



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

GABRIELLA SIMÕES HEYN ROTH CARDOSO

A FUNÇÃO DIFERENCIAL DOS TECIDOS ADIPOSOS BRANCO E
MARROM EM CÉLULAS BETA PANCREÁTICAS TUMORAIS: O PAPEL DOS
MICRO-RNAS DOS TECIDOS ADIPOSOS NESTE PROCESSO

BRASÍLIA
2021

GABRIELLA SIMÕES HEYN ROTH CARDOSO

A FUNÇÃO DIFERENCIAL DOS TECIDOS ADIPOSOS BRANCO E
MARROM EM CÉLULAS BETA PANCREÁTICAS TUMORAIS: O PAPEL DOS
MICRO-RNAS DOS TECIDOS ADIPOSOS NESTE PROCESSO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, da Universidade de Brasília, como requisito à obtenção do título de Doutora em Patologia Molecular.

Orientadora: Dra. Kelly Grace Magalhães

BRASÍLIA

2021

Autorizo a reprodução e divulgação deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de ensino, estudo ou pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação

CC268f Cardoso, Gabriella Simões Heyn Roth
A função diferencial dos tecidos adiposos branco e marrom em células beta pancreáticas tumorais: o papel dos micro RNAs dos tecidos adiposos neste processo / Gabriella Simões Heyn Roth Cardoso; orientador Kelly Grace Magalhães. -- Brasília, 2021.
111 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Patologia Molecular) -- Universidade de Brasília, 2021.

1. insulínoma. 2. miRNAs. 3. tecido adiposo. 4. inflamação. I. Magalhães, Kelly Grace, orient. II. Título.

GABRIELLA SIMÕES HEYN ROTH CARDOSO

A FUNÇÃO DIFERENCIAL DOS TECIDOS ADIPOSOS BRANCO E
MARROM EM CÉLULAS BETA PANCREÁTICAS TUMORAIS: O PAPEL DOS
MICRO-RNAS DOS TECIDOS ADIPOSOS NESTE PROCESSO

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia
Molecular da Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília.

Aprovada em 23/11/2021

Banca Examinadora

Prof^a. Dra. Kelly Grace Magalhães

Universidade de Brasília- UnB

Prof^a. Dra. Letícia Batista Azevedo Rangel

Universidade Federal do Espírito Santo- UFES

Prof^a Dra. Angélica Amorim Amato

Universidade de Brasília- UnB

Prof. Dr. Felipe Saldanha de Araújo

Universidade de Brasília-UnB

Prof^a Dra. Cecília Beatriz Fiuza Favali

Universidade de Brasília- UnB

“O lugar de cada um de nós depende unicamente da nossa vocação. A vocação não se encontra simplesmente depois de ter refletido e examinado os vários caminhos: é uma resposta que se obtém com a oração”.

Edith Stein

"Você não pode esperar construir um mundo melhor sem melhorar os indivíduos. Para esse fim, cada um de nós deve trabalhar para o seu próprio aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, compartilhar uma responsabilidade geral por toda a humanidade."

Marie Skłodowska Curie

“Colocamos em tudo o que fazemos o pensamento de tudo o que amamos”

S. Josemaria Escrivá

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por ter me conduzido até aqui, por me capacitar e me fortalecer durante toda minha vida, e me permitir desvendar um pouco deste mundo fascinante que é a ciência. Tudo para Ele e por Ele. Agradeço à Nossa Senhora de Guadalupe, minha Mãe e protetora.

Agradeço à minha família, ao meu esposo Hugo, que me apoiou desde o princípio e que foi o primeiro a me incentivar a ingressar na vida acadêmica. Obrigada por ser meu esteio e por ter me apoiado incondicionalmente, juntos fomos mais fortes, superando todos os desafios que a vida nos apresenta. Agradeço aos meus pais Paulo e Sônia que sempre me incentivaram. Obrigada por todo o suporte ao longo de minha vida, por todo o amor, valores, orações, carinho e dedicação. Agradeço ao meu irmão Renan, exemplo na minha vida, à minha cunhada Thaylla, às minhas sobrinhas Helena e Maria Clara, que são alegria e luz em nossas vidas. Agradeço à minha avó Inês e à minha madrinha Sandra, pelo apoio, carinho, amor e suporte. Agradeço aos amigos Débora e Vilson que com tanto carinho fui recebida nas últimas semanas em Brasília.

Agradeço à minha orientadora e amiga Prof^a Dra. Kelly Grace. Ao traçar uma retrospectiva de 2017 a 2021, vejo que não sou a mesma que chegou naquela primeira semana de agosto de 2017. Recordo todo o aprendizado, incentivo, crescimento pessoal e profissional durante estes quatro anos. Posso afirmar que minha vida seguiu um rumo completamente diferente depois desta experiência do doutorado. Obrigada pelo respeito, sinceridade, ética, compromisso, confiança, e sobretudo pela amizade.

Agradeço aos meus queridos amigos do Laboratório de Imunologia e Inflamação (LIMI), por todo o apoio, carinho, momentos de partilha e crescimento profissional, que vocês tornaram possível. Obrigada, Ana Júlia, Augusto Polveira, Dalila Ribeiro, Débora Santos, Gabriel Araújo, Gabriel Calixto, Gabriel Pasquarelli, Gabriel Ribeiro, Heloísa Antoniella, Igor Santos, Juliana Carvalho, Lívia Pimentel, Luís Corrêa, Milena Verdam, Nathalia Soares, Rafael Corrêa, Ramon Buson, Raquel das Neves, Sabrina Azevedo. Com cada um de vocês que passaram no laboratório e hoje percorrem caminhos diferentes, e aos que ainda permanecem no LIMI. Vocês me marcaram de uma forma especial, cada um de sua forma, e sou muito grata por toda a aprendizagem, por todas as discussões científicas que me permitiram pensar de uma forma diferente, por todos os momentos divertidos, viagens e congressos, cafés,

lanches, apresentações, enfim, amigos que levarei por toda a vida, e que foram especiais, cada um de uma forma. Muito obrigada!

Agradeço à Prof^a. Dra. Camilla Schéele e aos integrantes do laboratório da Novo Nordisk Foundation Center for Basic Metabolic Research: Alexander Gronning, Birgitte Lisdorf, Carla Petra, Jo Henningsen, Mai Severinsen, Nagendra Palani e Susanna Soberg. Obrigada por me receberem tão bem durante o período em que estive na Dinamarca. Com vocês eu aprendi um olhar diferente sobre a ciência. Obrigada pela oportunidade, pelo incentivo e por acreditarem em mim. Agradeço aos colaboradores Prof. Dr. Jakob Knudsen, Dra. Sarah Armour e Dorthe Nielsen que também fizeram parte desta caminhada durante o período em que estive na Dinamarca. Obrigada à minha amiga Juliana Assis, por toda a amizade e bons momentos que passamos juntas em terras escandinavas.

Agradeço à Universidade de Brasília (UnB), afinal foi a minha alma mater, desde a graduação em Ciências Farmacêuticas até o doutorado, com tantos profissionais de excelência. Agradeço aos técnicos da UnB, em especial ao Chiquinho que sempre foi prestativo e atencioso, nos auxiliando e buscando soluções para resolver nossos problemas do dia a dia. Agradeço a todos os servidores empenhados a exercer sua função e que contribuem para a manutenção da universidade, aos servidores da secretaria de Pós-graduação de Patologia Molecular da UnB por todo o auxílio ao longo desses quatro anos de doutorado.

Agradeço à toda equipe do biotério da Universidade de Brasília pelo cuidado e atenção com nossos animais, e todo o auxílio prestado. Agradeço aos colaboradores externos deste trabalho: Prof^a. Dra. Andreza de Bem, Prof. Dr. Guilherme Brand, Dra. Paula Belozzi, Prof. Dr. Marcelo Mori e Prof^a. Dra. Sonia Bao, por toda a contribuição. Agradeço aos membros da banca de defesa pelo aceite e por todas as contribuições à tese de doutorado.

Agradeço às agências de fomento CNPQ e CAPES pelo auxílio financeiro. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (Capes) - Código de Financiamento 001”.

Resumo

O tecido adiposo (TA) é um órgão endócrino complexo e altamente plástico. A composição desse tecido é heterogênea. O TA regula a homeostase metabólica por meio da secreção de vários fatores: peptídeos, citocinas, hormônios, ácidos graxos e miRNAs. O TA é uma das principais fontes de miRNAs exossomais, recentemente descritos como uma nova forma de adipocina. Os miRNAs derivados do TA estão associados à adipogênese, inflamação, resistência à insulina e desenvolvimento tumoral. Neste trabalho analisamos parâmetros inflamatórios e carcinogênicos na linhagem de células beta tumorais (MIN6), também conhecida como insulinoma, estimulada com o meio condicionado de tecido adiposo branco (WAT) e tecido adiposo marrom (BAT), contendo fatores de secreção. Analisamos o efeito da ausência de miRNAs em WAT e BAT sobre parâmetros inflamatórios e carcinogênicos em células MIN6. Foram utilizados camundongos C57Bl/6 machos, Adicer (nocaute para Dicer no tecido adiposo) e camundongos LOX (controle de ninhada), obtidos por recombinação sítio-específica de DNA, por meio do sistema Cre-Lox. Dentre os efeitos dos estímulos de TA em células MIN6 analisados, o estímulo de WAT Adicer levou à morte celular, diminuição da viabilidade celular e da massa mitocondrial, aumento do estresse oxidativo, maior produção de citocinas inflamatórias e biogênese de corpúsculos lipídicos. Além disso, observamos alterações da função mitocondrial, avaliada por respirometria de alta resolução, evidenciada com aumento da capacidade respiratória máxima das mitocôndrias, e maior atividade por meio do complexo II, demonstrando sobrecarga da função mitocondrial, devido a uma maior demanda por fluxo de oxigênio. Procuramos investigar por abordagem glicômica a composição e caracterização dos N-glicanos do TA, útil como biomarcador em alguns tipos de câncer, porém, devido à elevada quantidade de ácidos graxos no BAT e no WAT, o isolamento e detecção dos N-glicanos foram prejudicados. Os fatores secretados do TA tornam possível o desenvolvimento de novos alvos farmacológicos na regulação metabólica. Nosso trabalho mostrou a interação diferencial do TA e células MIN-6, principalmente a ausência de miRNAs no WAT, o que destaca o potencial terapêutico dos miRNAs derivados de AT no tratamento de doenças metabólicas como o insulinoma.

Palavras-chaves: insulinoma, miRNA, tecido adiposo, inflamação, mitocôndria.

Abstract

Adipose tissue (AT) is a complex and highly plastic endocrine organ. The composition of this tissue is heterogeneous. AT regulates metabolic homeostasis through the secretion of several factors: peptides, cytokines, hormones, fatty acids, and miRNAs. AT is one of the major sources of exosomal miRNAs, recently described as a novel adipokine. Adipose tissue-derived miRNAs are associated with adipogenesis, inflammation, insulin resistance, and tumor development. In this work we analyzed inflammatory and carcinogenic parameters in the tumoral beta-cell line (MIN6), also known as insulinoma, stimulated with the conditioned medium of white adipose tissue (WAT) and brown adipose tissue (BAT), containing secretion factors. We analyzed the effect in the absence of miRNAs in WAT and BAT on inflammatory and carcinogenic parameters in MIN6 cells. We used C57Bl/6 male Adicer mice (knockout for Dicer in adipose tissue) and LOX mice (littermate control), obtained by site-specific DNA recombination, through the Cre-Lox system. Among the effects of AT stimuli in MIN6 cells analyzed, the WAT Adicer stimulus led to cell death, decreased cell viability and mitochondrial mass, increased oxidative stress, higher production of inflammatory cytokines, and lipid droplet biogenesis. Furthermore, we observed changes of the mitochondrial function, assessed by high-resolution respirometry analysis, as shown with an increase of the maximal respiratory capacity of the mitochondria, and a higher activity through complex II, demonstrating an overload of the mitochondria function, due to a greater demand for oxygen flow. We sought to investigate by glycomics approach the composition and characterization of N-glycans from the AT, a useful tool as a cancer hallmark in some types of cancer, however, due to the high amount of fatty acids in BAT and WAT, the isolation and detection of N-glycans were impaired. Secreted factors from the AT turns possible the development of novel pharmacological targets in metabolic regulation. Our work showed differential crosstalk of AT and MIN-6 cells, especially the absence of miRNAs in WAT, which highlights the therapeutic potential of AT-derived miRNAs in the treatment of metabolic diseases such as insulinoma

Key words: insulinoma, miRNA, adipose tissue, inflammation, mitochondria

Lista de Figuras

Figura 1: Os quatro tipos de adipócitos no TA, morfologia e função.	19
Figura 2: Alterações da plasticidade do tecido adiposo com o dano inflamatório.	20
Figura 3: A interação entre adipócitos e macrófagos no microambiente tumoral.	24
Figura 4: Biogênese do miRNA e seu impacto em distúrbios metabólicos.	29
Figura 5: miRNAs derivados do TA modulam processos inflamatórios e vias tumorais.	31
Figura 6: Esquema simplificado da recombinação sítio-específica por sistema Cre-Lox.	36
Figura 7: Extração de BAT e WAT com estímulo dos produtos de secreção em células MIN6.	38
Figura 8: Eletroforese em gel de agarose na concentração de 2% de produtos amplificados por PCR convencional.	48
Figura 9: Ensaio de viabilidade celular por MTT após 24 h e 48 h de estímulo.	50
Figura 10: Ensaio de morte celular com marcação de Anexina V e PI.	52
Figura 11: Análise do ciclo celular com marcação de sonda PI.	53
Figura 12: Análise por MET de células de insulinoma estimuladas com produtos derivados de WAT de WT e Adicer.	55
Figura 13: Análise por microscopia de fluorescência de mitocôndrias em células MIN6 por sonda MitoTrackerRed.	57
Figura 14: Detecção de nitrito após estímulo com produtos de secreção de BAT e WAT, de WT e Adicer em células de insulinoma.	59
Figura 15: Detecção de ROS após estímulo com BAT e WAT de LOX e Adicer em células MIN6.	60
Figura 16: Efeito dos estímulos de BAT e WAT de LOX e Adicer sobre parâmetros de consumo de oxigênio e função mitocondrial nas células MIN6.	64
Figura 17: Gráfico representativo da respirometria de alta resolução.	65
Figura 18: Ensaio de viabilidade celular com rapamicina e 3-ma.	67
Figura 19: Formação de corpúsculos lipídicos nas células MIN6 após estímulo com BAT e WAT de LOX e Adicer.	69
Figura 20: Detecção de IL-33 em células de insulinoma após estímulo com BAT e WAT de WT e Adicer.	70
Figura 21: Detecção de TNF- α nas células de insulinoma após estímulo com BAT e WAT de WT e Adicer.	71
Figura 22: Detecção de CCL2 em células de insulinoma após estímulo de BAT e WAT de WT e Adicer.	72
Figura 23: Detecção de IL-1 β e TGF β em células de insulinoma com os produtos derivados de BAT e WAT de WT e Adicer.	73
Figura 24: Comparação da secreção das citocinas IL-1 β e TNF- α nas células de insulinoma após 24 horas e do meio condicionado de BAT e WAT de WT e Adicer.	75
Figura 25: Cromatograma de íons totais de BAT em relação ao padrão de N-glicanos.	78
Figura 26: Cromatograma de íons totais de WAT em relação ao padrão de N-glicanos.	79
Figura 27: Análise de espectrometria de massas com picos descritos de BAT.	81
Figura 28: Efeito diferencial dos produtos de BAT e WAT Adicer em células MIN6.	90

Lista de Tabelas

Tabela 1: Condições otimizadas da reação de PCR para genotipagem dos camundongos-----	36
Tabela 2: Ciclos da PCR para genotipagem de camundongos LOX e Adicer _____	37

Lista de abreviaturas

Adicer KO: knockout para Dicer

ADRB1: receptor adrenérgico beta 1

ADRP: proteína relacionada com a diferenciação adipogênica

ATP: adenosina trifosfato

BAT: tecido adiposo marrom

BCAA: aminoácidos de cadeia ramificada

Bcl-2: linfoma 2 de células B

BMP: proteína morfogenética óssea

BMP2: proteína morfogenética óssea 2

BMP4: proteína morfogenética óssea 5

BMP7: proteína morfogenética óssea 7

BMP8b: proteína morfogenética óssea 8b

BSA: albumina sérica bovina

C / EBP α : proteína de ligação ao amplificador C

CaCl₂: cloreto de cálcio

CAFs: fibroblastos associados ao câncer

cAMP: monofosfato cíclico de adenosina

CCCP: Carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona

CCL2: ligante 2 de quimiocina com motivo C-C

Cf DNA: DNA livre de células

CFSE: éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína

CIDEA: fator de fragmentação de DNA indutor de morte celular, efetor A semelhante à subunidade alfa.

CO₂: dióxido de carbono

CTE: cadeia transportadora de elétrons

CXCL14: quimiocina com motivo C-X-C ligante 14

DAPI: 4',6'-diamino-2-fenil-indol

DCFDA: diacetato de 2',7'-diclorohidrofluoresceína

DGCR8: do inglês Di George syndrome critical region gene 8

DMEM: meio Dulbecco Mem

DMSO: dimetilsulfóxido

DTT: ditioneitol

ELISA: ensaio imunoenzimático direto

ERK: quinase regulada por sinal extracelular

FABP4: proteína de ligação aos ácidos graxos tipo 4

FDG: fluorodesoxiglicose

FFAR-1: receptor de ácidos graxos livres 1

FGF21: fator de crescimento de fibroblastos 21

FOXO1: do inglês forkhead box 1

GABA: ácido gama-aminobutírico

GLP1: peptídeo semelhante a glucagon 1

GLUT1: transportador de glicose 1

GLUT2: transportador de glicose 2

GLUT4: transportador de glicose 4

GPCRS: receptores acoplados a proteína G

Gpr3: receptor acoplado a proteína 3

HEPES: Ácido 2-[4-(2-hidróxi-1-piperazinil) -1-piperazinil] -etanosulfônico

HEPES: ácido etanosulfônico 4,2 hidróxi-1-piperazina 1

HGF: fator de crescimento de hepatócito

HIF-1 α : fator indutor de hipóxia 1-alfa

IAA: iodoacetamida

IARC: Agência Internacional de Pesquisa do Câncer

IKK: inibidor de quinase K

IL-1: interleucina-1

IL-10: interleucina-10

IL-18: interleucina-18

IL-1 β : interleucina- 1 beta

IL-4: interleucina-4

IL-6: interleucina-6

IMC: índice de massa corporal

JKK: quinase ativadora do complexo C-Ju

KCl: cloreto de potássio

KCNJ11: retificador intrínseco do canal de potássio subfamília J 11

KRB: tampão Krebs Ringer

MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno

MC: meio condicionado

MCP-1: proteína quimiotática de monócitos

MgSO₄: sulfato de magnésio

miRNAs: micro-RNAs

mTOR: proteína alvo da rapamicina

mTORC1: complexo 1 da proteína alvo da rapamicina em mamíferos

mTORC2: complexo 2 da proteína alvo da rapamicina em mamíferos

MTT: (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl) -2,5difeniltetrazolio brometo

Na₂HPO₄: fosfato dissódico

NaCl: cloreto de sódio

NaHCO₃: bicarbonato de sódio

NaOH: hidróxido de sódio

N-EVAP: evaporador de nitrogênio

NFκB: fator nuclear kappa B

NGF: fator de crescimento neural

NK: do inglês natural killer

NO: óxido nítrico

NRG4: neurorregulina 4

OMS: Organização Mundial da Saúde

p38MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno p38

PAI-1: inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1

PCR: reação em cadeia da polimerase

PGC1-α: coativador-1 alfa do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama

PI: iodeto de propídio

PI3K: fosfatidilinositol 3-quinase

PI3K: fosfatidilinositol-3-quinase

Pknox1: do inglês PBX/Knotted 1 Homeobox 1

PKR: proteína quinase R

PPARγ: receptor ativado por proliferadores de peroxissoma tipo gama

PTEN: fosfatase homóloga à tensina

Ran GTPase: proteína ativadora de GTPase de RAN

RISC: complex silenciador induzido por RNA

ROS: espécies reativas de oxigênio

RT-qPCR: reação de polimerase por transcriptase reversa quantitativa

SGLT1: proteína de transporte sódio-glicose 1
SGLT2: proteína de transporte de sódio-glicose 2
SIRT1: sirtuína 1
SLC5A1: família 5 de carreadores de soluto
SNC: Sistema Nervoso Central
STMN2: do inglês stathmin 2
SUR1: receptor de sulfoniuréia 1
TA: tecido adiposo
TAMs: tumores associados a macrófagos
TGF- β : fator de transformação de crescimento beta
TNF- α : fator de necrose tumoral alfa
Treg: linfócitos T reguladores
UCP-1: proteína desacopladora-1
UNS: não estimulado
VEGF: fator de crescimento endotelial vascular
WAT: tecido adiposo branco

Sumário

1.0 Introdução	17
1.1 O Tecido Adiposo: Órgão Endócrino e de Alta plasticidade	17
1.2 Modulação imunológica no TA	19
1.3 A interação do TA e o tumor	22
1.4 Insulinoma	25
1.5 O papel dos miRNAs derivados do TA e o risco de carcinogênese	27
2.0 Justificativa	33
3.0 Objetivos	34
3.1 Objetivo geral	34
3.2 Objetivos Específicos	34
4.0 Materiais e Métodos	35
4.1 Linhagem celular de insulinoma murino (MIN6)	35
4.2 Genotipagem dos camundongos	35
4.3 Extração de BAT e WAT e obtenção do meio condicionado derivado dos tecidos adiposos	37
4.4 Ensaio de viabilidade celular por MTT	39
4.5 Análise de morte celular	39
4.6 Análise do ciclo celular e fragmentação nuclear	40
4.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão	40
4.8 Avaliação da quantidade de mitocôndrias viáveis com sonda MitoTracker por microscopia de fluorescência	41
4.9 Avaliação da formação de ROS por sonda DCF-DA	41
4.10 Análise da função mitocondrial por respirometria de alta resolução	42
4.11 Biogênese de corpúsculos lipídicos por sonda Bodipy	42
4.12 Detecção de Óxido Nítrico	43
4.13 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	43
4.14 Análise Glicômica Comparativa de BAT e WAT	43
4.14.1 Preparo dos tecidos para extração de proteínas	44
4.14.2 Purificação das Estruturas de N-glicanos para Análise por Espectrometria de massas (Redução, alquilação e deglicosilação das glicoproteínas)	44
4.14.3 Purificação dos N-glicanos	45
4.14.4 Permetilação	45
4.14.5 Purificação dos N-glicanos permetilados	46
4.14.6 Preparação da amostra para análise em LC-MS/MS	46
4.15 Análise Estatística	47
5.0 Resultados	48

5.1 Genotipagem dos camundongos Adicer e LOX	48
5.2 Efeito do estímulo com secreção derivada de BAT e WAT de camundongos WT e ADICER sobre a viabilidade e morte celular do insulinoma	48
5.3 Efeito dos estímulos com secreção derivada de BAT e WAT de camundongos WT e ADICER sobre o ciclo celular em células de insulinoma	53
5.4 Efeito dos estímulos com secreção derivada de BAT e WAT sobre características ultraestruturais celulares relacionados a morte celular, lipofagia e dano mitocondrial no insulinoma	54
5.5 Efeito dos estímulos de secreção derivada de BAT e WAT de camundongos WT e ADICER sobre a presença de mitocôndrias viáveis nas células do insulinoma	56
5.6 Efeito dos estímulos com secreção derivada de BAT e WAT de camundongos WT e ADICER sobre a geração de nitrito e espécies reativas oxigênio nas células do insulinoma	58
5.7 Efeito dos estímulos com secreção derivada de BAT e WAT de camundongos WT e ADICER sobre a função mitocondrial e consumo de oxigênio por respirometria de alta resolução nas células do insulinoma	61
5.8 O papel da via de sinalização do mTOR sobre a modulação da viabilidade celular de células do insulinoma estimuladas com secreção derivada de BAT e WAT de camundongos WT e ADICER	65
5.9 Efeito dos estímulos com secreção derivada de BAT e WAT de camundongos WT e ADICER sobre a biogênese de corpúsculo lipídico nas células do insulinoma	68
5.10 Efeito dos estímulos com secreção derivada de BAT e WAT de camundongos WT e ADICER sobre o perfil inflamatório de células do insulinoma	69
5.11 Identificação e caracterização de proteínas glicosiladas presentes nos tecidos adiposos e na secreção derivada de BAT e WAT	75
6.0 Discussão	82
7.0 Conclusão	88
Referências Bibliográficas	91
Anexos	108
Publicações durante o período do doutorado.	108

1.0 Introdução

1.1 O Tecido Adiposo: Órgão Endócrino e de Alta plasticidade

O TA é um órgão endócrino, ativo, complexo, heterogêneo, capaz de secretar diversas moléculas, produzir hormônios esteróides e fatores de crescimento, que apresenta a capacidade de acumular lipídios, como fonte energética (Ahima, Flier, 2000, Frayn et al, 2003) O TA pode ser classificado como TA branco (WAT) e TA marrom (BAT). O WAT está distribuído em depósitos viscerais e subcutâneos. Este tecido apresenta alta plasticidade e funções relacionadas à capacidade regulatória e metabólica, enquanto o BAT tem sua principal função associada à termogênese (Choe et al., 2016, Cypess et al, 2009).

Os adipócitos podem estar sujeitos a diferentes processos, tais como adipogênese, lipólise, sobrecarga oxidativa e alteração mitocondrial. Este órgão é capaz de atuar de forma endócrina, através da secreção de mediadores inflamatórios que controlam órgãos periféricos e cérebro, e facilitar o desenvolvimento de distúrbios metabólicos (Stepién et al, 2014). Os adipócitos brancos apresentam alta capacidade de estoque e liberação de energia. Os adipócitos brancos apresentam como características uma larga gotícula lipídica unilocular no citoplasma e núcleo periférico. O WAT é o mais abundante no organismo. Além de estoque energético, secreta diversas adipocinas, tais como leptina e adiponectina (Uddin et al, 2011; Chu; Gawronska-Kozak, 2017).

Os adipócitos marrons apresentam alto conteúdo de mitocôndrias e gotículas lipídicas multiloculares no seu conteúdo citoplasmático, núcleo mais centralizado. Estes adipócitos desempenham importante papel na termogênese, associada à expressão de UCP-1 (proteína desacopladora 1). A UCP-1 desvia a síntese de ATP (trifosfato de adenosina) para produção de calor. Isto ocorre como consequência do desacoplamento do gradiente de prótons entre o espaço intermembranar e a matriz mitocondrial (Harms, Seale, 2013; Shulz, Tseng, 2013).

O TA apresenta alta plasticidade. A plasticidade do TA se deve às alterações do tamanho do adipócito, que se adequa conforme o estoque lipídico, e pela capacidade de diferenciação dos adipócitos para um fenótipo distinto. Como exemplo,

a diferenciação dos adipócitos brancos em adipócitos com características de marrons, denominado do inglês “browning” ou “amarronzamento”, sob estímulo de agonistas beta-adrenérgicos e exposição ao frio (Bahler et al., 2016). Neste processo de diferenciação, surgem os adipócitos marrons induzíveis ou adipócitos bege. O adipócito bege apresenta gotículas lipídicas multiloculares, alto número de mitocôndrias e a expressão de marcadores de browning, tais como genes UCP-1, CIDEA, PGC1- α (coativador-1 do receptor ativado por proliferador de peroxissoma alfa) (Harms, Seale, 2013; Zoico et al., 2019). O adipócito rosa foi descrito pela primeira vez por Cinti e colaboradores (2018).

Em relação à alta plasticidade do TA, em distúrbios como a obesidade, os processos de hiperplasia e hipertrofia do adipócito são fenômenos descritos. A hiperplasia é definida pelo aumento do número de adipócitos, enquanto a hipertrofia é definida pelo aumento do tamanho do adipócito. O crescimento hiperplástico pode ser detectado nos estágios mais recentes do desenvolvimento do TA, enquanto a hipertrofia ocorre quando a hiperplasia não é suficiente para obtenção de estoque energético na progressão da obesidade (De Ferranti; Mozaffarian, 2008). A hipertrofia do adipócito compromete a vascularização do tecido, levando a uma condição de hipóxia tecidual (Stepián et al, 2014).

O adipócito rosa tem origem epitelial glandular, de células alveolares que secretam leite, resultantes de um processo de transdiferenciação durante a gravidez e lactação. Apresentam gotículas lipídicas abundantes no citoplasma, robusto retículo endoplasmático, complexo de Golgi e grânulos contendo leite (Giordano et al., 2014). O TA adquire a coloração rosácea durante o processo de transdiferenciação. O TA branco pode se diferenciar em rosa, por sua vez, o rosa em marrom e a reversão do marrom para a célula mioepitelial, demonstrando quão dinâmica é esta plasticidade do TA. As diferenças morfológicas entre os tecidos adiposos estão apresentadas na **figura 1**, na qual está correlacionado cada tipo de adipócito: branco, marrom, bege e rosa com suas diferentes funções, desde a capacidade de estoque energético do adipócito branco, associado a uma maior atividade inflamatória, bem como a do marrom envolvido na termogênese, rico em mitocôndrias expressando UCP1 e o bege com alta capacidade de produção de calor e maior atividade metabólica dos quatro adipócitos (Cinti, 2018).

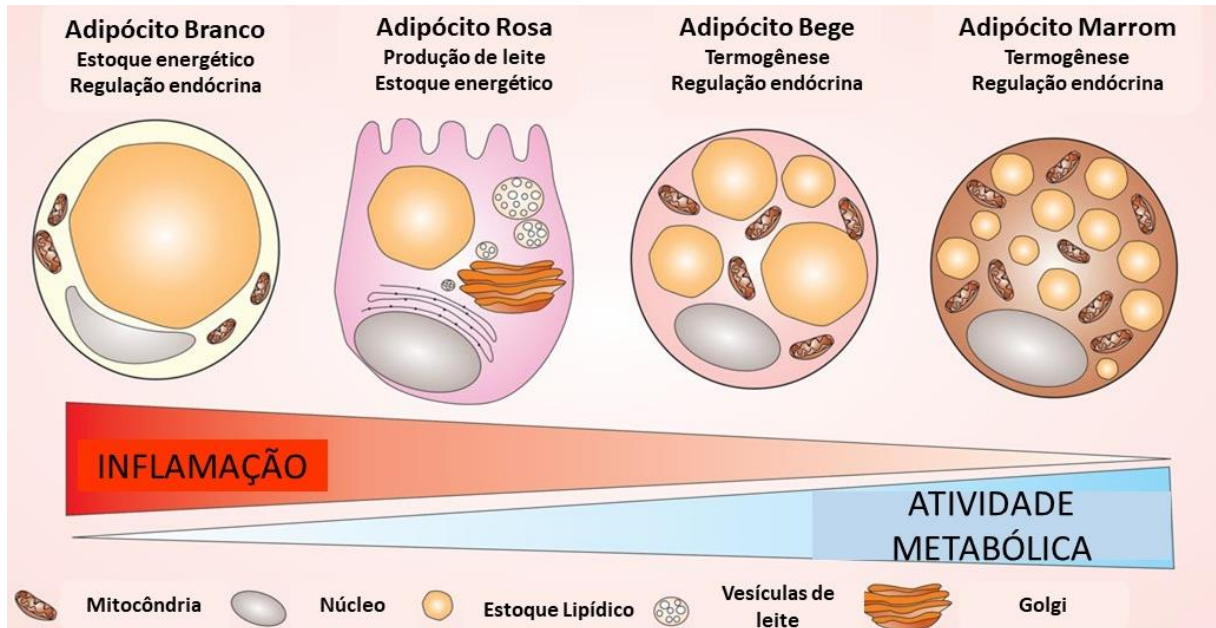


Figura 1: Os quatro tipos de adipócitos no TA, morfologia e função. Nesta figura observa-se que cada adipócito apresenta diferentes características, sendo apresentado no ponto extremo da esquerda para direita, como mais pró-inflamatório o adipócito branco, caracterizado por uma única gotícula lipídica, ocupando grande volume celular, com núcleo pressionado. A maior atividade metabólica é atribuída ao adipócito marrom, no extremo oposto da figura, decorrente da atividade termogênica. O adipócito marrom é caracterizado por múltiplas gotículas lipídicas, núcleo mais centralizado e maior quantidade de mitocôndrias. O adipócito rosa tem sua função mais associada à lactação, e o adipócito bege, que apresenta um fenótipo intermediário, da diferenciação do adipócito branco em marrom, contendo maior quantidade de mitocôndrias do que o adipócito branco, e múltiplas gotículas dispersas no citoplasma. Fonte: Adaptado de Corrêa, L.H; Heyn GS; Magalhães, K.G. The Impact of Adipose Organ Plasticity on Inflammation and Cancer Progression. *Cells*, 2019, 8(7), 662.

1.2 Modulação imunológica no TA

Dentre as várias funções que o TA apresenta, se destaca o armazenamento energético, na forma de triglicerídeos. Sobretudo, o TA branco, composto predominantemente por adipócitos brancos. O desequilíbrio no estoque energético nestas células pode levar a disfunções metabólicas associadas ao surgimento de doenças como o câncer, doenças cardiovasculares, hepáticas e diabetes mellitus tipo 2 (Kershaw, Flier, 2004).

O TA não é composto somente por adipócitos, mas também de células imunológicas que são importantes para manutenção da homeostase tecidual e compõe a fração do estroma vascular do tecido (Boone et al, 2000, Frühbeck et al, 2001). O perfil de polarização destas células imunes no tecido depende da condição a que se encontra o adipócito, por exemplo, nos casos de hipertrofia do adipócito, consequente da obesidade, pode impactar diretamente no perfil inflamatório, podendo ser um fator facilitador na progressão maligna. As células imunológicas podem ser

recrutadas e polarizadas por estímulos externos, sendo modificadas em dois perfis: perfil tipo 1 e perfil tipo 2 (Corrêa et al., 2017). O perfil tipo 1, de polarização de macrófagos é descrito como pró-inflamatório e células imunes polarizadas para este perfil secreta citocinas mais pró-inflamatórias, tais como TNF- α (fator de necrose tumoral alfa), IL-6 (interleucina-6) e IL-1 β (interleucina 1beta) (Li et al., 2018).

Na figura 2 está descrito o processo inflamatório como consequência do acúmulo de adiposidade e alteração da composição de células imunes, via secreção de citocinas inflamatórias. O TNF- α está associado a obesidade e resistência insulínica. No TA branco, esta citocina está presente no estroma vascular e nos adipócitos. É secretada por macrófagos, sobretudo no depósito subcutâneo do que no visceral (Weisberg et al., 2003). A secreção de TNF- α pode influenciar outros fatores secretados por adipócitos como MCP-1 (proteína quimiotática de monócitos 1), resultando na infiltração de monócitos, potencializando o processo inflamatório (Makki; Froguel; Wolowczuk, 2013).

