

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Laíris Cunha Campos

**ANÁLISE DA FORMAÇÃO DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS, SÍNTESE
DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS E PERFIL DE MACRÓFAGOS
MURINOS EM MODELOS DE INTERAÇÃO COM CÉLULAS
TUMORAIS IN VITRO**

JUIZ DE FORA

2021

2021 PPGCBIO	LAÍRIS CUNHA CAMPOS	ICB/UFJF
-------------------------------	----------------------------	-----------------

LAÍRIS CUNHA CAMPOS

**ANÁLISE DA FORMAÇÃO DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS, SÍNTESE
DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS E PERFIL DE MACRÓFAGOS
MURINOS EM MODELOS DE INTERAÇÃO COM CÉLULAS
TUMORAIS IN VITRO**

Tese de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, para obtenção do Título de Doutora em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias

Heloísa D'Avila da Silva Bizarro

Juiz de Fora
2021

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Campos, Laíris Cunha.

Análise da formação de corpúsculos lipídicos, síntese de mediadores inflamatórios e perfil de macrófagos murinos em modelos de interação com células tumorais in vitro / Laíris Cunha Campos. -- 2021.

116 p.

Orientador: Heloísa D'Avila da Silva Bizarro

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2021.

1. câncer. 2. corpúsculo lipídico. 3. macrófago. 4. vitamina D. 5. PPARg. I. Bizarro, Heloísa D'Avila da Silva, orient. II. Título.

Lairis Cunha Campos

Título: Análise da formação de corpúsculos lipídicos, síntese de mediadores inflamatórios e perfil de macrófagos murinos em modelos de interação com células tumorais in vitro

Tese apresentada ao
Nome do Curso ou
Programa
da Universidade
Federal de Juiz de
Fora como requisito
parcial à obtenção do
título de Doutor em
Ciências Biológicas).
Área de
concentração:
Imunologia e DIP

Aprovada em 22 de dezembro de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Heloisa D' Avila da Silva Bizarro - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Jacy Gameiro

Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Juciane Maria de Andrade Castro

Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Natalia Roberto Roque

Instituto do Cérebro - Rio de Janeiro

Profa. Danielle de Oliveira Nascimento

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Juiz de Fora, 03/01/2022.



Documento assinado eletronicamente por **Jacy Gameiro, Professor(a)**, em 03/01/2022, às 14:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Heloisa D Avila da Silva Bizarro, Professor(a)**, em 03/01/2022, às 14:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Natalia Roberta Roque, Usuário Externo**, em 03/01/2022, às 19:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **DANIELLE DE OLIVEIRA NASCIMENTO, Usuário Externo**, em 04/01/2022, às 13:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Laíris Cunha Campos, Usuário Externo**, em 01/02/2022, às 20:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **0631984** e o código CRC **3EEC178F**.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Fátima e Aristides, meus maiores orientadores da vida; e que sem eles, nada seria possível.

AGRADECIMENTO

Ao término de mais uma etapa, não posso deixar de agradecer àqueles que contribuíram para a concretização deste trabalho.

A Deus agradeço o dom da vida e da resiliência. Foram anos desafiadores, sobretudo pela perda da minha mãe. O Senhor me ofertou forças para continuar, não somente por mim, mas para concretizar o sonho e esforço dos meus pais. Obrigada por todo o suporte na realização deste trabalho!

A Helô eu agradeço os anos de orientação, parceria, suporte e apoio.

Ao Laboratório de Biologia Celular (LBC) por todo o suporte e infraestrutura dada para a realização do trabalho. Sobretudo, gostaria de agradecer aos alunos e ex-alunos do LBC: Gabriel, Daniel, Sabrina, Ana Luíza, Giuliana, Luís Eduardo, Kássia, Polly, Rafaela, Ana Beatriz (Bia) e Laura pela paciência, amizade e auxílio durante o desenvolvimento do trabalho. A Adriana, meu mais sincero agradecimento por todo o apoio, colaboração e amizade ao longo desses anos.

Agradeço a Prof. Dr^a Jacy Gameiro e a Pollyana pela disponibilidade das células utilizadas nesse estudo e, pelo ensinamento ofertado.

A Universidade Federal de Juiz de Fora e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, pela aquisição do conhecimento adquirido ao longo destes anos e, suporte para a concretização da tese.

Agradeço ainda as Agências de Fomento, sobretudo a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Aos familiares pelo carinho e compreensão. E ao meu pai Aristides, por todo o suporte, sobretudo o emocional, mediante a ausência de minha mãe.

Obrigada!

“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu. Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e sonhamos; lembre-se, tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos”.
(Paulo Beleki)

RESUMO

O câncer é uma doença de abrangência global, sendo a segunda causa de morte na população. A lipogênese e a presença de inúmeros corpúsculos lipídicos (CL's) são observações patológicas vistas em neoplasias. CL's são organelas constituídas por lipídeos neutros e envoltas por uma monocamada de fosfolipídeos, e exercem funções como produção de mediadores inflamatórios; seu maior número em tumores está associado com a angiogênese e progressão neoplásica. O objetivo deste estudo foi avaliar a formação de CL's e a síntese de mediadores inflamatórios em linhagens tumorais mamárias e em macrófagos estimulados com meio condicionado de 4T1 e 67NR, além de averiguar o perfil de macrófagos no modelo de interação câncer e célula imune. Linhagens tumorais mamárias metastática (4T1) e não metastática (67NR) foram mantidas em cultura sob condição padrão e; macrófagos (Mø) peritoneais foram retirados de camundongos C57BL/6, recebendo posteriormente os pré-tratamentos com 1µM de GW, 5µM de rosiglitazona e 20nM de Rapamicina. Após 30 minutos os Mø foram estimulados com os meio condicionado das linhagens tumorais mamárias 67NR e 4T1, e acrescidos com o tratamento com GW, rosiglitazona, rapamicina ou 100nM de vitamina D (VD). Dados apontaram na citotoxicidade desencadeada pela VD na linhagem metastática 4T1 nos tempos analisados, além de sua administração reduzir a formação de CL's em macrófagos estimulados. Com relação ao uso do agonista (rosiglitazona) e antagonista (GW9662) do PPAR γ , fora observado um aumento na formação de CL's mediado pelo uso da rosiglitazona, ao passo que a redução dessa organela foi observada e forma significativa, no tratamento com GW9662. Preliminarmente a utilização da rapamicina, inibidor via mTOR, demonstrou reduzir a síntese de CL's nas linhagens tumorais mamárias, e o mesmo fenômeno foi notado em macrófagos estimulados com o sobrenadante das linhagens tumorais em ambos os tempos analisados. Citocinas pró e anti-inflamatórias foram dosadas no sobrenadante de macrófagos tratados com rapamicina, demonstrando que a inibição da biogênese de corpúsculos lipídicos é independente da ativação de NF- κ B, além de demonstrar uma modulação na resposta de Mø estimulados com a linhagem metastática (4T1) é dependente de tempo, uma vez que, a responsividade antitumoral ocorreu no tempo de 48horas. A utilização desses fármacos demonstrou ser efetivo na modulação do metabolismo lipídico, e corroboram para novas estratégias terapêuticas em neoplasias.

Palavras-chave: Câncer. Corpúsculo Lipídico. mTOR. PPAR γ . Vitamina D.

ABSTRACT

Cancer is a disease of global scope, being the second leading cause of death in the population. Lipogenesis and the presence of numerous lipid bodies (LBs) are pathological observations seen in neoplasms. LBs are organelles composed of neutral lipids and surrounded by a phospholipid monolayer, and exert functions such as production of inflammatory mediators; their increased number in tumors is associated with angiogenesis and neoplastic progression. The aim of this study was to evaluate LBs formation and synthesis of inflammatory mediators in mammary tumor cell lines and in macrophages stimulated with 4T1 and 67NR conditioned medium, and to investigate the profile of macrophages in the cancer-immune cell interaction model. Metastatic (4T1) and non-metastatic (67NR) mammary tumor cell lines were maintained in culture under standard condition and; peritoneal macrophages (Mø) were taken from C57BL/6 mice, subsequently receiving pretreatments with 1µM GW, 5µM rosiglitazone and 20nM Rapamycin. After 30 minutes the Mø were stimulated with the conditioned media of the 67NR and 4T1 mammary tumor cell lines, and increased with the treatment with GW, rosiglitazone, rapamycin or 100nM vitamin D (VD). Data pointed out in the cytotoxicity triggered by VD in the metastatic lineage 4T1 in the analyzed times, besides its administration reducing the formation of LBs in stimulated macrophages. Regarding the use of PPARγ agonist (rosiglitazone) and antagonist (GW9662), an increase in LB formation mediated by the use of rosiglitazone was observed, while the reduction of this organelle was significantly observed in the treatment with GW9662. Preliminarily, the use of rapamycin, an mTOR inhibitor, was shown to reduce LB synthesis in mammary tumor cell lines, and the same phenomenon was noted in macrophages stimulated with the supernatant of tumor cell lines in both analyzed times. Pro- and anti-inflammatory cytokines were dosed in the supernatant of macrophages treated with rapamycin, demonstrating that the inhibition of lipid body biogenesis is independent of NF-κB activation, besides demonstrating a modulation in the response of Mø stimulated with the metastatic lineage (4T1) is time-dependent, since the antitumor responsiveness occurred within 48 hours. The use of these drugs proved to be effective in modulating lipid metabolism, and corroborate new therapeutic strategies in neoplasms.

Keywords: Cancer. Lipid Bodies. mTOR. PPARγ. Vitamin D

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição por gênero, dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil em 2018 .	19
Figura 2: Polarização Macrofágica	24
Figura 3: Estrutura dos Corpúsculos Lipídicos.	27
Figura 4: Biogênese dos Corpúsculos Lipídicos.	28
Figura 5: Coloração de Corpúsculos Lipídicos.	29
Figura 6: Síntese de mediadores inflamatórios	31
Figura 7: Sinalização PPAR γ .	34
Figura 8: Síntese de Vitamina D	37
Figura 9: Via de sinalização mTOR	40
Figura 10: Formação de Corpúsculos lipídicos e síntese de prostaglandina E ₂ (PGE ₂) nas linhagens tumorais mamárias, 4T1 e 67NR, nos tempos de 24 e 48 horas.	51
Figura 11: Formação de Corpúsculos lipídicos e síntese de prostaglandina E ₂ (PGE ₂) nas linhagens tumorais mamárias, 4T1 e 67NR, pré-tratada com 20nM de rapamicina nos tempos de 24 e 48 horas.	52
Figura 12: Produção de TGF- β nas linhagens tumorais mamárias, 4T1 e 67NR, pré-tratadas com rapamicina nos tempos de 24 e 48 horas.	53
Figura 13: Viabilidade celular de 4T1 e 67NR pré-tratadas com rapamicina.	54
Figura 14: Metabolismo lipídico e síntese de citocinas e viabilidade celular de 4T1 tratada com 100nM de Vitamina D.	55
Figura 15: Metabolismo lipídico e síntese de citocinas em 67NR tratada com 100nM de Vitamina D.	57
Figura 16: Biogênese de Corpúsculos lipídicos e síntese de TNF- α em macrófagos pré-tratados com 20nM de rapamicina e estimulados com sobrenadante das linhagens tumorais mamárias.	59
Figura 17: Quantificação de IL-10 no sobrenadante de macrófagos estimulados com meio condicionado da linhagens 4T1 e 67NR e pré-tratados com 20nM de rapamicina, nos tempos de 24 horas e 48 horas	61
Figura 18: Efeito do tratamento de 100nM de Vitamina D (VDc) em macrófagos	64
Figura 19: Biogênese de corpúsculos lipídicos em macrófagos estimulados com meio condicionado das linhagens tumorais mamárias e pré-tratados com 5 μ M de rosiglitazona ou 1 μ M de GW9662, por 24 horas.	65

LISTA DE ABREVIATURAS

1,25(OH)₂D₃- di-hidroxivitamina D₃

4E-BP1 - "eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1" – proteína de ligação do fator de iniciação eucariótico 4E 1

5-HEPTE - "5-hydroperoxy-eicosatetraeic acid" - 5-hidroperoxieicosatetranoico

5-LO – "5-lipoxygenase" - 5-lipoxigenase

25(OH)D₃ – 25- hidroxivitamina D₃

AA - "Arachidonic Acid" - ácido araquidônico

ADRP - " Adipose differentiation-related protein" – proteína relacionada com a diferenciação de adipócitos

AF-1 - "ligand-independent activation function 1" – função de ativação independente de ligante 1

AF-2 - "ligand-independent activation function 2" – função de ativação independente de ligante 2

ANOVA - análise de variância

BCG - Bacillus Calmette-Guérin

COX-1 - "Cyclooxygenase 1" – Ciclooxygenase 1

COX-2 - "Cyclooxygenase 2" – Ciclooxygenase 2

DBP – "D-binding protein" – proteína ligante de vitamina D

DEPTOR - "DEP-domain-containing mTOR-interacting protein" - proteína de interação mTOR contendo domínio DEP

DHCR7 – "7-dehydrocholesterol reductase" - 7-desidrocolesterol redutase

EGFR - "Epidermal Growth Factor Receptor" - receptor do fator de crescimento epidérmico

eIF4E - "eukaryotic translation initiation factor 4E" - Fator de iniciação de tradução eucariótico

IFN- γ - "Interferon Gama" – Interferon Gama

IL -1 β - "Interleucin 1 β " – Interleucina 1 β

IL-4 - "Interleucin 4" – Interleucina 4

IL-10 - "Interleucin 10" – Interleucina 10

IL-13 - "Interleucin 13" – Interleucina 13

INCA - Instituto Nacional do Câncer

LOX – "lipoxygenase" - lipoxigenase

LPS – "Lipopolysaccharide" - lipopolissacarídeo

LTB₄ - "Leukotriene B4" – Leucotrieno B4

mLST8 - "mammalian lethal with Sec13 protein 8" – subunidade β da proteína GTPase

mSIN1 - "stress-activated protein kinase interacting protein 1" – proteína de interação da proteína quinase de mamíferos ativada por estresse 1

mTOR - "mammalian target of rapamycin" – proteína alvo da rapamicina em mamíferos

NF- κ B - "factor nuclear kappa B" – fator nuclear kappa B

OMS - Organização Mundial da Saúde

PGE₂ – "prostaglandin E₂" - prostaglandina E₂

PLA₂ - "phospholipase A₂" - fosfolipases A₂

PLIN - "Perilipin" – Perilipina

PPAR - "Peroxisome proliferator-activated receptors" - receptores ativados por proliferadores de peroxissomos

PPRE – "peroxisome proliferator response elements" - elementos responsivos aos proliferadores de peroxissoma

Protor 1 - "protein observed with rictor-1" – proteína observada com rictor-1

Protor 2 - “protein observed with rictor-2” – proteína observada com rictor-2

Raptor- “regulatory-associated protein of TOR” – regulador associado à proteína TOR

Rictor - “rapamycin-insensitive companion of mTOR” – proteína associada a TOR insensível a rapamicina

RXR – “retinoid X receptor” – receptor X retinoico

S6K1 - “p70 ribosomal protein S6 kinase 1” – proteína ribossomal S6 quinase beta-1

SREBP - “Sterol regulatory element-binding proteins” - Proteínas de Ligação a Elemento Regulador de Esterol

TAM – “tumor-associated macrophages” - macrófagos associados ao tumor

TGF-β - "Transforming Growth Factor Beta" – Fator de transformação de crescimento Beta

TIP47 - "tail-interacting protein of 47 kD" – Proteína de interação de cauda de 47 kda

TNF-α - "Tumor Necrosis Factor alpha" - Fator de Necrose Tumoral Alfa

VDR - “vitamin D receptor” - receptor de vitamina D

VEGF- "Vascular endothelial growth factor" – Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 CÂNCER DE MAMA	18
1.1.2 RESPOSTA IMUNOLÓGICA AO CÂNCER	21
1.2 CORPÚSCULO LIPÍDICO	26
1.2.1 MECANISMOS DE FORMAÇÃO DOS CORPÚSCULOS LIPÍDICOS	32
2 OBJETIVOS	43
2.1 OBJETIVO GERAL	43
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
3 MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1 LINHAGENS CELULARES	44
3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	44
3.2.1 Estimulação de macrófagos peritoneais com sobrenadante das linhagens tumorais e tratados com: Rapamicina, GW9662, Rosiglitazona e Vitamina D	44
3.2.1 Viabilidade Celular e análise do metabolismo lipídico das linhagens tumorais mamárias tratadas com Vitamina D	46
3.3 VITAMINA D	47
3.4 COLORAÇÃO DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS	47
3.5 QUANTIFICAÇÃO DE IL-10 e TNF- α	48
3.6 CAPTURA E PROCESSAMENTO DAS IMAGENS	49
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA E ELABORAÇÃO DOS GRÁFICOS	49
3.8 BIOINFORMÁTICA: HEATMAP	49
4 RESULTADOS	50
4.1 CÉLULAS TUMORAIS	50
4.2 MACRÓFAGO	58
5 DISCUSSÃO	65
6 CONCLUSÕES FINAIS	73
ANEXOS	74
1 - Pedido de depósito de patente em colaboração:	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

Há muitos anos o câncer emerge como um grave problema de saúde pública (EWING, 1929). Inúmeros casos são diagnosticados em estágios avançados da doença, limitando as terapêuticas e possibilidade de cura sendo, portanto, a segunda causa de morte da população (MA e YU, 2006; NAGAI e KIM, 2017).

Causando cerca de 9,6 milhões de óbitos na população mundial no ano de 2018, o câncer pode ser compreendido como um grupo de doenças que apresentam similaridades: o crescimento anormal de células, e a capacidade destas em invadir regiões adjacentes, processo esse, denominado metástase (WHO, 2013; WHO, 2018).

As células neoplásicas apresentam distintas propriedades quando comparadas as células normais, tais como: capacidade proliferativa exacerbada, invasão tecidual e evasão do processo de morte celular (HANAHAN e WEINBERG, 2000; HANAHAN e WIENBER, 2011). Essas características devem-se ao somatório de inúmeras anormalidades genéticas, acarretando a alteração da função fisiológica da célula (FARIA e RABENHORST, 2006; NIKIFOROV e NIKIFOROVA, 2011).

Além de inversões, deleções e translocações em determinada região gênica, que influem na proliferação celular e resistência ao processo apoptótico, por exemplo, outras anormalidades genéticas podem ocorrer, tais como: ativação de mutações somáticas e metilação do DNA (POPESCU e ZIMONJIC, 1997, NIKIFOROV e NIKIFOROVA, 2011; YOU e JONES, 2012; FOUAD e AANEI, 2017). Essas alterações interferem em duas classes de genes reguladores do crescimento celular: os protooncogenes e os genes supressores de tumor (SHEN et al, 2018).

Os protooncogenes são genes normais vinculados à atividade regulatória, que quando mutados originam os oncogenes - que atuam sobre o ciclo celular, por influenciar o crescimento e diferenciação celular (OSBORNE et al, 2004; FERRARI et al, 2006; MARTINEZ et al, 2006; PIEROTTI et al, 2017). Em contraste aos oncogenes,

os genes supressores de tumor atuam no reparo do DNA, suprimindo a formação de massa tumoral e controlando, portanto, o crescimento demasiado (FRIEND et al, 1988; MARTINEZ et al, 2006; LEE e MULLER, 2010; ZHAO, VOGELSTEIN et al, 2013; SUN e ZHAO, 2013; CHEN et al, 2015; WANG et al, 2018).

Há inúmeras famílias de genes supressores de tumor, os quais atuam como fatores de regulação homeostática (COLOMBO e RAHAL, 2009). Atualmente, as terapias anticâncer tem se baseado no controle da proliferação celular, ou seja, na indução do processo apoptótico, visando a homeostasia (PFEFFER e SINGH, 2018). Um dos fármacos amplamente utilizados no combate a neoplasia é a doxorubicina, uma antraciclina, empregada em cancros de mama, pulmão, linfomas, leucemias e dentre outros (YANG et al, 2014; ZHAO e ZHANG, 2017; TAYMAZ-NIKERE et al 2018). Seu mecanismo de ação consiste na geração de radicais livres e inibição da topoisomerase II – responsável pelos processos de transcrição, recombinação e replicação do DNA – ambos atuam concomitantemente, para o processo apoptótico da célula neoplásica, suprimindo, portanto, o crescimento demasiado de células (GUANO et al, 1999; MINOTTI et al, 2004; THORN et al, 2011; ZHAO e ZHANG, 2017; GORINI et al, 2018).

1.1 CÂNCER DE MAMA

O Câncer de Mama é um problema global, sendo a malignidade mais frequente nas mulheres (RUSSO & RUSSO, 1995; HARBECK et al, 2019; TESAURO et al, 2019). De acordo com estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), o número de casos diagnosticados em 2018 em todo o mundo foi de 2,1 milhões, representando um aumento exponencial de casos, quando compara-se anos anteriores (BRAY et al, 2018; YAGOUBHI et al, 2019).

No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou para o Triênio 2020-2022 o surgimento de 625 mil novos casos de câncer. De acordo com os mesmos

parâmetros, surgirão 66.280 casos de cancro de mama a cada ano, representando 29,7% dos acontecimentos de câncer em mulheres (Figura 1) (INCA, 2020). Com relação ao número de mortes na população brasileira em 2017, as maiores taxas de mortalidade se encontravam nas regiões Sul e Sudeste, com cerca de 14 óbitos a cada 100.000 casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

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

Figura 1: Distribuição por gênero, dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil em 2018 (Fonte: INCA, 2020).

As possibilidades de tratamento são baseadas em análises como heterogeneidade morfológica, característica histopatológica, idade da paciente e estágio clínico; portanto quando descoberto precocemente, as possibilidades de cura são elevadas (TURASHVILI e BROGI, 2017).

Inúmeros estudos experimentais de câncer de mama utilizam-se linhagens celulares para mimetizar a neoplasia (EVANGELISTA et al, 2019). A linhagem 4T1 - originalmente isolada por Miller - é transplantável e de origem murina; sendo capaz de metastizar rapidamente devido ao elevado índice mitótico para outros sítios, os quais incluem: pulmão, linfonodos, cérebro e ossos, ocasionando, portanto, estágios avançados da doença em humanos (DEXTER et al, 1978; LELEKAKIS et al, 1999; PULASKI, 2001; TAO et al, 2008; SZTALMACHOVA et al, 2015; LIU et al, 2019).

