



Universidade de Brasília – UnB

Instituto de Ciências Biológicas - IB

Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

**Análise dos efeitos de ácidos graxos em parâmetros carcinogênicos e no metabolismo lipídico de células de adenocarcinoma pancreático**

**Ramon Buson Lima Paiva**

Brasília, 2025



Universidade de Brasília – UnB

Instituto de Ciências Biológicas - IB

Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

**Ramon Buson Lima Paiva**

**Análise dos efeitos de ácidos graxos em parâmetros carcinogênicos e no metabolismo lipídico de células de adenocarcinoma pancreático**

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

Orientadora: Profa. Dra. Kelly Grace Magalhães

Brasília, 2025

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

**Ramon Buson Lima Paiva**

**Análise dos efeitos do estímulo de ácidos graxos em parâmetros carcinogênicos e  
no metabolismo lipídico de células de adenocarcinoma pancreático**

Data:10/03/2025

**Dr.(a) Sônia Nair Bão, UnB**

**Examinador(a) Interno(a)**

**Dr.(a) Patrícia Borges Botelho Gamba, UNICAMP**

**Examinador(a) Externo(a) à Instituição**

**Dr.(a) Paula Maria Quaglio Bellozi, UnB**

**Suplente**

**Dr.(a) Kelly Grace Magalhães, UnB**

**Presidente**

**Ramon Buson Lima Paiva**

**Mestrando**

## **Agradecimentos**

Agradeço a minha família, em primeiro lugar ao meu pai, Flavio, por ser a minha maior inspiração desde criança e principal motivo para eu ter me dedicado para a realização desse trabalho. Agradeço por ter me criado, dado todo o suporte, carinho, atenção e tempo que você pôde, me amando até seus últimos momentos. Sua luta contra essa injusta doença era praticamente impossível desde o início, mas você nunca desistiu mesmo assim. O resultado final não foi favorável ao senhor, mas todos os seus feitos em vida e as pessoas que você zelou e inspirou continuam aqui para dar seguimento a sua história, esse trabalho é dedicado a você.

Agradeço a minha mãe, Valeska, por seu amor incondicional, por ter me apoiado todos os dias da minha vida sem exceções, ter me feito a pessoa que sou hoje sempre me guiando pelo caminho correto e sempre dando o seu melhor, você perseverou e continuou cuidando da nossa família mesmo no nosso momento de maior dor. Agradeço a minha querida irmã, Érika, que também foi importante para moldar quem eu sou, sempre me acolheu e me ajudou, é a pessoa que me mostrou os caminhos pelos quais a biologia poderia me levar, sua determinação e sua garra também sempre vão ser minha inspiração.

Agradeço a minha orientadora e professora Kelly, minha maior inspiração científica e a base que permitiu a realização de todo esse projeto. Agradeço por ter me acolhido em seu laboratório, me orientado com todo o seu conhecimento, me encorajando incontáveis vezes quando eu mesmo não acreditei em mim. Ser orientado por você é um privilégio, além de competente você é humana e criou uma segunda família para todos os integrantes deste laboratório.

Agradeço a todos os membros atuais e prévios do laboratório de imunologia e inflamação (LIMI). Em especial, agradeço ao meu filho científico Nicolas, meu companheiro em boa parte dessa jornada, obrigado por trilhar esse caminho comigo. Ao Calixto, meu amigo desde o início da graduação e parceiro para toda situação. A Sarah, que também se aventura pelo caminho do câncer de pâncreas, agradeço por todas as dicas, suporte e alegria. À Heloísa, Debora, Luana, Gabriel Pasquareli, Raquel, Rafael, Gaby, Igor, Sabrina, Gabriel Ribeiro, Gabriel Araujo, Lívia, Milena, Julia, Fernanda, Clarissa, Nathalia, Mickaella, Jader, Laís, Maria Heloísa, Isabela, Rafaela e Augusto, agradeço por também terem me acolhido, pelo apoio, momentos de descontração e trocas científicas.

Agradeço aos amigos Felipe e Marina assim como ao professor Marcelo do laboratório GPRO. Agradeço também ao técnico Chiquinho que ajuda a todos a resolver qualquer situação, por sempre ser solícito e por todo o seu bom humor contagiante.

Agradeço a Universidade de Brasília, em especial ao programa de Pós-graduação em Biologia Molecular por possibilitar que este projeto fosse realizado. Agradeço também as agências de fomento, CNPq, CAPES, FAPDF e PEW que fomentaram este projeto assim como a estrutura disponível no nosso laboratório e na universidade.

## RESUMO

O adenocarcinoma pancreático é o câncer mais comum do pâncreas. Por possuir um processo de carcinogênese silencioso, de difícil detecção e tratamento em estágios avançados, é uma das neoplasias altamente letal e com curto tempo de sobrevivência. A dieta possui relevância clínica para a saúde dos pacientes pois pode modular parâmetros energéticos, oxidativos e inflamatórios, impactando processos fisiológicos e patológicos. Os ácidos graxos são moléculas que podem ser obtidas pela dieta e que influenciam diversos parâmetros tumorais como sobrevivência, proliferação, metabolismo energético, migração e resposta ao estresse. Dentre os ácidos graxos, o ácido palmítico (PA) é encontrado em óleos, gorduras e em grande quantidade em ultraprocessados. A literatura apresenta resultados variados do PA no contexto tumoral, demonstrando a necessidade da validação do seu efeito em cenários como o adenocarcinoma pancreático. Outro ácido graxo importante é o ácido docosaexaenoico (DHA), que é encontrado em óleos de peixes, e está associado a benefícios à saúde. Já foi demonstrado que o DHA exerce citotoxicidade seletiva em alguns tipos tumorais, contudo, os seus efeitos no adenocarcinoma pancreático ainda não foram totalmente elucidados. Dessa forma, este estudo propõe-se a analisar os efeitos dos ácidos palmítico e docosaexaenoico na modulação de parâmetros carcinogênicos de células MIA PaCa-2 de adenocarcinoma pancreático humano *in vitro*. Para isso, células MIA PaCa-2 foram estimuladas com as concentrações 50  $\mu\text{M}$  e 200  $\mu\text{M}$  de PA, assim como 25  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$  de DHA por diferentes períodos. Foram avaliados parâmetros carcinogênicos e mecanismos de morte como viabilidade, proliferação, biogênese de corpúsculos lipídicos, perfil de secreção de citocinas, geração de espécies reativas (ROS) e a abundância mitocondrial. Nossos resultados demonstram que o PA não é citotóxico para as células MIA PaCa-2, mas aumenta a biogênese de corpúsculos lipídicos e modula o seu perfil de secreção de citocinas, o que pode impactar o microambiente tumoral. Também demonstramos que o DHA induziu toxicidade celular dependente da indução de espécies reativas, resultando na despolarização da mitocôndria, redução da capacidade proliferativa das células e apoptose. Este estudo destaca o efeito tumoral promissor do ácido docosaexaenoico *in vitro*, reforçando sua importância biomédica e seu potencial adjuvante no tratamento do câncer de pâncreas.

**Palavras-chave:** Adenocarcinoma pancreático, Ácido palmítico, Ácido docosaexaenoico, Efeito antitumoral.

## ABSTRACT

Pancreatic adenocarcinoma is the most common pancreatic cancer. Due to its silent carcinogenesis process, which is difficult to detect and treat with advanced innovations, it is one of the most lethal neoplasms with a short survival time. Diet has clinical relevance for patients' health because it can modulate energy, oxidative and inflammatory parameters, impacting physiological and pathological processes. Fatty acids are molecules that can be obtained through diet and that influence several tumor parameters such as survival, energy metabolism, migration and response to stress. Among fatty acids, palmitic acid (PA) is found in oils, fats and in large quantities in ultra-processed foods. The literature presents varied results of PA in the tumor context, demonstrating the need to validate its effect in scenarios such as pancreatic adenocarcinoma. Another important fatty acid is docosahexaenoic acid (DHA), which is found in fish oils and is associated with health benefits. It has been demonstrated that DHA exerts selective cytotoxicity in some tumor types; however, its effects on pancreatic adenocarcinoma have not yet been fully elucidated. Therefore, this study aims to analyze the effects of palmitic and docosahexaenoic acids in the modulation of carcinogenic parameters of MIA PaCa-2 human pancreatic adenocarcinoma cells in vitro. For this purpose, MIA PaCa-2 cells were stimulated with 50  $\mu$ M and 200  $\mu$ M PA, as well as 25  $\mu$ M and 50  $\mu$ M DHA for different periods. Carcinogenic parameters and death mechanisms such as viability, proliferation, lipid body biogenesis, cytokine secretion profile, reactive species (ROS) generation and mitochondrial abundance were evaluated. Our results demonstrate that PA is not cytotoxic to MIA PaCa-2 cells, but increases lipid body biogenesis and modulates their cytokine secretion profile, which may impact the tumor microenvironment. We also demonstrated that DHA-induced cellular toxicity depends on the induction of reactive species, resulting in mitochondrial depolarization, reduced proliferative capacity of cells and apoptosis. This study highlights the promising tumorigenic effect of docosahexaenoic acid in vitro, reinforcing its biomedical importance and its adjuvant potential in the treatment of pancreatic cancer.

**Key Words:** Pancreatic adenocarcinoma, Palmitic acid, Docosahexaenoic acid, Antitumor effect.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 - <i>Hallmarks</i> do câncer.</b>	16
<b>Figura 2 - A composição celular do pâncreas.</b>	17
<b>Figura 3 - Incidência e mortalidade mundial do câncer de pâncreas.</b>	18
<b>Figura 4 - Projeção estimadas da incidência e mortalidade do câncer de pâncreas de 2022 a 2050.</b>	19
<b>Figura 5 - Sintomas do câncer de pâncreas.</b>	20
<b>Figura 6 - Processo de carcinogênese do adenocarcinoma pancreático.</b>	21
<b>Figura 7 - Porcentagens de mortes causadas por cânceres associadas a fatores de risco.</b>	22
<b>Figura 8 - Fatores de risco associados a óbitos causados por câncer.</b>	23
<b>Figura 9 - Ilustração do papel do tecido adiposo no pâncreas.</b>	24
<b>Figura 10 - Efeitos biológicos da dieta na carcinogênese.</b>	25
<b>Figura 11 - Componentes da dieta mediterrânea.</b>	26
<b>Figura 12 - Papel do corpúsculo lipídico em <i>hallmarks</i> tumorais.</b>	31
<b>Figura 13 - Estratégia de gate em citometria de fluxo para seleção de células viáveis e singlets para análises.</b>	40
<b>Figura 14 - Efeito do estímulo de ácido palmítico e ácido docosaexaenoico ao longo do tempo na viabilidade mitocondrial.</b>	46
<b>Figura 15 - Prancha representativa do efeito do estímulo com ácido palmítico e ácido docosaexaenoico nas células MIA PaCa-2.</b>	47
<b>Figura 16 - Ácido docosaexaenoico causa morte celular na célula MIA PaCa-2.</b>	49
<b>Figura 17- Ácido palmítico e ácido docosaexaenoico não causaram a formação precoce de poros na membrana plasmática nas células MIA PaCa-2.</b>	51
<b>Figura 18 - Ácido palmítico e ácido docosaexaenoico não induziram a liberação de lactato desidrogenase para o espaço extracelular nas células MIA PaCa-2.</b>	53
<b>Figura 19 - A maquinaria necessária para indução de morte lítica piroptótica está presente na célula MIA PaCa-2.</b>	55
<b>Figura 20 - Ácido palmítico causou a diminuição da secreção de IL-1 <math>\beta</math> e aumento da secreção de IL-6.</b>	57
<b>Figura 21 - Ácido palmítico não modulou a capacidade proliferativa. Ácido docosaexaenoico reduziu a capacidade proliferativa das células MIA PaCa-2.</b>	59
<b>Figura 22 - O ácido palmítico não induziu a produção de espécies reativas em tempos precoces. O ácido docosaexaenoico induziu a produção precoce de espécies reativas.</b>	60
<b>Figura 23 - Ácido docosaexaenoico induziu a produção tardia de espécies reativas.</b>	61
<b>Figura 24 - A inibição da produção de espécies reativas reverteu a redução de viabilidade mitocondrial causada pelo ácido docosaexaenoico nas células MIA PaCa-2.</b>	63
<b>Figura 25 - Prancha representativa do efeito da inibição da produção de espécies reativas na diminuição de viabilidade mitocondrial causada pelo DHA nas células MIA PaCa-2.</b>	64
<b>Figura 26 - Ácido docosaexaenoico diminuiu o número de mitocôndrias viáveis da célula MIA PaCa-2.</b>	65

<b>Figura 27 - Ácido palmítico aumentou a quantidade total de corpúsculos lipídicos nas células MIA PaCa-2, enquanto o ácido docosaexaenoico não modulou a biogênese de corpúsculos lipídicos.....</b>	<b>67</b>
<b>Figura 28 - O ácido palmítico e o ácido docosaexaenoico aumentaram o número de gotículas lipídicas, com um efeito mais acentuado causado pelo ômega-3, imagem de microscopia confocal. ....</b>	<b>69</b>
<b>Figura 29 - O ácido palmítico e o ácido docosaexaenoico aumentaram o número de gotículas lipídicas, com um efeito mais acentuado causado pelo ômega-3, imagem por microscopia óptica.....</b>	<b>70</b>
<b>Figura 30 - O ácido palmítico e o ácido docosaexaenoico aumentaram o número de gotículas lipídicas, com um efeito mais acentuado causado pelo ômega-3, quantificação por microscopia óptica.....</b>	<b>71</b>
<b>Figura 31 – O Ácido palmítico aumenta o número de projeções celulares em tempos tardios enquanto ácido docosaexaenoico diminui.. ....</b>	<b>72</b>
<b>Figura 32 - Papel do ácido palmítico e do ácido docosaexaenoico em células de câncer de adenocarcinoma pancreático humano MIA PaCa-2.. ....</b>	<b>84</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µM	Micromolar
ABC	família de proteínas <i>ATP-Binding Cassette</i>
ADP	Adenocarcinoma pancreático
AKT	Proteína quinase ativada por AMP
ALA	Ácido alfa-linolênico
ANOVA	Análise de variância
BD	Empresa de tecnologia médica, Becton Dickinson
BODIPY	Boro-dipirrometano
CAFs	Fibroblastos Associados Ao Câncer
CD8+	Linfócito T citotóxico com receptor cluster de diferenciação 8
CFSE	Éster succinimidil de carboxifluoresceína
CLs	Corpúsculos Lipídicos
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
COXs	Cicloxigenases
DCF-DA	Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína
DGAT1	Diacilglicerol Aciltransferases 1
DHA	Ácido docosaenoico
DMEM	Meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio imunoenzimático ligado a substrato
EPA	Ácido eicosapentaenoico
ERs	Espécies reativas
ESCRTs	Complexos de Classificação Endossomal Necessário para o Transporte
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FAS	Ácido-graxo sintase

FITC	Isotiocianato de fluoresceína
H	Horas
HEPES	4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanossulfonato
HFD	Dieta hiper lipídica
HIF-1	Fator induzível por hipóxia
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 beta
IL-10	Interleucina-10
IL-6	Interleucina-6
IMC	Índice de Massa Corporal
JAK	Janus Kinase
KDa	Kilodalton
KRAS	Oncogene viral do sarcoma de rato Kirsten
LDH	Lactato desidrogenase
LOXs	Lipoxigenases
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPKs	Proteínas Quinases ativadas por mitógenos
MDS	Escore da Dieta Mediterrânea
mL	Mililitro
mTHOR	Alvo mecanístico da rapamicina
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio brometo
NAC	N-Acetilcisteína
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (forma oxidada)
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (forma reduzida)
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear kappa B
NLRP3	Receptor da família NOD contendo domínio pirina 3
NM	Célula não marcadas
P13K	Fosfoinositídeo 3-quinase
PA	Ácido palmítico
PanIN	Neoplasia Intraepitelial Pancreática
PANX1	Pannexina 1

PBS	Tampão fosfato-salino
Peli1	Pellino E3 Ubiquitin Ligase 1
PFA	Paraformaldeído
Pg	Picograma
PG	Propilenoglicol
PI	Iodeto de propídio
PI	Iodeto de propídio
PSC	Células Estreladas Pancreáticas
PUFAs	Ácidos graxos poli-insaturados
RAS	Proteína derivada do Oncogene viral do sarcoma de rato
SFB	Soro Fetal Bovino
Sigma	Empresa de química, biotecnologia e ciências da vida, Sigma-Aldrich
STAT	Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição
TLR4	Receptor Semelhante a Toll 4
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TRIF	Domínio TIR contendo a molécula adaptadora 1
UNS	Condição não estimulada

## SUMÁRIO

**Sumário**

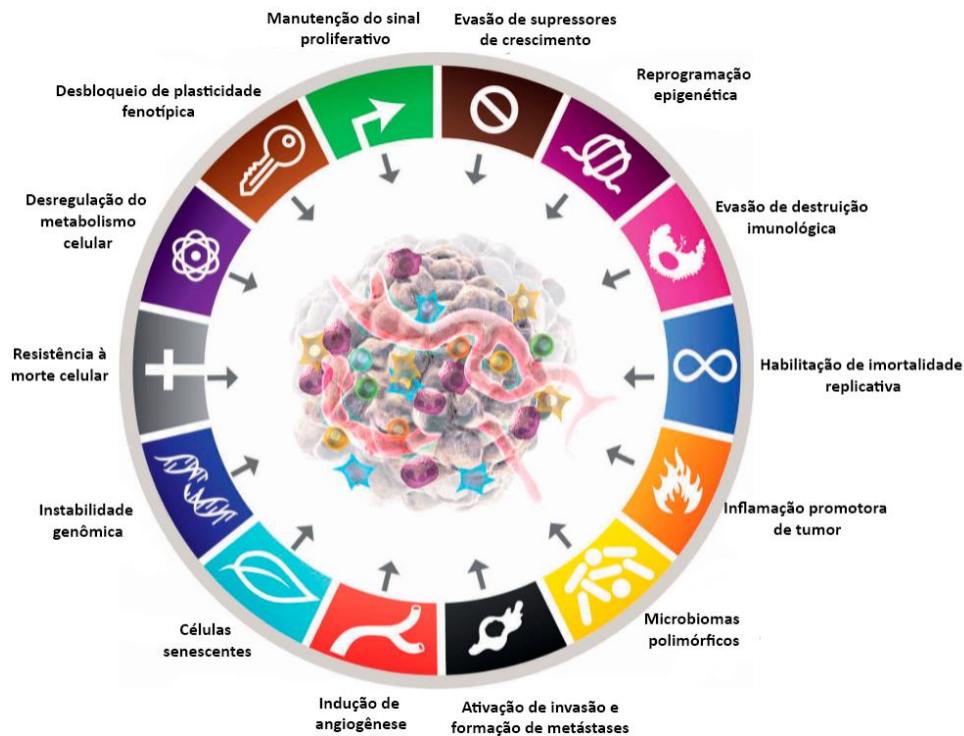
1. INTRODUÇÃO .....	16
1.1 Câncer .....	16
1.2 Câncer de pâncreas .....	17
1.3 Fatores de risco para o adenocarcinoma pancreático .....	22
1.4 Dieta no câncer .....	24
1.5 Ácido palmítico.....	27
1.6 Ômega-3 .....	28
1.7 Corpúsculo lipídico e câncer .....	30
2. JUSTIFICATIVA.....	32
3. OBJETIVOS .....	34
3.1 Objetivo Geral .....	34
3.2 Objetivo específico .....	34
4. METODOLOGIA .....	35
4.1 Cultivo celular .....	35
4.2 Estímulos com ácidos graxos .....	35
4.3 Análise de viabilidade mitocondrial .....	35
4.4 Análise de perfil de morte celular .....	36
4.5 Análise da formação de poros na membrana plasmática .....	37
4.6 Análise da liberação de LDH.....	38
4.7 Análise do perfil de secreção de citocinas .....	38
4.8 Análise de proliferação celular.....	39
4.9 Análise da geração de espécies reativas de oxigênio.....	40
4.10 Análise de viabilidade mitocondrial na presença de NAC. ....	41
4.11 Análise de abundância mitocondrial .....	42
4.12 Análise de biogênese de corpúsculos lipídicos .....	42
4.13 Contagem do número de projeções celulares .....	44
4.14 Análise estatística e confecção de gráficos.....	44
5. RESULTADOS .....	45
5.1 O ácido palmítico não afetou a viabilidade mitocondrial, enquanto o ácido docosaexaenoico reduziu essa viabilidade de forma dependente da dose e do tempo nas células MIA PaCa-2.....	45
5.2 PA não induz morte celular, enquanto ácido docosaexaenoico induz morte apoptótica e perda de integridade de membrana .....	48

5.3 Ácido palmítico e ácido docosaexaenoico não induzem a formação precoce de poros na membrana de células MIA PaCa-2 .....	50
5.4 Ácido palmítico e ácido docosaexaenoico não induziram a liberação de lactato desidrogenase para o espaço extracelular nas células MIA PaCa-2 .....	52
5.5. A maquinaria necessária para indução de morte lítica piroptótica está presente na célula MIA PaCa-2 .....	54
5.6 Ácido palmítico causou a diminuição da secreção de IL-1 $\beta$ e aumento da secreção de IL-6 em células MIA PaCa-2. Ácido docosaexaenoico não modulou a secreção das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, e TNF- $\alpha$ .....	56
5.7 O ácido docosaexaenoico na maior concentração diminuiu a capacidade proliferativa das células MIA PaCa-2 em todos os tempos. Ácido palmítico não alterou a capacidade proliferativa .....	58
5.8 O ácido palmítico não induziu a produção de espécies reativas em tempos precoces. O ácido docosaexaenoico induziu a produção precoce de espécies reativas nas células MIA PaCa-2 .....	60
5.9 Ácido docosaexaenoico induziu a produção tardia de espécies reativas.....	61
5.10 A inibição da produção de espécies reativas reverteu a redução de viabilidade mitocondrial causada pelo ácido docosaexaenoico nas células MIA PaCa-2.....	62
5.11 Ácido docosaexaenoico diminuiu o número de mitocôndrias viáveis .....	65
5.12 Ácido palmítico aumentou a quantidade total de corpúsculos lipídicos nas células MIA PaCa-2. Ácido docosaexaenoico não modulou a biogênese de corpúsculos lipídicos.....	66
5.13 O ácido palmítico e o ácido docosaexaenoico aumentaram o número de gotículas lipídicas, com um efeito mais acentuado causado pelo ômega-3 .....	68
5.14 O ácido palmítico aumenta o número de projeções celulares da célula MIA PaCa-2. O ácido docosaexaenoico diminui o número de projeções celulares. ....	72
6. DISCUSSÃO .....	73
7. CONCLUSÃO.....	83
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Câncer

O câncer é um conjunto de doenças derivadas do acúmulo de mutações genéticas no DNA (Ácido desoxirribonucleico), causando alterações no funcionamento celular (HANAHAHAN, 2022; HANAHAHAN; WEINBERG, 2011). Essas alterações resultam na disfunção da homeostase, de forma a caracterizar os *hallmarks* tumorais (Figura 1).



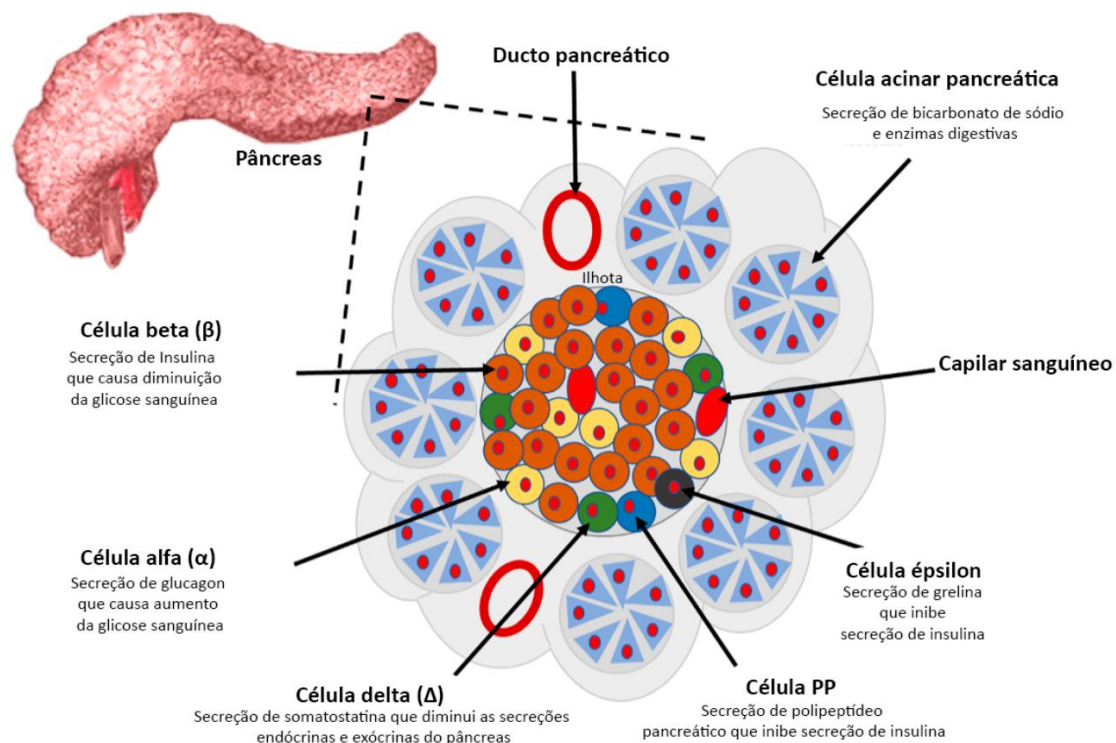
**Figura 1 - Hallmarks do câncer.** Características e marcadores do câncer incluem a evasão dos mecanismos de supressão do crescimento celular, escape da resposta imune, imortalização, inflamação pró-tumoral, metástase, angiogênese, instabilidade genômica, resistência à morte celular, reprogramação metabólica e proliferação exacerbada. Adaptado de: (HANAHAHAN, 2022).

Apesar de características em comum, os diferentes tipos de câncer são altamente heterogêneos. O perfil distinto de mutações genéticas e alterações epigenéticas de cada tumor resulta em características que podem ser divergentes (DAGOGO-JACK; SHAW, 2018). Além disso, células cancerosas passam por desdiferenciação, processo que resulta na formação células-tronco cancerosas que podem originar subpopulações tumorais com perfis distintos (GROSE; SENGA, 2021). Além disso, em cada tumor sólido, existe uma complexa mistura de células residentes que constituem o chamado microambiente tumoral, que é modulado pela produção de citocinas e quimiocinas por células tumorais e células associadas ao tumor, de forma a favorecer a progressão tumoral e evasão imunológica (MEMPEL; LILL; ALTENBURGER, 2024).



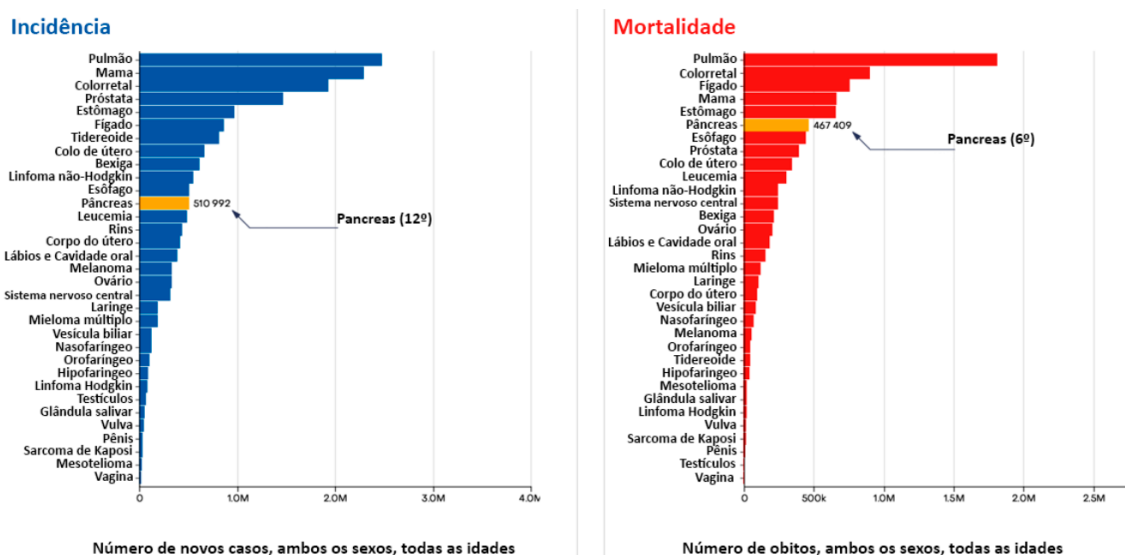
## 1.2 Câncer de pâncreas

O pâncreas é um órgão exócrino e endócrino localizado posterior ao estômago, na porção superior do abdome. É constituído por diversos tipos celulares secretores e de revestimento (ENGLISH; IRWIN, 2019). As células que compõem a porção endócrina formam estruturas chamadas ilhotas pancreáticas, nas quais são produzidos hormônios importantes para a regulação da homeostase energética, dentre eles insulina, glucagon, somatostatina, polipeptídio pancreático e grelina (Figura 2). Além disso, o pâncreas apresenta uma porção exócrina, composta por células acinares secretoras de lipases, proteases e amilases que auxiliam na digestão (WILLIAMS, 1980). Ademais, o pâncreas é revestido por células epiteliais que também formam estruturas chamadas ductos pancreáticos, canais compostos de células epiteliais pelos quais as enzimas digestivas produzidas pelos ácinos são transportadas para o duodeno. Além disso, as células epiteliais secretam bicarbonato de sódio para neutralizar o pH ácido do quimo do estômago (ATKINSON et al., 2020; WILLIAMS, 1980).