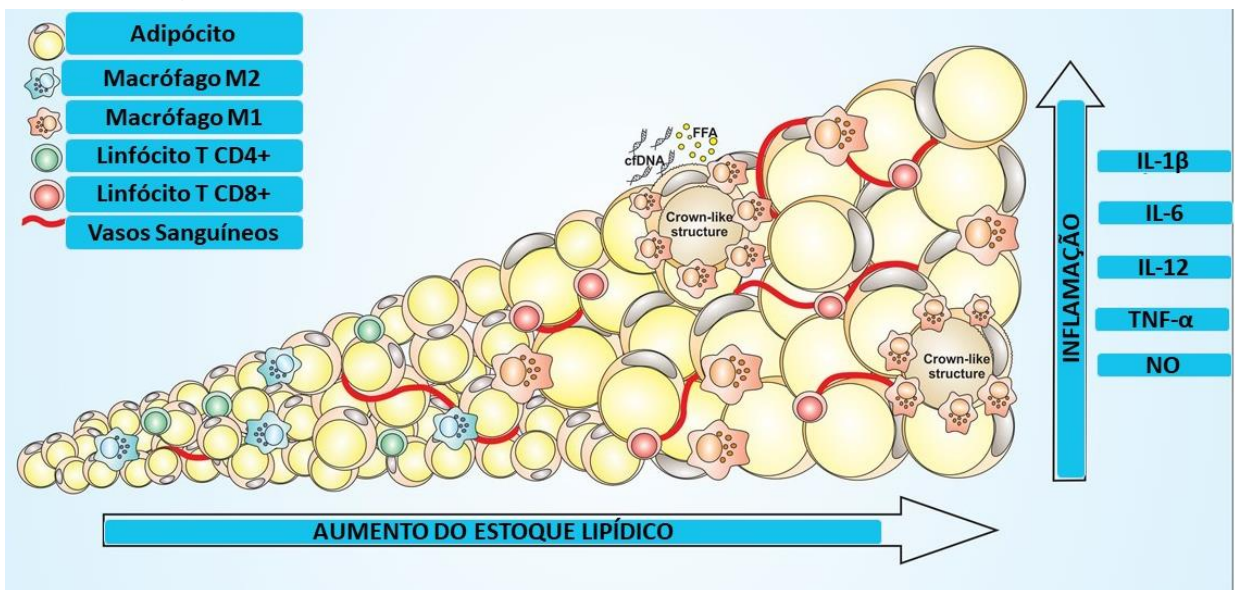


Figura 2: Alterações da plasticidade do tecido adiposo com o dano inflamatório. Nesta figura está ilustrado o processo de hipertrofia do adipócito na obesidade, decorrente do maior acúmulo de triglicerídeos, o que resulta em um processo inflamatório, através da necrose do adipócito, recrutamento de células imunes ao TA, tais como macrófagos mais polarizados para o perfil pró-inflamatório M1 e linfócitos TCD8+, aumento da secreção de citocinas inflamatórias pelo adipócito e pelas células imunes recrutadas, que acentuam o quadro de inflamação deste tecido. São ilustrados também a formação das CLS (do inglês crown-like structures), que se refere a macrófagos em formato de coroa que circundam o adipócito em necrose, além da ativação de vias angiogênicas, liberação de ácidos graxos livres, e a presença de DNA livre de célula. Fonte: Adaptado de Corrêa, L.H; Heyn, G.S; Magalhães, K.G. The Impact of Adipose Organ Plasticity on Inflammation and Cancer Progression. *Cells*, 2019, 8(7), 662.

A desregulação de WAT facilita no recrutamento de macrófagos através da liberação de quimiocinas seguida pela polarização ao fenótipo M1. A quantidade de linfócitos TCD8⁺ (linfócito T citotóxico CD8⁺) e NK (do inglês natural killers) estão aumentados neste perfil, que está associado a obesidade (Sica et al., 2008). Em oposição ao fenótipo M1, o perfil tipo 2 é caracterizado como anti-inflamatório, com produção e secreção de citocinas como a IL-10 (interleucina-10), IL-4 (interleucina-4) e TGF- β (fator de transformação de crescimento beta), maior quantidade de linfócitos TCD4⁺ (linfócito T auxiliares CD4⁺) e Treg (células T regulatórias) (Weisberg et al., 2003). A progressão da obesidade e o perfil inflamatório estão ilustrados na **figura 2**.

A comunicação entre células imunes como macrófagos e linfócitos com os adipócitos pode desregular a homeostase do TA, e como impacto afetar outros órgãos. O aumento da secreção de citocinas inflamatórias pode afetar órgãos como fígado, pâncreas, coração e cérebro. Dados recentes mostraram uma maior atividade de quinases tais como a JKK (quinase ativadora do complexo C-Jun), IKK (inibidor de quinase K) e PKR (proteína quinase R) no TA de obesos, que colaboraram para a piora da inflamação em outros órgãos (De Souza et al., 2005).

O adipócito exposto a um ambiente de estresse oxidativo, altas concentrações de ácidos graxos e citocinas pode resultar na ativação de vias de proliferação e sobrevivência, como exemplo pelas vias da MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno), a p38MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno p38), fatores de transcrição nuclear como NF κ B (fator nuclear kappa B) entre outras. A resposta inflamatória característica da obesidade pode promover a carcinogênese. A obesidade possui várias características de alteração da expressão de receptores PPAR- γ (receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama), que inclui o aumento da produção de PAI-1 (inibidor de ativação do plasminogênio-1), que por sua vez promove crescimento tumoral, através da inibição de apoptose quinases (Hotamisligil, 2006; Ouchi et al, 2011; Chen et al., 2015).

Níveis aumentados de leptina podem favorecer a progressão tumoral, com efeitos mitogênicos, pró-inflamatórios, anti-apoptóticos e pró-angiogênicos (Zhang et al, 1994; Leze et al, 2012) Pacientes obesos tem pior prognóstico e maior risco no desenvolvimento de metástase tumoral, uma vez que vias angiogênicas, pelo aumento da expressão de VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e HGF (fator de crescimento hepatotrópico) podem estar elevados (Rehman et al, 2003; De Pergola, Silvestris, 2013; Wiczór et al, 2016).

1.3 A interação do TA e o tumor

De acordo com dados divulgados pela IARC (Agência Internacional de Pesquisa ao Câncer), em 2016, foram descritos treze tipos de câncer, no qual a obesidade é um fator de risco para seu estabelecimento e progressão, dentre os quais são os tumores de: esôfago, adenocarcinoma gástrico, cólon e reto, fígado, vesícula biliar, pâncreas, mama pós-menopausa, uterino endometrial, ovário, rins, meningioma, tireóide e mieloma múltiplo (Larsson, Wolk, 2007; Yang et al, 2009; Turati et al, 2012; Zhao et al, 2012; Shao et al, 2014; Feng et al, 2015; Colditz; Lindsay, 2018; Lavalette et al, 2018; Liu et al, 2019).

Há uma interação dinâmica entre as células tumorais e o estroma circundante. Existe de fato uma clara relação entre a massa tumoral e a matriz extracelular. A matriz além de desempenhar suporte estrutural às células, também é um sítio importante de quimiocinas. Esta interação das células tumorais com a matriz extracelular pode promover a metástase tumoral, por exemplo (Turley; Cremasco; Astarita, 2015, Weisberg et al, 2003).

A progressão tumoral pode se iniciar no estroma, tais como visto nos CAFs (fibroblastos associados ao câncer) ou TAMs (tumores associados a macrófagos), que secretam componentes da matriz extracelular, fatores de crescimento que estimulam a migração e metástase. Os adipócitos podem influenciar na progressão tumoral, uma vez que são células que secretam adipocinas, hormônios, fatores de crescimento e citocinas, podendo modular o perfil inflamatório e de proliferação (Condeelis; Pollard, 2006; Hursting, Beger, 2010; Dirat et al, 2011; Park et al, 2014).

Na obesidade a hipertrofia e hiperplasia do adipócito promove sérias desregulações metabólicas, favorecendo a formação de um microambiente pró-tumorigênico. O TA de indivíduos obesos apresenta em maior quantidade citocinas como IL-1, IL-6, TNF- α , IL-1 β e de quimiocinas como CCL2. A quimiocina CCL2 (proteína quimiotática de monócitos), por exemplo, está aumentada devido ao reconhecimento de Cf DNA (DNA livre de células), que são liberados após morte do adipócito, resultando em maior acúmulo de macrófagos, que polarizam para perfil pró-inflamatório M1, agravando o quadro inflamatório (Rodríguez et al, 2015; Iyengar et al., 2016, Himbert et al, 2017;).

Neste contexto inflamatório e pró-tumorigênico da obesidade, destaque para os inflamassomas, complexos multiproteicos que permitem a clivagem mediada de

caspase-1, levando a secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e IL-18. Níveis circulantes aumentados destas citocinas, bem como a infiltração de macrófagos já discutida podem modular o microambiente tumoral e a formação de metástases (De Pergola, Silvestris, 2013; Nieman et al, 2013).

As espécies reativas de oxigênio (ROS) também estão envolvidas no processo de tumorigênese, uma vez que na inflamação crônica, decorrente do agravamento da obesidade, maior geração de ROS é observada (Muntané; de La Mata, 2010). Na obesidade, a hipóxia ocorre na medida que o TA se expande, gerando restrições na disponibilidade de oxigênio, promovendo infiltração de macrófagos e morte ao adipócito (Hotamisligil, 2017). O WAT de pacientes obesos apresenta CLS (do inglês crown-like structures). As CLS consistem em um infiltrado de macrófagos que circundam os adipócitos em necrose, potencializando o perfil inflamatório. As CLS estão associadas a formação e progressão de muitos tipos de câncer, sendo observado no câncer de mama (Iyengar et al., 2016), endométrio (Berstein et al., 2016) próstata, e câncer hepatocelular (Lavalette et al, 2018; Larsson, Wolk, 2007).

Os fatores secretados pelo TA podem colaborar para ativação da via mTOR, complexos mTORC 1 e mTORC2 (Lee, Yun, Guertin, 2017). O complexo mTORC1 é um importante regulador da biogênese mitocondrial e autofagia. A ativação deste complexo aumenta o número de cópias de DNA mitocondrial e promove a expressão de genes associados ao metabolismo mitocondrial, incluindo os que codificam proteínas chaves na respiração celular e fosforilação oxidativa (Rosario et al., 2019, López et al., 2019). O complexo mTORC1 pode ser ativado por nutrientes, tais como aminoácidos e fatores de crescimento. A ativação ou inibição do complexo mTORC1 desempenha papel de destaque na regulação da função e proliferação de células beta pancreáticas, mediada pela proteína quinase S6K. O complexo mTORC2 medeia a organização do citoesqueleto, migração celular e polarização (Zoncu et al., 2010).

A ativação de mTORC1, por exemplo é fundamental para regular a homeostase de células beta pancreáticas e secreção de insulina (Ardestani et al., 2017). A proteína mTOR é uma serina/treonina quinase, constituída de dois complexos proteicos distintos, o mTORC1 e mTORC2. O mTORC1 é sensível à ação da rapamicina. Este complexo está relacionado à regulação do crescimento celular, translação de proteínas pelos substratos S6K1 e 4E-BP1, regulando assim a autofagia via ULK1 e biogênese de ribossomos. O segundo complexo proteico que constitui a mTOR é o

mTORC2, está associado à sinalização de insulina, através de substratos que incluem AKT15 (Schreiber et al.,2019).

Os adipócitos associados a tumores podem facilitar a progressão tumoral. Os ácidos graxos liberados pelo adipócito em necrose, podem ser substrato energético para as células tumorais, cuja demanda por energia é mais alta, facilitando assim o crescimento e proliferação tumoral, com suporte nutricional ao tumor (Dirat et al., 2011). Na **figura 3** está ilustrado como o ambiente mais pró-inflamatório do TA pode favorecer o desenvolvimento tumoral.

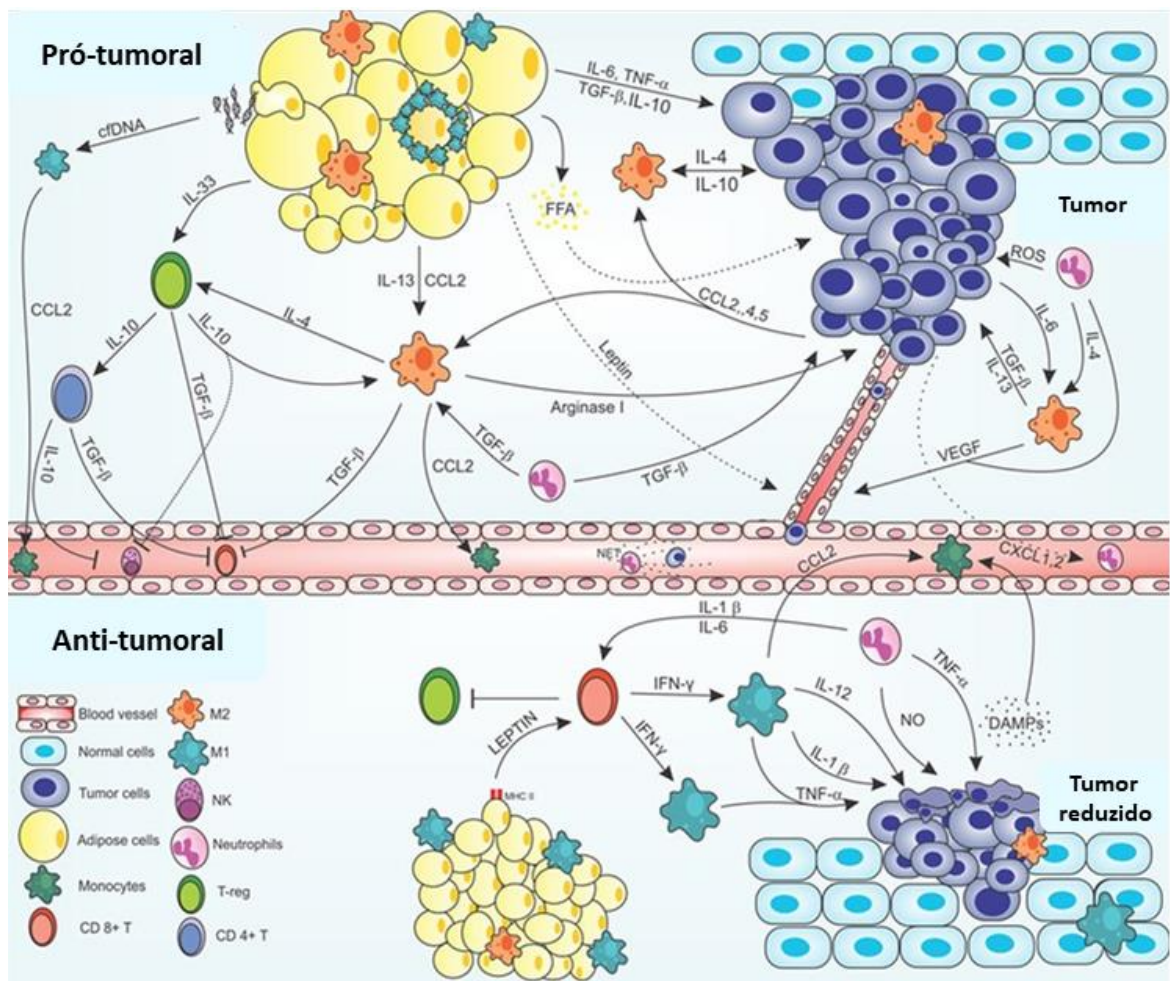


Figura 3: A interação entre adipócitos e macrófagos no microambiente tumoral. Nesta figura está ilustrado como o TA pode levar ao desenvolvimento tumoral, através de mediadores inflamatórios. As citocinas IL-6 e TNF- α promovem proliferação e angiogênese, enquanto as citocinas anti-inflamatórias IL-33, IL-10 e TGF- β também podem ser produzidas para manutenção do tumor. Observa-se que o perfil de polarização de macrófagos M2 inibe o recrutamento de células TCD8+ e NK, que poderiam reconhecer e eliminar as células tumorais. É possível correlacionar a secreção de óxido nítrico e danos celulares ativados pelo tumor. Fonte: Adaptado de Corrêa, L.H; Corrêa, R; Farinasso, C.M; Dourado, L.P; Magalhães, K.G. Adipocytes and Macrophages interplay in the orchestration of Tumor Microenvironment: New Implications in Cancer Progression. Front. Immunol, 8:1129, 2017.

A resistência insulínica, como consequência da obesidade também aumenta o risco de desenvolvimento tumoral. Foi relatado que na obesidade há uma redução da sensibilidade do TA à insulina. A adiposidade crescente está associada a hiperinsulinemia. Elevados níveis séricos de insulina promovem o crescimento acelerado e agressividade nos tumores colorretais, pancreáticos, hepático, mama e endometriais. Embora a insulina não induza mutações somáticas celulares, apresenta efeitos anabólicos e anti-apoptóticos. As células tumorais têm a capacidade de responder a ativação de insulina na transdução intracelular, em particular os altos níveis, como ocorre na obesidade. As vias ERK (quinase regulada por sinal extracelular) e PI3K (fosfatidilinositol 3-quinase) são ativadas pelo receptor de insulina, geralmente superexpresso em células tumorais (De Pergola, Silvestris, 2013)

A perda de função das células que compõe as ilhotas pancreáticas pode estar relacionada ao desenvolvimento de tumores pancreáticos, como exemplo o insulinoma e glucagonoma. O insulinoma é um tumor neuroendócrino de células beta pancreáticas, caracterizado pela alta secreção insulínica. (Okabayashi et al., 2013).

1.4 Insulinoma

As ilhotas de Langerhans foram descritas pela primeira vez em 1869, por Paul Langerhans, e constituem um aglomerado celular pancreático de células alfa, beta, delta, épsilon e polipeptídios pancreáticos, cada qual com uma função endócrina específica, que permite a homeostase glicêmica (Jo, Choi, Koh, 2009). A homeostase glicêmica desempenha um papel crucial na manutenção da vida, uma vez que perturbações dos níveis glicêmicos podem comprometer a função de diversos órgãos. As células beta pancreáticas produzem insulina, em resposta ao aumento dos níveis glicêmicos, enquanto as células alfa-pancreáticas produzem glucagon, em resposta à redução dos níveis glicêmicos (Xavier et al, 2018).

As células beta pancreáticas desempenham papel de fundamental importância no metabolismo sistêmico. Na diabetes tipo 1, a hiperglicemia é proveniente de fatores imunológicos e genéticos, nos quais observa-se a destruição das células beta, redução ou perda da secreção de insulina. Na diabetes mellitus tipo 2, a doença é caracterizada por resistência insulínica e hipersecreção de insulina, resultando na perda de função das células beta, e está associada a outras comorbidades como a obesidade. Observa-se também a redução da sensibilidade à insulina pelo músculo

esquelético, fígado e TA, comprometendo a captação de glicose pelas células, levando ao quadro de hiperglicemia, que por sua vez pode gerar danos vasculares, como retinopatia, nefropatia e neuropatia (Forbes e Cooper, 2013; Campbel e Newgard, 2021).

O insulinoma é um tumor neuroendócrino de células beta-pancreáticas. Dentre as características deste tumor destaca-se a alta secreção de insulina. Este tipo de tumor pode ocorrer em qualquer faixa etária e a distribuição é similar entre os gêneros masculino e feminino. O insulinoma pode se manifestar como um quadro de hipoglicemia severa, em decorrência da hiperinsulinemia endógena (Öberg, Eriksson, 2005).

As manifestações clínicas do insulinoma são resultantes do quadro de hipoglicemia, dentre os quais também podem ser relatados sintomas neuroglicopênicos: confusão mental, cefaleias, distúrbios comportamentais, tremores, tonturas, e em casos mais severos pode evoluir para um coma. Podem ser encontrados também sintomas relacionados à maior atividade de catecolaminas, como palpitações, fraqueza, hiperfagia e tremores (Matej, Bujwid, Wronski, 2016). A tríade de Whipple é utilizada no diagnóstico do insulinoma, e constitui-se pelos sintomas de hipoglicemia, com alívio sintomático após consumo de carboidratos, bem como dados laboratoriais, tais como os níveis de insulina e peptídeo C (Bashari, Riddel, Oyibo, 2015).

O insulinoma é geralmente benigno, mas em torno de 10% dos casos podem evoluir para quadro de malignização, como a metástase, preferencialmente hepática. O insulinoma está localizado preferencialmente na porção intra-pancreática. A maioria dos tumores são lesões solitárias e encapsuladas (Tucker, Crotty, Conlon, 2005). A interação entre TA e insulinoma ainda é desconhecida, embora tenham relatos de casos clínicos na literatura, nos quais foram observadas interações atípicas, como exemplo, foi descrito o recrutamento de adipócitos na região tumoral do insulinoma. O infiltrado de adipócitos foi confirmado por análise histopatológica após ressecção tumoral. O recrutamento e diferenciação de adipócitos pode ter beneficiado insulinoma, seja pela maior disponibilidade energética ou pela própria modulação inflamatória (Eriguchi, 2000).

O TA é um sítio importante da atividade insulínica, promovendo o estoque de triglicerídeos e inibição da lipólise. As células tumorais de insulinoma tendem a secretar níveis aumentados de insulina. A maior secreção insulínica associada à

perda de sensibilidade nos tecidos adiposos e periféricos, podem ser resultantes de alterações morfológicas do TA, que contribui como um gatilho pró-inflamatório (Stone; McPherson; Gail Darlington, 2018).

Foi reportado na literatura o caso clínico referente a um paciente com insulínoma e acentuada perda de peso. A redução de WAT visceral e atividade pronunciada do BAT interescapular deste paciente foram demonstrados. O padrão de captação de glicose pelo BAT deste paciente demonstrou uma atividade exacerbada. A maior atividade de BAT pode ser observada em alguns tipos tumorais, levando ao estado de caquexia. O BAT é sensível à ação da insulina, então possivelmente a hipersecreção insulínica poderia ter resultado em uma maior atividade deste TA (Cannon, Nedergaard, 2004; Saito et al, 2009; Wang et al, 2015; Prídavková et al., 2020).

O BAT quando ativado aumenta a captação de glicose, que atua como substrato para termogênese, síntese de novo de ácidos graxos, produção de glicerol (Carpentier et al., 2018). Estudos em roedores demonstraram que a quantidade captada de glicose pelo BAT é suficiente para afetar de forma aguda e a longo termo a homeostase da glicose, o que torna o BAT potencial alvo terapêutico no tratamento para diversas desordens metabólicas dependentes da homeostase da glicose, como diabetes tipo 2 (Cypess et al, 2009; Olsen et al., 2014).

O TA pode beneficiar o crescimento tumoral desde o fornecimento energético aumentado, através de ácidos-graxos livres liberados por lipólise dos adipócitos, seja pela secreção diferencial de adipocinas, citocinas e até mesmo pelos miRNAs. Os miRNAs estão associados a diversas doenças como câncer, diabetes e a própria obesidade. Os adipócitos regulam a expressão de genes através de exossomos circulantes que contêm miRNAs, o que demonstra uma forte influência do TA sobre outros tecidos (Thomou et al., 2017).

A alteração e regulação destes miRNAs podem impactar na proliferação e diferenciação de adipócitos durante o desenvolvimento de células adiposas, com grandes perspectivas de novos alvos terapêuticos para drogas anti-obesidade, além de biomarcadores para diagnósticos clínicos e de carcinogênese (McGregor, Choi, 2011).

1.5 O papel dos miRNAs derivados do TA e o risco de carcinogênese

Na carcinogênese, várias vias de sinalização e reparo estão desreguladas, como exemplo as vias de proliferação e sobrevivência, angiogênese, evasão da resposta imune e apoptose, reprogramação metabólica, instabilidade genética e inflamação (Hanahan e Weiberg, 2011). Neste sentido, o papel dos miRNAs nesta desordem se torna cada vez mais evidente. A superexpressão ou ausência de alguns miRNAs estão associadas ao desenvolvimento tumoral (Ji; Sun; Su, 2017). Os miRNAs regulam diversos processos biológicos. Estes pequenos nucleotídeos representam um potencial alvo terapêutico e como biomarcadores. Estão relacionados a importantes processos, tais como: adipogênese, secreção insulínica, metabolismo lipídico, termogênese, vias de sinalização e reparo, angiogênese e inflamação (Peng et al., 2014).

Os miRNA são pequenos RNAs não codificantes, consistem em 19 a 23 nucleotídeos, conhecidos também como silenciadores gênicos. Atuam através de mecanismos de silenciamento de gene pós-transcricional. Os miRNA suprimem a atividade pós-transcricional, clivando o mRNA (RNA mensageiro) alvo ou pela deadenilação do mRNA. A supressão da atividade pós-transcricional pode alterar diretamente na atividade de diversos genes, dentre os quais envolvidos na diferenciação do adipócito, sensibilidade à insulina e captação de glicose (Williams; Mitchell, 2012; Ha, Kim, 2014).

Os miRNAs podem regular uma diversidade de genes codificados pelo genoma humano, no qual um miRNA pode ter como alvo mais de cem genes. O miRNA se liga a regiões 3' UTR de um mRNA (RNA mensageiro) específico (Lu, Clark, 2012). A biogênese do miRNA pode ser classificada em duas vias: a canônica e não canônica e se inicia pela transcrição no núcleo pela RNA polimerase II ou III, gerando um transcrito de miRNA, o pri-miRNA, apresentando um 5' cap e uma cadeia poli A (Treiber; Treiber; Meister, 2019).

Os pri-miRNAs são transcritos e processados em pré-miRNA por um complexo processador consistindo em uma proteína de ligação ao RNA, a DGCR8 (do inglês DiGeorge Syndrome Critical Region 8) e uma ribonuclease III, a Drosha. A Drosha cliva o duplex do pri-miRNA na estrutura de hairpin, resultando no pre-miRNA. O pré-miRNA é então transportado ao citoplasma pela exportina-5, dependente de cofactor RanGTP (Ran GTPase), para então ser processada pela endonuclease RNase III, a enzima Dicer. Após processamento da Dicer, ocorre a remoção do loop terminal, o que gera um miRNA duplex, no qual é incorporado no complexo silenciador induzido

por RNA RISC, incluindo proteínas Argonautas como seus principais componentes, formando assim o miRNA maduro que terá como alvo o mRNA, promovendo assim a repressão translacional (Williams; Mitchell, 2012, O'Brien et al, 2018).

Os miRNAs secretados pelo TA podem estar envolvidos na expressão de UCP-1 e PGC1- α (marcadores de browning), atuando tanto a níveis parácrinos, quanto endócrinos em outros tecidos. Os miRNAs podem ser considerados como uma nova classe de adipocinas, que influenciam o metabolismo em outros tecidos. Os miRNAs podem resultar em alterações na diferenciação dos adipócitos, como exemplo o miR-193b-365 e miR-155 estão relacionados à adipogênese do tecido marrom, e o miR-143 e miR-103 na diferenciação do adipócito branco e resistência insulínica (MacFarlane, Murphy, 2010; Sun et al., 2011). A superexpressão do miRNA-375, por exemplo, está associada a uma desregulação da secreção insulínica, da gliconeogênese e das células beta pancreáticas (Poy et al, 2009).

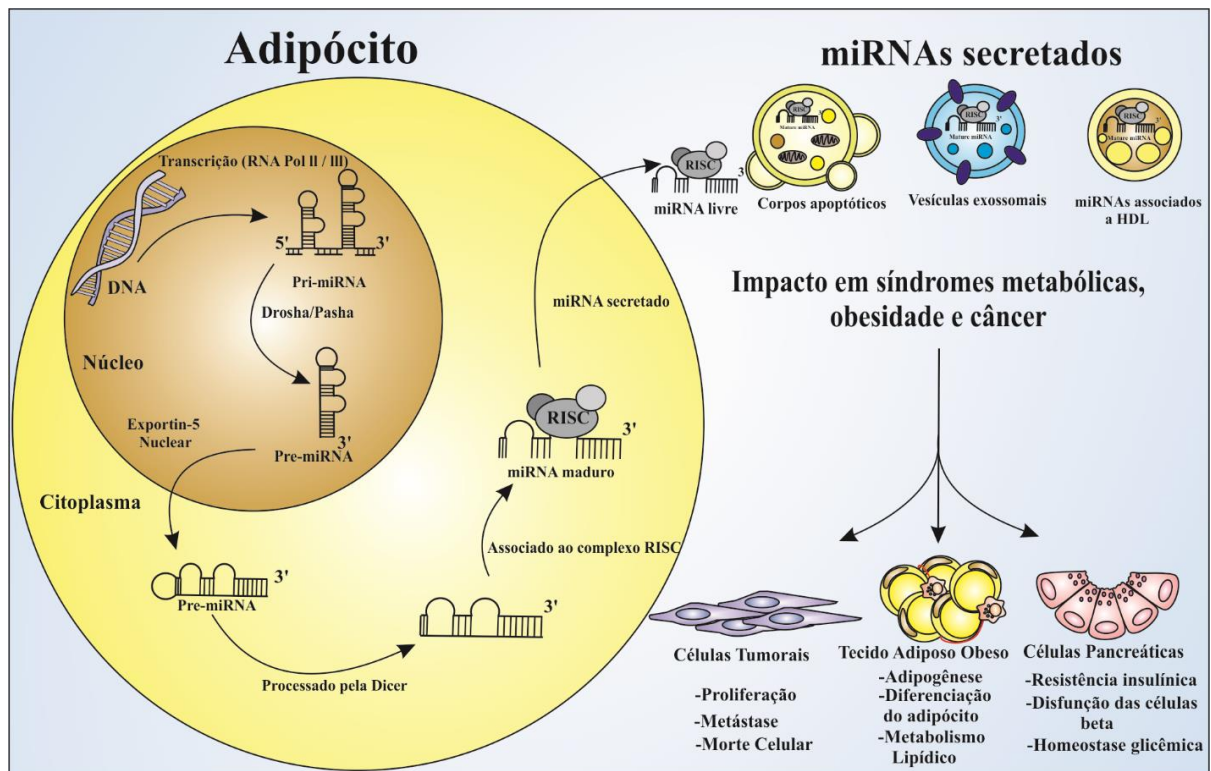


Figura 4: Biogênese do miRNA e seu impacto em distúrbios metabólicos. Nesta figura está ilustrada a biogênese do miRNA, desde a transcrição do gene pela RNA polimerase II/III, a conversão de pri-miRNA para pré-miRNA, sendo exportado para o citoplasma, no qual a enzima Dicer processará este pre-miRNA, com a eliminação do hairpin (grampo), associando-se ao complexo RISC e sendo secretado. O miRNA pode ser secretado na forma livre, por vesículas exossomais, o que representa a maioria dos miRNAs provenientes do TA, em corpos apoptóticos e associados a lipoproteínas. Os miRNAs podem influenciar diversos processos fisiológicos, e desta forma comprometer vias de proliferação, angiogênese, metabolismo lipídico, adipogênese e homeostase da glicose. Fonte: Adaptado de Heyn, G.S; Corrêa, L.H; Magalhães, K.G. The Impact of Adipose Tissue-derived miRNAs in Metabolic Syndrome, Obesity and Cancer. Front. Endocrinol (2020).

Os miRNAs derivados do TA podem alterar vias inflamatórias e angiogênicas, importantes pilares no risco carcinogênico (Hotasmiligil 2017; Ogawa et al., 2010). Os miRNAs podem ser oncogênicos ou supressores tumorais, a depender do mRNA a ser silenciado (Svoronos, Engelman, Slack, 2016). Diversos estudos na literatura destacam a função de miRNAs derivados do TA no risco carcinogênico. O miRNA 377, por exemplo, é considerado um regulador mestre da adipogênese do WAT (Peng et al., 2017). Tem como alvo a SIRT1, que por sua vez está envolvida na iniciação tumoral, progressão e angiogênese (Liu, Liu, Marshal, 2009). O miRNA 34a está associado à redução da proliferação e migração de células de câncer de mama, por um mecanismo atrelado a uma redução da expressão de Bcl-2 e SIRT-1 (Li et al., 2013).

Uma vez que os genes de miRNAs podem ser encontrados em regiões relacionadas ao tumor, podem facilitar a ativação de vias tumorais. A disseminação tumoral como consequência da desregulação da expressão de miRNAs. Estes podem atuar como oncogenes ou supressores tumorais, como visto na baixa expressão de miR-15 e miR-16 com leucemia linfocítica crônica (Peng, Croce, 2015; Tan et al., 2018).

Os miRNAs 221 e 222 atuam sobre vias angiogênicas e inibem o recrutamento de células endoteliais (Chistiakov et al., 2014). O miR-223 favorece a polarização de macrófagos para perfil M2, mais anti-inflamatório (Zhuang et al., 2012). O miR-21 é secretado por macrófagos residentes do TA, tem efeitos anti-apoptóticos, tendo como alvo o gene PTEN, ativando vias de crescimento e proliferação tumoral (Wu et al., 2017). A superexpressão deste miRNA foi detectada em tumores pancreáticos, cólon, mama e glioblastoma. A secreção do miR-155 contribui na ativação da resposta inflamatória do TA, modula o microambiente tumoral, favorece a hipóxia, tendo como alvo HIF-1 α (Bruning et al., 2011).

Na **figura 5** estão ilustrados os mecanismos pelos quais miRNAs secretados do TA podem modular vias tumorais, tendo impacto sobre angiogênese, crescimento celular, proliferação. O TA magro é caracterizado por um perfil de polarização mais anti-inflamatório, como demonstrado pela infiltração de macrófagos M2 e linfócitos TCD4+. A secreção do miR-223 inibe a ativação de macrófagos M1 ao suprimir Pknox1 (do inglês PBX/Knotted 1 Homeobox 1). O miR-145 atua como supressor tumoral, associado a inibição do fator transcricional oncogênico C-MYC. A transição do TA magro para o obeso que está mais inflamado, importantes alterações como a

hipertrofia do adipócito, angiogênese e inflamação são observadas. O miR-21 secretado por macrófagos do TA tem um papel oncogênico, através do silenciamento do gene PTEN, favorecendo assim o crescimento tumoral. O miR-155 contribui para a ativação da resposta inflamatória, enquanto o miR-27a pode inibir o fator de transcrição FOXO1 (do inglês Forkhead box transcription factor O1), que regula genes associados a parada do ciclo celular e apoptose. O miR-222 pode atuar em vias angiogênicas, facilitando a progressão tumoral (Chistiakov et al., 2015; Pan et al., 2018; Kim et al., 2009).

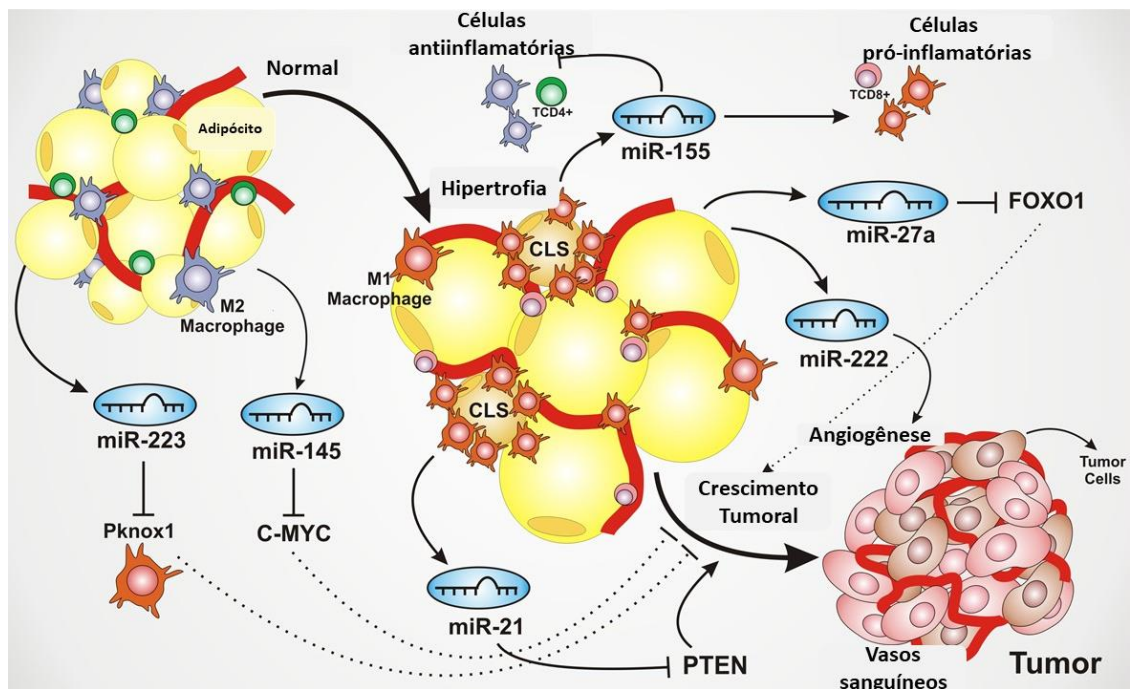


Figura 5: miRNAs derivados do TA modulam processos inflamatórios e vias tumorais. Nesta figura está ilustrado como a secreção de miRNAs derivados do TA modula o desenvolvimento tumoral. No TA normal, sem processo de hipertrofia do adipócito, a secreção de miRNA-223 suprime a via Pknox1 (do inglês PBX/knotted 1 Homeobox 1), que inibe a ativação de macrófagos polarizados ao perfil mais pró-inflamatório M1. O miR-145 atua como um supressor tumoral ao inibir o fator transcricional oncogênico C-MYC. Na obesidade, com a hipertrofia do adipócito, maior inflamação do TA, observa-se a secreção do miR-21 por macrófagos residentes deste tecido, que ao silenciar PTEN, ativam vias de crescimento e proliferação tumoral. O miR-155 contribui para ativação da resposta inflamatória, e o miR-222 com angiogênese. Fonte: Adaptado de Heyn, G.S; Corrêa, L.H; Magalhães, K.G. The Impact of Adipose Tissue-derived miRNAs in Metabolic Syndrome, Obesity and Cancer. *Front. Endocrinol* (2020).

