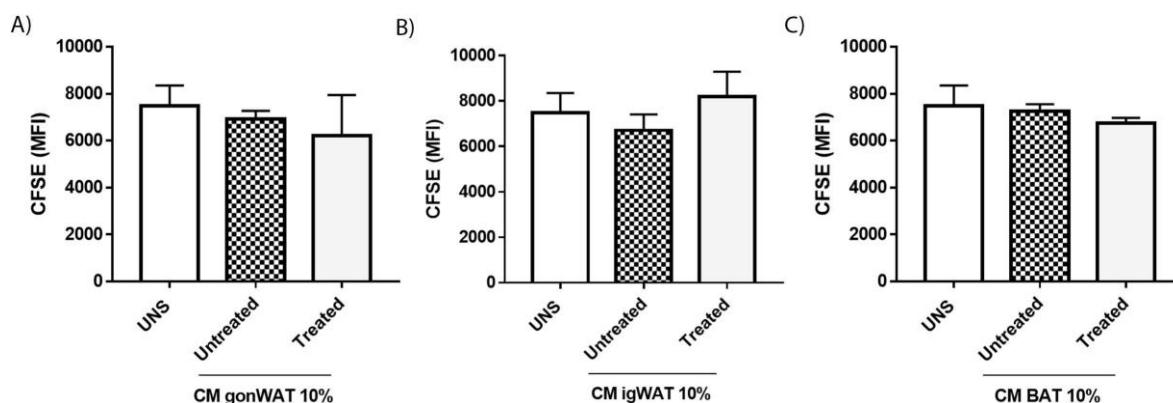
**Figura 26. Análise do perfil de morte celular de células 4T1 estimuladas com produtos de secreção de tecidos adiposos.** Células 4T1 foram avaliadas quanto ao perfil de morte celular por citometria de fluxo, após estímulo com produtos de secreção de tecidos adiposos por tecido adiposo branco gonadal e tecido adiposo branco inguinal e tecido adiposo marrom. Cada grupo experimental possuía oito animais (N=8). Resultados referentes à uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi representada com asteriscos (\*) e as diferenças entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra:  $p > 0,05$  (um símbolo),  $p > 0,01$  (dois símbolos) e  $p > 0,001$  (três símbolos).



**Figura 287. Análise do perfil de apoptose de células 4T1 estimuladas com produtos de secreção de tecidos adiposos.** Células 4T1 foram avaliadas quanto ao perfil de apoptose, após estímulo com produtos de secreção de tecidos adiposos por (A) tecido adiposo branco gonadal e (B) tecido adiposo branco inguinal e (C) tecido adiposo marron. Cada grupo experimental possuía oito animais (N=8). Resultados referentes à uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi representada com asteriscos (\*) e as diferenças entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra:  $p>0,05$  (um símbolo),  $p>0,01$  (dois símbolos) e  $p>0,001$  (três símbolos).

#### 5.2.4) Efeito de moléculas secretadas por tecidos adiposos modulados por animais tratados e não tratados com Tocotrienol sobre o perfil proliferação das células 4T1

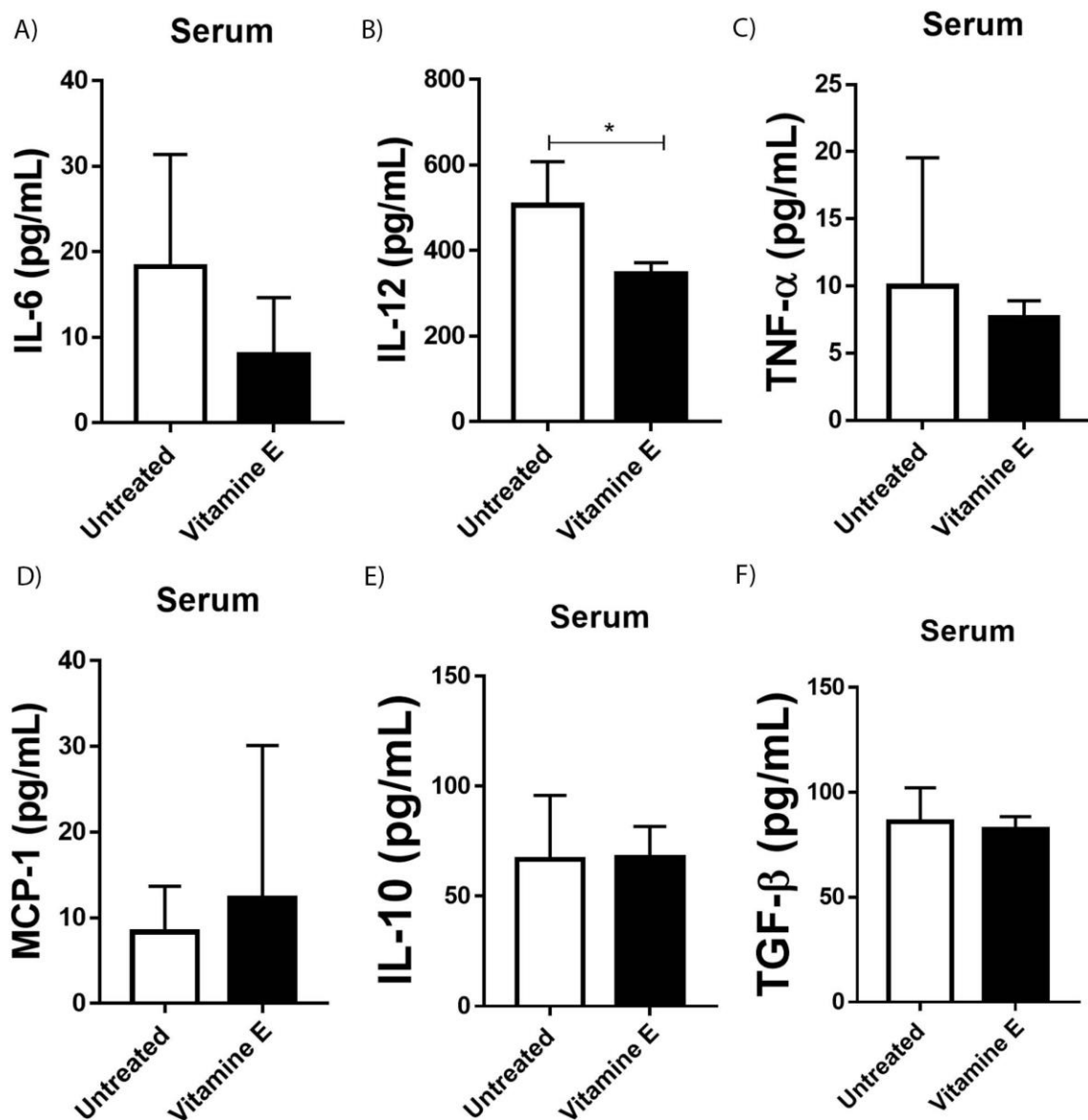
Visando investigar o impacto da suplementação de Tocotrienol em animais em tecidos adiposos sobre as células 4T1, foi analisado os efeitos deste tratamento sob a proliferação celular das células de tumor de mama. Como ilustrado pela Figura 28, o tratamento com produtos secretados de tecidos adiposos de animais suplementados não modularam a proliferação de células 4T1.