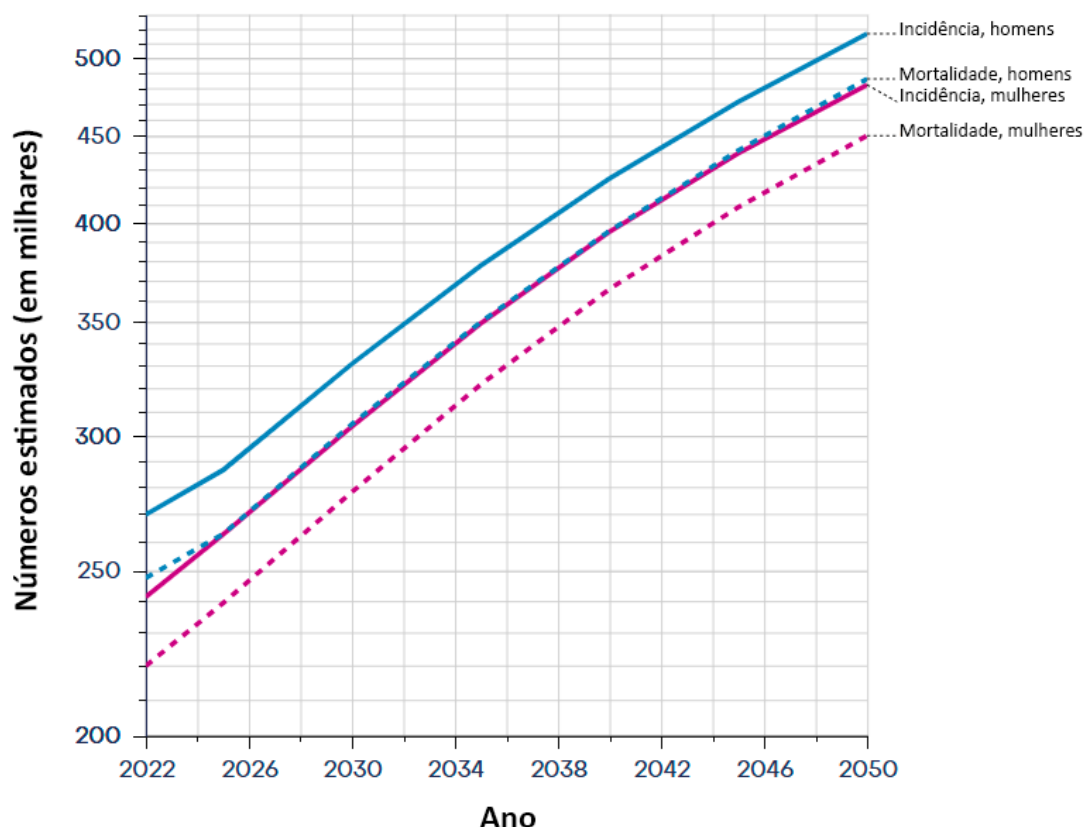


**Figura 2 - A composição celular do pâncreas.** O pâncreas é um órgão composto por diferentes tipos celulares, incluindo células de revestimento e células secretoras. Estas últimas são responsáveis tanto pela produção de hormônios que modulam o metabolismo e a homeostase energética quanto pela secreção do suco pancreático, que é transportado ao duodeno para atuar na digestão. Adaptado de: (ENGLISH; IRWIN, 2019).

Assim como em outros órgãos, a maioria das neoplasias pancreáticas é derivada de células epiteliais. As células epiteliais do pâncreas revestem os ductos pancreáticos e são a origem de cerca de 90% dos cânceres pancreáticos, de modo que, quando passam por um processo carcinogênico resultam no adenocarcinoma pancreático (ADP) (CHENG JIN; LING BAI, 2020). O ADP é um câncer agressivo e letal, de forma que apenas cerca de 9% dos pacientes sobrevivem por cinco anos após o diagnóstico (WANG et al., 2021). Apesar de não ser um dos tipos de neoplasias mais comuns, o ADP é responsável por aproximadamente 500 mil mortes anuais, de modo que é considerado um dos tipos mais letais (Figura 3). A incidência, assim como o número de óbitos causados por essa doença, tende a aumentar nas próximas décadas (Figura 4) (HU et al., 2021; IHME, 2024).

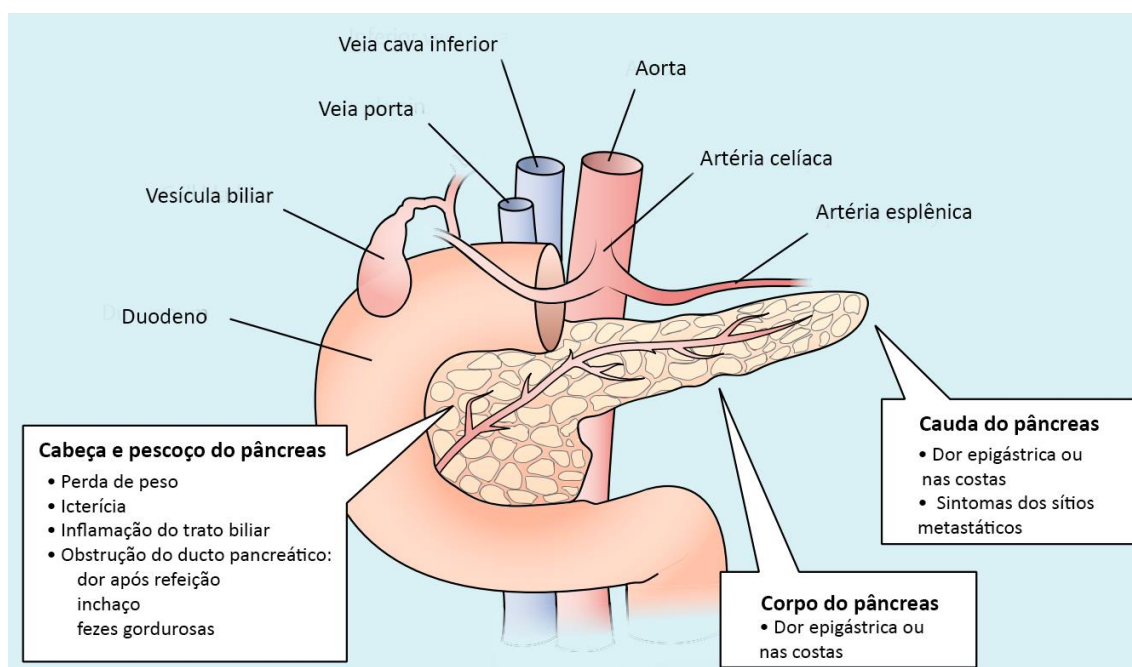


**Figura 3 - Incidência e mortalidade mundial do câncer de pâncreas.** O gráfico destaca o câncer de pâncreas em laranja, representam números absolutos a incidência em azul e a mortalidade em vermelho. O câncer de pâncreas é o 12º mais comum e o 6º mais letal, evidenciando seu impacto clínico. Fonte: (LYON, 2024).



**Figura 4 - Projeção estimadas da incidência e mortalidade do câncer de pâncreas de 2022 a 2050.** A cor azul representa os homens, e a rosa, as mulheres. A linha contínua representa a incidência, enquanto a pontilhada indica a mortalidade. Adaptado de: (IHME, 2024).

O diagnóstico do adenocarcinoma pancreático é frequentemente tardio, o que contribui para a sua alta letalidade. Os sintomas dessa doença se desenvolvem apenas em estágios avançados e são inespecíficos, incluindo: dor nas costas, perda de apetite, fadiga, perda de peso, náuseas, entre outros (Figura 5) (WALTER et al., 2016). A localização do pâncreas dificulta a identificação dessa neoplasia, de maneira que, a maioria dos casos seja diagnosticada em estágios avançados, muitas vezes já com metástases. Cerca de metade dos diagnósticos ocorre simultaneamente a testes hepáticos anormais (MIZRAHI et al., 2020). Outra demonstração da dificuldade de um diagnóstico preciso é o fato de que um terço dos tumores categorizados como operáveis são recatalogados em inoperáveis após a realização de operações exploratórias para localização e remoção de tumores (VAN DER GEEST et al., 2017).



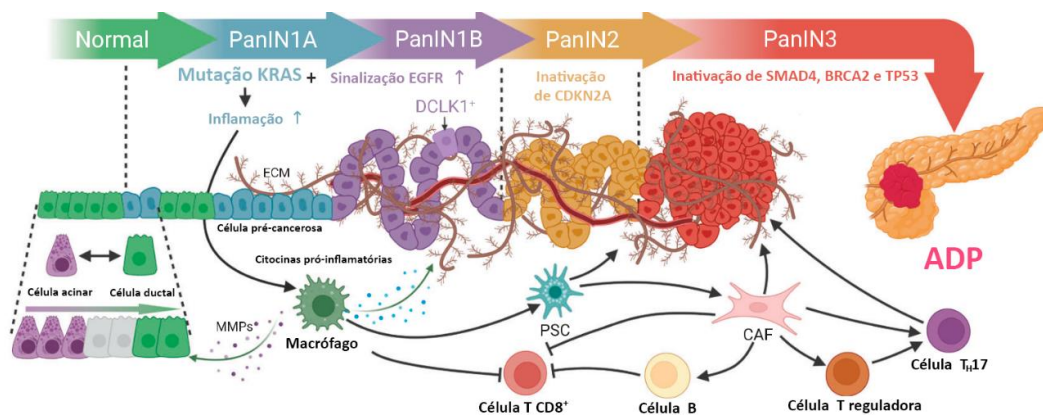
**Figura 5 - Sintomas do câncer de pâncreas.** Essa figura ilustra as três divisões anatômicas do pâncreas: cabeça, corpo e cauda, assim como sintomas mais comuns entre pacientes diagnosticados com o tumor nas respectivas regiões. Adaptado de: (MIZRAHI et al., 2020).

A única opção de cura para o ADP é a remoção cirúrgica, de modo que, os demais tratamentos disponíveis são paliativos ou com o objetivo de possibilitar a excisão do tumor. Quando detectado em estágios iniciais, o tumor é passível de ressecção cirúrgica da porção afetada do órgão e de uma região adjacente (KOLBEINSSON et al., 2023). Outra opção de tratamento é o uso de gencitabina, que tem como objetivo aumentar a sobrevida do paciente e possibilitar a remoção cirúrgica do tumor (HEINEMANN; GROSSHADERN, 2001; MIZRAHI et al., 2020). Também são utilizadas outras técnicas como a radioterapia com o objetivo de aumentar a sobrevida do paciente (KOLBEINSSON et al., 2023).

Alterações em vias de sinalização estão diretamente associadas ao adenocarcinoma pancreático, sendo relacionadas a carcinogênese e a progressão tumoral. Mutações no oncogene viral do sarcoma de rato Kirsten (KRAS) são encontradas em cerca de 90% dos adenocarcinomas de pâncreas, o que resulta na modulação de outras vias de sinalização e na potencialização de parâmetros carcinogênicos, como proliferação tumoral, migração, metabolismo, imunomodulação e angiogênese (WANG et al., 2021). O gene KRAS quando mutado também é associado à desdiferenciação de células acinares pancreáticas em células intraepiteliais neoplásicas (HUANG et al., 2021).

Mutações no gene KRAS também resultam na ativação da via Fosfoinositídeo 3-quinase/ Proteína quinase ativada por AMP/ Alvo mecanístico da rapamicina (PI3K/AKT/mTHOR), a qual é relacionada à função mitocondrial, proliferação celular, migração e angiogênese. Além disso, a ativação dessa via pode inibir apoptose, principal mecanismo de ação das terapias disponíveis atualmente, dessa forma, a via PI3K/AKT/mTHOR é associada a resistência a quimioterápicos (EBRAHIMI et al., 2017). Dentre os diversos efeitos da via PI3K, ocorre a ativação da via do fator de transcrição do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), que desencadeia resistência a morte celular e induz a produção de moléculas pró-inflamatórias, de modo a contribuir para o microambiente tumoral favorável ao câncer (WANG et al., 2021).

O processo de carcinogênese do adenocarcinoma pancreático é lento e o microambiente desempenha um papel essencial nesse processo. Desde a primeira mutação carcinogênica, esse tumor pode levar cerca de dez anos para manifestar os primeiros sintomas inespecíficos (YACHIDA et al., 2010). O microambiente pancreático desse tumor é imunossupressor e é constituído por diferentes tipos celulares e a atividade e sinalização das células associadas ao tumor impacta em parâmetros carcinogênicos (Figura 6) (LOOI et al., 2019).



**Figura 6 - Processo de carcinogênese do adenocarcinoma pancreático.** Mutações com aumento de função no gene KRAS promovem a desdiferenciação de células acinares em epiteliais e levam à formação de lesões pré-cancerosas (PanIN). Ao mesmo tempo, essa mutação aumenta a sinalização da via EGFR, que promove a sobrevivência e proliferação celular. Em conjunto com a inativação de genes supressores de tumores como CDKN2A, TP53, BRCA2 e SMAD4 possibilitam a formação de um tumor in situ. Macrófagos associados ao tumor (TAM) amplificam a inflamação, de forma favorecer a desdiferenciação pancreática. Além disso, ativam células esteladas pancreáticas (PSCs), que por sua vez se diferenciam em fibroblastos associados ao tumor (CAF) e causam fibrose e hipóxia. Ademais, essas alterações do microambiente resultam na supressão de linfócitos T CD8+ e ativação de células B reguladoras, T reguladoras e Th 17, que contribuem para a imunossupressão do ambiente. Fonte: (RUZE et al., 2023).

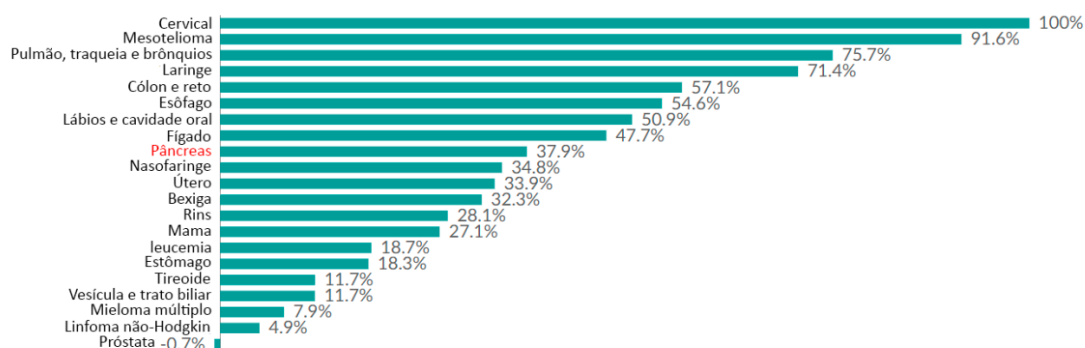
### 1.3 Fatores de risco para o adenocarcinoma pancreático

Existem diversos fatores de risco para o desenvolvimento do adenocarcinoma pancreático. Cerca de 37,7% dos pacientes que morrem devido ao câncer de pâncreas apresentam algum fator de risco associado à doença (Figura 7). Dentre os fatores de risco, o componente genético está associado a 10% dos casos da doença (OHMOTO; YACHIDA; MORIZANE, 2019). O tabagismo está associado a 14% dos casos, enquanto o alto consumo de bebidas alcoólicas corresponde a 13% (MICHALAK; MAŁECKA-WOJCIESKO, 2023; ROSATO et al., 2014).

#### Proporção de mortes por câncer atribuídas a fatores de risco, Mundo, 2021



Parcela estimada de mortes por câncer atribuídas a todos os fatores de risco. A parcela restante representa mortes que seriam esperadas como tendo ocorrido na ausência desses fatores de risco conhecidos.



Nota: Em alguns casos, a metodologia do IHME para calcular riscos pode incluir valores negativos. Isso pode refletir potenciais efeitos de proteção ou indicar incerteza devido a relações fracas ou mal compreendidas entre os fatores de risco e os resultados de saúde.

**Figura 7 - Porcentagens de mortes causadas por cânceres associadas a fatores de risco.** O gráfico estima a proporção de mortes decorrentes de câncer que estão associadas a fatores de risco, com destaque em vermelho para o câncer de pâncreas. Adaptado de (IHME, 2024).

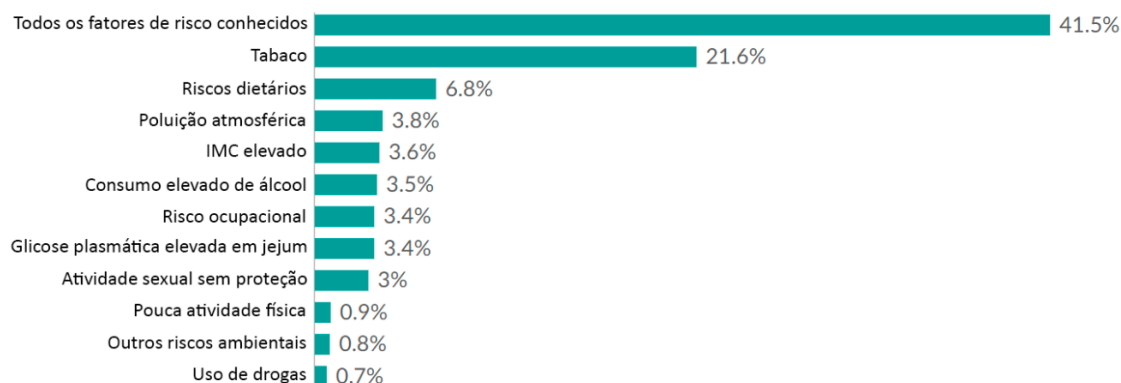
Além do álcool e tabagismo, a alimentação e alterações metabólicas também são fatores de risco para esse tipo de câncer (Figura 8). A diabetes mellitus está associada a 10% dos casos de câncer de pâncreas (ROSATO et al., 2014). Pacientes com diabetes mellitus recém diagnosticada e não controlada tem um risco sete vezes maior de desenvolver o adenocarcinoma pancreático (HUANG et al., 2020). Alterações metabólicas como hiperglicemia ou diabetes mellitus são encontradas em 80% dos pacientes antes do aparecimento de sintomas do câncer de pâncreas; ao passo que, pacientes de idade avançada que desenvolveram diabetes tardiamente, também tem um risco aumentado de desenvolver o adenocarcinoma pancreático, de forma a evidenciar uma dupla associação entre as condições (PANNALA et al., 2009).



### Proporção de mortes por câncer atribuídas a diferentes fatores de risco, Mundo, 2021



Parcela estimada de mortes por câncer atribuídas a diferentes fatores de risco.

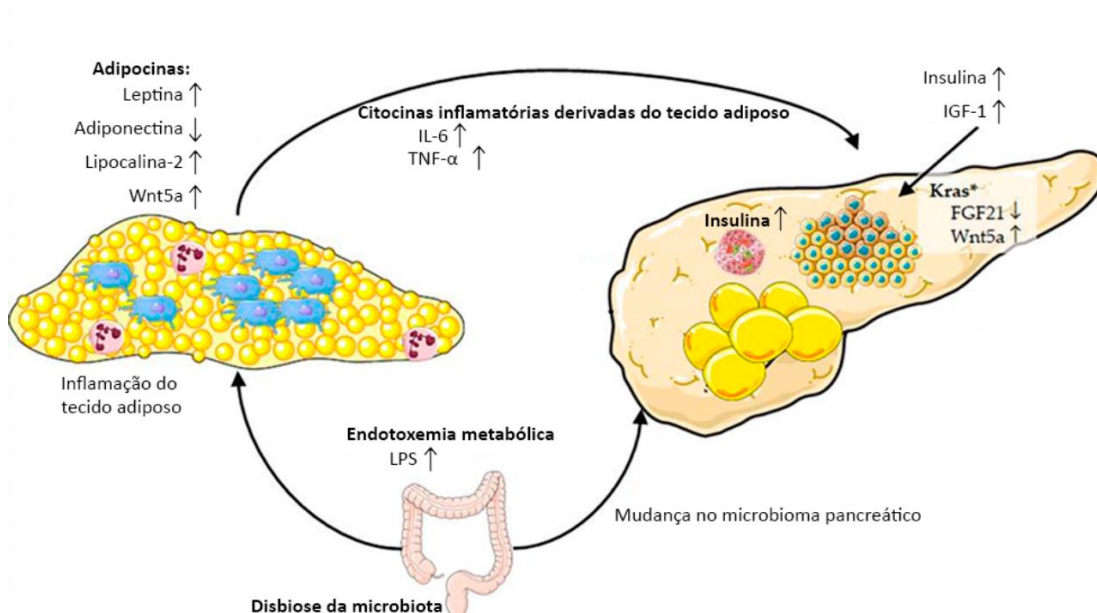


Nota: Os fatores de risco não são mutuamente exclusivos. A soma de mortes atribuídas a cada fator de risco pode exceder o número total de mortes.

**Figura 8 - Fatores de risco associados a óbitos causados por câncer.** Gráfico que apresenta os principais fatores de risco associados a mortes por câncer. Muitos desses fatores estão relacionados ao estilo de vida. Adaptado de (IHME, 2024).

Diversos mecanismos foram propostos para explicar a relação entre obesidade e o adenocarcinoma pancreático. A obesidade é uma condição de incidência crescente e está relacionada a fisiopatologia de diversas doenças, incluindo neoplasias (WŁODARCZYK; NOWICKA, 2019). Entre os mecanismos propostos para explicar a associação entre obesidade e câncer, destacam-se: disbiose da microbiota, hipertrofia e inflamação do tecido adiposo, além da inflamação crônica de baixo grau (Figura 9) (EIBL; ROZENGURT, 2021).

Alterações da microbiota decorrentes da obesidade podem tanto promover inflamação no tecido adiposo quanto afetar a microbiota pancreático, de modo a promover o crescimento tumoral (EIBL; ROZENGURT, 2021). Inflamação no tecido adiposo visceral leva à secreção de moléculas sinalizadoras por adipócitos e células imunes, sendo que as adipocinas e citocinas liberadas podem promover a proliferação de células pancreáticas cancerosas (DIVELLA et al., 2016). Ademais, a inflamação está relacionada a hiperinsulinemia e resistência insulínica, ambas associadas a um maior risco de câncer de pâncreas (PARK et al., 2014).



**Figura 9 - Ilustração do papel do tecido adiposo no pâncreas.** O tecido adiposo é um órgão dinâmico que pode modular a fisiologia pancreática. Disbiose da microbiota intestinal desencadeia processos inflamatórios. O tecido adiposo pode produzir adiponectina e citocinas inflamatórias, que ativam vias de sinalização envolvidas na transdiferenciação, proliferação e sobrevivência de células pancreáticas cancerosas. Fonte: (EIBL; ROZENGURT, 2021).

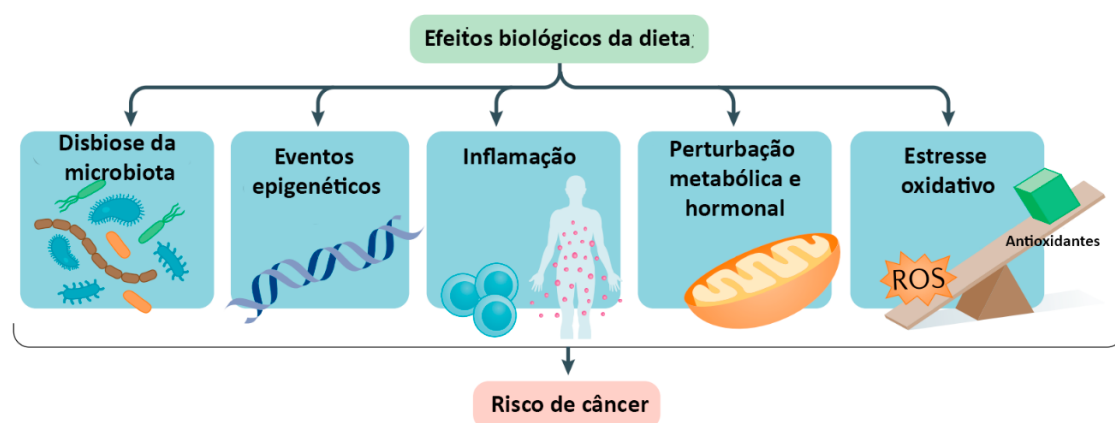
#### 1.4 Dieta no câncer

Dentre os fatores de risco modificáveis associados ao câncer, destacam-se hábitos alimentares. De acordo com o relatório do Instituto Americano de Pesquisa do Câncer e Fundo Mundial de Pesquisa do Câncer (1997), 30% a 40% de todos os cânceres podem ser prevenidos através da manutenção de um índice de massa corporal adequado, atividade física regular e hábitos alimentares adequados. A dieta pode influenciar o desenvolvimento tumoral de diversas formas, incluindo disbiose da microbiota intestinal, eventos epigenéticos adversos, inflamação, distúrbios hormonais e metabólicos assim como para o balanço oxidativo (Figura 10). O efeito da dieta pode ser mais ou menos significativo para o risco de carcinogênese a depender do tipo e órgão de origem do tumor (DONALDSON, 2004). Dietas saudáveis estão associadas a menor risco de desenvolvimento de câncer de pâncreas, enquanto dietas ocidentais, com maior potencial obesogênico, favorecem a carcinogênese (STECK; MURPHY, 2020).

A dieta pode influenciar a saúde e o risco de desenvolvimento de câncer por diversos mecanismos. O consumo de alimentos afeta a disponibilidade de nutrientes para a microbiota do trato digestivo, de modo a afetar a diversidade microbiana e a homeostasia do organismo. Por exemplo, a alteração da proporção de bactérias



pertencentes aos filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes* estão associadas a diversas doenças incluindo tumores (AN; KWON; KIM, 2023). Além disso, influencia o padrão de metilação de genes oncogênicos e na regulação do estado da cromatina (AÇAR; AKBULUT, 2023). Paralelamente, a dieta é essencial para ação imunológica, inflamação e resolução da inflamação, por exemplo, por meio da produção dos eicosanoides (CALDER, 2015). Ademais, a dieta pode induzir hiperinsulinemia e resistência insulínica além de modular a sinalização de adiponectinas oriundas do tecido adiposo (KLIMCAKOVA et al., 2010; STECK; MURPHY, 2020). Por fim, pode contribuir com moléculas antioxidantes que afetam o balanço oxidativo do corpo (TERAO, 2023; YANG et al., 2013).



**Figura 10 - Efeitos biológicos da dieta na carcinogênese.** A dieta influencia a composição da microbiota intestinal, pode afetar a expressão gênica por meio da metilação do DNA e a modificação da cromatina. Além disso, modula a imunidade, a inflamação, e pode causar também alterações hormonais e metabólicas. Ademais, fornece moléculas antioxidantes, que afetam o balanço oxidativo do organismo. Fonte: (STECK; MURPHY, 2020).

Dentre os tipos de dietas, a dieta ocidental, caracterizada pelo elevado consumo de ultraprocessados, açúcares e lipídeos, está associada a efeitos deletérios à saúde. A dieta de cafeteria, baseada em ultraprocessados, está associada à indução da obesidade e à piora no prognóstico tumoral (PASQUARELLI, 2023; ZEENI et al., 2015). Os lipídeos são uma classe de macromoléculas envolvidas tanto em processos fisiológicos quanto patológicos (SANTOS; SCHULZE, 2012). Dietas com alto teor de lipídeos saturados, conhecidas como *high fat diet* (HFD), estão associadas à carcinogênese e à progressão tumoral do adenocarcinoma pancreático em camundongos (BIRT et al., 2011). A HFD causa inflamação sustentada e autofagia, que aumentam a incidência e a progressão de PanIN (CHANG et al., 2017). Além disso, a HFD também pode aumentar o crescimento

tumoral, induzir angiogênese e conferir proteção contra morte apoptótica (GARCIA et al., 2021).

Em contrapartida, a dieta mediterrânea é considerada uma das mais saudáveis. Nessa dieta, são incentivados o consumo de alimentos vegetais, como legumes, frutas e grãos, assim como o consumo frequente de peixes, ao passo que, laticínios são consumidos moderadamente e a carne vermelha é consumida em pouca quantidade (Figura 11). O consumo de álcool, assim como o de outras fontes de ácidos graxos, como o azeite de oliva, é um dos aspectos mais variados entre os praticantes da dieta mediterrânea. Essa diversidade, juntamente com outras variações metodológicas nas pesquisas, dificulta a avaliação precisa do impacto dessa dieta e destaca a necessidade de estudos adicionais sobre o tema (GALBETE et al., 2018).



**Figura 11 - Componentes da dieta mediterrânea.** Pirâmide alimentar que representa os principais componentes da dieta mediterrânea. Adaptado de (OLDWAYS, 2009).

A dieta mediterrânea está associada a bons indicadores no contexto da prevenção de doenças. O *Mediterranean diet score* (MDS) é um dos principais índices utilizados para avaliar a adesão à dieta mediterrânea em pesquisas (TRICHOPOULOU et al., 2003). A alta conformidade com o índice MDS está associada a um menor risco de carcinogênese de neoplasias, incluindo o câncer de pâncreas (STECK; MURPHY, 2020).

### **1.5 Ácido palmítico**

O ácido palmítico (PA) é um ácido graxo saturado de dezesseis carbonos, que é encontrado comumente em gorduras, óleos sendo também o ácido graxo mais abundante no corpo humano (CARTA et al., 2017). A principal fonte do PA é o óleo de palma, que é amplamente utilizado na produção de alimentos ultraprocessados por melhorar a fragrância e palatabilidade de produtos, de forma a estar presente nesses em altas quantidades (KADANDALE; MARTEN; SMITH, 2019). O ácido palmítico está associado à fisiopatologia de diversas patologias, dentre elas, doenças metabólicas, neuronais, tumorais, inflamatórias e cardiovasculares (MANCINI et al., 2015). O Óleo de palma também modula a microbiota, diminuindo a diversidade residente, além de promover ganho de peso e acúmulo de gordura em órgãos como o fígado (MANCINI et al., 2015). A concentração sanguínea de ácido palmítico costuma estar elevada em pacientes com obesidade, condição que aumenta a predisposição a diferentes tipos de câncer e piora o prognóstico de sobrevida de pacientes com cânceres, dentre eles, os adenocarcinomas pancreáticos (AVGERINOS et al., 2019; ZHOU; URSO; JADEJA, 2020).

O PA poder participar modificação pós-traducional de proteínas. A palmitoilação é uma modificação reversível, na qual ocorre a tioesterificação de uma molécula de palmitato a um resíduo de cisteína. Essa modificação afeta o endereçamento e hidrofobicidade da proteína, de modo que, o PA essencial para diversos processos fisiológicos (KO; DIXON, 2018). Um exemplo disso é a proteína do Sarcoma de Rato (RAS), que atua como um interruptor molecular capaz de ativar as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e necessita dessa modificação pós-traducional para exercer sua função (BUSQUETS-HERNÁNDEZ; TRIOLA, 2021). A palmitoilação é uma modificação importante para a ancoragem das proteínas transmembrânicas da família RAS, como a KRAS, à membrana plasmática, sendo um possível alvo molecular no contexto de cânceres, incluindo o adenocarcinoma pancreático (FATIMA et al., 2019).

Ácidos graxos de cadeia longa, como o ácido palmítico, podem ser metabolizados nos peroxissomos e, quando acumulados podem gerar espécies reativas (ERs) que, por sua vez, causam estresse celular ou indução de morte apoptótica (FATIMA et al., 2019; GEHRMANN; ELSNER; LENZEN, 2010; MANGALI et al., 2019).

O ácido palmítico pode causar outros efeitos a depender do tipo celular e da sua condição, sendo cancerosa ou não. Entre esses efeitos, destaca-se a ativação do inflamassoma em macrófagos e em outras células (DONG et al., 2020; KORBECKI; BAJDAK-RUSINEK, 2019; MANGALI et al., 2019). O inflamassoma é um complexo proteico importante para a produção de moléculas pró-inflamatórias e também para o processo de morte celular denominado piroptose (YU et al., 2021). Nesse contexto, o PA leva a ativação do Receptor Semelhante a Toll 4, do inglês toll-like receptor 4 (TLR4), e na translocação do NFκB para o núcleo, onde desencadeia a produção e montagem de proteínas do inflamassoma, que necessita de um segundo sinal para sua ativação (YU et al., 2021).