O envelhecimento reduz a expressão de miRNAs no TA, através da menor atividade da endonuclease Dicer (Smith-Vikos; Slack, 2012). A enzima Dicer, conforme apresentado brevemente na biogênese do miRNA é importante no processamento citoplasmático, sendo uma etapa crucial. Os miRNAs influenciam o fenótipo e a função do adipócito branco e marrom (Karbiener; Scheideler, 2014).

Dados da literatura mostraram que o silenciamento de Dicer no TA gera um fenótipo de lipodistrofia, dislipidemia e resistência insulínica (Mori et al., 2014).

Mori e colaboradores (2014) demonstraram que camundongos com o silenciamento de Dicer no TA (Adicer KO), desenvolveram lipodistrofia, caracterizada por alteração na distribuição de TA branco, acompanhado por processos inflamatórios, resistência insulínica, dislipidemia, menor expressão de genes que codificam leptina e adiponectina e piora na captação de glicose. Thomou e colaboradores (2017) demonstraram que miRNAs exossomais derivados do TA podem exercer efeito endócrino, regulando outros órgãos, como fígado. O transplante do BAT de camundongo LOX (controle) em camundongo Adicer restaurou as concentrações séricas de vários miRNAs circulantes, relacionados com a melhora da tolerância a glicose, e redução dos níveis hepáticos de FGF21 (fator de crescimento de fibroblasto 21), mais especificamente o miRNA-99b foi o responsável por esta regulação dos níveis de FGF21 (Thomou et al, 2017).

Estes dados demonstram a importância desempenhada pelos miRNAs derivados do TA, que podem ser considerados adipocinas, atuando na plasticidade e função do TA, na identidade celular e regulação endócrina.

2.0 Justificativa

O TA é um órgão endócrino com alta plasticidade e função (Ailhauld 2000). Evidências apontam uma possível interação entre TA e progressão tumoral (Quail, Dannenberg, 2019). O TA não é composto somente por adipócitos, mas também pela fração estroma vascular do tecido, constituído por células imunes, matrix extracelular, células endoteliais. O imunometabolismo, ou seja, a interação entre adipócitos e células imunes podem impactar diretamente na progressão inflamatória do TA e na secreção diferencial de produtos deste tecido, contribuindo para progressão tumoral. Dentre os mecanismos pelos quais a interação seria possível, destaca-se a função secretória do TA, através da produção de hormônios, citocinas, enzimas (Makki, Froguel, Wolowczuk, 2013) peptídeos e miRNAs, que podem exercer controle regulatório tanto a nível parácrino, autócrino e sobretudo endócrino. Neste sentido, investigamos inicialmente os efeitos do estímulo *in vitro* de meio condicionado de BAT e WAT murinos, contendo produtos de secreção destes tecidos no insulinooma, tendo como enfoque a análise de parâmetros carcinogênicos e inflamatórios. Os miRNAs derivados do TA podem atuar como oncogenes ou supressores tumorais, alterar vias de proliferação e invasão tumoral, induzir angiogênese, alterar mecanismos de evasão de apoptose e promover respostas inflamatórias, e atuar de forma endócrina (Zhang et al, 2007; Wang et al, 2018; Tahantan et al, 2018). Com o intuito de analisar o impacto da ausência de miRNAs no TA sobre os efeitos da interação dos produtos de secreção de BAT e WAT no insulinooma, utilizamos camundongo knockout para Dicer no TA (Adicer). Desta forma, espera-se o melhor entendimento da comunicação entre tecidos adiposos e células do insulinooma, bem como do papel dos miRNAs do TA neste processo.

3.0 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos diferenciais que os produtos de secreção de BAT e WAT possuem sobre a modulação de parâmetros inflamatórios e carcinogênicos do insulínoma murino, e a função dos miRNAs dos tecidos adiposos neste processo

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Avaliar o efeito da secreção derivada de BAT e WAT, com presença e ausência de miRNAs, sobre o insulínoma, avaliando:

- a viabilidade e morte celular em insulínoma;
- a participação de componentes da via de sinalização de mTOR na viabilidade celular do insulínoma
- o ciclo celular e fragmentação nuclear do insulínoma;
- as características ultra estruturais celulares relacionados a morte celular, lipofagia e dano mitocondrial no insulínoma
- a integridade e função mitocondrial do insulínoma;
- a produção de ROS (espécies reativas de oxigênio) no insulínoma;
- a secreção de óxido nítrico pelo insulínoma;
- a biogênese de corpúsculos lipídicos no insulínoma;
- a modulação do perfil inflamatório do insulínoma;

3.2.2. Identificar e caracterizar proteínas glicosiladas presentes nos tecidos adiposos e na secreção derivada de BAT e WAT, com presença e ausência de miRNAs.

4.0 Materiais e Métodos

4.1 Linhagem celular de insulinoma murino (MIN6)

A linhagem de insulinoma murino MIN6 (ATCC®CRL-11506) foi doada pelo Dr. Antônio Bosco do Laboratório do Pâncreas Endócrino e Metabolismo (Instituto de Biologia, UNICAMP). As células foram cultivadas em meio DMEM (meio Eagle modificado por Dulbecco), contendo 25 mM de glicose, suplementado com 10% de soro fetal bovino (Sigma Aldrich), 2 mM L-glutamina, 285 µM de 2-mercaptoethanol e 100 µM de antibiótico penicilina/estreptomicina (Sigma Aldrich), mantido na temperatura de 37 °C e atmosfera modificada em 5 % de CO₂.

4.2 Genotipagem dos camundongos

Os camundongos C57BL/6 knockout para Dicer no TA (Adicer) foram gerados por recombinação gênica Cre-LOX. Os camundongos Adicer e controle LOX foram doados pelo Dr. Marcelo Mori, do Laboratório de Biologia do Envelhecimento (Instituto de Biologia da UNICAMP). Foram utilizados camundongos machos, de 4 a 5 meses de idade, peso entre 20 e 25 g. Todos os animais foram mantidos em ciclo de 12 horas claro/escuro, sem restrições de água e ração, sob condições de termoneutralidade entre 26 e 28 °C. A formação de novas matrizes de cruzamento e identificação dos filhotes foi possível por genotipagem. Para a genotipagem foram extraídos fragmentos de 2 mm da cauda dos animais. O DNA foi obtido por lise alcalina. O fragmento de tecido foi tratado com solução básica (50 mM de NaOH e 1 M de TrisBase), ajustado para o pH final de 8.0.

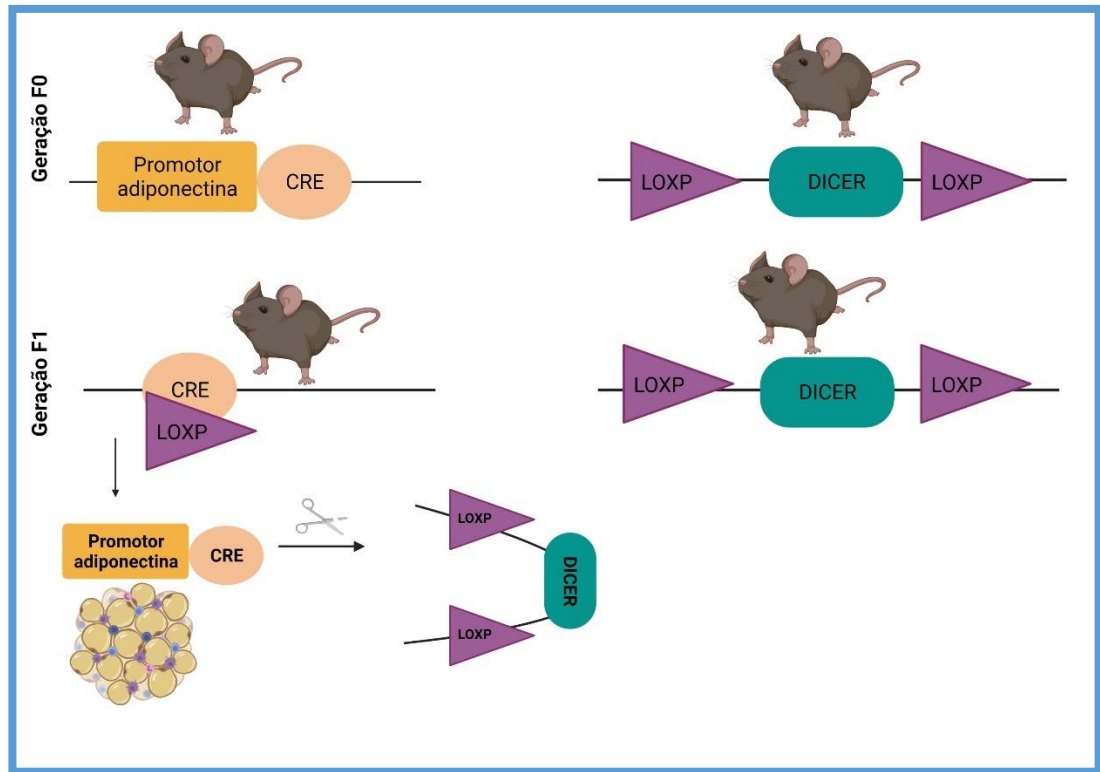


Figura 6: Esquema simplificado da recombinação sítio-específica por sistema Cre-Lox. Nesta figura estão representados os cruzamentos de camundongos LOX e Adicer, e o reconhecimento da enzima Cre recombinase reconhece sítios LoxP, levando assim ao nocaute do gene *Dicer*, responsável pelo processamento dos miRNAs no citoplasma. Fonte: próprio autor. Figura criada com licença e direito de publicação pela BioRender.com.

Tabela 1: Condições otimizadas da reação de PCR para genotipagem dos camundongos

Reagentes	Volume	Sequência
MasterMix Promega	12,5 µL	-
Primer OIMF733	1 µL	CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT
Primer OIMF 7339	1 µL	GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C
Primer 15381	1 µL	ACG GAC AGA AGC ATT TTC CA
Primer 18564	1 µL	GGA TGT GCC ATG TGA GTC TG
DNA	3 µL	-
H2O livre de nuclease	5,5 µL	
Volume final	25 µL	

Fonte: próprio autor

Tabela 2: Ciclos da PCR para genotipagem de camundongos LOX e Adicer

Etapa	Ciclo 1	Tempo
1	94°C	2 minutos
2	94° C	20 segundos
3	65°C	15 segundos
4	68°C	10 segundos
Repetir etapa 2 a 4 (10 vezes)		
Etapa	Ciclo 2	Tempo
5	94°C	15 segundos
6	60° C	15 segundos
7	72°C	30 segundos
8	68°C	10 segundos
Repetir etapa 6 a 8 (28 vezes)		
9	72°C	2 minutos
5	10°C	hold

Fonte: próprio autor

As condições da reação de PCR, além da sequência dos primers utilizados estão especificados abaixo. O DNA foi analisado por eletroforese em gel de agarose 2%, e as bandas referentes ao camundongo knockout (em 324 pares de base e 200 pares de base) e controle (200 pares de base) puderam ser identificadas com marcador de peso molecular de 100 pares de base (Kasvi).

4.3 Extração de BAT e WAT e obtenção do meio condicionado derivado dos tecidos adiposos

Os camundongos foram eutanasiados por inalação de CO₂ em câmara fechada. Após a eutanásia, o BAT da região interescapular e o WAT da região gonadal de camundongos Adicer e LOX foram extraídos em condições estéreis, dentro de fluxo laminar, com materiais cirúrgicos previamente esterilizados. Os tecidos foram dissociados em placas de 6 poços, em meio de cultura DMEM na concentração de 25 mM de glicose, 1% de BSA (Sigma Aldrich), 10% de soro fetal bovino (Sigma Aldrich), 285 µM de 2-mercaptoethanol, 100 µM de penicilina/estreptomicina (Sigma Aldrich), 40 µg/mL de gentamicina, 25 µg/mL de anfotericina B e cloranfenicol na concentração de 10 µg/mL. A cada 0,05 g de tecido pesado, foram adicionados 1 mL deste meio

suplementado com antibióticos e BSA, a fim de normalizar a quantidade de amostra utilizada nos ensaios *in vitro*. Os tecidos adiposos foram mantidos em cultura neste meio, denominado de meio condicionado, por 24 horas, em estufa na temperatura de 37°C e 5% de CO₂. Após 24 horas em cultura, este meio contendo produtos de secreção de BAT e WAT, de camundongos Adicer e LOX foram utilizados para estimular as células de insulinooma murino MIN6, na proporção de 2:1 em relação a meio DMEM próprio para as condições de cultura destas células.

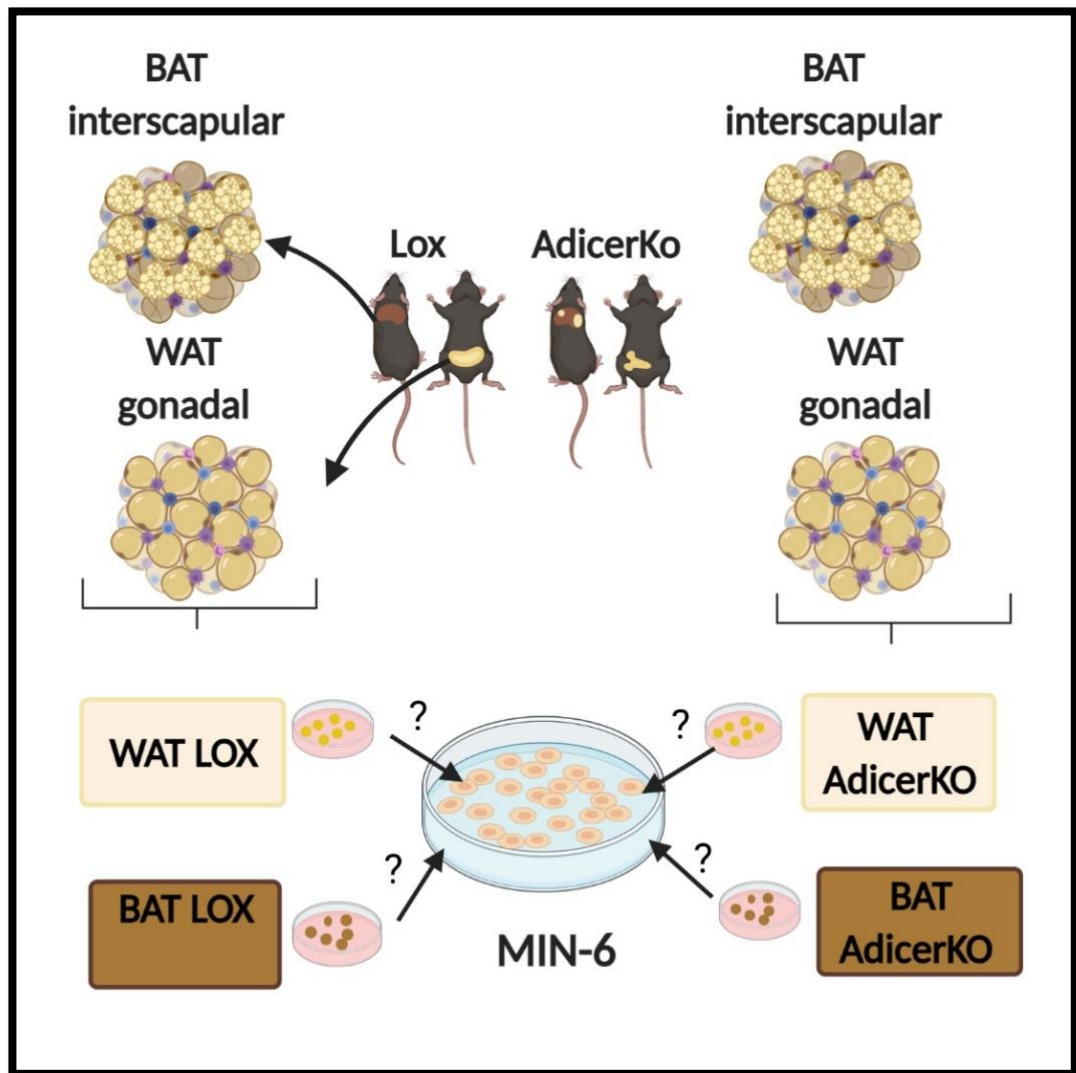


Figura 7: Extração de BAT e WAT com estímulo dos produtos de secreção em células MIN6. A figura acima ilustra a retirada de BAT da região interescapular dos camundongos LOX e Adicer. Nos camundongos Adicer observa-se em BAT acúmulo de adipócitos brancos, enquanto o WAT está reduzido (lipodistrofia). Os meios condicionados contendo os produtos secretados pelos tecidos foram utilizados como estímulo nas células MIN6. Após o estímulo, parâmetros inflamatórios e carcinogênicos foram analisados. Fonte: próprio autor. Figura criada com licença e direito de publicação pela BioRender.com.

4.4 Ensaio de viabilidade celular por MTT

As células MIN6 foram plaqueadas na densidade de $1,25 \times 10^4$ células por poço em placas de 96 poços. As células foram estimuladas com meio condicionado derivado de BAT e WAT por 48 horas. A proporção de estímulo foi de 2:1 em relação a meio DMEM, ou seja, a cada 150 μL , 100 μL provenientes de estímulo e 50 μL de meio DMEM e suplementos utilizados para cultura da linhagem MIN6. Os estímulos foram denominados de BAT LOX (derivado de BAT do camundongo controle LOX), BAT Adicer (derivado de BAT do camundongo Adicer), WAT LOX (derivado de WAT do camundongo controle LOX), WAT Adicer (derivado de WAT do camundongo Adicer) e UNS (não-estimulado). Após 48 horas de estímulo, a viabilidade celular dependente da atividade mitocondrial foi analisada por MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio brometo, Sigma Aldrich) medido pela capacidade de formação de cristais de formazan. As células foram posteriormente tratadas com indutor autofágico rapamicina (100 ng/mL) e 3-metiladenina (5mM) um inibidor de PI3K classe III, em combinação com os produtos de secreção dos tecidos adiposos dos camundongos Adicer e LOX por 24 h.

O reagente MTT foi utilizado na concentração de 10% do volume do meio (concentração estoque de 5mg/mL diluído em tampão PBS 1X, pH 7.4). As placas foram incubadas com MTT, em estufa, na temperatura de 37 °C, mantidos em 5% de CO₂, por 1 hora. Foram incluídos como controles as células estimuladas com DMSO (concentração de 5 mM) e células estimuladas com o meio condicionado (meio DMEM contendo suplementos). A absorbância foi lida em 570 nm no espectrofotômetro SpectraMax M3 (Molecular Devices, USA).

4.5 Análise de morte celular

As células MIN6 foram plaqueadas na densidade de 5×10^4 por poço em placa de 24 poços. As células foram estimuladas por 48 horas com meio condicionado derivado de BAT e WAT, de camundongos Adicer e LOX, na proporção de 2:1. As células foram incubadas com sonda Anexina V conjugada com FITC, do kit de detecção de apoptose (BD Biosciences) e iodeto de propídio (Sigma Aldrich). As amostras foram adquiridas em citômetro FACSCalibur (Becton & Dickenson, USA)

imediatamente após finalização da marcação. Foram adquiridos 10.000 eventos e analisadas as fluorescências nos canais FL1-H e FL3-H, em escala logarítmica. Os dados foram analisados por software *FlowJo V10* (Tree Star Inc).

4.6 Análise do ciclo celular e fragmentação nuclear

As células foram plaqueadas na densidade de 1×10^5 por poço, em placa de 24 poços, estimuladas por 48 horas com meio condicionado derivado de BAT e WAT de camundongos Adicer e LOX, na proporção de 2:1. As células foram desaderidas com tripsina e fixadas em etanol 70% por 2 horas. Após a etapa de fixação, as células foram marcadas com 100 μ L de solução de iodeto de propídio (0,1% de citrato de sódio, 0,1% de Triton-x, 20 μ g/mL de iodeto de propídio, 50 μ g/mL de RNase e PBS 1X, pH 7.4). As células foram incubadas por 30 minutos na temperatura ambiente. A fragmentação do DNA e análise do ciclo celular foram realizados por citometria de fluxo, em citômetro FACSCalibur (Becton & Dickenson, USA). Foram adquiridos 30.000 eventos por amostra analisada. Os dados foram analisados em software *FlowJo V10* (Tree Star Inc).

4.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão

As células MIN6 foram plaqueadas na densidade de 6×10^6 células em frasco de cultura de 25 cm^2 , e estimuladas por 48 horas com meio condicionado de BAT e WAT de camundongo LOX, e BAT e WAT de camundongo Adicer, na proporção de 2:1 de estímulo em relação ao meio de cultura DMEM, e células não estimuladas. Para análise das células de insulinoma em microscopia eletrônica de transmissão (MET) as amostras provenientes dos diferentes tratamentos foram lavadas com PBS pH 6,4, ressuspensas e fixadas em 2% de glutaraldeído e 2% de paraformaldeído tamponado em 0,1 M tampão de cacodilato de sódio pH 6,4 com 5% de sacarose. As amostras foram pós-fixadas em 1% de tetróxido de ósmio por 4 horas, desidratadas em série de soluções aquosas de concentrações crescentes de acetona e incluídas em resina "Spurr". Os cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo, examinados em microscópio eletrônico de transmissão modelo Jeol (JEM) 100 C (Jeol Ltd, Tokyo, Japão, 80 kv).

4.8 Avaliação da quantidade de mitocôndrias viáveis com sonda MitoTracker por microscopia de fluorescência

As células MIN6 foram plaqueadas na densidade de 5×10^4 por poço, em placas de 24 poços pré-revestidas com lamínulas para microscopia. As células foram estimuladas com meio condicionado derivado de BAT e WAT, de camundongos Adicer e LOX, na proporção de 2:1. Após 24 horas de estímulo, as células foram marcadas com sonda MitoTracker Red CMXRos (Thermo Fisher), diluída no mesmo meio de cultura DMEM e suplementos para cultura das células MIN6, porém sem soro fetal bovino. As células foram desaderidas com tripsina e marcadas com sonda MitoTracker, por 45 minutos, protegidas da exposição à luz, e em estufa na temperatura de 37°C e 5% de CO₂. Após 45 minutos de incubação, as células foram lavadas com 200 µL de PBS 1X, pH 7.4. Após lavagem, foram fixadas com 3,7% de formalina por 15 minutos e lavadas uma vez com PBS 1X, pH 7.4. Após a etapa de fixação, as células foram marcadas por 5 minutos com DAPI (4',6'-diamino-2-fenil-indol) (Sigma-Aldrich) diluído em PBS 1X (1:5.000), e lavado novamente em PBS 1x. As amostras foram analisadas por microscopia de fluorescência, em equipamento EVOS Cell EVOS Cell Imaging System (Thermo Fisher). A intensidade média de fluorescência foi detectada por software Image J, e a análise estatística realizada em software GraphPad Prism para três experimentos independentes.

4.9 Avaliação da formação de ROS por sonda DCF-DA

As células MIN6 foram plaqueadas na densidade de 5×10^4 células por poço, em placa de 48 poços. As células foram estimuladas por 24 horas com meio condicionado derivado de BAT e WAT, de camundongos Adicer e LOX, na proporção de 2:1. Após 24 horas de estímulo, as células foram incubadas com sonda diclorodihidrofluoresceína-diacetato (DCF-DA, Sigma Aldrich) na concentração de 20 µM. A menadiona foi utilizada como controle positivo, na concentração de 50 µM, uma vez que induz a formação de ROS por ciclicização redox, solubilizada em meio DMEM e suplementos utilizada na cultura de MIN6, sem soro fetal bovino. As células foram incubadas com DCF-DA por 30 minutos em estufa a 37°C. Após 30 minutos, as células foram lavadas duas vezes em PBS 1x, pH 7.4. Após lavagem, as células foram fixadas com formalina na concentração de 3,7% em PBS 1X. Após fixação, as células foram desaderidas com tripsina, centrifugadas a 1800 rpm, 4°C e 5 minutos. As células

foram ressuspensas em PBS e a geração de ROS medida por citometria de fluxo, em citômetro FACSCalibur (Beckton& Dickson). Os dados foram analisados em software *FlowJo V10* (Tree Star Inc) e análise estatística em software GraphPad Prisma.

4.10 Análise da função mitocondrial por respirometria de alta resolução

As células MIN6 foram plaqueadas em placas de 6 poços (n=4), com densidade celular de 2×10^6 células por poço. As células foram estimuladas por 24 horas com meio condicionado derivado de BAT e WAT, de camundongos Adicer e LOX, na proporção de 2:1. Após 24 horas de estímulo, as células foram desaderidas com tripsina, lavadas em PBS, centrifugadas em PBS, ressuspensas em meio DMEM sem soro fetal bovino e sem beta-mercaptoetanol. A taxa de consumo de oxigênio (OCR) foi avaliada através do respirômetro de alta resolução (OROBOROS Oxygraph-2k), à 37°C, em agitação contínua à 750 rpm. Ao início de cada dia de experimento rodado, o equipamento foi calibrado com o meio usado para fazer o cultivo das linhagens, DMEM sem SFB e sem beta-mercaptoetanol. Foram adicionadas 1×10^6 células/mL às câmaras do respirômetro. Foram utilizados moduladores e o consumo de oxigênio analisado após estabilização do sinal frente a estes estímulos. Os reagentes utilizados foram a oligomicina (inibidor da ATP sintase) na concentração de 1,25 μ M, pelo qual foi possível a obtenção do dado de consumo de oxigênio acoplado à síntese de ATP; o CCCP (carbonilcianeto m-clorofenilhidrazona é um desacoplador da cadeia transportadora de elétrons), adicionado em pulsos de 40 η M, o qual permite analisar a capacidade respiratória máxima da célula; a rotenona (inibidora do complexo I da CTE) na concentração de 0,5 μ M, a antimicina A (inibidora do complexo III da CTE) na concentração de 1 μ M, pelo qual foi possível analisar o consumo de oxigênio residual (residual oxygen consumption).

4.11 Biogênese de corpúsculos lipídicos por sonda Bodipy

As células MIN6 foram plaqueadas na densidade de 5×10^4 células por poço, em placa de 48 poços. As células foram estimuladas com meio condicionado derivado de BAT e WAT, de camundongos Adicer e LOX, na proporção de 2:1, por 24 horas. Após 24 horas de estímulo, as células foram incubadas com sonda fluorescente Bodipy (Life Technologies), diluída em PBS 1X (1:5000, pH 7.4), por 30 minutos, em

estufa à 37°C e 5% de CO₂, protegido da exposição à luz. Após este período de incubação, as células foram lavadas três vezes com PBS 1X, desaderidas com tripsina, centrifugadas (1800 rpm, 4°C, 5 minutos). As células foram ressuspensas em PBS 1x, e analisadas por citometria de fluxo no Citômetro FACSCalibur (Becton & Dickenson, USA). A intensidade da mediana de fluorescência (MFI) e histogramas foram gerados em software *FlowJo V10* (Tree Star Inc).

4.12 Detecção de Óxido Nítrico

As células MIN6 foram plaqueadas na densidade de 1,25 x10⁴ células por poço, em placa de 96 poços. As células foram estimuladas com meio condicionado derivado de BAT e WAT, de camundongos Adicer e LOX, na proporção de 2:1. Os níveis de óxido nítrico foram mensurados indiretamente, a partir do acúmulo de nitrito no sobrenadante das células estimuladas, pelo teste de Griess. Os sobrenadantes coletados após estímulo foram incubados com reagente de Griess (1% de sulfanilamida, 0,1% de naftaleno-diamino-diidrocloreto, em 2,5% de ácido fosfórico), em uma placa de 96 poços. Após 10 minutos de incubação, a absorbância foi lida em 550 nm em espectrofotômetro SpectraMax M3 (Molecular Devices, USA).

4.13 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

As células MIN6 foram plaqueadas na densidade de 1,25 x10⁴ células por poço em placas de 96 poços. As células foram estimuladas com meio condicionado derivado de WAT e BAT, de camundongos Adicer e LOX, na proporção de 2:1, em relação a meio DMEM com suplementos utilizado na cultura da linhagem MIN6. Após 24 horas e 48 horas de estímulo, o sobrenadante das células foi coletado e as citocinas TNF- α , IL-1 β , TGF- β , IL-33 e a quimiocina CCL2 foram dosadas por ELISA, conforme recomendação do fabricante (BD Bioscience). As concentrações de citocinas foram demonstradas em valores absolutos (pg/mL). A absorbância foi lida em 450 nm em espectrofotômetro SpectraMax M3 (Molecular Devices, USA). As análises estatísticas foram realizadas em software GraphPad Prisma.

4.14 Análise Glicômica Comparativa de BAT e WAT

4.14.1 Preparo dos tecidos para extração de proteínas

Os camundongos LOX foram eutanasiados por inalação de CO₂ em câmara fechada. Após a eutanásia, o BAT da região interescapular e o WAT da região gonadal de camundongos LOX foram extraídos em condições estéreis, dentro de fluxo laminar, com materiais cirúrgicos previamente esterilizados. Foram separados 40 mg de WAT e BAT, macerados em gral e pistilo no nitrogênio líquido. Após maceração foi acrescentado 500 µL de acetonitrila na concentração de 50%, sonificado à temperatura ambiente por 45 minutos e a amostra centrifugada a 13.400 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi extraído no gelo e as amostras foram secas à vácuo no speedvac e armazenado na temperatura de – 80°C.

4.14.2 Purificação das Estruturas de N-glicanos para Análise por Espectrometria de massas (Redução, alquilação e deglicosilação das glicoproteínas)

Foi acrescentado às amostras liofilizadas 240 µL do tampão de redução/alquilação (contendo solução Tris 0,6 M da Sigma Aldrich com cloridrato de guanidina 6M da Sigma Aldrich, pH 8,4). A amostra foi incubada com o tampão de redução/alquilação na temperatura de 45°C por 90 minutos. Foi adicionado às amostras 9,6 µL do tampão de redução (contendo 1,6 mg de DTT da Sigma Aldrich em 20 µL de tampão= 500 mM). As amostras foram incubadas na temperatura de 45°C por 4 horas. Após este período de incubação, foi adicionado 9,2 µl do tampão de alquilação (11,1 mg de IAA da Sigma Aldrich em 20 µL de tampão de redução/alquilação). As amostras ficaram em repouso, no escuro por 17 horas, sem agitação.

Após 17 horas sob o abrigo de luz, as amostras foram transferidas para o filtro de ultracentrifugação Milipore (Amicon Ultra, 0,5-10k). Foi adicionado 200 µl de solução de carbonato de amônio 50 mM e as amostras foram centrifugadas na rotação de 14,000 rpm por 15 minutos (14,4 mg de carbonato de amônio em 1,5 mL de H₂O = 100 mM). O volume eluído no filtro para o eppendorf foi descartado, e a amostra foi lavada por 4 vezes com 350 µL de solução de carbonato de amônio, na concentração de 50 mM usando o filtro Millipore 10 K (volume final de 22 µl). As amostras foram centrifugadas novamente na rotação de 14,000 g por 15 minutos em cada etapa das quatro lavagens.

As amostras foram transferidas do filtro Millipore 10K para um eppendorf de 2000 µl de fundo chato, no qual o filtro foi inserido de cabeça para baixo dentro do eppendorf e a amostra centrifugada na rotação de 1000 rpm por 2 minutos). Após a etapa de centrifugação, foi acrescentado 200 µL da solução de carbonato de amônio na concentração de 50 mM da solução de carbonato de amônio. Foi preparada uma solução de carbonato de amônio 50mM contendo tripsina na concentração de 5 µg/µl. Desta última solução foi acrescentado 14 µl nas amostras, que ficaram em incubação na temperatura de 37°C por 24 horas sob agitação de 400 rpm.

A solução com a amostra foi aquecida em banho maria na temperatura de 100 °C por 10 minutos, seguido de secagem à vácuo em equipamento. SpeedVac. Após secagem, foi acrescentado 200 µl da solução de carbonato de amônio 50mM e adicionado 3 µl da enzima PNGase F (diluída em água deionizada) na concentração de 1U/µl. As amostras foram incubadas em banho maria na temperatura de 37 °C por 15 a 17 horas e secas novamente em SpeedVac, armazenadas na temperatura de -80°C.

4.14.3 Purificação dos N-glicanos

Foi acrescentado 200 µl de ácido acético a 5% nas amostras. Foi condicionado para cada amostra uma coluna Sep-Pak C18 com 5 ml de metanol e em seguida com 10 ml de ácido acético 5%. As amostras foram colocadas na coluna Sep-Pak C18, e a coluna eluída em tubos de vidro com 3 ml de ácido acético 5% e, em seguida, com ácido acético 5% da Dinâmica em 80% de acetonitrila (J. T. Baker). As frações de cada eluição foram coletadas. Os N-glicanos foram eluídos em ácido acético 5%, a fração eluída em ácido acético 5% em 80% de acetonitrila correspondeu à mistura de peptídeos e O-glicopeptídeos. Após a coleta, as amostras foram secas à vácuo no Speed Vac e armazenadas na temperatura de -80°C.

4.14.4 Permetilação

Foi adicionado 500 µl de DMSO (Sigma Aldrich) às amostras eluídas em tubos de vidro. O hidróxido de sódio (NaOH) da Sigma Aldrich foi macerado em um gral na quantidade suficiente para usar 25 mg por amostra. As amostras foram colocadas no evaporador de N-EVAP sob fluxo de nitrogênio. Foi adicionado 300 µl de Iodometano

(Sigma Aldrich), e a mistura submetida sob fluxo de nitrogênio. As amostras foram vortexadas e colocadas em banho de ultrassom por 90 minutos na temperatura ambiente.

A reação foi interrompida pela adição de 1 ml de ácido acético a 5% em banho de gelo, fechada e a mistura vigorosamente vortexada. Foi adicionado 600 µl de clorofórmio (J.T.Baker, vortexada novamente até que a mistura se separou em duas fases na temperatura de 4°C. A solução foi transferida com o auxílio de uma pipeta pasteur de vidro, e a fase inferior (clorofórmio) transferida para um novo tubo de vidro.

Este processo de separação com clorofórmio e separação em fases foi realizada por mais duas vezes, e todas as frações referentes à fase do clorofórmio foram coletadas em um mesmo tubo. A fase de clorofórmio foi lavada 8 vezes com o mesmo volume de água deionizada (aproximadamente 1800 µl) a 4°C (banho de gelo) descartando a fase aquosa (superior). As amostras foram secas no N-EVAP para remoção do clorofórmio.