O Câncer de Mama é considerada uma doença heterogênea, sobretudo pelo seu desenvolvimento em diversas regiões da anatomia mamária, respostas distintas a terapêuticas, expressão gênica e, manifestações clínicas e comportamentais diferentes (STINGL e CALDAS, 2007). Avanços nas técnicas de microarranjo do DNA, permitiu diferenciar a neoplasia em subtipos moleculares denominados: HER2+, Triplo

negativo, Luminal A, Luminal B, Claudina Baixa e mama normal (CIQUEIRA et al, 2011, RAFFO et al, 2017).

As distinções moleculares entre os subtipos de câncer de mama estão associadas com a expressão de alguns receptores, tais como: receptores de estrogênio (RE), receptores de progesterona (RP) e expressão da proteína ErbB-2 (*Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2*) (SIMS et al, 2007). O subtipo triplo-negativo não expressa RE, RP e ErbB2 e, possui uma natureza agressiva em comparação aos demais subtipos moleculares; por apresentar uma rápida e mais agressiva metástase que reduz, a sobrevida dos pacientes (CLEATOR et al, 2007; LI et al, 2020).

A denominação de câncer triplo negativo (TN) foi utilizada primeiramente em 2005. Essa terminologia representa um subconjunto de indivíduos que a terapêutica para a neoplasia mamária está limitada apenas a quimioterapia, uma vez que, esses doentes não apresentavam a expressão de receptores hormonais para terapia hormonal (BRENTON et al, 2005). Histologicamente classificado como carcinoma mamário invasivo, o câncer TN apresenta prevalência em mulheres jovens, afro-americanas e, que apresentam mutação no gene *BRCA1* (FOULKES et al, 2010; BIANCHINI et al, 2016)

Células de adenocarcinoma triplo negativo, 4T1, apresenta reprodutibilidade em modelo de carcinoma mamário humano, sobretudo por dois fatores: pela facilidade do desenvolvimento de metástase a partir do tumor primário e, o desenvolvimento do tumor primário no sítio correto após o transplante da célula tumoral (PULANSKI et al, 2000). Para análises comparativas, emprega-se linhagens tumorais murinas não metastáticas, tal como a 67NR (BOSILJCIC et al, 2019; NECKMANN et al, 2019).

Contraopondo-se a natureza invasiva e metastática de 4T1, a linhagem 67NR é tumorigênica e não metastática, permanecendo restrita ao sítio primário de desenvolvimento tumoral (ASLAKSON e MILLER, 1992; LELEKAKIS et al, 1999). Considerando aspectos da progressão tumoral e metabolismo lipídico, o estudo foi conduzido pela utilização destas duas linhagens celulares a fim de elucidar e comparar as respostas aos tratamentos utilizados.

1.1.2 RESPOSTA IMUNOLÓGICA AO CÂNCER

O sistema imunológico visa o combate a patógenos e outros agentes infecciosos, além de combater célula danificadas, sendo responsável por manter a homeostasia (CRUVINEL et al, 2010; GOLDSZMID et al, 2014). Esse sistema é caracterizado pela imunidade inata e pela imunidade adaptativa, os quais diferenciam sobretudo, pelas células e moléculas características (ADAM et al, 2003; VISSER et al, 2006). No entanto, em neoplasias, a doença pode evadir esse mecanismo de resposta permitindo, portanto, a sobrevivência das células cancerosas.

O sistema imune inato corresponde a primeira linha de defesa frente a patógenos e agentes estranhos (AKIRA et al, 2006; LIU et al, 2019). É reconhecida por ser uma resposta rápida, e constituída por células dendríticas, macrófagos, células natural Killer (NK) e monócitos (ADAM et al, 2003; AKIRA et al, 2006; VISSER et al, 2006; GRIVENNIKOV et al, 2010; LIU et al, 2019). Os principais mecanismos efetores dessa resposta são: fagocitose e processo inflamatório (CRUVIEL et al, 2010; GOLDSZMID et al, 2014; GONZALEZ et al, 2018; LIU et al, 2019).

Desde 1863 autores correlacionam a inflamação com o desenvolvimento de neoplasias (COUSSENS e WERB, 2002; LANDSKRON et al, 2014). Dados apontam que aproximadamente 25% dos novos casos de câncer que surgem devem-se a um processo inflamatório crônico, isto é, caracterizado por ser de longa duração; sendo 15% dos óbitos relacionados a infecções crônicas virais e bacterianas persistentes (KARIN e GRETEN, 2005; MANTOVANI et al, 2008; KORNILUK et al, 2017).

O processo inflamatório se inicia quando padrões moleculares presente nos antígenos são reconhecidos por células do sistema imune. Para o desenvolvimento e resolução do processo inflamatório, é necessário o recrutamento de células do sistema imunológico, por exemplo: macrófagos, neutrófilos e eosinófilos; aos sítios da injúria - sendo desencadeados por fatores quimiotáticos, os quais incluem TGF β , quimiocinas (MCP-1/CCL2; MCP-2/CCL8; MCP-3/CCL7), citocinas (IL-1 β e TNF- α) e

eicosanoides (COUSSENS e WERB, 2002; MEDZHITOV; 2008; MENDONÇA e COUTINHO-NETTO, 2009; PALOMINO e MARTI, 2015).

Os macrófagos são células constituintes do sistema mononuclear e advindos dos monócitos (OTTAVIANI e FRANCESCHI, 1997; NORRIS e DENNIS, 2014, GORDON e PLÜDDEMANN, 2017). Estas células estão amplamente distribuídas entre todos os tecidos, cuja função é permitir a homeostasia por atuar na fagocitose, nos processos inflamatórios e na remodelação tecidual que ocorre quando a inflamação cessa (KASAHARA e MATSUSHIMA, 2001; FUJIWARA e KOBAYASHI, 2005; SERHAN e SAVILL, 2005; BERCOVICI et al, 2019).

Em condições adversas, mediante ao reconhecimento dos padrões associados aos patógenos, macrófagos residentes secretam quimiocinas e citocinas inflamatórias que irão recrutar outras células, inclusive outros macrófagos, ao sítio da injúria. Uma citocina produzida por macrófagos ativados e neutrófilos é o TNF- α (*Tumor Necrosis Factor*). Essa citocina está relacionada com a ativação das vias NF- κ B e MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*), acarretando a morte celular ou na sobrevivência desta; possuindo uma dualidade frente a condição fisiológica, em neoplasias (TANIGUCHI e KARIN, 2018). A produção constante de TNF- α está relacionado a caquexia e disseminação do tumor (SZLOSAREK e BALKWILL, 2003; BALKWILL, 2006; CRUSZ e BALKWILL, 2015).

A terminologia de TNF - fator de necrose tumoral - originalmente identificado em 1975, se deve a capacidade dessa citocina induzir a necrose em modelos de sarcoma (CARSWELL et al, 1975; MONTFORT et al, 2019). TNF é uma proteína transmembranar, na qual sua função citotóxica ocorre devido a interação com o seu receptor, TNFR1 (*Tumor necrosis factor receptor 1*) – expresso por quase todos os tipos celulares - desencadeando a ativação de caspases (MOCELLIN e NITTI, 2008; WAJANT e SIEGMUND, 2019).

Durante o estabelecimento do processo inflamatório, TNF atua na ativação de células endoteliais e na aderência e migração leucocitária na região acometida (BERTAZZA e MOCELLIN, 2010). Em altos níveis, TNF inibe a proliferação de células endoteliais e conseqüentemente, a angiogênese; além de induzir necrose ou apoptose de células tumorais (KLAGSBRUN e D'AMORE, 1991; WILSON e BALKWILL, 2002).

Prevost-Blondel e cols (2000) demonstraram que a imunidade adaptativa também está associada a regressão tumoral, uma vez que, indivíduos knockout para TNF, apresentaram um comprometimento das funções de linfócitos T.

Contraopondo a ação antitumoral, células tumorais e macrófagos podem produzir de forma autócrina TNF- α e; a expressão crônica desta citocina está relacionado ao crescimento e progressão tumoral (MARTINS e SILVA, 1991; SHEEN-CHEN et al, 1997). A síntese de TNF- α pode desencadear a transcrição de fatores relacionados a invasividade e metástase, através da ativação de NF- κ B. Outra atribuição pró-tumorigênica associada a TNF- α é a alteração de um fenótipo celular, na qual as células apresentam alterações em sua morfologia e aspecto mesenquimal, além de aumentar a migração celular (CRUCERIU et al, 2020).

O macrófago apresenta dois perfis de classificação, baseados no estado de ativação e da natureza dos estímulos. Esses subtipos são denominados: ativação clássica e alternativa, os quais apresentam papéis controversos em cânceres (MANTOVANI et al, 2002; WYNN et al, 2013; LIN et al, 2019; YU te al, 2019). Os macrófagos ativados classicamente (M1) são predispostos a esse perfil via presença de IFN- γ (*Interferon Gamma*), e exibem atividade microbicida pela produção de óxido nítrico e enzimas lisossomais, além da ação antitumoricida, que é desencadeada pelo processo inflamatório. Em face, a via alternativa (M2) é desencadeada na presença das citocinas IL-4 e IL-13, possuindo um caráter pró-tumorigênico, por favorecer o processo angiogênico e reparo tecidual, visto que, possui caráter anti-inflamatório (Figura 2) (SICA et al, 2008; MEDREK et al, 2012; WANG et al, 2014; LIN et al, 2019).

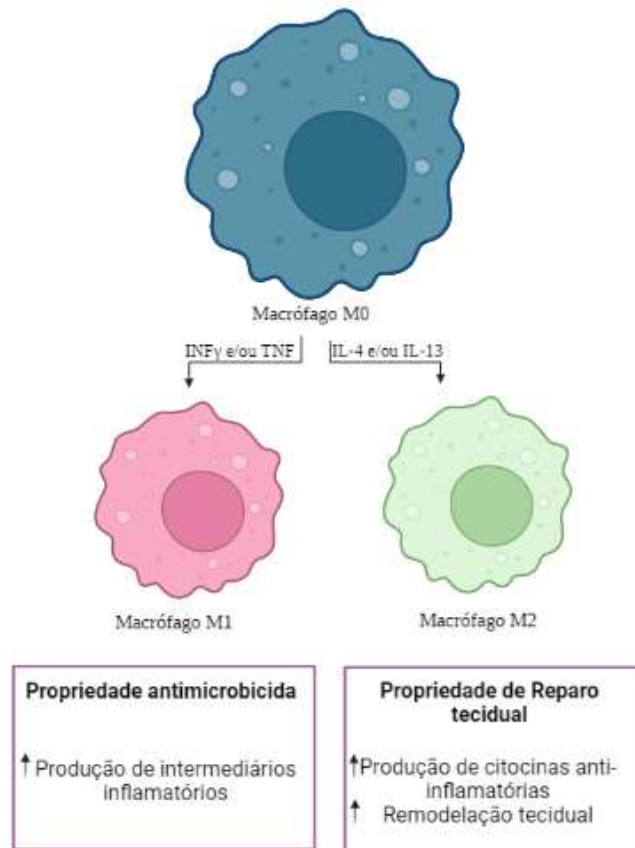


Figura 2: Polarização Macrófagica (Fonte: RUSSELL et al, 2019)

O microambiente tumoral é composto por inúmeras células, sendo proeminente a existência de macrófagos de perfil anti-inflamatório (M2) (KELLY et al, 1988; KIM e BAE, 2016; VOLODKO et al, 2019). Os macrófagos associados ao tumor (TAM) contribuem para diversos mecanismos de evasão a resposta imunológica, permitindo a perpetuação do cancro, como por exemplo, através da secreção de fatores imunossupressores como arginase, IL-10 e TGF- β , os quais coíbem a resposta imune mediada por células T (GORELIK e FLAVELL, 2001; TERABE et al, 2003; BROWN et al, 2017).

É demonstrado ainda a participação dos TAM no processo metastático, promovendo a angiogênese, isto é, a formação de vasos sanguíneos que nutrem o tumor (SICA et al, 2008; LIN et al, 2019). Dentre os fatores pro-angiogênicos liberados pelos macrófagos associados ao tumor estão: VEGF-A (vascular endothelial growth factor - A), TNF- α (tumor necrosis tumor alpha), metaloproteinases de matriz, IL-1 β

(Interleucina 1 beta) e; a ativação de ciclooxigenase-2 (COX₂) – enzima precursora de mediadores inflamatórios (VALKOVIC et al, 2002; RIABOV et al, 2014; KIM e BAE, 2016; LARIONOVA et al, 2019).

Caracterizado pelas fases de eliminação, equilíbrio e escape; a imunoeedição é uma teoria que descreve a capacidade do sistema imunológico em moldar o perfil antigênico de tumores devido a uma pressão seletiva. A imunoeedição é um processo contínuo que descreve a ação ambígua do sistema imune no combate a tumorigênese, sendo iniciado pela fase de eliminação (VESELY et al, 2011; DE SOUZA SILVA et al, 2021).

Na etapa de eliminação, estão envolvidas células do sistema imune inato e adaptativo que atuam na detecção e eliminação células neoplásicas. Com o reconhecimento de células tumorais, ocorre recrutamento de células da imunidade inata através da produção de IFN- γ – citocina importante na ativação de vias sinalizatórias. As ativação dessas vias correlaciona-se a produção de moléculas pró-apoptóticas e liberação de mediadores inflamatórios que, desencadeiam a apoptose de células tumorais e posteriormente, antígenos tumorais são liberados; acarretando à ativação do sistema imune adaptativo (SCHREIBER et al, 2004; O'DONELL et al, 2019). Algumas células tumorais podem persistir após a etapa de eliminação, entrando na fase de equilíbrio.

O equilíbrio é a segunda fase da imunoeedição. Ele consiste na dormência de células tumorais, que não apresentam crescimento celular devido ao equilíbrio estabelecido com as ações do sistema imunológico, podendo persistir por um longo período em estado de latência (VESELY et al, 2011). O estabelecimento e desenvolvimento tumoral se deve a fase de escape. O escape consiste na irresponsividade das células neoplásicas às ações do sistema imunológico devido a alterações genéticas expressas, levando a proliferação celular e redução na sobrevida do paciente (DUNN et al, 2002).

Os mediadores inflamatórios são moléculas secretadas que atuam na eliminação da injúria – por exemplo, as células tumorais - através da inflamação. Para a resolução da resposta, há a substituição das prostaglandinas por lipoxinas, na qual essas últimas, inibem o recrutamento de neutrófilos e promovem o recrutamento de

monócitos, que removem as células mortas e iniciam a remodelação dos tecidos (LEVI et al, 2001; MEDZHITOV, 2008).

As prostaglandinas são mediadores inflamatórios advindos do metabolismo do ácido araquidônico (STEIN-WERULOWSKY, 1974). Em neoplasias, as prostaglandinas desempenham papel na promoção e progressão do tumor, visto que promove o processo angiogênico, isto é, a formação de vasos sanguíneos, os quais permitem a nutrição do tumor e metástase (WANG e DuBOIS, 2006; NAKANISHI e ROSEMBERG, 2013). As prostaglandinas podem ser produzidas e localizadas no interior de organelas denominadas corpúsculos lipídicos (CL's), sendo objeto de alguns estudos que vêm inferindo a participação dessas organelas na progressão tumoral (ACCIOLY et al, 2008; BOZZA e VIOLA, 2010; PETAN et al, 2018).

1.2 CORPÚSCULO LIPÍDICO

Em regiões de desenvolvimento tumoral, observa-se elevada formação de organelas denominadas corpúsculos lipídicos (CL); as quais são sítios de localização e produção de mediadores inflamatórios. Atualmente, inúmeros ensaios buscam elucidar a correlação destas organelas com o desenvolvimento neoplásico (DVORAK et al, 1993; ACCIOLY et al, 2008; FAZOLINI et al, 2015, PETAN et al, 2018).

A lipogênese, síntese de ácidos graxos, é uma observação patológica comumente presente em neoplasias, (PIZER et al, 1998; SWINNEN et al, 2006). Primariamente, os CL eram denominados apenas como reservatórios de lipídeos, desconhecendo-se a importância dessa organela na modulação de respostas a injúrias, como câncer e processos infecciosos (TIRINATO et al, 2017; CRUZ et al, 2019).

Os corpúsculos lipídicos são organelas citoplasmáticas circundadas por uma monocamada de fosfolipídeos, contendo em seu núcleo, lipídeos neutros como: diacilglicerol (DAG), triacilglicerol (TAG) e ésteres de colesterol (TAUCHI-SATO et al, 2002; D'AVILA et al, 2006; TOLEDO et al, 2016; DEN BROK et al, 2018; JARC e PETAN, 2019). Os CL's apresentam um monocamada de fosfolipídeos, onde

encontram-se associadas um grupo de proteínas, as quais podem ser: Perilipinas, CIDE ou caveolinas que desempenham papel na formação e manutenção dessas organelas (Figura 3) (MIURA et al, 2002; BICKEL et al, 2009; CRUZ et al, 2019).

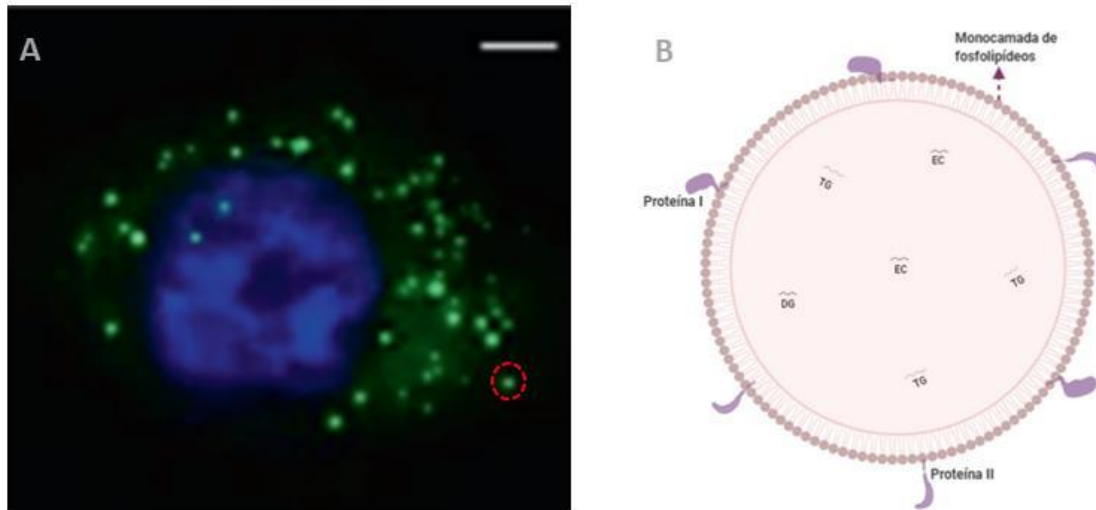


Figura 3: Estrutura dos Corpúsculos Lipídicos. (a) CL em células PC-3 marcados com BODIPY (Fonte: adaptado de NARDI et al, 2019). (b) Estrutura dos CL's (Fonte: OLZMANN e CARVALHO, 2018).

As perilipinas (antigamente denominadas proteínas PAT) é um grupo de proteínas estruturais associadas a membrana dos corpúsculos lipídicos, sendo composta por: Perilipinas (PLIN1), ADRP (ou perilipina-2 ou adipofilina) e TIP47 (PLIN3) (MIURA et al, 2002; ROBENEK et al, 2005; MARTIN e PARTON, 2006; ONAL et al, 2017; ALMEIDA et al, 2018). Apesar das perilipinas representarem as proteínas mais abundantes no corpúsculo lipídico, sua ocorrência é influenciada por uma gama de condições, exemplificadas por: fase metabólica da célula e desenvolvimento celular, tipo tecidual e regulação transcricional (BRASAEMLE, 2007; ARRESE et al, 2014).

Com relação a distribuição desta organela, é importante salientar que ela se encontra amplamente distribuída entre os grupos, não sendo restrita portanto, a adipócitos. Diversos estudos vêm relatando a existência de CL's tanto em células eucarióticas (plantas e mamíferos) quanto em células procariontas (ALVAREZ et al, 1996; BOZZA et al, 2009; FARESE JR e WALTHER, 2009; BOZZA et al, 2011; WELTE, 2015). Outras terminologias referentes a CL's são encontradas na literatura, tais como: "*lipid bodies*", "*adiposomes*", "*oil bodies*" (empregados em estudos de algas

e plantas) e "*lipid droplets*" na língua inglesa (MARTIN e PARTON, 2006; THIAM et al, 2013; MAEDA et al, 2017).

Além de ser estoque de lipídeos, denotando uma funcionalidade energética; os corpúsculos lipídicos apresentam outras atribuições tais como: produção de mediadores inflamatórios (prostaglandinas e leucotrienos); tráfico de membranas; regulação do metabolismo lipídico; sinalização intracelular e resposta ao stress celular (D'AVILA et al, 2006; BOZZA et al, 2011; JARC e PETAN, 2019). Os CL's também modulam respostas imunológicas, tal fato pode ser exemplificado com o bloqueio de sua biogênese em regiões hipóxias, que acarretam a ativação da via NF- κ B e conseqüentemente, eliminação de células neoplásicas devido a inflamação ocasionada (ACKERMAN et al, 2018).

A biogênese de corpúsculos lipídicos pode ser induzida por inúmeros fatores, tais como: estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, autofagia e inflamação. (BOZZA e VIOLA, 2010; BENSaad et al, 2014; JARC e PETAN, 2019). Em contrapartida, o processo de biogênese não permanece completamente esclarecido, sendo a hipótese mais aceita, que os CL's provêm do retículo endoplasmático (RE). De acordo com essa teoria, entre a dupla membrana do RE, ocorre o acúmulo de lipídeos neutros e posterior desprendimento por brotamento; isso justificaria então, o fato dos CL's serem organelas constituídas por uma monocamada de fosfolipídios (Figura 4) (MURPHY, 2001; MARTIN e PARTON, 2006; JOSHI et al, 2018; OLZMANN e CARVALHO, 2018).