O acúmulo de PA em adipócitos promove alterações que impactam o microambiente tumoral, por meio da ativação de vias como a do Fator nuclear kappa B (NFκB) e das MAPKs, além de aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias como o Fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e interleucina-10 (IL-10) e na diminuição da secreção de adiponectina (KENNEDY et al., 2009).

O acúmulo de ácidos graxos também pode resultar na produção de ERs, que podem ativar o inflamassoma. As ERs podem atuar como um dos possíveis segundos sinais que ativam o inflamassoma, o que resulta na formação de poros na membrana celular e morte piroptótica; além da liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF-α e interleucina-6 (IL-6), caso não ocorra reparo na membrana plasmática da célula (FANG et al., 2020; JIMENEZ et al., 2014).

### **1.6 Ômega-3**

Os ácidos graxos de cadeia longa da família do ômega-3 possuem a primeira insaturação no terceiro carbono a partir da extremidade oposta à carboxila (PHILIP C. CALDER; YAQOOB, 2009). Os principais representantes do ômega-3, os mais estudados são: o ácido alfa-linolênico (ALA), precursor do ácido eicosapentaenoico (EPA) que por sua vez origina o ácido docosaexaenoico (DHA) (CHOLEWSKI; TOMCZYKOWA; TOMCZYK, 2018). O ALA é adquirido por humanos exclusivamente por meio do

consumo de produtos vegetais, e de peixes que acumulam esses ácidos graxos ao ingerir algas marinhas (DYALL, 2015; SIDDIQUI et al., 2004). Embora o ALA possa ser convertido em EPA e DHA, esse processo ocorre com baixa eficiência, de modo que, é recomendável o consumo de fontes primárias de DHA e EPA, como peixes (BARCELÓ-COBLIJN; MURPHY, 2009).

O ômega-3 exerce seus efeitos celulares por meio de diversos mecanismos, influenciando processos fisiológicos e patológicos. Os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) da família do ômega-3 são incorporados à membrana plasmática das células, modificando o conteúdo das balsas lipídicas e a fluidez da membrana, consequentemente, afetam a ancoragem e função de proteínas transmembranares, como o TLR4 e receptores hormonais (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2018; SIDDIQUI et al., 2004).

A metabolização de EPA e DHA na via dos eicosanoides leva à produção de leucotrienos da série 5 e prostaglandinas da série 3, com menor potencial inflamatório, além disso, compete com a metabolização dos ácidos graxos ômega-6, de modo a diminuir a síntese de prostaglandinas da série 2 e leucotrienos da série 4, com maior potencial inflamatório (KANG et al., 2008). A metabolização de EPA e DHA também resulta na produção de moléculas anti-inflamatórias e pró-resolutivas, chamadas protectinas, resolvinas e maresinas (CALDER, 2017). Ademais, DHA aumenta a expressão de enzimas antioxidantes em células saudáveis, de forma a contribuir para o seu efeito protetor (YANG et al., 2013).

Dessa forma, os PUFAs de ômega-3 apersentam potencial protetor no contexto de diversas doenças, incluindo metabólicas, cardiovasculares, neurodegenerativas, assim como, tumorais (ANIL, 2007; DYALL, 2015; FABIAN; KIMLER; HURSTING, 2015; HOLUB, 2009; NARAYAN; MIYASHITA; HOSAKAWA, 2006; PIZATO et al., 2018; SIDDIQUI et al., 2004; SPENCER et al., 2009). No contexto tumoral, o DHA e o EPA inibem a angiogênese em câncer pancreático (D'ELISEO et al., 2012). Ademais, DHA e EPA podem conferir proteção ao paciente no contexto de caquexia desse tumor, que está associada a um pior prognóstico e maior mortalidade (COLOMER et al., 2007; FREITAS; CAMPOS, 2019).

Além disso, pesquisas já demonstraram o potencial do DHA na prevenção da carcinogênese, principalmente devido à indução de apoptose em células tumorais (PARK; KIM, 2017; ROSE; CONNOLLY, 1999; SIDDIQUI et al., 2004). Ademais, também é

demonstrado que pode induzir piroptose em câncer de mama (PIZATO et al., 2018). Os mecanismos pelos quais esses ácidos graxos induzem apoptose incluem o estresse oxidativo resultante da peroxidação lipídica, aprisionamento do ciclo celular e a inibição de vias importantes para a progressão tumoral, como as vias PI3K/AKT/mTHOR, Janus Kinase-transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição (JAK-STAT), Wnt/ $\beta$ -catenina e MAPKs (D'ELISEO; VELOTTI, 2016; NEWELL et al., 2017; SUN et al., 2011).

Por fim, o ômega-3 é descrito na literatura como uma molécula com potencial para uso adjuvante em terapias. Estudos pré-clínicos foi demonstrado que além da redução da ocorrência de eventos adversos, o ômega-3 aumentou a ação antitumoral da rapamicina no contexto do câncer de mama (ZHU et al., 2018). A suplementação com ômega-3 em pacientes reduziu a ocorrência de toxicidades associadas ao uso dos quimioterápicos docetaxel, cisplatina e 5-fluorouracil utilizados em conjunto no tratamento do câncer de esôfago (MIYATA et al., 2017). Entretanto, a análise clínica da eficácia do ômega-3 como molécula adjuvante apresenta resultados contraditórios sobre parâmetros como qualidade de vida, proteção contra efeitos adversos, e prevenção contra caquexia (FREITAS; CAMPOS, 2019; SILVA; FABRE; WAITZBERG, 2015).

### **1.7 Corpúsculo lipídico e câncer**

Os ácidos graxos podem se acumular nos corpúsculos lipídicos (CLs) de diversos tipos de células, como adipócitos, células imunológicas e células tumorais. Os CLs são organelas com diversas funções fisiológicas, incluindo armazenamento energético, regulação do metabolismo lipídico, produção de citocinas e adipocinas, além de mediar a síntese de eicosanoides, importantes no contexto da inflamação e na sua resolução (CRUZ et al., 2020; DUCHARME; BICKEL, 2008; ZADOORIAN; DU; YANG, 2023). Os CLs se formam a partir da membrana do retículo endoplasmático, de modo que, podem permanecer conectados à membrana, ou serem liberados e interagir com outras organelas citoplasmáticas, como mitocôndrias, citoesqueleto, peroxissomos e lisossomos (OLZMANN; CARVALHO, 2019). No contexto tumoral, CLs estão associados a diversos *hallmarks* do câncer, de forma que sua importância é emergente (Figura 12). No contexto do ADP, os CLs estão associados a maior motilidade, potencial invasivo e quimiorresistência (LIN et al., 2024; ROZEVELD et al., 2020).



**Figura 12 - Papel do corpúsculo lipídico em *hallmarks* tumorais.** O papel dos CLs no contexto tumoral possui um destaque emergente, de modo que, é associado à modulação de parâmetros carcinogênicos. Essa organela participa do metabolismo energético, é um sítio de síntese de eicosanóides, de forma que também modula a inflamação e a comunicação celular entre diferentes tipos celulares do microambiente tumoral. Ademais, pode participar da transdiferenciação de células e sequestrar moléculas com potencial terapêutico, podendo interferir na eficácia dos tratamentos antineoplásicos. Fonte: (CRUZ et al., 2020).

## 2. JUSTIFICATIVA

O adenocarcinoma pancreático (ADP) corresponde a aproximadamente 90% das neoplasias pancreáticas, sendo a mais letal delas. A taxa de sobrevivência em cinco anos é de menos de 10% e estima-se que ocorra cerca de 460 mil óbitos anuais no mundo. O ADP se desenvolve a partir do acúmulo de mutações em proto-oncogenes de células epiteliais pancreáticas. A alta taxa de mortalidade do ADP se deve, principalmente, à baixa eficácia dos tratamentos não cirúrgicos e aos sintomas inespecíficos que dificultam o diagnóstico precoce. Nesse contexto, a prevenção e tratamento precoce são as melhores alternativas para reduzir o impacto da doença na população, ressaltando a necessidade da busca por moléculas com potencial preventivo, terapêutico e de atenuação de efeitos colaterais de outros tratamentos disponíveis.

Nesse contexto, a dieta se destaca entre os fatores de risco para o desenvolvimento do adenocarcinoma pancreático. A alimentação é um dos principais fatores modificáveis para diminuição do risco do desenvolvimento de tumores. A dieta influencia na composição da microbiota intestinal, bem como no estado inflamatório, metabólico, hormonal e oxidativo do organismo. Dietas saudáveis estão associadas a uma menor chance de desenvolvimento do câncer de pâncreas, enquanto dietas ocidentais, mais obesogênicas estão associadas a uma maior incidência da doença.

Dentre as causas da obesidade, destaca-se o consumo de alimentos ultraprocessados, que frequentemente contêm altas quantidades de ácido palmítico. O ácido palmítico (PA) é o ácido graxo saturado encontrado em maior quantidade no corpo humano. As principais fontes desse ácido graxo são a ingestão de óleo de palma, carnes vermelhas e laticínios, além da síntese endógena por meio da enzima ácido graxo sintase. O PA é relevante para processos fisiológicos e patológicos, estando associado a doenças inflamatórias, metabólicas e também tumorais. Além disso, participa da modificação pós-traducional de proteínas como a proteína do Sarcoma de Rato RAS, uma das proteínas mais relevantes e mais comumente mutadas em cânceres, sendo necessário para sua função. O ácido palmítico causa efeitos variados a depender da célula na qual é absorvido. Em células tumorais, esse ácido graxo pode induzir morte apoptótica por indução de espécies reativas e estresse ao retículo endoplasmático. Entretanto, ácidos graxos também podem ser armazenados no corpúsculo lipídico e utilizados como reserva energética para o tumor, de forma que esse acúmulo está associado a resistência a quimioterapia e formação de metástases em diversos tipos tumorais.



Outros ácidos graxos importantes são os ômega-3, que são uma família de ácidos graxos poli-insaturados, obtidos por meio da ingestão de óleo de peixe e fontes vegetais como linhaça. Essa família é explorada na literatura científica no contexto da prevenção e tratamento de diversos tipos de doenças, dentre elas, os cânceres. O ácido docosaexaenoico (DHA) é um dos principais representantes da família ômega-3, juntamente com o ácido eicosapentaenoico e o alfa-linolênico. É descrito que o DHA pode ser metabolizado na via dos eicosanoides, originando moléculas anti-inflamatórias e de resolução da inflamação, como protectinas, resolvinas e maresinas; além disso, resulta na expressão de enzimas antioxidantes por meio do fator nuclear derivado de eritróide 2 (Nrf2).

Em contrapartida à proteção de células saudáveis, o ômega-3 exerce um efeito citotóxico em neoplasias. É demonstrado que, a depender do tipo tumoral, o DHA pode gerar estresse celular e induzir morte apoptótica ou piroptótica. Ademais, pode inibir a proliferação e a angiogênese tumoral, além de conferir proteção contra efeitos colaterais de quimioterápicos e o processo de caquexia.

No contexto do ADP, já foi demonstrado que o PA aumenta o potencial invasivo na linhagem AsPC-1 (BINKER-COSEN et al., 2017). Em contrapartida, o DHA é uma molécula indutora de apoptose em células de câncer de pâncreas (ZHANG et al., 2007). Entretanto, os efeitos desses ácidos graxos no câncer de pâncreas ainda não estão completamente elucidados na literatura. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar e caracterizar os efeitos do ácido palmítico e ácido docosaexaenoico na modulação de parâmetros carcinogênicos de células de câncer de pâncreas humano MIA PaCa-2 *in vitro*.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar a modulação de parâmetros carcinogênicos e do metabolismo lipídico em células de câncer pancreático humano estimuladas com ácidos graxos ácido palmítico ou ácido docosaexaenoico.

#### **3.2 Objetivo específico**

- Verificar o papel diferencial do ácido palmítico (PA) e do ácido docosaexaenoico (DHA), sobre os seguintes parâmetros de células de adenocarcinoma pancreático humano, por meio de análises in vitro, considerando:
  - A morte celular por apoptose ou morte lítica;
  - A formação de poros na membrana celular;
  - A modulação do perfil inflamatório pela secreção de citocinas;
  - A proliferação celular tumoral;
  - A produção de espécies reativas de oxigênio;
  - A viabilidade mitocondrial;
  - A biogênese de corpúsculos lipídicos.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1 Cultivo celular**

A linhagem de células de adenocarcinoma ductal pancreático humana MIA PaCa-2 (“MIA PaCa-2 - CRL-1420| ATCC”) foi cultivada em meio DMEM (meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco’s) (GIBCO) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (GIBCO) e 1% de Penicilina/Estreptomicina (GIBCO) e mantida em estufa úmida a 37 °C (graus Celsius) com uma atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> (Dióxido de carbono). Para garantir a ausência de contaminação por Mycoplasma, as células foram tratadas com o kit BM Cyclin (Sigma) e o número máximo de passagens para os experimentos foi 6.

### **4.2 Estímulos com ácidos graxos**

Os ácidos graxos ácido palmítico e ácido docosaexaenoico (Sigma-Aldrich) foram reconstituídos em etanol puro, nas concentrações de 100mM e 40mM, respectivamente. A concentração estoque foi determinada a fim de se obter uma concentração final de veículo (etanol), igual ou inferior a 2% do volume final do meio de cultura evitando efeitos citotóxicos às células.

A partir dos respectivos estoques, foram realizadas diluições em meio de cultura suplementado com 10% SFB para obter as concentrações finais de ácido palmítico: 50 µM e 200 µM e de ácido docosaexaenoico: 25 µM, 50 µM. Antes do estímulo, as soluções foram submetidas a banho ultrassônico por 10 minutos à temperatura ambiente para melhorar a solubilização dos ácidos graxos no meio de cultura. Após os preparos das diluições e banho ultrassônico, as células MIA PaCa-2 foram estimuladas e mantidas a 37 °C em uma atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> pelos tempos estabelecidos em cada abordagem experimental.

### **4.3 Análise de viabilidade mitocondrial**

A análise da viabilidade mitocondrial das células MIA PaCa-2 estimuladas com ácidos graxos foi realizada a partir do ensaio com MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltetrazolio brometo) (Thermo Fisher). Esse ensaio colorimétrico baseia-se na redução do MTT por enzimas mitocondriais, formando cristais de formazan de coloração roxa. As células foram semeadas em placas de 96 poços em uma densidade de 5x10<sup>3</sup> células por poço. No dia seguinte, as células foram estimuladas com as concentrações de ácido docosaexaenoico: 25 µM, 50 µM; e de ácido palmítico: 50 µM e 200 µM; por 24,

48 e 72 horas. Após o período de estímulo as células foram expostas à uma solução de MTT a 10% (v/v) em meio de cultura sem SFB. As células foram incubadas em estufa a 37 °C, protegidas da luz, numa atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> por 40 minutos. O sobrenadante foi descartado e os cristais de formazan foram dissolvidos utilizando-se 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). A leitura da absorbância foi realizada em 570 nm utilizando espectrofotômetro (Spectramax M3, Molecular Devices). A análise dos dados foi realizada utilizando o software GraphPad Prism, considerando a média do valor de absorbância da condição não estimulada como 100% de viabilidade e analisando os outros grupos de forma proporcional por análise de variância (ANOVA). O controle experimental foi obtido expondo as células ao agente citotóxico DMSO.

As imagens representativas do fenômeno foram adquiridas por microscopia de luz. As células foram semeadas em placas de 24 poços contendo lamínulas de 13 mm em uma densidade de  $2 \times 10^4$  células por poço. No dia seguinte, as células foram estimuladas por 24, 48 e 72 horas com ácido palmítico (50 µM ou 200 µM) ou ácido docosaenoico (25 µM ou 50 µM). Após o estímulo, as células foram fixadas em solução de formalina 3,7% por 10 minutos na estufa a 37 °C. Após a etapa de fixação, as células foram lavadas com PBS 1X sob agitação leve na gangorra. As células foram lavadas com água destilada por três vezes e as lamínulas foram montadas em lâminas com meio de montagem (Agilent Technologies) e as imagens foram adquiridas com microscópio de luz (ZEISS) utilizando o software Zen.

#### **4.4 Análise de perfil de morte celular**

A análise do perfil de morte celular das células MIA PaCa-2 foi realizada a partir da marcação das células pelos agentes fluorescentes Anexina V-FITC e Iodeto de propídio (PI) (QuatroG Biotecnologia). Essa análise baseia-se no fato de que a Anexina V é uma proteína que se liga a fosfolipídeos e possui alta afinidade pela fosfatidilserina, que é externalizada em células apoptóticas, permitindo a ligação e emitindo fluorescência. Ao passo que o PI é um agente intercalante e impermeável a membrana, o que impede a ligação ao material genético de células que matem a integridade da membrana. Nesse sentido, em vias de morte não-apoptóticas ou de necrose secundária, onde ocorre dano a membrana plasmática, é possível observar a dupla marcação dos agentes fluorescentes. As células MIA PaCa-2 foram semeadas em placas de cultivo celular de 12 poços (n=1) com densidade celular de  $1 \times 10^5$  células por poço. No dia seguinte, as células foram estimuladas com 50 µM e 200 µM de ácido palmítico ou 25 µM e 50 µM de ácido

docosaexaenoico, nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Após os tempos de estímulo, as células foram coletadas e lavadas duas vezes com PBS 1X e centrifugadas a 1800 rpm, por 5 minutos a 4 °C. As células foram então ressuspensas em 100 µL de tampão de ligação 1X (10 mM de HEPES/NaOH pH 7,4 140 mM de NaCl e 2,5 mM de CaCl<sub>2</sub>), 2 µL de Anexina V-FITC e 2 µL de iodeto de propídio e incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente ao abrigo de luz. Após essa etapa, as células foram lavadas uma vez com PBS 1X, ressuspensas em 400 µL de tampão de ligação 1X e imediatamente analisadas em citômetro de fluxo (FACS VERSE, BD Biosciences) utilizando os canais FITC e PE, ambos em escala exponencial. Como controle experimental foram utilizadas células aquecidas à 100 °C por 10 minutos. Os dados obtidos foram analisados utilizando o software FlowJo V10 (Tree Star Inc).

#### **4.5 Análise da formação de poros na membrana plasmática**

A análise de formação de poros na membrana plasmática das células MIA PaCa-2 estimuladas com ácidos graxos foi realizada a partir do ensaio de captação Iodeto de propídio (PI) (Sigma-Aldrich) ao longo de análise cinética durante 8 horas. Essa análise baseia-se no fato de que o PI é internalizado nas células após danos na membrana plasmática, e a emissão de fluorescência detectada é um indicativo de ligação a ácidos nucleicos devido a captação do PI por poros. As células foram semeadas em placas de 96 poços de fundo transparente e paredes pretas em uma densidade de  $1 \times 10^4$  células por poço. No dia seguinte, as células foram estimuladas com as concentrações 50 µM e 200 µM de ácido palmítico ou 25 µM e 50 µM de ácido docosaexaenoico, ambos diluídos em meio DMEM sem vermelho de fenol, contendo 6 µg/mL de PI e tampão HEPES (4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanossulfonato). Em seguida, as células foram submetidas às leituras de fluorescência no espectrofotômetro (Spectramax M3, Molecular Devices) por 8 horas em intervalos de 1 hora entre as leituras, ao abrigo da luz e em cabine a 37 °C. A fluorescência foi analisada utilizando os comprimentos de onda de excitação de 538 nm e de 617 nm de emissão. Os dados obtidos foram analisados utilizando o software GraphPad Prism. Para validar a maquinaria de indução de poros, as células foram tratadas com 1 µg/mL de LPS por 24 horas, representando o primeiro sinal de ativação do inflamassoma NLRP3. Em seguida, adicionou-se 20 mM de nigericina por 2 horas como segundo sinal de ativação. Foram utilizadas duas condições experimentais: LS, na qual o LPS permaneceu presente durante o tratamento com nigericina, e SS, onde apenas a nigericina foi utilizada.

#### 4.6 Análise da liberação de LDH

A análise da liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) para o meio extracelular pelas células MIA PaCa-2 estimuladas com ácidos graxos foi realizada a partir da quantificação dessa enzima utilizando um kit comercial *CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay* (Invitrogen™). Trata-se de um ensaio colorimétrico que consiste no potencial da enzima LDH em converter o lactato em piruvato, reduzindo Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo oxidada (NAD<sup>+</sup>) a sua forma reduzida (NADH). Em seguida, o NADH transfere o hidrogênio para o sal de tetrazólio, gerando formazan. A quantidade de formazan formada é proporcional ao número de células mortas ou danificadas, indicando a liberação da LDH e a lise celular. As células foram semeadas em placas de 96 poços (n=3) em uma densidade de  $1 \times 10^4$  células por poço. No dia seguinte, as células foram estimuladas por 24, 48 e 72 horas com ácido palmítico (50  $\mu$ M ou 200  $\mu$ M) ou ácido docosaexaenoico (25  $\mu$ M ou 50  $\mu$ M). Após o tempo de estímulo, os sobrenadantes das células foram coletados e transferidos para uma nova placa, onde foi adicionado o coquetel de reação do *CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay* (Invitrogen™) de acordo com as recomendações do fabricante. Após o período de reação, foi adicionada uma solução de parada. Como controle do experimento foi utilizada uma solução de lise (Triton 0,5%). A leitura da absorbância foi realizada no comprimento de onda de 490 nm, utilizando espectrofotômetro (Spectramax M3, Molecular Devices). A análise dos dados foi realizada utilizando o software GraphPad Prism.

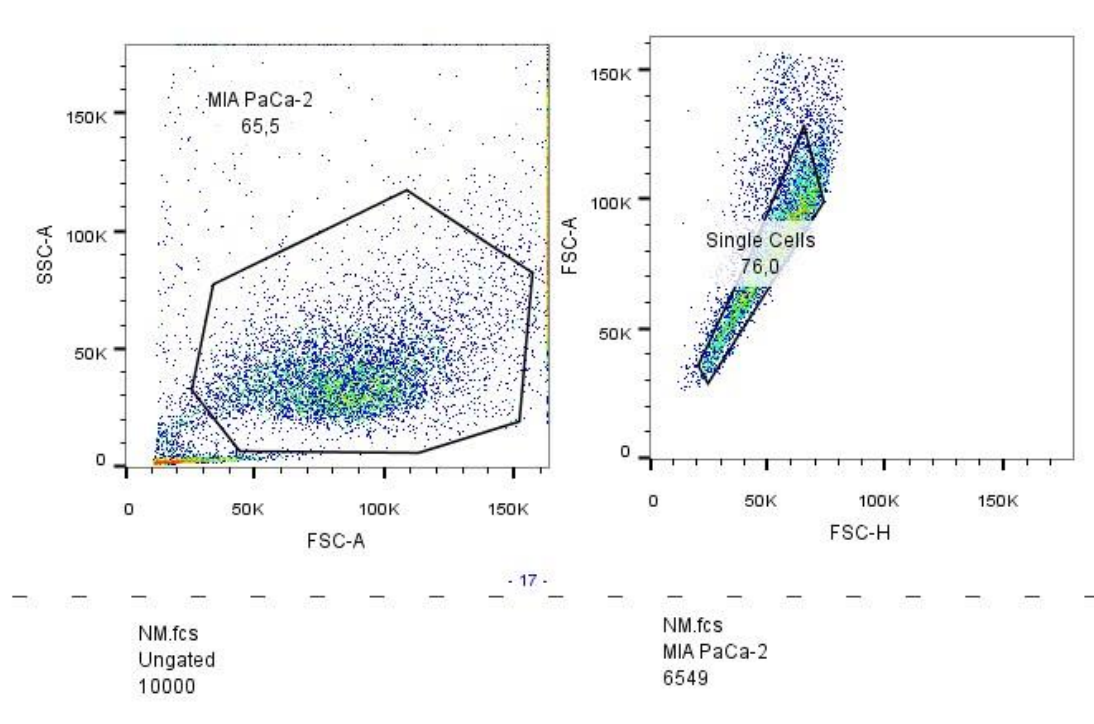
#### 4.7 Análise do perfil de secreção de citocinas

A análise do perfil de secreção das citocinas interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6) e Fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) pelas células MIA PaCa-2 estimuladas com ácidos graxos foi realizada a partir do ensaio de ELISA (ensaio imunoenzimático ligado a substrato, do inglês enzyme-Linked Immunosorbent Assay), utilizando Kits comerciais (BD Biosciences). As células foram semeadas em placas de 96 poços (n=3) em uma densidade de  $1 \times 10^4$  células por poço. No dia seguinte, as células foram estimuladas por 24 horas com ácido palmítico (50  $\mu$ M ou 200  $\mu$ M) ou ácido docosaexaenoico (25  $\mu$ M ou 50  $\mu$ M). Após o tempo de estímulo, os sobrenadantes das células foram coletados para dosagem das citocinas pelo método de ELISA de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras foram lidas no espectrofotômetro (Spectramax M3, Molecular Devices) no comprimento de onda de 450nm. Os níveis de

citocinas foram apresentados em níveis absolutos (pg/mL). Os dados obtidos foram analisados utilizando o software GraphPad Prism.

#### **4.8 Análise de proliferação celular**

A análise de proliferação celular das células MIA PaCa-2 estimuladas com ácidos graxos foi realizada a partir do ensaio com CFSE (Éster succinimidil de carboxifluoresceína). Esse composto permeável à membrana plasmática interage com aminas biogênicas citoplasmáticas e emitir fluorescência. Uma vez que a célula realiza o processo de divisão celular, as moléculas de CFSE são divididas entre as células filhas, reduzindo assim a fluorescência presente em cada célula gerada, nesse sentido, a intensidade de fluorescência detectada é inversamente proporcional a taxa proliferativa das células. As células MIA PaCa-2 foram semeadas em placas de cultivo celular de 12 poços (n=3) com densidade celular de  $2,5 \times 10^4$  células por poço. Antes da estimulação com os lipídeos, as células foram marcadas com a sonda CFSE (Thermo Fisher) na concentração de 5  $\mu$ M em PBS (Tampão fosfato-salino) e incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente, protegidas da luz. Após incubação, foi realizada a etapa de bloqueio por 5 minutos com SFB puro, seguida de duas lavagens com PBS 1x. Após a lavagem, as células foram estimuladas com 50  $\mu$ M ou 200  $\mu$ M de ácido palmítico e 25  $\mu$ M ou 50  $\mu$ M de ácido docosaenoico por 24, 48 e 72 horas. Após os estímulos, as células foram então coletadas, lavadas com PBS 1X e centrifugadas a 1800 rpm, a 4 °C por 5 minutos. Em seguida, foram fixadas em 400  $\mu$ L de PFA (paraformaldeído) 1X. As células foram analisadas em citômetro de fluxo (Accuri C6) no canal FITC (Isotiocianato de fluoresceína), em escala exponencial, utilizando estratégia de gate (Figura 13). A análise dos dados realizada utilizando o software GraphPad Prism, considerando a média do valor de absorbância da condição não estimulada como capacidade proliferativa basal (100%). Os outros grupos foram analisados de forma proporcional por ANOVA.



**Figura 13 - Estratégia de gate em citometria de fluxo para seleção de células viáveis e singlets para análises.**

#### 4.9 Análise da geração de espécies reativas de oxigênio

A análise de geração de espécies reativas (ERs) das células MIA PaCa-2 estimuladas com ácidos graxos foi realizada a partir da marcação com a sonda DCF-DA (diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína) (Sigma-Aldrich), avaliando-se a fluorescência de forma cinética de 0 a 6 horas e também de forma pontual no tempo de 24 horas. O DCF-DA é uma sonda fluorogênica para medir o estresse oxidativo, que é permeável às células e não apresenta fluorescência quando no estado reduzido, mas emite fluorescência fotoestável verde brilhante após oxidação por espécies reativas.

Para a análise cinética da geração de espécies reativas, as células foram semeadas em placas de 96 poços de fundo transparente e paredes pretas em uma densidade de  $1 \times 10^4$  células por poço. No dia seguinte, as células foram expostas ao DCF-DA na concentração de  $4 \mu\text{M}$  por 45 minutos. Em seguida, as células foram lavadas com PBS 1X três vezes e estimuladas com as concentrações  $50 \mu\text{M}$  e  $200 \mu\text{M}$  de ácido palmítico; e  $25 \mu\text{M}$ ,  $50 \mu\text{M}$  de ácido docosaenoico diluídas em DMEM sem vermelho de fenol, contendo tampão HEPES, e imediatamente submetidas às leituras de fluorescência no espectrofotômetro (Spectramax M3, Molecular Devices) por 6 horas com intervalos de 30 minutos entre as leituras, ao abrigo da luz e em cabine a  $37^\circ\text{C}$ . O peróxido de hidrogênio na concentração



de 600 $\mu$ M foi utilizado como controle positivo do experimento. A fluorescência foi analisada utilizando os comprimentos de onda de excitação de 485 nm e de 535 nm de emissão. Os dados obtidos foram analisados utilizando o software GraphPad Prism.

Para a análise pontual por citometria de fluxo, as células MIA PaCa-2 foram semeadas em placas de 24 poços em uma densidade de  $5 \times 10^4$  células por poço. No dia seguinte, as células foram estimuladas com ácido palmítico (50  $\mu$ M ou 200  $\mu$ M) ou com ácido docosaexaenoico (25  $\mu$ M ou 50  $\mu$ M). Após 24 horas, os poços foram lavados duas vezes com PBS 1X. Em seguida, as células foram marcadas com DCF-DA na concentração de 4  $\mu$ M. Em sequência, as células foram coletadas utilizando tripsina e centrifugadas, lavadas com PBS 1X e centrifugadas novamente. Por fim, foram diluídas em PBS 1x e adquiridas por citometria de fluxo (Accuri C6) no canal FITC (Isotiocianato de fluoresceína) em escala exponencial, aplicando estratégia de gate. Os dados foram analisados utilizando o software FlowJo V10 (Tree Star Inc).

#### **4.10 Análise de viabilidade mitocondrial na presença de NAC.**

A análise da viabilidade mitocondrial das células MIA PaCa-2 estimuladas com ácidos graxos na presença ou não de N-acetilcisteína (NAC) (Sigma) foi realizada a partir do ensaio com MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltetrazolio brometo) (Thermo Fisher). As células foram semeadas em placas de 96 poços em uma densidade de  $5 \times 10^3$  células por poço. No dia seguinte as células foram estimuladas com as concentrações de ácido docosaexaenoico: 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M; assim como foi utilizado as condições 25  $\mu$ M e 50  $\mu$ M de ácido docosaexaenoico em conjunto com 4 mM de N-acetilcisteína (NAC). Após os tempos de estímulo de 24, 48 e 72 horas, as células foram expostas à uma solução de MTT a 10%(v/v) em meio de cultura sem SFB. Em seguida, as células foram incubadas em estufa a 37 °C, protegidas da luz, numa atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> por 40 minutos. Após a incubação, o sobrenadante foi descartado e os cristais de formazan foram dissolvidos utilizando-se 100  $\mu$ L de dimetilsulfóxido (DMSO). Por fim, a leitura da absorbância foi realizada em 570nm utilizando espectrofotômetro (Spectramax M3, Molecular Devices). A análise dos dados realizada utilizando o software GraphPad Prism, considerando a média do valor de absorbância da condição não estimulada como 100% de viabilidade e analisando os outros grupos de forma proporcional por análise de variância (ANOVA). O controle experimental foi obtido expondo as células ao agente citotóxico DMSO. Adicionalmente, imagens representativas do fenômeno foram

adquiridas utilizando câmera de um smartphone Motorola Edge 50 Fusion, com resolução de 50 MPs.