4.14.5 Purificação dos N-glicanos permetilados

Foi acrescentado às amostras 200 µl de metanol. As colunas Sep-Pak C18 foram condicionadas com 5 ml de metanol e, em seguida, com 10 ml de água deionizada. As amostras foram colocadas na coluna e eluídas com 15 ml de água, 2 ml de acetonitrila 10% e 3 ml de acetonitrila a 80%. As frações de acetonitrila 80% foram colocadas em 2 eppendorfs de 1500 µl. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e secas no SpeedVac.

4.14.6 Preparação da amostra para análise em LC-MS/MS

Todas as amostras foram dissolvidas em 50 µL de metanol contendo acetato de sódio. A aquisição de cada amostra foi realizada através da injeção de 6 µL de amostra em placa de cromatografia líquida ekspertMultralc 100-XL (Eksigent, Dublin, CA, USA) equipado com a coluna Kinetex 2.6 µm C18 100 Å (50 × 2.1 mm) conectada ao espectrômetro de massa TripleTOF 5600+ (Sciex, Concord, ON, Canadá). Os solventes utilizados para a cromatografia de fase reversa foi água Milli-Q contendo 0,1% de ácido fórmico (solvente A) e metanol contendo ácido fórmico na concentração de 0,1% (solvente B). As amostras foram eluídas por um gradiente linear de solvente

B que oscilou de 30 a 95% em 10 minutos, com fluxo de 0,4 mL/minuto e sob uma temperatura constante de 40°C. A fonte de íons foi operada sob uma temperatura de 650°C. A análise de espectrometria de massas foi realizada em alta resolução, e a relação massa/carga (m/z) configurada para detecção de picos de 700- 2000. O espectro de fragmentação foi avaliado por software GRITS Tollbox 1.2.

4.15 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas em software GraphPad Prisma (7.0). O teste de múltiplas comparações foi feito por análise de variância simples (one-way ANOVA), com correção BonFerroni e teste de Tukey. Os valores de p significativos são representados por : $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.001$ (***) e $p \leq 0.0001$ (****). A média e desvio padrão representados nos gráficos em barra, representam dados obtidos de pelo menos três experimentos independentes.

5.0 Resultados

5.1 Genotipagem dos camundongos Adicer e LOX

Os filhotes gerados da matriz de cruzamento de camundongos Adicer e LOX (controle) foram identificados por genotipagem. O DNA foi extraído por lise alcalina, através de fragmentos extraídos da cauda dos animais. O genótipo foi obtido por PCR convencional. As bandas de amplificação características do camundongo knockout e do controle foram identificadas por eletroforese em gel de agarose na concentração de 2%, marcado com brometo de etídio. Na **figura 8** observa-se a dupla banda de amplificação em 324 pares de base e em 200 pares de base, característico do camundongo Adicer (Cre-LOX), e o LOX (controle) identificado por uma única banda em 324 pares de base.

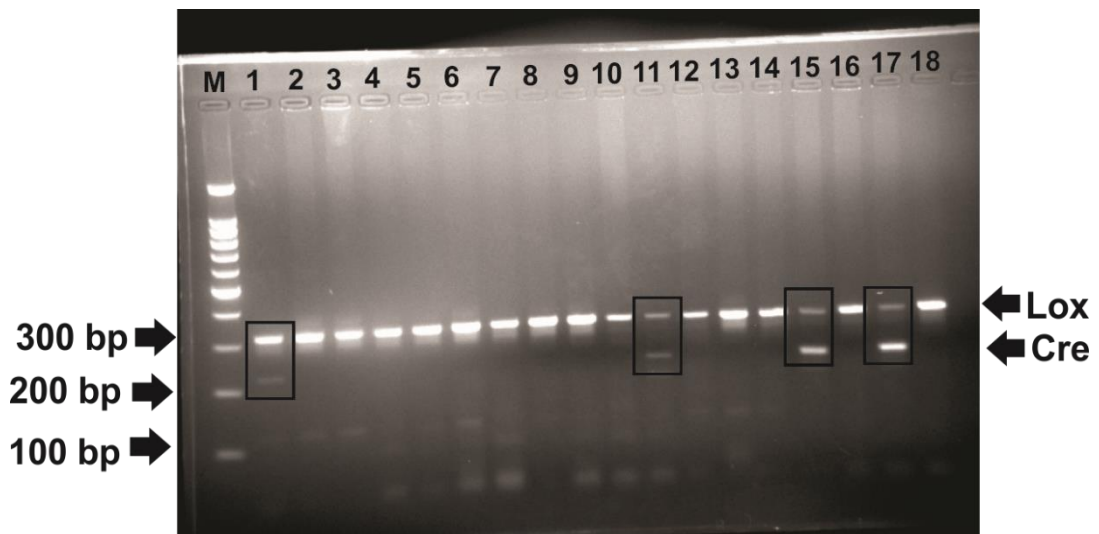


Figura 8: Eletroforese em gel de agarose na concentração de 2% de produtos amplificados por PCR convencional. Foram utilizados primers específicos para o LOX (controle) e transgene (Cre). Em M está representado o marcador de peso molecular de 100 a 1000 pares de base. As amostras de 1 a 18 se referem aos diferentes animais genotipados. Como exemplo, os camundongos das amostras 1, 11, 15 e 17 são Adicer (dupla banda de amplificação, em 200 e 324 pares de base), e os demais são LOX (amplificação do controle interno em 324 pares de base).

5.2 Efeito do estímulo com secreção derivada de BAT e WAT de camundongos WT e ADICER sobre a viabilidade e morte celular do insulinoma

Investigamos inicialmente o efeito de BAT (TA marrom) e WAT (TA branco) sobre a viabilidade de células MIN6, por ensaio de MTT. Os meios condicionados

contendo produtos de secreção de BAT interescapular e WAT gonadal do camundongo LOX (controle) foram utilizados para estimular as células MIN6. Incluímos como controles o MC (meio condicionado), meio de cultura sem os produtos secretados pelos tecidos adiposos e o DMSO (dimetilsulfóxido), agente citotóxico. A proporção de estímulo de meio condicionado contendo os produtos de secreção de BAT e WAT em relação ao meio de cultura DMEM foi de 2:1. Após 48 horas de estímulo, observamos que BAT e WAT não resultaram em perfis distintos sobre a viabilidade das células MIN6.

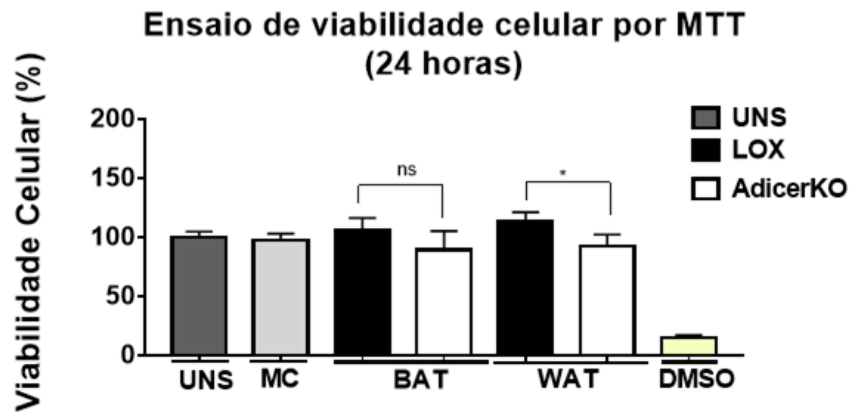
A morfologia, função e características metabólicas de BAT e WAT são distintos, portanto esperávamos que resultasse em perfis diferenciais sobre a viabilidade de células MIN6, mas não foram observadas diferenças significativas entre os dois estímulos. Os miRNAs secretados pelo TA podem resultar em alterações da plasticidade do TA, recrutamento imunológico e metabolismo, portanto a fim de investigar o impacto da ausência dos miRNAs no TA, pelo silenciamento da endonuclease Dicer, avaliamos o efeito dos estímulos provenientes de meios condicionados derivados de WAT gonadal e BAT interescapular de camundongo Adicer nas células MIN6, na mesma proporção de 2:1.

Comparamos os efeitos dos produtos de secreção de WAT e BAT, bem como na ausência de miRNA sobre estes tecidos no insulinoma após 24 e 48 horas de estímulo. Conforme **figura 9**, observamos que os efeitos foram mais pronunciados em relação às células não estimuladas após 48 horas, sobretudo na ausência de miRNAs em BAT e WAT. O estímulo de BAT do camundongo Adicer resultou em declínio da viabilidade das células MIN6, quando comparado ao estímulo de BAT do camundongo controle, e em relação ao não estimulado.

O estímulo de WAT do camundongo Adicer também resultou em declínio da viabilidade das células MIN6, quando comparado ao estímulo de WAT do camundongo controle, e em relação ao não-estimulado, conforme **figura 9**. Não há diferenças quanto à viabilidade das células MIN6 estimuladas com meio condicionado e não estimulado, demonstrando que o efeito observado não é decorrente de qualquer

suplemento do meio, mas sim dos produtos secretados pelos tecidos adiposos, sobretudo na ausência de miRNAs.

a)



b)

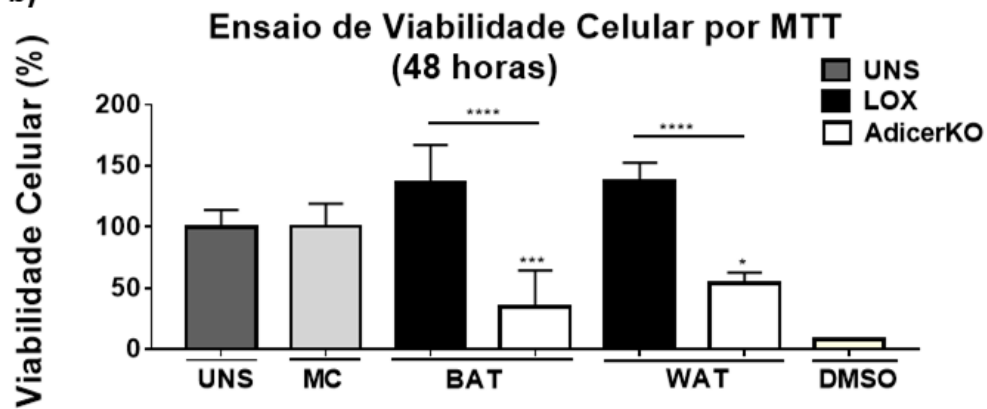


Figura 9: Ensaio de viabilidade celular por MTT após 24 h e 48 h de estímulo. As células MIN6 foram estimuladas com meio condicionado contendo produtos de secreção de WAT e BAT, de camundongos LOX e Adicer. Foram incluídos como controles o meio condicionado e DMSO, e UNS (células não estimuladas). Em (a) e (b) comparação entre grupos de estímulo após 24 e 48 horas. O tempo de estímulo de 48 h apresentou efeitos mais pronunciados sobre a redução da viabilidade celular. A viabilidade celular foi analisada por 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl) -2,5 difeniltetrazolio brometo (MTT), e os valores de absorbância medidos por espectrofotômetro. Os valores significativos de p são representados por: $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.001$ (***) e $p \leq 0.0001$ (****).

A partir dos dados obtidos no ensaio de viabilidade celular por MTT, investigamos se as células MIN6 estimuladas com os produtos de secreção derivados

de BAT e WAT apresentariam algum efeito sobre o perfil de morte celular. **Na figura 10 (a)** são representados dois eixos, sendo o Y representado por PI (iodeto de propídio) e eixo X representado por Anexina V. Quanto maior o percentual de células marcadas no quadrante positivo para Anexina v, o inferior à direita, a morte predominante é por apoptose (+Anexina/-PI). No quadrante superior à direita, temos percentual de morte lítica (+Anexina/+PI). No quadrante inferior à esquerda temos de células viáveis (Anexina/-PI) e no quadrante superior à esquerda positivos para PI, necrose.

Consistente com os dados de viabilidade, ambos estímulos de BAT e WAT não induziram morte celular, com percentuais de células viáveis semelhantes às das células não estimuladas (UNS) e tratadas com meio condicionado (MC), em torno de 80%, conforme observado na **figura 10 (a)**. Com base nos dados obtidos no ensaio de viabilidade celular por MTT, nos quais os estímulos provenientes de BAT e WAT na ausência de Dicer reduziram drasticamente a viabilidade celular, estes estímulos também induziram morte nas células MIN6.

As células tratadas com estímulo proveniente de WAT do camundongo Adicer apresentaram redução do percentual referente às células viáveis de 80% para 64%, comparado com as células tratadas com estímulo proveniente de WAT do camundongo controle. Foi observado aumento do percentual de células em morte lítica de 2,2% a 11%, conforme demonstrado na **figura 10 (a)**. As células tratadas com estímulo proveniente de BAT do camundongo Adicer apresentaram redução pronunciada do percentual de células viáveis de 79% para 10%, e o percentual de morte lítica aumentou de 6,8% para 86%, quando comparado com as células tratadas com estímulo derivado de BAT do camundongo controle, conforme está ilustrado na **figura 10 (a)**.

A partir dos dados de morte celular, analisamos o efeito resultante dos estímulos derivados de BAT e WAT de camundongos Adicer e controle sobre a capacidade de induzir fragmentação nuclear nas células MIN6, por marcação com PI e análise por citometria de fluxo, conforme apresentada na **figura 10 (b)**, o percentual de fragmentação nuclear após 48 horas de estímulo.

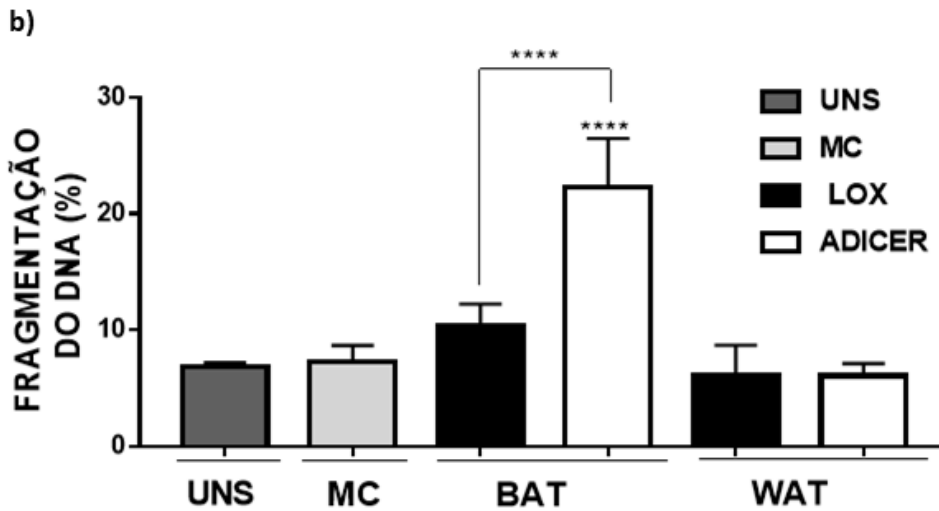
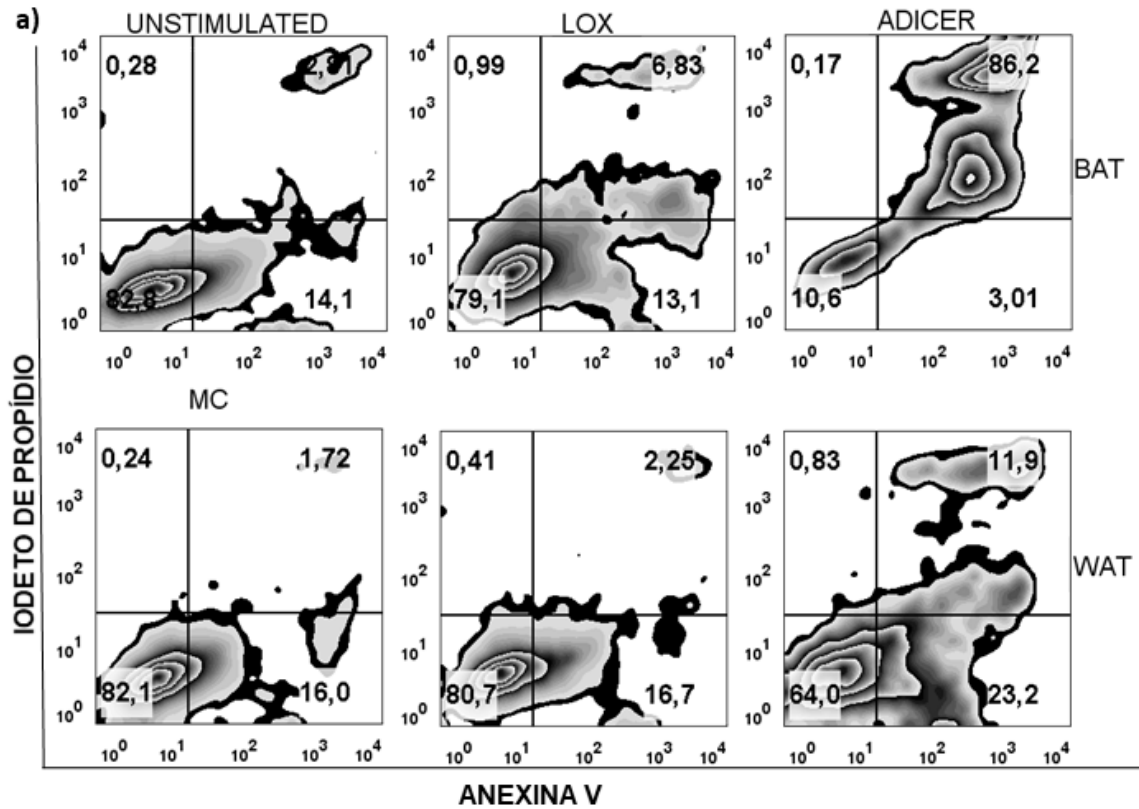


Figura 10: Ensaio de morte celular com marcação de Anexina V e PI. Em (a), as células MIN6 foram estimuladas por 48 horas com meio condicionado derivado de BAT e WAT, de camundongos Adicer e LOX (controle), meio condicionado (MC) e sem estímulo (UNS), análise feita por citometria de fluxo. Em (b) o percentual de fragmentação nuclear das células MIN6 após estímulo por 48 horas, por marcação com PI, dados obtidos por citometria de fluxo. Os valores significativos de p são representados por: $p \leq 0.0001$ (****).

5.3 Efeito dos estímulos com secreção derivada de BAT e WAT de camundongos WT e ADICER sobre o ciclo celular em células de insulinoma

Com base nos resultados obtidos dos efeitos dos produtos de secreção de BAT e WAT de camundongos WT e Adicer sobre o perfil de viabilidade e morte celular, no qual a ausência de miRNAs em BAT e WAT promoveram morte celular lítica e por apoptose, respectivamente, hipotetizamos que estes estímulos poderiam promover alterações na progressão do ciclo celular. Escolhemos o tempo de estímulo de 48 horas, no qual o efeito de morte foi mais pronunciado.

Não foram observadas diferenças do percentual de células que receberam estímulo de BAT e WAT nas respectivas fases do ciclo celular G1, S e G2/M e nem diferenças em relação às células não estimuladas. O estímulo de WAT do camundongo Adicer não resultou em efeitos distintos no percentual de distribuição das células MIN6 em cada uma das fases do ciclo celular, comparada com o estímulo de WAT do camundongo controle. Contudo, o estímulo de BAT do camundongo Adicer reduziu o percentual de células na fase G1, indicando progressão do ciclo celular, mas nas fases G2/M não foram observadas alterações do percentual de células, comparado com os demais estímulos, conforme **figura 11**.

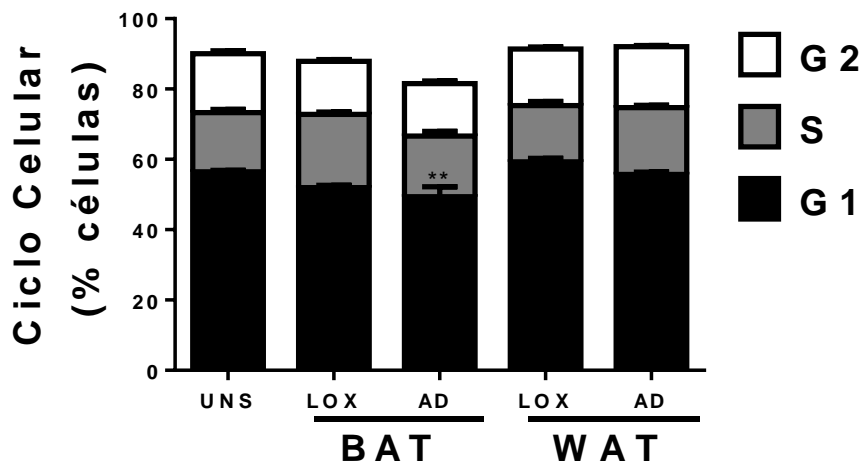


Figura 11: Análise do ciclo celular com marcação de sonda PI. O gráfico de barras se refere à análise de ciclo celular após 48 horas de estímulo, no qual estímulo de BAT Adicer reduziu o percentual de células positivas em fase G1. Os valores significativos de p são representados por $p \leq 0.01$ (**).

5.4 Efeito dos estímulos com secreção derivada de BAT e WAT sobre características ultraestruturais celulares relacionados a morte celular, lipofagia e dano mitocondrial no insulinoma

Com base nos dados obtidos nos ensaios de viabilidade e morte celular, sobretudo na ausência de miRNAs de WAT sobre o insulinoma, no qual induziu em declínio da viabilidade celular, com maior percentual de morte por apoptose, porém sem alterações no padrão de ciclo celular, hipotetizamos que este estímulo poderia resultar em danos celulares relacionados à função estrutural celular, sobretudo que pudessem caracterizar melhor este fenômeno. Neste sentido, realizamos análise por técnica de microscopia eletrônica de transmissão (MET) em células de insulinoma, estimuladas com os produtos derivados de WAT e BAT do camundongo WT e Adicer, e em comparação com células não estimuladas. Esta técnica permite obter imagens em escala nanométrica, por meio de cortes ultrafinos, tornando possível a visualização de organelas celulares.

A partir dos dados de MET, encontramos que o estímulo de WAT e BAT Adicer no insulinoma induziram a maior formação de vacúolos citoplasmáticos, comparado com as células não estimuladas e com WAT e BAT do WT, conforme **figura 12**. Os vacúolos são organelas ácidas delimitadas por uma membrana, que contêm hidrolases e glicoproteínas. Estas organelas servem como compartimentos de degradação em células eucarióticas (Wada, 2013).

Uma de nossas hipóteses é que o aumento de vacúolos citoplasmáticos observados nas células de insulinoma estimuladas com os produtos de secreção de WAT Adicer esteja relacionado com a morte por apoptose no insulinoma, certamente associado também a um possível quadro de estresse oxidativo e disfunção mitocondrial. (Phillips, Voeltz, 2015). Alterações resultantes de estresse oxidativo sobre a mitocôndria podem desencadear vários distúrbios na sinalização celular, incluindo apoptose e inflamação (Cao, Kaufman, 2014).

Poderíamos especular também processos autofágicos, uma vez que os vacúolos têm a função de degradação de organelas ou proteínas citosólicas. A autofagia permitiria a remoção de organelas danificadas, como tentativa de manter a homeostase celular frente a produção aumentada de ROS (Yorimitsu et al., 2006). Os vacúolos desempenham importante função sobre controle de pH, estoque energético, e resposta ao estresse celular, e o estímulo com os produtos de secreção na ausência

de miRNAs no WAT, estão demonstrando maior dano celular, possivelmente induzido por estresse oxidativo.

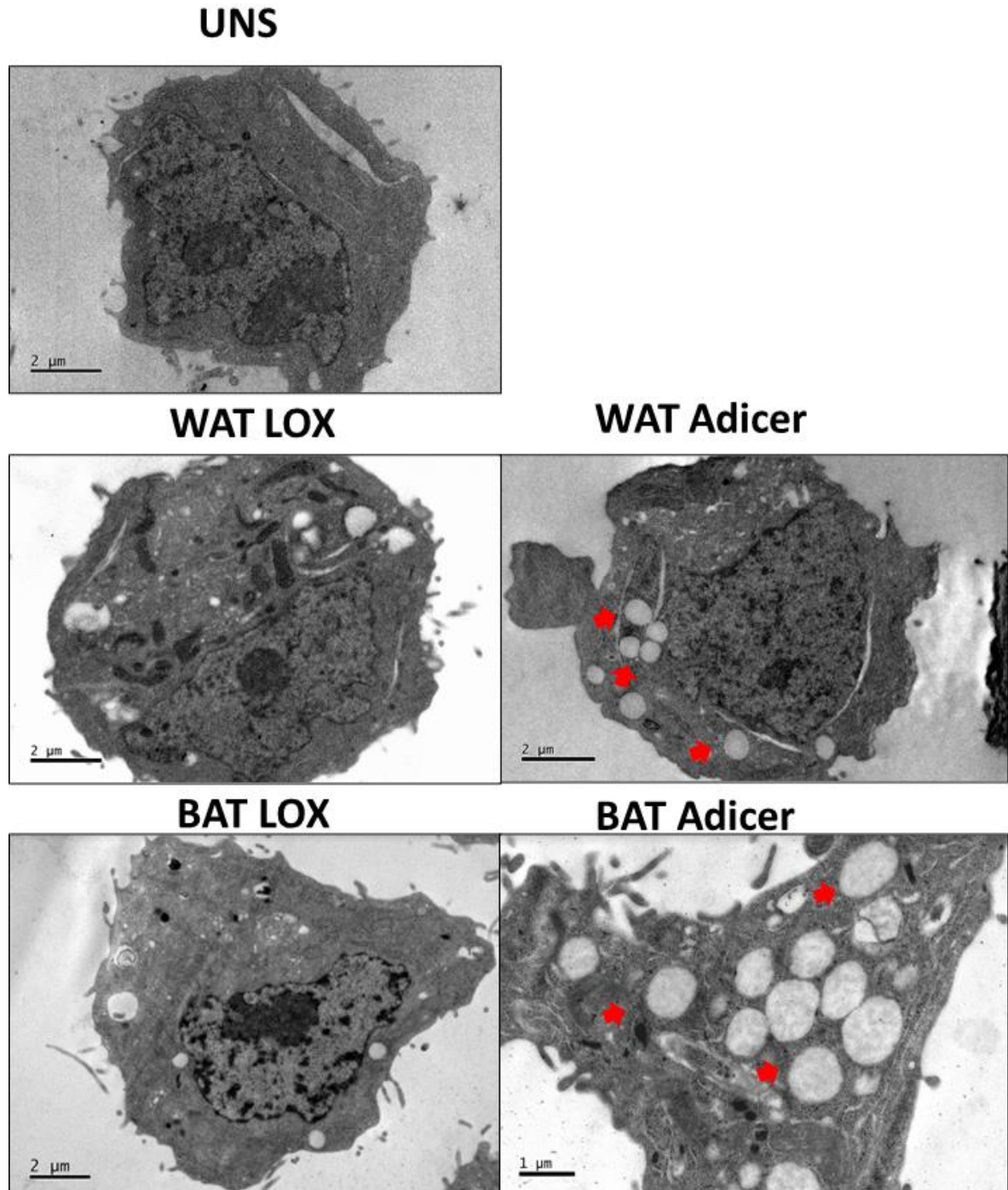


Figura 12: Análise por MET de células de insulinoma estimuladas com produtos derivados de WAT de WT e Adicer. Estão apresentados cinco cortes de 1 e 2 μ m, de células de insulinoma (MIN6) nas seguintes condições: não estimuladas (UNS), estimuladas com produtos derivados de WAT e BAT do WT e de BAT e WAT Adicer. Observa-se que na célula de insulinoma estimulada com produtos de secreção derivados de WAT Adicer e BAT Adicer resultou em maior formação de vacúolos citoplasmáticos. Análise realizada em microscópio eletrônico de transmissão modelo Jeol (JEM).

5.5 Efeito dos estímulos de secreção derivada de BAT e WAT de camundongos WT e ADICER sobre a presença de mitocôndrias viáveis nas células do insulinoma

Com base nos dados de morte e viabilidade celular, hipotetizamos um possível dano mitocondrial no insulinoma, portanto avaliamos os efeitos dos produtos derivados de BAT e WAT de WT e Adicer sobre alterações na quantidade de mitocôndrias viáveis nas células de insulinoma. Para este propósito realizamos marcação com sondas fluorescentes MitoTracker e DAPI (4',6'-diamino-2-fenil-indol), seguido por análise de microscopia de fluorescência.

Não foram observadas alterações nas quantidades de mitocôndrias viáveis nas células de insulinoma quando tratadas com os estímulos derivados de BAT e WAT do camundongo controle em relação às células não estimuladas. As células estimuladas com meio condicionado derivado de WAT e BAT do camundongo Adicer apresentaram redução expressiva na quantidade de mitocôndrias detectadas, conforme observado na **figura 13**, comparado com as células que receberam estímulo de WAT e BAT do camundongo controle e as células não estimuladas.

Observamos que o estímulo de BAT Adicer resultou em fragmentação nuclear massiva das células. A fragmentação nuclear pode ser visualizada pela marcação das células com sonda fluorescente DAPI. As células tratadas com estímulo de BAT de camundongo controle e as células que não receberam nenhum estímulo não apresentaram este dano celular, com núcleo preservado, conforme apresentado na **figura 13**.

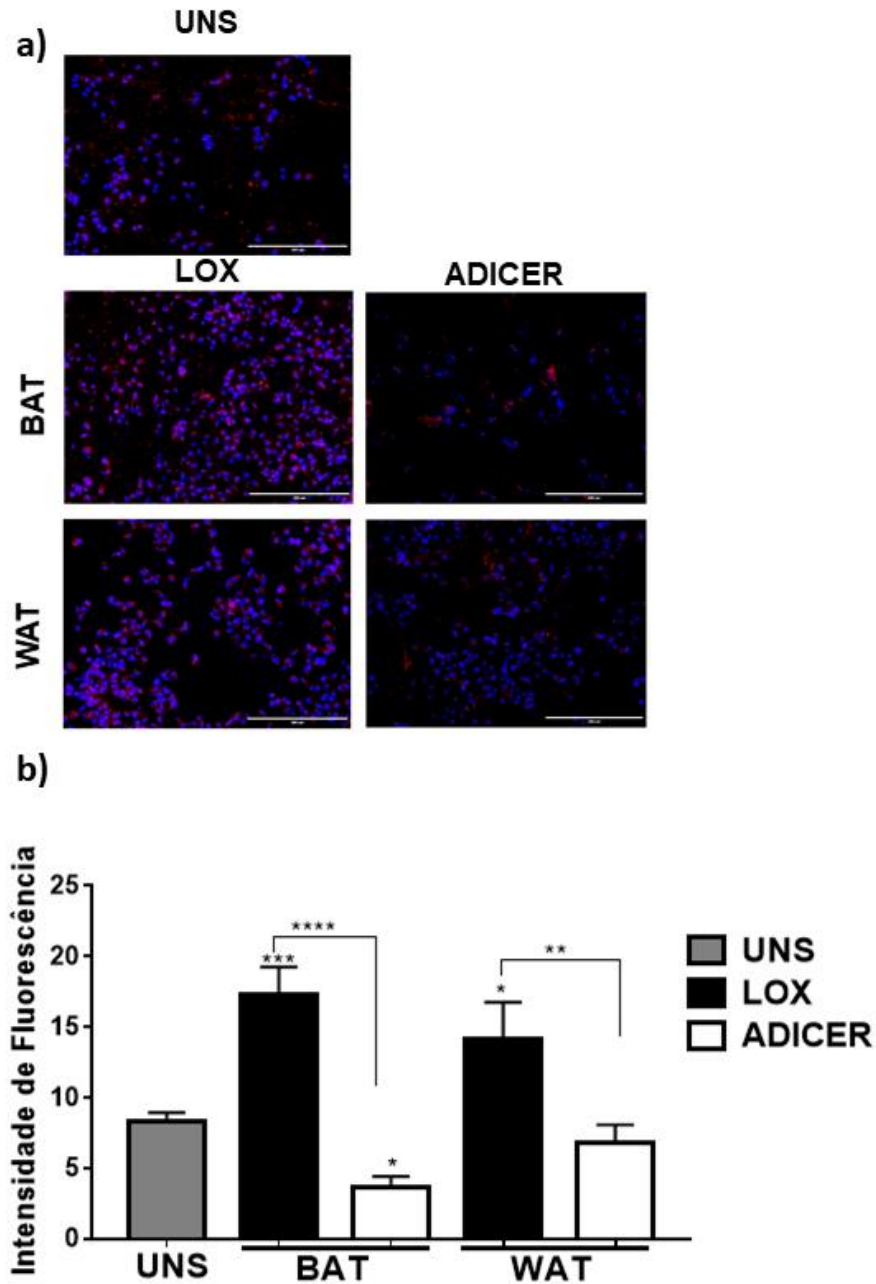


Figura 13: Análise por microscopia de fluorescência de mitocôndrias em células MIN6 por sonda MitoTrackerRed. Em (a) no quadrante superior da prancha de microscopia se refere às células MIN6 não estimuladas (UNS). Nos quadrantes inferiores, foram divididos conforme os estímulos que as células foram tratadas, respectivamente de BAT e WAT, provenientes de camundongos controle (LOX) e Adicer. As células estimuladas com os produtos de secreção de BAT Adicer apresentaram fragmentação nuclear pronunciada, conforme visualizado o núcleo (marcação com DAPI), e consequentemente perda acentuada na quantidade de mitocôndrias. Foram observadas redução da marcação de mitocôndrias no estímulo de WAT Adicer nas células MIN6. Em (b) a intensidade de fluorescência de três experimentos independentes foi quantificada por software Image J. Os asteriscos representam a diferença estatística para valores de p representados por: $p \leq 0.01$ (**) e $p \leq 0.0001$ (****).

5.6 Efeito dos estímulos com secreção derivada de BAT e WAT de camundongos WT e ADICER sobre a geração de nitrito e espécies reativas oxigênio nas células do insulinoma

Os dados obtidos nas análises anteriores demonstraram que os estímulos de BAT e WAT não apresentaram efeitos distintos sobre as células de insulinoma, ao que se refere à capacidade de indução de morte celular, dano mitocondrial e em relação às fases do ciclo celular. No entanto, na ausência de Dicer em BAT e WAT, os estímulos destes tecidos induziram morte nas células MIN6, sobretudo de BAT, por morte lítica e de WAT por apoptose, com maior formação de vacúolos citoplasmáticos, conforme os demonstrado nos resultados prévios. Foram observados também redução na quantidade de mitocôndrias viáveis

A resposta inflamatória nas células MIN6 poderia estar associada ao dano mitocondrial e morte celular. Analisamos, portanto, o efeito dos estímulos sobre a secreção de nitrito das células MIN6, uma vez que NO (óxido nítrico) é um mediador pró-inflamatório. A secreção de NO pode provocar danos ao DNA e desregular as vias de proteção da citotoxicidade, estimular a proliferação celular e inibir a apoptose, por exemplo. Dados da literatura indicam que NO medeia a resposta de stress oxidativo e de HIF-1 α (fator indutor de hipóxia), bem como a atividade de p53, gerando um distúrbio no ciclo celular, diferenciação, senescência e nas vias de reparo ao dano do DNA (Muntané, de La Mata, 2010).