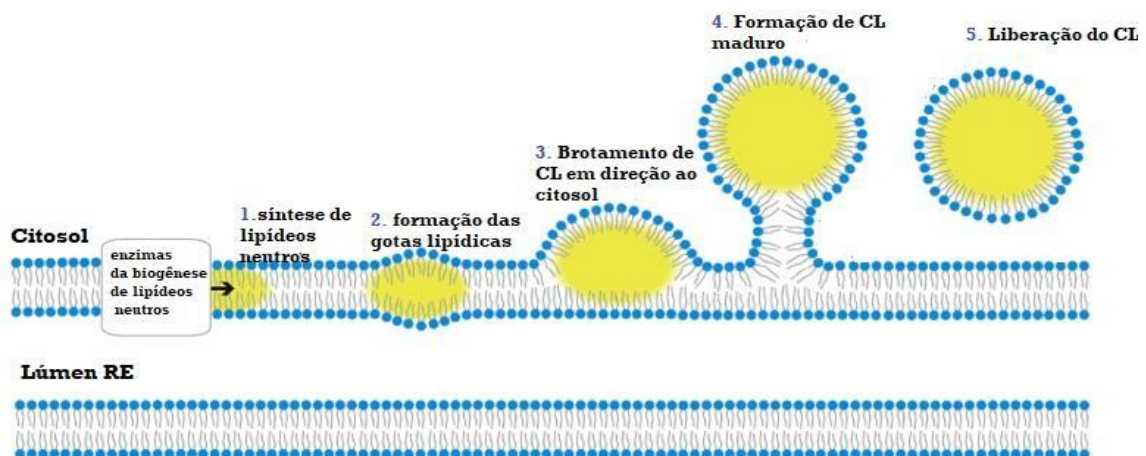


Figura 4: Biogênese dos Corpúsculos Lipídicos (Fonte: NETTEBROCK e BOHNERT, 2020).

Para análises de corpúsculos em processos fisiológicos e patológicos a utilização de microscopia de luz é de ampla importância, porém Melo et al. (2011) destacam limitações da técnica pelo fato de que algumas colorações utilizam o álcool como fixador. A fixação dos corpúsculos lipídicos deve ser realizada com fixadores como o formaldeído (formalina), paraformaldeído ou glutaraldeído, em conjunto com coloração de tetróxido de ósmio ou com marcações fluorescentes, destacando-se: BODIPY (β -Bodipy®FL C5-HPA), Oil red O (ORO) ou ácido 1-pirenododecanóico (p96), dentre outros. O tetróxido de ósmio apresenta nítida visibilidade em microscopia de luz e eletrônica; sua interação a lipídeos insaturados e a fosfolipídeos promove a sua redução, apresentando coloração enegrecida permanente (Figura 5).

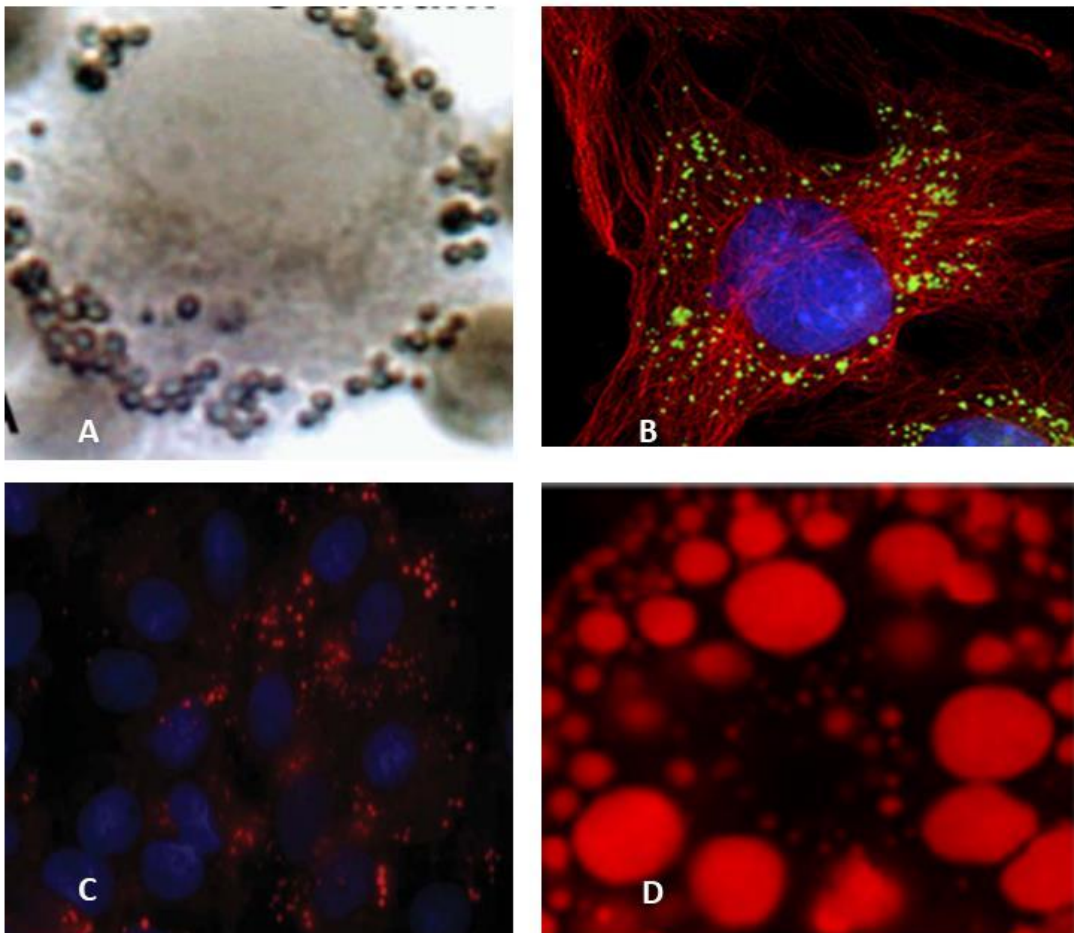


Figura 5: Coloração de Corpúsculos Lipídicos. (a) tetróxido de ósmio (OsO_4) em macrófagos (Fonte: adaptado de MELO et al, 2011). (b) marcação com BODIPY (em verde) em fibroblastos murinos (NIH 3T3) em 24horas (Fonte: adaptado de CRUZ et al, 2019). (c) marcação com ORO, em vermelho, em

células epiteliais (Fonte: adaptado de FAZOLINI et al, 2015). (d) marcação com Nile Red em *Drosophila* (Fonte: adaptado de BI et al, 2012).

Os corpúsculos lipídicos medeiam resposta imunológicas por meio produção e liberação de mediadores inflamatórios, que são moléculas orgânicas que agem em células inflamatórias e normais, desencadeando a inflamação. A partir do pressuposto, é associado aos CL's a localização e produção de eicosanoides, destacando-se prostaglandinas e leucotrienos. (WELLER e DVORAK, 1985; BOZZA e BANDEIRA-MELO, 2005; MELO et al, 2013; ALMEIDA et al, 2018, D'AVILA et al, 2021).

Os eicosanoides provêm da metabolização do ácido araquidônico (ácido graxo, da classe do ômega 6, e constituído por 20 carbonos), presente em membranas celulares (TALLIMA e EL RIDI, 2018). Para a obtenção dos eicosanoides é necessário o desprendimento do ácido araquidônico (AA) da membrana ou dos CL's, o qual é realizado pela enzima Fosfolipase A₂ (PLA₂). Após se desprender, o AA é metabolizado por dois sistemas enzimáticos: ciclooxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX), as quais convertem em prostaglandinas, tromboxanos, lipoxinas e leucotrienos (Figura 6) (WELLER e DVORAK, 1985; BROKE e PETERS-GOLDEN, 2007; BAENKE et al, 2013).

A família das fosfolipases é constituída por inúmeras enzimas, no entanto, a fosfolipase citosólica (cPLA₂) é a que apresenta maior afinidade ao ácido araquidônico (JARC e PETAN, 2019). A ciclooxigenase é uma isoenzima é responsável por originar prostaglandinas, tromboxanos e prostaciclina; a qual apresenta dois isotipos: COX-1 e COX-2 (KHANAPURE et al, 2007; WANG e DuBOIS, 2010). A COX-1 é expressa constitutivamente em todos os tecidos, no qual seus níveis basais, está relacionada a homeostase (DENNIS e NORRIS, 2015). Em contrapartida, a COX-2 é superexpressa em sítios inflamatórios e tumores (DuBOIS et al, 1998; DEEP e SCHLAEPFER, 2016).

Algumas terapêuticas têm sido realizadas com base na coibição da ciclooxigenase 2, e conseqüentemente em corpúsculos lipídicos, uma vez que, os CL's estão associados a inúmeras patologias. A técnica consiste na administração de drogas anti-inflamatórias não-esteroidais (AINES), que inibem a COX e, por conseguinte, seu produto, as prostaglandinas. Bozza et al. (1996) demonstraram que o uso da aspirina

coibiu a formação de CL's (sítios de localização e produção de prostaglandinas) em eosinófilos e células polimorfonucleares; constituindo uma intervenção viável para inflamações crônicas; assim como a administração das AINES inibiram a biogênese de CL's em macrófagos infectados por *Trypanosoma cruzi* no estudo de D'Avila et al (2011).

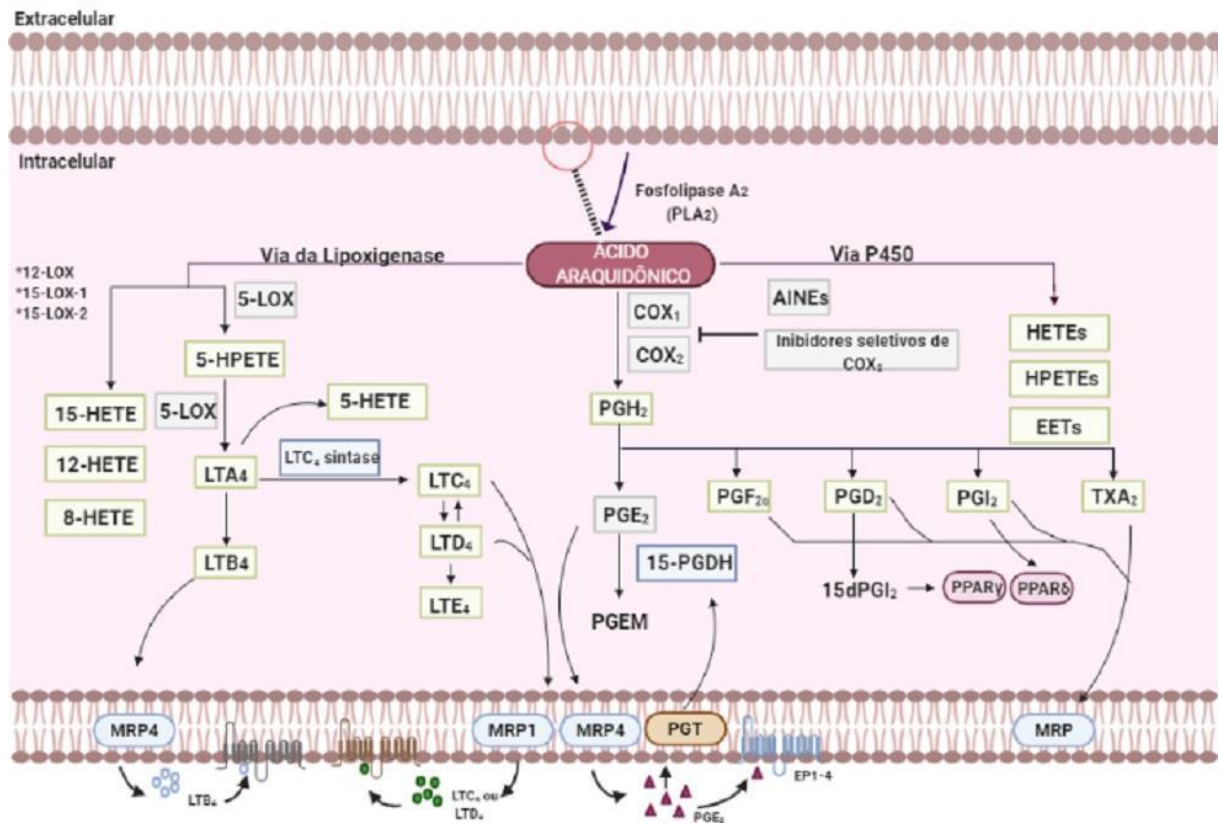


Figura 6: Síntese de mediadores inflamatórios (Fonte: WANG e DuBOIS, 2010).

Concomitante a formação de corpúsculos lipídicos tem-se associado o aumento de mediadores inflamatórios, dentre eles, prostaglandinas em ambientes tumorais (ACCIOLY et al, 2008; BOZZA e VIOLA, 2011; FAZOLINI et al, 2015; ALMEIDA et al, 2018). Estes prostanóides provêm da atividade da ciclooxigenase, em que a síntese de PGE2 está associada ao processo inflamatório, no qual há o recrutamento de células imunes para a região do tumor (TILLEY et al, 2001; RICCIOTTI e FITZGERALD, 2011). Em adição, a prostaglandina E2, pode promover o câncer por se ligar a receptores e induzir a sinalização que controla a proliferação celular, angiogênese, migração e apoptose (WANG e DUBOIS, 2006).

Os leucotrienos (LTs) e lipoxinas (LXs) são produtos da via do metabolismo do ácido araquidônico desencadeada pelas lipoxigenases. A obtenção destes mediadores é estimulada por meio da oxidação do ácido graxo, na qual a enzima 5-Lipoxigenase (5-LO) promove catálise; convertendo o AA em 5-hidroperoxieicosatetranoico (5-HEPTE). Deve-se mencionar a participação de um intermediário instável, o LTA₄, o qual pode ser convertido a LTB₄; ou ainda, conjugado com demais substâncias, ocasionando a produção de LTC₄, LTD₄, LTE₄ (FUNK, 2005; BROCK e PETERS-GOLDEN, 2007; SANTOS et al, 2019).

A biogênese dos corpúsculos lipídicos não é relacionada apenas a desequilíbrios fisiológicos ou com o acúmulo de ácidos graxos (lipotoxicidade), mas sim a um processo regulado por uma gama de fatores que dependem do estímulo, do tipo celular e condição patológica (BOZZA e BANDEIRA-MELO, 2005). A formação dessas organelas está intrinsecamente conectada a com vias de sinalização, tais como mTOR; a receptores nucleares, PPAR; e a hormônios, como a vitamina D (SALAMON et al, 2014; RODRIGUES et al, em preparação).

1.2.1 MECANISMOS DE FORMAÇÃO DOS CORPÚSCULOS LIPÍDICOS

1.2.1.1 FORMAÇÃO DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS VIA PPAR

Os receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPAR) são fatores de transcrição pertencentes a família de receptores nucleares, que foram identificados em 1990 e desempenham funções na homeostase metabólica (ISSEMAN e GREEN, 1990; HAN et al, 2017). O PPAR apresenta três isotipos que apresentam estruturas similares e se distinguem pela atividade desempenhada e padrões de distribuição: PPAR- α (ou NR1C1), PPAR- δ (ou NR1C2) e PPAR- γ (ou NR1C3) (MICHALIK et al, 2006; AHMADIAN et al 2013).

O PPAR- δ está presente em boa parte dos tecidos e regula o dispêndio de energia, face que o PPAR- α é notado em locais com elevada β -oxidação de ácidos graxos, como por exemplo, coração e fígado (VAN RAALTE et al, 2004; TYAGI et al,

2011). O PPAR- γ participa do processo adipogênico e é subdividido em isoformas, conforme local de expressão desses fatores: PPAR γ 1, o qual encontra amplamente distribuído nos tecidos; PPAR γ 2 sobretudo em tecido adiposo; PPAR γ 3, expresso em macrófagos e PPAR γ 4 em células endoteliais (CELI e SCHULDINER, 2002; TYAGI et al, 2011).

Estruturalmente, ambos os isotipos de PPAR apresentam os mesmos domínios funcionais (MOTOJIMA, 1993; BOUGARNE et al, 2018). O domínio A/B, também chamado de AF-1 (*ligand-independent activation function 1*) é responsável pela fosforilação do PPAR; já o domínio D condiz a ligação de cofatores, enquanto a região C ou DBD (DNA binding domain) permite a ligação do PPAR com o PPRE (*peroxisome proliferator response elements*) na região do gene alvo (HAN et al, 2017; BOUGARNE et al, 2018). PPAR regula uma gama de genes envolvidos na manutenção da homeostasia, sendo assegurada a transcrição desses genes por meio do Domínio E/F (também chamado de AF-2: *ligand-independent activation function 2*) (TAVARES et al, 2007; KROKER e BRUNING, 2015).

A ativação do PPAR ocorre mediante a alterações homeostáticas ocasionadas por processos patofisiológicos. A ativação do PPAR se inicia quando receptor e ligante se conectam, no qual eicosanoides - prostaglandinas e leucotrienos, atuam como ligantes (BERGER e MOLLER, 2002; TAVARES et al, 2007; WANG e DuBOIS, 2010). Sucedendo a interação entre receptor-ligante e a sua fosforilação, ocorre a interação no domínio DBD entre PPAR e PPRE (que contém a sequência gênica a ser transcrita), onde a transcrição pode ser reprimida ou não, pelos cofatores (MICHALIK et al, 2006; MARION-LETELLIER et al, 2016; HAN et al, 2017).

A função dos PPARs é atuar sobre genes que regulam o metabolismo de lipídeos, o processo inflamatório e a adipogênese – síntese de ácidos graxos, isto é, cabe aos PPAR's a manutenção da homeostase metabólica da célula (SCHOONJAS et al, 1997; CHA e DuBOIS, 2007; AHMADIAN et al 2013; HAN et al, 2017). A partir do pressuposto, vários estudos vêm elucidando a correlação entre biogênese de corpúsculos lipídicos e PPAR (Figura 7) (DE ASSIS et al, 2003; BOZZA e BANDEIRA-MELO, 2005; GORGA et al, 2017; JARC e PETAN, 2019).

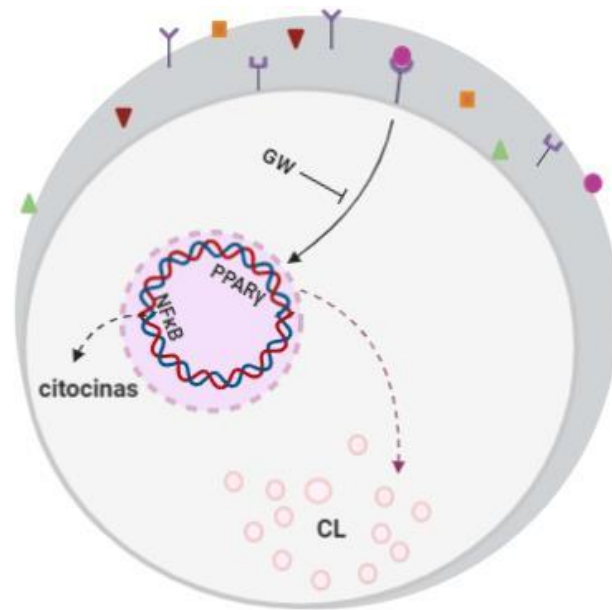


Figura 7: Sinalização PPAR γ (Fonte: Almeida et al, 2014).

Estudos vêm demonstrando que este receptor age sobre a expressão de genes que atuam sobre as perilipinas, que são proteínas estruturais associadas aos corpúsculos lipídicos e marcadores de diferenciação de adipócitos (ARIMURA et al, 2004; DALEN et al, 2004; BICKEL et al, 2009). Arimura et al. (2004) demonstraram que a expressão de perilipina estava associada com a expressão de PPAR γ 2 e, portanto, com o aumento na formação dos corpúsculos lipídicos em adipócitos.

Observações patológicas em processos infecciosos denotam a alteração do metabolismo lipídico e, conseqüentemente, aumento da biogênese de corpúsculos lipídicos (RAHBI et al, 2016). D'Ávila et al. (2006 e 2007), demonstraram o aumento de corpúsculos lipídicos em macrófagos e eosinófilos pleurais induzidos pela infecção por *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG), bem como Almeida et al (2009) em macrófagos infectados *in vitro*. Almeida et al. (2009) demonstraram que o PPAR γ regulou a produção de PGE₂ em macrófagos infectados com BCG. A alteração lipídica acarretada e regulada pelo PPAR γ denota ser um importante mecanismo de escape do patógeno (ALMEIDA et al, 2012; RAHBI et al, 2016; TOLEDO et al, 2016, ALMEIDA et al, 2018).

Inúmeros fatores de estresse celular podem acarretar a biogênese de corpúsculos lipídicos, como por exemplo: hipóxia, estresse oxidativo, autofagia e disfunção mitocondrial (PETAN et al, 2018; SHYU JR et al, 2018). Com relação a neoplasias, os tumores se desenvolvem em regiões hipóxicas, sendo observadas a formação de CL's em tumores de mama, próstata, cérebro e renal (BENSAAD et al, 2014; QIU et al, 2015). Laurenti et al. (2011) demonstraram que em hipóxia, a biogênese de corpúsculos lipídicos foi associada com a elevada expressão de PPAR α em glioblastomas. Considerando, pois, a correlação entre câncer e CL's, o PPAR γ fator que regula o metabolismo lipídico, pode vir a ser um bom alvo terapêutico, visto que apresenta papel contrastante no desenvolvimento tumoral (YOUSEFNIA et al, 2018).

Adicionalmente, os PPARs fazem parte de uma superfamília de receptores nucleares, as quais incluem ácido retinóico e vitamina D (MOTOJIMA, 1993; GRYGIEL-GÓRNIAK, 2014). Estudos conduzidos por Salamon et al. (2014) demonstraram que a vitamina D regula o metabolismo lipídico, ao reduzir a biogênese de CL's em células THP-1 infectadas com *Mycobacterium tuberculosis*, acrescidos que a vitamina D anulou a atividade de PPAR γ desencadeados por macrófagos infectados.

1.2.1.2 EFEITO DA VITAMINA D NA FORMAÇÃO DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS

A vitamina D é um membro da família de hormônios esteroides que regula a homeostase de cálcio e fosfato, mineralização óssea, metabolismo lipídico e respostas imunológicas (KOLATA, 1975; FELDMAN et al, 2014; SALAMON et al, 2014; LI et al, 2018). A hipovitaminose D é um fenótipo comum na população, está associada a diversas enfermidades como: autismo e esquizofrenia, doenças autoimunes e câncer (PLUM e DeLUCA, 2010; EYLES et al, 2013; SIRAJUDEEN et al, 2019).

Hipovitaminose é definida como níveis de vitamina abaixo dos valores de referência, isto é, deficientes (THOMAS et al, 1998). Em 2017, a Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia alterou as concentrações de referência para a suplementação de vitamina D (VD). A princípio, valores ideais de suplementação em uma população saudável era de 30ng/mL, sendo substituídos por acima de 20ng/mL. Para grupos de risco, como portadores de doenças autoimunes, gestantes e idosos, a suplementação ideal é entre 30 e 60ng/mL. Os grupos que apresentam hipovitaminose, isto é, níveis de VD abaixo de 20ng/mL apresentam maior propensão a raquitismo, osteoporose e fraturas.