#### **4.11 Análise de abundância mitocondrial**

Para a análise de mitocôndrias das células MIA PaCa-2, foi realizada a marcação das células pela sonda fluorescente MitoTracker Red CMXRos (Invitrogen). Trata-se de uma sonda fluorescente que contém uma porção clorometil reativa ao tiol, que se difunde passivamente através da membrana plasmática e se acumula em mitocôndrias com potencial de membrana normal. As células foram semeadas em placas de 24 poços contendo lamínulas de 13 mm em uma densidade de  $2 \times 10^4$  células por poço. No dia seguinte, as células foram estimuladas por 24 horas com ácido palmítico (50  $\mu$ M ou 200  $\mu$ M) ou ácido docosaexaenoico (25  $\mu$ M ou 50  $\mu$ M). Após o tempo de estímulo, as células foram incubadas com a solução de MitoTracker Red CMXRos diluída em meio completo em uma concentração de 100 Nm e incubadas em estufa a 37 °C protegidas da luz, por 30 minutos. Após a marcação, as células foram lavadas três vezes com meio de cultura e fixadas em formalina 3,7% diluída em meio aquecido, na estufa a 37 °C, por 15 minutos. Após a fixação, as células foram lavadas três vezes com PBS 1X sob agitação leve na gangorra por 5 minutos cada. Em seguida, as células foram marcadas com DAPI diluído em PBS 1X na proporção de 1:5000 por 5 minutos em temperatura ambiente. As células foram lavadas em PBS 1X novamente por três vezes e as lamínulas foram montadas em lâminas utilizando meio de montagem anti fading (Agilent Technologies) e as imagens foram adquiridas com microscópio confocal de fluorescência a laser (Leica TCS SP5).

#### **4.12 Análise de biogênese de corpúsculos lipídicos**

A análise da biogênese de corpúsculos lipídicos das células MIA PaCa-2 estimuladas com ácidos graxos foi realizada a partir da marcação com a sonda BODIPY (Life Technologies) e com o corante lipofílico Oil Red O (Sigma-Aldrich). Foram realizadas análises de citometria de fluxo, microscopia confocal de fluorescência a laser e microscopia óptica. Os corantes apresentam a capacidade de se ligar a lipídios neutros, que se acumulam nessas organelas, desse modo é possível analisar de maneira quantitativa e qualitativa a biogênese de corpúsculos lipídicos.

Para análise por citometria de fluxo, as células MIA PaCa-2 foram semeadas em placas de 24 poços (n=3) em uma densidade de  $5 \times 10^4$  células por poço. No dia seguinte, as células foram estimuladas por 24, 48 e 72 horas com ácido palmítico (50  $\mu$ M ou 200  $\mu$ M) ou ácido docosaexaenoico (25  $\mu$ M ou 50  $\mu$ M). Após o tempo de estímulo, as células

foram incubadas com BODIPY diluído em PBS (1:3000) a 4 °C, protegidas da luz. Após a incubação, as células foram coletadas, lavadas duas vezes com PBS 1X e fixadas em 400 µL de paraformaldeído 1X. As amostras foram analisadas no citômetro de fluxo (Accuri C6) utilizando o canal FITC em escala exponencial e aplicando estratégia de gate. Os dados foram analisados utilizando o software FlowJo V10 (Tree Star Inc).

Para análise por microscopia confocal de fluorescência, as células foram semeadas em placas de 24 poços contendo lamínulas de 13mm em uma densidade de  $2 \times 10^4$  células por poço. No dia seguinte, as células foram estimuladas por 24, 48 e 72 horas com ácido palmítico (50 µM ou 200 µM) ou ácido docosaexaenoico (25 µM ou 50 µM). Após o tempo de estímulo, as células foram fixadas em formalina 3,7% diluída em meio aquecido, na estufa a 37° C, por 15 minutos. Após a fixação, as células foram lavadas três vezes com PBS 1X sob agitação leve na gangorra por 5 minutos cada. Em seguida, as células foram incubadas em solução de BODIPY diluído em PBS 1X em uma proporção de 1:300 por 30 minutos em temperatura ambiente. Após três lavagens com PBS 1X, as células foram marcadas com uma solução de DAPI diluído em PBS em uma proporção de 1:5000 por 5 minutos em temperatura ambiente. As células foram lavadas em PBS 1x novamente por três vezes e as lamínulas foram montadas em lâminas utilizando meio de montagem anti-fading (Agilent Technologies) e as imagens foram adquiridas utilizando microscópio confocal de fluorescência a laser (Leica TCS SP5).

Para análise por microscopia de luz, as células foram semeadas em placas de 24 poços contendo lamínulas de 13mm em uma densidade de  $2 \times 10^4$  células por poço. No dia seguinte, as células foram estimuladas por 24, 48 e 72 horas com ácido palmítico (50 µM ou 200 µM) ou ácido docosaexaenoico (25 µM ou 50 µM). Após o estímulo, as células foram fixadas em solução de formalina 3,7% por 10 minutos na estufa a 37°C. Após a etapa de fixação as células foram lavadas com PBS 1x sob agitação leve na gangorra. Em seguida as células foram expostas a 300 µL de propileno glicol (PG) puro por 2 minutos. Posteriormente, o excesso de PG foi retirado e as células foram incubadas em 300 µL da solução de Oil Red O 0,5% em PG por 10 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação as células foram lavadas com PG 80% (diluído em água destilada) uma vez e três com água destilada. Em seguida, as células foram coradas com hematoxilina 3% por 1 minuto. As células foram lavadas em água destilada novamente por três vezes e as lamínulas foram montadas em lâminas utilizando meio de montagem (Agilent Technologies) e as imagens foram adquiridas utilizando microscópio de luz (ZEISS) e o

software Zen. Adicionalmente, foi realizada a contagem manual do número de gotículas lipídicas de 50 células de cada condição avaliada utilizando imagens adquiridas percorrendo sistematicamente a lâmina, garantindo que cada campo fosse capturado apenas uma vez, evitando sobreposição de áreas analisadas e a contagem repetida de células. A análise dos dados foi realizada utilizando o software GraphPad Prism.

#### **4.13 Contagem do número de projeções celulares**

A análise do número de projeções celulares das células MIA PaCa-2 foi realizada a partir da coloração das células com o corante hematoxilina. Para análise por microscopia de luz, as células foram semeadas em placas de 24 poços contendo lamínulas de 13mm em uma densidade de  $2 \times 10^4$  células por poço. No dia seguinte, as células foram estimuladas por 24 e 72 horas com ácido palmítico (50  $\mu$ M ou 200  $\mu$ M) ou ácido docosaenoico (25  $\mu$ M ou 50  $\mu$ M). Após o estímulo, as células foram fixadas em solução de formalina 3,7% por 10 minutos na estufa a 37°C. Após a etapa de fixação as células foram lavadas com PBS 1x sob agitação leve na gangorra. Em seguida as células foram incubadas com 300  $\mu$ L de propileno glicol (PG) puro por 2 minutos. Posteriormente, o excesso de PG foi retirado e as células foram incubadas em 300  $\mu$ L da solução de Oil Red O 0,5% em PG por 10 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação as células foram lavadas com PG 80% (diluído em água destilada) uma vez e três com água destilada. Em seguida, as células foram coradas com hematoxilina 3% por 1 minuto. As células foram lavadas em água destilada novamente por três vezes e as lamínulas foram montadas em lâminas utilizando meio de montagem (Agilent Technologies) e as imagens foram adquiridas utilizando microscópio de luz (ZEISS) e o software Zen. Adicionalmente, foi realizada a contagem manual do número de projeções celulares de 50 células de cada condição avaliada utilizando imagens adquiridas percorrendo sistematicamente a lâmina, garantindo que cada campo fosse capturado apenas uma vez, evitando sobreposição de áreas analisadas e a contagem repetida de células. A análise dos dados foi realizada utilizando o software GraphPad Prism.

#### **4.14 Análise estatística e confecção de gráficos**

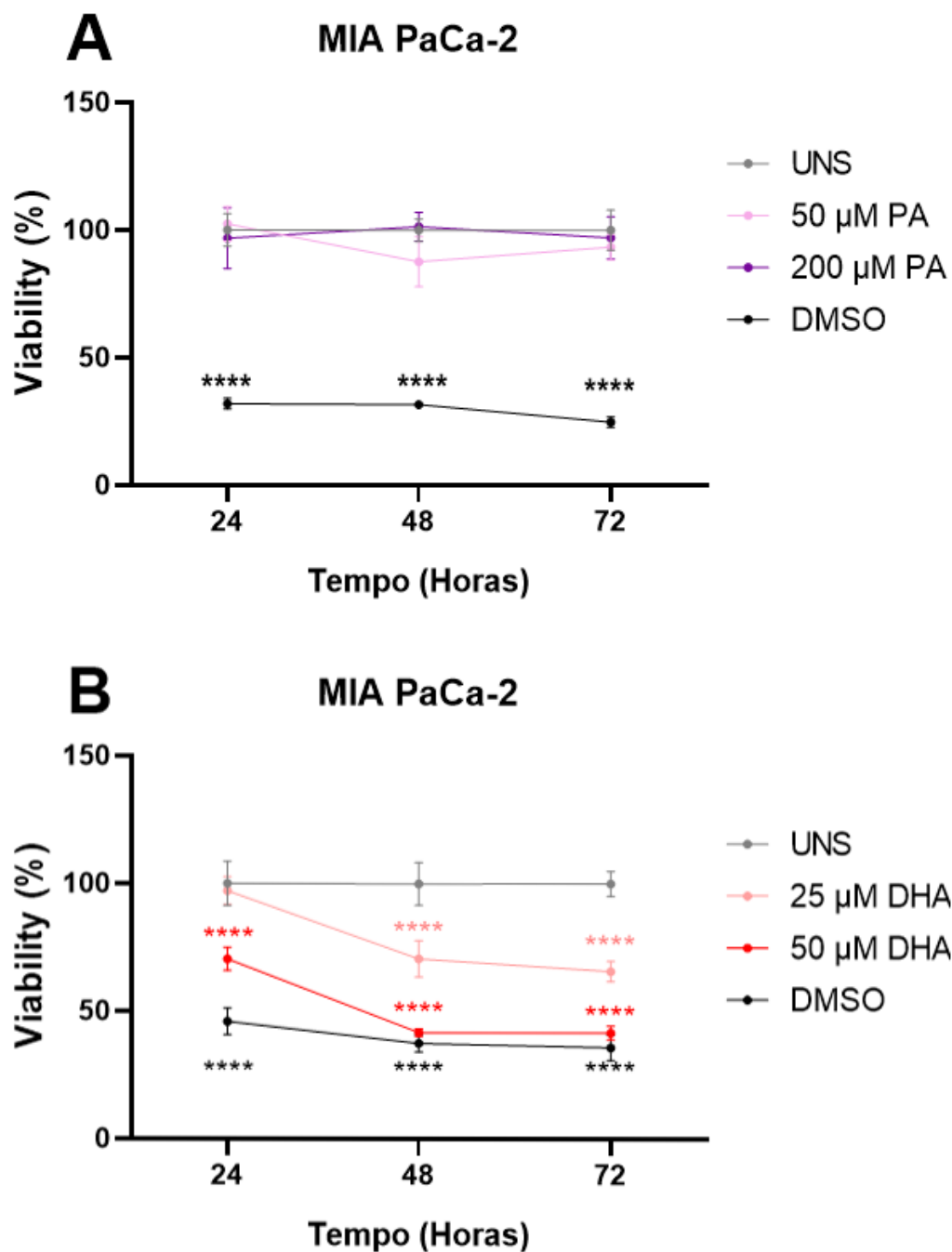
A fim de se determinar se os dados seguem distribuição normal, foi utilizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Os dados que se apresentaram distribuição normal (paramétricos) foram analisados utilizando o teste ANOVA. A montagem dos gráficos foi realizada utilizando GraphPad Prism 8.0.

## 5. RESULTADOS

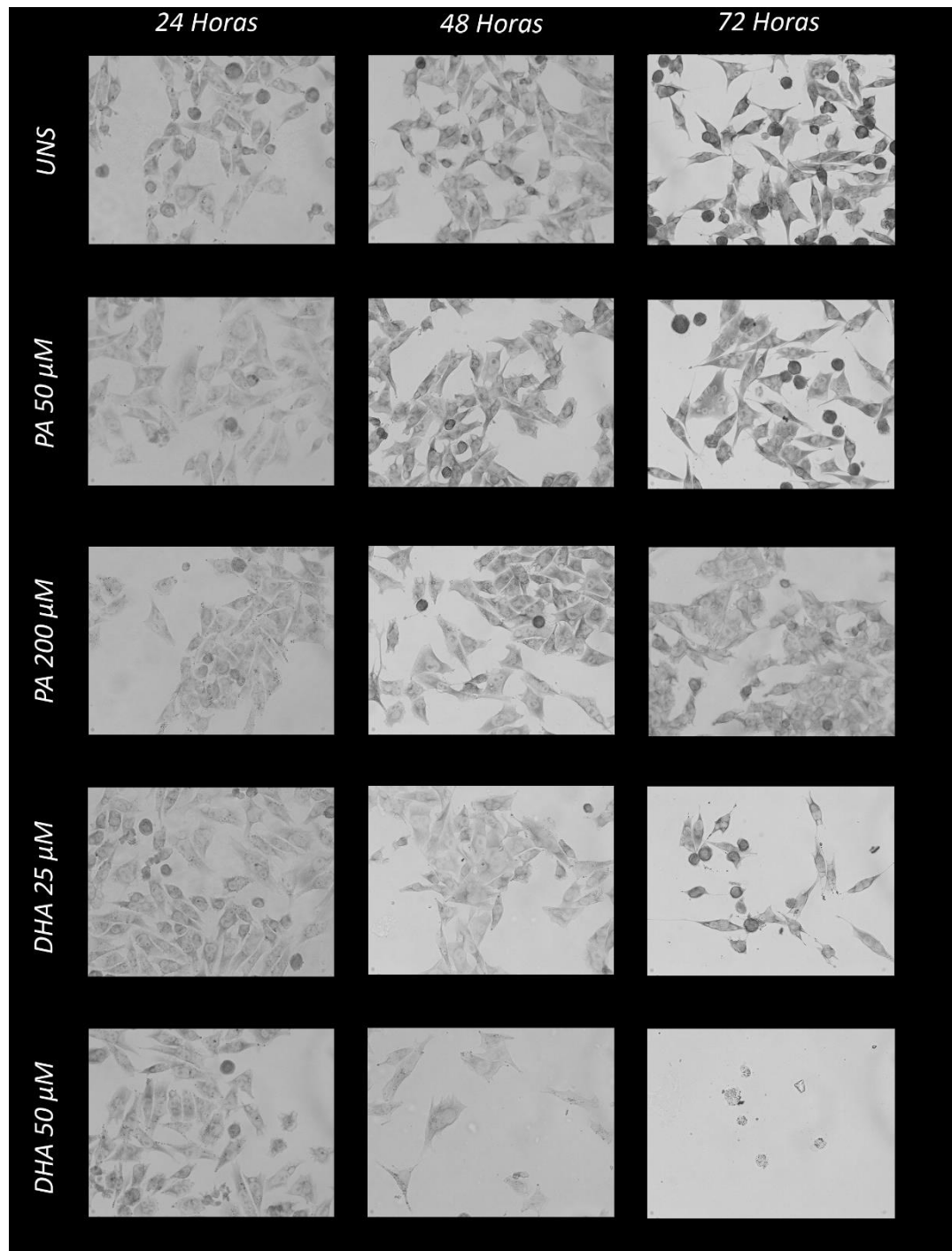
### **5.1 O ácido palmítico não afetou a viabilidade mitocondrial, enquanto o ácido docosaexaenoico reduziu essa viabilidade de forma dependente da dose e do tempo nas células MIA PaCa-2.**

De forma a mensurar o efeito dos ácidos graxos sobre a viabilidade mitocondrial das células MIA PaCa-2, foi utilizado o ensaio colorimétrico com MTT. Foram avaliadas as concentrações 50  $\mu$ M e 200  $\mu$ M de PA, além de 25  $\mu$ M e 50  $\mu$ M de DHA após 24h, 48h e 72h de estímulo.

Após 24 horas, o DHA reduziu de forma estatisticamente significativa a viabilidade mitocondrial das células MIA PaCa-2 na maior concentração de 50  $\mu$ M. Em tempos mais tardios de 48 e 72 horas as duas concentrações causaram redução de forma dose dependente (Figura 14 e 15).



**Figura 14 - Efeito do estímulo de ácido palmítico e ácido docosaexaenoico ao longo do tempo na viabilidade mitocondrial.** As células MIA PaCa-2 foram estimuladas nos tempos de 24, 48 e 72 horas com PA nas concentrações 50  $\mu$ M e 200  $\mu$ M (A) ou DHA nas concentrações 25  $\mu$ M e 50  $\mu$ M por 24h (B). Os resultados estão expressos em forma de média  $\pm$  desvio padrão (n=5), sendo a diferença estatística significativa representada (\*\*\*\*)  $p < 0,0001$  em relação ao não estimulado (UNS) indicado por One-way ANOVA.



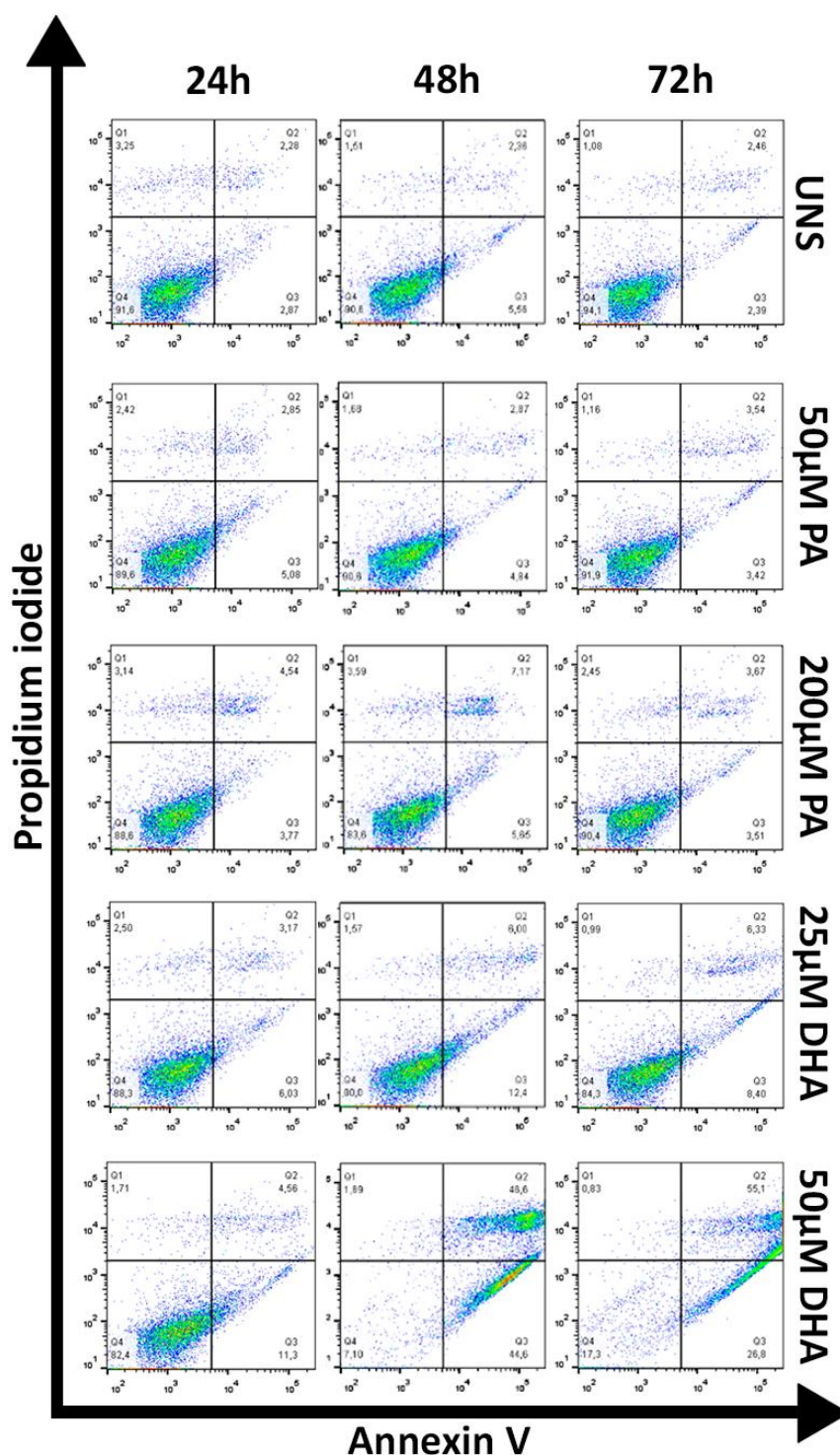
**Figura 15 - Prancha representativa do efeito do estímulo com ácido palmítico e ácido docosaexaenoico nas células MIA PaCa-2.** As células MIA PaCa-2 foram estimuladas com PA nas concentrações 50  $\mu$ M e 200  $\mu$ M ou DHA nas concentrações 25  $\mu$ M e 50  $\mu$ M por 24h, 48h e 72h. Após os tempos de estímulo, foi realizada a fixação das células e a observação por microscopia de campo claro das células estimuladas ou não.

## **5.2 PA não induz morte celular, enquanto ácido docosaexaenoico induz morte apoptótica e perda de integridade de membrana**

Diante da perda de viabilidade mitocondrial causada pelo ácido docosaexaenoico nas células MIA PaCa-2, nos perguntamos se os ácidos graxos poderiam estar causando morte celular e qual seria o perfil dessa morte. Para responder essa pergunta, as células MIA PaCa-2 foram estimuladas com PA nas concentrações 50  $\mu$ M e 200  $\mu$ M ou DHA nas concentrações 25  $\mu$ M e 50  $\mu$ M por 24h. Após o tempo de estímulo, foi realizada a dupla marcação com Anexina-V (FITC) e Iodeto de propídio (PI) (Figura 16).

Foi constatada uma modulação na concentração de 50  $\mu$ M de DHA no tempo de 48 horas, de forma que é possível observar a presença de duas populações de células. Uma população foi marcada apenas com Anexina-V, que demonstra células mortas com sua membrana íntegra, constando apoptose. Outra população foi marcada com dupla marcação, que demonstra a permeabilidade da membrana para o Iodeto de propídio, demonstrando que sua membrana não está completamente íntegra, podendo demonstrar células mortas com lise celular, como a morte necrótica primária ou secundária, piroptose, ferroptose entre outras. Esse feito foi acentuado no tempo de 72 horas, com mais células tendendo ao perfil de dupla marcação.



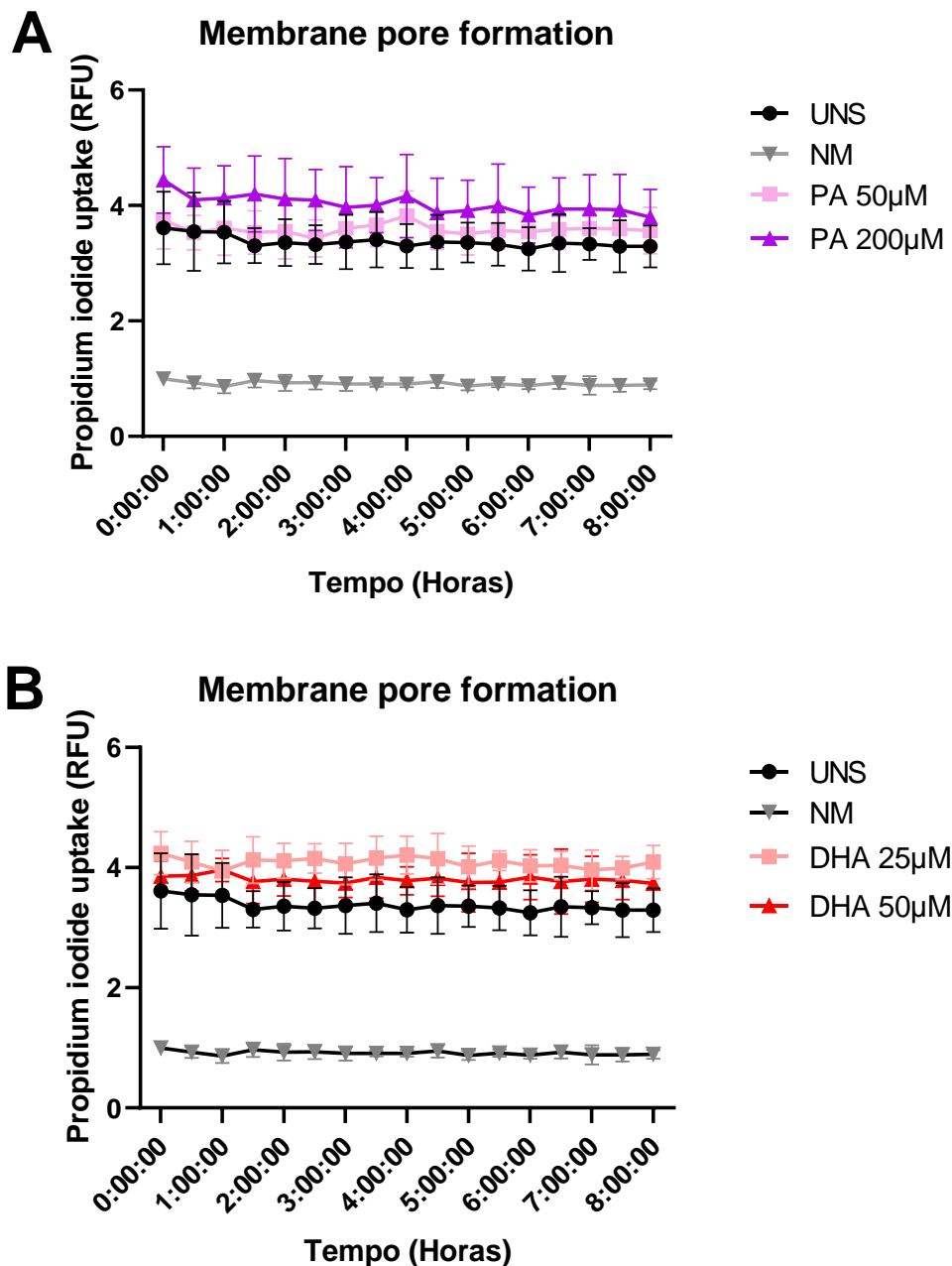


**Figura 16 - Ácido docosaexaenoico causa morte celular na célula MIA PaCa-2.** Dotplots representativas das amostras analisadas. As células MIA PaCa-2 foram estimuladas com PA nas concentrações 50 µM e 200 µM ou DHA nas concentrações 25 µM e 50 µM por 24h, 48 e 72h. Células não estimuladas (UNS) foram usadas como controle. As células foram marcadas com marcador fluorescente Anexina-V (FITC) e Iodeto de propídio (PI), e analisadas por citometria de fluxo (FACS Verse).

### **5.3 Ácido palmítico e ácido docosaexaenoico não induzem a formação precoce de poros na membrana de células MIA PaCa-2**

A fim de investigar a possibilidade da perda de integridade de membrana plasmática das células MIA PaCa-2 induzidas pelos ácidos graxos, além de investigar se esse evento poderia ser observado em tempos precoces, as células foram marcadas com a sonda impermeável a membrana, Iodeto de propídio e estimuladas com as concentrações 50  $\mu\text{M}$  e 200  $\mu\text{M}$  de PA, assim como 25  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$  de DHA. A fluorescência das células foi mensurada em um ensaio cinético por 8 horas.

Os dados indicam que não ocorreu aumento de fluorescência induzido pelos estímulos analisados, de modo a sugerir que não ocorreu formação de poros na membrana da célula MIA PaCa-2 no tempo analisado (Figura 17).

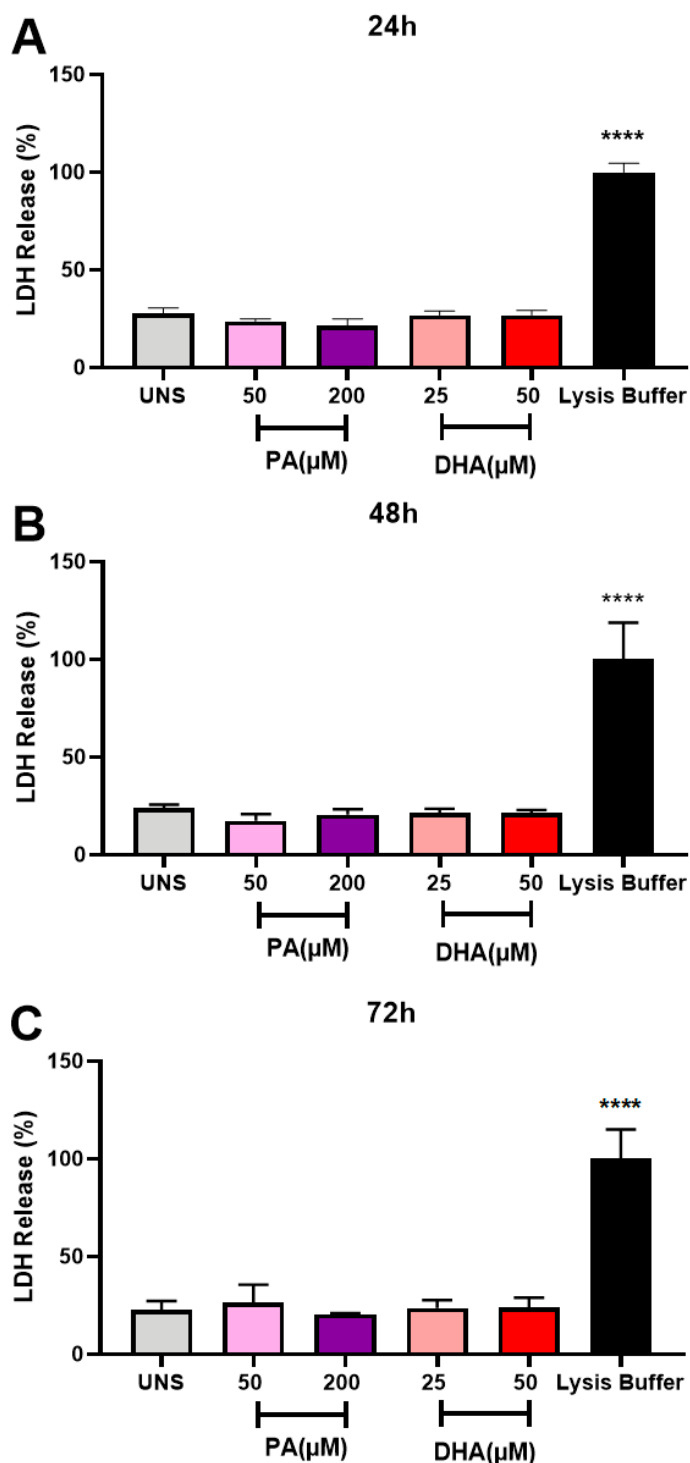


**Figura 17- Ácido palmítico e ácido docosaexaenoico não causaram a formação precoce de poros na membrana plasmática nas células MIA PaCa-2.** As células MIA PaCa-2 foram estimuladas com as concentrações 50 µM e 200 µM de PA, assim como 25 µM e 50 µM de DHA e expostas à sonda impermeável a membrana plasmática, Iodeto de propídio. UNS representa células não estimuladas e NM representa células não marcadas com a sonda. Foi realizado um ensaio cinético de fluorescência durante 8 horas, com medições a cada 1 hora no espectrofotômetro (SpectraMax M3). Os resultados estão representados em PA (A) e DHA (B) e expressos em forma de média  $\pm$  desvio padrão (n=5).