Após 24 horas de estímulo, os sobrenadantes celulares foram coletados e a detecção de nitrito foi realizada por reagente de Griess. As células MIN6 que foram tratadas com estímulo de BAT do camundongo controle apresentaram maior secreção de nitrito, comparado com as células que foram tratadas com estímulo de WAT do camundongo controle e das células não estimuladas. Não foram encontrados níveis detectáveis de nitrito nas células não estimuladas. As células tratadas com estímulo de BAT do camundongo Adicer também apresentaram maior secreção de nitrito comparado com as células não estimuladas, mas não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em relação ao tratamento com BAT do camundongo controle, conforme **figura14**.

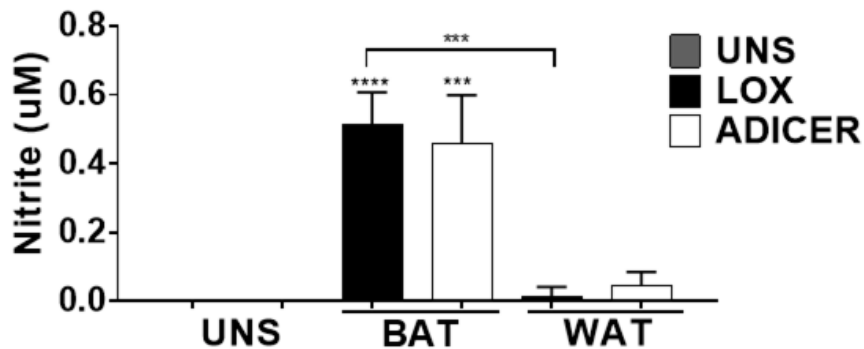


Figura 14: Detecção de nitrito após estímulo com produtos de secreção de BAT e WAT, de WT e Adicer em células de insulinoma. Os sobrenadantes foram coletados após 24 horas de estímulo nas células MIN6, e a análise por teste de Griess. A análise estatística entre dois grupos foi realizada por teste T. Os valores de p são representados por: $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.001$ (***) and $p \leq 0.0001$ (****).

Os dados da literatura reportam que elevados níveis de ROS promovem alterações do equilíbrio redox e desregulam a sinalização redox, o que poderia desencadear alteração sobre vias de crescimento e sobrevivência celular. A mitocôndria contribui principalmente na geração de ROS durante a fosforilação oxidativa e detecções acentuadas destas espécies foram encontradas em muitos tumores (Kumari, Badana, 2018).

Avaliamos por citometria de fluxo a formação intracelular de ROS nas células MIN6 após estímulo com os meios condicionados, contendo os produtos de secreção derivados de BAT e WAT de camundongos Adicer e controle (LOX). A menadiona foi utilizada como controle positivo, uma vez que induz a formação de ROS. As células estimuladas com meio condicionado derivado de BAT do camundongo controle apresentaram uma tendência de aumentar a formação de ROS no insulinoma, comparado com as células não estimuladas e as tratadas com estímulo de WAT do camundongo controle, conforme demonstrado no histograma representativo e por análise estatística dos valores da mediana da intensidade de fluorescência, apresentado na **figura 15**.

Os efeitos do estímulo de BAT Adicer em aumentar a produção de ROS nas células MIN6 comparado com as células tratadas com estímulo de BAT do camundongo controle e com as células que não receberam estímulo, não foram estatisticamente significativos, mas o estímulo de WAT de Adicer aumentou de forma significativa a formação de ROS nas células MIN6, comparado com as células que

não receberam estímulo e com as células que foram tratadas com estímulo de WAT do camundongo controle, conforme observado na **figura 15**.

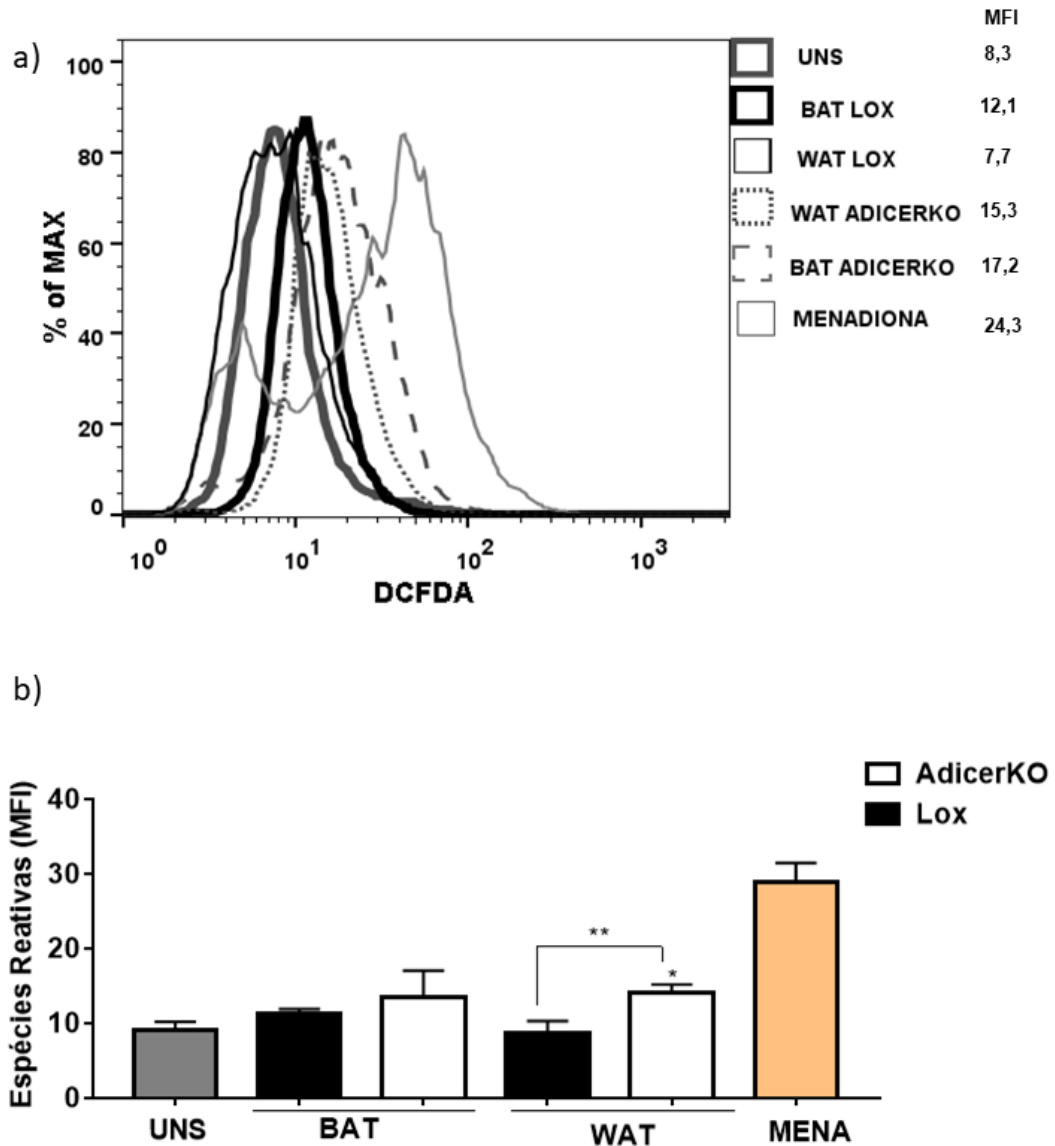


Figura 15: Detecção de ROS após estímulo com BAT e WAT de LOX e Adicer em células MIN6. Em (a) o histograma se refere à mediana da intensidade de fluorescência representativa de cada estímulo relacionada com a formação de ROS, por análise de citometria de fluxo com sonda DCFDA. Em (b) o gráfico de barras se refere aos valores da mediana da intensidade de fluorescência de três experimentos independentes. Os valores de p são representados por: $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**)

5.7 Efeito dos estímulos com secreção derivada de BAT e WAT de camundongos WT e ADICER sobre a função mitocondrial e consumo de oxigênio por respirometria de alta resolução nas células do insulinoma

Conforme demonstrado no ensaio de formação intracelular de ROS após estímulo com os meios condicionados de TA no insulinoma, não observamos alterações estatisticamente significativas, quando comparamos os efeitos de WAT e BAT. Não foram demonstrados efeitos distintos dos estímulos de BAT do camundongo WT em relação ao estímulo de BAT do Adicer nas células de insulinoma, porém detectamos aumento na produção de ROS no insulinoma, após estímulo com WAT Adicer. Desta forma, hipotetizamos que além da perda acentuada da quantidade de mitocôndrias viáveis, que os estímulos do TA poderiam promover alterações na função mitocondrial. A fim de verificar este parâmetro, realizamos análise por respirometria de alta resolução, que permite avaliar aspectos associados à função bioenergética mitocondrial por meio da taxa de consumo de oxigênio durante a respiração mitocondrial.

A análise foi feita após 24 horas de estímulo, tempo em que ainda não há morte celular tão pronunciada, como visto após 48 horas de estímulo, e mesmo tempo de estímulo realizado no ensaio de detecção de ROS por citometria de fluxo e análise de mitocôndrias viáveis por sonda MitoTracker. Não observamos diferenças significativas entre os estímulos de WAT e BAT no insulinoma, quanto à respiração basal, ou seja, sem exposição a inibidores da fosforilação oxidativa, nem diferenças entre os estímulos de BAT LOX e BAT Adicer, ou entre WAT LOX e WAT Adicer sobre o insulinoma. Contudo o estímulo de WAT Adicer aumentou a taxa de respiração basal, comparado com as células não estimuladas, conforme **figura 16 (a)**.

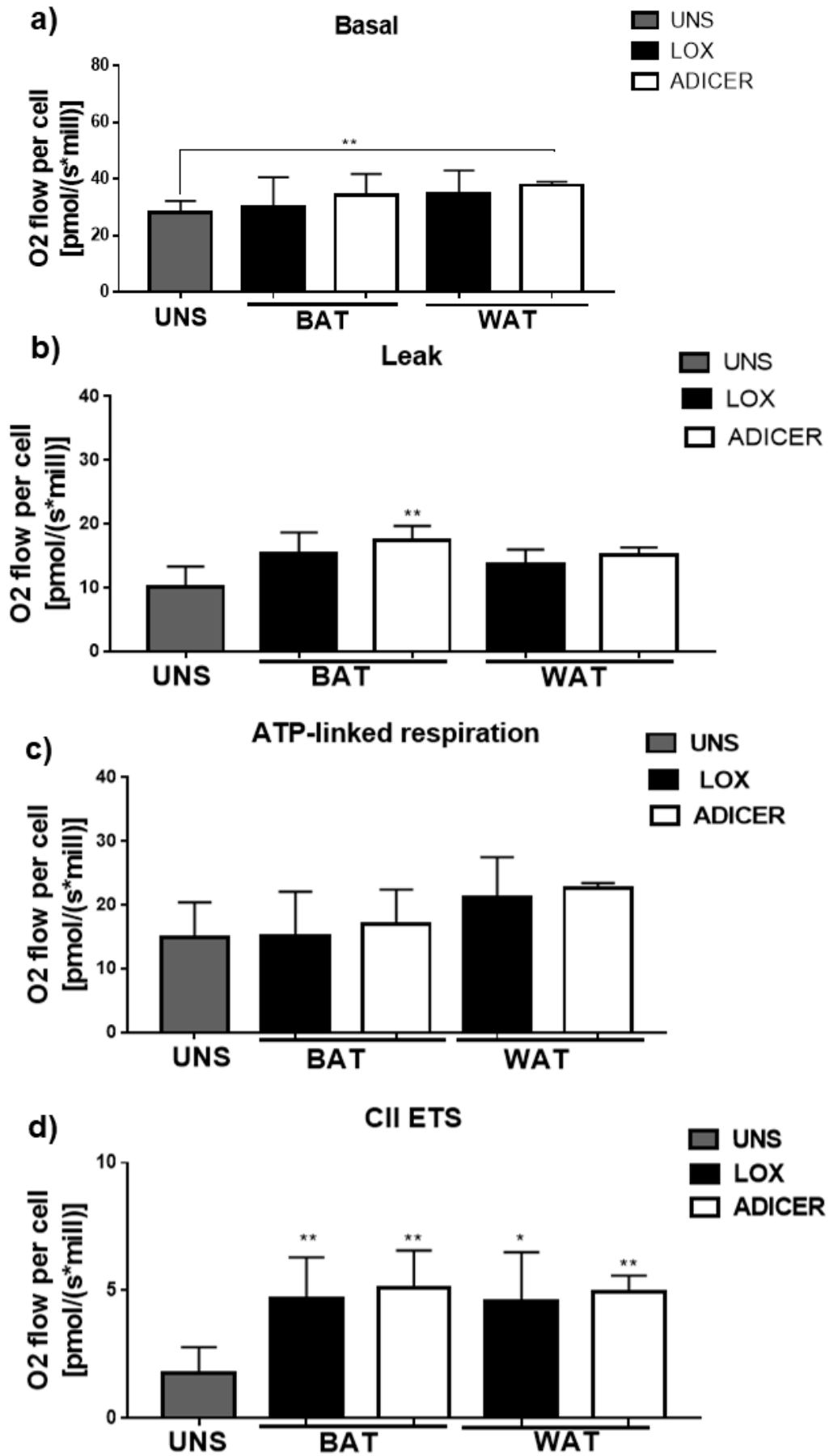
Ao inibir a ATP sintase com oligomicina é possível analisar o consumo de oxigênio diretamente associado à síntese de ATP (ATP linked respiration). O vazamento de prótons (denominado como leak) não é gerado pela inibição da ATP sintase, mas este bombeamento de prótons permite que ocorra a respiração, não de forma tão eficiente como observado na ativação da ATP sintase, mas permite consumo de oxigênio. A respiração ligada a ATP é calculada pela subtração da respiração no vazamento de prótons da respiração basal. Foi detectado aumento no consumo de oxigênio durante o vazamento de prótons nas células de insulinoma que receberam os estímulos com os meios condicionados de BAT e WAT Adicer, comparado com as células não estimuladas, conforme apresentado na **figura 16**. Não

foram observadas diferenças das células que receberam estimuladas com BAT e WAT de LOX e nem de BAT e WAT de Adicer no insulinoma sobre a capacidade respiratória ligada a ATP, conforme **figura 16**.

A adição de CCCP resulta em desacoplamento do gradiente de prótons, alterando o gradiente eletroquímico através da membrana interna mitocondrial, isto permite que a cadeia transportadora de elétrons atue na sua capacidade máxima, conforme a **figura 16**, sendo que o estímulo de WAT Adicer aumentou este efeito nas células de insulinoma, comparado com as células não estimuladas.

Observou-se que as células de insulinoma estimuladas com meio condicionado de WAT Adicer apresentaram aumento na capacidade respiratória máxima, em relação às células não estimuladas, embora não tenham sido detectadas diferenças com as células estimuladas com WAT LOX. Apesar do aumento do consumo de oxigênio após a inibição da ATP sintase, conforme apresentado na figura b, nas células de insulinoma estimuladas com meio condicionado de BAT LOX e BAT Adicer, e nas células estimuladas com meio condicionado de WAT Adicer, estes estímulos não alteraram a capacidade respiratória máxima, da mesma forma que foi observado após estímulo de WAT Adicer no insulinoma.

A capacidade respiratória de reserva é um importante parâmetro na avaliação da função mitocondrial e pode ser calculada pela diferença entre seu consumo de oxigênio basal em relação à capacidade respiratória máxima, após desacoplamento com CCCP. Não observamos alterações sobre a capacidade respiratória de reserva nas células estimuladas com meio condicionado de BAT e WAT de WT, nem em relação aos estímulos de BAT e WAT de Adicer, conforme apresentado na **figura 16**. Observamos que para todos os estímulos de TA houve aumento da atividade via complexo II da cadeia transportadora de elétrons, em relação às células não estimuladas, conforme apresentado na **figura 16**.



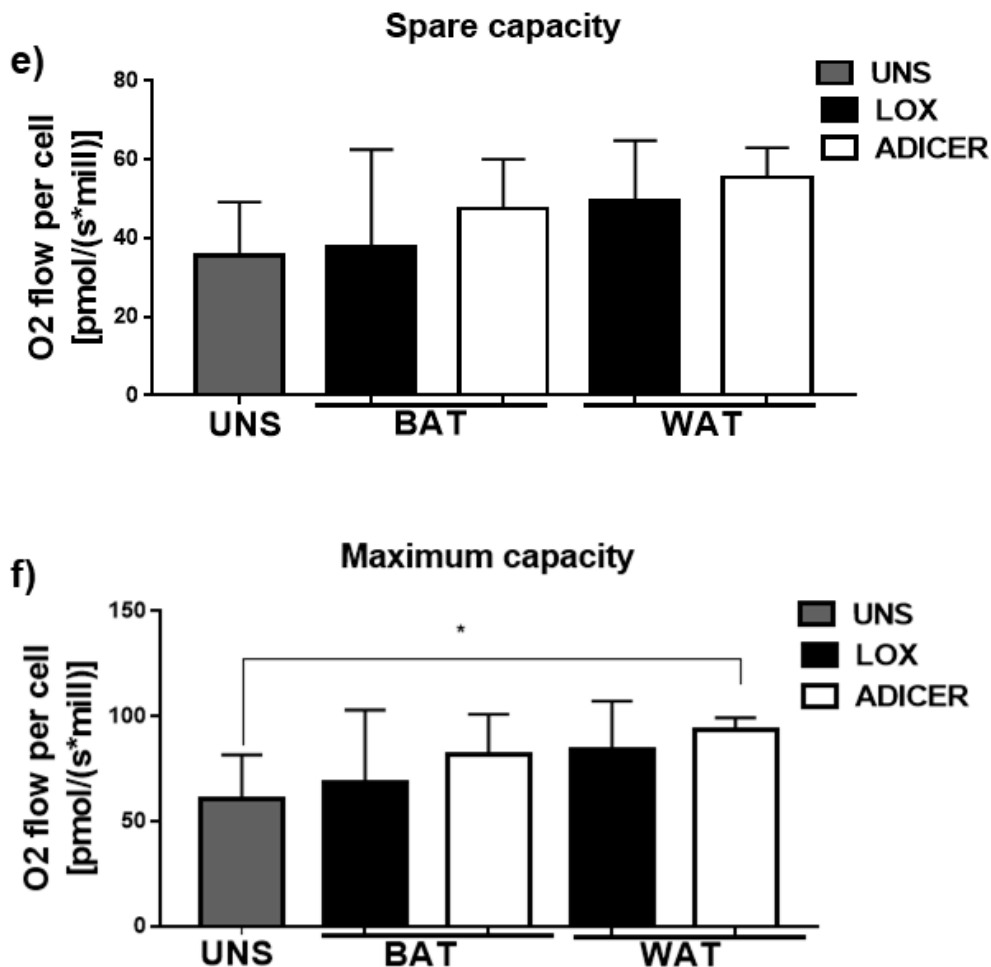


Figura 16: Efeito dos estímulos de BAT e WAT de LOX e Adicer sobre parâmetros de consumo de oxigênio e função mitocondrial nas células MIN6. As células MIN-6 foram estimuladas com meio condicionado dos tecidos adiposos por 24 horas. Em (a) é apresentado o consumo de oxigênio da respiração basal. Em (b) é o consumo de oxigênio durante o vazamento de prótons, após adição da oligomicina na concentração de 1,25 μM . Em (c) a respiração ligada a ATP, ou seja, o consumo de oxigênio resultante da subtração da respiração basal após adição da oligomicina. Em (d) a respiração aumentada via complexo II da cadeia transportadora de elétrons após inibição do complexo I pela rotenona. Em (e) a capacidade respiratória de reserva que se refere a capacidade da mitocôndria respirar além das taxas basais. Em (f) é apresentada a capacidade respiratória máxima após adição do desacoplador FCCP, utilizado em pulsos de 400 ηM . Os valores significativos de p foram representados por asteriscos, $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**).

A atividade via complexo II foi verificada pela inibição do complexo I com a rotenona, de tal forma que o complexo II continua ativo. O estímulo de WAT Adicer apresentou assim como os demais estímulos sobre o insulinoma aumento da atividade via complexo II, contudo apenas este estímulo foi capaz de modular outros parâmetros, tais como a capacidade respiratória máxima, e mesmo na ausência de inibidores da fosforilação oxidativa, as mitocôndrias das células de insulinoma já

demonstravam um perfil aumentado de consumo de oxigênio, sugerindo a possibilidade de substratos diferenciais presentes nos produtos de secreção de WAT Adicer associados a uma maior atividade glicolítica e respiração celular.

Na **figura 17** está representado o gráfico do consumo de oxigênio a partir do início da análise de respirometria de alta resolução, que detectou a respiração mitocondrial em níveis basais, até o término, após a adição dos inibidores dos complexos I e III, através da adição de rotenona e antimicina A. Através deste gráfico de representação da respirometria, observa-se que as células de insulinoma quando estimuladas com os produtos derivados de WAT Adicer apresentaram aumento pronunciado do consumo de oxigênio desde os níveis basais até a maior capacidade respiratória máxima, comparado com as células não estimuladas.

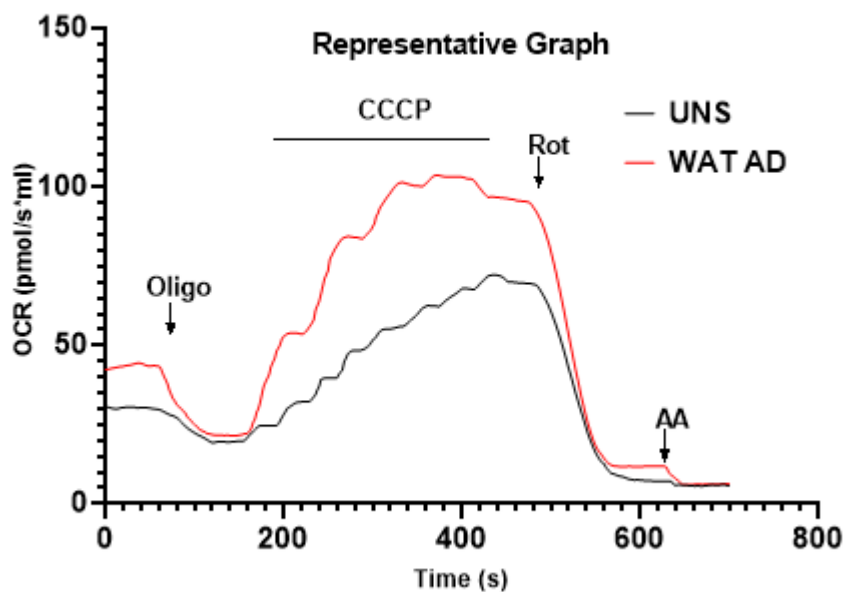


Figura 17: Gráfico representativo da respirometria de alta resolução. Neste gráfico está representado o consumo de oxigênio desde a adição da oligomicina, até o fim da respiração, através da adição de rotenona e antimicina A, inibidores dos complexos I e III da cadeia transportadora de elétrons. O estímulo de WAT Adicer gera um aumento do consumo de oxigênio pelas mitocôndrias das células de insulinoma, e uma maior capacidade respiratória.

5.8 O papel da via de sinalização do mTOR sobre a modulação da viabilidade celular de células do insulinoma estimuladas com secreção derivada de BAT e WAT de camundongos WT e ADICER

Com base nos nossos dados de morte celular, sobretudo do estímulo de WAT Adicer sobre o insulinooma, observamos por MET maior propensão à formação de vacúolos citoplasmáticos, que poderiam estar relacionados à morte por apoptose. As células de insulinooma secretam insulina em quantidades maiores, do que células betas normais. A insulina pode desregular a via PI3K/AKT/mTOR, sobretudo na formação do complexo mTORC1. Dados da literatura reportam que alterações nesta via podem resultar em defeitos na proliferação, autofagia e apoptose (Rosano et al, 2016; Bartolomé et al, 2014;). Desta forma hipotetizamos que na ausência de miRNAs em WAT, os produtos derivados deste tecido estejam também relacionados a distúrbios da via mTOR.

A via mTOR poderia estar associada a este fenômeno observado no insulinooma, uma vez que esta via é sensível a alterações nutricionais e hormonais, ao metabolismo, sobrevivência e proliferação celular. A autofagia é um processo catabólico caracterizado pela degradação de organelas, por ativação do maquinário lisossomal, portanto a remoção de organelas comprometidas funcionalmente teria o propósito de manter a homeostase metabólica e integridade genômica, porém danos pronunciados podem resultar em morte celular. Dados da literatura reportam que a autofagia é um mecanismo de sobrevivência e adaptação celular, que permite o fornecimento de energia e manutenção da viabilidade celular, incluindo sobretudo células tumorais, como uma estratégia de resistência à morte celular (Heckmann et al., 2012).

Avaliamos o efeito de rapamicina, inibidor de mTORC1 e 3-MA sobre o parâmetro de viabilidade celular do insulinooma, após 24 horas de estímulo. A rapamicina foi utilizada na concentração de 100 η mol/mL e 3-MA na concentração de 5 mM. Foram analisados os efeitos dos inibidores isoladamente e como co-estímulo com meio condicionado de WAT Adicer, a fim de investigar se os produtos de secreção deste estímulo poderiam resultar em efeitos opostos ou sinérgicos em relação ao composto isoladamente.

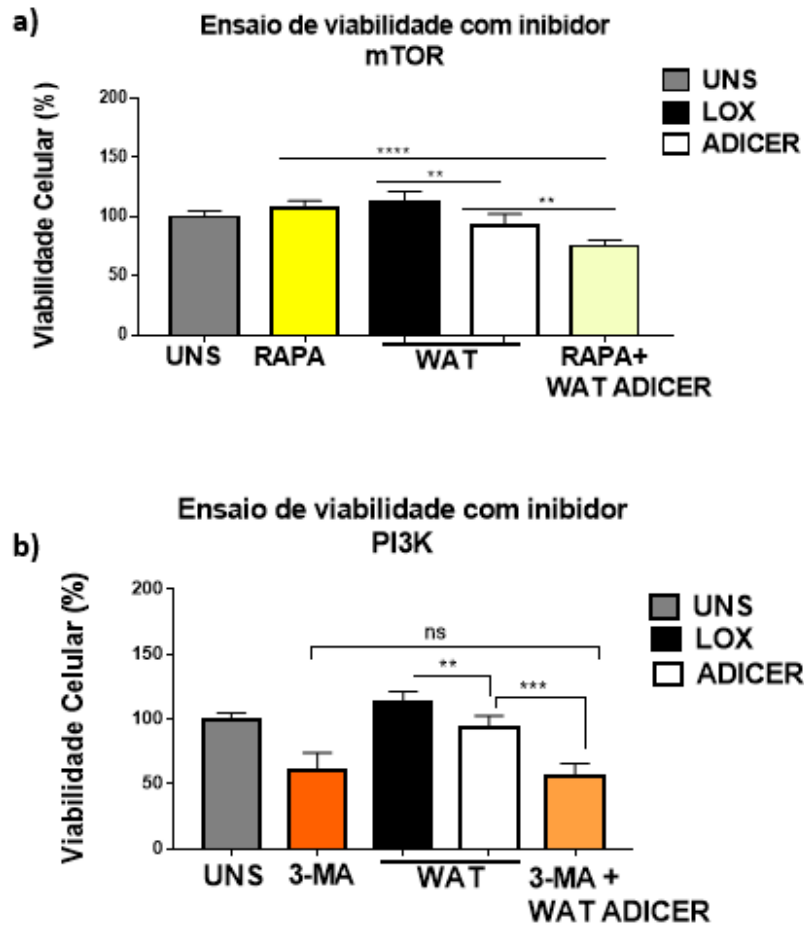


Figura 18: Ensaio de viabilidade celular com rapamicina e 3-ma. Em (a) as células de insulinoma murino foram estimuladas com rapamicina, e com os estímulos de WAT LOX, WAT Adicer e co-estímulo de WAT Adicer e rapamicina. A viabilidade celular foi analisada por ensaio de MTT, após 24 horas e observa-se que o co-estímulo de rapamicina e WAT Adicer potencializou a redução da viabilidade celular, comparado com o composto administrado isoladamente. Em (b) as células de insulinoma murino foram estimuladas com 3-MA e após 24 horas a viabilidade celular foi analisada por MTT. Não foram observadas diferenças do efeito sobre a viabilidade celular quando o 3-MA foi utilizado individualmente em relação ao co-estímulo com WAT Adicer. Os valores de p são representados por: $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.001$ (***), $p \leq 0.0001$ (****).

O estímulo de rapamicina na concentração de 100 η M/mL não promoveu alterações da viabilidade celular do insulinoma, comparado com as células não estimuladas, porém o co-estímulo de rapamicina e meio condicionado de WAT Adicer potencializou a redução da viabilidade celular do insulinoma, conforme demonstrado na **figura 18**, demonstrando um possível efeito sinérgico dos produtos de secreção de WAT na ausência de miRNA com a rapamicina, demonstrando uma possível regulação via complexo mTOR. O composto 3-MA reduziu a viabilidade do insulinoma,

porém o co-estímulo com os produtos de secreção de WAT Adicer não resultaram em efeitos distintos, quando comparado com o 3-MA isoladamente, demonstrando que a redução sobre a viabilidade celular não foi influenciada pelos produtos de secreção de WAT Adicer, mas sim atribuídos ao próprio efeito do composto.

5.9 Efeito dos estímulos com secreção derivada de BAT e WAT de camundongos WT e ADICER sobre a biogênese de corpúsculo lipídico nas células do insulinoma

Com base nos dados anteriores em que foi demonstrado que os estímulos de TA, sobretudo na ausência de Dicer de WAT sobre as células de insulinoma, promoveram morte celular apoptótica, com declínio da viabilidade mitocondrial, com maior propensão à formação de vacúolos citoplasmáticos, bem como alterações da função mitocondrial no insulinoma, vistos pelo aumento da respiração basal e capacidade respiratória máxima, além da maior produção de ROS, e que o estímulo de BAT de Adicer induziu morte lítica, hipotetizamos que estes estímulos estariam induzindo alterações inflamatórias no insulinoma. Dentre os parâmetros analisados, avaliamos a formação de corpúsculos lipídicos.

Os corpúsculos lipídicos são organelas constituídas por uma monocamada fosfolipídica, tendo em seu conteúdo intracelular ácidos graxos neutros. São organelas dinâmicas e ativas, contém diversos tipos de proteínas como a ADRP (do inglês *adipose-differentiation related protein*) e caveolina, enzimas de metabolização de lipídeos e de síntese de eicosanóides, proteínas quinases como a PI3K. Estas organelas podem ser biomarcadores inflamatórios e de agressividade tumoral, uma vez que atuam no metabolismo de lipídeos, sinalização intracelular e em mecanismos associados a proliferação e diferenciação celulares (Accioly et al, 2008).

Não foram observadas diferenças significativas sobre o aumento da biogênese de corpúsculos lipídicos nas células MIN6 que receberam tratamento com estímulos de BAT e WAT do camundongo controle, mas induziram aumento em relação às células não estimuladas, conforme apresentado no histograma representativo da mediana da intensidade de fluorescência.

As células que foram tratadas com estímulo de BAT do camundongo Adicer apresentaram maior formação de corpúsculos lipídicos, conforme demonstrado pelo maior deslocamento no histograma de fluorescência, comparado com as células não estimuladas e com as células tratadas com estímulo de BAT do camundongo controle,

conforme demonstrado na **figura 19**. O estímulo de WAT do camundongo Adicer promoveu maior formação de corpúsculos lipídicos nas células MIN6, comparado com as células não estimuladas e com as células que foram tratadas com estímulo de WAT do camundongo controle, conforme apresentado na **figura 19**.

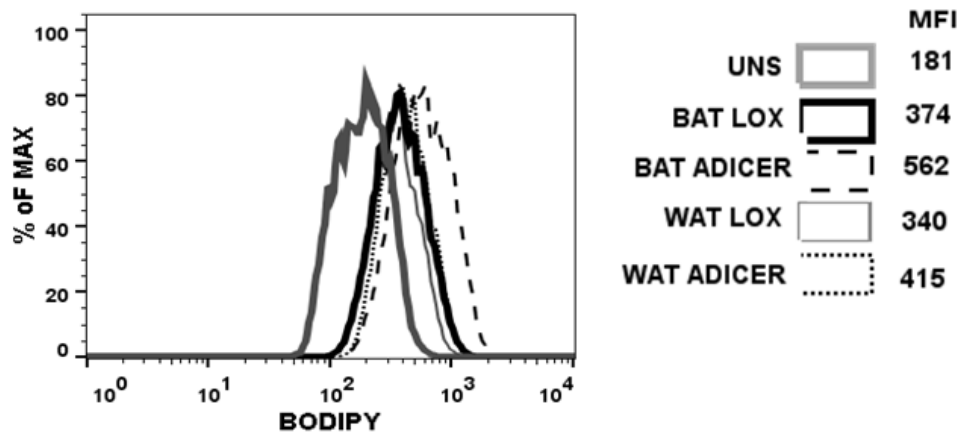


Figura 19: Formação de corpúsculos lipídicos nas células MIN6 após estímulo com BAT e WAT de LOX e Adicer. O histograma se refere à mediana da intensidade de fluorescência de sonda Bodipy. O maior deslocamento está associado à maior detecção de corpúsculos lipídicos nas células estimuladas. Análise realizada em software FlowJo.

5.10 Efeito dos estímulos com secreção derivada de BAT e WAT de camundongos WT e ADICER sobre o perfil inflamatório de células do insulinooma

Assim como os corpúsculos lipídicos podem ser marcadores de atividade inflamatória no tumor, hipotetizamos que os estímulos de TA, de BAT e WAT do camundongo WT e Adicer, poderiam promover alterações na secreção de citocinas no insulinooma. Foram avaliadas a secreção de TNF- α , IL-33, IL-1 β , TGF- β e quimiocina CCL2 nas células de insulinooma, após 24 e 48 h de estímulo.

A citocina IL-33 é secretada em situações de dano e estresse celular, embora apresente papel dual na resposta inflamatória, pode ativar células NK, linfócitos TCD8+ e vias angiogênicas (Fournié, Poupot, 2018). Observamos maior secreção desta citocina nas células de insulinooma após 24 e 48 horas do tratamento com estímulo de BAT do camundongo controle, comparado com as células que receberam estímulo de WAT e as não estimuladas, conforme **figura 20**.

As células que receberam estímulo de BAT do camundongo Adicer, após 24 e 48 horas, apresentaram uma tendência ao aumento da secreção de IL-33 ($p=0,06$), comparado com as células que receberam estímulo de BAT do camundongo controle, porém não foram estatisticamente significativas. Entretanto, as células que receberam estímulo de WAT do camundongo Adicer não apresentaram secreção aumentada de IL-33 após 24 horas de estímulo, mas após 48 horas de estímulo foram detectadas diferenças significativas na produção desta citocina, comparado com as células que foram tratadas com estímulo de WAT do camundongo controle, conforme apresentado na **figura 20** (a,b).