**Figura 298. Análise do perfil de proliferação de células 4T1 estimuladas com produtos de secreção de tecidos adiposos de animais suplementados com Tocotrienol.** Células 4T1 foram avaliadas quanto ao perfil de proliferação celular, após estímulo com produtos de secreção de tecidos adiposos por (A) tecido adiposo branco gonadal e (B) tecido adiposo branco inguinal e (C) tecido adiposo marron. Cada grupo experimental possuía oito animais (N=8). Resultados referentes à uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi representada com asteriscos (\*) e as diferenças entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra:  $p>0,05$  (um símbolo),  $p>0,01$  (dois símbolos) e  $p>0,001$  (três símbolos).

### 5.2.5) Efeito de citocinas secretadas por animais tratados e não tratados com Tocotrienol

Visando entender melhor a importância da suplementação de Tocotrienol sobre a secreção sistêmica de citocinas de animais suplementados sobre os níveis de citocinas secretadas no soro. Como ilustrado na Figura 29, apenas a citocina IL-12 que foi modulada sob a suplementação de Tocotrienol no soro. As outras citocinas (IL-6, TNF- $\alpha$ , MCP1, IL-10 e TGF- $\beta$ ) não foram moduladas pela suplementação de Tocotrienol no soro.



**Figura 29. Modulação da secreção de citocinas sobre a suplementação de Tocotrienol.** Soros de camundongos Balb/C foram analisados quanto a secreção de citocinas em dois grupos Untreated (Não tratados) e Vitamina E (Tocotrienol). Cada grupo experimental possuía oito animais (N=8). Resultados referentes à uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi representada com asteriscos (\*) e as diferenças entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra:  $p > 0,05$  (um símbolo),  $p > 0,01$  (dois símbolos) e  $p > 0,001$  (três símbolos).



## 6. Discussão

No presente estudo avaliamos a influência do tratamento de moléculas secretadas de tecidos adiposos (gonWAT, igWAT e BAT) sobre células de câncer de mama murino (4T1) juntamente tratados com o  $\delta$ -T3 sobre a morte, inflamação e parâmetros carcinogênicos. O trabalho descreveu pela primeira vez o efeito sinérgico do co-tratamento de moléculas secretadas de tecidos adiposos juntamente com o  $\delta$ -T3 sobre a modulação de parâmetros carcinogênicos de células de tumor mamário triplo-negativo murino.

Um dos objetivos do trabalho foi investigar os efeitos que o co-tratamento das moléculas secretadas de tecidos adiposos co-tratadas com o  $\delta$ -T3 teriam sobre na viabilidade mitocondrial de células de câncer de mama 4T1. O tecido adiposo branco é observado como um modulador do microambiente tumoral (DENG et al., 2016) O microambiente é importante para o estabelecimento e progressão de células neoplásicas. Células tumorais, em geral, modulam a inflamação a seu favor, polarizando para o perfil anti-inflamatório e pró-tumoral, e recrutando células imunes como macrófagos e linfócitos (WILLIAMS; YEH; SOLOFF, 2016).

O papel dos tecidos adiposos no microambiente tumoral ainda é um pouco controverso. O tecido adiposo é um órgão endócrino, sendo também capaz de modular o microambiente tumoral, através da liberação de adipocinas que podem facilitar a tumorigênese, podendo ocorrer uma disfunção do tecido adiposo branco e facilitar o crescimento do tumor (CORRÊA et al., 2017). Uma desregulação metabólica é observada no tecido adiposo branco durante o processo de obesidade, sendo mediada entre outros fatores pela polarização de macrófagos associados ao tecido adiposo para um perfil M1 fazendo com que este tecido tenha um fenótipo mais pró-inflamatório (CATALÁN et al., 2013).

Houve redução da viabilidade mitocondrial das células tumorais tratadas tanto com sobrenadantes de tecidos adiposos brancos e marrons, onde o co-tratamento com  $\delta$ -T3 potencializou esta diminuição da viabilidade mitocondrial. A citotoxicidade do  $\delta$ -T3 é relatado nos achados dos trabalhos de (KANNAPPAN et al., 2012; MCINTYRE et al., 2000; MONTAGNANI MARELLI et al., 2019; NESARETNAM, SELVARAJAN DORASAMY, PH, 2000; TAN B., 2010) que mostram o efeito antitumoral em diversos cânceres utilizando o  $\delta$ -T3 a partir de concentrações baixas.

O presente trabalho foi o primeiro a observar a diminuição da viabilidade mitocondrial e aumento da citotoxicidade de células de câncer de mama murina triplo-negativo quando co-tratadas com produtos de secreção de tecidos adiposos (gonWAT, igWAT e BAT) juntamente com  $\delta$ -T3. De fato, o efeito antitumoral que o  $\delta$ -T3 já vem sendo observado como um bom antioxidante, antiangiogenico, antiploferativo (MONTAGNANI MARELLI et al., 2019).

Para entender melhor como o perfil de morte celular estava acontecendo a partir do co-tratamento com moléculas secretadas de tecidos adiposos juntamente com o  $\delta$ -T3, foi analisado vias de morte celular. Corroborando com os resultados de citotoxicidade celular, os produtos de secreção de tecidos adiposos sozinhos induzem a morte por apoptose, porém quando co-tratados com o  $\delta$ -T3, há uma potencialização dessa morte por apoptose. Esse efeito mostra que há uma interação entre moléculas secretadas dos tecidos adiposos juntamente com o  $\delta$ -T3 que fazem com que potencializem a morte por apoptose das células 4T1. Moléculas de LDL e HDL são responsáveis por transportar o  $\delta$ -T3 para o interior das células através do receptor PXR e para outros tecidos e isso pode facilitar entrega da isoforma para o interior da célula (SCHMÖLZ, 2016).

Buscando investigar melhor quais moléculas da via da apoptose estão responsáveis pela modulação desta morte, foi investigado os níveis de Caspase 3 e Bax. Já é sabido que o  $\delta$ -T3 tem papel importante em algumas moléculas na via da apoptose (AGGARWAL et al., 2019). O co-tratamento mostrou uma potencialização no aumento dos níveis de Caspase-3 significativamente, mostrando que há um efeito sinérgico entre as moléculas secretadas dos tecidos adiposos inguinais e o  $\delta$ -T3. Algumas drogas quimioterápicas vem sendo usadas encapsuladas e inseridas em adipócitos para atuarem como cavalos de tróia contra células tumorais (WEN et al., 2019).

Buscamos então investigar se algumas moléculas da via da autofagia estariam sendo moduladas com o co-tratamento de moléculas secretadas de tecidos adiposos e  $\delta$ -T3. A autofagia é uma resposta de degradação catabólica celular à fome ou ao estresse em que proteínas celulares, organelas e citoplasma são engolfados, digeridos e reciclados para sustentar o metabolismo celular. A autofagia constitutiva, basal também tem uma importante função homeostática, mantendo o controle de qualidade das proteínas e organelas, atuando em paralelo com a via de degradação ubiquitina-protease para evitar o acúmulo de proteínas polibiquitinadas e agregadas (MATHEW; KARANTZA-WADSWORTH; WHITE, 2007).