A vitamina D é adquirida sobretudo pela exposição solar, através da radiação UV-B, e em menor proporção, através de ingestão de alimentos como ovos e peixes (SEDRANI et al, 1983; BOULION, 2017; PILZ et al, 2019). Alguns fatores podem ser atribuídos a hipovitaminose entre os indivíduos, tais como: coloração da pele, localização geográfica, hábitos pessoais, que incluem alimentares e de exposição ao sol (MITHAL et al, 2009). Entretanto, a hipervitaminose, não é um quadro desejável e sim tóxico, por promover a hipercalcemia (MARCINOWSKA-SUCHOWIERSKA et al, 2018).

A VD apresenta duas formas: vitamina D3 (colecalfiferol ou $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) de origem animal, enquanto a vitamina D2 (ergocalciferol ou $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$) é de origem vegetal (ZHANG e NAUGHTON, 2010; SIRAJUDEEN et al, 2019). A síntese da vitamina D3 se inicia na pele, quando o precursor 7-deidrocolesterol (7-DHC) é convertido a pré-vitamina D3, através da enzima 7-deidrocolesterol-redutase (DHCR7), a partir da incidência solar. Para coibir a toxicidade pela exposição prolongada da radiação UVB, pode haver a conversão de dois produtos inativos: taquisterol e lumisterol (ZHU e OKAMURA, 1995; NORMAN, 2008; CASTRO, 2011; JEON e SHIN, 2018).

A pré-vitamina D3 é um composto termoinstável, que sofre isomerização térmica, originando a VD3. A vitamina D3 então é dirigida para o fígado através da enzima DBP (D-binding protein), sofrendo hidroxilação no carbono 25 pela enzima 25-hidroxilase, originando então, a 25-hidroxivitamina D₃ ($25(\text{OH})\text{D}_3$) (BORTMAN et al, 2002; PLUM e DeLUCA, 2010; FELDMAN et al, 2014). A $25(\text{OH})\text{D}_3$ que é a forma circulante da

vitamina D, se acopla a DBP, e é então carregada para locais onde a enzima 1- α -hidroxilase irá transformá-la na forma ativa: 1,25(OH) $_2$ D $_3$ ou calcitriol (Figura 8) (PLUM e DeLUCA, 2010; CASTRO, 2011; SIRAJUDEEN et al, 2019).

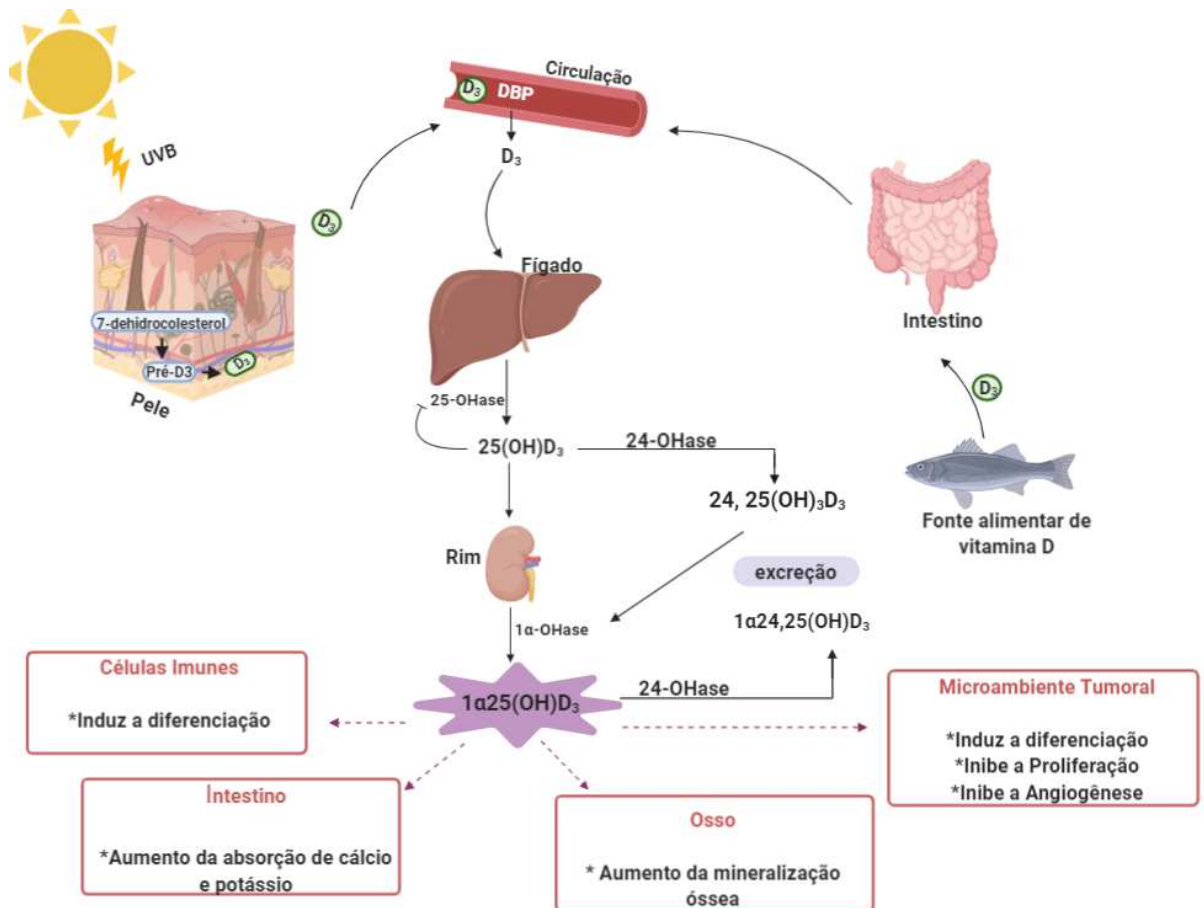


Figura 8: Síntese de Vitamina D (Fonte: DEEB et al, 2007)

O efeito biológico da vitamina D é desencadeado através da ativação de seu receptor VDR (*vitamin D receptor*) (KATO, 2000; NORMAN, 2008). O VDR é um receptor nuclear, que ao se ligar com alta afinidade a vitamina D regula genes relacionados a diversas funções biológicas. A partir dessa junção, o calcitriol ocasiona a fosforilação do VDR e heterodimerização com uma das três isoformas do receptor RXR (*retinoide-x-receptor*). O complexo formado por RXR-VDR-calcitriol se liga ao VDRE (*vitamin D response elements*) na região promotora, sucedido do recrutamento de fatores de repressão ou ativação da transcrição gênica (PLUM e DeLUCA, 2010; FELDMAN et al, 2014). Ao contrário da ativação da VD por resposta genômica que pode perdurar por dias, os efeitos da via não-genômica são associados em segundos

e se dá pela interação entre vitamina D e o seu receptor localizado na membrana plasmática (JEON e SHIN, 2018).

Intrinsecamente, a vitamina D se associa a neoplasias por apresentar características anticarcinogênicas, regulando a proliferação, diferenciação e apoptose celular. (KATO, 2000; BORTMAN et al, 2002). Os primeiros estudos relacionando a interação entre VD e câncer, denotam aproximadamente 80 anos, sendo que Garland e Garland (1980), conduziram um estudo epidemiológico demonstrando a correlação inversa entre exposição solar e desenvolvimento do câncer de cólon.

A $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ pode inibir a proliferação de células neoplásicas por ação de alguns mecanismos anticarcinogênicos. O primeiro é reduzir a expressão de EGF-R, e aumentar a expressão de TGF- β , levando a ativação de caspases – proteases que participam do processo apoptótico (JEON e SHIN, 2018). Acrescidos a isso, sabe-se a importância de prostaglandinas no processo inflamatório e angiogênico, sendo que a administração de calcitriol leva a uma inibição de sua síntese, bem como de COX-2 enzima responsável por sua produção (BOUILLON et al, 2006). Condizente aos mecanismos de ação do calcitriol, Sabzichi et al (2017) demonstraram a redução significativa da viabilidade celular de células MCF-7, com o tratamento conjunto de doxorrubicina acrescido de vitamina D.

O metabolismo lipídico também é modulado por meio da vitamina D, sendo correlacionados os baixos níveis a indivíduos obesos (BELL et al, 1985). A $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ atua sobre o processo de adipogênese e diferenciação de adipócitos, uma vez que, Ricciardi et al (2015) demonstraram que a vitamina D inibe a diferenciação de adipócitos, em que o calcitriol correlaciona-se com níveis inversos ao PPAR γ , mostrando ser um regulador negativo do metabolismo de lipídeos.

Outros estudos demonstraram que a VD regula negativamente a degradação das proteínas SREBP, que estão relacionadas com a lipogênese (ASANO et al, 2017). Paralelamente, Li et al (2018) demonstraram a presença de inúmeros corpúsculos lipídicos nas células da musculatura esquelética de camundongos deficientes em vitamina D, acompanhado do aumento da expressão de PPAR e perilipina 2 (proteínas associadas aos CL's) analisados no mesmo estudo. E em terapêutica para

osteosarcoma, a combinação entre vitamina D e doxorrubicina, um fármaco amplamente utilizado em neoplasias, demonstrou a inibição da via de proliferação e sobrevivência celular: a mTOR – que possui atribuições no metabolismo lipídico (MAAYAH et al, 2018).

1.2.1.3 INFLUÊNCIA DA VIA mTOR NO METABOLISMO LIPÍDICO

A via mTOR (*mammalian target of rapamycin*) é uma serina-treonina quinase que regula proliferação e sobrevivência celular, síntese de proteínas e metabolismo (GUERTIN e SABATINI, 2005; SAXTON e SABATINI, 2017). Inúmeras patologias são associadas a via mTOR como câncer, doenças neurológicas e diabetes (HUA et al, 2019).

A história da via mTOR se inicia na década de 1960 com a descoberta de uma bactéria que apresentava um componente com propriedades antitumorais, antifúngicas e imunossupressoras, o qual foi posteriormente utilizado para usos clínicos. A esse composto proveniente da bactéria *Streptomyces hygroscopicus* foi denominado rapamicina (VEZINA et al, 1975; SAXTON e SABATINI, 2017). Na década de 1990, análises bioquímicas apontaram o alvo da rapamicina em mamíferos, sendo posteriormente designado *mammalian target of rapamycin* (mTOR) (BROWN et al, 1994; SABATINI et al, 1994; LAPLANTE e SABATINI, 2012).

O mTOR apresenta dois complexos distintos: mTOR1 e mTOR2, os quais podem ser ativados por diversos fatores, intra ou extracelulares, como por exemplo: fatores de crescimento, aminoácidos, hipóxia, danos ao DNA e estresse (CHIANG e ABRAHAM, 2007; HUA et al, 2019). Ambos os complexos apresentam grupo de proteínas, as quais mTOR e mLST8 (ou GβL) são compartilhados. Diferenciando os complexos, mTOR1 é composto por proteínas raptor (*regulatory-associated protein of TOR*) e deptor (*DEP-domain-containing mTOR-interacting protein*), além de AKT1S1 (*proline-rich AKT1 substrate 1*). Enquanto, mTOR2, que é insensível a rapamicina, é caracterizado por proteínas deptor, rictor (*rapamycin-insensitive companion of*

mTOR), mSIN1 (*stress-activated protein kinase interacting protein 1*) e protor 1/2 (*protein observed with rictor*) (LAPLANTE e SABATINI, 2012; PERL, 2016).

O processo de ativação se inicia quando a mTOR recebe sinais da membrana plasmática por uma via de transdução de sinais, que inclui a proteína quinase B (PKB/AKT) e a proteína PI3K (*phosphoinositide 3-kinases*), dependendo do tipo celular estudado. A síntese proteica deve-se, sobretudo, a fosforilação de dois fatores-chaves: S6K1 e 4EBP1, que regulam a transcrição de genes relacionados a sua função efetora (Figura 9) (GINGRAS et al., 2001; CHEN e LONG, 2018).

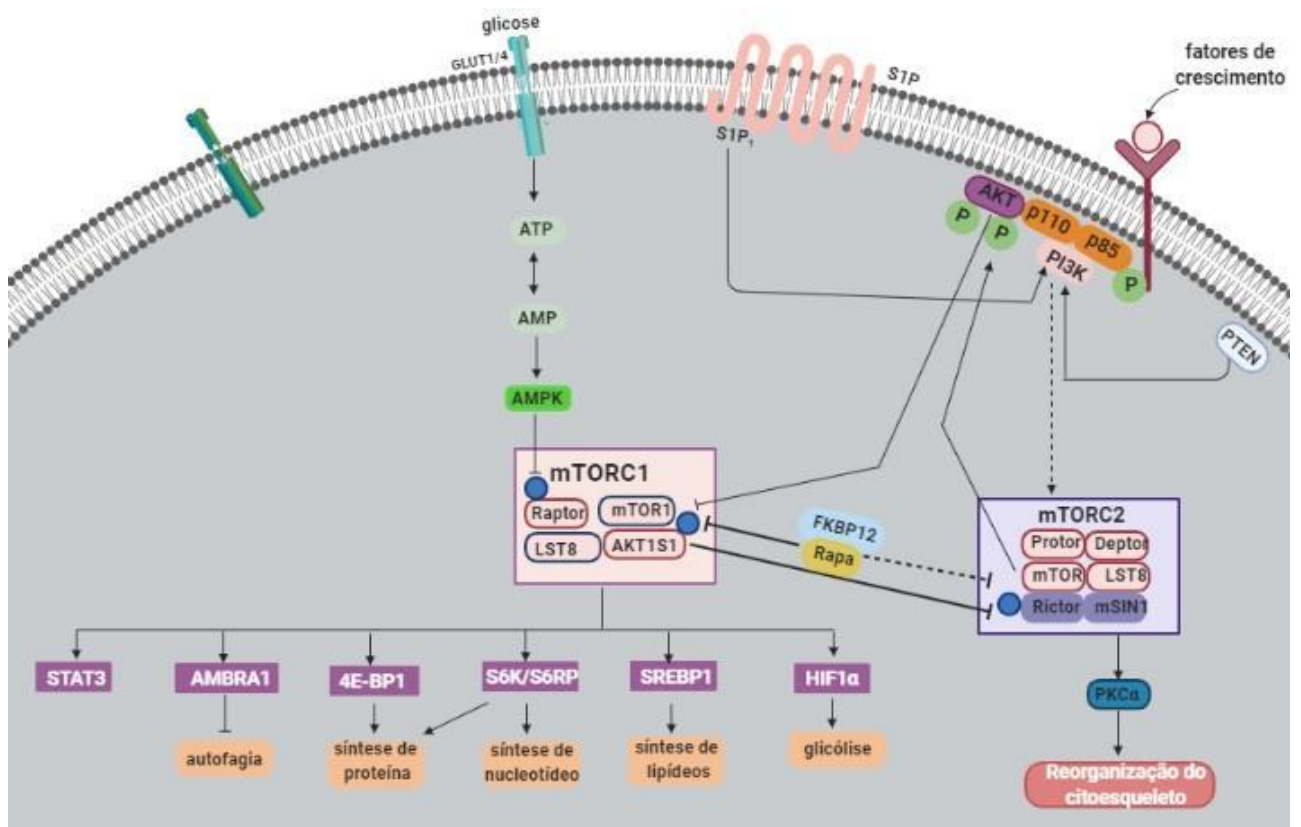


Figura 9: Via de sinalização mTOR (Fonte: PERL, 2016).

Rapamicina ou Sirulimus, inibidor da mTOR1, tem sido amplamente utilizado em terapêuticas por inibir a transcrição de genes de proliferação e sobrevivência; porém mTOR2 mostra-se insensível a ação desse fármaco (JACINTO et al, 2004). Seu processo de inibição na mTOR1 consiste na formação de um composto ternário entre mTOR-rapamicina-FKBP12, o qual rapamicina-FKBP12 se liga à mTOR e suprime a fosforilação de S6K1 e 4EBP1e suas funções relacionadas (CHUNG et al,

1992; SABATINI, 2006; TSANG et al, 2007). A inativação desta sinalização pode ocorrer também na ausência de estímulos, tais como: nutrientes e condições de estresse, promovendo a autofagia que é fundamental para respostas antitumorais (CRUZADO, 2008).

Em câncer a sinalização por mTOR está relacionada intrinsecamente com o desenvolvimento de neoplasias. Alterações desencadeadas, sobretudo, pela ação dos oncogenes, podem acarretar a superexpressão de proteínas relativas à proliferação e crescimento celular, bem como na síntese de lipídeos; ao passo que, a autofagia pode ser regulada negativamente (DAZERT e HALL, 2011). A utilização da rapamicina e seus análogos têm sido uma abordagem terapêutica para diversas desordens como o câncer, em que temsirolimus e everolimus, alguns dos análogos, são utilizados em cânceres renais e linfomas (DANCEY, 2010; KIM e GUAN, 2019). O emprego do inibidor da mTOR demonstrou ser efetivo na redução do VEGF, uma citocina importante na promoção da angiogênese e metástase, possuindo então ação antitumoricida (CRUZADO, 2008; TSANG et al, 2007).

A síntese lipídica mediada por mTOR1, é desencadeada por um mecanismo dependente de S6K1 e pela ativação de fatores transcricionais da proteína SREBP e, portanto, com o crescimento celular (TAKEI e NAWA, 2014; KIM e GUAN, 2019). Pelo fato de que progressão tumoral está associada a lipogênese e consequente formação de corpúsculos lipídicos, alguns estudos vêm elucidando a formação de CL's em cânceres e a ativação da via mTOR (ACCIOLY et al, 2008; FAZOLINI et al, 2015; CRUZ et al, 2020).

Fazolini et al (2015) analisaram a biogênese de corpúsculos lipídicos, síntese de mediadores inflamatórios e proliferação celular mediante a administração de leptina, uma adipocina secretada por tecido adiposo, em células intestinais. A leptina foi capaz de modular a formação de CL's, a síntese de mediadores inflamatórios e proliferação celular por meio da sinalização mTOR.

Sendo assim, mediante a resultados preliminares do nosso grupo em que, células 4T1 e 67NR apresentaram elevado número de corpúsculos lipídicos, o presente estudo visa analisar a influência de produtos secretados das linhagens

tumorais mamárias, com relação ao metabolismo lipídico e vias de sinalização, em macrófagos. Tendo em vista que, regulação do processo autofágico, inibição da lipogênese e proliferação celular são alguns dos alvos promissores para terapêuticas futuras em neoplasias.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a modulação das vias de PPAR-gama, da via mTOR e da vitamina D na formação de corpúsculos lipídicos e na síntese de mediadores inflamatórios nas linhagens celulares tumorais de mama; bem como o papel destas vias na ativação de macrófagos em modelos de interação com células tumorais *in vitro*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.2.1 Analisar a formação de corpúsculos lipídicos e síntese de PGE₂ nas linhagens tumorais;
- 2.2.2 Analisar a viabilidade celular e a formação de corpúsculos lipídicos nas linhagens tumorais 4T1 e 67NR tratada com vitamina D (calcitriol);
- 2.2.3 Avaliar o papel da vitamina D (calcitriol) na formação de corpúsculos lipídicos e síntese de mediadores inflamatórios em macrófagos estimulados *in vitro*;
- 2.2.4 Avaliar o papel da via mTOR na formação de corpúsculos lipídicos e síntese de mediadores inflamatórios em macrófagos estimulados *in vitro*
- 2.2.5 Avaliar o papel de PPAR-gama na formação de corpúsculo lipídicos e síntese de mediadores inflamatórios em macrófagos estimulados *in vitro*

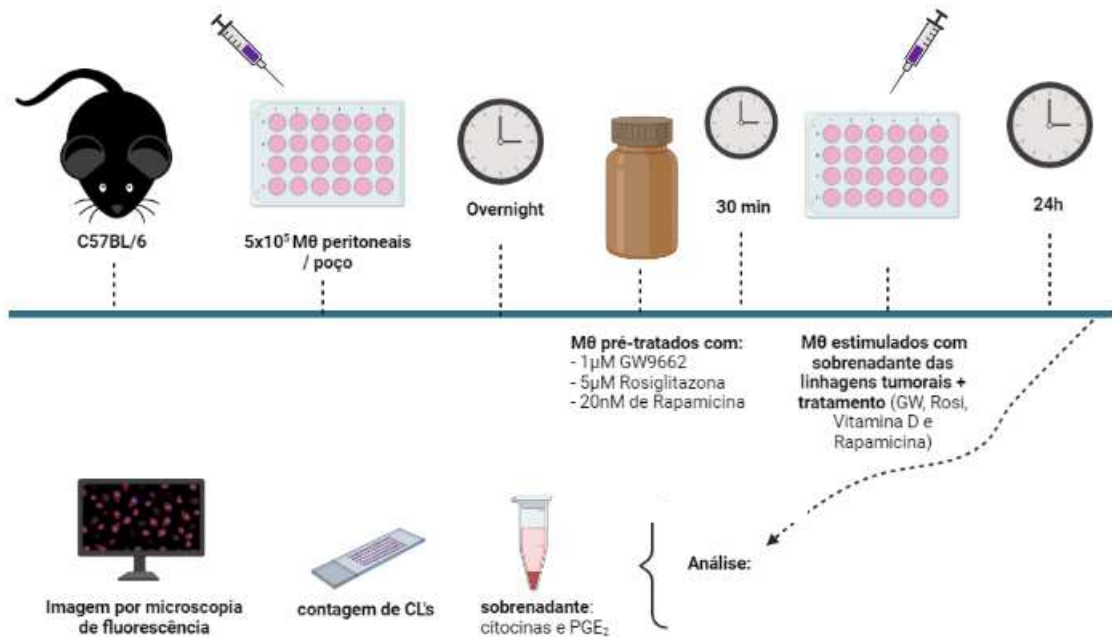
3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LINHAGENS CELULARES

As linhagens tumorais mamárias, metastásica (4T1 - ATCC® CRL – 2539TM) e não metastásica (67 NR) foram cedidas pela Dra. Jacy Gameiro do Laboratório de Imunologia das Doenças Infecto Parasitárias e Obesidade (LIDIPO) da Universidade Federal de Juiz de Fora. As alíquotas contendo 1×10^6 células das linhagens 4T1 e 67NR foram mantidas em nitrogênio líquido (-196°). Para os experimentos, as alíquotas foram descongeladas e cultivadas em meio RPMI-1640 (contendo: 10% de Soro Fetal Bovino (SFB); 1% de Penicilina e Estreptomicina e 1% L-glutamina (Sigma-Aldrich, USA)) em garrafas de cultura celular de 75cm^2 . As linhagens celulares foram mantidas a 37°C em atmosfera de gás carbônico (5% CO_2), e utilizadas para experimentos posteriores ou para a manutenção da cultura no Laboratório de Biologia Celular – ICB – UFJF.