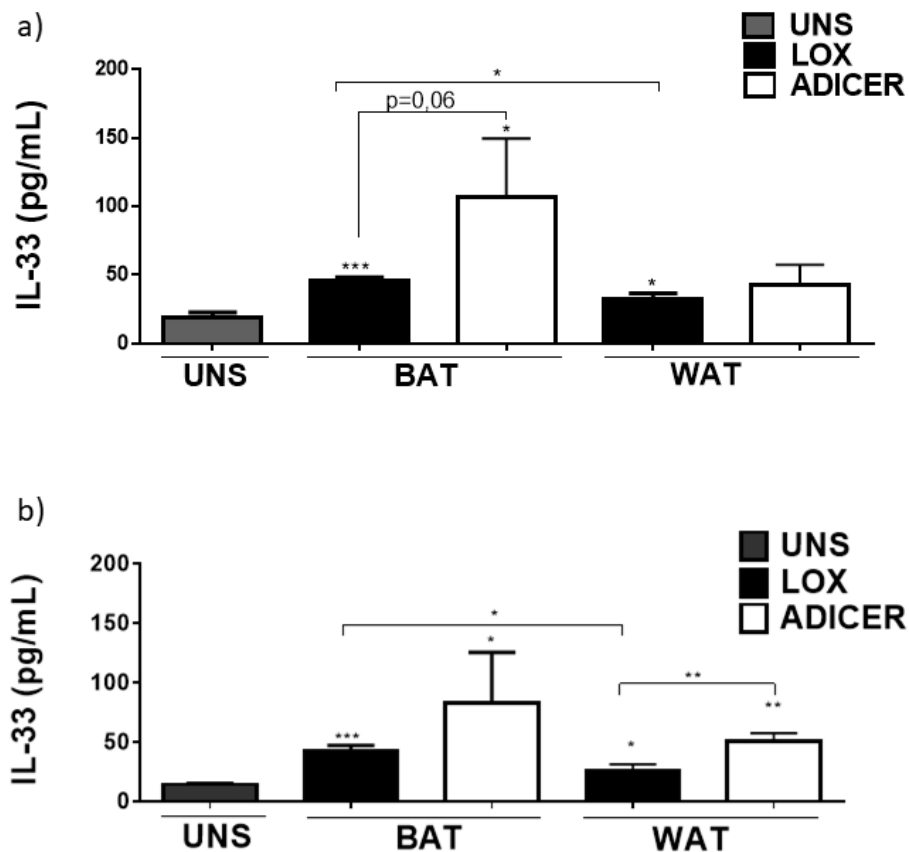


Figura 20: Detecção de IL-33 em células de insulinooma após estímulo com BAT e WAT de WT e Adicer. Em (a) se refere à detecção de IL-33 após 24 horas de estímulo e em (b) se refere à detecção de IL-33 após 48 horas de estímulo. Os valores de p são representados por: $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**), e $p \leq 0.001$ (***)

A citocina TNF- α é um importante mediador inflamatório e da resposta imune celular. Dentre as funções reguladas por esta citocina, podem ser citadas a diferenciação celular. A secreção de altas concentrações desta citocina pode resultar em citotoxicidade (Webster e Vucic, 2020). Avaliamos a secreção desta citocina pelas

células MIN6 após estímulo com os meios condicionados derivados de BAT e WAT, se resultariam em um efeito distinto após 24 horas e 48 horas de estímulo. Observamos que tanto após 24 horas, como após 48 horas de estímulo, as células MIN6 tratadas com meio condicionado de BAT secretaram mais TNF- α , comparado com as que receberam estímulo de WAT do camundongo controles e às não estimuladas, conforme demonstrado na **figura 21 (a,b)**.

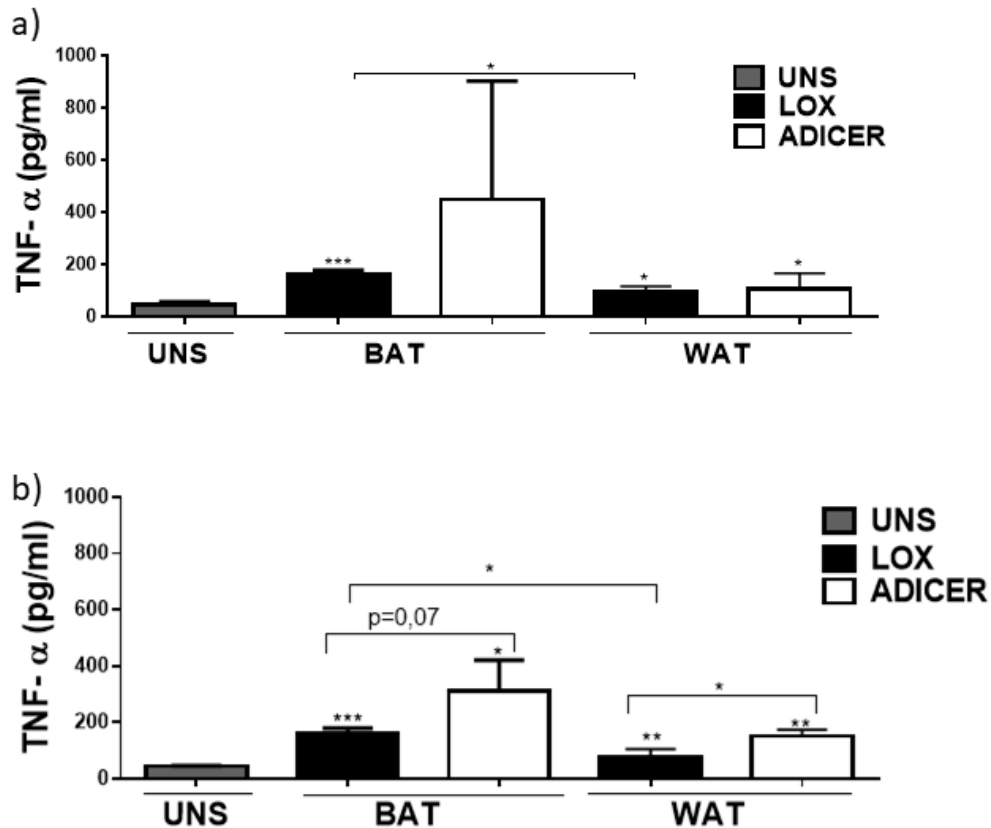


Figura 21: Detecção de TNF- α nas células de insulinoma após estímulo com BAT e WAT de WT e Adicer. Em (a) se refere à detecção de TNF- α após 24 horas de estímulo e em (b) se refere à detecção de TNF- α após 48 horas de estímulo. As análises estatísticas foram feitas comparando-se dois grupos entre si, por teste T. Os valores de p são representados por: $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**), e $p \leq 0.001$ (***)

As células estimuladas com meio condicionado de BAT de camundongo Adicer não apresentaram diferenças quanto ao aumento da secreção de TNF- α , comparado com as células estimuladas com BAT do camundongo controle após 24 horas, porém a partir de 48 horas há uma tendência ao aumento da secreção desta citocina. O estímulo de WAT do camundongo Adicer não induziu aumento da secreção de TNF- α , comparado ao estímulo de WAT do camundongo controle, após 24 horas de estímulo, porém a partir de 48 horas, observamos um aumento significativo da produção desta citocina, conforme demonstrado na **figura 21 (a, b)**.

Avaliamos o efeito dos estímulos de BAT e WAT sobre a secreção da quimiocina CCL-2 nas células de insulinoma após 24 horas e 48 horas, uma vez que esta quimiocina está envolvida no recrutamento de monócitos no sítio inflamatório e adesão celular. Não foram observadas diferenças quanto à secreção de CCL-2 nas células MIN6 estimuladas com BAT e WAT do camundongo controle e em relação ao não estimulado após 24 e 48 horas, conforme demonstrado na **figura 22 (a, b)**.

Não foram observadas diferenças quanto à maior secreção de CCL-2 nas células MIN6 que receberam estímulo de BAT do camundongo Adicer comparado com as células que receberam estímulo de BAT do camundongo controle em nenhum dos tempos analisados (24 e 48 horas). Contudo, após 48 horas de estímulo, as células tratadas com estímulo de WAT do camundongo Adicer apresentaram aumento na secreção da quimiocina CCL-2, comparado com as células que receberam estímulo de WAT do camundongo controle conforme apresentado na **figura 22 (a, b)**.

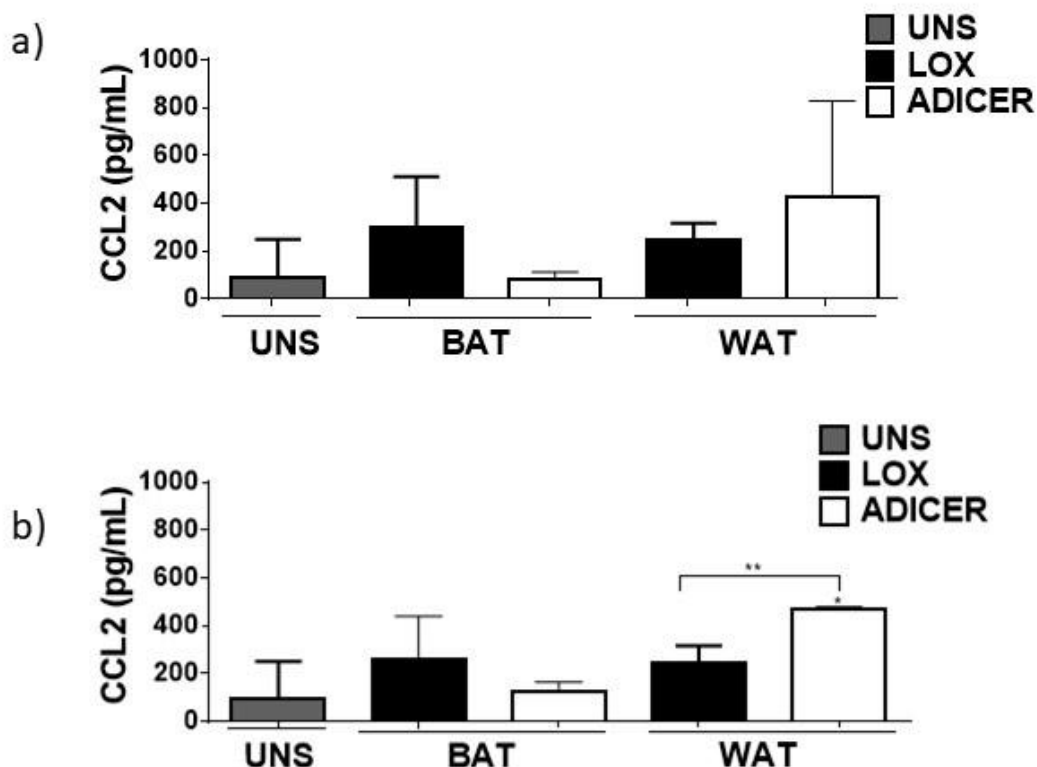


Figura 22: Detecção de CCL2 em células de insulinoma após estímulo de BAT e WAT de WT e Adicer. Em (a) se refere à detecção de CCL2 após 24 horas de estímulo e em (b) se refere à detecção de CCL2 após 48 horas de estímulo. As análises estatísticas foram feitas comparando-se dois grupos entre si, por teste T. Os valores de p são representados por: $p \leq 0.01$ (**).

Investigamos o efeito dos estímulos BAT e WAT sobre a secreção de IL-1 β e TGF- β nas células MIN6 após 48 horas de estímulo. A citocina IL-1 β tem ação pró-inflamatória e desempenha papel na resolução da resposta inflamatória aguda e crônica, que podem ser benéficos ao desenvolvimento tumoral (Kaneko et al, 2019). A citocina TGF- β tem função anti-inflamatória e pode regular a homeostase da resposta imune, embora a supressão da resposta imune por maior secreção desta citocina também pode facilitar o crescimento tumoral (Batle e Massague, 2019).

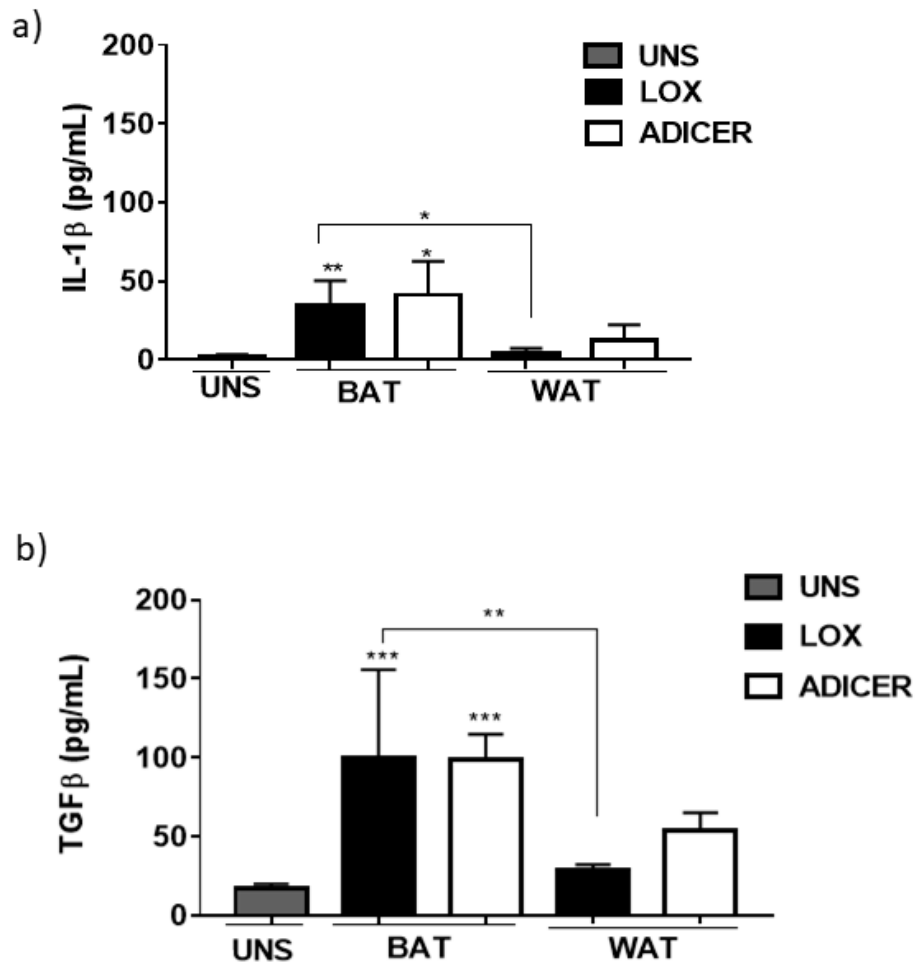


Figura 23: Detecção de IL-1 β e TGF β em células de insulinoma com os produtos derivados de BAT e WAT de WT e Adicer. Em (a) se refere à detecção da citocina IL-1 β após 48 horas de estímulo e em (b) se refere à detecção da citocina TGF β após 48 horas de estímulo. Os valores de p são representados por: $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**), e $p \leq 0.001$ (***)

As células MIN6 que receberam estímulo de BAT do camundongo controle apresentaram maior secreção de IL-1 β e TGF- β , comparadas com o estímulo de WAT de WT e em comparação com as células não estimuladas. A ausência de Dicer no estímulo de BAT sobre as células MIN6 não alteraram a secreção destas citocinas não foram observadas alterações significativas na secreção de IL-1 β e TGF- β nas células que receberam estímulo dos produtos de secreção de WAT Adicer em relação às células não estimuladas, e comparadas com as células que receberam estímulo de WAT WT.

Com o intuito de avaliarmos se a secreção de citocinas seria efeito da interação diferencial dos produtos de secreção de BAT e WAT de WT e Adicer com as células de insulinoma e não provenientes do próprio estímulo, dosamos as secreções de duas citocinas: IL-1 β e TNF- α após 24 horas de estímulo, e dos meios condicionados derivados de BAT e WAT do WT e Adicer, conforme demonstrado na **figura 24**.

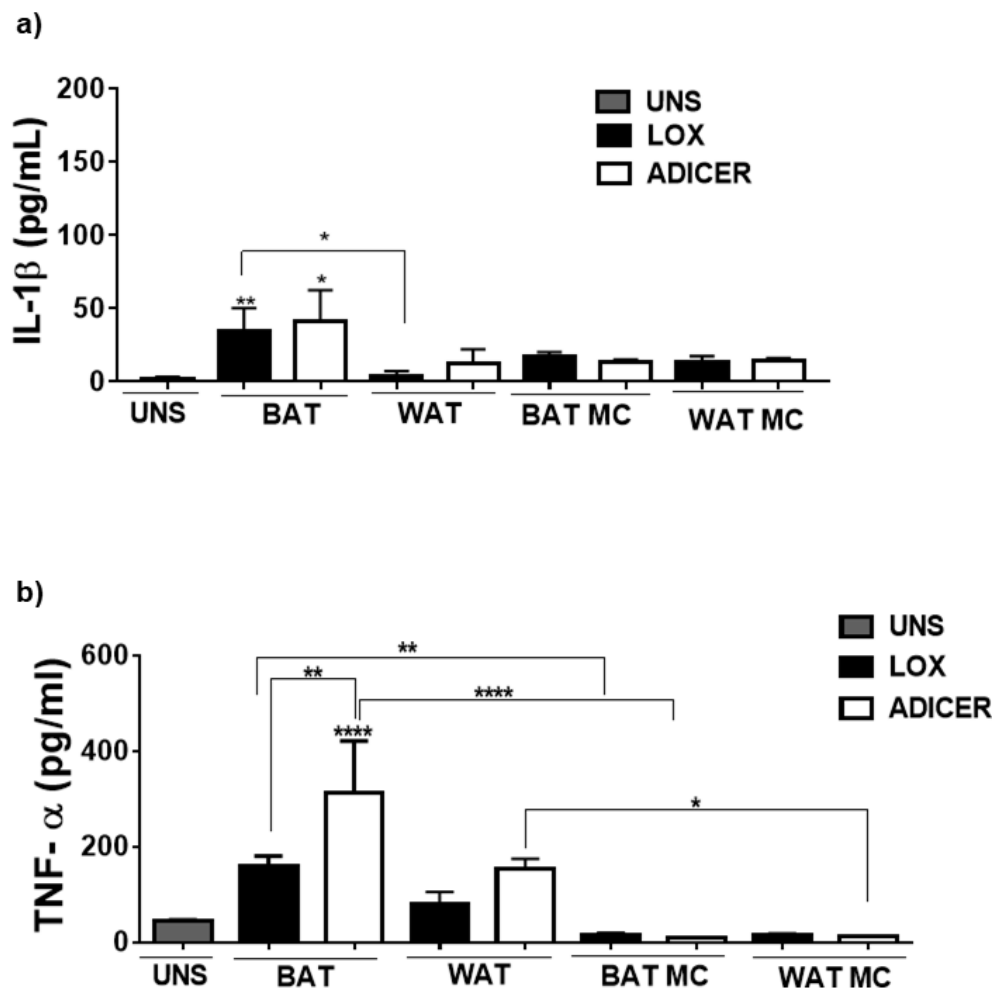


Figura 24: Comparação da secreção das citocinas IL-1 β e TNF- α nas células de insulinoma após 24 horas e do meio condicionado de BAT e WAT de WT e Adicer
 Observa-se que a secreção destas citocinas é aumentada após a interação dos produtos derivados de BAT de WT e Adicer com as células de insulinoma, comparado com as células não estimuladas e com os níveis detectados no meio condicionado dos tecidos de BAT e WAT, de WT e Adicer. Os valores de p são representados por: $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.001$ (***), $p \leq 0.0001$ (****).

Observamos que a interação dos produtos derivados de BAT do WT e Adicer nas células de insulinoma apresentaram maior secreção de IL-1 β , comparado com as células não estimuladas. Não foram detectados níveis aumentados de IL-1 β no meio condicionado de BAT e WAT, de WT e Adicer. Com relação a citocina TNF- α , a interação dos produtos derivados de BAT de WT e Adicer aumentaram a secreção desta citocina comparado com as células não estimuladas, e em relação aos níveis detectados no meio condicionado destes tecidos. A interação dos produtos derivados de WAT Adicer com as células de insulinoma também promoveu maior secreção desta citocina, comparado com os níveis detectados no meio condicionado de WAT do animal Adicer.

5.11 Identificação e caracterização de proteínas glicosiladas presentes nos tecidos adiposos e na secreção derivada de BAT e WAT

Os nossos dados demonstraram que apesar de serem tecidos distintos, os estímulos de BAT e WAT não promoveram alterações sobre viabilidade e morte do insulinoma, embora o estímulo de BAT apresentou maior tendência de induzir no insulinoma a secreção aumentada de citocinas e formação de corpúsculos lipídicos. Observamos que na ausência de Dicer do estímulo de BAT resultou em morte celular massiva, sobretudo indicando morte lítica, resultando em fragmentação nuclear. O estímulo de WAT Adicer no insulinoma induziu morte celular por apoptose, acompanhada da alteração de outros parâmetros, tais como redução na quantidade de mitocôndrias viáveis, estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, formação de vacúolos citoplasmáticos, e maior secreção dos marcadores inflamatórios como corpúsculos lipídicos e citocinas inflamatórias. O nosso questionamento foi em relação à composição dos produtos secretados por BAT e WAT, e o impacto na ausência de Dicer.

Dentre as possibilidades para caracterização da composição dos produtos secretados pelo TA, a glicômica é uma técnica útil e sensível na identificação de moléculas-alvo, que poderiam explicar melhor o fenômeno observado na interação diferencial destes produtos secretados sobre o insulinoma. Os glicanos são componentes de diversos glicoconjugados, tais como as glicoproteínas, proteoglicanos e glicolipídeos. Os glicanos livres como oligossacarídeos, monossacarídeos e polissacarídeos também são encontrados em células eucarióticas. A glicosilação é descrita como uma modificação pós-translacional, que assim como em outros processos, tais como a fosforilação, acetilação, metilação, ubiquitinação têm impacto sobre a expressão de proteínas metabólicas e fatores transcricionais. A reação de glicosilação é catalisada por glicosiltransferases. Os glicanos podem ser bastante heterogêneos, e as glicosiltransferases podem estar relacionadas a diversos glicanos, com atividades específicas na regulação do metabolismo celular (Taniguchi; Kizuka, 2015).

A glicosilação de proteínas pode formar N e O-glicanos. Os N-glicanos são caracterizados por apresentarem um átomo de nitrogênio na cadeia lateral da asparagina ligada a acetilglucosamina. Os O-glicanos são caracterizados por apresentarem um átomo de oxigênio na cadeia lateral da serina ou treonina ligadas ao N-acetilgalactosamina. Os glicanos e glicoproteínas podem interagir com componentes do estroma tumoral, tendo efeitos sobre proliferação, resistência à morte celular, evasão da resposta imune, inflamação e instabilidade genômica (Nardy et al., 2016).

Os glicanos e padrões atípicos de glicosilação foram propostos como biomarcadores tumorais promissores, uma vez que modificações de proteínas glicosiladas foram identificadas em tecidos tumorais. A glicosilação pode ter um papel regulatório sobre a progressão do câncer e metástase, bem como na transição epitelial-mesenquimal observada em células neoplásicas. Como exemplo, na estratégia terapêutica contra o câncer, tem sido empregada a utilização da deleção específica de glicanos e modificações das cadeias de glicanos com fucose e ácido siálico a fim de aumentar a sensibilidade de células cancerosas a ação de drogas antitumorais (Taniguchi; Kizuka, 2015)

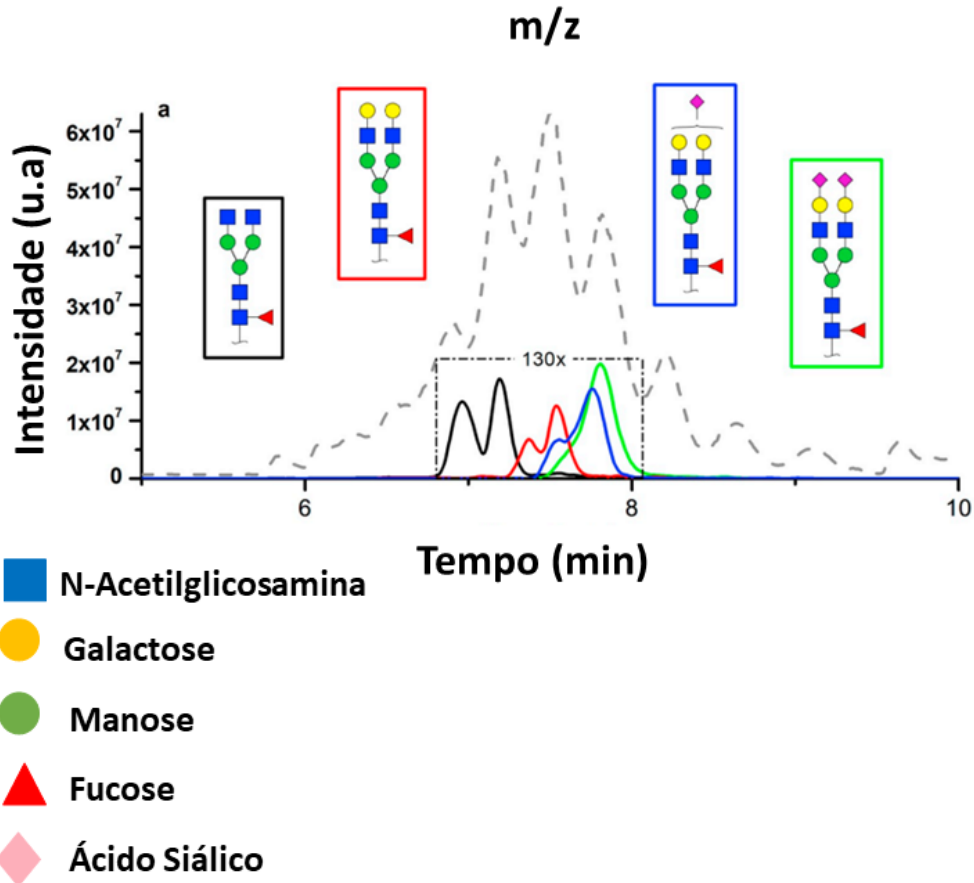
As modificações pós-translacionais, como a glicosilação podem alterar o tráfego intracelular de proteínas, padrões de proteólise, interações entre ligante e receptor, adesão de matriz extracelular, reconhecimento imune, sinalização tumoral e

migração celular. Como exemplo, a reprogramação metabólica de células tumorais pode mudar a composição do glicoma e glicoproteoma, promovendo assim a superexpressão de algumas proteínas glicosiladas que facilitam o desenvolvimento tumoral. Neste sentido, a caracterização dos glicanos podem ser valiosos biomarcadores tumorais, tanto no sítio tumoral ou em fluidos, como plasma (Peixoto et al., 2019).

Já foram demonstrados que a partir de materiais biológicos, como o plasma e em biópsias tumorais de pacientes com câncer de cólon, foi possível a detecção e caracterização de padrões alterados de N-glicanos por espectrometria de massas (Coura et al., 2021). No entanto, ainda não foram descritas a caracterização diferencial de N-glicanos de BAT e WAT. Uma vez que o TA exerce um efeito endócrino, podendo interferir sobre diferentes parâmetros inflamatórios e carcinogênicos, pela secreção de diversos fatores, e que os N-glicanos podem facilitar as vias de progressão e evasão da resposta imune tumoral, buscamos detectar e diferenciar N-glicanos a partir de amostras de BAT e WAT murinos, obtidos de camundongos machos LOX.

Optamos por inicialmente caracterizar proteínas N-glicosiladas de BAT e WAT, para que então pudéssemos dar continuidade com amostras de Adicer. As proteínas totais do tecido foram extraídas após maceração em nitrogênio líquido com solução de acetonitrila 50% e sonicação à temperatura ambiente. As reações específicas para obtenção de N-glicanos compreenderam as etapas de redução, alquilação, deglicosilação das glicoproteínas, purificação dos N-glicanos, permetilação, purificação dos N-glicanos permetilados e a preparação da amostra para análise de cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massas foi realizada. A metodologia está descrita em detalhes na seção de materiais e métodos.

a) **Cromatograma de íons totais característico de N-glicanos**



b) **Cromatograma de íons totais BAT**

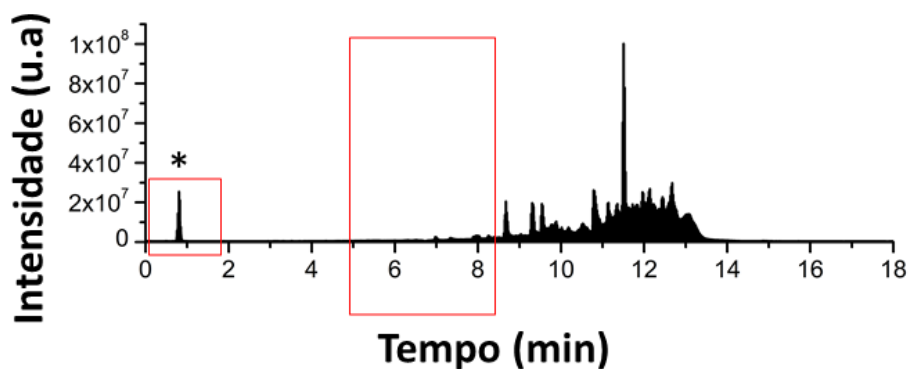
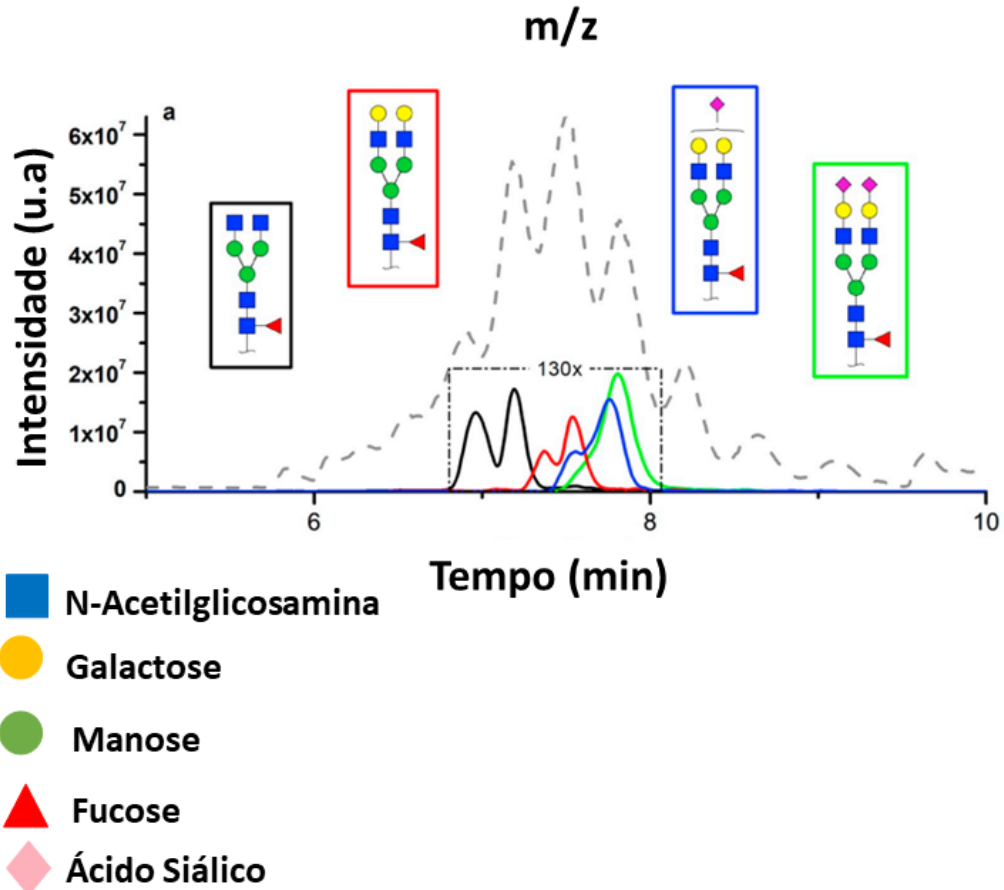


Figura 25: Cromatograma de íons totais de BAT em relação ao padrão de N-glicanos. Observa-se em (a) cromatograma de íons totais por LC característico de proteínas N-glicosiladas, no qual os picos detectados estão presentes entre os tempos de 5 a 8 minutos de exposição, em (b) observa-se que a amostra de BAT não gerou picos característicos neste tempo de exposição. O primeiro pico identificado de 0 a 2 minutos está relacionado à formação de clusters com acetato de sódio, porém não está relacionado à identidade de N-glicanos.

a) **Cromatograma de íons totais característico de N-glicanos**



b) **Cromatograma de íons totais WAT**

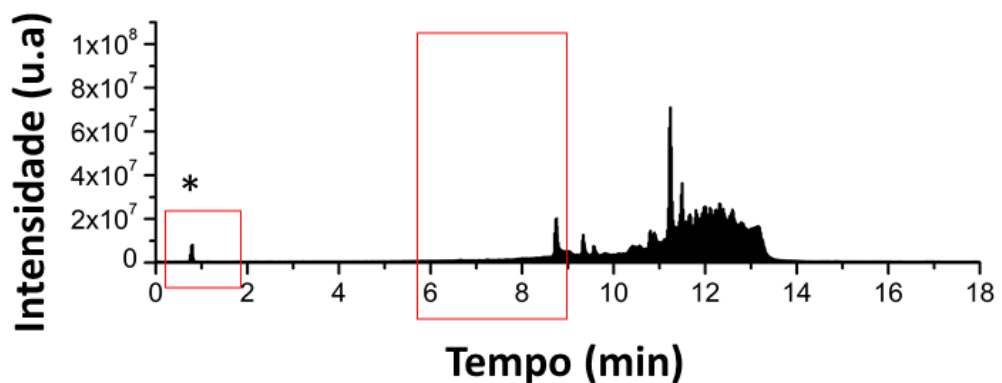
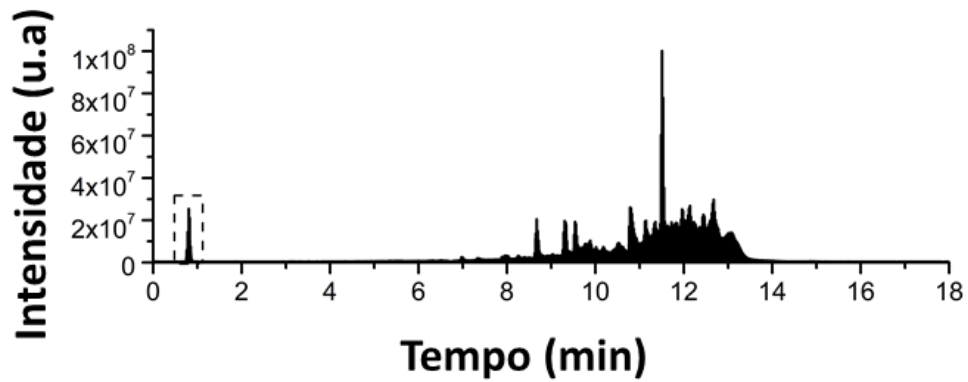


Figura 26: Cromatograma de íons totais de WAT em relação ao padrão de N-glicanos. Observa-se em (a) cromatograma de íons totais por LC característico de proteínas N-glicosiladas, no qual os picos detectados estão presentes entre os tempos de 5 a 8 minutos de exposição, em (b) observa-se que a amostra de BAT não gerou picos característicos neste tempo de exposição. O primeiro pico identificado de 0 a 2 minutos está relacionado à formação de clusters com acetato de sódio, porém não está relacionado à identidade de N-glicanos.