O papel da autofagia no câncer é bastante investigado e mostra que existe uma relação indireta com a apoptose (MATHEW; KARANTZA-WADSWORTH; WHITE, 2007). Nossos resultados mostram que os níveis de LC3B e acidificação lisossomal, em células co-tratadas, são diminuídas significativamente quando comparados com o tratamento sozinho ou células não estimuladas. Esses resultados sugerem que há uma diminuição da formação do autofagossomo, porém há a necessidade de outras análises microscópicas complementares para comprovar essa diminuição do processo autofágico.

O desenvolvimento do câncer e sua resposta à terapia são regulados pela inflamação, que promove ou reprime a progressão do tumor, potencialmente exibindo efeitos opostos nos resultados terapêuticos. A inflamação crônica facilita a progressão do tumor e a resistência ao tratamento, enquanto que a indução de reações inflamatórias agudas frequentemente estimula a maturação das células dendríticas (DCs) e a apresentação de antígenos, levando a respostas imunes antitumorais (ZHAO et al., 2021). O papel da inflamação no câncer é bastante discutido e controverso, pois o efeito da inflamação na maioria dos cânceres é de dois gumes, sendo que o câncer também afeta o processo de inflamação. Nos co-tratamentos com moléculas secretadas de tecidos adiposos e  $\delta$ -T3 nós observamos que há uma modulação de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-12 e TNF- $\alpha$ ) em comparação com as células não tratadas, o que pode sugerir um início da inflamação na célula tumoral. Porém, há também uma diminuição da quimiocina MCP1 e das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- $\beta$  que são responsáveis pela resolução da inflamação. Sugerindo assim, que há um aumento do processo inflamatório da célula tumoral, mostrando o papel dubio da inflamação sobre o câncer (ZHAO et al., 2021).

Buscando entender como o co-tratamento afeta o processo de carcinogênese, foi investigado o perfil de formação de espécies de oxigênio. Visto que o  $\delta$ -T3 é um antioxidante natural (TAN B., 2010), gostaríamos de saber se haveria uma potencialização do poder de antioxidante desta isoforma quando co-tratada com os produtos de secreção. Não houve uma potencialização do efeito de antioxidante quando co-tratado com os produtos de secreção, porém o efeito se manteve, mostrando uma diminuição significativa da formação de espécies reativas de oxigênio quando comparadas as células não estimuladas o que sugerem um efeito antitumoral, já que as células tumorais produzem grande quantidade de espécies reativas de oxigênio para a manutenção do microambiente tumoral (GLASAUER; CHANDEL, 2014).

Neste trabalho mostramos que há uma maior citotoxicidade de células pelo co-tratamento, juntamente com uma diminuição da viabilidade mitocondrial, seguida de um perfil de morte apoptótica com a ativação da caspase 3 conjuntamente de um perfil inflamatório e antioxidante. Esses dados corroboram com achados outros cânceres que utilizaram tocotrienol como suplementação (KANCHI et al., 2017; MCINTYRE et al., 2000; MÜLLER; THEILE; BÖHM, 2010; NESARETNAM, SELVARAJAN DORASAMY, PH, 2000; SYLVESTER; SHAH; SAMANT, 2005).

Buscando entender como o co-tratamento influencia no metabolismo lipídico das células de cancer de mama murino 4T1, nós fomos investigar a biogênese de corpúsculos lipídicos. O acúmulo de corpúsculos lipídicos em células neoplásicas está diretamente ligado ao pior prognóstico (PETAN; JARC; JUSOVIĆ, 2018), que são utilizados como armazenadores de energia, mas também possuem papel especial entre a comunicação entre as células imunes e as células cancerígenas e podem influenciar no processo de progressão tumoral (CRUZ et al., 2020). Nossos resultados mostram que o co-tratamento com produtos de secreção de tecidos adiposos juntamente com  $\delta$ -T3 diminuem significativamente a biogênese de corpúsculos lipídicos, sugerindo que há um efeito antitumoral pelo tratamento.

O Tocotrienol já foi estudado como um antiproliferativo tumoral (AGGARWAL et al., 2019), e nós queríamos verificar se esse efeito seria observado no nosso modelo de tratamento juntamente com os produtos de secreção de tecidos adiposos. Nossos resultados não mostraram modulação na proliferação das células 4T1 induzidas nesse contexto de estimulação celular. O que pode sugerir que o co-tratamento não influencia no processo de proliferação celular.

Para melhor entender os efeitos do co-tratamento de produtos de secreção de tecidos adiposos juntamente com o  $\delta$ -T3, investigamos a apresentação do antígeno lipídico CD1d. Células T assassinas naturais (NKT) são células T especializadas CD1d-restritas que reconhecem antígenos lipídicos. Após a estimulação, as células NKT levam à ativação posterior de células imunes inatas e adaptativas no microambiente do tumor (NAIR; DHODAPKAR, 2017). Nossos co-tratamentos mostraram uma redução significativa da apresentação de antígeno lipídico, o que sugere que podem estar sendo ativadas outras vias antitumorais que não esta (NAIR; DHODAPKAR, 2017).

Até o momento nossos resultados mostram que o co-tratamento com o produto de secreção de igWAT juntamente com o  $\delta$ -T3 induzem a diminuição da viabilidade celular, maior

citotoxicidade, maior morte por apoptose, uma ativação de caspase 3, sugere uma menor autofagia, uma diminuição da formação de espécies reativas de oxigênio e também uma diminuição da biogênese de corpúsculos lipídicos (LD), além de haver uma diminuição da apresentação de antígenos lipídicos. Esses dados sugerem que o co-tratamento ativa uma via de morte bastante forte (Apoptose) juntamente com auxiliares antitumorais antioxidantes, redução de LD.

Buscando validar que os tecidos adiposos são órgãos endócrinos e tem a função também de armazenar moléculas. Foi então feito uma sessão ex vivo de animais suplementados por 14 dias com Tocotrienol proveniente do Urucum. Verificamos se o perfil de morte celular e carcinogênese se mantém com essa suplementação.

Houve redução significativa nas células tratadas com moléculas secretadas de tecidos adiposos de animais tratados com Tocotrienol comparado com Não tratados. Esse resultado sugere que o tecido adiposo é um depósito de moléculas e mostrou armazenar o tocotrienol suplementado dos animais (KERSHAW; FLIER, 2004).

Buscamos investigar se as células tratadas com moléculas secretadas de tecidos adiposos de animais tratados induziriam apoptose significativamente comparado as células não tratadas. Observamos que houve uma diferença significativa de apoptose, mostrando que o tocotrienol juntamente com as moléculas dos tecidos adiposos têm um papel essencial na morte por apoptose das células 4T1 (SCHMÖLZ, 2016).

Assim como nas células tratadas com o  $\delta$ -T3 juntamente com as moléculas secretadas de tecidos adiposos, não houve modulação na proliferação celular. O que pode sugerir que não há relação com essa via de ativação celular quando realizado o co-tratamento ou o tratamento com o tecido suplementado.

Para investigar melhor como estavam o perfil inflamatório dos animais suplementados e não suplementados, observamos se haveria alguma alteração no perfil de secreção de citocinas no soro desses animais. Apenas a citocina IL-12 teve uma diminuição quando comparado com os animais não tratados o que pode sugerir que o tocotrienol está agindo como um anti-inflamatório (SCHMÖLZ, 2016).