#### **5.4 Ácido palmítico e ácido docosaexaenoico não induziram a liberação de lactato desidrogenase para o espaço extracelular nas células MIA PaCa-2**

De modo a investigar a possibilidade da perda tardia da integridade de membrana plasmática das células MIA PaCa-2 induzida pelos ácidos graxos, as células foram estimuladas com as concentrações 50  $\mu\text{M}$  e 200  $\mu\text{M}$  de PA, assim como 25  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$  de DHA. Após 24, 48 e 72 horas, foi realizado o ensaio colorimétrico de quantificação de LDH extracelular utilizando o kit *CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay* (Invitrogen™).

Foi possível observar que não ocorreu liberação da enzima lactato desidrogenase para o espaço extracelular, sugerindo que não ocorreu perda completa da integridade de membrana em tempos tardios (Figura 18).

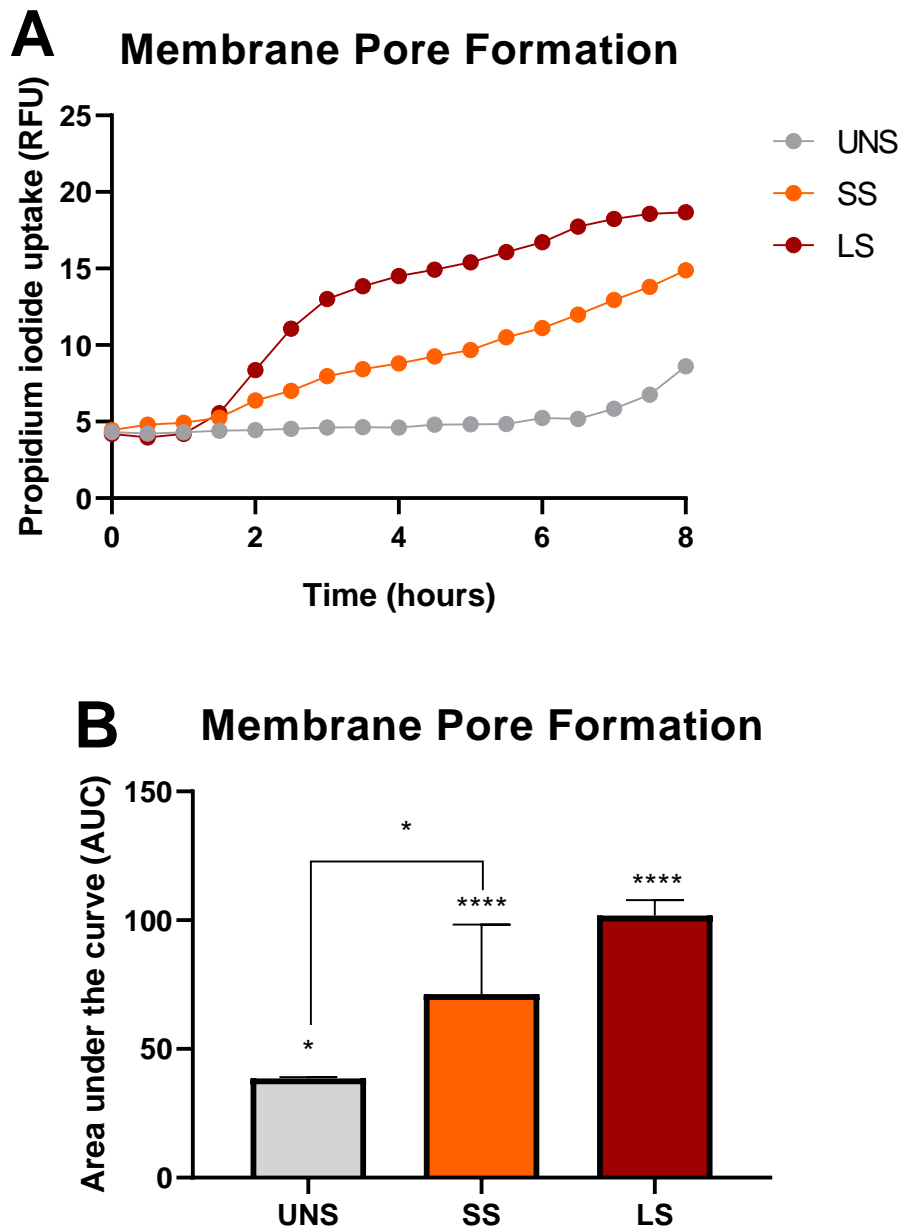


**Figura 18 - Ácido palmítico e ácido docosaexaenoico não induziram a liberação de lactato desidrogenase para o espaço extracelular nas células MIA PaCa-2.** As células MIA PaCa-2 foram estimuladas com as concentrações 50  $\mu\text{M}$  e 200  $\mu\text{M}$  de PA, assim como 25  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$  de DHA, ou não estimuladas (UNS) por 24h (A), 48h (B) ou 72h (C). O sobrenadante das células foi analisado com o kit comercial CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay (Invitrogen™), seguindo as recomendações do fabricante por espectrofotometria (SpectraMax M3). Os resultados estão expressos em forma de média da absorbância  $\pm$  desvio padrão ( $n=3$ ), com diferenças estatisticamente significativas indicadas por (\*\*\*\*)  $p < 0,0001$  indicado por One-way ANOVA.

### **5.5. A maquinaria necessária para indução de morte lítica piroptótica está presente na célula MIA PaCa-2**

De modo a verificar se as células MIA PaCa-2 podem passar pelo processo de piroptose, objetivou-se investigar se a maquinaria necessária para a indução dessa morte está presente nesse modelo celular (Figura 19). Com esse objetivo, as células MIA PaCa-2 foram estimuladas com 1 µg/ml de LPS por 24 horas e em seguida com 20 mM de nigericina pelo tempo de 2h , na ausência (SS) ou presença de LPS (LS), estímulos descritos na literatura como indutores de piroptose. Além do estímulo, as células foram marcadas com a sonda impermeável a membrana Iodeto de propídio e analisadas por espectrofotometria em um ensaio cinético de fluorescência por 8 horas.

Os resultados evidenciam a formação de poros nas duas condições analisadas, com uma maior captação de PI na condição que permaneceu com LPS durante o estímulo com nigericina.



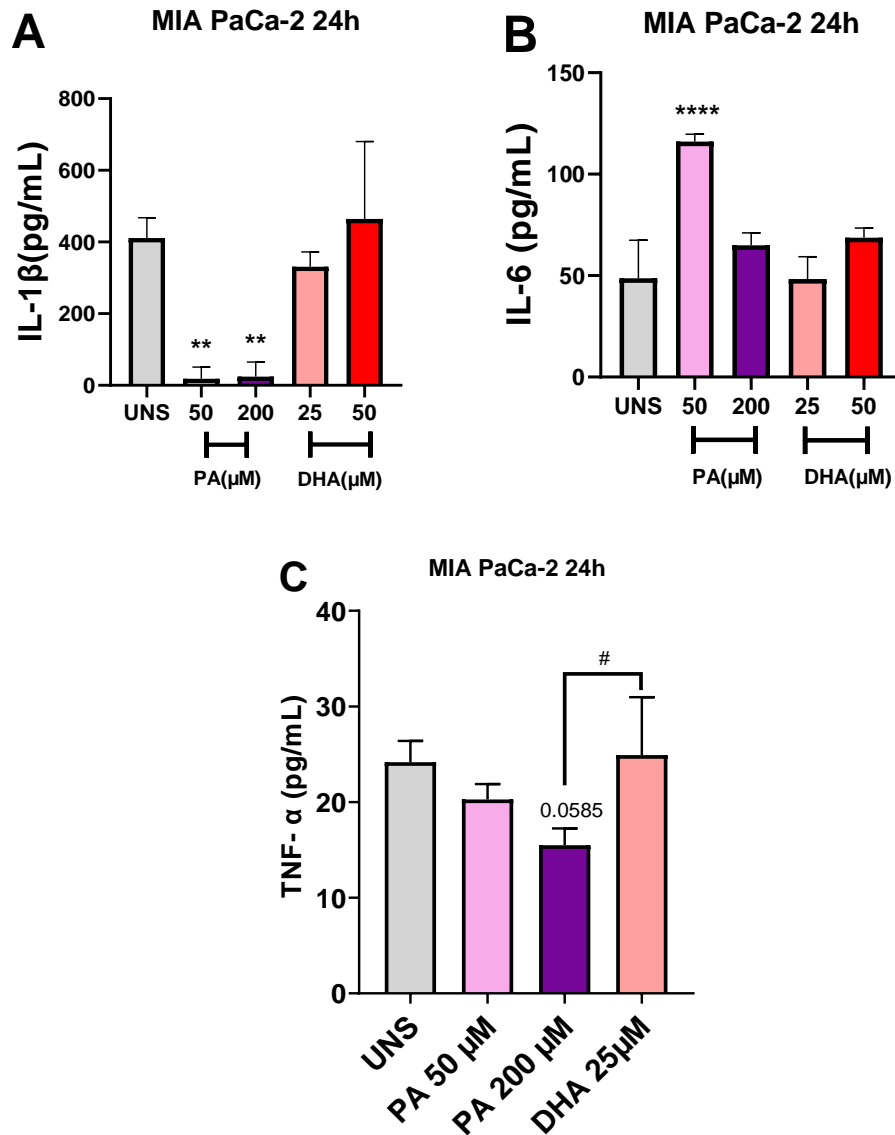
**Figura 19 - A maquinaria necessária para indução de morte lítica piroptótica está presente na célula MIA PaCa-2.** As células MIA PaCa-2 foram marcadas com iodeto de propídio e estimuladas com 1  $\mu\text{g/ml}$  de LPS por 24 horas e em seguida com 20 mM de nigericina pelo tempo de 2h , na ausência (SS) ou presença de LPS (LS). Como controle foi utilizado células não estimuladas (UNS). Os resultados estão representados em gráficos linear (A) e área sob a curva (B) e expressos em forma de média  $\pm$  desvio padrão ( $n=5$ ), sendo a diferença estatística significativa representada por (\*)  $p < 0,05$  e (\*\*\*\*)  $p < 0,0001$  em relação ao não estimulado (UNS) indicado por ANOVA.

**5.6 Ácido palmítico causou a diminuição da secreção de IL-1  $\beta$  e aumento da secreção de IL-6 em células MIA PaCa-2. Ácido docosaexaenoico não modulou a secreção das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, e TNF- $\alpha$**

Com o objetivo de identificar se os ácidos graxos PA e DHA modulam o perfil de secreção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6, e TNF- $\alpha$  nas células MIA PaCa-2, foi realizado o ensaio imunoenzimático ELISA (Figura 20). As células foram estimuladas com as concentrações 50  $\mu$ M e 200  $\mu$ M de PA, assim como 25  $\mu$ M e 50  $\mu$ M de DHA por 24 horas.

Como resultado, observou-se que o ácido palmítico diminuiu consideravelmente a secreção de IL-1 $\beta$ , ao passo que aumentou a secreção de IL-6. Nossos dados também sugerem que o ácido docosaexaenoico não modulou a secreção dessas citocinas no tempo observado.



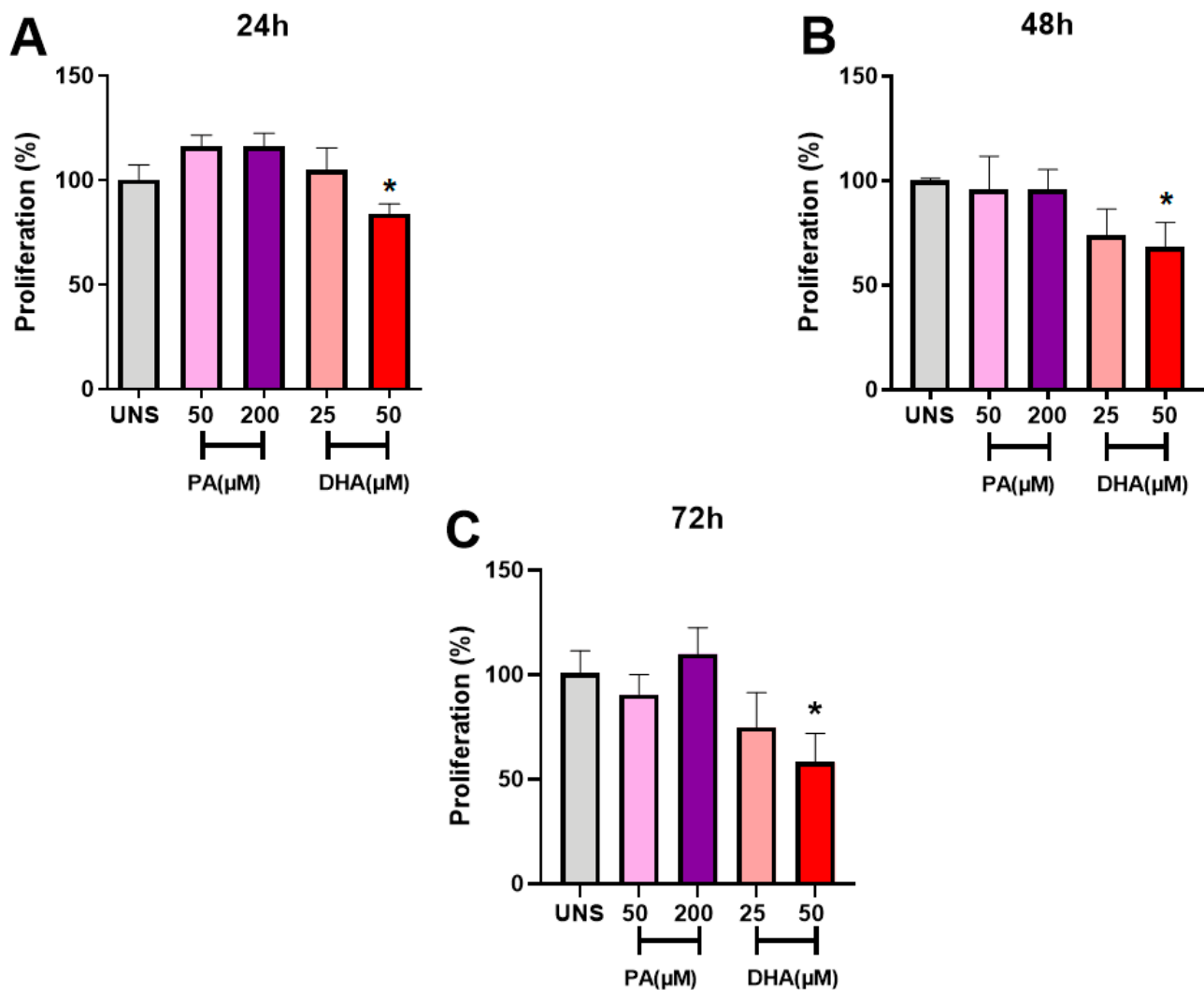


**Figura 20 - Ácido palmítico causou a diminuição da secreção de IL-1  $\beta$  e aumento da secreção de IL-6.** As células MIA PaCa-2 foram estimuladas com 50  $\mu$ M e 200  $\mu$ M de ácido palmítico, 25  $\mu$ M e 50  $\mu$ M de ácido docosaenoico ou não estimuladas (UNS) por 24 horas. As citocinas IL-1 $\beta$  (A), IL-6 (B) e TNF- $\alpha$  (C) presentes no sobrenadante foram dosadas pelo ensaio de ELISA. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n=3), sendo a diferença estatística significativa entre a condição e o não estimulado representada por (\*\*)  $p < 0,01$ , (\*\*\*\*)  $p < 0,0001$  e entre estímulos (#)  $p < 0,05$ , calculada por ANOVA.

**5.7 O ácido docosaexaenoico na maior concentração diminuiu a capacidade proliferativa das células MIA PaCa-2 em todos os tempos. Ácido palmítico não alterou a capacidade proliferativa**

Para investigar se os ácidos graxos poderiam modular a capacidade proliferativa das células MIA PaCa-2, foi utilizada a sonda permeável e fluorescente CFSE. Essa molécula se liga a aminas biogênicas no citoplasma e à medida que ocorrem divisões celulares, a fluorescência de cada célula filha é aproximadamente metade da fluorescência da célula mãe. De modo que, a intensidade de fluorescência mensurada nesse experimento é inversamente proporcional a taxa de proliferação celular, CFSE. Após a marcação, as células foram estimuladas com as concentrações 50  $\mu$ M e 200  $\mu$ M de PA, assim como 25  $\mu$ M e 50  $\mu$ M de DHA.

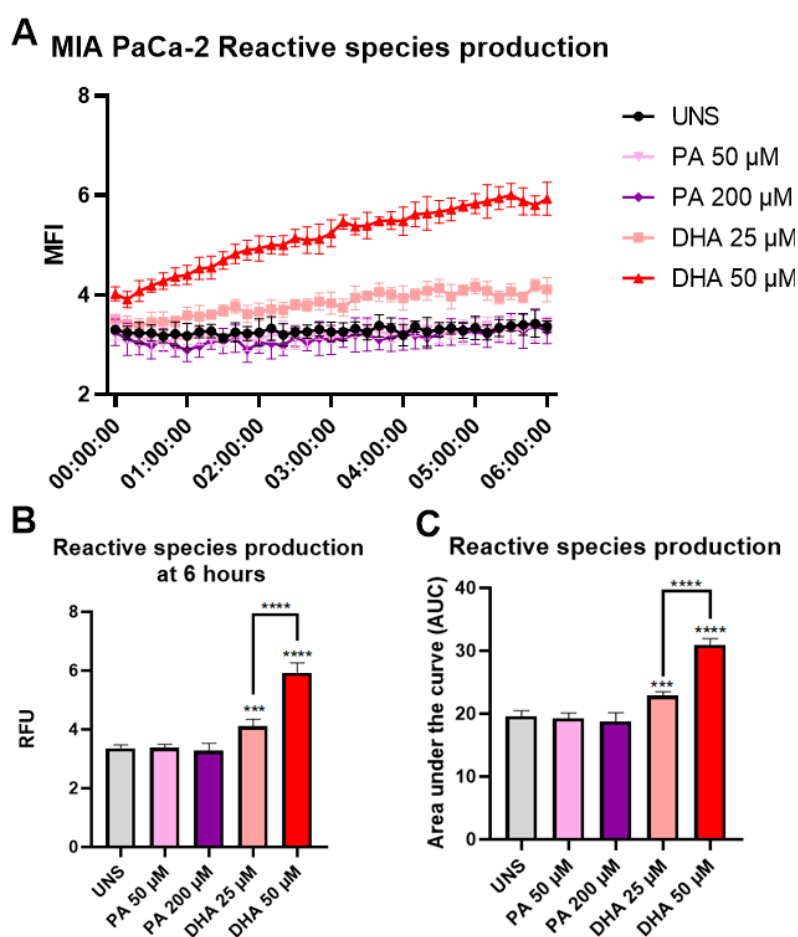
Os resultados demonstraram que, após 24h, 48h e 72h de estímulo, o DHA reduziu de forma estatisticamente significativa a capacidade proliferativa em comparação com as células não estimuladas (Figura 21).



**Figura 21 - Ácido palmítico não modulou a capacidade proliferativa. Ácido docosaexaenoico reduziu a capacidade proliferativa das células MIA PaCa-2.** As células foram marcadas com CFSE antes da realização dos estímulos e após o tempo de estímulo com 50  $\mu$ M e 200  $\mu$ M de PA, assim como 25  $\mu$ M e 50  $\mu$ M de DHA, as células foram analisadas por citometria de fluxo (Accuri C6). Os resultados foram normalizados em relação ao grupo não tratado (UNS) nos tempos de 24h (A), 48h (B) e 72h (C). Para facilitar a interpretação dos dados, foi realizada a normalização dos dados (N=3)  $\pm$  desvio padrão, invertendo a abordagem convencional: o valor da média do controle UNS foi dividido pela intensidade de fluorescência de cada amostra, e o resultado foi multiplicado por 100. Dessa forma, os valores finais expressam diretamente o percentual de proliferação celular, onde valores mais altos correspondem a maior proliferação. Assim, os resultados passaram a ser expressos diretamente como percentual de proliferação celular. Os resultados estão expressos em forma de média do MFI. Sendo a diferença estatística significativa representada por (\*)  $p < 0,05$  em relação ao não estimulado (UNS) indicada por One-way ANOVA.

### 5.8 O ácido palmítico não induziu a produção de espécies reativas em tempos precoces. O ácido docosaexaenoico induziu a produção precoce de espécies reativas nas células MIA PaCa-2

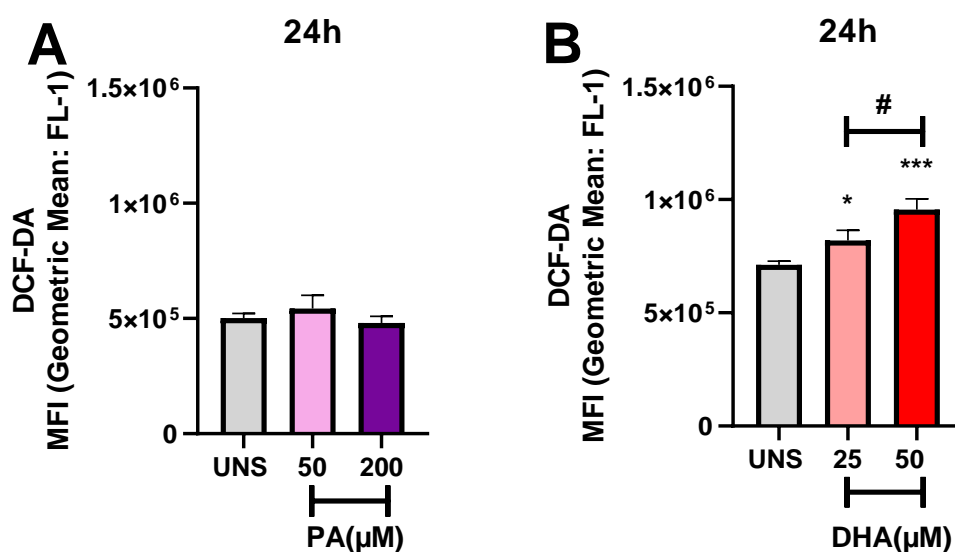
A fim de identificar se os ácidos graxos induzem à produção de espécies reativas, as células MIA PaCa-2 foram marcadas com a sonda permeável DCF-DA e em sequência, estimuladas com as concentrações 50  $\mu\text{M}$  e 200  $\mu\text{M}$  de PA, assim como 25  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$  de DHA. Para o ensaio de 6 horas, após a marcação e os estímulos, as células foram analisadas em um ensaio cinético de fluorescência por 6 horas com leituras a cada 10 minutos (Figura 22). Durante o tempo observado, ocorreu a formação de espécies reativas de forma dose dependente de DHA.



**Figura 22 – O ácido palmítico não induziu a produção de espécies reativas em tempos precoces. O ácido docosaexaenoico induziu a produção precoce de espécies reativas.** As células MIA PaCa-2 foram expostas à sonda DCF-DA e em seguida estimuladas com as concentrações 50  $\mu\text{M}$  e 200  $\mu\text{M}$  de PA assim como 25  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$  de DHA (A). Em sequência, foi realizada a leitura cinética durante 6 horas com leituras de fluorescência a cada 10 minutos no espectrofotômetro e os valores foram analisados com o software GraphPad Prism (B e C) (SpectraMax M3).

### 5.9 Ácido docosaexaenoico induziu a produção tardia de espécies reativas

Para complementar o ensaio inicial de produção de espécies reativas, as células MIA PaCa-2 foram estimuladas com 25  $\mu$ M e 50  $\mu$ M de DHA e após 24 horas as células foram incubadas com a sonda DCF-DA, coletadas e analisadas por citometria de fluxo (Accuri C6) (Figura 23). Os achados sugerem que os estímulos com PA não modularam a produção de espécies reativas, ao passo que, as de DHA causaram a produção de espécies reativas no tempo analisado, de forma dose e tempo dependente.

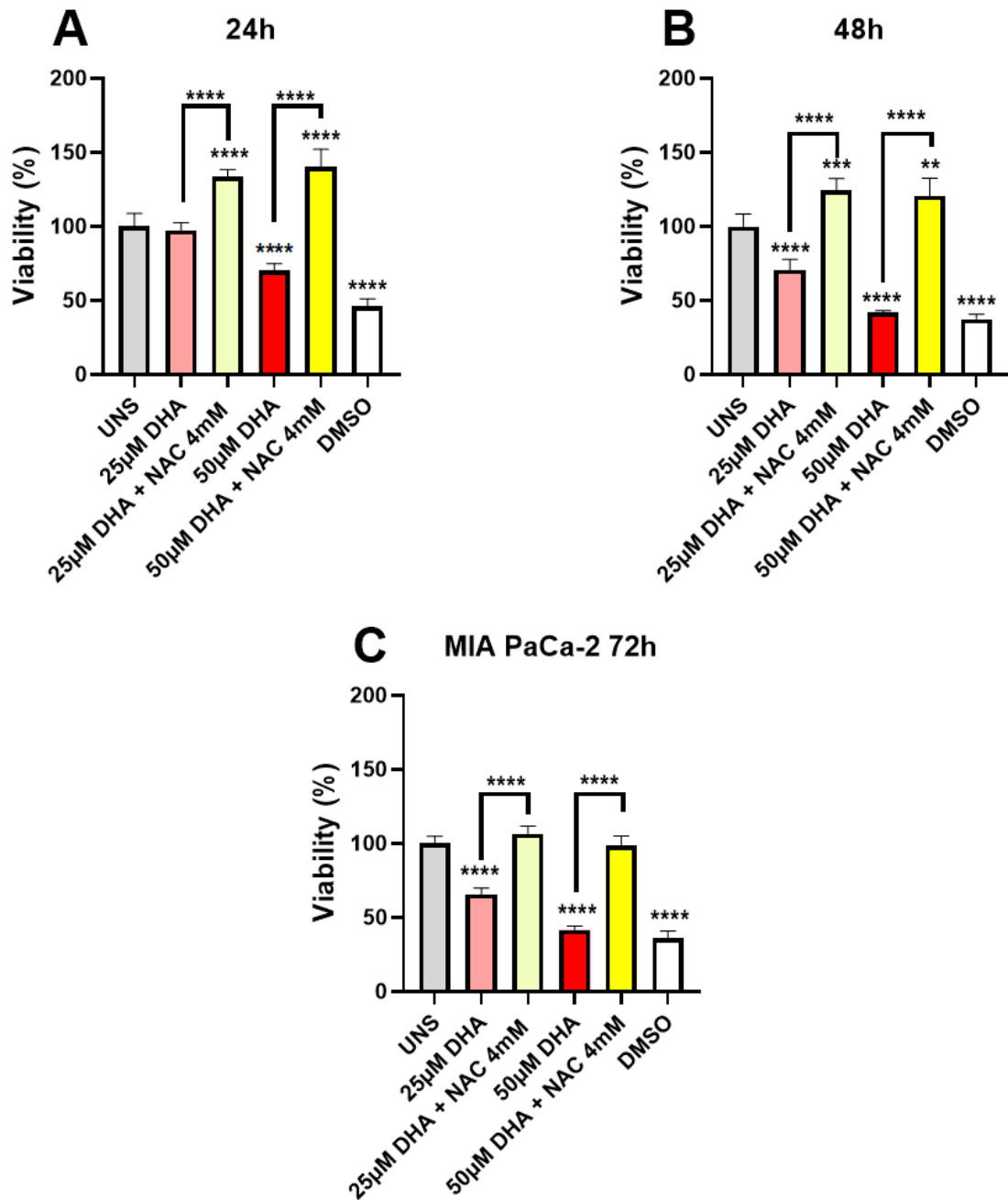


**Figura 23 - Ácido docosaexaenoico induziu a produção tardia de espécies reativas.** Células MIA PaCa-2 foram estimuladas por 24 horas com as concentrações 25  $\mu$ M e 50  $\mu$ M de DHA. Após o tempo de estímulo, as células foram incubadas com a sonda DCF-DA, coletadas e analisadas por citometria de fluxo (Accuri C6). Os resultados da citometria estão representados em gráficos de barras para PA (A) e DHA (B) e expressos em forma de média  $\pm$  desvio padrão (n=5), sendo a diferença estatística significativa representada por (\*) p < 0,05, (\*\*\*) p < 0,001 quando comparados com o UNS e por (#) quando comparados entre estímulos, todos indicado por ANOVA.