As metodologias descritas de maior sucesso na literatura para isolamento e caracterização de N-glicanos foram realizadas a partir de amostras de plasma ou do próprio tumor. Sendo assim, uma perspectiva futura seria avaliar a presença de N-glicanos no meio condicionado de BAT e WAT, e caso gere resultados satisfatórios, avaliar o impacto na ausência de miRNAs sobre a composição de N-glicanos em BAT e WAT, de camundongo Adicer, uma vez que os miRNAs podem regular a biossíntese de glicanos, incluindo N-glicanos e O-glicanos, através do silenciamento de genes-alvos da glicosilação (Sovran et al, 2011; Kasper, Koppolu, Mahal, 2014; Agrawal et al, 2014;)

As amostras de BAT e WAT analisadas para identificação de grupos de N-glicanos não resultaram em picos de detecção característicos, conforme análise comparativa realizada por software GRITS Tollbox 1.2. Uma de nossas hipóteses é que pela própria composição de BAT e WAT, ambos altamente ricos em ácidos graxos possam ter interferido em uma das etapas de purificação dos N-glicanos ou pelo impacto na massa mensurada das amostras, demonstrando que em relação à grande abundância de ácidos graxos, o teor proteico extraído pode ser baixo em relação à massa total.

a) **Cromatograma de íons totais de BAT**



b) **Análise de espectrometria de massas de BAT**

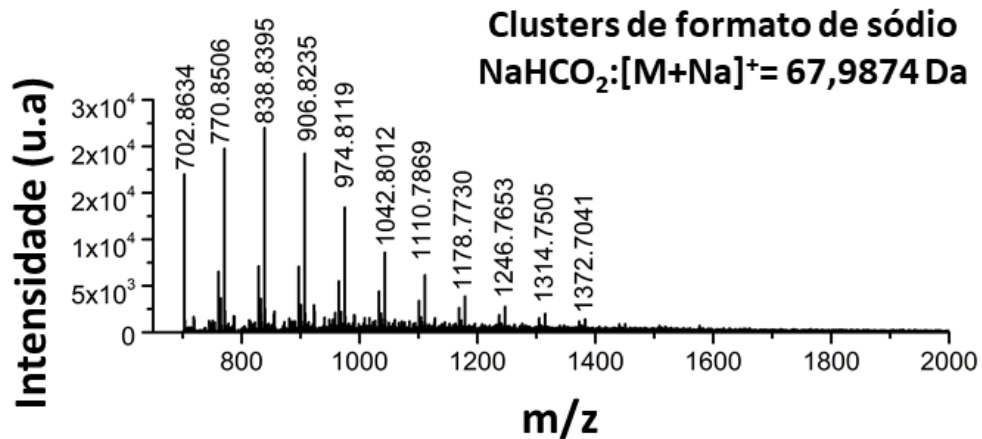


Figura 27: Análise de espectrometria de massas com picos descritos de BAT.

Em (a) está representado o cromatograma de íons totais, com destaque para o pico detectado no tempo de exposição de 0 a 2 minutos. Em (b) está representada a análise de espectrometria de massas de BAT, e assim como WAT apresentaram perfil semelhante no cromatograma total. A relação massa/carga é descrita, com picos que variaram de 702,86 a 1377,70, referentes à formação de clusters de acetato de sódio, embora não sejam relacionados à N-glicanos.

6.0 Discussão

A correlação entre TA e agressividade no insulinoma ainda é desconhecida, embora o risco de câncer pancreático esteja aumentado na presença de alterações da plasticidade do TA, como exemplo na obesidade, caracterizada pela hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos com acentuado dano inflamatório (Li et al, 2018). O TA contribui para o desenvolvimento tumoral, por mecanismos relacionados às alterações metabólicas que favorecem o crescimento do tumor, tais como a interação dos adipócitos e os componentes da fração vascular estromal com as células tumorais, recrutamento imunológico, modulação do perfil inflamatório, ativação de vias angiogênicas, fornecimento de substrato energético, como ácidos graxos livres, além da migração de células-tronco derivadas do TA para o sítio tumoral (Lengyel et al, 2018). Os ácidos graxos secretados pelo TA podem induzir lipotoxicidade e alterar função das ilhotas pancreáticas, sobretudo em células beta (Eguchi et al, 2012).

Neste trabalho focamos inicialmente em investigar se os produtos derivados de BAT e WAT apresentariam efeitos distintos no insulinoma, considerando que estes tecidos são distintos em relação à composição, função e atividade metabólica. Não foram observadas diferenças significativas entre BAT e WAT quanto aos parâmetros de viabilidade, morte, ciclo celular e danos mitocondriais. Esperávamos que BAT reduzisse a viabilidade no insulinoma, uma vez que representa um promissor alvo terapêutico contra doenças metabólicas, tais como obesidade e diabetes tipo 2. O potencial efeito antitumoral de BAT ainda é desconhecido, embora haja indícios que a diferenciação de adipócitos brancos em marrons aumente a expressão de genes antitumorais, como PTEN, que regula vias de proliferação de crescimento celular (Ortega Molina et al, 2012), porém no insulinoma não foram observadas diferenças.

Os miRNAs regulam adipogênese, diferenciação do adipócito, recrutamento imunológico, remodelamento vascular e perfil inflamatório. Esperávamos que na ausência de Dicer em BAT e WAT, com resultante ausência de miRNAs derivados destes tecidos, promoveria alterações importantes na interação com o insulinoma, porém desconhecíamos se beneficiariam ou não o desenvolvimento das células tumorais quanto aos parâmetros carcinogênicos e inflamatórios avaliados. O estímulo de WAT Adicer poderia estar associado à morte celular por apoptose, hipótese reforçada também pela análise de MET, no qual apresentou maior formação de vacúolos citoplasmáticos.

Associado a este efeito, analisamos quantidade de mitocôndrias e função mitocondrial no insulinoma. As mitocôndrias regulam o metabolismo energético, e os miRNAs derivados do TA podem promover alterações sobre a plasticidade do TA e metabolismo lipídico. A mitocôndria gera ATP pela cadeia transportadora de elétrons. Embora todos os estímulos de TA tenham aumento o consumo de oxigênio pelo complexo II, apenas as células estimuladas com WAT Adicer apresentaram associado a este efeito alterações em outros parâmetros, tais como a respiração basal e a capacidade respiratória máxima, demonstrando que os produtos de secreção deste tecido podem sobrecarregar a atividade mitocondrial a tal ponto de demandar maior consumo de oxigênio, sugerindo uma progressiva perda da função mitocondrial.

Observamos por respirometria de alta resolução que as células de insulinoma quando estimuladas com os produtos secretados derivados de WAT Adicer apresentaram além do aumento da respiração basal e da capacidade máxima respiratória, maior atividade via complexo II da cadeia transportadora de elétrons. O complexo II é um componente do ciclo de Krebs e da cadeia respiratória. Este complexo é formado principalmente pela desidrogenase do succinato, a única enzima do ciclo de Krebs presente na membrana interna da mitocôndria. Possui quatro subunidades, contendo 2 proteínas com grupos ferro/enxofre, e uma delas ligadas ao FAD. O complexo II oxida o intermediário succinato e forma o fumarato, através da transferência de elétrons do succinato para FAD, que resulta ao final na redução de uma molécula de ubiquinona (coenzima Q10) para ubiquinol (Liesa, Shirihai, 2013).

O complexo II é um componente tanto do ciclo de Krebs quanto da cadeia transportadora de elétrons. As alterações no complexo II podem comprometer a manutenção da homeostase energética. Dados recentes demonstram que este complexo é de fundamental importância na produção de ROS, e este complexo pode ser útil na indução ou supressão da morte celular, a depender do tumor (Bandara, Drake, Brown, 2021).

O trabalho de Barlow e colaboradores (2012) demonstrou que a rapamicina na concentração de 200 η mol/mL induziu perda de função de células beta pancreáticas e em ilhotas de Langerhans, com inibição dos complexos mTORC1 e mTORC2, mais pronunciado em estímulos tardios, como 72 horas. Os nossos dados demonstraram que embora na concentração de 100 η mol/mL de rapamicina em 24 horas de estímulo não tenha resultado em alterações da viabilidade celular do insulinoma, conforme demonstrado em trabalhos anteriores com células beta-pancreáticas, o co-estímulo

de rapamicina com os produtos de secreção de WAT Adicer possa contribuir na redução da viabilidade celular do insulinoma.

Uma de nossas hipóteses que poderia explicar o efeito observado do estímulo de WAT Adicer com a rapamicina sobre a redução da viabilidade celular se baseia na atividade atípica descrita da via mTOR no WAT de camundongo Adicer. Reis e colaboradores (2016) demonstraram que a ausência de Dicer no TA resultou em desregulação do complexo mTORC1 quando submetido a diferentes dietas. No camundongo Adicer os níveis de BCAA (aminoácidos de cadeia ramificada) estão aumentados, o que promove desregulação de mTORC1, e sobre a fosforilação de S6 quinase e IRS1, comprometendo a sensibilidade à insulina. O TA é uma das fontes mais ricas de BCAA, e nos camundongos Adicer, houve aumento destes. O metabolismo de BCAA pode favorecer o acúmulo de metabólitos tóxicos no TA.

O complexo mTORC1 pode ser ativado por fatores de crescimento, insulina e aminoácidos. Consistente com os dados *in vivo* que demonstraram que os níveis de aminoácidos ramificados provenientes do TA estão aumentados na ausência de Dicer, hipotetizamos que estes mesmos aminoácidos estejam presentes nos produtos de secreção de WAT Adicer, o que poderia estar associado aos efeitos observados de sobrecarga mitocondrial, particularmente em WAT. As células tumorais adquirem plasticidade metabólica, de tal forma a garantir sua sobrevivência, mas uma vez que os miRNAs podem ser oncogenes, a ausência destes miRNAs em WAT podem ser fundamentais na interação *in vitro* entre TA e insulinoma.

Os parâmetros de proliferação e sobrevivência tumoral requerem constantes adaptações do metabolismo energético, de tal forma que assegurem a alta demanda nutricional do tumor. Como exemplo desta adaptação energética, o efeito Warburg, no qual há a maior captação de glicose e produção de lactato na presença de oxigênio. O efeito Warburg pode resultar diretamente do dano mitocondrial, embora as mitocôndrias de células tumorais possam contornar este empecilho à obtenção energética, mantendo sua função, a fim de garantir a sobrevivência do tumor. A transcrição de genes metabólicos, tais como PGC-1 α e HIF-1 α podem ser controlados pela atividade de mTORC1 (Lopez et al., 2019).

Dados da literatura reportam que a exposição crônica de glicose e ácidos graxos livres poderiam resultar em perda da função de células beta pancreáticas. O TA é uma fonte rica de ácidos graxos. Nossos dados demonstraram que o meio condicionado de WAT e BAT não promoveram alterações distintas sobre parâmetros

carcinogênicos e inflamatórios no insulinoma, no entanto na ausência de miRNAs em WAT, os efeitos sobre estes parâmetros foram mais pronunciados.

Com relação à danos inflamatórios promovidos pelos estímulos de TA, a análise da biogênese de corpúsculos lipídico pode correlacionar a maior atividade inflamatória com a progressão tumoral. As células de insulinoma estimuladas com meio condicionado de BAT apresentaram maior formação de corpúsculos lipídicos, comparado com as células estimuladas com meio condicionado de WAT e com as células não estimuladas. Na ausência de Dicer no estímulo de BAT também foi observado aumento da biogênese de corpúsculos lipídicos no insulinoma. Hipotetizamos que defeitos nas vias de lipogênese e lipólise, normalmente regulados pelos miRNAs do TA (Miroslava et al., 2016), sobretudo na ausência destes no TA, poderia induzir estresse oxidativo e morte celular, confirmado também pelo aumento da biogênese de corpúsculos em células de insulinoma estimuladas com produtos de WAT Adicer.

A inflamação aumenta o risco carcinogênico (Grivennikov, Karin, 2010), enquanto a formação de ROS pode causar dano ao DNA, mutações, oxidação lipídica, disfunção mitocondrial (Sies, Jones, 2020). A formação de ROS tem um efeito dual na progressão tumoral, ao ativar vias de sobrevivência celular, crescimento endotelial vascular, adaptação à hipóxia e induzir estresse oxidativo nas células tumorais, o que culminaria com a morte celular (Aggarwal et al, 2019). O perfil de secreção de citocinas inflamatórias no insulinoma demonstrou que o estímulo de WAT Adicer poderia promover estresse oxidativo e inflamação resultantes da disfunção mitocondrial. As espécies reativas são produtos mitocondriais gerados na síntese de ATP e do fluxo de elétrons da cadeia transportadora. Ácidos graxos e glicose podem ter um efeito nocivo sobre a função mitocondrial, sendo assim aumentando a produção de espécies reativas, e estas espécies oxidam macromoléculas, o que pode provocar perturbações da homeostase celular e associados a patologias como diabetes e câncer (Gupta et al., 2012). Sabe-se que dentre os produtos secretados pelo TA, há uma alta concentração de ácidos graxos, logo, a abundância destes poderia mediar a formação de ROS. Contudo, os demais estímulos também apresentam ácidos graxos, logo pode ser que a ausência dos miRNAs em WAT resulte em maior impacto sobre o metabolismo lipídico do TA.

A ausência de Dicer no estímulo de BAT não induziu a secreção diferencial de mediadores inflamatórios no insulinoma, comparado ao estímulo de BAT do

camundongo controle. Entretanto, a ausência de Dicer no estímulo de WAT contribuiu para aumentar a resposta inflamatória, conforme observado pela maior secreção das citocinas TNF- α , IL-33, e quimiocina CCL2, sugerindo um sinal de dano decorrente deste estímulo no insulinooma. O camundongo Adicer pode desenvolver alterações morfológicas no BAT interescapular, demonstrado pela hipertrofia do tecido e branqueamento, característico de WAT.

Dados preliminares demonstraram que estas alterações em BAT podem ser reproduzidas *in vitro*, pela alteração da expressão dos miRNAs-365, miRNA-345 e miR-362 (Mori et al., 2014). A estas modificações do BAT podem ser atribuídas a diferenciação do adipócito, a formação de CLS (do inglês crown-like structures), que são macrófagos que circundam adipócitos em necrose, aumentam a inflamação do tecido. A ausência de miRNAs no TA poderia impactar diretamente sobre a composição e perfil dos produtos secretados por BAT, desta forma, como visto no insulinooma, o estímulo contendo os produtos de secreção de BAT na ausência de Dicer provocaram morte massiva no insulinooma.

Dados preliminares ainda não publicados por colaboradores (Rocha e Mori, 2020) caracterizaram por lipidômica os produtos secretados por adipócitos brancos na ausência de Dicer. Dentre os dados reportados, foi encontrado aumento da secreção de ácidos graxos saturados e triacilgliceróis. A alta concentração de ácidos graxos saturados poderia ser o gatilho para induzir lipotoxicidade nas células de insulinooma, conforme verificado no aumento de morte celular, disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e inflamação. Como perspectivas de caracterização dos produtos secretados pelo tecido, buscamos por análise de glicômica identificar proteínas N-glicosiladas, mas nossos resultados não geraram picos de identificação característicos de padrão de N-glicosilação.

Os miRNAs derivados do TA têm um papel-chave na regulação da homeostase metabólica e no possível crosstalk com outros órgãos. No envelhecimento, por exemplo, há redução da expressão de Dicer no TA, possivelmente como consequência do dano celular a longo prazo e alterações metabólicas (Mori et al, 2012), que impactam sobre a biogênese e processamento de miRNAs. A redução global da abundância de miRNAs no envelhecimento também pode resultar do maior estresse celular por danos oxidativos (Emde, Hornstein, 2014).

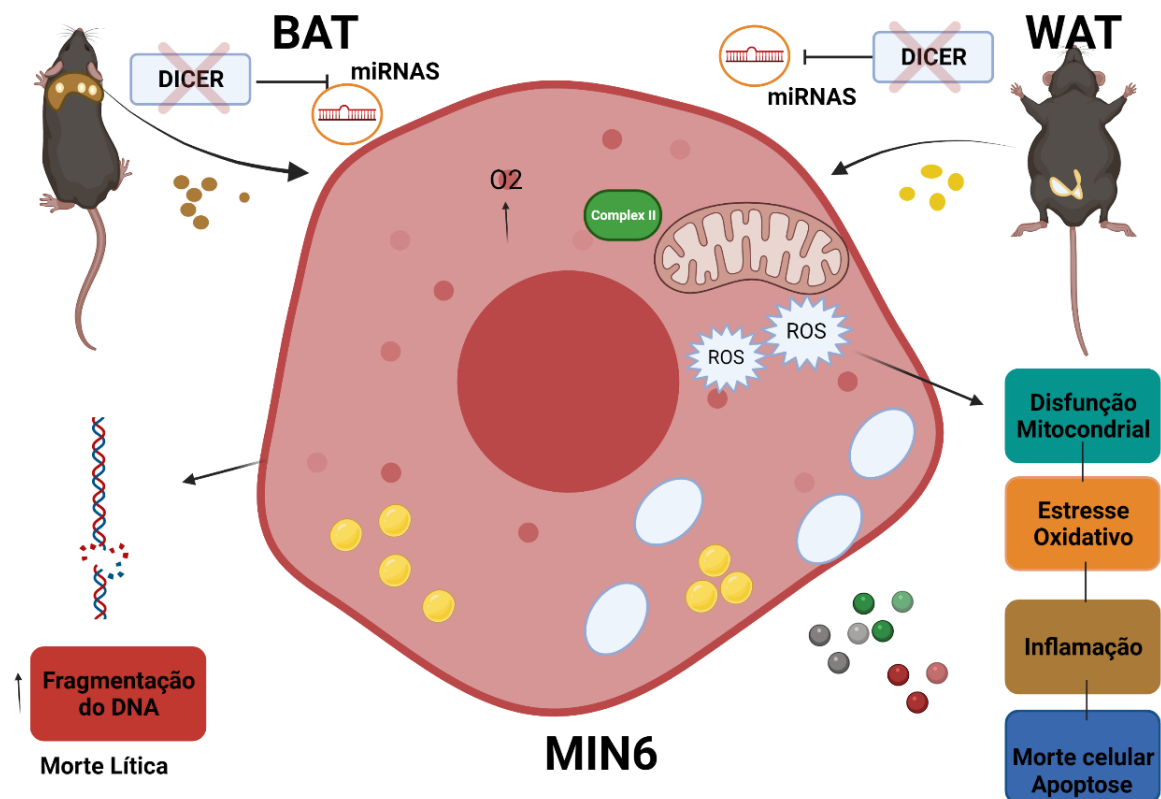
O declínio de Dicer e a supressão dos miRNAs no TA poderiam estar associados a outros fenômenos observados no processo de envelhecimento, tais como os riscos aumentados do desenvolvimento de doenças metabólicas como a dislipidemia, diabetes tipo 2 e obesidade (Fernandez et al., 2021). A disfunção mitocondrial (Haas, 2019; Chistiakov et al., 2014), a redução da sensibilidade à insulina, a intolerância a glicose (Shou et al., 2020), a alteração e perda de função das células beta pancreáticas (Tata, 2014), alterações da composição do TA e maior acúmulo lipídico, além da redistribuição de lipídeos dos depósitos subcutâneos para os viscerais (Mancuso e Bouchard, 2019), poderiam ser decorrentes da supressão dos miRNAs do TA no envelhecimento. As células MIN-6 são uma linhagem tumoral beta-pancreática útil no estudo de outras disfunções metabólicas, como a diabetes tipo 2, uma vez que pode secretar insulina (Miyazaki et al., 2021).

7.0 Conclusão

- Os produtos derivados de BAT e WAT do camundongo WT não promoveram alterações distintas sobre o perfil de viabilidade, morte e ciclo celular no insulinoma
 - Os produtos derivados de BAT e WAT do camundongo WT não demonstraram efeitos distintos sobre a via de sinalização mTOR no insulinoma
 - Os produtos derivados de BAT e WAT do camundongo WT não resultaram em efeitos distintos sobre quantidade de mitocôndrias viáveis, função mitocondrial e estresse oxidativo
 - Os produtos derivados de BAT do camundongo WT resultaram em aumento de citocinas pró-inflamatórias e aumento de biogênese de corpúsculos lipídicos em comparação com os produtos derivados de WAT do camundongo WT no insulinoma, mas não acompanhado de outros efeitos
 - Os produtos derivados de BAT de camundongo Adicer promoveram declínio da viabilidade celular do insulinoma, por indução de morte lítica e fragmentação nuclear no insulinoma
 - Os produtos derivados de BAT de camundongo Adicer diminuíram a quantidade de mitocôndrias viáveis no insulinoma, porém não alteraram a produção de ROS e nem de parâmetros associados à função mitocondrial no insulinoma
 - Os produtos derivados de BAT de camundongo Adicer promoveram aumento da biogênese de corpúsculos lipídicos no insulinoma, mas não alteraram o perfil de secreção de citocinas inflamatórias no insulinoma
 - Os produtos derivados de WAT de camundongo Adicer reduziram a viabilidade celular e induziram morte celular por apoptose no insulinoma
 - Os produtos derivados de WAT de camundongo Adicer aumentaram a formação de vacúolos citoplasmáticos no insulinoma
 - Os produtos derivados de WAT de camundongo Adicer em associação com inibidor da via mTOR potencializaram o efeito sobre redução da viabilidade celular no insulinoma
 - Os produtos derivados de WAT de camundongo Adicer reduziram a quantidade de mitocôndrias viáveis, alteraram parâmetros relacionados à função mitocondrial e induziram a formação de ROS no insulinoma

- Os produtos derivados de WAT de camundongo Adicer aumentaram a biogênese de corpúsculos lipídicos e secreção de citocinas inflamatórias no insulinoma
- Não foram identificadas espécies características de proteínas N-glicosiladas em amostras de BAT e WAT.

Em suma neste trabalho enfocamos na capacidade regulatória endócrina do TA pela secreção de diversos fatores, e sobretudo um possível crosstalk do TA e o insulinoma. Dentre estes fatores secretados os miRNAs, cuja ausência em WAT induziu morte associada à disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e inflamação. E por fim, nosso trabalho abre a perspectiva da caracterização dos produtos secretados pelo WAT, tendo por enfoque a seleção de miRNAs derivados do TA, como possíveis alvos farmacológicos no tratamento do insulinoma e outros distúrbios metabólicos como a diabetes, no qual também é observada perda de função de células beta pancreáticas, com comprometimento na secreção de insulina.



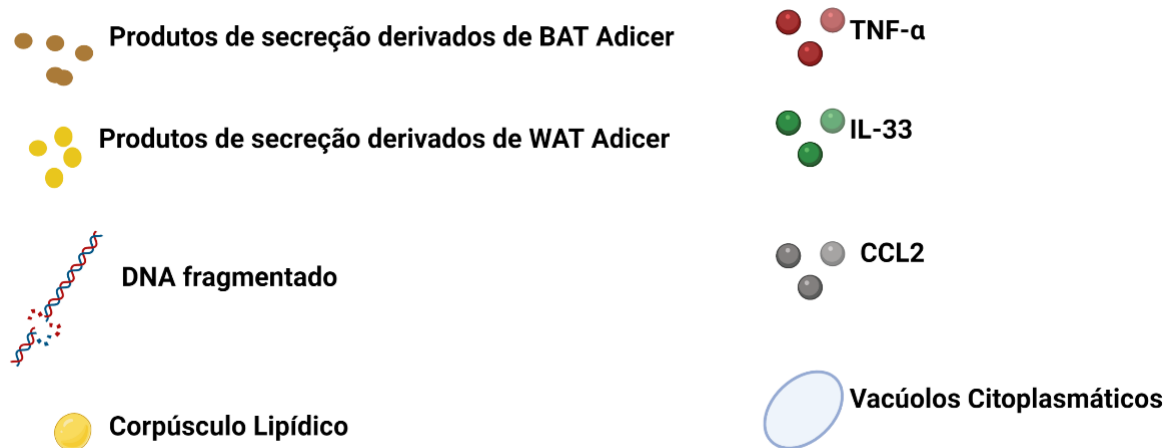


Figura 28: Efeito diferencial dos produtos de BAT e WAT Adicer em células MIN6. Nesta figura de conclusão do trabalho, observa-se acima o BAT e WAT extraídos da região interescapular e gonadal de camundongos Adicer. Nota-se lipodistrofia do WAT gonadal e hipertrofia de BAT, com acúmulo de adipócitos brancos mesclados. Nestes camundongos o gene Dicer está silenciado, o que resulta no bloqueio da biogênese de miRNAs, ou seja, ausência de miRNAs em BAT e WAT. Os produtos de secreção de BAT (em marrom) e WAT (em amarelo) são liberados dos tecidos. Estes produtos de secreção foram utilizados para estimular células MIN6, e os efeitos resultantes são apresentados. Na célula MIN6, o estímulo de BAT Adicer promoveu fragmentação do DNA, morte lítica, conforme apresentado no canto inferior esquerdo. Nas células MIN6, o estímulo de WAT Adicer resultou em vários distúrbios, como exemplo a sobrecarga mitocondrial, decorrente do aumento do consumo de oxigênio, e atividade aumentada do complexo II da cadeia transportadora de elétrons, com maior formação de ROS e secreção de citocinas inflamatórias. Foi observado o aumento da formação de vacúolos citoplasmáticos. Em conjunto estes danos promoveram morte celular por apoptose. Fonte: próprio autor. Figura criada com licença e direito de publicação pela BioRender.com.

Referências Bibliográficas

Abdelaal, M., le Roux, C. W., & Docherty, N. G. (2017). Morbidity and mortality associated with obesity. *Annals of Translational Medicine*, 5(7), 161–161. <https://doi.org/10.21037/atm.2017.03.107>

Accioly, M. T., Pacheco, P., Maya-Monteiro, C. M., Carrossini, N., Robbs, B. K., Oliveira, S. S., Kaufmann, C., Morgado-Diaz, J. A., Bozza, P. T., & Viola, J. P. B. (2008). Lipid bodies are reservoirs of cyclooxygenase-2 and sites of prostaglandin-E2 synthesis in colon cancer cells. *Cancer Research*, 68(6), 1732–1740. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1999>

Aggarwal, V., Tuli, H. S., Varol, A., Thakral, F., Yerer, M. B., Sak, K., Varol, M., Jain, A., Khan, M. A., & Sethi, G. (2019). Role of reactive oxygen species in cancer progression: Molecular mechanisms and recent advancements. *Biomolecules*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/biom9110735>

Ahima, R. S., & Flier, J. S. (2000). Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 11(8), 327–332. [https://doi.org/10.1016/S1043-2760\(00\)00301-5](https://doi.org/10.1016/S1043-2760(00)00301-5)

Avital Gaziel-Sovran^{1, 2}, Miguel F. Segura^{1, 2}, Raffaella Di Micco^{1, 2}, M. K. C., Douglas Hanniford^{1, 2}, Eleazar Vega-Saenz de Miera^{2, 3}, John F. Rakus⁶, John F. Dankert^{1, 2}, Shulian Shang⁴, Robert S. Kerbel⁸, Nina Bhardwaj^{1, 2, 5}, Yongzhao Shao⁴, F., Darvishian^{1, 2}, Jiri Zavadil^{1, 6}, Adrian Erlebacher¹, Lara K. Mahal⁷, Iman Osman^{2, 3, 5}, and E., & Hernando. (2011). MiR-30b/30d regulation of GalNAc transferases enhances invasion and immunosuppression during metastasis. *Cancer Cell*, 1(20), 104–118. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.05.027>

Alexander, R., Lodish, H., & Sun, L. (2011). MicroRNAs in adipogenesis and as therapeutic targets for obesity. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 15(5), 623–636. <https://doi.org/10.1517/14728222.2011.561317>

Andrew P. Wojtovich¹, C. Owen Smith², Cole M. Haynes³, Keith W. Nehrke¹, and P. S., & Brookes⁴. (2013). Physiological consequences of complex II inhibition for aging, disease, and the mKATP channel. *Biochim Biophys Acta*, 5(1827), 1–32. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.12.007>. Physiological

Ardestani, A., Lupse, B., Kido, Y., Leibowitz, G., & Maedler, K. (2018). mTORC1 Signaling: A Double-Edged Sword in Diabetic β Cells. *Cell Metabolism*, 27(2), 314–331. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.11.004>

Bahler, L., Verberne, H. J., Admiraal, W. M., Stok, W. J., Soeters, M. R., Hoekstra, J. B., & Holleman, F. (2016). Differences in sympathetic nervous stimulation of brown adipose tissue between the young and old, and the lean and obese. *Journal of Nuclear Medicine*, *57*(3), 372–377. <https://doi.org/10.2967/jnumed.115.165829>

Bandara, A. B., Drake, J. C., & Brown, D. A. (2021). Complex II subunit SDHD is critical for cell growth and metabolism, which can be partially restored with a synthetic ubiquinone analog. 1–11.

Barlow, A. D., Xie, J., Moore, C. E., Campbell, S. C., Shaw, J. A. M., Nicholson, M. L., & Herbert, T. P. (2012). Rapamycin toxicity in MIN6 cells and rat and human islets is mediated by the inhibition of mTOR complex 2 (mTORC2). *Diabetologia*, *55*(5), 1355–1365. <https://doi.org/10.1007/s00125-012-2475-7>

Bartolomé, A., Kimura-Koyanagi, M., Asahara, S. I., Guillén, C., Inoue, H., Teruyama, K., Shimizu, S., Kanno, A., García-Aguilar, A., Koike, M., Uchiyama, Y., Benito, M., Noda, T., & Kido, Y. (2014). Pancreatic b-Cell failure mediated by mTORC1 hyperactivity and autophagic impairment. *Diabetes*, *63*(9), 2996–3008. <https://doi.org/10.2337/db13-0970>

Bashari, W. A., Riddel, N. E., & Oyibo, S. O. (2020). Correction to: A Man With Whipple's Triad Secondary to a Malignant Insulinoma. *Journal of Medical Cases*, *11*(1), 34–34. <https://doi.org/10.14740/jmc2175wc1>

Batlle, E., & Massagué, J. (2019). Transforming Growth Factor- β Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity*, *50*(4), 924–940. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.024>

Berstein, L. M., Iyevleva, A. G., Mukhina, M. S., Vasilyev, D. A., & Poroshina, T. E. (2016). Features of omental adipose tissue in endometrial cancer patients with 'standard' or 'metabolically healthy' obesity: associations with tumor process characteristics. *SpringerPlus*, *5*(1). <https://doi.org/10.1186/s40064-016-3582-6>

Blandino-Rosano, M., Barbaresso, R., Jimenez-Palomares, M., Bozadjieva, N., Werneck-de-Castro, J. P., Hatanaka, M., Mirmira, R. G., Sonenberg, N., Liu, M., Rüegg, M. A., Hall, M. N., & Bernal-Mizrachi, E. (2017). Loss of mTORC1 signalling impairs β -cell homeostasis and insulin processing. *Nature Communications*, *8*(May), 1–15. <https://doi.org/10.1038/ncomms16014>

Boone, C., Mourot, J., Gregoire, F., & Remacle, C. (2000). The adipose conversion process: Regulation by extracellular and intracellular factors. *Reproduction Nutrition Development*, *40*(4), 325–358. <https://doi.org/10.1051/rnd:2000103>

Brian T. Kasper, Sujeethraj Koppolu, and L. K. M. (2014). Insights into MiRNA Regulation of the Human Glycome. *Biochem Biophys Res Commun.*, 4(445), 774–779. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.01.034>.

Bruning, U., Cerone, L., Neufeld, Z., Fitzpatrick, S. F., Cheong, A., Scholz, C. C., Simpson, D. A., Leonard, M. O., Tambuwala, M. M., Cummins, E. P., & Taylor, C. T. (2011). MicroRNA-155 Promotes Resolution of Hypoxia-Inducible Factor 1 Activity during Prolonged Hypoxia. *Molecular and Cellular Biology*, 31(19), 4087–4096. <https://doi.org/10.1128/mcb.01276-10>

Campbell, J. E., & Newgard, C. B. (2021). Mechanisms controlling pancreatic islet cell function in insulin secretion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 22(2), 142–158. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00317-7>

CANNON, B. (2004). Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiological Reviews*, 84(1), 277–359. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2003>

Carpentier, A. C., Blondin, D. P., Virtanen, K. A., Richard, D., Haman, F., & Turcotte, É. E. (2018). Brown adipose tissue energy metabolism in humans. *Frontiers in Endocrinology*, 9(AUG), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00447>

Chen, L., Chen, R., Wang, H., & Liang, F. (2015). Mechanisms Linking Inflammation to Insulin Resistance. *International Journal of Endocrinology*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/508409>

Chistiakov, D. A., Sobenin, I. A., Orekhov, A. N., & Bobryshev, Y. v. (2015). Human miR-221/222 in physiological and atherosclerotic vascular remodeling. *BioMed Research International*, 2015(354517), 1–18. <https://doi.org/10.1155/2015/354517>

Chistiakov, D. A., Sobenin, I. A., Revin, V. v., Orekhov, A. N., & Bobryshev, Y. v. (2014). Mitochondrial aging and age-related dysfunction of mitochondria. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/238463>

Choe, S. S., Huh, J. Y., Hwang, I. J., Kim, J. I., & Kim, J. B. (2016). *Adipose Tissue Remodeling : its Role in energy Metabolism and Metabolic Disorders*. 7(April), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00030>

Chu, D. T., & Gawronska-Kozak, B. (2017). Brown and brite adipocytes: Same function, but different origin and response. *Biochimie*, 138, 102–105. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.04.017>

Cinti, S. (2018). Pink Adipocytes. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 29(9), 651–666. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2018.05.007>

Colditz, G. A., & Lindsay, L. (2018). Obesity and cancer: Evidence, impact, and future directions. *Clinical Chemistry*, 64(1), 154–162. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2017.277376>

Condeelis, J., & Pollard, J. W. (2006). Macrophages: Obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell*, 124(2), 263–266. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.007>

Corrêa, L. H., Corrêa, R., Farinasso, C. M., Pimentel, L., Dourado, D. S. A., & Magalhães, K. G. (2017). *Adipocytes and Macrophages interplay in the Orchestration of Tumor Microenvironment : New implications in Cancer Progression*. 8(September), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01129>

Coura, M. de M. A., Barbosa, E. A., Brand, G. D., Bloch, C., & de Sousa, J. B. (2021). Identification of differential N-glycan compositions in the serum and tissue of colon cancer patients by mass spectrometry. *Biology*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/biology10040343>

Cypess, A. M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A. B., Kuo, F. C., Palmer, E. L., Tseng, Y. H., Doria, A., Kolodny, G. M., & Ronald Kahn, C. (2009). Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *Obstetrical and Gynecological Survey*, 64(8), 519–520. <https://doi.org/10.1097/OGX.0b013e3181ac8aa2>

Dana Prídavková, Matej Samoš, Roman Kyčina, Katarína Adamicová, Michal Kalman, M. B., & Mokáň, M. (2020). Insulinoma presenting with postprandial hypoglycemia and a low body mass index: A case report. *World J Clin Cases*, 18(8), 4169–4176. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v8.i18.4169>

Da Silva Xavier, G. (2018). The Cells of the Islets of Langerhans. *Journal of Clinical Medicine*, 7(3), 54. <https://doi.org/10.3390/jcm7030054>

De la Cruz López, K. G., Toledo Guzmán, M. E., Sánchez, E. O., & García Carrancá, A. (2019). mTORC1 as a Regulator of Mitochondrial Functions and a Therapeutic Target in Cancer. *Frontiers in Oncology*, 9(December), 1–22. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01373>

Dirat, B., Bochet, L., Dabek, M., Daviaud, D., Dauvillier, S., Majed, B., Wang, Y. Y., Meulle, A., Salles, B., le Gonidec, S., Garrido, I., Escourrou, G., Valet, P., & Muller, C. (2011). Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. *Cancer Research*, 71(7), 2455–2465. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3323>

Eguchi, K., Manabe, I., Oishi-Tanaka, Y., Ohsugi, M., Kono, N., Ogata, F., Yagi, N., Ohto, U., Kimoto, M., Miyake, K., Tobe, K., Arai, H., Kadowaki, T., & Nagai, R. (2012). Saturated fatty acid and TLR signaling link β cell dysfunction and islet inflammation. *Cell Metabolism*, 15(4), 518–533. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.01.023>

Emde, A., & Hornstein, E. (2014). miRNAs at the interface of cellular stress and disease. *The EMBO Journal*, 33(13), 1428–1437. <https://doi.org/10.15252/emj.201488142>

Eriguchi, N., Aoyagi, S., Hara, M., Imayama, H., Okuda, K., Hashino, K., Kanazawa, N., Tamae, T., Fukuda, S., & Jimi, A. (2000). Insulinoma occurring in association with fatty replacement of unknown etiology in the pancreas: Report of a case. *Surgery Today*, 30(10), 937–941. <https://doi.org/10.1007/s005950070050>

Feng, Y. H. (2015). The association between obesity and gynecological cancer. *Gynecology and Minimally Invasive Therapy*, 4(4), 102–105. <https://doi.org/10.1016/j.gmit.2015.03.003>

Ferranti, S., & Mozaffarian, D. (2008). The perfect storm: Obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences. *Clinical Chemistry*, 54(6), 945–955. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2007.100156>

Forbes, J. M., & Cooper, M. E. (2013). Mechanisms of diabetic complications. *Physiological Reviews*, 93(1), 137–188. <https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2011>

Fournié, J. J., & Poupot, M. (2018). The pro-tumorigenic IL-33 involved in antitumor immunity: A yin and yang cytokine. *Frontiers in Immunology*, 9(OCT), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02506>

Frayn, K. N., Karpe, F., Fielding, B. A., Macdonald, I. A., & Coppack, S. W. (2003). Integrative physiology of human adipose tissue. *International Journal of Obesity*, 27(8), 875–888. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0802326>

Frühbeck, G., Catalán, V., Rodríguez, A., Ramírez, B., Portincasa, P., & Gómez-ambrosi, J. (2017). Normalization of adiponectin concentrations by leptin replacement in ob/ob mice is accompanied by reductions in systemic oxidative stress and inflammation. *April*, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02848-0>

Gençoğlu, H., Şahin, K., & Jones, P. M. (2019). Determining the insulin secretion potential for certain specific G-protein coupled receptors in min6 pancreatic beta cells. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 49(1), 403–411. <https://doi.org/10.3906/sag-1712-147>

Gnad, T., Scheibler, S., Kugelgen, I. von, Scheele, C., Kilic, A., Glode, A., Hoffmann, L. S., Reverte-Salisa, L., Horn, P., Mutlu, S., El-Tayeb, A., Kranz, M., Deuther-Conrad, W., Brust, P., Lidell, M. E., Betz, M. J., Enerback, S., Schrader, J., Yegutkin, G. G., ... Pfeifer, A. (2014). Adenosine activates brown adipose tissue and recruits beige adipocytes via A2A receptors. *Nature*, *516*(7531), 395–399. <https://doi.org/10.1038/nature13816>

Grivennikov, S. I., & Karin, M. (2010). Inflammation and oncogenesis: a vicious connection. *Current Opinion in Genetics and Development*, *20*(1), 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2009.11.004>

Grozinsky-Glasberg, S., Mazeh, H., & Gross, D. J. (2015). Clinical features of pancreatic neuroendocrine tumors. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences*, *22*(8), 578–585. <https://doi.org/10.1002/jhbp.226>

Gupta, S. C., Hevia, D., Patchva, S., Park, B., Koh, W., & Aggarwal, B. B. (2012). Upsides and downsides of reactive oxygen species for Cancer: The roles of reactive oxygen species in tumorigenesis, prevention, and therapy. *Antioxidants and Redox Signaling*, *16*(11), 1295–1322. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4414>

Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *15*(8), 509–524. <https://doi.org/10.1038/nrm3838>

Haas, R. H. (2019). Mitochondrial dysfunction in aging and diseases of aging. *Biology*, *8*(2), 1–5. <https://doi.org/10.3390/biology8020048>

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, *144*(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

Harms, M., & Seale, P. (2013). Brown and beige fat: Development, function and therapeutic potential. *Nature Medicine*, *19*(10), 1252–1263. <https://doi.org/10.1038/nm.3361>

Heckmann, B. L., Yang, X., Zhang, X., & Liu, J. (2013). The autophagic inhibitor 3-methyladenine potently stimulates PKA-dependent lipolysis in adipocytes. *British Journal of Pharmacology*, *168*(1), 163–171. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02110.x>

Hotamisligil, G. S. (2017). Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. *Nature*, *542*(7640), 177–185. <https://doi.org/10.1038/nature21363>

Hotamisligil, G. S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Insight Review - Nature*, *444*(14), 8.