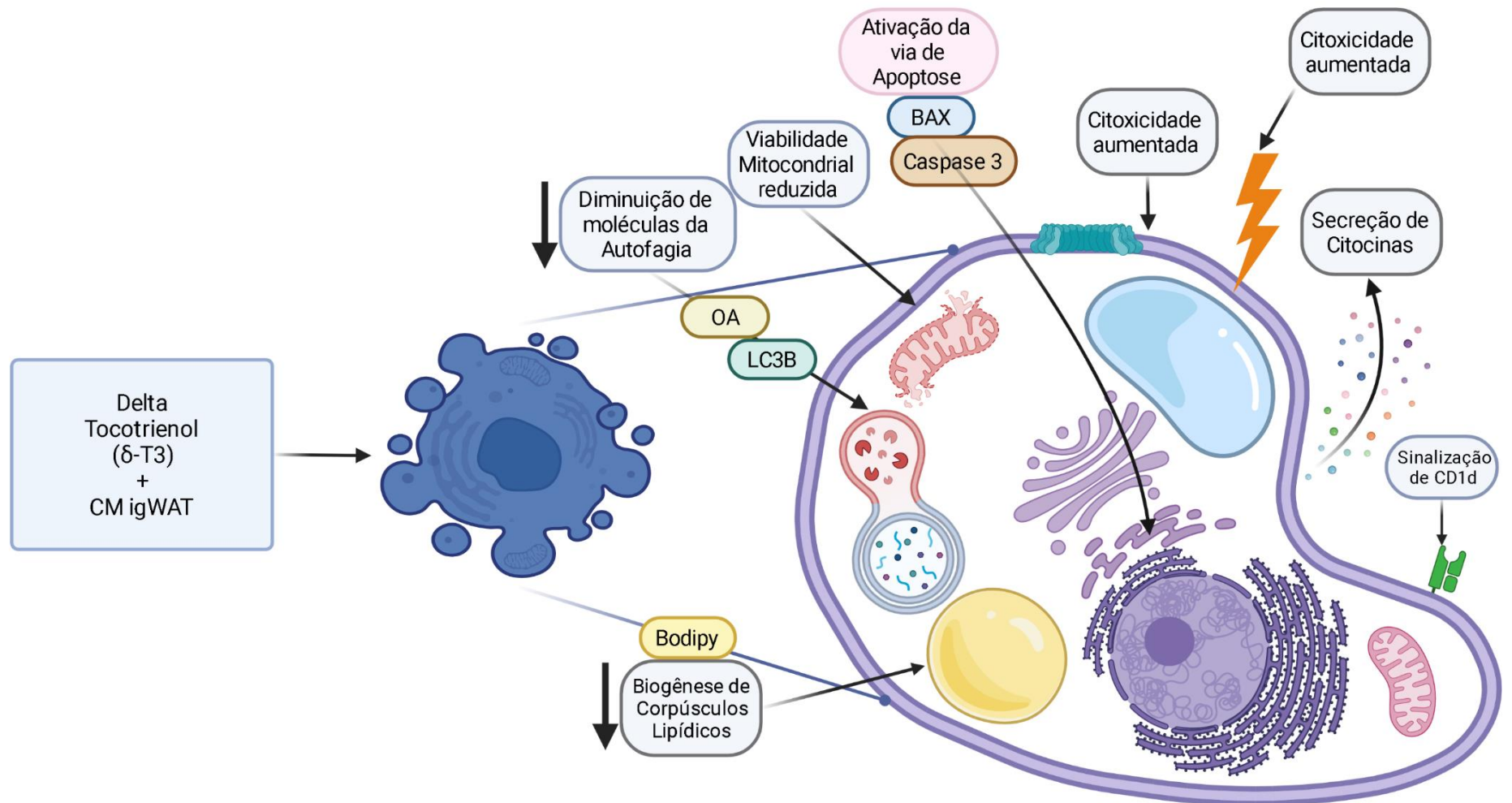
Considerando importante analisar a composição dos produtos de secreção dos tecidos adiposos a fim de se conhecer melhor os mecanismos de comunicação entre células neoplásicas,

tecidos adiposos conjuntamente com o Tocotrienol, estudos posteriores podem esclarecer mecanismos moleculares que fazem parte da comunicação célula-tecido adiposo-tocotrienol no processo de morte celular programada. O próprio co-tratamento permitiu entender que há uma sinergia quando há o estímulo entre produtos de secreção de tecidos adiposos juntamente com o Tocotrienol, em especial o Delta tocotrienol ( $\delta$ -Tocotrienol). Esse co-tratamento mostra que moléculas secretadas de tecidos adiposos podem estar ligadas diretamente com o processo de morte celular por apoptose de células 4T1 quando co-tratadas com a vitamina E (tocotrienol).

## 7. Conclusão

Neste estudo, demos os primeiros passos para se compreender os mecanismos de comunicação entre câncer de mama triplo-negativo e depósitos de tecidos adiposos em diferentes localizações (gonWAT, igWAT e BAT) conjuntamente tratados com o  $\delta$ -T3, bem como para se entender de que modo essa neoplasia e os tecidos adiposos impactam sobre as células de câncer de mama bem como a isoforma de Vitamina E.

E concluímos com base nos nossos achados que o co-tratamento de moléculas secretadas de igWAT juntamente com  $\delta$ -T3 diminuem a viabilidade mitocondrial, aumenta a citotoxicidade celular, aumentam consideravelmente a apoptose celular pela ativação da caspase 3, diminuem a biogênese de corpúsculos lipídicos, bem como a formação de espécies reativas de oxigênio impactando assim negativamente parâmetros carcinogênicos de células de tumor mamário triplo-negativo 4T1 (Figura 30).



**Figura 30. O co-tratamento de moléculas de secreção de igWAT juntamente com  $\delta$ -T3 induzem cascata de apoptose.** Células de câncer de mama triplo-negativo foram co-tratadas com moléculas secretadas de igWAT (tecido adiposo inguinal) juntamente com delta tocotrienol por 24h e posteriormente foram feitas análises. Há uma diminuição da viabilidade mitocondrial, um aumento da citotoxicidade celular. Ocorre uma ativação da via de morte por apoptose com a ativação da caspase 3. Acontece a diminuição de níveis de moléculas da via da autofagia (LC3B e Laranja de Acridina). Ocorre também uma diminuição na formação de espécies reativas de oxigênio bem como a diminuição da biogênese de corpúsculos lipídicos. Há uma diminuição na apresentação de antígeno lipídico bem como um perfil próinflamatório de citocinas. O modelo sugere que é uma via antitumoral e promissor como um tratamento coadjuvante.



## 8. Referências bibliográficas

AGGARWAL, V. et al. **Molecular mechanisms of action of tocotrienols in cancer: Recent trends and advancements** *International Journal of Molecular Sciences* MDPI AG, , 1 fev. 2019.

ALI, A. et al. Association of Obesity and Thyroid Cancer at a Tertiary Care Hospital in Pakistan. *Cureus*, 26 mar. 2018.

ARENDDT, L. M. et al. Obesity promotes breast cancer by CCL2-mediated macrophage recruitment and angiogenesis. *Cancer Res.*, v. 73, n. 19, p. 1–26, 2014.

AZZI, A. et al. **The role of  $\alpha$ -tocopherol in preventing disease: From epidemiology to molecular events** *Molecular Aspects of Medicine* Elsevier Ltd, , 2003.