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

3.2.1 Estimulação de macrófagos peritoneais com sobrenadante das linhagens tumorais e tratados com: Rapamicina, GW9662, Rosiglitazona e Vitamina D

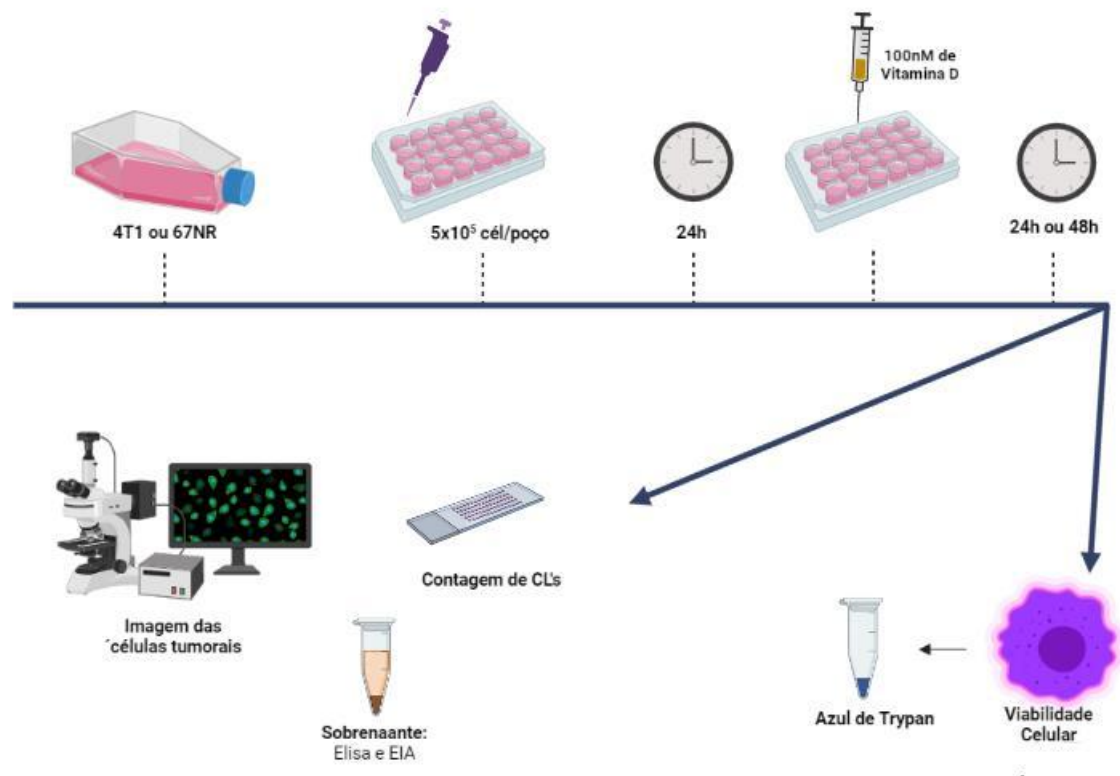


Camundongos machos C57BL/6 foram cedidos pelo biotério do Centro de Biologia da Reprodução – CBR- UFJF, estando de acordo com protocolo aprovado pelo CEUA/UFJF (018/2018 e 021/2015). Animais deficientes de PI3K foram gentilmente doados pelo Laboratório de Imunologia da UFJF. Estes animais foram eutanasiados em câmaras de CO₂ para a coleta de macrófagos peritoneais. Após coletados os macrófagos, houve a contagem do número de células totais por meio de Azul de Trypan, para então o plaqueamento de 5 x10⁵/poço (em placas de 24 poços) e de 2x10⁶/poço (em placas de 6 poços). Sucedendo a contagem dos macrófagos, estes foram centrifugados (Heraeus™ Megafuge™ 16R), por 5 minutos à 1100rpm e 4°C, para a formação do pellet. Após essa etapa, os MΦ foram em cultura celular e mantidos com meio RPMI1640 suplementado com 2% de Soro Fetal Bovino (SFB); 1% de Penicilina e Estreptomicina e 1% L-glutamina (Sigma-Aldrich, USA).

Após 24 horas, as placas cultivadas foram lavadas com PBS para posterior pré-tratamento por 30 minutos com: rapamicina (20nM), rosiglitazona (5μM) ou GW (1μM). Em seguida, as células receberam os estímulos (sobrenadante das células tumorais) acrescidos com as substâncias administradas durante o pré-tratamento ou o tratamento com Vitamina D (100nM) permanecendo até o final do experimento (24 horas depois). O sobrenadante das placas foi guardado em eppendorfs para posterior

dosagem de citocinas por ELISA, e nas placas de 6 poços, as células foram processadas para a análise por Western Blotting. As lamínulas contidas nesse experimento foram posteriormente utilizadas para a contagem dos corpúsculos lipídicos, bem como processamento de imagens por meio do microscópio de fluorescência.

3.2.1 Viabilidade Celular e análise do metabolismo lipídico das linhagens tumorais mamárias tratadas com Vitamina D



As linhagens 4T1(ATCC® CRL – 2539™) e 67NR após alcançarem a confluência, foram transferidas em placas de cultivo celular de 24 poços. Procurou-se avaliar dois aspectos: o primeiro se a administração da vitamina D seria suficiente em reduzir a viabilidade das células tumorais estudadas; e em um segundo momento, o efeito da vitamina D diretamente nas células tumorais, no âmbito do metabolismo lipídico.

Referente à viabilidade celular, após o plaqueamento das células tumorais em placas de cultivo de 24 poços, as mesmas foram mantidas em meio RPMI-1640 (contendo 10% de Soro Fetal Bovino (SFB); 1% de Penicilina e Estreptomicina e 1% L-glutamina (Sigma-Aldrich, USA)) sob atmosfera de 5% CO₂ e 37°C. Após a aderência das mesmas, os poços foram lavados com PBS e administrou-se em conjunto ao meio padrão, 100 nM de Vitamina D. Após 24 e 48 horas com o tratamento, o sobrenadante foi retirado e adicionou-se o Azul de Tripán, sendo analisadas as viabilidades das linhagens tumorais estudadas nos intervalos de tempo descritos.

Para averiguar se a vitamina D é capaz de modular a formação de corpúsculos lipídicos nas linhagens tumorais, após a aderência e tratamento com Vitamina D nas células tumorais, 4T1 e 67 NR, estas foram fixadas com formalina 3,7% para posterior contagem de corpúsculos lipídicos. O sobrenadante foi coletado para dosagens de citocinas e mediadores inflamatórios.

3.3 VITAMINA D

O estudo foi conduzido pela utilização de duas vitaminas D, aqui denominadas VDc (Calcijex) e VDf (vendida comercialmente em farmácia).

A VDc descrita nesse estudo se refere a forma intravenosa do calcitriol, Calcijex[®], produzida pela empresa biofarmacêutica americana AbbVie. O composto apresenta número de lote 833268E02 e, sua concentração é de 1mcg/mL. A sua utilização é destinada para o tratamento de hipocalcemia e, restrito para uso adulto.

A VDf discriminada no trabalho, condiz com a DePura 500, vendida comercialmente em farmácias, sob forma de colecalciferol e de uso oral. DePura 500 apresenta 14.000UI/mL e é produzida pela farmacêutica Sanofi-Aventis, sendo destinada para a suplementação vitamínica de uso pediátrico (acima de 4 anos) e adulto.

3.4 COLORAÇÃO DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS

3.4.1 Oil Red O

A solução estoque de oil red O (1-([4-(Xylylazo) xylyl]azo)-2-naphthol) (Sigma Aldrich) foi preparada a 0,3% (0,3 g de oil red O qsp 100mL de isopropanol (ácido isopropílico) (Sigma Aldrich)). Em seguida, filtrada e acondicionado em temperatura ambiente. A solução de uso foi preparada no dia da coloração. Para isso, diluiu-se 6 mL da solução estoque em 4mL de água destilada. Concluída a diluição, a solução foi novamente filtrada e utilizada para a coloração de corpúsculos lipídicos.

As células das linhagens tumorais e os macrófagos estimulados, após fixadas, foram lavados com água destilada e coradas no próprio poço das placas de cultura. Para isso, foi adicionada a solução de uso de Oil red O em quantidade suficiente para cobrir a lamínula, e incubada por 5 minutos. Decorrido o tempo, as células foram lavadas 5 vezes com água destilada e as lâminas montadas com meio de montagem contendo DAPI (VECTASHIELD® mounting medium containing DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) para a marcação do núcleo das células.

3.4.2 Bodiipy

Solução estoque de Bodipy 493/503 (4,4-Difluoro-1,3,5,7,8-Pentamethyl-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-Indacene) (Molecular probes) foi obtida através da sua diluição em 1mL de DMSO. Para a solução de trabalho, preparada no dia da coloração, parte da solução estoque foi diluída em PBS na proporção de 1:2500 para posterior marcação dos corpúsculos lipídicos. Após o término da coloração das lâminas (Oil Red O ou Bodipy), os corpúsculos lipídicos foram contados em 50 células consecutivas após análise em microscópio de fluorescência BX-51 acoplado com câmera digital XC-50, sob objetiva de 100x (Olympus, Tokyo, Japan).

3.5 QUANTIFICAÇÃO DE IL-10 e TNF- α

A produção das citocinas pró-inflamatória (TNF- α) e anti-inflamatórias (IL-10 e TGF-beta) desencadeada pelos macrófagos tratados e estimulados, e pelas células

tumorais, foram dosadas por ELISA. Foram utilizados os kits Duo set (R&D Systems) e os ensaios seguiram as determinações do fabricante. A quantificação foi mensurada a partir das curvas padrão proveniente da diluição realizada. A leitura foi realizada como descrito acima em 450 nm utilizando o programa Softmax Pro

3.6 CAPTURA E PROCESSAMENTO DAS IMAGENS

As imagens foram capturadas a partir das lâminas confeccionadas para a análise quantitativa e qualitativa dos macrófagos tratados ou não, e estimulados ou não, com o meio condicionado das linhagens tumorais, permitindo o caráter comparativo dos tratamentos analisados quanto a formação de corpúsculos lipídicos. As imagens foram processadas por meio do programa CellSens Dimension em microscópio de fluorescência OlympusDP73, no aumento de 100x.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA E ELABORAÇÃO DOS GRÁFICOS

Os gráficos foram obtidos por meio do programa GraphPad Prism®7(GraphPad Software). A análise dos resultados foi mediante Média \pm EPM e analisados estatisticamente segundo ANOVA seguido pelo teste de Tukey, com significância de $p < 0.05$.

3.8 BIOINFORMÁTICA: HEATMAP

Para performarmos as análises *in silico*, o dataset GSE113034, publicamente disponível na plataforma Gene Expression Omnibus Datasets (GEO Datasets), foi utilizado. Para gerar o heatmap os valores de expressão dos genes *il1b*, *vegfa*, *pparg*, *mmp9*, *vdr*, *arg1*, *inos*, *tnfaip3*, *il4ra*, *bcl2a1d*, *tgfb1*, *hif1a*, *EIF4EBP1* e *RPS6KB1*, foram retirados da tabela de Series Matrix, também disponível no GEO Datasets, e normalizados por Log2. Em seguida estes resultados foram ajustados em tabela que

foi submetida ao site ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data (BETA) (ut.ee).

4 RESULTADOS

4.1 CÉLULAS TUMORAIS

A presença de inúmeros corpúsculos lipídicos em tecidos neoplásicos é uma observação patológica comum (MARTIN e PARTON, 2006; BOZZA e VIOLA, 2010). A partir do pressuposto, foi averiguada a formação dessas organelas nas linhagens tumorais mamárias: 4T1 (metastática) e 67NR (não metastática) nos intervalos de tempo 24 e 48 horas (Figura 10).

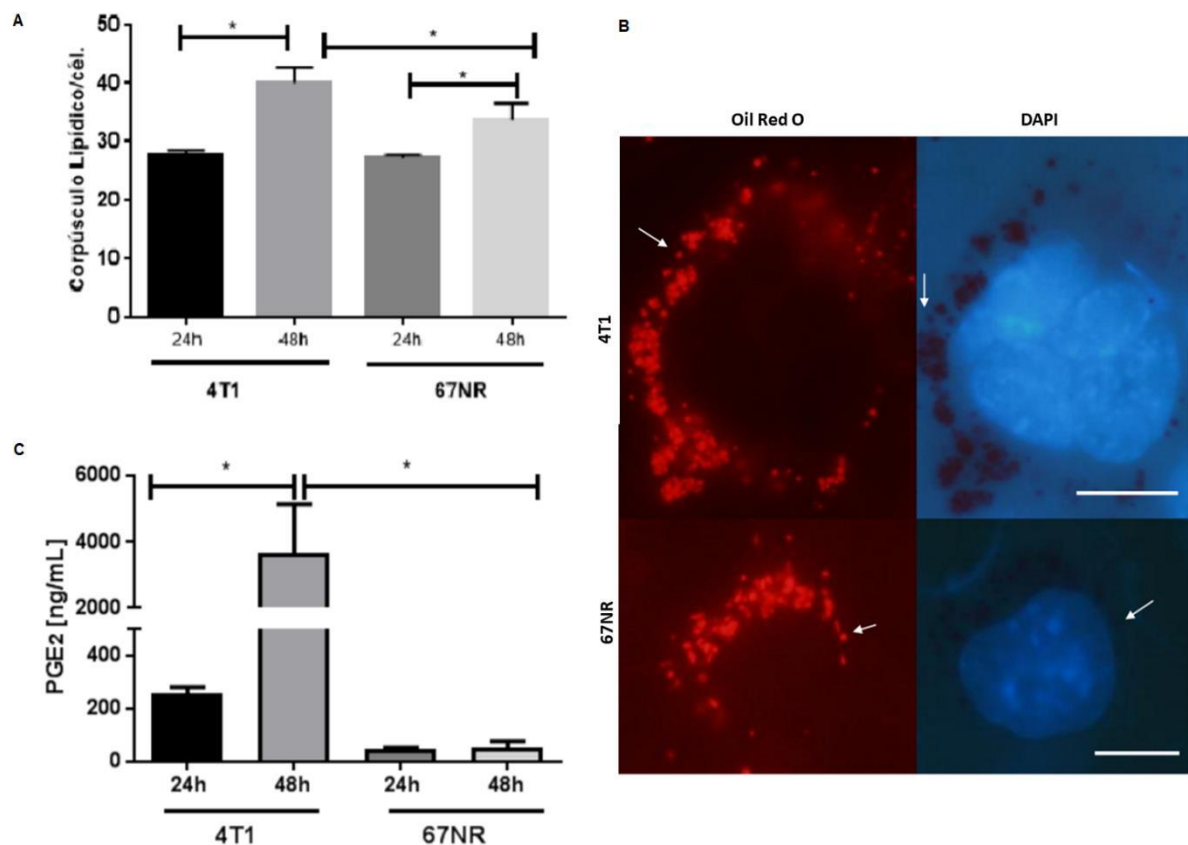


Figura 10: Formação de Corpúsculos lipídicos e síntese de prostaglandina E₂ (PGE₂) nas linhagens tumorais mamárias, 4T1 e 67NR, nos tempos de 24 e 48 horas. **(A)** Biogênese de CL's nas linhagens tumorais. As linhagens tumorais mamárias metastática (4T1) e não metastática (67NR) foram mantidas em cultura celular em meio RPMI1640 suplementado com soro fetal bovino e, penicilina e estreptomicina. Para a quantificação de CL's, foram contadas 50 células, em cada lâmina e, analisadas por microscópio de fluorescência. **(B)** Corpúsculos Lipídicos marcados com Oil Red O nas linhagens tumorais mamárias **(C)** Produção de Prostaglandina E₂ nas linhagens 4T1 e 67NR. foi obtida no sobrenadante das linhagens tumorais mamárias e realizadas por meio do Ensaio Imunoenzimático. Barras representam média \pm EPM, n = 3. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) são indicadas por *. O gráfico foi obtido pelo programa Graphpad Prism 5® utilizando ANOVA.

Nossos resultados demonstraram que ambas as linhagens apresentam elevada formação de corpúsculos lipídicos, e que a biogênese dessa organela é dependente de tempo. As linhagens estudadas exibiram aumento significativo na biogênese de CL's em 48 horas de cultura quando comparado ao tempo de 24 horas de cultivo.

Interessantemente, no período de 48 horas, a linhagem metastática (4T1) apresentou maior formação de corpúsculos lipídicos quando comparados a linhagem 67NR. Esse resultado pode ser atribuído pelo fato que a linhagem 4T1 apresenta natureza invasiva, a qual é dependente do metabolismo lipídico para a promoção e progressão tumoral, visto que CL's são sítios de produção de prostaglandina E₂ (ACCIOLY et al, 2008; BOZZA e VIOLA, 2010, FAZOLINI et al, 2015).

Os corpúsculos lipídicos são organelas presentes em células envolvidas com processos inflamatórios e sítios de produção de mediadores inflamatórios (ALMEIDA et al, 2018). Investigamos posteriormente, se a elevada biogênese de corpúsculos lipídicos encontradas nas linhagens tumorais, é condizente com níveis de prostaglandina E₂ produzidas por estas células (figura 10). Nossos resultados apontaram elevada produção de PGE₂ na linhagem metastática 4T1 quando comparada a 67NR, sobretudo no tempo de 48 horas.

Os níveis de prostaglandina apresentados pela linhagem 4T1 estão condizentes a biogênese de CL's quantificados anteriormente. A prostaglandina é um mediador inflamatório proveniente da metabolização do ácido araquidônico, e em neoplasias, PGE₂ está associada a angiogênese sendo, portanto, associada ao desenvolvimento de tumores (WANG e DuBOIS, 2006).

Algumas patologias, as quais se incluem câncer e obesidade, são reguladas através da ativação da via mTOR (LAPLANTE E SABATINI, 2012). A partir do pressuposto, avaliamos a biogênese de corpúsculos lipídicos, bem como a síntese de prostaglandina nas linhagens tumorais mamárias, acrescidas do pré-tratamento com rapamicina, inibidor da via mTOR, em 24 e 48 horas (figura 11).

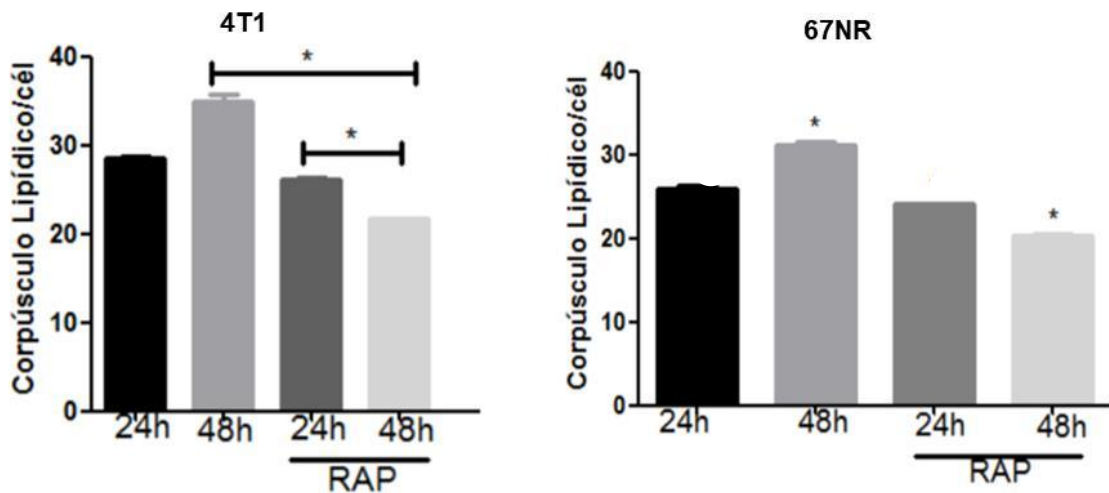


Figura 11: Formação de Corpúsculos lipídicos nas linhagens tumorais mamárias, 4T1 e 67NR, pré-tratadas com 20nM de rapamicina nos tempos de 24 e 48 horas. Após a aderência das linhagens tumorais mamárias nas placas de cultivo, em condição padrão, estas receberam o pré-tratamento com 20nM de rapamicina por 30 minutos. Barras representam média \pm EPM, $n = 3$. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) são indicadas por *. O gráfico foi obtido pelo programa Graphpad Prism 5® utilizando ANOVA.

Com base na figura 11, pode-se inferir que o pré-tratamento com rapamicina nas linhagens tumorais mamárias, regulou negativamente a biogênese de CL's, sobretudo no tempo de 48 horas. Importante destacar que a dosagem da rapamicina utilizada não apresentou toxicidade em outros modelos celulares (FUMAROLA et al, 2005; YELLEN et al, 2011; FLETCHER et al, 2013).

Responsável pela regulação de diversas atividades celulares como: angiogênese, produção de matriz extracelular e apoptose; TGF- β apresenta importância no desenvolvimento tumoral (LIN e KARIN, 2007). As funções associadas a esta citocina se devem a ativação desta, seguida pela interação com seu receptor na superfície celular. (HAYASHI e SAKAI, 2012).

Amplamente distribuído entre todos os tipos celulares, as isoformas de TGF- β e seus receptores, regulam uma série de vias de sinalização celular. Em relação a carcinogênese, a interação receptor com TGF- β , promove a fosforilação dos R-Smad

(Smad regulado por receptor), e desencadeia a sinalização via Smad (LEBRUN, 2012). No entanto, há ativação de vias sinalizatórias independentes de Smad, exemplificadas pela via PI3K/AKT e pela transdução de sinais de mTOR (LAMOUILLE e DERYNCK, 2007).

Níveis desta citocina foram quantificados por ELISA nas linhagens tumorais mamárias tratadas com 20nM de rapamicina, inibidor da via mTOR (figura 12A e 12B).