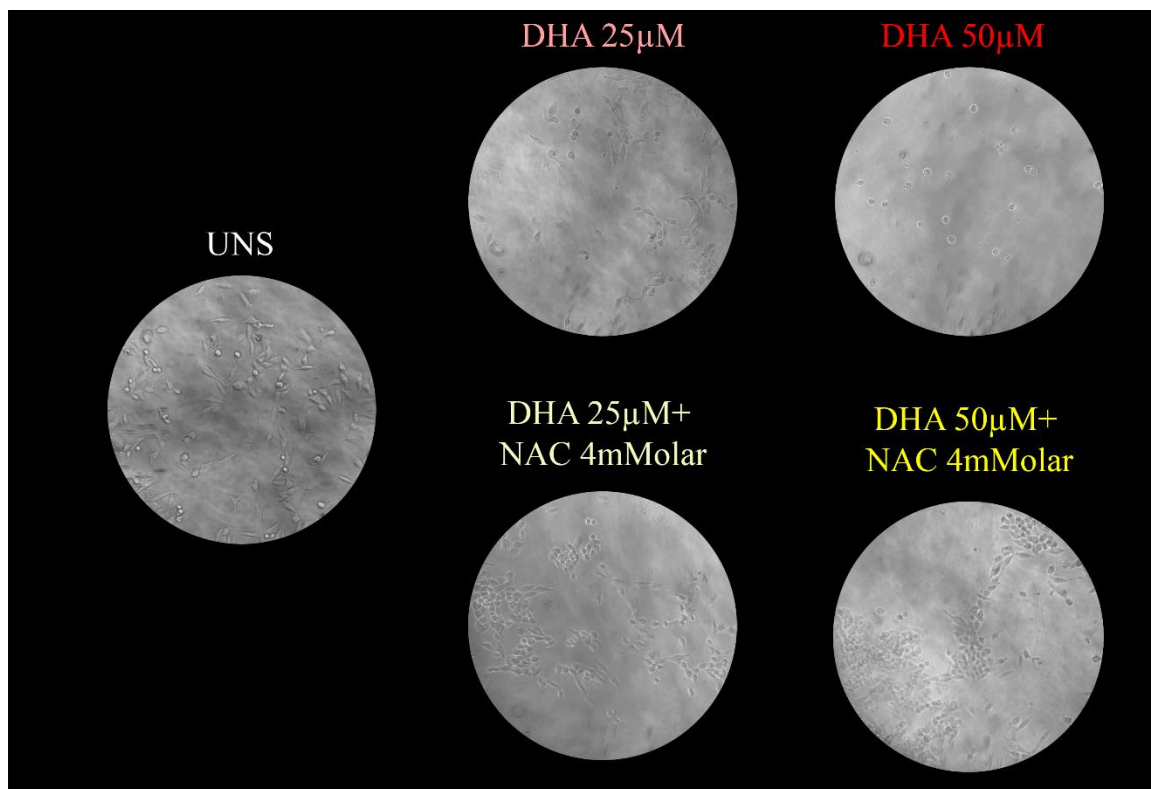
### **5.10 A inibição da produção de espécies reativas reverteu a redução de viabilidade mitocondrial causada pelo ácido docosaexaenoico nas células MIA PaCa-2**

Com o objetivo de verificar se as espécies reativas estavam associadas a diminuição de viabilidade celular causada pelo ácido docosaexaenoico nas células MIA PaCa-2. O ensaio de medição de viabilidade mitocondrial com a sonda MTT foi realizado em células MIA PaCa-2 estimuladas com as concentrações 25  $\mu$ M e 50 $\mu$ M de DHA, assim como 25  $\mu$ M e 50  $\mu$ M de DHA na presença do inibidor farmacológico N-Acetilcisteína (NAC) que é um inibidor de espécies reativas, por 24, 48 ou 72 horas (Figura 24 e 25).

Foi possível observar que as células MIA PaCa-2 quando estimuladas com 25  $\mu$ M e 50  $\mu$ M de ácido docosaexaenoico tiveram uma redução tempo e dose dependente e sua viabilidade mitocondrial. A presença de NAC manteve a viabilidade mitocondrial em todos os tempos analisados, ademais, nos tempos de 24 e 48 horas, o NAC causou aumento da conversão do sal de MTT a cristais de formazan, indicando um possível ganho de atividade mitocondrial causada pela inibição das espécies reativas, efeito que não foi observado no tempo de 72h.



**Figura 24 - A inibição da produção de espécies reativas reverteu a redução de viabilidade mitocondrial causada pelo ácido docosaexaenoico nas células MIA PaCa-2.** As células MIA PaCa-2 foram estimuladas com DHA nas concentrações 25 µM e 50 µM com ou sem a presença de N-Acetilcisteína (NAC), por 24h (A); 48h (B); 72h (C). Após os tempos de estímulo, foi realizado o ensaio de viabilidade mitocondrial com MTT, a média dos percentuais de células viáveis em relação ao controle não estimulado (UNS) foi utilizada para calcular a viabilidade mitocondrial. Os resultados estão expressos em forma de média ± desvio padrão (n=5), sendo a diferença estatística significativa representada (\*\*\*\*)  $p < 0,0001$  em relação ao não estimulado (UNS), indicado por One-way ANOVA.

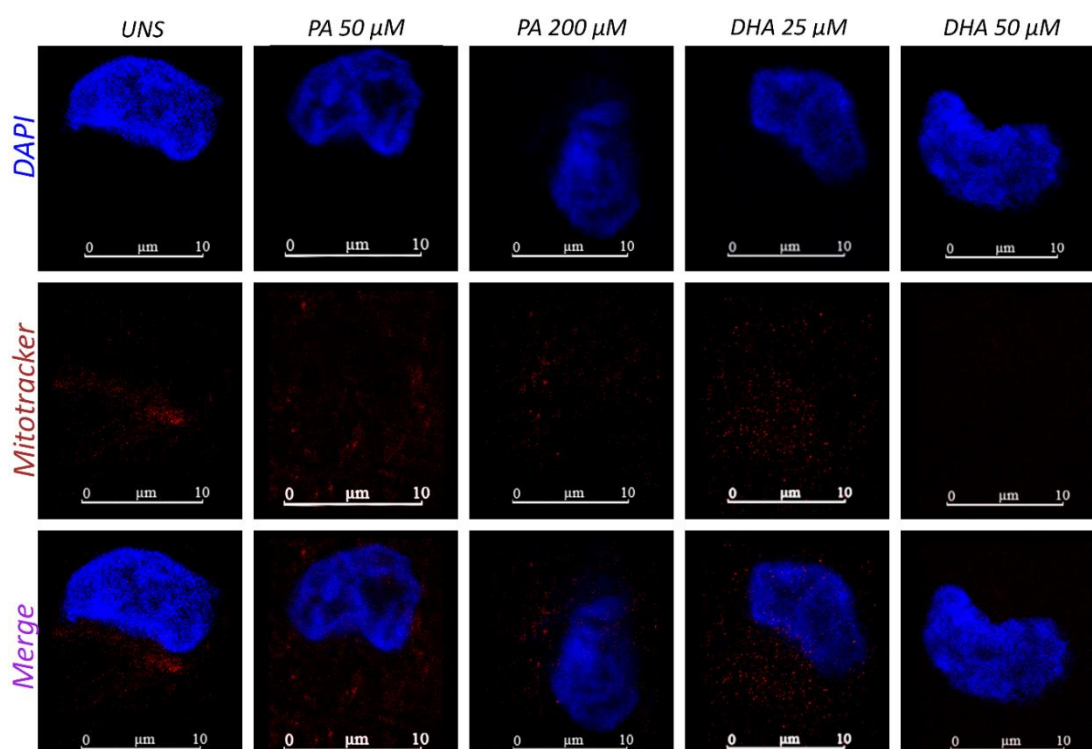


**Figura 25 - Prancha representativa do efeito da inibição da produção de espécies reativas na diminuição de viabilidade mitocondrial causada pelo DHA nas células MIA PaCa-2.** As células MIA PaCa-2 foram estimuladas com DHA nas concentrações 25 µM e 50 µM com ou sem a presença de N-Acetilcisteína (NAC), por 24h, 48h ou 72h. Após o estímulo, foram capturadas imagens de campo claro das células estimuladas com DHA na presença ou não do inibidor farmacológico NAC.



### 5.11 Ácido docosaexaenoico diminuiu o número de mitocôndrias viáveis

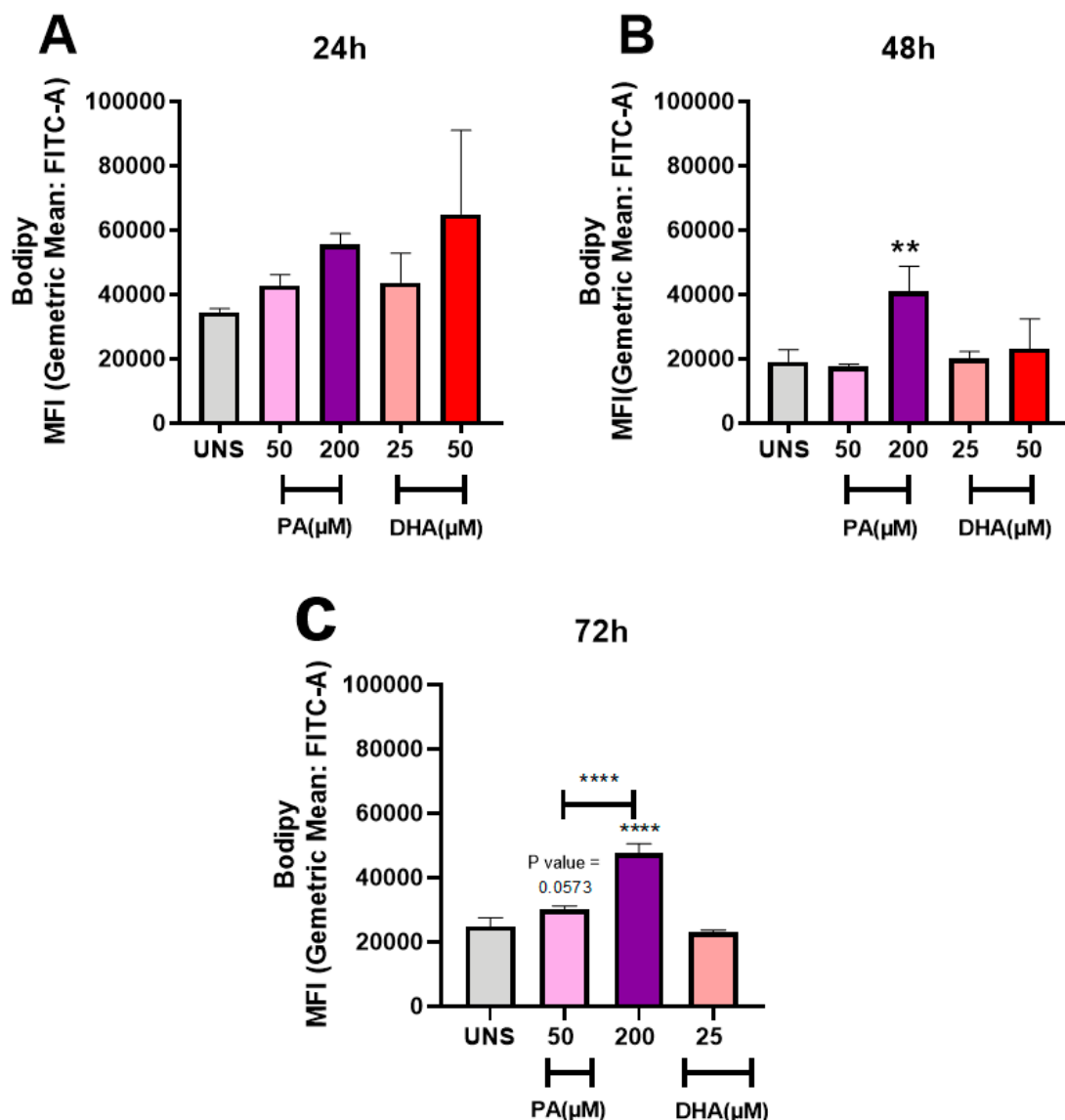
A fim de investigar se o aumento de ROS e a indução de morte celular nas células MIA PaCa-2 estimuladas com ácido graxos poderia estar relacionada a alterações mitocondriais, foi realizada a visualização das mitocôndrias por microscopia confocal de fluorescência das células. Para isso, as células MIA PaCa-2 estimuladas com as concentrações 50  $\mu\text{M}$  e 200  $\mu\text{M}$  de PA, assim como 25  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$  de DHA. Após 24 horas de estímulo, as mitocôndrias foram marcadas com a sonda fluorescente MitoTracker Red CMXRos, enquanto o núcleo foi marcado com a sonda fluorescente DAPI. Os achados sugerem uma diminuição na visualização de mitocôndrias causada pelo DHA na concentração de 50  $\mu\text{M}$ , o que indica a ausência de mitocôndrias com potencial de membrana eficientes, considerando que a sonda é retida na organela quando esta está polarizada (Figura 26).



**Figura 26 - Ácido docosaexaenoico diminuiu o número de mitocôndrias viáveis da célula MIA PaCa-2.** As células MIA PaCa-2 foram estimuladas com 50  $\mu\text{M}$  e 200  $\mu\text{M}$  de PA, assim como 25  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$  de DHA por 24 horas. As mitocôndrias das células foram marcadas com MitoTracker Red CMXRos (vermelho) e o núcleo celular marcado com DAPI (azul) e analisadas por microscopia confocal de fluorescência a laser (Leica TCS SP5).

### **5.12 Ácido palmítico aumentou a quantidade total de corpúsculos lipídicos nas células MIA PaCa-2. Ácido docosaexaenoico não modulou a biogênese de corpúsculos lipídicos**

Com o objetivo de analisar a influência dos ácidos graxos no metabolismo lipídico das células MIA PaCa-2. As células foram estimuladas com as concentrações 50  $\mu\text{M}$  e 200  $\mu\text{M}$  de PA, assim como 25  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$  de DHA. Após o tempo dos estímulos as células foram coletadas e a biogênese de corpúsculos lipídicos foi analisada por meio do ensaio de citometria com a sonda lipofílica BODIPY (Figura 27). A análise dos resultados revelou que, em 24 horas, não ocorreu modulação significativa da biogênese de corpúsculos. Em tempos mais tardios de 48 e 72 horas foi possível mensurar um aumento no processo de biogênese de corpúsculos lipídicos causado pelo estímulo com 200  $\mu\text{M}$  de PA.

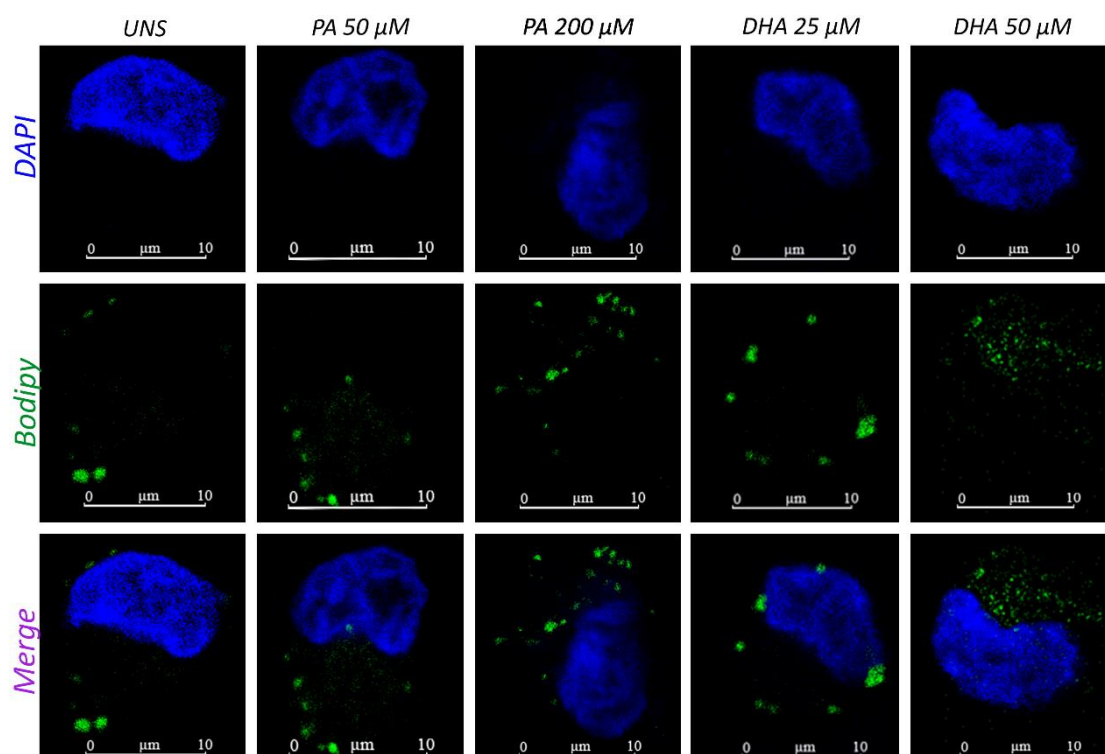


**Figura 27 - Ácido palmítico aumentou a quantidade total de corpúsculos lipídicos nas células MIA PaCa-2, enquanto o ácido docosaexaenoico não modulou a biogênese de corpúsculos lipídicos.** As células MIA PaCa-2 foram estimuladas com 50  $\mu$ M e 200  $\mu$ M de PA, assim como 25  $\mu$ M e 50  $\mu$ M de DHA. Após 24h (A), 48h (B) e 72h (C) de estímulo, as células foram marcadas com BODIPY (FITC) e analisadas por citometria de fluxo (Accuri C6). Os resultados estão expressos em forma de média  $\pm$  desvio padrão (n=3), sendo a diferença estatística significativa representada por (\*\*)  $p < 0,01$  e (\*\*\*\*)  $p < 0,0001$  em relação ao não estimulado (UNS), indicada por ANOVA.

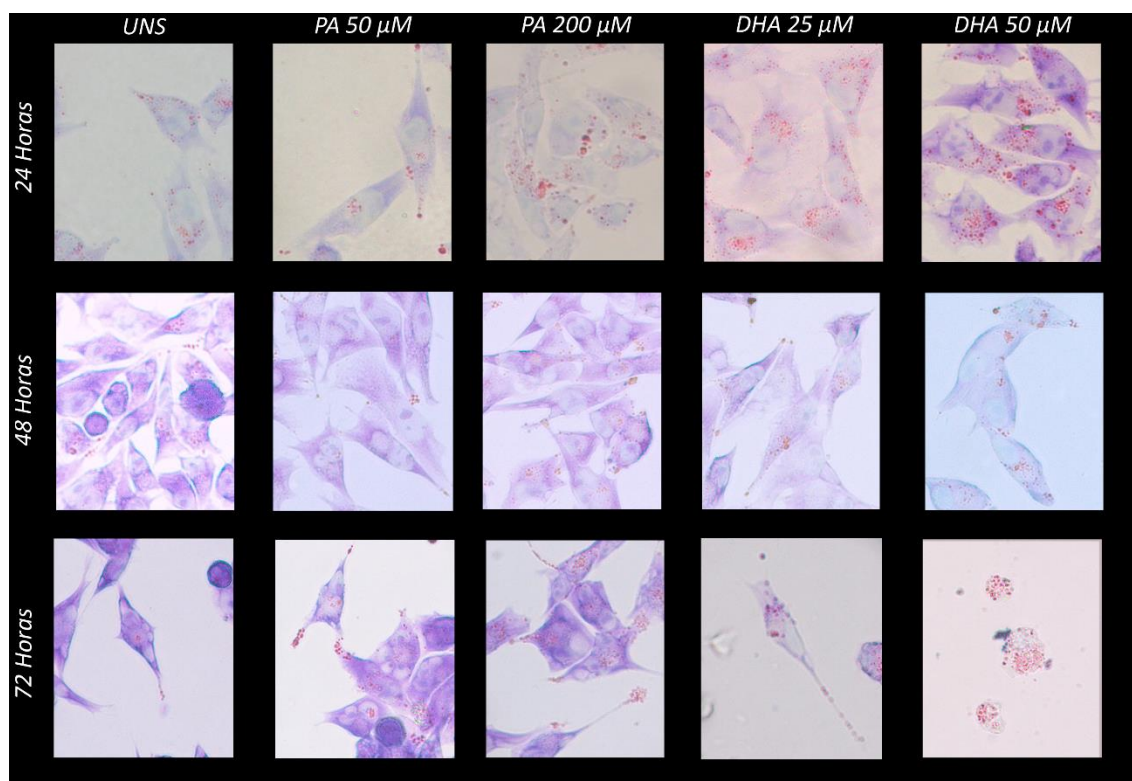
### **5.13 O ácido palmítico e o ácido docosaexaenoico aumentaram o número de gotículas lipídicas, com um efeito mais acentuado causado pelo ômega-3**

Com o objetivo de complementar a análise de biogênese de corpúsculos lipídicos, foram realizadas microscopias confocal (Figura 28) e ópticas (Figura 29), além da contagem de gotículas lipídicas por microscopia óptica (Figura 30). Para isso, as células MIA PaCa-2 foram estimuladas com 50  $\mu\text{M}$  e 200  $\mu\text{M}$  de PA, assim como 25  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$  de DHA. Após os tempos de estímulo, as células foram marcadas com as sondas BODIPY ou o corante Oil Red O, ambas moléculas lipofílicas com capacidade de se ligar a lipídios neutros que se acumulam nos corpúsculos lipídicos.

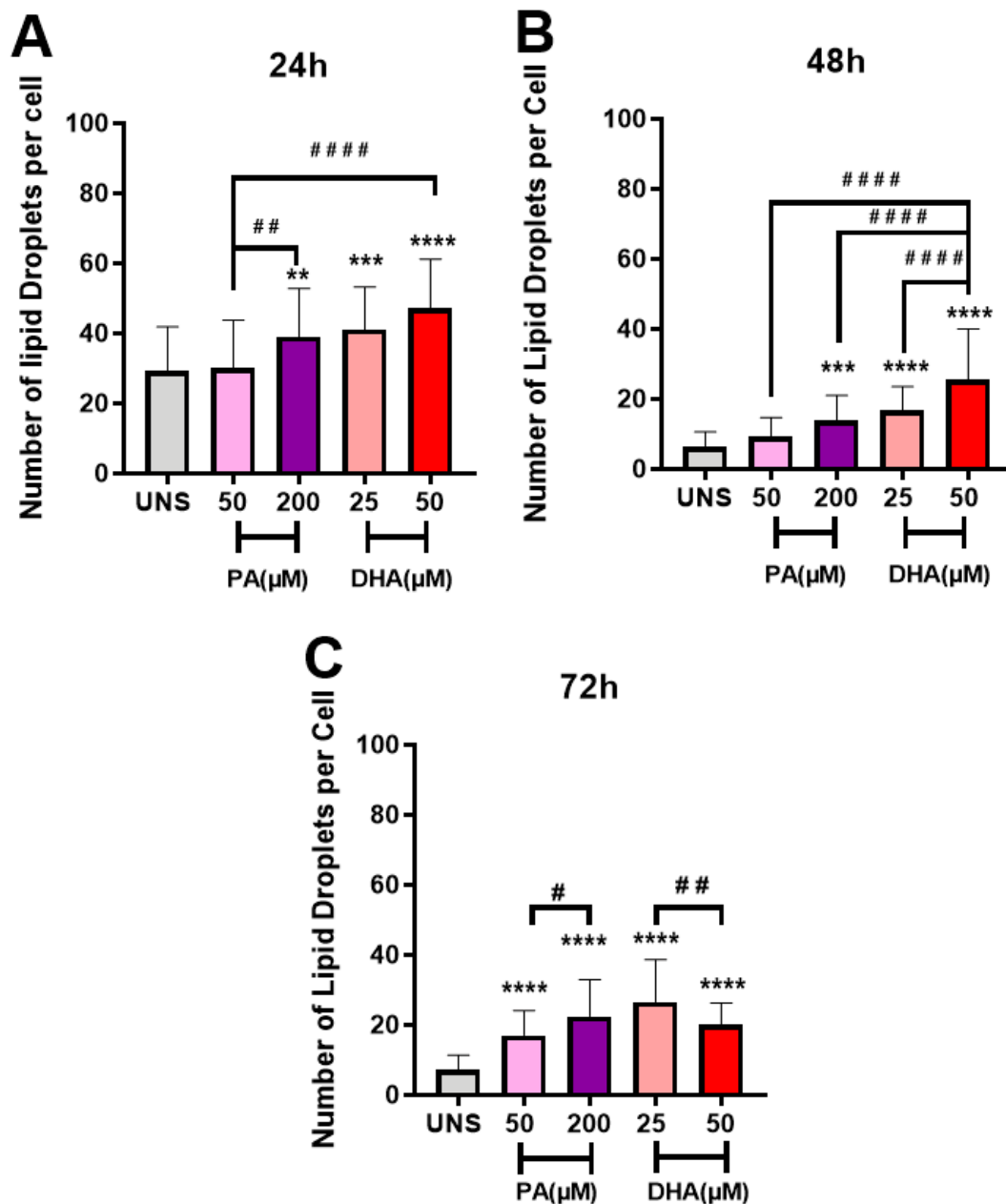
Foi possível observar que o PA causou um aumento no número de gotículas em todos os tempos na concentração de 200  $\mu\text{M}$ , enquanto que a concentração de 50  $\mu\text{M}$  aumentou o número de gotículas lipídicas apenas no tempo tardio de 72 horas. Ademais, o DHA causou aumento no número de gotículas lipídicas nas concentrações de 25  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$  em todos os tempos analisados. Dessa forma, os ácidos graxos na concentração de 50  $\mu\text{M}$  exerceram um efeito distinto sobre a quantidade dessa organela nos tempos de 24 e 48 horas.



**Figura 28 - O ácido palmítico e o ácido docosaexaenoico aumentaram o número de gotículas lipídicas, com um efeito mais acentuado causado pelo ômega-3, imagem de microscopia confocal.** As células MIA PaCa-2 foram estimuladas com 50  $\mu\text{M}$  e 200  $\mu\text{M}$  de PA, assim como 25  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$  de DHA. Após 24h, o núcleo das células foi marcado com o corante fluorescente DAPI (azul) e os corpúsculos lipídicos foram marcados com a sonda lipofílica BODIPY (verde). Por fim, as células foram analisadas por microscopia confocal de fluorescência a laser (Leica TCS SP5).



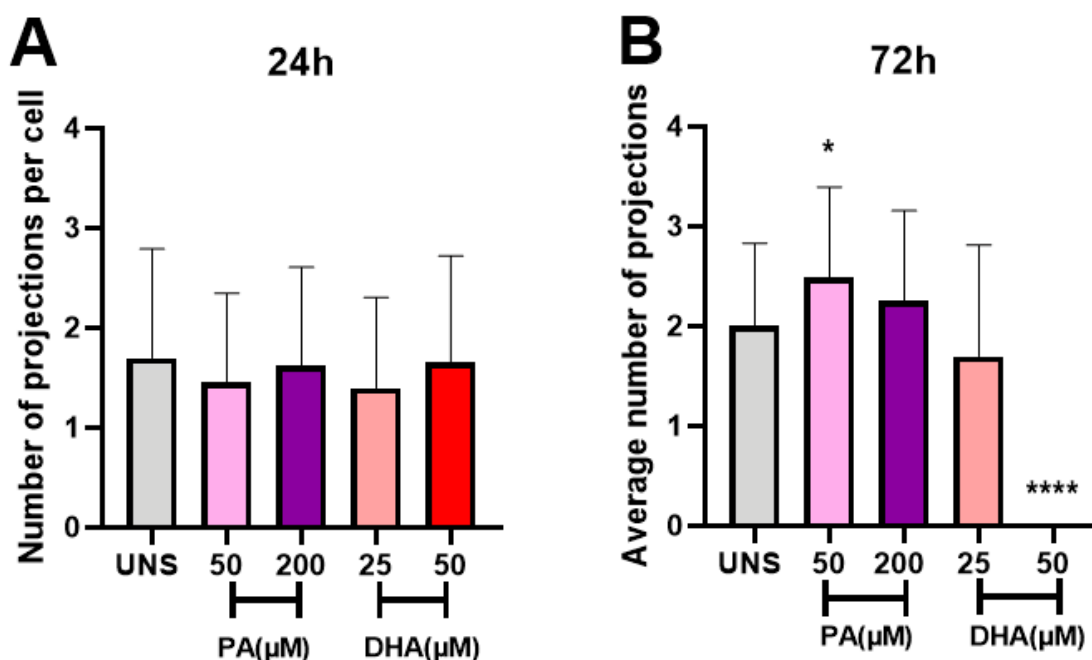
**Figura 29 - O ácido palmítico e o ácido docosaexaenoico aumentaram o número de gotículas lipídicas, com um efeito mais acentuado causado pelo ômega-3, imagem por microscopia óptica.** As células MIA PaCa-2 foram estimuladas com 50  $\mu$ M e 200  $\mu$ M de PA, assim como 25  $\mu$ M e 50  $\mu$ M de DHA. Após 24h (A), 48h (B) e 72h (C), as células foram marcadas com Oil Red O e hematoxilina e analisadas por microscopia de Luz, de modo que, pontos vermelhos indicam corpúsculos lipídicos (Zeiss AXIO LAB.A1).



**Figura 30 - O ácido palmítico e o ácido docosaexaenoico aumentaram o número de gotículas lipídicas, com um efeito mais acentuado causado pelo ômega-3, quantificação por microscopia óptica.** As células MIA PaCa-2 foram estimuladas com 50  $\mu$ M e 200  $\mu$ M de PA, assim como 25  $\mu$ M e 50  $\mu$ M de DHA. Após 24h (A), 48h (B) e 72h (C), as células foram marcadas com Oil Red O e hematoxilina e analisadas por microscopia de Luz (Zeiss AXIO LAB.A1). A contagem do número de gotículas foi realizada manualmente a partir da contagem do número de gotículas lipídicas de 50 células por condição, percorrendo sistematicamente a lâmina, garantindo que cada campo fosse capturado apenas uma vez, dessa forma, evitando sobreposição de áreas analisadas. A diferença estatística significativa foi representada por (\*\*)  $p < 0,01$ , (\*\*\*)  $p < 0,001$  e (\*\*\*\*)  $p < 0,001$  em relação ao não estimulado (UNS); (#)  $p < 0,05$  (##),  $p < 0,01$  e (####)  $p < 0,001$  para demonstrar a diferença entre estímulos, todos indicados por ANOVA.

#### 5.14 O ácido palmítico aumenta o número de projeções celulares da célula MIA PaCa-2. O ácido docosaexaenoico diminui o número de projeções celulares.

Devido à observação do acúmulo de gotículas lipídicas na ponta de projeções celulares, investigamos qual seria o efeito do estímulo dos ácidos graxos nas projeções celulares da célula MIA PaCa-2 (Figura 31). Para isso, após os estímulos com 50  $\mu\text{M}$  e 200  $\mu\text{M}$  de PA, assim como 25  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$  de DHA, foi realizada a fixação e coloração com hematoxilina das células, seguida da contagem manual do número de projeções celulares. Os resultados sugerem um aumento no número de projeções celulares no tempo tardio de 72 horas causado pelo ácido palmítico, assim como a redução do número de projeções causado pelo DHA.



**Figura 31 – O Ácido palmítico aumenta o número de projeções celulares em tempos tardios enquanto ácido docosaexaenoico diminui.** As células MIA PaCa-2 foram estimuladas com 50  $\mu\text{M}$  e 200  $\mu\text{M}$  de PA, assim como 25  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$  de DHA. As células foram marcadas com o corante Oil Red e hematoxilina e analisadas por microscopia de luz (Zeiss AXIO LAB.A1). A contagem do número de projeções foi realizada manualmente a partir da contagem de 50 células obtidas de imagens registradas percorrendo sistematicamente a lâmina, garantindo que cada campo fosse capturado apenas uma vez, evitando sobreposição de áreas analisadas. A diferença estatística significativa representada por (\*)  $p < 0,05$  e (\*\*\*\*)  $p < 0,001$  em relação ao não estimulado (UNS) por ANOVA.