BARTELT, A.; HEEREN, J. Adipose tissue browning and metabolic health. *Nature Publishing Group*, 2013.

BETH A. PULASKI, S. O.-R. Mouse 4T1 Breast Tumor Model. *Current Protocols*, 2001.

BIANCHINI, G. et al. **Triple-negative breast cancer: Challenges and opportunities of a heterogeneous disease** *Nature Reviews Clinical Oncology* Nature Publishing Group, , 1 nov. 2016.

BRACCI, P. M. Obesity and pancreatic cancer: Overview of epidemiologic evidence and biologic mechanisms. *Molecular Carcinogenesis*, v. 51, n. 1, p. 53–63, jan. 2012.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 68, n. 6, p. 394–424, nov. 2018.

BURTON, G. et al. Human plasma and tissue  $\alpha$ -tocopherol concentrations in response to supplementation with deuterated natural and synthetic vitamin E. *American Journal of Clinical Nutrition*, p. 669–684, 1998.

CARDENAS, E.; GHOSH, R. **Vitamin E: A dark horse at the crossroad of cancer management** *Biochemical Pharmacology* Elsevier Inc., , 2013.

CATALÁN, V. et al. **Adipose tissue immunity and cancer** *Frontiers in Physiology*, 2013.

CDC. **Breast Cancer**.

CHAMBERS, A. F.; GROOM, A. C.; MACDONALD, I. C. **DISSEMINATION AND GROWTH OF**. v. 2, n. August, 2002.

CINTI, S. Pink Adipocytes. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. xx, p. 1–16, 2018.

COELHO, M.; OLIVEIRA, T.; FERNANDES, R. **Biochemistry of adipose tissue: An endocrine organ** *Archives of Medical Science*, abr. 2013.

CORRÊA; HEYN; MAGALHAES. The Impact of the Adipose Organ Plasticity on Inflammation and Cancer Progression. **Cells**, v. 8, n. 7, p. 662, 30 jun. 2019.

CORRÊA, L. H. et al. Adipocytes and Macrophages interplay in the Orchestration of Tumor Microenvironment : New implications in Cancer Progression. v. 8, n. September, p. 1–12, 2017.

CRUZ, A. L. S. et al. **Lipid droplets: platforms with multiple functions in cancer hallmarks** *Cell Death and Disease* Springer Nature, , 1 fev. 2020.

DENG, T. et al. Obesity, Inflammation, and Cancer. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 11, p. 421–449, 23 maio 2016.

DENKERT, C. et al. **Molecular alterations in triple-negative breast cancer—the road to new treatment strategies** *The Lancet* Lancet Publishing Group, , 17 jun. 2017.

DREHER, M. L. **Pistachio nuts: Composition and potential health benefits** *Nutrition Reviews*, abr. 2012.

DUTTA, D. et al. Leptin and cancer: Pathogenesis and modulation. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 16, n. 9, p. 596, 2012.

ENGIN, A. Obesity-associated breast cancer: Analysis of risk factors. In: **Advances in Experimental Medicine and Biology**. [s.l.] Springer New York LLC, 2017. v. 960p. 571–606.

EROLE, P. et al. **Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways** *Cancer Treatment Reviews*, out. 2012.

FENZL, A.; KIEFER, F. W. Brown adipose tissue and thermogenesis. v. 19, n. 1, p. 25–37, 2014.

GIORDANO, A. et al. White , brown and pink adipocytes : the extraordinary plasticity of the adipose organ. 2014.

GLASAUER, A.; CHANDEL, N. S. **Targeting antioxidants for cancer therapy***Biochemical Pharmacology*Elsevier Inc., , 1 nov. 2014.

GONG, Y. et al. Metabolic-Pathway-Based Subtyping of Triple-Negative Breast Cancer Reveals Potential Therapeutic Targets. *Cell Metabolism*, v. 33, n. 1, p. 51- 64.e9, 5 jan. 2021.

HARMELEN, V. VAN et al. **Leptin Secretion From Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue in Women***DIABETES*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://diabetesjournals.org/diabetes/article-pdf/47/6/913/363672/9604868.pdf>>.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **ABC do Câncer: Abordagens Básicas para o Controle do Câncer**. 6. ed. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2020.

JONG, J. M. A. DE et al. The  $\alpha_3$ -adrenergic receptor is dispensable for browning of adipose tissues. v. 10691, p. 508–518, 2021.

KAMAI-ELDIN, A.; KE APPELQVIST, L.-/. **The Chemistry and Antioxidant Properties of Tocopherols and Tocotrienols**. [s.l: s.n.].

KANCHI, M. M. et al. **Tocotrienols: the unsaturated sidekick shifting new paradigms in vitamin E therapeutics***Drug Discovery Today*Elsevier Ltd, , 1 dez. 2017.

KANNAPPAN, R. et al. **Tocotrienols fight cancer by targeting multiple cell signaling pathways**. *Genes and Nutrition. Anais...*jan. 2012.

KASHYAP, D. et al. **Molecular targets of gambogic acid in cancer: recent trends and advancements***Tumor Biology*Springer Netherlands, , 1 out. 2016.

KERSHAW, E. E.; FLIER, J. S. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 89, n. 6, p. 2548–2556, 2004.

KIR, S.; SPIEGELMAN, B. M. CACHEXIA & BROWN FAT: A BURNING ISSUE IN CANCER Serkan. *Trends Cancer*, v. 2, n. 9, p. 461–463, 2016.

KLIN, K. et al. **Vitamin E and Breast Cancer Prevention: Current Status and Future Potential** *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. [s.l: s.n.].

LEHMANN, B. D. et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. **Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 7, p. 2750–2767, jul. 2011.

LONG, E.; BEALES, I. L. P. **The role of obesity in oesophageal cancer development** *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 2014.

MALORNI, L. et al. Clinical and biologic features of triple-negative breast cancers in a large cohort of patients with long-term follow-up. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 136, n. 3, p. 795–804, dez. 2012.

MATHEW, R.; KARANTZA-WADSWORTH, V.; WHITE, E. Role of autophagy in cancer. **Nature Reviews: Cancer**, v. 7, p. 961–967, 2007.

MCINTYRE, K. P. et al. Antiproliferative and apoptotic effects of tocopherols and tocotrienols on preneoplastic and neoplastic mouse mammary epithelial cells. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 224, p. 292–301, 2000.

MEGANATHAN, P.; FU, J. Y. **Biological properties of tocotrienols: Evidence in human studies** *International Journal of Molecular Sciences* MDPI AG, , 1 nov. 2016.

MONTAGNANI MARELLI, M. et al. **Anticancer properties of tocotrienols: A review of cellular mechanisms and molecular targets** *Journal of Cellular Physiology* Wiley-Liss Inc., , 1 fev. 2019.

MÜLLER, L.; THEILE, K.; BÖHM, V. In vitro antioxidant activity of tocopherols and tocotrienols and comparison of vitamin E concentration and lipophilic antioxidant capacity in human plasma. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 54, n. 5, p. 731–742, maio 2010.

NAIR, S.; DHODAPKAR, M. V. **Natural killer T cells in cancer immunotherapy** *Frontiers in Immunology* Frontiers Media S.A., , 22 set. 2017.