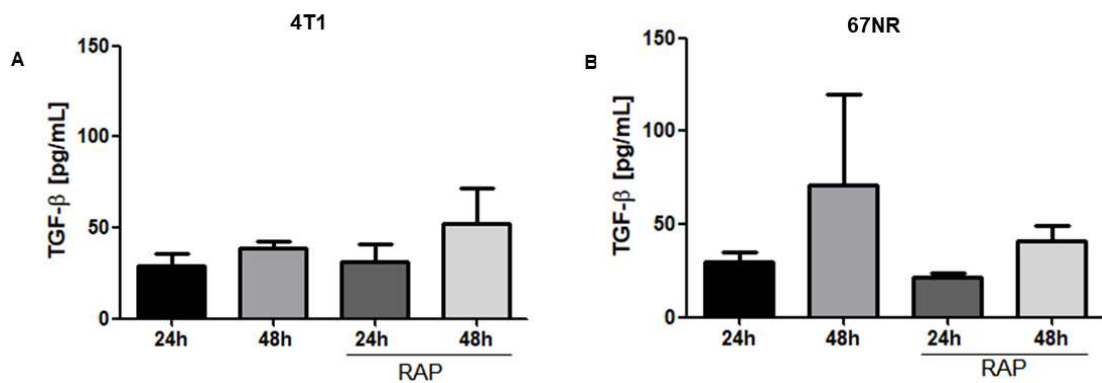


Figura 12: Produção de TGF-β nas linhagens tumorais mamárias, 4T1 e 67NR, pré-tratadas com rapamicina no tempo de 24horas. Após o cultivo celular das linhagens tumorais mamárias, seguido do pré-tratamento com rapamicina por 30minutos, estas foram mantidas em condição padrão por 24horas. Após 24horas, o sobrenadante foi coletado para mensurar os níveis de TGF-β por Elisa. Barras representam média \pm EPM, n = 3. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) são indicadas por *. O gráfico foi obtido pelo programa Graphpad Prism 5® utilizando ANOVA.

Nossos resultados apontaram que não houve nenhuma diferença significativa entre os grupos quando as linhagens tumorais foram pré-tratadas com o inibidor da via mTOR (rapamicina) nos tempos analisados.

Anteriormente, nosso grupo demonstrou que a suplementação do meio de cultivo, estava diretamente relacionado com a viabilidade das linhagens tumorais. Mediante a isso, avaliou-se a viabilidade de 4T1 e 67NR pré-tratadas com rapamicina (CAMPOS et al, em preparação) (figura 13).

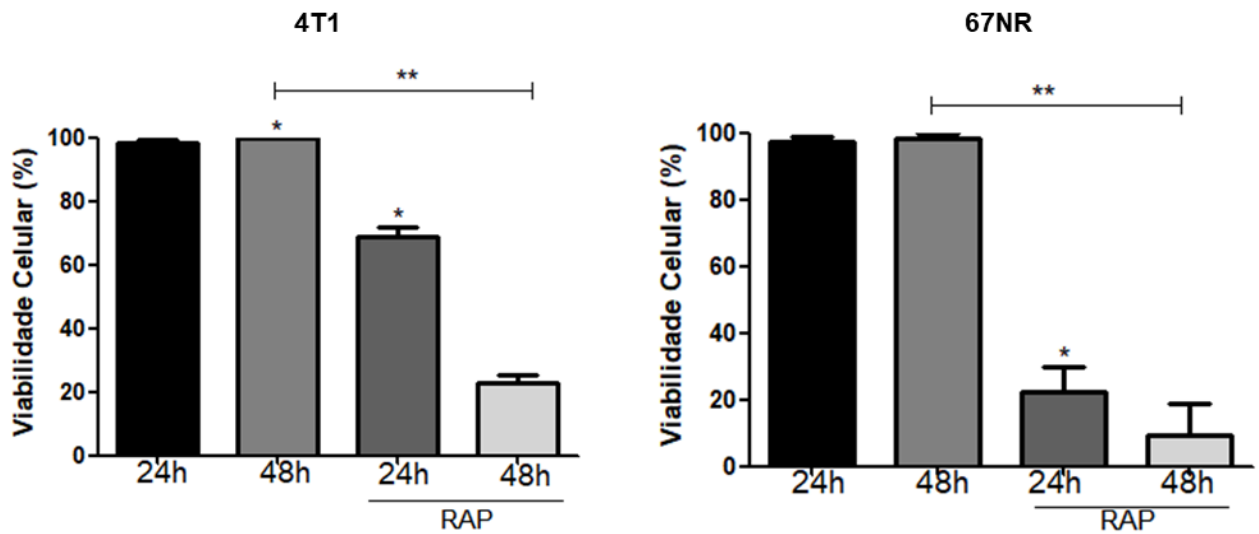


Figura 13: Viabilidade celular de 4T1 e 67NR pré-tratadas com rapamicina. De modo similar a quantificação de citocinas, após 24 ou 48 horas do pré-tratamento; foi coletado o sobrenadante e, na placa de cultura, foi adicionado Azul de Trypan para análise da viabilidade celular. Barras representam média \pm EPM, $n = 3$. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) são indicadas por * (em 24horas) e indicadas por ** (em 48horas). O gráfico foi obtido pelo programa Graphpad Prism 5® utilizando ANOVA.

O pré-tratamento com o inibidor da via mTOR, reduziu de forma significativa as viabilidades celulares nas linhagens tumorais mamárias metastática e não metastática, em ambos os tempos. Sobretudo, a linhagem 67NR (não metastática) apresentou uma diminuição acentuada em sua viabilidade, em ambos os tempos analisados, quando comparada a linhagem 4T1.

Conhecendo o papel da vitamina D na modulação do metabolismo de lipídeos (SALAMON et al, 2014; RODRIGUES et al, em preparação) investigamos o seu papel na viabilidade celular da linhagem 4T1 em 24 e 48horas, mantidas sob condição padrão (meio RPMI 1640 e 10% SFB). Nossos resultados demonstraram que a linhagem metastática (4T1) apresentou significativa redução na viabilidade, mediante ao tratamento com a vitamina D DePura (VDf) quanto ao uso de *calcijex* (VDc), em ambos os tempos analisados: 24 e 48h (Figura 14^a). Interessante notar ainda que, em 48horas, o tratamento não somente reduziu a viabilidade comparada ao controle, mas como também entre os dois tratamentos com vitamina D.

Uma vez que Accioly et al (2008) demonstraram a presença de inúmeros corpúsculos lipídicos em sítios neoplásicos intestinais, avaliou-se a formação de CL's na linhagem mamária metastática (4T1) tratadas com 100nM vitamina D (*Calcijex* e

DePura) nos tempos de 24 e 48 horas. Interessantemente, o tratamento com vitamina D, além de diminuir a viabilidade celular, implicou na redução significativa na biogênese das organelas em ambos os tempos e tratamentos com VD (Figura 14B).

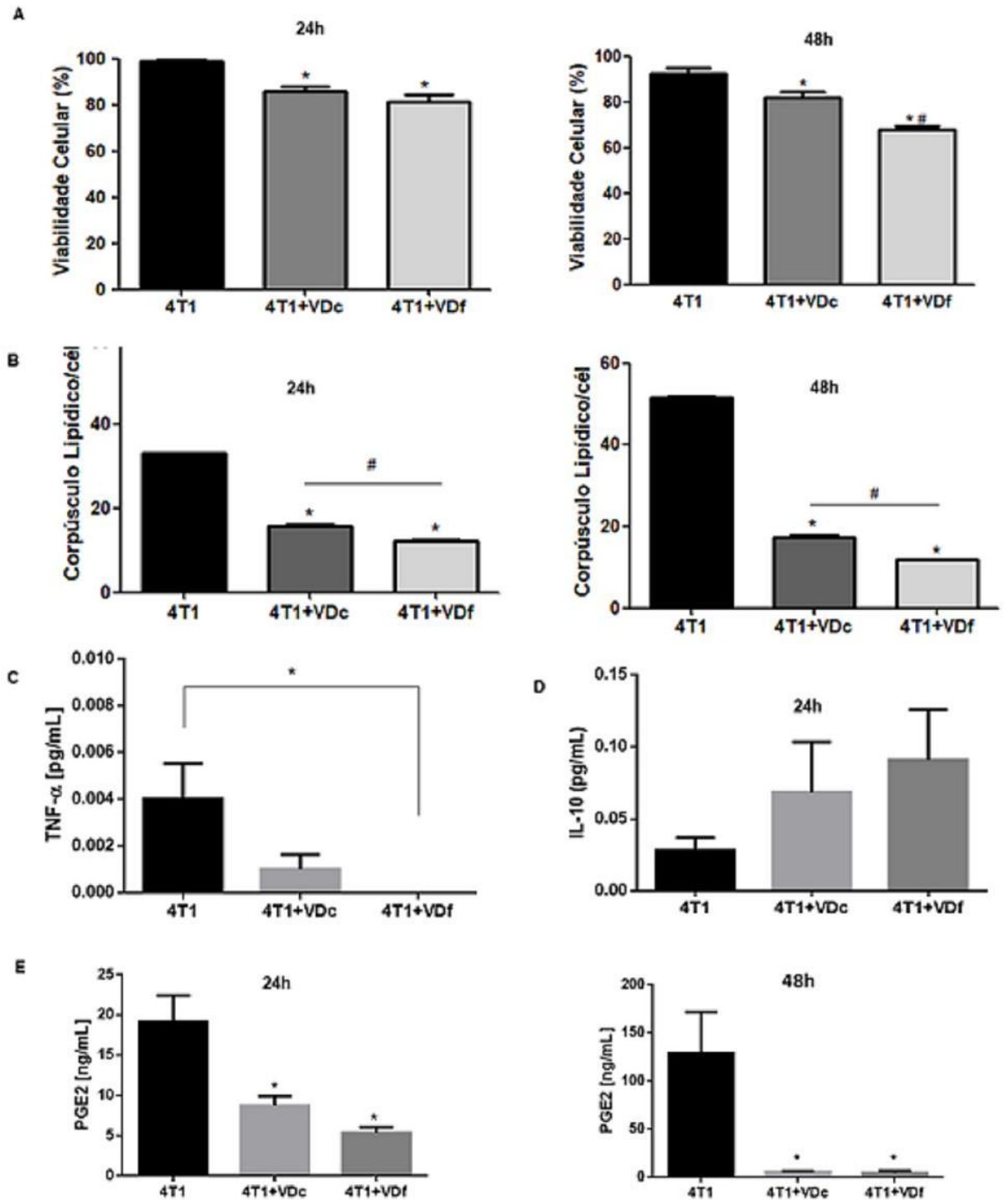


Figura 14: Metabolismo lipídico, síntese de citocinas e Prostaglandina E₂ (PGE₂) e viabilidade celular de 4T1 tratada com 100nM de Vitamina D em 24 e 48 horas. (A) Viabilidade celular de 4T1 tratada com

Calcijex (VDc) ou DePura (VDf) em 24h e 48h; **(B)** Formação de CL's em 4T1 tratadas com vitamina D. Níveis de TNF- α **(C)**. **(D)** Níveis de IL-10, e **(E)** Produção de PGE₂ na linhagem 4T1 tratada com Vitamina D em 24 e 48 horas. A linhagem metastática (4T1) foi mantida em cultura sob condições padrão; após a confluência, foram plaqueadas $2,5 \times 10^5$ células (para viabilidade celular) e 5×10^5 células (para as demais análises). A viabilidade celular foi obtida através do uso de Azul de Trypan; já a biogênese de CL's foi mensurada na contagem de 50 células/lâmina e, marcadas com Bodipy. O sobrenadante de 4T1, em ambos os tempos analisados, foram coletados para mensurar a produção de citocinas por ELISA e; a produção de PGE₂ por Ensaio Imunoenzimático. Barras representam média \pm EPM, n = 3. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) são indicadas por * e (#) representa a diferença entre os tratamentos. O gráfico foi obtido pelo programa Graphpad Prism 6® utilizando ANOVA.

O desenvolvimento tumoral deve-se, sobretudo, ao estado inflamatório crônico. Alguns estudos demonstram a correlação entre suplementação da vitamina D e produção de citocinas em modelos tumorais (KWON et al, 2010). Mensuramos a produção de IL-10 na linhagem metastática tratadas com as vitaminas D, no tempo de 24h (Figura 14C). Os níveis de IL-10, observa uma tendência de aumento na síntese da citocina entre os grupos tratados, quando comparados ao controle.

Para análises comparativas aos dados apresentados anteriormente, avaliamos a viabilidade celular e biogênese de CL's na linhagem não metastática (67NR) (Figura 15).

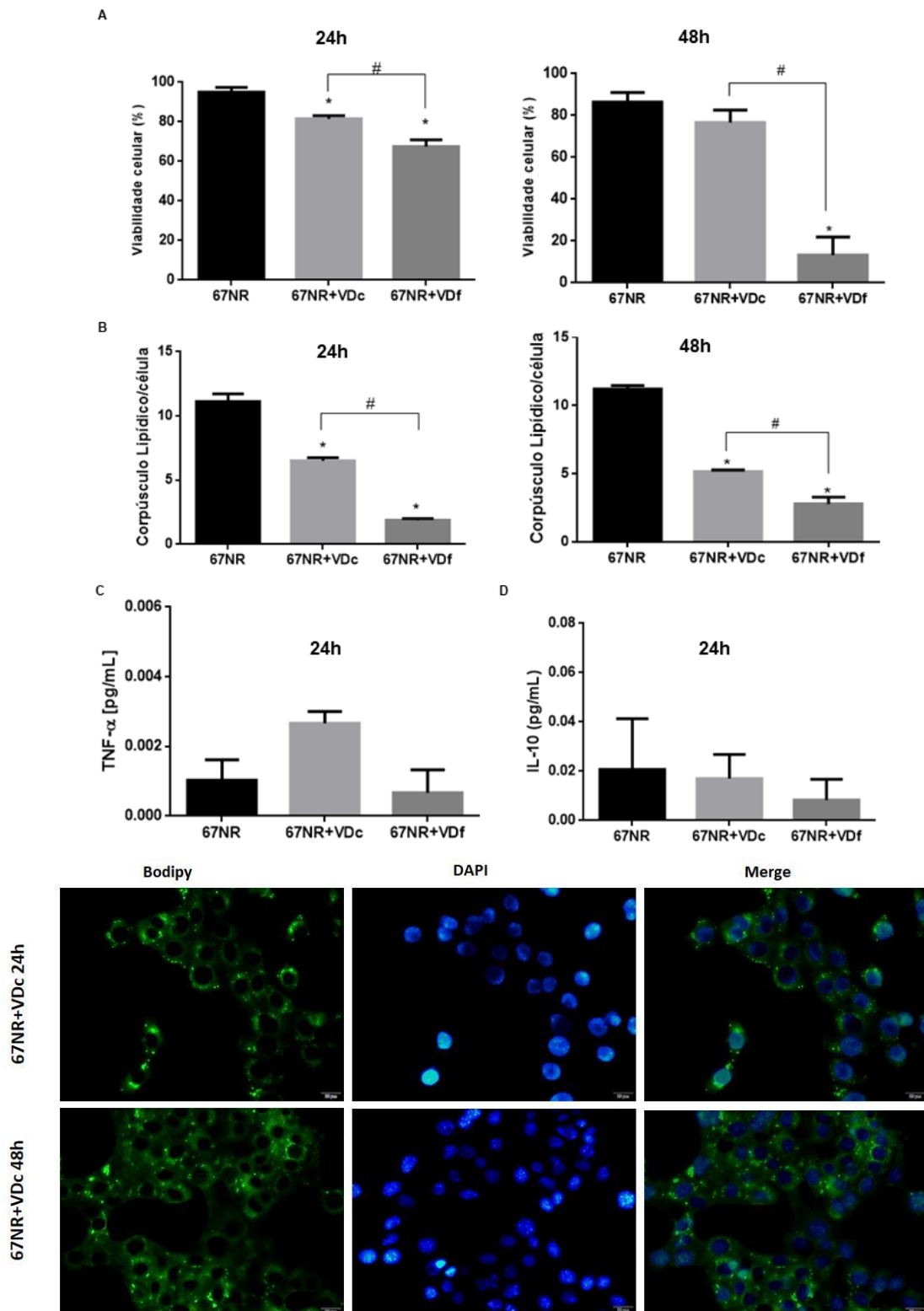


Figura 15: Metabolismo lipídico e síntese de citocinas em 67NR tratada com 100nM de Vitamina D. **(A)** Viabilidade celular de 67NR tratada com Calcijex (VDc) ou DePura (VDf) em 24h e 48h; **(B)** Formação de CL's em 67NR tratadas com vitamina D. Níveis de TNF- α **(C)** e **(D)** Níveis de IL-10. Linhagem tumoral não metastática, 67NR, recebeu o tratamento com VD e, avaliou: viabilidade celular por Azul de Trypan e o sobrenadante dessas células foram coletadas para dosagem de citocinas por Elisa. Barras representam média \pm EPM, n = 3. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) são indicadas por * e #

(#) representa a diferença entre os tratamentos. O gráfico foi obtido pelo programa Graphpad Prism 6® utilizando ANOVA.

Em conformidade com os resultados da 4T1, o tratamento com vitamina D reduziu, de forma significativa, a viabilidade celular de 67NR (Figura 15A). De forma interessante, no tempo de 48 horas, a viabilidade de 67NR acrescido do tratamento VDf (DePura) diminuiu substancialmente o número de células viáveis. Concomitante ao resultado da figura 14B, a biogênese de corpúsculos lipídicos também foi reprimida com a adição da vitamina D em ambos os tempos analisados (Figura 15B).

A quantificação de citocinas na figura 15 apresentaram perfis distintos quando comparados ao obtido pela linhagem metastática. Os níveis de IL-10 (Figura 15C) sugerem uma diminuição dos níveis dessa citocina quando comparado a linhagem 67NR sem o tratamento com a vitamina D, contrapondo-se os achados em 4T1, no qual notou-se uma tendência a um aumento da citocina nos grupos tratados.

4.2 MACRÓFAGO

Macrófagos ($M\phi$) são constituintes do sistema imunológico, desempenhando funções como fagocitose e remodelação tecidual. Importante denotar que, dependendo do estímulo, como por exemplo, processo inflamatório crônico, essas células exercem efeitos controversos em neoplasias, podendo favorecer o tumor (GORELIK e FLAVELL, 2001; TERABE et al, 2003; BROWN et al, 2017).

Primariamente avaliou-se a biogênese de CL's em macrófagos ($M\phi$) pré-tratados com 20nM de rapamicina e estimulados com meio condicionado das linhagens tumorais mamárias (4T1 e 67NR). A priori, $M\phi$ estimulados com sobrenadante de 4T1 e 67NR, apresentaram elevada formação de CL's quando comparados ao controle não estimulado e/ou tratado, tendo a biogênese de corpúsculos lipídicos reprimida com o pré-tratamento com rapamicina (Figura 16A).

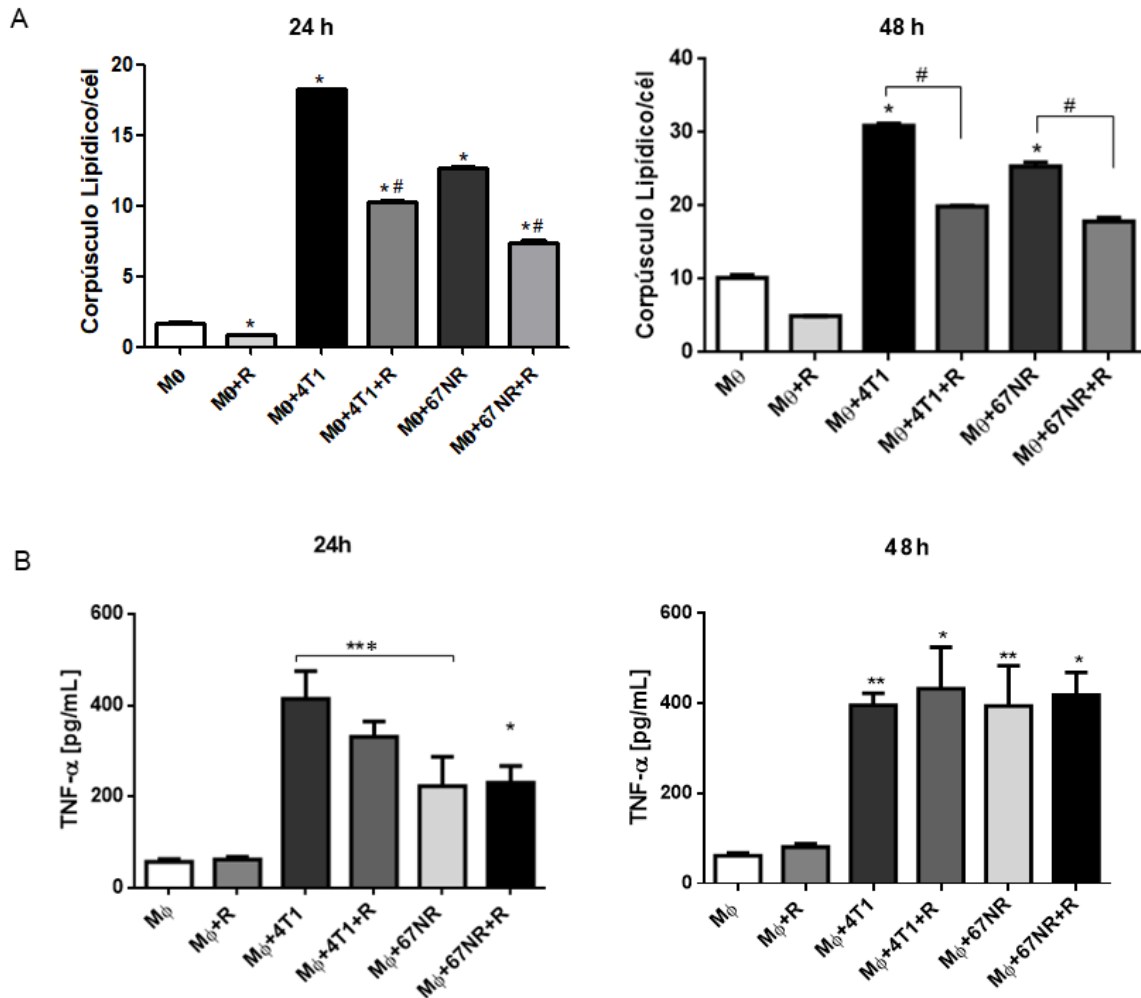


Figura 16: Biogênese de Corpúsculos lipídicos e síntese de TNF- α em macrófagos pré-tratados com 20nM de rapamicina e estimulados com sobrenadante das linhagens tumorais mamárias em 24 e 48horas. **(A)** Formação de Corpúsculos Lipídicos em macrófagos estimulados com sobrenadante de 4T1 e, pré-tratados e tratados com rapamicina. **(B)** Produção de TNF- α em M ϕ estimulados. Macrófagos peritoneais foram obtidos de camundongos C57BL/6 e, foram pré-tratados com 20nM de rapamicina por 30minutos, sendo sucedido pelo sobrenadante das células tumorais acrescidos do inibidor da mTOR1. Barras representam média \pm EPM, n = 3. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) são indicadas por *, ** representa a diferença entre os estimulados e estimulados tratados e *** representa a diferença entre os grupos estimulados. O gráfico foi obtido pelo programa Graphpad Prism 6® utilizando ANOVA.