## 6. DISCUSSÃO

Neste trabalho, foram avaliados os efeitos do ácido palmítico e do ácido docosaexaenoico sobre parâmetros celulares e a modulação de parâmetros carcinogênicos, assim como seu efeito sobre as organelas mitocôndria e corpúsculo lipídico de células MIA PaCa-2 de câncer adenocarcinoma pancreático humano. No presente estudo, corroboramos a literatura científica ao demonstrar que o ácido palmítico não comprometeu a viabilidade das células MIA PaCa-2, ao mesmo tempo, esse ácido graxo resultou em alterações que podem ser favoráveis ao tumor. Ademais, corroboramos a literatura científica demonstrando que em contraponto ao ácido palmítico, o ácido docosaexaenoico causou um efeito antitumoral na linhagem analisada.

Nossos resultados sugerem que o estímulo com ácido palmítico não comprometeu a viabilidade mitocondrial das células MIA PaCa-2 nos tempos avaliados. Ademais, nossos dados demonstram que o estímulo com ácido docosaexaenoico causou a redução da viabilidade mitocondrial de forma dependente da dose e do tempo na linhagem celular. De forma complementar, nossos resultados sugerem que o estímulo com 50  $\mu$ M DHA induziu morte não lítica em células MIA PaCa-2 nos tempos de 48 e 72 horas. Observamos também a presença de uma segunda população de células que são permeáveis ao iodeto de propídio (PI) quando estimuladas com 50  $\mu$ M de DHA nos mesmos tempos, o que indica que a membrana dessas células não está mais completamente íntegra, podendo ter sido comprometida e parcialmente reparada. Esses dados reforçam que o ômega-3 induz um efeito distinto em células tumorais quando comparado ao seu efeito em células saudáveis, onde atua como uma molécula protetora da homeostase celular.

Dado que o DHA induziu alterações na viabilidade celular e na integridade da membrana, é possível que esses efeitos estejam relacionados à ativação de padrões moleculares de perigo. Os padrões moleculares associados a dano (DAMPs) ou a patógenos (PAMPs) ativam vias celulares e podem resultar em efeitos distintos. A literatura demonstra que ácidos graxos podem modular de forma diferencial a produção de citocinas, por exemplo, ácidos graxos de cadeia curta diminuem a ativação de TLR4 enquanto ácidos graxos de cadeia longa podem ativá-lo (SAM et al., 2021). Na presença de um segundo sinal, o reconhecimento de padrões pode também resultar na ativação do inflamassoma, levando à formação de poros na membrana, caracterizando a piroptose (FANG et al., 2020).

Resultados variados foram encontrados na literatura acerca do efeito do PA no inflamassoma. O PA pode ativar o inflamassoma de células estreladas hepáticas e macrófagos, contribuindo para o processo de indução de fibrose e inflamação (DONG et al., 2020; KORBECKI; BAJDAK-RUSINEK, 2019). Ademais, o PA pode induzir morte piroptótica em células epiteliais hepáticas de maneira dependente da formação do inflamassoma (ZENG et al., 2020). Outrossim, PA promove a invasividade de células AsPC-1 de câncer de pâncreas por meio do seu reconhecimento pelo TLR4 e da ativação do inflamassoma (BINKER-COSEN et al., 2017). Além disso, o PA promove a formação de metástases pulmonares pelo melanoma, devido à ativação da via TLR4/TRIF/Pel1, resultando na ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B e na produção de citocinas como IL-6 (ZHANG et al., 2022).

O ômega-3, por sua vez, possui efeitos distintos dos do ácido palmítico no contexto da ativação do inflamassoma. É descrito que os ômega-3 podem diminuir a ativação do inflamassoma em diversos tipos celulares como adipócitos e macrófagos (LEE; MIDGETTE; SHAH, 2019; WILLIAMS-BEY et al., 2014). Por outro lado, é descrito que DHA pode induzir morte piroptótica em câncer de mama (PIZATO et al., 2018). Reforçando que o efeito do ômega-3 varia conforme o tipo celular estimulado.

Levando em consideração o papel emergente e dubio de mortes líticas, como a piroptose, em cânceres, além da possibilidade de reparo da membrana citoplasmática (FANG et al., 2020; JIMENEZ et al., 2014). Avaliamos se estaria ocorrendo indução de morte decorrentes da perda da integridade de membrana celular em células adenocarcinoma pancreático estimuladas com esses lipídeos.

Nossos resultados apontam que nenhuma das concentrações analisadas de ácido palmítico induziu poros nas células MIA PaCa-2 nos períodos de 0 a 72 horas. Em contrapartida, embora o estímulo com DHA tenha resultado na permeabilidade a iodeto de propídio em tempos tardios de 48 e 72 horas, não houve formação precoce de poros em até 8 horas. Ademais, constatamos que não ocorreu liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) pela membrana das células MIA PaCa-2 nos tempos de 24, 48 e 72 horas.

Levando em conta a diferença de massa molecular dessas moléculas (0.67 kD para o PI e de 140 kD para o LDH) e a relação entre massa e tamanho molecular, essa diferença de tamanho das moléculas pode explicar a permeabilidade ao PI e a impermeabilidade ao

LDH observada nos resultados (SILVA; DO VALE; DOS SANTOS, 2008). Em contraste com os poros maiores formados na morte lítica, como a piroptose mediada pela família de proteínas gasdermina, outros poros podem estar presentes na membrana plasmática das células.

Um exemplo que pode possibilitar esse fenômeno é a proteína canal Pannexina 1 (PANX1), que permite a passagem de moléculas de até aproximadamente 1.5 kDa (QIU; DAHL, 2009; WANG et al., 2007). A principal função desse canal, quando aberto, é permitir a liberação de ATP, que possui cerca de 0,5 kDa de massa, para o espaço extracelular (DAHL, 2015). Ademais, foi demonstrado que o PANX1 participa do processo de captação de iodeto de propídio, e a sua inibição reduz essa captação (SEMINARIO-VIDAL et al., 2009, 2011). Esse canal também está associado a diferentes formas de morte celular como a apoptose, necrose e piroptose (CRESPO YANGUAS et al., 2017). Além disso, a expressão de PANX1 é aumentada em células de adenocarcinoma pancreático (ONCODB, 2021).

Outro ponto a ser explorado no futuro é a possibilidade de ativação do sistema de reparo da membrana celular na resposta e no controle da morte celular. Os Complexos de Classificação Endossomal Requeridos para Transporte (ESCRT) são essenciais para a formação de corpos multivesiculares a partir da citocinese da membrana plasmática e também podem mediar o reparo da membrana, excisando segmentos com pequenos poros (JIMENEZ et al., 2014). Ao promover o selamento de poros, esse sistema inibe mortes líticas como a piroptose, de modo que, e inibição dos complexos, por exemplo, pela utilização de BAPTA, um quelante de cálcio, pode desfazer essa proteção (RÜHL et al., 2018). A expressão de várias proteínas que formam o complexo ESCRT-III, envolvido em todas as funções associadas aos ESCRTs, é constitutiva ou está aumentada no adenocarcinoma (ONCODB, 2021).

Para averiguar a possibilidade de indução de morte lítica na linhagem MIA PaCa-2, estimulamos essas células com LPS e nigericina, agentes clássicos indutores de piroptose. O resultado indica que ao longo de 8 horas, ocorreu a formação de pequenos poros e captação de iodeto de propídio na membrana dessas células. Ainda é preciso averiguar se, com esse estímulo, as células estariam permeáveis também a moléculas maiores, como o LDH, e avaliar a atuação do seu sistema de reparo.

Além da indução de morte celular, ácidos graxos também podem modular o perfil de secreção de diversas citocinas, que são moléculas reguladoras da inflamação, e podem ser secretadas durante a indução de processos de morte celular. A interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) é um dos mediadores inflamatórios mais importantes, sendo essencial para a resposta contra patógenos (VAN DE VEERDONK et al., 2011). Ao mesmo tempo, a IL-1 $\beta$  está associada a doenças inflamatórias como artrite reumatoide, doenças autoimunes, dentre outras (SATO et al., 2015). No contexto do câncer, a IL-1 $\beta$  está associada a uma maior invasividade tumoral. A IL-1 $\beta$ , assim como a IL-6, induzem a expansão de linfócitos B reguladores, contribuindo para o perfil imunossupressivo do microambiente tumoral do ADP (TAKAHASHI et al., 2021). A IL-1 $\beta$  não é sintetizada contendo um peptídeo sinal, sendo a sua secreção ocorre por meio da formação de poros na membrana celular, pela ação dos transportadores da família cassete de ligação ao ATP (Do inglês *ATP-Binding Cassette*, ABC), ou ainda, pela liberação de exossomos ou microvesículas (EDER, 2009).

De maneira similar, nossos resultados demonstraram que o ácido palmítico reduziu, nas duas concentrações analisadas, a secreção de IL-1 $\beta$  para o espaço extracelular. Essa diferença de secreção pode ter ocorrido devido à modulação da expressão da citocina ou pela diminuição da sua secreção por meio de transportadores, vesículas ou exossomos.

Outra citocina inflamatória importante é a interleucina-6 (IL-6). Os níveis de IL-6 circulantes são mais elevados em pacientes com adenocarcinoma pancreático (EBRAHIMI et al., 2004). Ademais, concentrações elevadas circulantes dessa citocina estão associadas à menor sobrevida de pacientes e com a progressão do ADP (EBRAHIMI et al., 2004; RAMSEY et al., 2019). De modo que, a inibição de IL-6 em camundongos mitigou os efeitos da doença, diminuindo a chance de recorrência e o tamanho dos tumores (GOUMAS et al., 2015).

O mecanismo proposto para a ação da IL-6 no adenocarcinoma ocorre por meio da ativação tanto da STAT3 quanto da MAPK, promovendo o crescimento tumoral (LESINA et al., 2011; ZHANG et al., 2013). A IL-6 é essencial para a metaplasia de células acinares em ductais, sendo que camundongos knockout para IL-6 apresentam um menor número de lesões pré-tumorais; no entanto, essa redução é revertida pelo tratamento com o antioxidante N-acetilcisteína (ZHANG et al., 2013). A ativação de via da MAPK leva à ativação do fator de transcrição Nrf2, que resulta na detoxificação de espécies reativas, de modo que, a deleção de Nrf2 causa a morte de células de câncer de

pâncreas (DENICOLA et al., 2011). Isso demonstra o papel chave da IL-6 na resistência tumoral ao estresse oxidativo.

Ademais, ao ativar as vias MAPK e STAT3, que estão associadas à resistência à apoptose, a IL-6 promove a produção de VEGF, um fator de indução da angiogênese. Além disso, estimula a produção de metaloproteinases, enzimas que degradam a matriz extracelular, facilitando a invasão tumoral de novos tecidos (FEURINO et al., 2007). A IL-6 também induz apoptose em células dendríticas e inibe o seu processo de diferenciação, comprometendo seu potencial como células apresentadoras de antígenos e a ativação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> (LIN et al., 2020). Ademais, IL-6 induz diferenciação e expansão de células supressoras derivadas de mieloide, como os macrófagos associados ao tumor, que, sob a ação da IL-6, são modulados para um fenótipo M2, mais imunossupressivo (VAN DUIJNEVELDT; GRIFFIN; PUTOCZKI, 2020).

Nossos resultados corroboram os dados da literatura, demonstrando que o ácido palmítico na concentração de 50  $\mu$ M aumentou a quantidade secretada de IL-6 pelas células tumorais MIA PaCa-2, o que indica um possível mecanismo que pode promover a progressão e o microambiente tumoral do adenocarcinoma pancreático.

O fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) é outra citocina pró-inflamatória importante para o ADP. Outras células que compõem o pâncreas são as células estreladas pancreáticas. Essas células permanecem em estado quiescente em um pâncreas saudável, entretanto, o TNF- $\alpha$ , assim como IL-6, ativa essas células, que passam a modular o microambiente tumoral, promovendo a inflamação e a desmoplasia (MASAMUNE; SHIMOSEGAWA, 2009). O TNF- $\alpha$  é importante para a resistência à morte apoptótica e para a formação de metástases em diferentes tipos de câncer (WU; ZHOU, 2010). A expressão de TNF- $\alpha$  também está associada à de CXCR4 e do seu ligante CXCL12, que estão associados à formação de metástase e à sobrevivência tumoral em diversas células cancerosas (BALKWILL, 2004). Nossos dados demonstraram que nos tempos e condições analisados não ocorreu modulação significativa na secreção de TNF- $\alpha$ .

Além da inflamação, a resistência à morte celular e a proliferação descontrolada das células cancerosas estão entre os principais *hallmarks* tumorais que impulsionam a progressão da doença (HANAHAHAN, 2022). O ácido palmítico exerce efeitos distintos sobre o potencial proliferativo de diferentes linhagens celulares tumorais. O PA, na concentração de 50  $\mu$ M, reduz a capacidade proliferativa das células PC3 e DU145 de

câncer de próstata, assim como a de diversas linhagens de câncer gástrico (YU et al., 2023; ZHU et al., 2021). Ao mesmo tempo, na linhagem celular Caco-2, de adenocarcinoma colorretal humano, o estímulo com ácido palmítico nas concentrações entre 20 a 100  $\mu\text{M}$  não reduz a sua capacidade proliferativa, além disso, o estímulo com pequenas concentrações de 0 a 20  $\mu\text{M}$  pode aumentá-la (NANO et al., 2003).

Nesse contexto, na linhagem AsPC-1 de câncer de pâncreas, o estímulo com 200  $\mu\text{M}$  foi benéfico para o tumor, aumentando sua capacidade invasiva (BINKER-COSEN et al., 2017). Ademais, já foi demonstrado que o estímulo com 50  $\mu\text{M}$  de ácido palmítico não foi citotóxico mesmo após 6 dias de exposição em linhagens de adenocarcinoma pancreático; nessas mesmas condições, membros da família do ômega-3 incluindo o ácido docosaexaenoico causaram redução do crescimento celular (FALCONER et al., 1994). A inibição do crescimento tumoral causada pelo ômega-3 foi demonstrada em diversas linhagens tumorais incluindo as de pâncreas (SCHLEY et al., 2005; SONG et al., 2011; YIN et al., 2017).

Nossos resultados acrescentam à literatura evidências de que o efeito do ácido palmítico não causa citotoxicidade e não modula a capacidade proliferativa das células MIA PaCa-2. Além disso, nossos dados corroboram os dados da literatura ao demonstrar a citotoxicidade e a redução da capacidade proliferativa induzidas pelo ácido docosaexaenoico nas células MIA PaCa-2.

Um dos mecanismos que podem mediar a morte celular é a produção de espécies reativas, de modo que, a sua produção e neutralização afetam diversos processos celulares, incluindo inflamação e sobrevivência. Ácidos graxos de cadeia longa podem ser incorporados a membranas celulares, incluindo a membrana plasmática e a membrana mitocondrial, alterando a sua fluidez (FUENTES et al., 2018). A alteração da fluidez causada pela incorporação de ácidos graxos na membrana interna da mitocôndria pode possibilitar o vazamento de elétrons, de forma a estimular a produção de espécies reativas de oxigênio (SCHÖNFELD; WOJTCZAK, 2008). Ácidos graxos também podem interferir no sistema antioxidante da glutathione, reduzindo seus níveis em células tumorais (MERENDINO et al., 2005).

Nesse contexto, ácidos graxos de cadeia longa, como o ácido palmítico e o ácido docosaexaenoico, podem impactar as células que os incorporam, influenciando seus processos fisiológicos e patológicos. Já foi demonstrado que, em células saudáveis ou

tumorais, ao menos parte da indução de apoptose causada pelo ácido palmítico decorre da produção de espécies reativas (GEHRMANN; ELSNER; LENZEN, 2010; YU et al., 2019). Em contrapartida, o DHA pode induzir seletivamente a produção de espécies reativas em células cancerosas, comprometendo o crescimento tumoral (KANG et al., 2010; YIN et al., 2017). Ademais, a morte induzida pelo ácido docosaexaenoico na linhagem celular PaCa-44 de câncer de pâncreas ocorre devido à peroxidação lipídica mediante extrusão de glutathione reduzida, de forma a minar o potencial antioxidativo do tumor (MERENDINO et al., 2005).

Observamos que o ácido palmítico não induziu a produção de espécies reativas na linhagem celular MIA PaCA-2 nos tempos analisados, enquanto o ácido docosaexaenoico causou a produção de espécies reativas em tempos precoces de até 6 horas e no tempo de 24 horas, ambos de forma dose dependente. Além disso, demonstramos que a inibição dessas espécies reativas com o antioxidante N-Acetilcisteína foi suficiente para reverter a morte induzida pelo DHA nessa linhagem celular.

A mitocôndria, é uma organela chave para o metabolismo celular sendo relevante em diversos contextos como a produção de energia e espécies reativas. A mitocôndria possui duas membranas lipoproteicas, sendo que a interna forma as cristas mitocondriais e dentre seus constituintes estão presentes as proteínas integrantes da cadeia respiratória ou cadeia transportadora de elétrons. A cadeia transportadora utiliza as coenzimas carreadoras de elétrons produzidas pelo metabolismo celular, para gerar um gradiente de prótons que é utilizado para produzir a molécula energética adenosina trifosfato (ATP) pela enzima ATP sintase (BONORA et al., 2012).

Considerando a importância da mitocôndria para a homeostase celular, essa organela também desempenha um papel fundamental no modo de ação dos lipídios no contexto tumoral. A mitocôndria é o local onde ocorre a beta-oxidação, processo no qual ácidos graxos são oxidados, gerando moléculas energéticas que podem ser utilizadas pela célula cancerosa. Alterações mitocondriais, como mudanças na sua composição lipídica, podem levar à produção de espécies reativas (SCHÖNFELD; WOJTCZAK, 2008). Estudos demonstraram que ácidos graxos poli-insaturados, como os ômega-3, podem causar a perda do potencial de membrana mitocondrial em células cancerosas ao permitir o vazamento de prótons (SCHLEY et al., 2005; SO; LIU; LEUNG, 2015). A perda do potencial de membrana mitocondrial está associada à permeabilidade da sua membrana,

processo que permite a liberação do citocromo C para o citosol, onde é reconhecido como um DAMP e induz apoptose pela via intrínseca (WU; BRATTON, 2013).

Nossos resultados corroboram os dados da literatura, demonstrando que, durante o processo citotóxico causado pelo ácido docosaenoico, ocorreu a perda do potencial de membrana das células MIA PaCa-2. Contudo, análises adicionais são necessárias para caracterizar o efeito desse estímulo, incluindo a avaliação da capacidade respiratória e de proteínas relacionadas à disfunção mitocondrial.

Além dos efeitos diretos na funcionalidade mitocondrial, é importante considerar como essas alterações celulares podem influenciar o microambiente tumoral. No adenocarcinoma pancreático, o processo de desmoplasia leva à síntese excessiva de fibras, resultando em fibrose e hipóxia tecidual. Esse processo de fibrose é intensificado pela IL-6, que, por sua vez, é aumentada pelo fator induzível por hipóxia (HIF-1) (LI et al., 2022; ZHANG et al., 2023). A hipóxia é um marcador de agressividade tumoral do adenocarcinoma pancreático (BAO et al., 2012). A fibrose dificulta o acesso de fármacos, comprometendo vários tratamentos para este câncer; entretanto, a hipóxia resultante pode causar estresse nas células cancerosas.

Dentre os recursos empregados pela célula tumoral para sobreviver na falta de oxigênio, é a biogênese de corpúsculos lipídicos. Os corpúsculos lipídicos é uma organela essencial para a manutenção da homeostase celular, atuando como reserva energética na forma de ácidos graxos (DUCHARME; BICKEL, 2008; OLZMANN; CARVALHO, 2019; ZADOORIAN; DU; YANG, 2023). Dessa forma, a captação e síntese de ácidos graxos assim como o seu armazenamento nos corpúsculos lipídicos são induzidas pela hipóxia (BENSAAD et al., 2014; FURUTA et al., 2008).

Entre os *hallmarks* tumorais, alterações no metabolismo lipídico são cruciais para a progressão da doença. A enzima ácido-graxo sintase (do inglês *Fatty acid synthase*, FAS), que realiza a síntese de lipídeos, está aumentada em diversos tipos de cânceres, inclusive no adenocarcinoma pancreático, essa produção de ácidos graxos é importante para suprir a síntese da bicamada fosfolipídica necessária à divisão celular (BIAN et al., 2015). Além disso, o nível circulante dessa enzima também está elevado em pacientes com essa doença, associando-se à resistência a terapias como o tratamento com gencitabina (WALTER et al., 2009; YOUYUN YANG et al., 2011).



Os corpúsculos lipídicos também são um dos principais sítios de produção de citocinas, desempenhando um papel na modulação da inflamação. Essa modulação ocorre em grande medida devido à metabolização de ácidos graxos das famílias ômega-6 e ômega-3, que competem pelas enzimas cicloxigenases (COXs) e lipoxigenases (LOXs) (LE et al., 2009). A metabolização dessas duas famílias de ácidos graxos produz mediadores pró-inflamatórios ou pró-resolutivos, respectivamente (CALDER, 2017; INNES; CALDER, 2018; PHILIP C. CALDER; YAQOOB, 2009). Ademais, essas duas famílias têm efeitos opostos no adenocarcinoma pancreático: enquanto os ácidos graxos ômega-6 promovem o crescimento tumoral de células de ADP com alta expressão de cicloxigenase 2, os ômega-3 reduz esse crescimento (FUNAHASHI et al., 2008).

No entanto, o papel dos corpúsculos lipídicos não está completamente elucidado no contexto do adenocarcinoma pancreático. Nossos resultados demonstram que, a partir de 48 horas, o ácido palmítico na concentração de 200  $\mu$ M levou a um aumento na biogênese de corpúsculo lipídicos, efeito não observado nas outras condições. Além disso, nos constatamos um aumento no número de gotículas lipídicas em células MIA PaCa-2 estimuladas com os ácidos graxos, com o ácido palmítico induzindo a formação de gotículas maiores, enquanto o ácido docosaexaenoico induziu a formação de gotículas menores que as encontradas nas demais condições.

Nesse contexto, observamos o acúmulo de gotículas lipídicas nas extremidades das projeções das células MIA PaCa-2 visualizadas por microscopia óptica. Dessa forma, questionamos qual seria o efeito desses ácidos graxos na formação de projeções celulares. Nossos resultados sugerem que o PA aumenta o número de projeções celulares, enquanto o DHA as reduz. As projeções celulares são importantes para processos de aderência e mobilidade das células, sendo, portanto, relevantes no contexto tumoral podendo atuar na migração celular e invasão de tecidos (ALEKSEENKO et al., 2024; LEONG et al., 2014). Assim, nossos resultados podem estar relacionados ao aumento de invasividade do ADP quando estimulado com PA observada em outro trabalho (BINKER-COSEN et al., 2017). Além da redução do potencial invasivo de tumores causada pelo DHA (D'ELISEO et al., 2012).

Diante dos resultados obtidos neste trabalho, sugere-se que o ácido palmítico não é citotóxico para as células MIA PaCa-2. Pelo contrário, induziu a biogênese de corpúsculos lipídicos, que estão associados a um pior prognóstico no ADP, promovendo a migração tumoral e contribuindo para a resistência contra quimioterápicos e estresse energético.

Além disso, o PA aumentou o número de projeções celulares, que podem estar relacionadas a migração celular. O PA também modulou o perfil de secreção de citocinas, que podem contribuir para a imunossupressão do microambiente tumoral. Ademais, sugerimos que o ácido docosaexaenoico não modulou a biogênese de corpúsculos lipídicos nem a secreção de citocinas inflamatórias. O DHA também reduziu a proliferação das células MIA PaCa-2 e o número de projeções celulares, induzindo a produção de espécies reativas, a perda de potencial de membrana mitocondrial e indução de apoptose.

Considerando a relevância do metabolismo lipídico para os tumores, perspectivas futuras incluem a investigação dos efeitos da inibição de componentes da síntese de lipídios e da formação de corpúsculos lipídicos no adenocarcinoma pancreático (BOZZA; VIOLA, 2010; SUNAMI; REBELO; KLEEFF, 2018). Nesse contexto, buscamos avaliar o efeito do corpúsculo lipídico no adenocarcinoma pancreático por meio da inibição da enzima diacilglicerol aciltransferases 1 (DGAT1). Essa enzima é necessária para o armazenamento de ácidos graxos no corpúsculo lipídico, tendo em vista que ela realiza a adição de uma molécula de ácido graxo a uma molécula de diacilglicerol, formando um triacilglicerol, que pode ser armazenado no corpúsculo (YEN et al., 2008). A DGAT1 está localizada no retículo endoplasmático e é necessária para a síntese de gotículas lipídicas menores derivadas dessa organela, de forma que, o seu bloqueio compromete a biogênese dessa organela (HERNÁNDEZ-CORBACHO; OBEID, 2019). Além disso, pretendemos analisar alterações morfológicas das mitocôndrias e proteínas associadas à sua dinâmica.

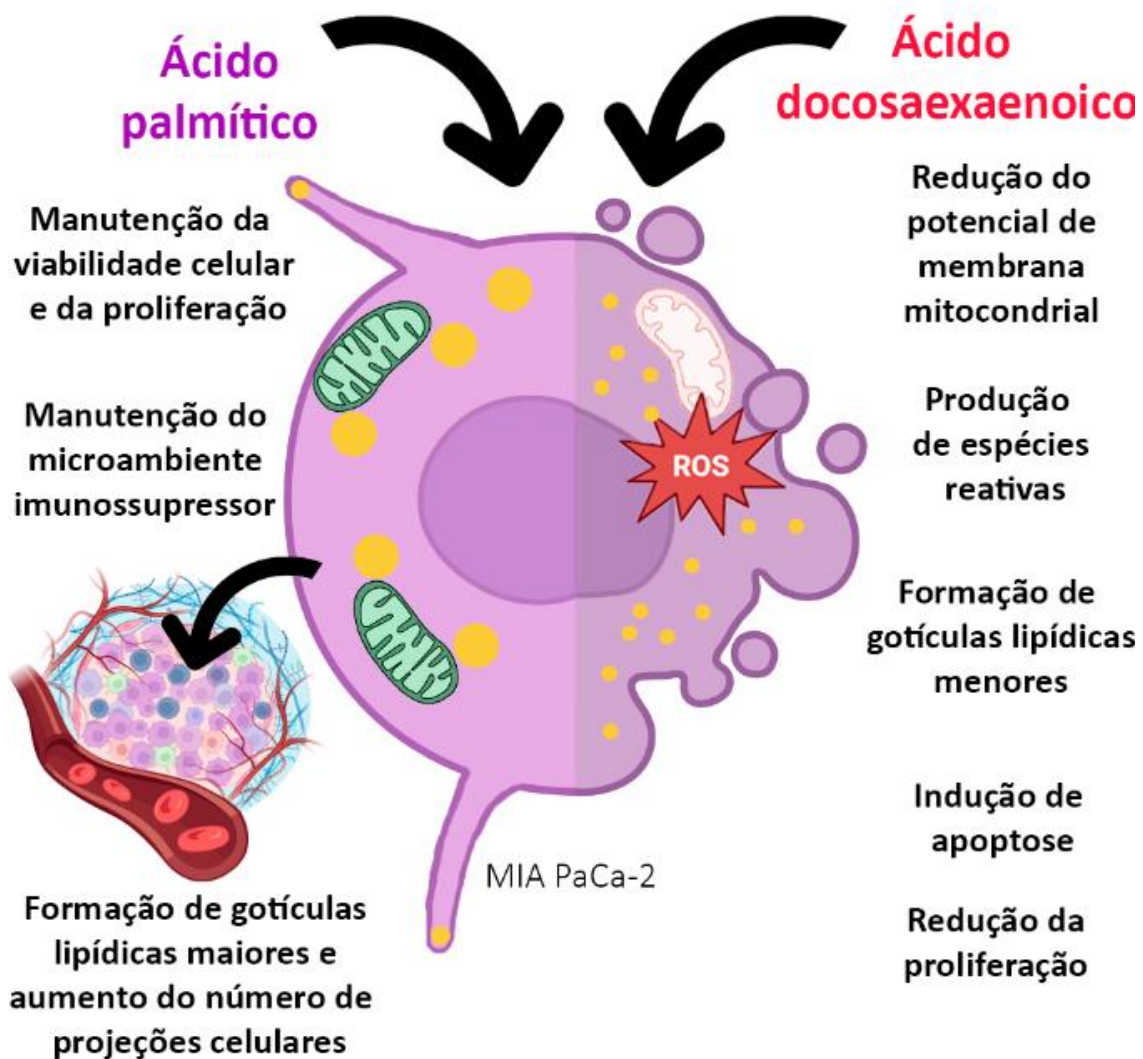
## 7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos nesse trabalho, concluímos que o ácido palmítico e o ácido docosaexaenoico exerceram efeitos distintos na modulação de parâmetros carcinogênicos das células MIA PaCa-2 (Figura 32).

Verificamos que o ácido palmítico não comprometeu a viabilidade mitocondrial da linhagem e nem a capacidade proliferativa, pelo contrário, observamos que induziu a biogênese de corpúsculos lipídicos, que estão associados na literatura a um maior potencial invasivo do câncer e resistência a quimioterápicos. Além disso sugerimos que pode levar a um aumento do número de projeções celulares, que podem estar relacionadas a mobilidade celular. Por fim, nossos achados indicam uma modulação da secreção de citocinas pró-inflamatórias, com aumento da IL-6 e diminuição da IL-1 $\beta$ .

Também demonstramos neste estudo o potencial efeito citotóxico do ácido docosaexaenoico na linhagem MIA PaCa-2, reduzindo sua viabilidade mitocondrial e capacidade proliferativa por meio da indução de morte celular. Outrossim, sugerimos que a morte induzida pelo DHA nessa linhagem é dependente da formação de espécies reativas. Ademais, nossos dados sugerem que o estímulo com DHA não aumentou a biogênese de corpúsculos lipídicos, associados a um pior prognóstico pela literatura.

Dessa forma, este trabalho demonstra que o ácido palmítico causa alterações celulares não tóxicas a linhagem celular MIA PaCa-2, que podem alterar sua organização espacial, modular seu microambiente tumoral e potencial de migração. Ademais, destacamos o potencial efeito antitumoral do ácido docosaexaenoico contra células de câncer pancreático *in vitro*, sugerindo novas possibilidades terapêuticas que podem ser exploradas como ferramentas promissoras no tratamento dessa doença.



**Figura 32 - Papel do ácido palmítico e do ácido docosaexaenoico em células de câncer de adenocarcinoma pancreático humano MIA PaCa-2.** O Ácido palmítico não apresentou efeitos citotóxicos ou citostáticos em células MIA PaCa-2, *promovendo a* biogênese de gotículas lipídicas grandes e aumentou a secreção de IL-6 que pode modular o microambiente tumoral. Além disso, *aparenta induzir* o número de projeções celulares, que podem estar relacionadas a migração celular. Em contrapartida, o ácido docosaexaenoico *reduziu* a capacidade proliferativa de células MIA PaCa-2 por meio da indução de apoptose e perda de potencial mitocondrial, além de *induzir aumento* no número de pequenas gotículas lipídicas e diminuir o número de projeções celulares (Fonte: autoria própria – criado utilizando BioRender e Photoshop).

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AÇAR, Y.; AKBULUT, G. **Nutritional Epigenetics and Phytochemicals in Cancer Formation.** *Journal of the American Nutrition Association.* Routledge, 2023.