NESARETNAM, SELVARAJAN DORASAMY, PH, K. Tocotrienols inhibit growth of ZR-75-1 breast cancer cells. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 51, n. 1, p. 95–103, jan. 2000.

NIH. **What Is Cancer?**

NISHIMOTO, S. et al. Obesity-induced DNA released from adipocytes stimulates chronic adipose tissue inflammation and insulin resistance. v. 6, n. March, p. 1–12, 2016.

NOGUCHI, N. et al. Inhibition of THP-1 cell adhesion to endothelial cells by  $\alpha$ -tocopherol and  $\alpha$ -tocotrienol is dependent on intracellular concentration of the antioxidants. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 34, n. 12, p. 1614–1620, 15 jun. 2003.

NUR, U. et al. A prospective investigation of oral contraceptive use and breast cancer mortality: Findings from the Swedish women's lifestyle and health cohort. **BMC Cancer**, v. 19, n. 1, 14 ago. 2019.

OELKRUG, R.; JASTROCH, E. T. P. M. Brown adipose tissue : physiological function and evolutionary significance. **Journal of Comparative Physiology B**, 2015.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Obesity**.

PANINA, Y. A. et al. Plasticity of Adipose Tissue-Derived Stem Cells and Regulation of Angiogenesis. v. 9, n. November, p. 1–13, 2018.

PEIRCE, V.; CAROBBIO, S.; VIDAL-PUIG, A. **The different shades of fat**Nature Nature Publishing Group, , 2014.

PETAN, T.; JARC, E.; JUSOVIĆ, M. **Lipid droplets in cancer: Guardians of fat in a stressful world**MoleculesMDPI AG, , 2018.

PICON-RUIZ, M.; MORATA-TARIFA, C.; VALLE-GOFFIN, J. J. Take free quizzes online at [acsjournals . com / ce](https://acsjournals.com/ce) Obesity and Adverse Breast Cancer Risk and Outcome : Mechanistic Insights and Strategies for Intervention. v. 67, n. 5, 2017.

P.J. MCLAUGHLIN; JOHN L. WEIHRAUCH. Vitamin E content of foods. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 75, n. 6, p. 647–665, 1979.

RAJENDRAN, P. et al.  $\gamma$ -Tocotrienol is a novel inhibitor of constitutive and inducible STAT3 signalling pathway in human hepatocellular carcinoma: Potential role as an antiproliferative, pro-apoptotic and chemosensitizing agent. **British Journal of Pharmacology**, v. 163, n. 2, p. 283–298, maio 2011.

RIZVI, S. et al. **The Role of Vitamin E in Human Health and Some Diseases**. [s.l.] Epub, 2014.

SANTANDER, A. M. et al. **Paracrine Interactions between Adipocytes and Tumor Cells Recruit and Modify Macrophages to the Mammary Tumor Microenvironment: The Role of Obesity and Inflammation in Breast Adipose Tissue.** [s.l: s.n.].

SCHMÖLZ, L. Complexity of vitamin E metabolism. **World Journal of Biological Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 14, 2016.

SHAH, S.; GAPOR, A.; SYLVESTER, P. W. Role of caspase-8 activation in mediating vitamin E-induced apoptosis in murine mammary cancer cells. **Nutrition and Cancer**, v. 45, n. 2, p. 236–246, 2003.

SHANMUGAM, S. R.; ADHIKARI, S.; SHAKYA, R. Nutrient removal and energy production from aqueous phase of bio-oil generated via hydrothermal liquefaction of algae. **Bioresource Technology**, v. 230, p. 43–48, 2017.

SYLVESTER, P. W.; SHAH, S. J.; SAMANT, G. V. **Intracellular signaling mechanisms mediating the antiproliferative and apoptotic effects of  $\gamma$ -tocotrienol in neoplastic mammary epithelial cells.** *Journal of Plant Physiology*. Anais...Elsevier GmbH, 1 jul. 2005.

TAN B. Tocotrienols: the New Vitamin E. **Spacedocnet**, 2010.

TAYLOR, P. R. et al. Prospective study of serum vitamin E levels and esophageal and gastric cancers. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 95, n. 18, p. 1414–1416, 17 set. 2003.

THOMAS N. SEYFRIED, L. C. H. On the Origin of Cancer Metastasis. **Crit Rev Oncog.**, v. 18, p. 43–73, 2013.

TRAYHURN, P. Brown Adipose Tissue — A Therapeutic Target in Obesity? v. 9, n. November, p. 1–5, 2018.

VALASTYAN, S.; WEINBERG, R. A. Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. **Cell**, v. 147, n. 2, p. 275–292, 2011.

WEIGERT, A.; WEIS, N.; BRÜNE, B. **Regulation of macrophage function by sphingosine-1-phosphate** *Immunobiology*, set. 2009.

WEN, D. et al. Adipocytes as Anticancer Drug Delivery Depot. **Matter**, v. 1, n. 5, p. 1203–1214, 6 nov. 2019.

WILLIAMS, C. B.; YEH, E. S.; SOLOFF, A. C. Tumor-associated macrophages : unwitting accomplices in breast cancer malignancy. **Nature Publishing Group**, n. December 2015, 2016.

WU, J.; COHEN, P.; SPIEGELMAN, B. M. **Adaptive thermogenesis in adipocytes: Is beige the new brown?****Genes and Development**, 1 fev. 2013.

ZHAO, H. et al. **Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention****Signal Transduction and Targeted Therapy**Springer Nature, , 1 dez. 2021.

## 9. Anexos

### I. Produções aceitas para publicação



# Hypercoagulopathy and Adipose Tissue Exacerbated Inflammation May Explain Higher Mortality in COVID-19 Patients With Obesity

Gabriel Pasquarelli-do-Nascimento<sup>1</sup>, Heloisa Antoniella Braz-de-Melo<sup>1</sup>, Sara Socorro Faria<sup>1</sup>, Igor de Oliveira Santos<sup>1</sup>, Gary P. Kobinger<sup>2,3</sup> and Kelly Grace Magalhães<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Immunology and Inflammation, Department of Cell Biology, University of Brasilia, Brasilia, Brazil, <sup>2</sup>Département de Microbiologie-Infectiologie et d'Immunologie, Université Laval, Québec City, QC, Canada, <sup>3</sup>Centre de Recherche en Infectiologie du CHU de Québec - Université Laval, Québec City, QC, Canada

COVID-19, caused by SARS-CoV-2, is characterized by pneumonia, lymphopenia, exhausted lymphocytes and a cytokine storm. Several reports from around the world have identified obesity and severe obesity as one of the strongest risk factors for COVID-19 hospitalization and mechanical ventilation. Moreover, countries with greater obesity prevalence have a higher morbidity and mortality risk of developing serious outcomes from COVID-19. The understanding of how this increased susceptibility of the people with obesity to develop severe forms of the SARS-CoV-2 infection occurs is crucial for implementing appropriate public health and therapeutic strategies to avoid COVID-19 severe symptoms and complications in people living with obesity. We hypothesize here that increased ACE2 expression in adipose tissue displayed by people with obesity may increase SARS-CoV-2 infection and accessibility to this tissue. Individuals with obesity have increased white adipose tissue, which may act as a reservoir for a more extensive viral spread with increased shedding, immune activation and pro-inflammatory cytokine amplification. Here we discuss how obesity is related to a pro-inflammatory and metabolic dysregulation, increased SARS-CoV-2 host cell entry in adipose tissue and induction of hypercoagulopathy, leading people with obesity to develop severe forms of COVID-19 and also death. Taken together, it may be crucial to better explore the role of visceral adipose tissue in the inflammatory response to SARS-CoV-2 infection and investigate the potential therapeutic effect of using specific target anti-inflammatories (canakinumab or anakinra for IL-1 $\beta$  inhibition; anti-IL-6 antibodies for IL-6 inhibition), anticoagulant or anti-diabetic drugs in COVID-19 treatment of people with obesity. Defining the immunopathological changes in COVID-19 patients with obesity can provide prominent targets for drug discovery and clinical management improvement.