Hursting, S. D., & Berger, N. A. (2010). Energy balance, host-related factors, and cancer progression. *Journal of Clinical Oncology*, 28(26), 4058–4065. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.27.9935>

Ikeda, K., Maretich, P., & Kajimura, S. (2018). The Common and Distinct Features of Brown and Beige Adipocytes. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 29(3), 191–200. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2018.01.001>

Iyengar, N. M., Gucalp, A., Dannenberg, A. J., & Hudis, C. A. (2016). Obesity and cancer mechanisms: Tumor microenvironment and inflammation. *Journal of Clinical Oncology*, 34(35), 4270–4276. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.67.4283>

Jeong Kim, Y., Jin Hwang, S., Chan Bae, Y., & Sup Jung, J. (2009). MiR-21 regulates adipogenic differentiation through the modulation of TGF- β signaling in mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue. *Stem Cells*, 27(12), 3093–3102. <https://doi.org/10.1002/stem.235>

Ji, W., Sun, B., & Su, C. (2017). Targeting MicroRNAs in Cancer Gene Therapy. *Genes (Basel)*, 8(1), 1–15. <https://doi.org/10.3390/genes8010021>

Jivraj, S. (2016). Obesity. *Antenatal Disorders for the MRCOG and Beyond*, 135–138. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107585799.013>

Jo, J., Choi, M. Y., & Koh, D. S. (2009). Beneficial effects of intercellular interactions between pancreatic islet cells in blood glucose regulation. *Journal of Theoretical Biology*, 257(2), 312–319. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2008.12.005>

Kaneko, N., Kurata, M., Yamamoto, T., Morikawa, S., & Masumoto, J. (2019). The role of interleukin-1 in general pathology. *Inflammation and Regeneration*, 39(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s41232-019-0101-5>

Karbiener, M., & Scheideler, M. (2014). MicroRNA functions in brite/brown fat - Novel perspectives towards anti-obesity strategies. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 11(19), 101–105. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2014.09.005>

Keaver, L., Webber, L., Dee, A., Shiely, F., Marsh, T., Balanda, K., & Perry, I. (2013). Application of the UK foresight obesity model in Ireland: The health and economic consequences of projected obesity trends in Ireland. *PLoS ONE*, 8(11), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079827>

Kelley, E. F., Snyder, E. M., & Johnson, B. D. (2018). Influence of Beta-1 Adrenergic Receptor Genotype on Cardiovascular Response to Exercise in Healthy Subjects. *Cardiology Research*, 9(6), 343–349. <https://doi.org/10.14740/cr785>

Kershaw, E. E., & Flier, J. S. (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(6), 2548–2556. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-0395>

Kristin M. Niemana, Iris L. Romeroa, Bennett Van Houtenb, and Ernst Lengyela. (2013). Adipose tissue and adipocytes supports tumorigenesis and metastasis. *Biochim Biophys Acta*, 10(1831), 1533–1541. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2013.02.010>.Adipose

Kumari, S., Badana, A. K., Murali Mohan, G., Shailender, G., & Malla, R. R. (2018). Reactive Oxygen Species: A Key Constituent in Cancer Survival. *Biomarker Insights*, 13. <https://doi.org/10.1177/1177271918755391>

Larsson, S. C., & Wolk, A. (2007). Overweight, obesity and risk of liver cancer: A meta-analysis of cohort studies. *British Journal of Cancer*, 97(7), 1005–1008. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603932>

Lavalette, C., Cénéé, S., Rebillard, X., Lamy, P.-J., Trétarre, B., & Menegaux, F. (2018). Abdominal obesity and prostate cancer risk: epidemiological evidence from the EPICAP study. *Revue d'Épidémiologie et de Santé Publique*, 66(77), S248. <https://doi.org/10.1016/j.respe.2018.05.040>

Lee, M.-W., Lee, M., & Oh, K.-J. (2019). Adipose Tissue-Derived Signatures for Obesity and Type 2 Diabetes: Adipokines, Batokines and MicroRNAs. In *Journal of Clinical Medicine* (Vol. 8, Issue 6). <https://doi.org/10.3390/jcm8060854>

Lengyel, E., Makowski, L., DiGiovanni, J., & Kolonin, M. G. (2018). Cancer as a Matter of Fat: The Crosstalk between Adipose Tissue and Tumors. *Trends in Cancer*, 4(5), 374–384. <https://doi.org/10.1016/j.trean.2018.03.004>

Leze, E., Alves-Pereira, J. L., Colli, S., Cavalcante, F. S., José Sampaio, F., & da Fonte Ramos, C. (2012). Leptin regulates proliferation and apoptosis in human prostate. *The Scientific World Journal*, 2012. <https://doi.org/10.1100/2012/842301>

Li, C., Xu, M. M., Wang, K., Adler, A. J., Vella, A. T., & Zhou, B. (2018). Macrophage polarization and meta-inflammation. *Translational Research*, 191, 29–44. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2017.10.004>

Li, L., Yuan, L., Luo, J., Gao, J., Guo, J., & Xie, X. (2013). MiR-34a inhibits proliferation and migration of breast cancer through down-regulation of Bcl-2 and SIRT1. *Clinical and Experimental Medicine*, 13(2), 109–117. <https://doi.org/10.1007/s10238-012-0186-5>

Liesa, M., & Shirihai, O. S. (2013). Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell Metabolism*, 17(4), 491–506. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.03.002>

Liu, T., Liu, P. Y., & Marshall, G. M. (2009). The critical role of the class III histone deacetylase SIRT1 in cancer. *Cancer Research*, 69(5), 1702–1705. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3365>

Liu, P. H., Wu, K., Ng, K., Zauber, A. G., Nguyen, L. H., Song, M., He, X., Fuchs, C. S., Ogino, S., Willett, W. C., Chan, A. T., Giovannucci, E. L., & Cao, Y. (2019). Association of Obesity with Risk of Early-Onset Colorectal Cancer among Women. *JAMA Oncology*, 5(1), 37–44. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.4280>

Lu, J., & Clark, A. G. (2012). Impact of microRNA regulation on variation in human gene expression. *Genome Research*, 22(7), 1243–1254. <https://doi.org/10.1101/gr.132514.111.22>

MacFarlane, L.-A., & R. Murphy, P. (2010). MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Current Genomics*, 11(7), 537–561. <https://doi.org/10.2174/138920210793175895>

Maeda, S., Kamata, H., Luo, J. L., Leffert, H., & Karin, M. (2005). IKK β couples hepatocyte death to cytokine-driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis. *Cell*, 121(7), 977–990. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.04.014>

Matej, A., Bujwid, H., & Wroński, J. (2016). Glycemic control in patients with insulinoma. *Hormones*, 15(4), 489–499. <https://doi.org/10.14310/horm.2002.1706>

Makki, K., Froguel, P., & Wolowczuk, I. (2013). Adipose Tissue in Obesity-Related Inflammation and Insulin Resistance: Cells, Cytokines, and Chemokines. *ISRN Inflammation*, 2013, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2013/139239>

Mancuso, P., & Bouchard, B. (2019). The impact of aging on adipose function and adipokine synthesis. *Frontiers in Endocrinology*, 10(MAR), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00137>

Mcallister, E. J., Dhurandhar, N. v, Keith, S. W., Aronne, L. J., Baskin, M., Benca, R. M., Biggio, J., Boggiano, M. M., C, J., Elobeid, M., Fontaine, K. R., Gluckman, P., Hanlon, E. C., Pietrobelli, A., Redden, D. T., Ruden, D. M., Waterland, R. A., Wright, S. M., & Allison, D. B. (2010). Ten Putative Contributors to the Obesity

Epidemic Emily. *Critical Review*, 49(10), 868–913.
<https://doi.org/10.1080/10408390903372599>.Ten

McGregor, R. A., & Choi, M. S. (2011). microRNAs in the regulation of adipogenesis and obesity. *Current Molecular Medicine*, 11(4), 304–316.
<https://doi.org/10.2174/156652411795677990>

Miroslava Cedikova, 1, 2 Michaela Kripnerová, 3 Jana Dvorakova, 4 Pavel Pitule, 2, 5, & Martina Grundmanova, 1, 2 Vaclav Babuska, 6 Dana Mullerova, 4 and Jitka Kuncova¹. (2016). Mitochondria in White, Brown, and Beige Adipocytes. *Stem Cells International*, 2016, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2016/6067349>

Miyazaki, S., Tashiro, F., Tsuchiya, T., Sasaki, K., & Miyazaki, J. ichi. (2021). Establishment of a long-term stable β -cell line and its application to analyze the effect of Gcg expression on insulin secretion. *Scientific Reports*, 11(1), 1–10.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-79992-7>

Moede, T., Leibiger, I. B., & Berggren, P. O. (2020). Alpha cell regulation of beta cell function. *Diabetologia*, 63(10), 2064–2075. <https://doi.org/10.1007/s00125-020-05196-3>

Monteiro, R., & Azevedo, I. (2010). Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome. *Mediators of Inflammation*, 2010(Atp Iii).
<https://doi.org/10.1155/2010/289645>

Moreno-Fernandez, M. E., Sharma, V., Stankiewicz, T. E., Oates, J. R., Doll, J. R., Damen, M. S. M. A., Almanan, M. A. T. A., Chougnet, C. A., Hildeman, D. A., & Divanovic, S. (2021). Aging mitigates the severity of obesity-associated metabolic sequelae in a gender independent manner. *Nutrition and Diabetes*, 11(1).
<https://doi.org/10.1038/s41387-021-00157-0>

Mori, M. A., Thomou, T., Boucher, J., Lee, K. Y., Lallukka, S., Kim, J. K., Torriani, M., Yki-Järvinen, H., Grinspoon, S. K., Cypess, A. M., & Kahn, C. R. (2014). Altered miRNA processing disrupts brown/white adipocyte determination and associates with lipodystrophy. *Journal of Clinical Investigation*, 124(8), 3339–3351.
<https://doi.org/10.1172/JCI73468>

Mori, M., Nakagami, H., Rodriguez-Araujo, G., Nimura, K., & Kaneda, Y. (2012). Essential role for miR-196a in brown adipogenesis of white fat progenitor cells. *PLoS Biology*, 10(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001314>

Muntané, J., & de la Mata, M. (2010). Nitric oxide and cancer. *World Journal of Hepatology*, 2(9), 337–344. <https://doi.org/10.4254/wjh.v2.i9.337>

Nardy, A. F. F. R., Freire-de-Lima, L., Freire-de-Lima, C. G., & Morrot, A. (2016). The sweet side of immune evasion: Role of Glycans in the Mechanisms of Cancer Progression. *Frontiers in Oncology*, 6(MAR), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fonc.2016.00054>

Nuttall, F. Q. (2015). Body mass index: Obesity, BMI, and health: A critical review. *Nutrition Today*, 50(3), 117–128. <https://doi.org/10.1097/NT.0000000000000092>

Öberg, K., & Eriksson, B. (2005). Endocrine tumours of the pancreas. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*, 19(5 SPEC. ISS.), 753–781. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2005.06.002>

O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Frontiers in Endocrinology*, 9(402), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>

Ogawa, R., Tanaka, C., Sato, M., Nagasaki, H., Sugimura, K., Okumura, K., Nakagawa, Y., & Aoki, N. (2010). Adipocyte-derived microvesicles contain RNA that is transported into macrophages and might be secreted into blood circulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 398(4), 723–729. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.07.008>

Okabayashi, T., Shima, Y., Sumiyoshi, T., Kozuki, A., Ito, S., Ogawa, Y., Kobayashi, M., & Hanazaki, K. (2013). Diagnosis and management of insulinoma. *World Journal of Gastroenterology*, 19(6), 829–837. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i6.829>

Olsen, J. M., Sato, M., Dallner, O. S., Sandström, A. L., Pisani, D. F., Chambard, J. C., Amri, E. Z., Hutchinson, D. S., & Bengtsson, T. (2014). Glucose uptake in brown fat cells is dependent on mTOR complex 2-promoted GLUT1 translocation. *Journal of Cell Biology*, 207(3), 365–374. <https://doi.org/10.1083/jcb.201403080>

Ortega-Molina, A., Efeyan, A., Lopez-Guadamillas, E., Muñoz-Martin, M., Gómez-López, G., Cañamero, M., Mulero, F., Pastor, J., Martinez, S., Romanos, E., Mar Gonzalez-Barroso, M., Rial, E., Valverde, A. M., Bischoff, J. R., & Serrano, M. (2012). Pten positively regulates brown adipose function, energy expenditure, and longevity. *Cell Metabolism*, 15(3), 382–394. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.02.001>

Ouchi, N., Parker, J. L., Lugus, J. J., & Walsh, K. (2011). Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature Reviews Immunology*, *11*(2), 85–97. <https://doi.org/10.1038/nri2921>

Pan, Y. I., Ye, C., Tian, Q., Yan, S., & Zeng, X. (2018). *miR-145 suppresses the proliferation, invasion and migration of NSCLC cells by regulating the BAX / BCL-2 ratio and the caspase-3 cascade*. 4337–4343. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.7863>

Park, J., Morley, T. S., Kim, M., Clegg, D. J., & Scherer, P. E. (2014). Obesity and cancer - Mechanisms underlying tumour progression and recurrence. *Nature Reviews Endocrinology*, *10*(8), 455–465. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2014.94>

Peixoto, A., Relvas-Santos, M., Azevedo, R., Lara Santos, L., & Ferreira, J. A. (2019). Protein glycosylation and tumor microenvironment alterations driving cancer hallmarks. *Frontiers in Oncology*, *9*(MAY), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00380>

Peng, Y., & Croce, C. M. (2016). The role of microRNAs in human cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *1*(November 2015). <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2015.4>

Peng, J., Wu, Y., Deng, Z., Zhou, Y., Song, T., Yang, Y., Zhang, X., Xu, T., Xia, M., Cai, A., Liu, Z., & Peng, J. (2017). MiR-377 promotes white adipose tissue inflammation and decreases insulin sensitivity in obesity via suppression of sirtuin-1 (SIRT1). *Oncotarget*, *8*(41), 70550–70563. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19742>

Peng, Y., Yu, S., Li, H., Xiang, H., Peng, J., & Jiang, S. (2014). MicroRNAs: Emerging roles in adipogenesis and obesity. *Cellular Signalling*, *26*(9), 1888–1896. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.05.006>

Peter, L., Jung, S. M., & Guertin, D. A. (2017). The Complex Roles of mTOR in Adipocytes and Beyond. *Trends Endocrinol Metab*, *28*(5), 319–339. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.01.004>.

Pergola, G., & Silvestris, F. (2013). Obesity as a major risk factor for cancer. *Journal of Obesity*, *2013*(291546), 1–11. <https://doi.org/10.1155/2013/291546>

Phillips, M. J., & Voeltz, G. K. (2016). Structure and function of ER membrane contact sites with other organelles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *17*(2), 69–82. <https://doi.org/10.1038/nrm.2015.8>

Poy, M. N., Hausser, J., Trajkovski, M., Braun, M., Collins, S., Rorsman, P., Zavolan, M., & Stoffel, M. (2009). miR-375 maintains normal pancreatic alpha- and

beta-cell mass. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(14), 5813–5818. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810550106>

Quail, D. F., & Dannenberg, A. J. (2019). The obese adipose tissue microenvironment in cancer development and progression. In *Nature Reviews Endocrinology* (Vol. 15, Issue 3, pp. 139–154). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41574-018-0126-x>

Rehman, J., Considine, R. v., Bovenkerk, J. E., Li, J., Slavens, C. A., Jones, R. M., & March, K. L. (2003). Obesity is associated with increased levels of circulating hepatocyte growth factor. *Journal of the American College of Cardiology*, 41(8), 1408–1413. [https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(03\)00231-6](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(03)00231-6)

Reis, F. C. G., Branquinho, J. L. O., Brandão, B. B., Guerra, B. A., Silva, I. D., Frontini, A., Thomou, T., Sartini, L., Cinti, S., Ronald Kahn, C., Festuccia, W. T., Kowaltowski, A. J., & Mori, M. A. (2016). Fat-specific Dicer deficiency accelerates aging and mitigates several effects of dietary restriction in mice. *Aging*, 8(6), 1201–1222. <https://doi.org/10.18632/aging.100970>

Rodríguez, A., Ezquerro, S., Méndez-Giménez, L., Becerril, S., & Frühbeck, G. (2015). Revisiting the adipocyte: A model for integration of cytokine signaling in the regulation of energy metabolism. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 309(8), E691–E714. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00297.2015>

Rosario, F. J., Gupta, M. B., Myatt, L., Powell, T. L., Glenn, J. P., Cox, L., & Jansson, T. (2019). Mechanistic Target of Rapamycin Complex 1 Promotes the Expression of Genes Encoding Electron Transport Chain Proteins and Stimulates Oxidative Phosphorylation in Primary Human Trophoblast Cells by Regulating Mitochondrial Biogenesis. *Scientific Reports*, 9(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36265-8>

Saito, M., Okamatsu-Ogura, Y., Matsushita, M., Watanabe, K., Yoneshiro, T., Nio-Kobayashi, J., Iwanaga, T., Miyagawa, M., Kameya, T., Nakada, K., Kawai, Y., & Tsujisaki, M. (2009). High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: Effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes*, 58(7), 1526–1531. <https://doi.org/10.2337/db09-0530>

Shao, C., Bai, L. P., Qi, Z. Y., Hui, G. Z., & Wang, Z. (2014). Overweight, obesity and meningioma risk: A meta-analysis. *PLoS ONE*, 9(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090167>

Schreiber, K. H., Arriola Apelo, S. I., Yu, D., Brinkman, J. A., Velarde, M. C., Syed, F. A., Liao, C. Y., Baar, E. L., Carbajal, K. A., Sherman, D. S., Ortiz, D., Brunauer, R., Yang, S. E., Tzannis, S. T., Kennedy, B. K., & Lamming, D. W. (2019). A novel rapamycin analog is highly selective for mTORC1 in vivo. *Nature Communications*, *10*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11174-0>

Schulz, T. J., & Tseng, Y.-H. (2013). Brown adipose tissue: development, metabolism and beyond. *Biochemical Journal*, *23*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1042/BJ20130457>.Brown

Shoelson, S. E., Lee, J., & Goldfine, A. B. (2006). Review series Inflammation and insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, *116*(7), 1793–1801. <https://doi.org/10.1172/JCI29069>.and

Shou, J., Chen, P. J., & Xiao, W. H. (2020). Mechanism of increased risk of insulin resistance in aging skeletal muscle. *Diabetology and Metabolic Syndrome*, *12*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13098-020-0523-x>

Sica, A., Larghi, P., Mancino, A., Rubino, L., Porta, C., Totaro, M. G., Rimoldi, M., Biswas, S. K., Allavena, P., & Mantovani, A. (2008). Macrophage polarization in tumour progression. *Seminars in Cancer Biology*, *18*(5), 349–355. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2008.03.004>

Sies, H., & Jones, D. P. (2020). Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *21*(7), 363–383. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>

Smith-Vikos, T., & Slack, F. J. (2012). MicroRNAs and their roles in aging. *Journal of Cell Science*, *125*(1), 7–17. <https://doi.org/10.1242/jcs.099200>

Souza, C. T., Araujo, E. P., Bordin, S., Ashimine, R., Zollner, R. L., Boschero, A. C., Saad, M. J. A., & Velloso, L. A. (2005). Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology*, *146*(10), 4192–4199. <https://doi.org/10.1210/en.2004-1520>

Stępień, M., Stępień, A., Wlazeł, R. N., Paradowski, M., Banach, M., & Rysz, J. (2014). Obesity indices and inflammatory markers in obese non-diabetic normo- and hypertensive patients: A comparative pilot study. *Lipids in Health and Disease*, *13*(1), 10–13. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-13-29>

Stone, T. W., McPherson, M., & Gail Darlington, L. (2018). Obesity and Cancer: Existing and New Hypotheses for a Causal Connection. *EBioMedicine*, *30*, 14–28. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.02.022>

Svoronos, A. A., Engelman, D. M., & Slack, F. J. (2016). OncomiR or Tumor Suppressor? The Duplicity of MicroRNAs in Cancer. *Cancer Research*, 76(13), 3666–3670. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0359>

Tan, W., Liu, B., Qu, S., Liang, G., Luo, W., & Gong, C. (2018). MicroRNAs and cancer: Key paradigms in molecular therapy (Review). *Oncology Letters*, 15(3), 2735–2742. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7638>

Taneera, J., Jin, Z., Jin, Y., Muhammed, S. J., Zhang, E., Lang, S., Salehi, A., Korsgren, O., Renström, E., Groop, L., & Birnir, B. (2012). γ -Aminobutyric acid (GABA) signalling in human pancreatic islets is altered in type 2 diabetes. *Diabetologia*, 55(7), 1985–1994. <https://doi.org/10.1007/s00125-012-2548-7>

Taniguchi, N., & Kizuka, Y. (2015). Glycans and cancer: Role of N-Glycans in cancer biomarker, progression and metastasis, and therapeutics. In *Advances in Cancer Research* (1st ed., Vol. 126). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2014.11.001>

Tata, V. (2014). Age-related impairment of pancreatic beta-cell function: Pathophysiological and cellular mechanisms. *Frontiers in Endocrinology*, 5(SEP), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00138>

Thomou, T., Mori, M. A., Dreyfuss, J. M., Konishi, M., Sakaguchi, M., Wolfrum, C., Rao, T. N., Winnay, J. N., Garcia-Martin, R., Grinspoon, S. K., Gorden, P., & Kahn, C. R. (2017). Adipose-derived circulating miRNAs regulate gene expression in other tissues. *Nature*, 542(7642), 450–455. <https://doi.org/10.1038/nature21365>

Treiber, T., Treiber, N., & Meister, G. (2019). Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(1), 5–20. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0059-1>

Turati, F., Tramacere, I., la Vecchia, C., & Negri, E. (2013). A meta-analysis of body mass index and esophageal and gastric cardia adenocarcinoma. *Annals of Oncology*, 24(3), 609–617. <https://doi.org/10.1093/annonc/mds244>

Tucker, O. N., Crotty, P. L., & Conlon, K. C. (2006). The management of insulinoma. *British Journal of Surgery*, 93(3), 264–275. <https://doi.org/10.1002/bjs.5280>

Turley, S. J., Cremasco, V., & Astarita, J. L. (2015). Immunological hallmarks of stromal cells in the tumour microenvironment. *Nature Reviews Immunology*, 15(11), 669–682. <https://doi.org/10.1038/nri3902>

Uddin, S., Hussain, A. R., Siraj, A. K., Khan, O. S., Bavi, P. P., & Al-kuraya, K. S. (2011). Role of leptin and its receptors in the pathogenesis of thyroid cancer. *Int J Clin Exp Pathol*, 4(7), 637–643.

Villarroya, F., Cereijo, R., Villarroya, J., & Giralt, M. (2017). Brown adipose tissue as a secretory organ. *Nature Reviews Endocrinology*, 13(1), 26–35. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.136>

Wada, Y. (2013). Vacuoles in mammals: a subcellular structure indispensable for early embryogenesis. *Bioarchitecture*, 3(1), 13–19. <https://doi.org/10.4161/bioa.24126>

Wang, Q., Zhang, M., Xu, M., Gu, W., Xi, Y., Qi, L., Li, B., & Wang, W. (2015). Brown adipose tissue activation is inversely related to central obesity and metabolic parameters in adult human. *PLoS ONE*, 10(4), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123795>

Webster, J. D., & Vucic, D. (2020). The Balance of TNF Mediated Pathways Regulates Inflammatory Cell Death Signaling in Healthy and Diseased Tissues. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8(May), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00365>

Weisberg, S. P., Mccann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., & Ferrante, A. W. (2003). *Obesity is associated with macrophage accumulation*. 112(12). <https://doi.org/10.1172/JCI200319246>. Introduction

Wieczór, R., Wieczór, A. M., Gadomska, G., Stankowska, K., Fabisiak, J., Suppan, K., Pulkowski, G., Budzyński, J., & Rość, D. (2016). Overweight and obesity versus concentrations of VEGF-A, sVEGFR-1, and sVEGFR-2 in plasma of patients with lower limb chronic ischemia. *Journal of Zhejiang University: Science B*, 17(11), 842–849. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1600009>

Williams, M. D., & Mitchell, G. M. (2012). MicroRNAs in insulin resistance and obesity. *Experimental Diabetes Research*, 2012(484696). <https://doi.org/10.1155/2012/484696>

Wu, Y., Song, Y., Xiong, Y., Wang, X., Xu, K., Han, B., Bai, Y., Li, L., Zhang, Y., & Zhou, L. (2017). MicroRNA-21 (Mir-21) Promotes Cell Growth and Invasion by Repressing Tumor Suppressor PTEN in Colorectal Cancer. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 43(3), 945–958. <https://doi.org/10.1159/000481648>

Yang, P., Zhou, Y., Chen, B., Wan, H. W., Jia, G. Q., Bai, H. L., & Wu, X. T. (2009). Overweight, obesity and gastric cancer risk: Results from a meta-analysis of

cohort studies. *European Journal of Cancer*, 45(16), 2867–2873. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2009.04.019>

Yorimitsu, T., Nair, U., Yang, Z., & Klionsky, D. J. (2006). Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, 281(40), 30299–30304. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607007200>

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, & Friedman JM. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372(DECEMBER), 425–432. <https://www.nature.com/articles/372425a0.pdf>

Zhao, Z. G., Guo, X. G., Ba, C. X., Wang, W., Yang, Y. Y., Wang, J., & Cao, H. Y. (2012). Overweight, obesity and thyroid cancer risk: A meta-analysis of cohort studies. *Journal of International Medical Research*, 40(6), 2041–2050. <https://doi.org/10.1177/030006051204000601>

Zhuang, G., Meng, C., Guo, X., Cheruku, P. S., Shi, L., Xu, H., Li, H., Wang, G., Evans, A. R., Safe, S., Wu, C., & Zhou, B. (2012). A novel regulator of macrophage activation: MiR-223 in obesity-associated adipose tissue inflammation. *Circulation*, 125(23), 2892–2903. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.087817>

Zimmerman, M. A., Huang, Q., Li, F., Liu, X., & Li, C.-Y. (2013). Cell death-stimulated cell proliferation: A tissue regeneration mechanism usurped by tumors during radiotherapy. *Seminars Topics in Radiography Oncology*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.semradonc.2013.05.003>.Cell

Zoico, E., Rubele, S., de Caro, A., Nori, N., Mazzali, G., Fantin, F., Rossi, A., & Zamboni, M. (2019). Brown and beige adipose tissue and aging. *Frontiers in Endocrinology*, 10(JUN), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00368>

Anexos

Publicações durante o período do doutorado.



The Impact of Adipose Tissue-Derived miRNAs in Metabolic Syndrome, Obesity, and Cancer

Gabriella Simões Heyn, Luis Henrique Corrêa and Kelly Grace Magalhães*

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

OPEN ACCESS

Edited by:

Hendrik Lahnert,
University of Lübeck, Germany

Reviewed by:

Juergen Eckel,
German Diabetes Center (DDZ),
Germany

Marc Thibonnier,
AptamR Therapeutics, Inc.,
United States

*Correspondence:

Kelly Grace Magalhães
kellymagalhaes@unb.br

Specialty section:

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

Received: 19 May 2020

Accepted: 18 September 2020




Obesity is a multifactorial and complex condition that is characterized by abnormal and excessive white adipose tissue accumulation, which can lead to the development of metabolic diseases, such as type 2 diabetes mellitus, nonalcoholic fatty liver disease, cardiovascular diseases, and several types of cancer. Obesity is characterized by excessive adipose tissue accumulation and associated with alterations in immunity, displaying a chronic low-grade inflammation profile. Adipose tissue is a dynamic and complex endocrine organ composed not only by adipocytes, but several immunological cells, which can secrete hormones, cytokines and many other factors capable of regulating metabolic homeostasis and several critical biological pathways. Remarkably, adipose tissue is a major source of circulating microRNAs (miRNAs), recently described as a novel form of adipokines. Several adipose tissue-derived miRNAs are deeply associated with adipocytes differentiation and have been identified with an essential role in obesity-associated inflammation, insulin resistance, and tumor microenvironment. During obesity, adipose tissue can completely change the profile of the secreted miRNAs, influencing circulating miRNAs and impacting the development of different pathological conditions, such as obesity, metabolic syndrome, and cancer. In this review, we discuss how miRNAs can act as epigenetic regulators affecting adipogenesis, adipocyte differentiation, lipid metabolism, browning of the white adipose tissue, glucose homeostasis, and insulin resistance, impacting deeply obesity and metabolic diseases. Moreover, we characterize how miRNAs can often act as oncogenic and tumor suppressor molecules, significantly modulating cancer establishment and progression. Furthermore, we highlight in this manuscript how adipose tissue-derived miRNAs can function as important new therapeutic targets.

Keywords: miRNA, adipose tissue, obesity, cancer, metabolic syndrome



Review

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

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

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

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

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



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

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

Review Article



Obesity and Breast Cancer: The Role of Crown-Like Structures in Breast Adipose Tissue in Tumor Progression, Prognosis, and Therapy

Sara Socorro Faria , Luís Henrique Corrêa , Gabriella Simões Heyn ,
 Lívia Pimentel de Sant'Ana , Raquel das Neves Almeida ,
 Kelly Grace Magalhães

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

OPEN ACCESS

Received: May 30, 2019

Accepted: Apr 15, 2020

Correspondence to

Kelly Grace Magalhães

Laboratory of Immunology and Inflammation,
 Department of Cell Biology, University of
 Brasilia, DF, Brasilia 70910-900, Brazil
 E-mail: kellymagalhaes@unb.br

© 2020 Korean Breast Cancer Society
 This is an Open Access article distributed
 under the terms of the Creative Commons
 Attribution Non-Commercial License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)
 which permits unrestricted non-commercial
 use, distribution, and reproduction in any
 medium, provided the original work is properly
 cited.

ORCID iDs

Sara Socorro Faria
<https://orcid.org/0000-0003-2508-8160>
 Luís Henrique Corrêa
<https://orcid.org/0000-0003-2825-0227>
 Gabriella Simões Heyn
<https://orcid.org/0000-0001-7120-1086>
 Lívia Pimentel de Sant'Ana
<https://orcid.org/0000-0003-9448-3227>
 Raquel das Neves Almeida
<https://orcid.org/0000-0003-1829-8143>
 Kelly Grace Magalhães
<https://orcid.org/0000-0003-7435-5272>

ABSTRACT

Obesity is associated with increased risk and aggressiveness of many types of cancer. Women with obesity and breast cancer are more likely to be diagnosed with larger and higher-grade tumors and have higher incidence of metastases than lean individuals. Increasing evidence indicates that obesity includes systemic, chronic low-grade inflammation, and that adipose tissue can act as an important endocrine site, secreting a variety of substances that may regulate inflammation, immune response, and cancer predisposition. Obesity-associated inflammation appears to be initially mediated by macrophage infiltration into adipose tissue. Macrophages can surround damaged or necrotic adipocytes, forming "crown-like" structures (CLS). CLS are increased in breast adipose tissue from breast cancer patients and are more abundant in patients with obesity conditions. Moreover, the CLS index-ratio from individuals with obesity seems to influence breast cancer recurrence rates and survival. In this review, we discuss the most recent cellular and molecular mechanisms involved in CLS establishment in the white adipose tissue of women with obesity and their implications for breast cancer biology. We also explain how CLS influence the tumor microenvironment and affect breast cancer behavior. Targeting breast adipose tissue CLS can be a crucial therapeutic tool in cancer treatment, especially in patients with obesity.

Keywords: Adipocytes; Adipose tissue; Breast neoplasms; Macrophages; Obesity

INTRODUCTION

Overweight and obesity are major risk factors for cancer and chronic diseases such as diabetes, insulin resistance, and cardiovascular disease [1]. These conditions are currently on the rise in low- and middle-income countries. Obesity is characterized by an excessive