ALEKSEENKO, I. et al. **Tumor Cell Communications as Promising Supramolecular Targets for Cancer Chemotherapy: A Possible Strategy.** *International Journal of Molecular Sciences.* Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 1 out. 2024.

AN, J.; KWON, H.; KIM, Y. J. The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio as a Risk Factor of Breast Cancer. *Journal of Clinical Medicine*, v. 12, n. 6, 1 mar. 2023.

ANIL, E. The impact of EPA and DHA on blood lipids and lipoprotein metabolism: Influence of apoE genotype. *Proceedings of the Nutrition Society*, v. 66, n. 1, p. 60–68, 2007.

ATKINSON, M. A. et al. **Organisation of the human pancreas in health and in diabetes.** *Diabetologia* Springer, 1 out. 2020.

AVGERINOS, K. I. et al. **Obesity and cancer risk: Emerging biological mechanisms and perspectives.** *Metabolism: Clinical and Experimental.* W.B. Saunders, 1 mar. 2019.

BALKWILL, F. The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. *Seminars in Cancer Biology*, v. 14, n. 3, p. 171–179, 2004.

BAO, B. et al. Hypoxia-Induced Aggressiveness of Pancreatic Cancer Cells Is Due to Increased Expression of VEGF, IL-6 and miR-21, Which Can Be Attenuated by CDF Treatment. *PLoS ONE*, v. 7, n. 12, 13 dez. 2012.

BARCELÓ-COBLIJN, G.; MURPHY, E. J. **Alpha-linolenic acid and its conversion to longer chain n-3 fatty acids: Benefits for human health and a role in maintaining tissue n-3 fatty acid levels.** *Progress in Lipid Research*, nov. 2009.

BENSAAD, K. et al. Fatty acid uptake and lipid storage induced by HIF-1 $\alpha$  contribute to cell growth and survival after hypoxia-reoxygenation. *Cell Reports*, v. 9, n. 1, p. 349–365, 9 out. 2014.

BIAN, Y. et al. Up-regulation of fatty acid synthase induced by EGFR/ERK activation promotes tumor growth in pancreatic cancer. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 463, n. 4, p. 612–617, 13 jul. 2015.

BINKER-COSEN, M. J. et al. Palmitic acid increases invasiveness of pancreatic cancer cells AsPC-1 through TLR4/ROS/NF- $\kappa$ B/MMP-9 signaling pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 484, n. 1, p. 152–158, 26 fev. 2017.

BIRT, D. F. et al. **and at a Controlled Calorie Intake ad Libitum High-Fat Diet Enhancement of Pancreatic Carcinogenesis in Hamsters Fed a Citing Articles E-mail alerts Enhancement of Pancreatic Carcinogenesis in Hamsters Fed a High-Fat Diet ad Libitum and at a Controlled Calorie Intake**<sup>1</sup>. Disponível em:  
<<http://cancerres.aacrjournals.org/content/49/21/5848><http://cancerres.aacrjournals.org/content/49/21/5848#related-urls>>.

BONORA, M. et al. **ATP synthesis and storage. Purinergic Signalling**, set. 2012.

BOZZA, P. T.; VIOLA, J. P. B. Lipid droplets in inflammation and cancer. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 82, n. 4–6, p. 243–250, abr. 2010.

BUSQUETS-HERNÁNDEZ, C.; TRIOLA, G. **Palmitoylation as a Key Regulator of Ras Localization and Function. Frontiers in Molecular Biosciences**. Frontiers Media S.A., 17 mar. 2021.

CALDER, P. C. **Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**. Elsevier, 2015.

CALDER, P. C. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: From molecules to man. **Biochemical Society Transactions**, v. 45, n. 5, p. 1105–1115, 2017.

CARTA, G. et al. **Palmitic acid: Physiological role, metabolism and nutritional implications. Frontiers in Physiology**. Frontiers Media S.A., 8 nov. 2017.

CHANG, H. H. et al. Incidence of pancreatic cancer is dramatically increased by a high fat, high calorie diet in KrasG12D mice. **PLoS ONE**, v. 12, n. 9, 1 set. 2017.

CHENG JIN; LING BAI. Pancreatic Cancer: Current Situation and Challenges. **Gastroenterology & Hepatology Letters**, v. 2, n. 1, p. 1–3, 24 fev. 2020.

CHOLEWSKI, M.; TOMCZYKOWA, M.; TOMCZYK, M. **A comprehensive review of chemistry, sources and bioavailability of omega-3 fatty acids**. **Nutrients**. MDPI AG, 4 nov. 2018.

COLOMER, R. et al. n-3 fatty acids, cancer and cachexia: A systematic review of the literature. **British Journal of Nutrition**, v. 97, n. 5, p. 823–831, 2007.

CRESPO YANGUAS, S. et al. **Pannexin1 as mediator of inflammation and cell death**. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**. Elsevier B.V., 1 jan. 2017.

CRUZ, A. L. S. et al. Lipid droplets: platforms with multiple functions in cancer hallmarks. **Cell Death and Disease**, v. 11, n. 2, 2020.

DAGOGO-JACK, I.; SHAW, A. T. **Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies**. **Nature Reviews Clinical Oncology**. Nature Publishing Group, 1 fev. 2018.

DAHL, G. ATP release through pannexon channels. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 370, n. 1672, p. 1–11, 5 jul. 2015.

D'ELISEO, D. et al. Docosahexaenoic acid inhibits invasion of human RT112 urinary bladder and PT45 pancreatic carcinoma cells via down-modulation of granzyme B expression. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, n. 5, p. 452–457, 2012.

D'ELISEO, D.; VELOTTI, F. Omega-3 Fatty Acids and Cancer Cell Cytotoxicity: Implications for Multi-Targeted Cancer Therapy. **Journal of Clinical Medicine**, v. 5, n. 2, p. 15, 26 jan. 2016.

DENICOLA, G. M. et al. Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. **Nature**, v. 475, n. 7354, p. 106–110, 7 jul. 2011.

DIVELLA, R. et al. **Obesity and cancer: The role of adipose tissue and adipo-cytokines-induced chronic inflammation**. **Journal of Cancer**. Ivyspring International Publisher, 2016.

DONALDSON, M. S. **Nutrition and cancer: A review of the evidence for an anti-cancer diet**. **Nutrition Journal**, 20 out. 2004.

DONG, Z. et al. Palmitic acid stimulates NLRP3 inflammasome activation through TLR4-NF- $\kappa$ B signal pathway in hepatic stellate cells. **Annals of Translational Medicine**, v. 8, n. 5, p. 168–168, mar. 2020.

DUCHARME, N. A.; BICKEL, P. E. Minireview: Lipid droplets in lipogenesis and lipolysis. **Endocrinology**, v. 149, n. 3, p. 942–949, 2008.

DYALL, S. C. Long-chain omega-3 fatty acids and the brain: A review of the independent and shared effects of EPA, DPA and DHA. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 7, n. APR, p. 1–15, 2015.

EBRAHIMI, B. et al. Cytokines in pancreatic carcinoma: Correlation with phenotypic characteristics and prognosis. **Cancer**, v. 101, n. 12, p. 2727–2736, 15 dez. 2004.

EBRAHIMI, S. et al. Targeting the Akt/PI3K Signaling Pathway as a Potential Therapeutic Strategy for the Treatment of Pancreatic Cancer. **Current Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 13, 23 jun. 2017.

EDER, C. **Mechanisms of interleukin-1 $\beta$  release**. **Immunobiology**, jul. 2009.

EIBL, G.; ROZENGURT, E. **Obesity and pancreatic cancer: Insight into mechanisms**. **CancersMDPI**, 1 out. 2021.

ENGLISH, A.; IRWIN, N. **Nonclassical Islet Peptides: Pancreatic and Extrapancreatic Actions**. **Clinical Medicine Insights: Endocrinology and Diabetes**. SAGE Publications Ltd, 2019a.

ENGLISH, A.; IRWIN, N. **Nonclassical Islet Peptides: Pancreatic and Extrapancreatic Actions**. **Clinical Medicine Insights: Endocrinology and Diabetes**, v. 12, n. Figure 1, 2019b.

FABIAN, C. J.; KIMLER, B. F.; HURSTING, S. D. Omega-3 fatty acids for breast cancer prevention and survivorship. **Breast Cancer Research**, v. 17, n. 1, p. 1–11, 2015.

FALCONER, J. et al. **Effect of eicosapentaenoic acid and other fatty acids on the growth in vitro of human pancreatic cancer cell lines** **Br. J. Cancer**.



FANG, Y. et al. **Pyroptosis: A new frontier in cancer.** *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Elsevier Masson SAS, 1 jan. 2020.

FATIMA, S. et al. **Palmitic acid is an intracellular signaling molecule involved in disease development.** *Cellular and Molecular Life Sciences* Birkhauser Verlag AG, 15 jul. 2019.

FEURINO, L. W. et al. IL-6 stimulates Th2 type cytokine secretion and upregulates VEGF and NRP-1 expression in pancreatic cancer cells. **Cancer Biology and Therapy**, v. 6, n. 7, p. 1096–1100, 2007.

**Food, Nutrition, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective.**

FREITAS, R. D. S.; CAMPOS, M. M. **Protective effects of omega-3 fatty acids in cancer-related complications.** *Nutrients* MDPI AG, 1 maio 2019.

FUENTES, N. R. et al. **Omega-3 fatty acids, membrane remodeling and cancer prevention.** *Molecular Aspects of Medicine*. Elsevier Ltd, 1 dez. 2018.

FUNAHASHI, H. et al. **Opposing Effects of n-6 and n-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Pancreatic Cancer Growth.** Acesso em: 9 fev. 2025.

FURUTA, E. et al. Fatty acid synthase gene is up-regulated by hypoxia via activation of Akt and sterol regulatory element binding protein-1. **Cancer Research**, v. 68, n. 4, p. 1003–1011, 15 fev. 2008.

GALBETE, C. et al. **Evaluating Mediterranean diet and risk of chronic disease in cohort studies: an umbrella review of meta-analyses.** *European Journal of Epidemiology*. Springer Netherlands, 1 out. 2018.

GARCIA, D. I. et al. High-Fat Diet Drives an Aggressive Pancreatic Cancer Phenotype. **Journal of Surgical Research**, v. 264, p. 163–172, 1 ago. 2021.

GEHRMANN, W.; ELSNER, M.; LENZEN, S. Role of metabolically generated reactive oxygen species for lipotoxicity in pancreatic  $\beta$ -cells. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 12, n. SUPPL. 2, p. 149–158, 2010.

GOUMAS, F. A. et al. Inhibition of IL-6 signaling significantly reduces primary tumor growth and recurrences in orthotopic xenograft models of pancreatic cancer. **International Journal of Cancer**, v. 137, n. 5, p. 1035–1046, 1 set. 2015.

GROSE, R. P.; SENG, S. S. Cite this article: Seng SS, Grose RP. **Open Biol**, v. 11, 2021.

HANAHAN, D. **Hallmarks of Cancer: New Dimensions. Cancer Discovery**. American Association for Cancer Research Inc., 1 jan. 2022.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HEINEMANN, V.; GROSSHADERN, K. **Gemcitabine: Progress in the Treatment of Pancreatic CancerOncology**. Disponível em: <[www.karger.comwww.karger.com/journals/ocl](http://www.karger.comwww.karger.com/journals/ocl)>.

HERNÁNDEZ-CORBACHO, M. J.; OBEID, L. M. **A novel role for DGATs in cancer. Advances in Biological Regulation**. Elsevier Ltd, 1 maio 2019.

HOLUB, B. J. Docosahexaenoic acid (DHA) and cardiovascular disease risk factors. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 81, n. 2–3, p. 199–204, 2009.

HU, J. X. et al. **Pancreatic cancer: A review of epidemiology, trend, and risk factors. World Journal of Gastroenterology**. Baishideng Publishing Group Co, 21 jul. 2021.

HUANG, B. Z. et al. New-Onset Diabetes, Longitudinal Trends in Metabolic Markers, and Risk of Pancreatic Cancer in a Heterogeneous Population. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 18, n. 8, p. 1812- 1821.e7, 1 jul. 2020.

HUANG, L. et al. Commitment and oncogene-induced plasticity of human stem cell-derived pancreatic acinar and ductal organoids. **Cell Stem Cell**, v. 28, n. 6, p. 1090- 1104.e6, 3 jun. 2021.

IHME. **Share of cancer deaths attributed to risk factors, World, 2021**.

IHME. **Share of cancer deaths attributed to different risk factors, World, 2021**.

IHME, G. B. OF D. **INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Cancer Tomorrow: Estimated numbers from 2022 to 2050.**

INNES, J. K.; CALDER, P. C. **Omega-6 fatty acids and inflammation. Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids.** Churchill Livingstone, 1 maio 2018.

JIMENEZ, A. J. et al. ESCRT machinery is required for plasma membrane repair. **Science**, v. 343, n. 6174, 2014.

KADANDALE, S.; MARTEN, R.; SMITH, R. The palm oil industry and noncommunicable diseases. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 97, n. 2, p. 118–128, 1 fev. 2019.

KANG, J. X. et al. **Modulation of Inflammatory Cytokines by Omega-3 Fatty Acids.**

KANG, K. S. et al. Docosahexaenoic acid induces apoptosis in MCF-7 cells In Vitro and In Vivo via reactive oxygen species formation and caspase 8 activation. **PLoS ONE**, v. 5, n. 4, 2010.

KENNEDY, A. et al. **Saturated fatty acid-mediated inflammation and insulin resistance in adipose tissue: Mechanisms of action and implications.** **Journal of Nutrition**, jan. 2009.

KLIMCAKOVA, E. et al. **Adipokines and dietary interventions in human obesity. Obesity Reviews** Blackwell Publishing Ltd, 2010.

KO, P.; DIXON, S. J. Protein palmitoylation and cancer. **EMBO reports**, v. 19, n. 10, out. 2018.

KOLBEINSSON, H. M. et al. **Pancreatic Cancer: A Review of Current Treatment and Novel Therapies.** **Journal of Investigative Surgery.** Taylor and Francis Ltd., 2023.

KORBECKI, J.; BAJDAK-RUSINEK, K. **The effect of palmitic acid on inflammatory response in macrophages: an overview of molecular mechanisms.** **Inflammation Research.** Birkhauser Verlag AG, 1 nov. 2019.

LE, H. D. et al. The essentiality of arachidonic acid and docosahexaenoic acid. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 81, n. 2–3, p. 165–170, ago. 2009.

LEE, K. R.; MIDGETTE, Y.; SHAH, R. Fish oil derived omega 3 fatty acids suppress adipose NLRP3 inflammasome signaling in human obesity. **Journal of the Endocrine Society**, v. 3, n. 3, p. 504–515, 1 mar. 2019.

LEONG, H. S. et al. Invadopodia Are Required for Cancer Cell Extravasation and Are a Therapeutic Target for Metastasis. **Cell Reports**, v. 8, n. 5, p. 1558–1570, 2014.

LESINA, M. et al. Stat3/Socs3 Activation by IL-6 Transsignaling Promotes Progression of Pancreatic Intraepithelial Neoplasia and Development of Pancreatic Cancer. **Cancer Cell**, v. 19, n. 4, p. 456–469, 2011.

LI, Y. et al. **The Role of IL-6 in Fibrotic Diseases: Molecular and Cellular Mechanisms.** **International Journal of Biological Sciences.** Ivyspring International Publisher, 2022.

LIN, J. H. et al. Type 1 conventional dendritic cells are systemically dysregulated early in pancreatic carcinogenesis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 217, n. 8, 3 ago. 2020.

LIN, Y. et al. LPCAT2-mediated lipid droplet production supports pancreatic cancer chemoresistance and cell motility. **International Immunopharmacology**, v. 139, 30 set. 2024.

LOOI, C. K. et al. **Therapeutic challenges and current immunomodulatory strategies in targeting the immunosuppressive pancreatic tumor microenvironment.** **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research.** BioMed Central Ltd., 15 abr. 2019.

LYON, FRANÇA. **Pancreas fact sheet.**

MANCINI, A. et al. **Biological and nutritional properties of palm oil and palmitic acid: Effects on health.** **Molecules.** MDPI AG, 1 set. 2015.

MANGALI, S. et al. Inhibition of protein kinase R protects against palmitic acid–induced inflammation, oxidative stress, and apoptosis through the JNK/NF-κB/NLRP3 pathway in cultured H9C2 cardiomyocytes. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 120, n. 3, p. 3651–3663, 1 mar. 2019.

MASAMUNE, A.; SHIMOSEGAWA, T. **Signal transduction in pancreatic stellate cells.** *Journal of Gastroenterology*, 2009.

MEMPEL, T. R.; LILL, J. K.; ALTENBURGER, L. M. **How chemokines organize the tumour microenvironment.** *Nature Reviews Cancer*. Nature Research, 1 jan. 2024.

MERENDINO, N. et al. Docosahexaenoic acid induces apoptosis in the human PaCa-44 pancreatic cancer cell line by active reduced glutathione extrusion and lipid peroxidation. *Nutrition and Cancer*, v. 52, n. 2, p. 225–233, 2005.

MICHALAK, N.; MAŁECKA-WOJCIESKO, E. **Modifiable Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC) Risk Factors.** *Journal of Clinical Medicine*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 1 jul. 2023.

MIYATA, H. et al. Randomized study of the clinical effects of  $\omega$ -3 fatty acid–containing enteral nutrition support during neoadjuvant chemotherapy on chemotherapy-related toxicity in patients with esophageal cancer. *Nutrition*, v. 33, p. 204–210, 2017.

MIZRAHI, J. D. et al. **Pancreatic cancer.** *The Lancet*. Lancet Publishing Group, 27 jun. 2020.

NANO, J. L. et al. Effects of fatty acids on the growth of Caco-2 cells. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, v. 69, n. 4, p. 207–215, 2003.

NARAYAN, B.; MIYASHITA, K.; HOSAKAWA, M. Physiological effects of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) - A review. *Food Reviews International*, v. 22, n. 3, p. 291–307, 2006.

NEWELL, M. et al. A critical review on the effect of docosahexaenoic acid (Dha) on cancer cell cycle progression. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 8, p. 1–14, 2017.

OHMOTO, A.; YACHIDA, S.; MORIZANE, C. **Genomic features and clinical management of patients with hereditary pancreatic cancer syndromes and familial pancreatic cancer.** *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG, 1 fev. 2019.

OLDWAYS. **Mediterranean Diet Pyramid.**

OLZMANN, J. A.; CARVALHO, P. **Dynamics and functions of lipid droplets.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 1 mar. 2019.

ONCOBDB. **Análise de expressão gênica em amostras tumorais.**

PANNALA, R. et al. **New-onset diabetes: a potential clue to the early diagnosis of pancreatic cancer.** *The Lancet Oncology*. Lancet Publishing Group, 2009.

PARK, J. et al. **Obesity and cancer - Mechanisms underlying tumour progression and recurrence.** *Nature Reviews Endocrinology*. Nature Publishing Group, 2014.

PARK, M.; KIM, H. Anti-cancer Mechanism of Docosahexaenoic Acid in Pancreatic Carcinogenesis: A Mini-review. *Journal of Cancer Prevention*, v. 22, n. 1, p. 1–5, 2017.

PASQUARELLI, G. **EFEITO DO JEJUM INTERMITENTE E DA DIETA DE CAFETERIA SOBRE O EIXO TECIDO ADIPOSEO-MICROBIOTA INTESTINAL NO MODELO DE CÂNCER DE MAMA MURINO.**

PHILIP C. CALDER; YAQOOB, P. *Understanding Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids*. 2009.

PIZATO, N. et al. Omega-3 docosahexaenoic acid induces pyroptosis cell death in triple-negative breast cancer cells. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018.

QIU, F.; DAHL, G. A permeant regulating its permeation pore: inhibition of pannexin 1 channels by ATP. *Am J Physiol Cell Physiol*, v. 296, p. 250–255, 2009.

RAMSEY, M. L. et al. Circulating interleukin-6 is associated with disease progression, but not cachexia in pancreatic cancer. *Pancreatology*, v. 19, n. 1, p. 80–87, 1 jan. 2019.

ROSATO, V. et al. **Population Attributable Risk for Pancreatic Cancer in Northern Italy.** Disponível em: <[www.pancreasjournal.com](http://www.pancreasjournal.com)>.

ROSE, D. P.; CONNOLLY, J. M. Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. *Pharmacology and Therapeutics*, v. 83, n. 3, p. 217–244, 1999.

ROZEVELD, C. N. et al. KRAS controls pancreatic cancer cell lipid metabolism and invasive potential through the lipase HSL. **Cancer Research**, v. 80, n. 22, p. 4332–4345, 15 nov. 2020.

RÜHL, S. et al. **ESCRT-dependent membrane repair negatively regulates pyroptosis downstream of GSDMD activation**. Disponível em: <<http://science.sciencemag.org/>>.

RUZE, R. et al. **Mechanisms of obesity- and diabetes mellitus-related pancreatic carcinogenesis: a comprehensive and systematic review**. **Signal Transduction and Targeted Therapy**. Springer Nature, 1 dez. 2023.

SAM, Q. H. et al. The divergent immunomodulatory effects of short chain fatty acids and medium chain fatty acids. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 12, 2 jun. 2021.

SANTOS, C. R.; SCHULZE, A. Lipid metabolism in cancer. **FEBS Journal**, v. 279, n. 15, p. 2610–2623, 2012.

SATOH, T. et al. **The inflammasome and IL-1 $\beta$ : Implications for the treatment of inflammatory diseases**. **Immunotherapy**. Future Medicine Ltd., 1 mar. 2015.

SCHLEY, P. D. et al. Mechanisms of omega-3 fatty acid-induced growth inhibition in MDA-MB-231 human breast cancer cells. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 92, n. 2, p. 187–195, jul. 2005.

SCHÖNFELD, P.; WOJTCZAK, L. **Fatty acids as modulators of the cellular production of reactive oxygen species**. **Free Radical Biology and Medicine**, 1 ago. 2008.

SEMINARIO-VIDAL, L. et al. Thrombin promotes release of ATP from lung epithelial cells through coordinated activation of Rho- and Ca<sup>2+</sup> -dependent signaling pathways. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 31, p. 20638–20648, 31 jul. 2009.

SEMINARIO-VIDAL, L. et al. Rho signaling regulates pannexin 1-mediated ATP release from airway epithelia. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 30, p. 26277–26286, 29 jul. 2011.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Their Health Benefits. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 9, n. 1, p. 345–381, 2018.

SIDDIQUI, R. A. et al. **Omega 3-Fatty Acids: Health Benefits and Cellular Mechanisms of Action** *Reviews in Medicinal Chemistry*.

SILVA, J.; FABRE, M.; WAITZBERG, D. **Omega-3 supplements for patients in chemotherapy and/or radiotherapy: A systematic review**. *Clinical Nutrition*. Churchill Livingstone, 1 jun. 2015.

SILVA, M. T.; DO VALE, A.; DOS SANTOS, N. M. N. **Secondary necrosis in multicellular animals: An outcome of apoptosis with pathogenic implications**. *Apoptosis*, abr. 2008.

SO, W. W.; LIU, W. N.; LEUNG, K. N. Omega-3 polyunsaturated fatty acids trigger cell cycle arrest and induce apoptosis in human neuroblastoma LA-N-1 cells. *Nutrients*, v. 7, n. 8, p. 6956–6973, 18 ago. 2015.

SONG, K. S. et al. Omega-3-polyunsaturated fatty acids suppress pancreatic cancer cell growth in vitro and in vivo via downregulation of Wnt/beta-catenin signaling. *Pancreatology*, v. 11, n. 6, p. 574–584, 2011.

SPENCER, L. et al. The effect of omega-3 FAs on tumour angiogenesis and their therapeutic potential. *European Journal of Cancer*, v. 45, n. 12, p. 2077–2086, 2009.

STECK, S. E.; MURPHY, E. A. **Dietary patterns and cancer risk**. *Nature Reviews Cancer*. Nature Research, 1 fev. 2020.

SUN, H. et al. Omega-3 fatty acids induce apoptosis in human breast cancer cells and mouse mammary tissue through syndecan-1 inhibition of the MEK-Erk pathway. *Carcinogenesis*, v. 32, n. 10, p. 1518–1524, 2011.

SUNAMI, Y.; REBELO, A.; KLEEFF, J. **Lipid metabolism and lipid droplets in pancreatic cancer and stellate cells**. *Cancers*. MDPI AG, 1 jan. 2018.

TAKAHASHI, R. et al. Interleukin-1 $\beta$ -induced pancreatitis promotes pancreatic ductal adenocarcinoma via B lymphocyte-mediated immune suppression. *Gut*, v. 70, n. 2, p. 330–341, 1 fev. 2021.

TERAO, J. **Revisiting carotenoids as dietary antioxidants for human health and disease prevention**. *Food and Function*. Royal Society of Chemistry, 16 ago. 2023.



TRICHOPOULOU, A. et al. **Adherence to a Mediterranean Diet and Survival in a Greek Population** *engl j med*. Disponível em: <[www.nejm.org](http://www.nejm.org)>.

VAN DE VEERDONK, F. L. et al. **Inflammasome activation and IL-1 $\beta$  and IL-18 processing during infection**. *Trends in Immunology*, mar. 2011.

VAN DER GEEST, L. G. M. et al. Nationwide outcomes in patients undergoing surgical exploration without resection for pancreatic cancer. **British Journal of Surgery**, v. 104, n. 11, p. 1568–1577, 1 out. 2017.

VAN DUIJNEVELDT, G.; GRIFFIN, M. D. W.; PUTOCZKI, T. L. **Emerging roles for the IL-6 family of cytokines in pancreatic cancer**. *Clinical Science*. Portland Press Ltd, 1 ago. 2020.

WALTER, F. M. et al. Symptoms and patient factors associated with diagnostic intervals for pancreatic cancer (SYMPTOM pancreatic study): a prospective cohort study. **The Lancet Gastroenterology and Hepatology**, v. 1, n. 4, p. 298–306, 2016.

WALTER, K. et al. Serum fatty acid synthase as a marker of pancreatic neoplasia. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 18, n. 9, p. 2380–2385, set. 2009.

WANG, J. et al. Modulation of membrane channel currents by gap junction protein mimetic peptides: Size matters. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 293, n. 3, set. 2007.

WANG, S. et al. **The molecular biology of pancreatic adenocarcinoma: translational challenges and clinical perspectives**. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. Springer Nature, 1 dez. 2021.

WILLIAMS, J. **Regulation of pancreatic acinar cell function by intracellular calcium**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <[www.physiology.org/journal/ajpgi](http://www.physiology.org/journal/ajpgi)>.

WILLIAMS-BEY, Y. et al. Omega-3 free fatty acids suppress macrophage inflammasome activation by inhibiting NF- $\kappa$ B activation and enhancing autophagy. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, 9 jun. 2014.

WŁODARCZYK, M.; NOWICKA, G. **Obesity, DNA damage, and development of obesity-related diseases. International Journal of Molecular Sciences.** MDPI AG, 1 mar. 2019.

WU, C. C.; BRATTON, S. B. **Regulation of the intrinsic apoptosis pathway by reactive oxygen species. Antioxidants and Redox Signaling,** 20 ago. 2013.

WU, Y.; ZHOU, B. P. **TNF- $\alpha$ /NF $\kappa$ -B/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. British Journal of Cancer,** fev. 2010.

YACHIDA, S. et al. Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. **Nature**, v. 467, n. 7319, p. 1114–1117, 28 out. 2010.

YANG, Y. C. et al. Docosahexaenoic acid inhibition of inflammation is partially via cross-talk between Nrf2/heme oxygenase 1 and IKK/NF- $\kappa$ B pathways. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 1, p. 204–212, jan. 2013.

YEN, C. L. E. et al. **DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. Journal of Lipid Research,** 2008.

YIN, Y. et al. **The omega-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid inhibits proliferation and progression of non-small cell lung cancer cells through the reactive oxygen species-mediated inactivation of the PI3K /Akt pathway. Lipids in Health and Disease** BioMed Central Ltd, 3 maio 2017.

YOUYUN YANG et al. **Role of fatty acid synthase in gemcitabine and radiation resistance of pancreatic cancers.** Disponível em: <[www.ijbmb.org](http://www.ijbmb.org)>.

YU, G. et al. Loss of p53 sensitizes cells to palmitic acid-induced apoptosis by reactive oxygen species accumulation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 24, 2 dez. 2019.

YU, P. et al. **Pyroptosis: mechanisms and diseases. Signal Transduction and Targeted Therapy.** Springer Nature, 1 dez. 2021.

YU, X. et al. Palmitic Acid Inhibits the Growth and Metastasis of Gastric Cancer by Blocking the STAT3 Signaling Pathway. **Cancers**, v. 15, n. 2, 1 jan. 2023.

ZADOORIAN, A.; DU, X.; YANG, H. **Lipid droplet biogenesis and functions in health and disease.** *Nature Reviews Endocrinology*. Nature Research, 1 ago. 2023.

ZEENI, N. et al. Cafeteria diet-fed mice is a pertinent model of obesity-induced organ damage: a potential role of inflammation. *Inflammation Research*, v. 64, n. 7, p. 501–512, 13 jul. 2015.

ZENG, X. et al. Oleic acid ameliorates palmitic acid induced hepatocellular lipotoxicity by inhibition of ER stress and pyroptosis. *Nutrition and Metabolism*, v. 17, n. 1, 30 jan. 2020.

ZHANG, T. et al. Interleukin-6 and Hypoxia Synergistically Promote EMT-Mediated Invasion in Epithelial Ovarian Cancer via the IL-6/STAT3/HIF-1  $\alpha$  Feedback Loop. *Analytical Cellular Pathology*, v. 2023, 2023.

ZHANG, W. et al. Modulatory effects of EPA and DHA on proliferation and apoptosis of pancreatic cancer cells. *Journal of Huazhong University of Science and Technology - Medical Science*, v. 27, n. 5, p. 547–550, 2007.

ZHANG, X. et al. Palmitic Acid Promotes Lung Metastasis of Melanomas via the TLR4/TRIF-Peli1-pNF- $\kappa$ B Pathway. *Metabolites*, v. 12, n. 11, 1 nov. 2022.

ZHANG, Y. et al. Interleukin-6 is required for pancreatic cancer progression by promoting MAPK signaling activation and oxidative stress resistance. *Cancer Research*, v. 73, n. 20, p. 6359–6374, 15 out. 2013.

ZHOU, H.; URSO, C. J.; JADEJA, V. **Saturated fatty acids in obesity-associated inflammation.** *Journal of Inflammation Research*. Dove Medical Press Ltd, 2020.

ZHU, S. et al. Metabolic Shift Induced by  $\omega$ -3 PUFAs and Rapamycin Lead to Cancer Cell Death. *Cellular Physiology and Biochemistry*, v. 48, n. 6, p. 2318–2336, 2018.

ZHU, S. et al. Palmitic acid inhibits prostate cancer cell proliferation and metastasis by suppressing the PI3K/Akt pathway. *Life Sciences*, v. 286, 1 dez. 2021.