**Keywords:** adipose tissue, COVID-19, Obesity, SARS-CoV-2, hypercoagulopathy, ACE-2

## INTRODUCTION

On December 2019, a series of pneumonia cases without a recognized etiology was reported in Wuhan, a central China city (1). Rapidly spreading throughout the globe, Coronavirus disease (COVID-19) was recently discovered to be caused by Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). The World Health Organization (WHO) declared SARS-CoV-2

### OPEN ACCESS

#### Edited by:

Jeff M. P. Holly,  
University of Bristol, United Kingdom

#### Reviewed by:

Luca Spezia,  
University of Padova, Italy  
Erik Albert Karlsson,  
Institut Pasteur du  
Cambodge, Cambodia

#### \*Correspondence:

Kelly Grace Magalhães  
kellymagalhaes@unb.br

#### Specialty section:

This article was submitted to  
Obesity,  
a section of the journal  
Frontiers in Endocrinology

**Received:** 03 June 2020

**Accepted:** 30 June 2020

**Published:** 28 July 2020

#### Citation:

Pasquarelli-do-Nascimento G,  
Braz-de-Melo HA, Faria SS,  
Santos IO, Kobinger GP and  
Magalhães KG (2020)  
Hypercoagulopathy and Adipose  
Tissue Exacerbated Inflammation May  
Explain Higher Mortality in COVID-19  
Patients With Obesity.  
Front. Endocrinol. 11:530.  
doi: 10.3389/fendo.2020.00530





# The Use of the Anticoagulant Heparin and Corticosteroid Dexamethasone as Prominent Treatments for COVID-19

Helôisa Antonielli Braz-de-Melo<sup>1</sup>, Sara Socorro Faria<sup>1</sup>, Gabriel Pasquarelli-do-Nascimento<sup>1</sup>, Igor de Oliveira Santos<sup>1</sup>, Gary P. Kobinger<sup>2,3</sup> and Kelly Grace Magalhães<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Immunology and Inflammation, Department of Cell Biology, University of Brasília, Brasília, Brazil, <sup>2</sup> Département de Microbiologie-Infectiologie et d'Immunologie, Université Laval, Québec City, QC, Canada, <sup>3</sup> Centre de Recherche en Infectiologie du CHU de Québec, Université Laval, Québec City, QC, Canada

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Ana Alfonso,  
University of São Paulo, Brazil

### Reviewed by:

Frank M. P. Van Haren,  
Australian National University, Australia  
Naveen Kumar Devanga Ragupathi,  
The University of Sheffield,  
United Kingdom  
Clive P. Page,  
King's College London,  
United Kingdom

### \*Correspondence:

Kelly Grace Magalhães  
kellymagalhães@unb.br  
orcid.org/0000-0002-7435-5272

### Specialty section:

This article was submitted to  
Infectious Diseases - Surveillance,  
Prevention and Treatment,  
a section of the journal  
Frontiers in Medicine

Received: 09 October 2020

Accepted: 26 March 2021

Published: 23 April 2021

### Citation:

Braz-de-Melo HA, Faria SS,  
Pasquarelli-do-Nascimento G,  
Santos IO, Kobinger GP and  
Magalhães KG (2021) The Use of the  
Anticoagulant Heparin and  
Corticosteroid Dexamethasone as  
Prominent Treatments for COVID-19.  
Front. Med. 8:615333.  
doi: 10.3389/fmed.2021.615333

COVID-19 is spreading worldwide at disturbing rates, overwhelming global healthcare. Mounting death cases due to disease complications highlight the necessity of describing efficient drug therapy strategies for severe patients. COVID-19 severity associates with hypercoagulation and exacerbated inflammation, both influenced by ACE2 downregulation and cytokine storm occurrence. In this review, we discuss the applicability of the anticoagulant heparin and the anti-inflammatory corticosteroid dexamethasone for managing severe COVID-19 patients. The upregulated inflammation and blood clotting may be mitigated by administrating heparin and its derivatives. Heparin enhances the anticoagulant property of anti-thrombin (AT) and may be useful in conjunction with fibrinolytic drugs for severe COVID-19 patients. Besides, heparin can also modulate immune responses, alleviating TNF- $\alpha$ -mediated inflammation, impairing IL-6 production and secretion, and binding to complement proteins and leukotriene B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>). Moreover, heparin may present anti-SARS-CoV-2 potential once it can impact viral infectivity and alter SARS-CoV-2 Spike protein architecture. Another feasible approach is the administration of the glucocorticoid dexamethasone. Although glucocorticoid's administration for viral infection managing is controversial, there is increasing evidence demonstrating that dexamethasone treatment is capable of drastically diminishing the death rate of patients presenting with Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) that required invasive mechanical ventilation. Importantly, dexamethasone may be detrimental by impairing viral clearance and inducing hyperglycemia and sodium retention, hence possibly being deleterious for diabetics and hypertensive patients, two major COVID-19 risk groups. Therefore, while heparin's multitarget capacity shows to be strongly beneficial for severe COVID-19 patients, dexamethasone should be carefully administered taking into consideration underlying medical conditions and COVID-19 disease severity. Therefore, we suggest that the multitarget impact of heparin as an anti-viral, antithrombotic and anti-inflammatory drug



OPEN

## Gut microbiota modulation induced by Zika virus infection in immunocompetent mice

Rafael Corrêa<sup>1</sup>, Igor de Oliveira Santos<sup>1</sup>, Heloísa Antoniella Braz-de-Melo<sup>1</sup>, Lúvia Pimentel de Sant'Ana<sup>1</sup>, Raquel das Neves Almeida<sup>1</sup>, Gabriel Pasquarelli-do-Nascimento<sup>1</sup>, Paulo Sousa Prado<sup>2</sup>, Gary P. Kobinger<sup>3,4</sup>, Corinne F. Maurice<sup>5</sup> & Kelly Grace Magalhães<sup>1</sup>✉

Gut microbiota composition can modulate neuroendocrine function, inflammation, and cellular and immunological responses against different pathogens, including viruses. Zika virus (ZIKV) can infect adult immunocompetent individuals and trigger brain damage and antiviral responses. However, it is not known whether ZIKV infection could impact the gut microbiome from adult immunocompetent mice. Here, we investigated modifications induced by ZIKV infection in the gut microbiome of immunocompetent C57BL/6J mice. Adult C57BL/6J mice were infected with ZIKV and the gut microbiota composition was analyzed by next-generation sequencing of the V4 hypervariable region present in the bacterial 16S rDNA gene. Our data showed that ZIKV infection triggered a significant decrease in the bacteria belonging to Actinobacteria and Firmicutes phyla, and increased Deferribacteres and Spirochaetes phyla components compared to uninfected mice. Interestingly, ZIKV infection triggered a significant increase in the abundance of bacteria from the Spirochaetaceae family in the gut microbiota. Lastly, we demonstrated that modulation of microbiota induced by ZIKV infection may lead to intestinal epithelium damage and intense leukocyte recruitment to the intestinal mucosa. Taken together, our data demonstrate that ZIKV infection can impact the gut microbiota composition and colon tissue homeostasis in adult immunocompetent mice.