Importante destacar que em ambos os grupos tratados, a administração do inibidor da via mTOR reduziu a biogênese de CL's, sendo mais bem visualizada na linhagem metastática 4T1. Concomitantemente pode-se associar então, a invasividade tumoral com o número de CL's formados, uma vez que, a linhagem 67NR de natureza não metastática, apresentou número inferior de corpúsculos lipídicos.

TNF- α é uma citocina pró-inflamatória, secretada principalmente por macrófagos e, que apresenta papel dicotômico no desenvolvimento de neoplasias (MACCALLI et al, 2009). Aspectos antitumorais correlatos a esta citocina condizem com a apoptose das células cancerosas, ao passo que, a promoção do tumor está relacionada ao processo inflamatório crônico e a superexpressão da ciclooxigenase 2 (COX-2) (SUGARMAN et al, 1985; SOBOLEWSKI et al, 2010).

A dualidade do TNF- α frente ao desenvolvimento tumoral foi analisado posteriormente, em macrófagos pré-tratados com rapamicina e estimulados com meio condicionado das linhagens tumorais, em 24 e 48 horas (Figura 16B).

Nota-se que o tratamento com a rapamicina em ambos os tempos, 24 e 48 horas, não alterou significativamente a concentração de TNF- α . Isso sugere que, a modulação do metabolismo lipídico através do inibidor da via mTOR não interfere na produção dessa citocina. Resultados similares foram também notados na linhagem 67NR.

O papel imunossupressor exercido pela citocina IL-10 desencadeia uma série de eventos que permitem a progressão neoplásica, dentre os quais, a inibição da proliferação de células T e polarização macrofágica para o perfil M2 (ITAKARA et al, 2011; HAM et al, 2017). Considerando o microambiente anti-inflamatório como promotor do processo angiogênicos e metastático, fora avaliado os níveis de IL-10 em macrófagos estimulados com o sobrenadante de ambas as linhagens tumorais mamárias, e pré-tratadas com 20nM de rapamicina em 24 e 48 horas (Figuras 17).

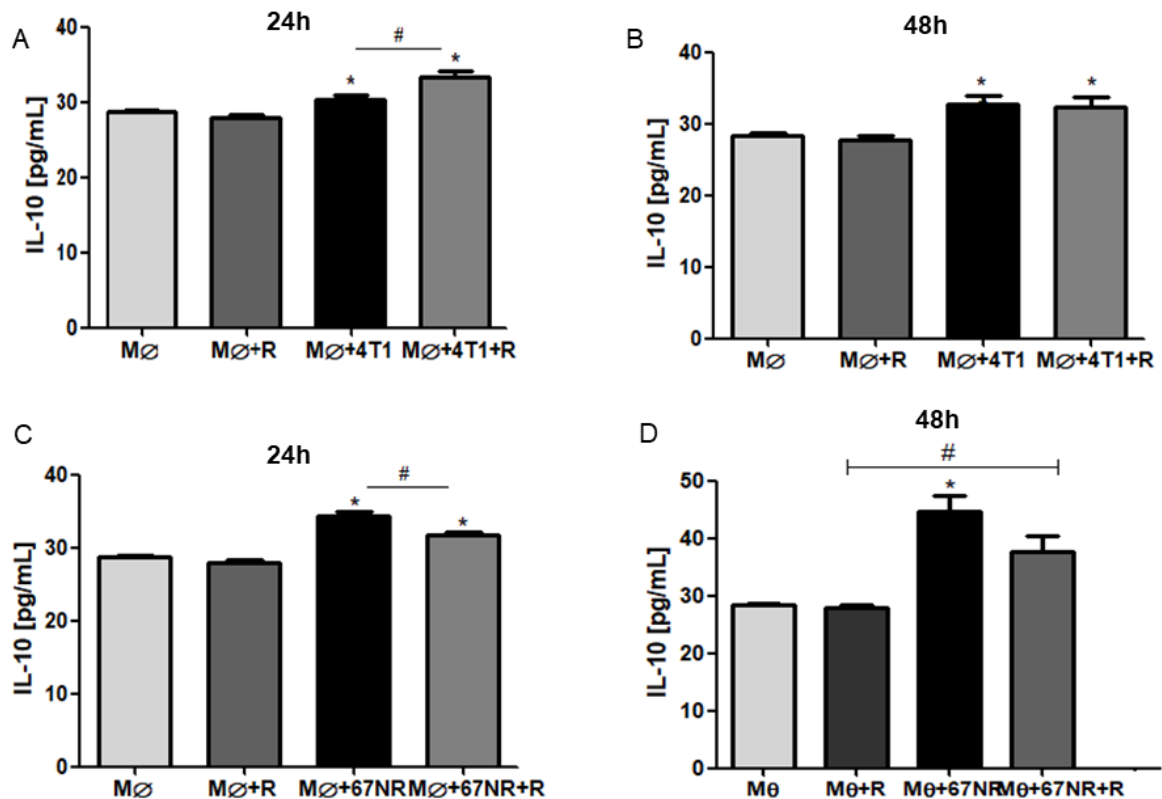


Figura 17: Quantificação de IL-10 no sobrenadante de macrófagos estimulados com meio condicionado da linhagens 4T1 e 67NR e pré-tratados com 20nM de rapamicina, nos tempos de 24 horas (A e C) e 48 horas (B e D). Barras representam média \pm EPM, $n \geq 3$. O símbolo * representa diferença significativa entre os grupos apresentando $p < 0,05$. O gráfico foi obtido pelo programa Graphpad Prism 5® utilizando ANOVA.

De forma interessante, nossos dados apontaram para um perfil antagônico na secreção de IL-10 no tempo de 24 horas nos macrófagos estimulados com meio condicionado de 4T1 e 67NR. O estímulo com o sobrenadante da linhagem metastática, induziu de forma significativa, o aumento de IL-10; ao passo que, a linhagem não metastática a secreção da citocina foi reduzida no mesmo intervalo analisado. Com relação ao tempo de 48 horas, a produção de IL-10 não foi modulada de forma significativa em ambas as linhagens.

A hipovitaminose D é um fenótipo comum em neoplasias (BRAUN et al, 1995). Conhecendo a modulação do metabolismo lipídico e de suas ações frente ao desenvolvimento tumoral, avaliou-se a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos estimulados com meio condicionado das linhagens tumorais mamárias

(4T1 e 67NR) e posteriormente tratados com 100nM de vitamina D (*Calcijex*) por 24 horas. A priori, M ϕ estimulados com sobrenadante de 4T1 e 67NR, apresentaram elevada formação de CL's quando comparados ao controle não estimulado e/ou tratado. Pode-se notar que em ambos os grupos, o tratamento com vitamina D coibiu a biogênese de CL's, sobretudo em macrófagos estimulados com o meio condicionado das linhagens tumorais, podendo contribuir para a reversão do processo neoplásico (Figura 18A).

Algumas características intrínsecas ao câncer, como sobrevivência e alterações no ciclo celular, são mediadas via sinalização PI3K /Akt/mTOR (HANAHAN e WEINBERG, 2011; DATTA-MITRA et al, 2013). Avaliamos o papel da ativação de PI3K através da biogênese de CL's de macrófagos de camundongos knockout para PI3K, e selvagens (Wild-type) (Figura 18C e 18D); e na síntese de citocinas como TNF- α e IL-10 (Figura 18E e 18F). Nossos dados apontaram que animais PI3K^{-/-} apresentaram menor biogênese de corpúsculos lipídicos, quando comparados a indivíduos Wild-type (WT); sobretudo nos grupos estimulados-tratados.

Contraopondo-se as funções associadas a ativação da via PI3K/Akt/mTOR, a vitamina D atua como reguladora negativa do ciclo celular, e posteriormente, induz a apoptose (BROZYNA et al, 2020). Em relação a síntese de citocinas, os grupos knockout estimulados e tratados com VDC apresentaram ser parcialmente dependentes de PI3K, tendo perfis distintos entre as citocinas anti e pró-inflamatórias. (Figuras 18D, 18F).

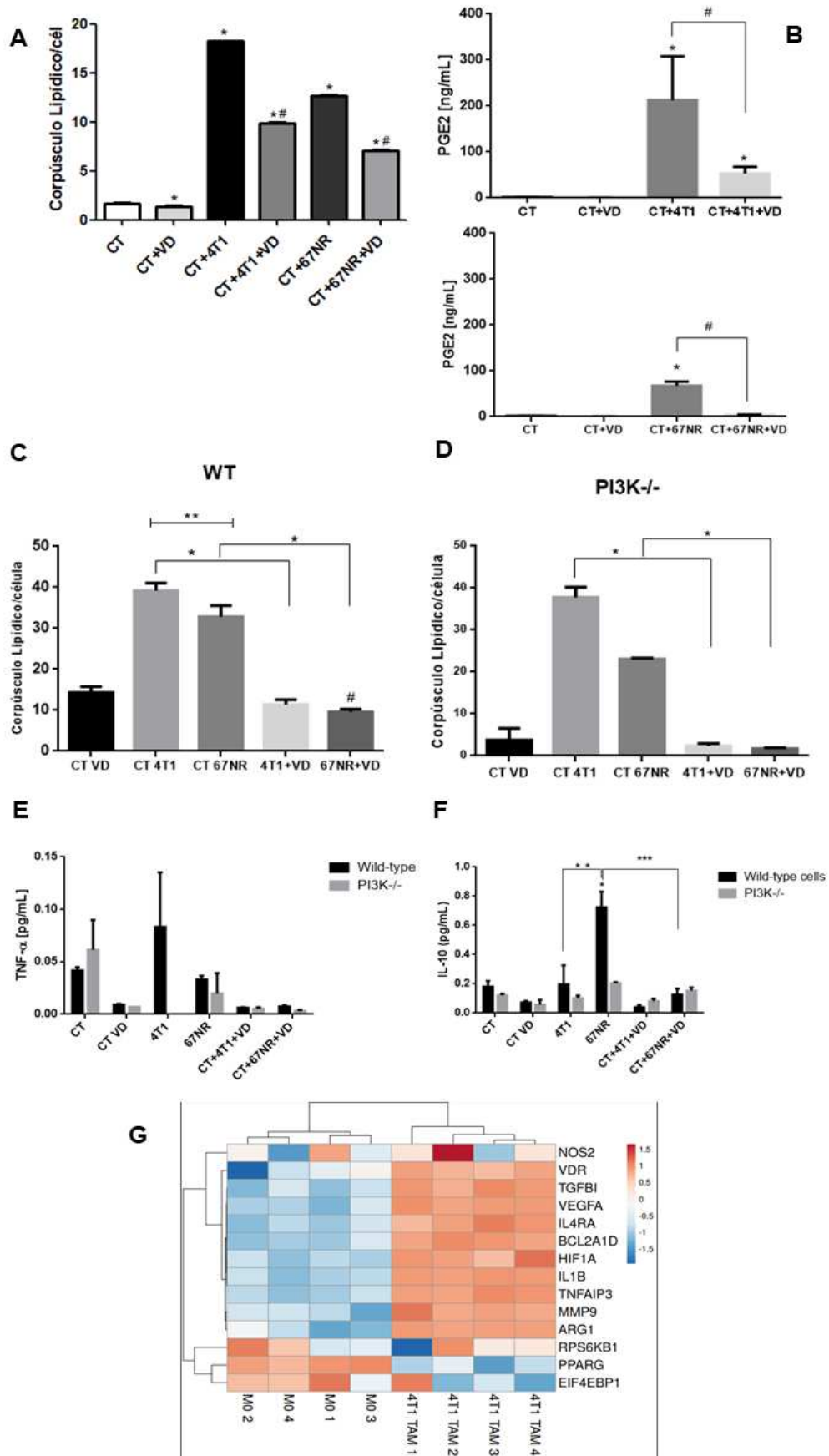


Figura 18: Efeito do tratamento com Vitamina D (VDc) em macrófagos estimulados. (A) Biogênese de corpúsculos lipídicos em macrófagos estimulados e tratados com vitamina D. (B) Níveis de prostaglandina E_2 produzidas por macrófagos estimulados e tratados. (C e D) Biogênese de CL's em macrófagos de indivíduos WT ou knockout para PI3K. (E e F) Níveis de TNF- α e IL-10 em macrófagos de indivíduos WT ou knockout para PI3K. (G) Análise da expressão de genes em macrófagos do microambiente tumoral. No heatmap estão apresentados alguns genes, tais como: *PPAR γ* , *HIF1A*, *VDR*; o valor de expressão de cada um desses genes foi normalizado por \log_2 . Os genes que aparecem representados em vermelho, estão sendo mais expressos, e os de cor azul, menos expressos. No eixo vertical estão apresentados os genes de interesse e, na base, os grupos analisados: controle (macrófagos) e macrófagos infiltrados de 4T1. Barras representam média \pm EPM, $n \geq 3$. O símbolo * representa diferença significativa entre os grupos, apresentando $p < 0,05$. O gráfico foi obtido pelo programa Graphpad Prism 6® utilizando ANOVA.

Estudos de bioinformática foram conduzidos para performar a expressão de alguns genes de interesse em macrófagos e associá-los aos resultados preliminares deste estudo (Figura 18G). Em conjunto, a análise comparativa entre macrófagos e M ϕ do infiltrado tumoral de 4T1, pode-se observar que o VDR foi upregulado em macrófagos do tumor de 4T1, quando comparado aos do grupo controle (MULIADITAN et al, 2018).

PPAR γ é um receptor nuclear que regula a transcrição de genes relacionados a inflamação e metabolismo lipídico, em que estudos vem relatando o processo anabólico exercido por PPAR γ na biogênese de corpúsculos lipídicos (GORGA et al, 2017; SOUZA-MOREIRA et al, 2019). Para elucidar a biogênese de CL's por meio do receptor PPAR γ , foram analisados a formação de CL's em macrófagos estimulados com meio condicionado das linhagens tumorais mamárias (4T1 e 67NR) pré-tratadas com o agonista da via PPAR γ , rosiglitazona, ou ainda, com o antagonista – GW 9662 (Figura 19A e 19B). Nossos resultados apontaram que a administração de 5Mm de rosiglitazona foi capaz de aumentar significativamente a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos não estimulados e potencializar a formação de CL's em macrófagos estimulados com meio condicionado de ambas as linhagens tumorais mamárias em 24 horas; já a adição de GW9662, reverteu a biogênese dessas organelas em M ϕ estimulados.

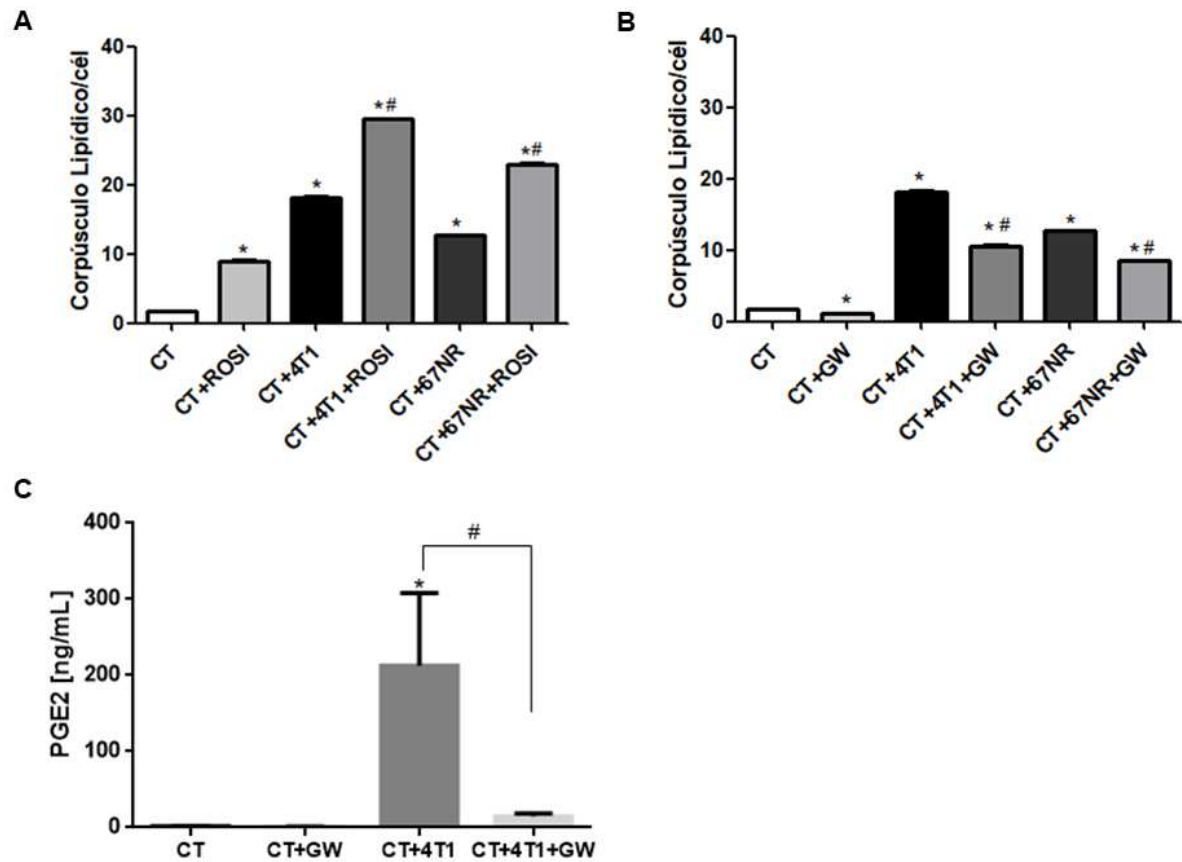


Figura 19: Biogênese de corpúsculos lipídicos e síntese de PGE₂ em macrófagos estimulados com meio condicionado das linhagens tumorais mamárias e pré-tratados com agonista e antagonista de PPAR γ por 24 horas. Para avaliar a biogênese de CL's, macrófagos peritoneais foram pré-tratados com 5 μ m de rosiglitazona (agonista de PPAR γ) **(A)** ou 1 μ m de GW9662 (antagonista de PPAR γ) **(B)**, por 30 minutos, sendo sucedido pelo estímulo com o sobrenadante acrescido dos tratamentos permanecendo-os por 24 horas. **(C)** Níveis de PGE₂ foram obtidos do sobrenadante e mensurados por EIA. Barras representam média \pm EPM, $n \geq 3$. O símbolo * representa diferença significativa entre os grupos, apresentando $p < 0,05$; o símbolo # representa diferença significativa entre os estimulados e estimulados tratados, apresentando $p < 0,05$. O gráfico foi obtido pelo programa Graphpad Prism 6[®] utilizando ANOVA.

5 DISCUSSÃO

O câncer é caracterizado pela proliferação demasiada e sobrevivência celular. Atualmente, é a segunda causa de morte na população, tratando-se, pois de um problema de saúde global (NAGAI e KIM, 2017).

A lipogênese e elevado número de corpúsculos lipídicos em seções tumorais é um fenótipo comum observado (TIRINATO et al, 2015). Nossos estudos demonstraram que as linhagens tumorais mamárias apresentam inúmeros CL's formados, e que esta formação, era dependente de tempo. Adicionalmente, a biogênese de corpúsculos lipídicos é diretamente proporcional a síntese de prostaglandina E₂, sobretudo na linhagem metastática (4T1) corroborando, portanto, com dados de Accioly et al (2008).

Corpúsculos lipídicos são sítios de localização e produção de Prostaglandina E₂ (PGE₂), um mediador inflamatório que provém da metabolização do ácido araquidônico através da ação da ciclooxigenase (COX). Em câncer mamário humano, a superexpressão da COX-2 está associada a um pior prognóstico da doença; estando associados ao aumento do tumor e a alta taxa proliferativa (BOLAND et al, 2004). Nossos achados condizem com estudos anteriores, uma vez que, a linhagem metastática apresentou níveis elevados de PGE₂, e a síntese desse eicosanoide está associado a elevada invasividade; sobretudo, pelo fato de que a 4T1 mimetiza um carcinoma triplo-negativo e em estágio IV.

A regulação do metabolismo lipídico e a formação de CL's está relacionada com a regulação e ativação de algumas sinalizações celulares, por exemplo, a ativação da mTOR. mTOR desempenha inúmeras funções na homeostase da célula, tais como a lipogênese, crescimento e sobrevivência celular (EASTON e HOUGHTON, 2006). A ação combinada de fármacos juntamente com o inibidor da via mTOR, rapamicina, tem reduzido a biogênese de CL's, além de auxiliar na melhora do quadro patológico (FAZOLINI et al, 2015).

Nossos dados apontam que o pré-tratamento com rapamicina reduziu a biogênese de CL's nas linhagens celulares e em macrófagos estimulados com o meio condicionado das linhagens tumorais, corroborando com achados de Fazolini et al (2015) em células IEC-6 e; Maya-Monteiro et al (2008) em macrófagos estimulados com leptina. A regulação negativa da biogênese de corpúsculos lipídicos se deve a formação do complexo rapamicina-FKBP-mTOR, que impede a fosforilação de S6K1 e 4EBP1 e conseqüentemente, suas funções associadas.

Considerando a via mTOR uma das vias responsáveis pelo metabolismo celular, sua ativação tem sido associada com as expressões de IL-10 e a sobrevivência da célula; e somados a isso, a utilização de seu inibidor, rapamicina, é observado na indução do processo apoptótico (EASTON e HOUGHTON, 2006; BAKER et al, 2009). Nossos resultados contrastam com os de BAKER et al (2009), em que macrófagos estimulados com o sobrenadante da linhagem metastática (4T1) e tratados com rapamicina em 24 horas demonstram um aumento significativo de IL-10, face que o estudo de 2009 apresentou redução da citocina anti-inflamatória no mesmo tipo celular. Tal dado pode ser justificado pelo fato de que a natureza de 4T1 – linhagem que apresenta alta taxa metastática e terapêuticas limitadas – restringe a ação do inibidor da mTOR1 em macrófagos, tornando-se dependente de tempo. E dados obtidos em macrófagos estimulados com meio condicionado da linhagem 67NR e tratados com rapamicina em 24 horas, demonstrou a redução dos níveis de IL-10 e corroboram com os estudos de Nepomuceno et al (2003) em células linfoblastoides. Adicionalmente, estudo de Itakura e cols (2011), sugerem que a produção de IL-10 por células tumorais e macrófagos associados a tumores aumenta à medida que os melanomas primários progridem, com importantes implicações prognósticas para a transição do melanoma *in situ* para o melanoma invasivo e melanoma metastático. Sendo assim, a inibição dessa citocina pode ter efeito protetor.