Zika Virus (ZIKV) is an Arbovirus member of the Flaviviridae family that is mainly transmitted by the bite of *Aedes* genus mosquitoes<sup>1</sup>. During the 2015 outbreak, ZIKV spread quickly in America, mainly in Brazil<sup>2</sup>. During ZIKV dissemination, non-vector born routes of infection were reported, including sexual transmission<sup>3</sup>. A great concern about ZIKV's impact worldwide was the association of post-infection disorders, such as Guillain-Barré syndrome<sup>4</sup>, and the development of congenital malformations<sup>5</sup>.

As a means of better understanding ZIKV pathogenesis, most of the molecular mechanisms associated with the infection were elucidated with the use of genetically-induced immunodeficient mice models<sup>6</sup>. In those reports, infected mice presented weight loss, high viremia, detectable signs of illness, intensive neuronal loss, immune system activation on neuronal surroundings, and severe testicular inflammation<sup>6-8</sup>. In contrast, the impact of ZIKV on immunocompetent adult mice models showed detectable viral loads in the serum, and effects on different organs or lethality after infection through different routes<sup>9,10</sup>. Despite this, ZIKV induces innate and adaptive immune responses that are essential for protecting the organism against the establishment of disease<sup>11,12</sup>. The immune system activation demonstrates that specific parameters are modulated during ZIKV infection such that, regardless of the milder symptoms, the virus still impacts on the host<sup>13</sup>. These findings lead to new questions regarding if other alterations could be linked to viral activation of the host's immune system and modulation of physiological functions not noticed before.

The gut microbiota has been described as a strong modulator of inflammatory and immune responses, both locally and systemically<sup>14,15</sup>, playing essential roles in triggering host responses against pathogen infections<sup>16</sup>. In recent years, studies have shown that the gut microbiota influences and is influenced by viral infections<sup>17</sup>. This study reports that enteric viruses can lead to substantial disturbances in gut microbiota composition, impacting

<sup>1</sup>Laboratory of Immunology and Inflammation, Department of Cell Biology, University of Brasília, Brasília, DF, Brazil. <sup>2</sup>Central Laboratory of Federal District (LACEN), Brasília, Brazil. <sup>3</sup>Département de Microbiologie-Infectiologie et d'Immunologie, Université Laval, Québec, Canada. <sup>4</sup>Centre de Recherche en Infectiologie du CHU de Québec-Université Laval, Québec, Canada. <sup>5</sup>Department of Microbiology and Immunology, McGill University, Montreal, Canada. ✉email: kellymagalhaes@unb.br

OPEN

## Potential neuroprotective and anti-inflammatory effects provided by omega-3 (DHA) against Zika virus infection in human SH-SY5Y cells

Heloísa Antoniella Braz-De-Melo<sup>1</sup>, Gabriel Pasquarelli-do-Nascimento<sup>1</sup>, Rafael Corrêa<sup>1</sup>, Raquel das Neves Almeida<sup>1</sup>, Igor de Oliveira Santos<sup>1</sup>, Paulo Sousa Prado<sup>2</sup>, Victor Pícolo<sup>3</sup>, Andreza Fabro de Bem<sup>3</sup>, Nathalia Pizato<sup>4</sup> & Kelly Grace Magalhães<sup>1\*</sup>

Zika virus (ZIKV) has a strong tropism for the nervous system and has been related to post-infection neurological syndromes. Once neuronal cells are infected, the virus is capable of modulating cell metabolism, leading to neurotoxicity and cellular death. The negative effect of ZIKV in neuron cells has been characterized. However, the description of molecules capable of reversing these cytotoxic effects is still under investigation. In this context, it has been largely demonstrated that docosahexaenoic acid (DHA), an omega-3 polyunsaturated fatty acid, is highly neuroprotective. Here, we hypothesized that DHA's neuroprotective properties could have an influence on ZIKV-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells. Our data showed that pre-treatment of SH-SY5Y cells with DHA increased the cell viability and proliferation in ZIKV-infected cells. Moreover, DHA triggered an anti-inflammatory response in those infected cells. Besides, DHA was capable of restoring mitochondria function and number in ZIKV-infected SH-SY5Y cells. In addition, cells pre-treated with DHA prior to ZIKV infection presented a lower viral load at different times of infection. Taking together, these results demonstrated that DHA has a potential anti-inflammatory and neuroprotective effect against ZIKV infection in these neuron-like cells and could be a useful tool in the treatment against this virus.

First discovered in Uganda Forest in 1947, Zika virus (ZIKV) is an arthropod-borne Flavivirus, transmitted by mosquitoes from *Aedes* genus, and, as recently discovered, an arbovirus sexually transmitted<sup>1,2</sup>. ZIKV has been associated with several neuronal alterations and congenital diseases<sup>3</sup>. Indeed, ZIKV is closely related to neurological disorders and presents a main tropism for nervous system, being isolated from animals born with microcephaly and infected adult mice brain<sup>4,5</sup>. Neuronal cells, both progenitors or differentiated ones, suffer a loss of homeostasis when infected with ZIKV and present considerable changes in cell metabolism during infection, due to the presence of specific required metabolites for viral replication<sup>6,7</sup>. ZIKV-induced neuronal alterations can directly impair neuronal homeostasis leading to decreased cellular proliferation and differentiation capacity of those cells, followed by cell death<sup>7</sup>.

It was also reported that negative influence of ZIKV in neuronal cells has a strong relationship with mitochondrial-sequestration of phospho-TBK1, an important factor that once relocated can cause a disruption in mitosis process, creating a critical environment to neuronal survival<sup>8</sup>. In addition, specific ZIKV proteins are capable of inhibiting Akt-mTOR pathway in neuronal stem cells, which plays essential role on neurogenesis process, cell maturation and migration<sup>9,10</sup>. Such mechanisms act synergistically to induce neuronal apoptotic cell death and loss of massive cell population during brain development and it can be accompanied by activation of inflammatory response<sup>7,11,12</sup>.

It is known that inflammation is a key process that orchestrates neuronal damage induced by ZIKV infection<sup>13</sup>. It has been reported that ZIKV intensively induces the generation of pro-inflammatory factors in microglia cells, such as IL-6 and MCP-1, when it infects human fetal brain<sup>14</sup>. In addition, pro-inflammatory response triggered

<sup>1</sup>Laboratory of Immunology and Inflammation, Department of Cell Biology, University of Brasília (UnB), 70910-900, Brasília, Brazil. <sup>2</sup>Central Laboratory of Federal District (LACEN), 70830-010, Brasília, Brazil. <sup>3</sup>Department of Physiological Sciences, University of Brasília (UnB), 70910-900, Brasília, Brazil. <sup>4</sup>Department of Nutrition, University of Brasília (UnB), 70910-900, Brasília, Brazil. \*email: kellymagalhaes@unb.br