A diferença entre os níveis encontrados de IL-10 em macrófagos estimulados com o meio condicionado da linhagem metastática (4T1) e não metastática (67NR) acrescidos da administração da rapamicina em 24 horas podem ser atribuídos à natureza invasiva da linhagem 4T1. No entanto, no segundo tempo analisado não foi observado o mesmo fenótipo, podendo então, condizer que a reversão do quadro anti-inflamatório por meio do inibidor da via mTOR, acontece a partir de 48 horas após o tratamento. A resistência a fármacos é um dos principais desafios em terapêuticas em câncer, as quais se incluem rapamicina e seus análogos; Provisieiro et al (2019) demonstraram que a utilização de vitamina D em hepatocarcinoma, reverteu a resistência neoplásica a everolimus.

TNF- α é uma citocina pró-inflamatória que está associada com a proliferação de macrófagos, *Natural Killer* e células dendríticas. No entanto, quando o processo inflamatório é exacerbado, ela desempenha funções importantes na tumorigênese

como a metástase, proliferação e transformação celular (SETHI et al, 2008; WU e ZHOU, 2010). Com a administração da rapamicina em macrófagos estimulados, obtivemos como resultados a não responsividade da citocina mediante ao tratamento na linhagem 67NR em ambos os tempos, porém de forma interessante na linhagem 4T1, houve uma tendência à alteração desse perfil inflamatório; em que se observa uma propensão à redução de TNF- α no tratado 24horas, e um acréscimo da mesma em 48horas (dados não mostrados). Esses dados podem indicar que o perfil invasivo da linhagem metastática tende a responder dependente de tempo após a administração do inibidor da mTOR1.

Leptina é uma citocina produzida pelo tecido adiposo, responsável pela homeostase energética e, em elevados níveis, promovem a progressão tumoral (GAROFALO, 2005). Em macrófagos estimulados com meio condicionado, nota-se o aumento na biogênese de CL's e na síntese de leptina, estando em concomitância com o trabalho de Maya-Monteiro et al (2008) e Fazolini et al (2015).

Maya-Monteiro atribuiu a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos de maneira dependente da ativação da sinalização PI3K/mTOR. Nossos resultados apontam a redução da biogênese de CL's em indivíduos knockout (KO) para PI3K – sendo potencializadas em administração conjunta com vitamina D - corroborando com o trabalho de Yu et al (2000) e; com dados preliminares de nosso grupo, em que macrófagos infectados – indivíduos PI3K^{-/-} com *Trypanosoma cruzi*, apresentaram menor formação dessas organelas (GONÇALVES, em preparação). A reversão do quadro neoplásico pode ser obtida através da inibição de PI3K. Nossos achados demonstram que a modulação do metabolismo lipídico, por meio de animais KO, pode ser tratada como um bom alvo terapêutico em condutas anticâncer; estando em conformidade com Wang e cols (2001) que demonstraram a redução na diferenciação e proliferação de células Caco-2 a partir da inativação de PI3K.

Diversas terapias anticâncer destinam-se a regulação da sobrevivência celular, característica intrínseca em neoplasias. Performamos a viabilidade das linhagens tumorais mamárias com o pré-tratamento com rapamicina, e notou-se a redução na sobrevivência dessas células. Nossos dados confirmam os achados Song e cols (2014), no qual a associação de rapamicina com mitomicina induziu morte apoptótica

de células de carcinomatose peritoneal; e com Saqcena e cols (2015), apoptose de MDA-MDB-231 tratadas com o inibidor da mTOR1.

Algumas terapêuticas a neoplasias utilizam da ação conjunta de quimioterápicos e antraciclinas somadas com a administração de vitamina D, uma vez que, o fenótipo da maioria dos pacientes demonstra uma deficiência dos níveis dessa vitamina no organismo (MAAYAH et al, 2018).

A fim de elucidar aspectos correlatos à ação da vitamina D (VD) em células neoplásicas, o estudo foi conduzido com a utilização de duas linhagens tumorais mamárias, 4T1 e 67NR, tratando-se de um estudo válido, uma vez que, sua reprodutibilidade e resultados observados são comparáveis aos obtidos *in vivo* (EVANGELISTA et al., 2019)

Primariamente foram analisadas as viabilidades celulares das linhagens tumorais mamárias mediante o tratamento com a vitamina D. Nossos resultados apontaram a redução significativa da viabilidade celular mediante a administração de VD, estando em concordância com estudos preliminares em linhagens mamárias carcinogênicas humanas, como BT-20 e MCF-7 (CHOUVET et al, 1986; WELSH, 1994; SIMBOLI-CAMPBELL et al, 1997). A redução da viabilidade celular em células neoplásicas é desencadeada, sobretudo, pela apoptose; uma vez que a interação entre a vitamina, seu receptor e a região a ser transcrita (VDRE) regula negativamente genes relacionados com a inibição da apoptose, como o Bcl-2 (JAMES et al, 1998; MORENO et al, 2006; GAO et al, 2018). Maayah e cols (2018) demonstraram que a ação conjunta de doxorrubicina (uma antraciclina) com vitamina D, reduziu em aproximadamente 50% a proliferação de células de osteosarcoma, além de aumentar a expressão de genes pró-apoptóticos, evidenciando a efetividade do tratamento.

A existência de inúmeros corpúsculos lipídicos são observações patológicas evidenciadas em tecidos neoplásicos (ACCIOLY et al, 2008; BOZZA e VIOLA, 2010; BELORIBI-DJEFAFLIA et al, 2016). A partir do tratamento com 100nM de calcitriol, nossos resultados apontaram para uma drástica redução na biogênese de corpúsculos lipídicos nas células 4T1 e 67NR; bem como em macrófagos estimulados com meio condicionado das linhagens tumorais. Esses dados corroboram com estudos de Li et al (2018) em que a vitamina D inibe a formação de CL's em tecido

muscular; e a diminuição de lipídeos neutros fora encontrada por Wilmanski et al (2017), em células tumorais MCF10CA1a.

Estudos preliminares de nosso grupo em modelo de infecção por *Trypanosoma cruzi* em macrófagos, demonstrou que o tratamento com calcitriol inibiu a formação de corpúsculos lipídicos induzida pela infecção. E, de modo interessante, a vitamina D reverteu à polarização macrofágica, e permitiu uma maior responsividade ao parasito (RODRIGUES et al, em preparação). Condizentes a isso, nossos resultados corroboram com a inibição do metabolismo lipídico mediado pelo tratamento com VD em câncer, e aliados a isso, outro estudo em desenvolvimento por nosso grupo, demonstrou as mesmas atribuições em modelo experimental de infecção por *Mycobacterium bovis* BCG em macrófagos (MEDEIROS et al, em preparação).

A formação de corpúsculos lipídicos é essencialmente relacionada a condições patológicas, embora diminuta visualização seja observada em condições normais. O processo lipogênico, isto é, a síntese de ácidos graxos, são premissas visualizadas em neoplasias, por exemplo; e promotoras da biogênese de CL's. O tratamento com vitamina D reduz de forma significativa a gênese dessas organelas, por atuar diretamente no fator de transcrição SREBP, o qual controla o metabolismo lipídico via expressão de genes lipogênicos. Asano et al (2017) comprovaram que um dos metabólitos da sinalização em vitamina D, a 25-hidroxitamina D, suprime a expressão de SREBP e aliados a isso, degradam SCAP (*SREBP cleavage-activating protein*), proteína fundamental para a ativação de genes lipogênicos.

Regulador negativo do metabolismo lipídico, mensuramos os níveis de IL-10 das linhagens tumorais tratadas com vitamina D. A quantificação de IL-10 apontou a uma diferença na resposta entre as células estudadas. A linhagem metastática (4T1) apresentou aumento na síntese de IL-10 nos grupos tratados com VD, ao passo que, a linhagem 67NR obteve redução dos níveis da citocina anti-inflamatória. Essa alteração de perfil entre as linhagens aos níveis de citocinas produzidas pode estar associada pelo fato de que a vitamina D regula a interação entre células tumorais e imunes para suprimir quadro inflamatório crônico.

A ativação de vias de sinalização celular e receptores nucleares, os quais incluem Vitamina D e PPARs; são fatores desencadeadores na biogênese de

corpúsculos lipídicos (MOTOJIMA, 1993). Alguns estudos vêm correlacionando proporcionalmente a formação de CL's com receptores ativadores da proliferação de peroxissomos (PPAR) em diversos modelos experimentais (GORGA et al, 2017; JARC e PETAN, 2019).

GW9662 (2-cloro-5-nitrobenzanilida) é um antagonista irreversível de PPAR, isto é, que impede a ativação do receptor e conseqüentemente, transcrição de genes relacionados a regulação lipídica. Nossos dados demonstraram que a administração de GW9662 coíbe de forma significativa a biogênese de corpúsculos lipídicos em macrófagos estimulados com sobrenadante das linhagens tumorais mamárias, corroborando com dados de Almeida et al (2009) em macrófagos infectados com *Mycobacterium bovis* BCG e com Souza-Moreira et al (2019) em macrófagos condicionados ao sobrenadante de células mesenquimais de origem adiposa.

A inibição na biogênese de corpúsculos lipídicos pela administração do GW9662 pode dar-se-á uma estratégia terapêutica eficaz, tendo em vista que, CL's são sítios de produção e localização de mediadores inflamatórios. As prostaglandinas, mediadores inflamatórios provenientes da metabolização do AA pela ação da ciclooxigenase-2 (COX-2), permeiam funções importantes no desenvolvimento neoplásico como, por exemplo, angiogênese, metástase e vasodilatação (WANG e DuBOIS, 2006).

De forma interessante, estudos conduzidos em células tumorais demonstram que a administração de antagonistas de PPAR γ , como, por exemplo, o GW9662, modulam uma resposta pró-tumorigênica, inibindo o processo autofágico (ASSUMPÇÃO et al, 2017). Assumpção e cols (2017) analisaram a correlação entre biogênese de CL's e autofagia em células Caco-2, e demonstraram um aumento na formação das organelas mediante o pré-tratamento com GW9662, o que não fora visto em tratamentos como rosiglitazona e rapamicina. Enquanto em modelos hepatocarcinoma, o tratamento de GW9662 acrescidos de moléculas do sistema canabinoide, induziu um aumento da massa tumoral, o que não fora visto quando tratados somente com THC ou JWH (VARA et al, 2013).

Autofagia é concebida como um processo de manutenção da homeostase celular por meio da degradação de proteínas celulares e organelas através de

enzimas lisossomais; sendo regulada uma série fatores, dentre os quais PPAR (MATHEW et al, 2007; JIANG et al, 2018). A degradação de componentes lipídicos via autofagia é desencadeada através da lipofagia, em que vesículas autofágicas carregam corpúsculos lipídicos e os liberam para serem degradados nos lisossomos (SETTEMBRE e BALLABIO, 2014). Assumpção et al (2017) sugerem que a biogênese de corpúsculos lipídicos em células Caco-2 mediante ao tratamento com agonistas e antagonistas de PPAR se deve a inibição da lipofagia e conseqüentemente, geração de estresse celular.

PPAR γ e receptor da vitamina D (VDR) são fatores de transcrição pertencentes a família de receptores nucleares. Alimirah et al (2012) demonstraram a correlação negativa desses receptores em modelos de câncer de mama, isto é, a ativação de PPAR γ está ligada com supressão da atividade desencadeada pela VD. A atividade antiproliferativa de vitamina D foi restabelecida em células T47D administradas em conjunto com 1,25D₃ e GW9662. Em modelo de infecção por *Mycobacterium tuberculosis* em macrófagos, o tratamento com agonistas de PPAR γ (rosiglitazona e GW1929) reverteram a atividade antimicrobica desempenhada por VD e restauraram o aumento na biogênese de corpúsculos lipídicos (SALAMON et al, 2014).

A expressão de PPAR γ não se limita apenas em tecido adiposo, uma vez que em menor expressão, pode ser notada em outros tipos celulares, como em neutrófilos e macrófagos (MOORE et al, 2001). Bouhlel et al (2007) demonstraram que a utilização dos agonistas: rosiglitazona e GW1929, modularam a diferenciação de monócitos humanos para macrófagos de perfil M2, ou seja, de cunho anti-inflamatório. Em neoplasias, o microambiente tumoral conduz o macrófago para um fenótipo M2, o qual indica um favorecimento do tumor visto que, promove o processo angiogênico e metastático (LEE et al, 2019). E somados a isso, em diversos tipos de câncer observa-se o aumento na formação de corpúsculos lipídicos (ACCIOLY et al, 2008; BOZZA e VIOLA, 2010; ASSUMPÇÃO et al, 2017; PETAN et al, 2018).

O presente estudo evidenciou que a utilização de rosiglitazona em macrófagos estimulados com o meio condicionado das linhagens tumorais mamárias acarretou o acréscimo da biogênese de corpúsculos lipídicos, corroborando com os achados de Salamon et al (2014) em modelos de infecção Macrofágica por micobactéria e de

Souza-Moreira et al (2019) no mesmo tipo celular e estimulados com sobrenadante de células mesenquimais de origem adiposa. O fato é explicado devido a rosiglitazona, um membro da classe tiazolidinediona, possuir afeição ao PPAR γ e permitir a superexpressão desse receptor, ocasionando um aumento na expressão de genes reguladores do metabolismo lipídico.

6 CONCLUSÕES FINAIS

Nossos resultados mostraram que tanto linhagens tumorais mamárias, quanto macrófagos tratados com meio condicionado dessas linhagens apresentam número aumentado de corpúsculos lipídicos, podendo ser sítios de produção de mediadores que favorecem o desenvolvimento tumoral.

Mediante aos resultados apresentados, as três vias de sinalização celular estudadas apresentaram interferências na biogênese de corpúsculos lipídicos nas linhagens tumorais mamárias e, em macrófagos estimulados com o meio condicionado

Em suma, considerando lipogênese e biogênese de corpúsculos lipídicos como fenótipos comuns em neoplasias, o presente trabalho visou elucidar possíveis mecanismos de supressão dessas organelas e regulação do metabolismo lipídico em macrófagos e em linhagens tumorais mamárias, os quais apresentam papéis controversos em neoplasias. A partir dos dados apresentados, novas ações terapêuticas podem ser propostas em neoplasias associando-se estes fármacos e /ou a outras drogas administradas em terapêuticas antitumorais.

ANEXOS



OPEN ACCESS

Edited by:

Giovane R. Sousa,
Harvard Medical School, United States

Reviewed by:

Michael Lewis,
University of London, United Kingdom

Alexandre F. Marques,
Federal University of Minas Gerais,
Brazil

Eugenio Antonio Carrera Silva,
Academia Nacional de Medicina,
Argentina

Andres Sanchez Alberti,
Consejo Nacional de Investigaciones
Científicas y Técnicas (CONICET),
Argentina

Celio Geraldo Freire-de-Lima,
Federal University of Rio de Janeiro,
Brazil

Galia Andrea Ramirez-Tolosa,
University of Chile, Chile

*Correspondence:

Patrícia Elaine de Almeida
patricia.almeida@uff.edu.br
Heloisa D'Avila
davila.bizarro@uff.edu.br
Jose Raimundo Correa
joseraimundocorrea@gmail.com

[†]These authors have contributed
equally to this work and share
the second authorship

Specialty section:

This article was submitted to
Parasite and Host,
a section of the journal
Frontiers in Cellular and
Infection Microbiology

Received: 31 August 2021

Accepted: 05 October 2021

Published: 28 October 2021

Citation:

D'Avila H, Souza NP, Albertoni ALS,
Campos LC, Rampinelli PG, Correa JR
and Almeida PE (2021) Impact
of the Extracellular Vesicles
Derived From *Trypanosoma cruzi*:
A Paradox in Host Response
and Lipid Metabolism Modulation.
Front. Cell. Infect. Microbiol. 11:768124.
doi: 10.3389/fcimb.2021.768124

Impact of the Extracellular Vesicles Derived From *Trypanosoma cruzi*: A Paradox in Host Response and Lipid Metabolism Modulation

Heloisa D'Avila^{1*}, Núbia Pereira de Souza^{2†}, Ana Luíza da Silva Albertoni^{1†},
Láiris Cunha Campos¹, Pollianne Garbero Rampinelli¹, José Raimundo Correa^{2*}
and Patrícia Elaine de Almeida^{1*}

¹Laboratory of Cellular Biology, Department of Biology, Federal University of Juiz de Fora (UFJF), Minas Gerais, Brazil,

²Laboratory of Microscopy and Microanalysis, Department of Cell Biology, University of Brasília, Brasília, Brazil

Chagas disease is a major public health problem, especially in the South and Central America region. Its incidence is related to poverty and presents a high rate of morbidity and mortality. The pathogenesis of Chagas disease is complex and involves many interactive pathways between the hosts and the *Trypanosoma cruzi*. Several factors have been implicated in parasite-host interactions, including molecules secreted by infected cells, lipid mediators and most recent, extracellular vesicles (EVs). The EVs of *T. cruzi* (EVsT) were reported for the first time in the epimastigote forms about 42 years ago. The EVsT are involved in paracrine communication during the infection and can have an important role in the inflammatory modulation and parasite escape mechanism. However, the mechanisms by which EVs employ their pathological effects are not yet understood. The EVsT seem to participate in the activation of macrophages via TLR2 triggering the production of cytokines and a range of other molecules, thus modulating the host immune response which promotes the parasite survival. Moreover, new insights have demonstrated that EVsT induce lipid body formation and PGE₂ synthesis in macrophages. This phenomenon is followed by the inhibition of the synthesis of pro-inflammatory cytokines and antigen presentation, causing decreased parasitic molecules and allowing intracellular parasite survival. Therefore, this mini review aims to discuss the role of the EVs from *T. cruzi* as well as its involvement in the mechanisms that regulate the host immune response in the lipid metabolism and its significance for the Chagas disease pathophysiology.

Keywords: extracellular vesicles, *T. cruzi*, infectious diseases, inflammation, lipid droplets, prostaglandin, parasite replication, Chagas disease

INTRODUCTION

Chagas disease is a neglected disease caused by infection with *Trypanosoma cruzi*, in which the persistence of the parasite and the prolonged activation of the immune system lead to a chronic inflammatory process and cardiomyopathies (D'Avila et al., 2011). The pathogenesis of Chagas disease is a multifactorial complex mechanism that involves a large number of molecules and

vesicles, among them, the extracellular vesicles (EVs) – small lipid vesicles released from the host- cell and/or parasite-cell into the extracellular space, potentially modulating the immune response (Cestari et al., 2012; Torró et al., 2018).

The EVs traffic has been the target of important mechanisms of cellular communication. Moreover, the EVs can mediate parasite-parasite and host-parasite interactions. Infected cell-derived EVs induce the communication between distant parasites and facilitate the dissemination of virulence factors (Mantel and Marti, 2014). In addition, EVs from parasitic protozoa are important in the pathogenicity and disease progression (Gonçalves et al., 1991; Nogueira et al., 2015).

The persistence of parasitemia through immune evasion mechanisms demonstrates the success of *T. cruzi* in the chronic development of Chagas disease where the EVs play an important role in modulating the immune response to the parasite. The purpose of this mini review is to present the recent progress in elucidating the origin, morphology and functions of EVs from the host cells and *T. cruzi*, as well as their impact on the parasite escape mechanism.

EXTRACELLULAR VESICLES ORIGIN AND MORPHOLOGY

The term extracellular vesicles (EVs) is commonly used to indicate different membrane-bound structures delimited by a lipid bilayer, released in the extracellular environment. The EVs are heterogeneous, with different biogenesis, molecular composition, sizes (from 20 nm to 5 µm) and functions (Van Niel et al., 2018; Witwer and Théry, 2019). They are secreted by either prokaryotic or eukaryotic cells, thus extending their phenotype (Campos et al., 2010; Torrecilhas et al., 2012). Moreover, EVs can carry and transfer molecules for the maintenance of homeostasis, respond to cellular imbalance and help the rapid modulation and/or evasion of the immune response during different pathogenic infections (Oliveira et al., 2010; Marcilla et al., 2014; Vargas et al., 2015; De Pablos et al., 2016; Dong et al., 2019; Babatunde and Subramanian, 2020; Palacios et al., 2021).

The EVs populations are usually classified according to their origin and size into three different types: exosomes (20–100 nm), microvesicles (MVs) (ectosomes like EVs - 100–1,000 nm) and apoptotic bodies (>1000 nm) (Akers et al., 2013; Witwer and Théry, 2019). The main type of EVs are categorized according to their intracellular origin in eukaryotic cells: the exosomes, formed inside multivesicular bodies and released upon fusion of these endosomal compartments with the plasma membrane and the microparticles, formed by direct budding and constriction from the plasma membrane (Akers et al., 2013). In EVs from trypanosomatids, the vesicles have been described as larger vesicles that bud from the plasma membrane and smaller vesicles that bud within the flagellar pocket. They are released through exocytosis of multivesicular bodies carrying components of the parasite membrane and intracellular environment (Silveira et al., 1979; Lovo-Martins et al., 2018). In general, EVs from parasites or hosts cells are isolated from the

culture after spontaneous secretion, then the supernatants containing EVs are filtered for a total exosome isolation (Cestari et al., 2012; Lovo-Martins et al., 2018) (Table 1).

The EVs participate in intercellular communication (parasite-parasite, parasite-host cell or host cell-host cell), modulate the immune response and act as pro-inflammatory mediators (Lovo-Martins et al., 2018). Thus, they can potentiate the course of the infection from the delivery or capture of its content by the host cells, through distinct routes: endocrine, paracrine, juxtacrine or autocrine signaling (Torró et al., 2018). These pathways, however, can be influenced by several factors such as the phase of the disease, immunocompromised patient, levels of parasitemia and parasite life cycle (Ramirez et al., 2017; Torró et al., 2018).

ROLE OF EVS FROM *T. cruzi* (EVsT) IN THE IMMUNE SYSTEM MODULATION

For years, numerous studies have been conducted on EVs in the context of diseases (Silveira et al., 1979; Lovo-Martins et al., 2018; Cronemberger-Andrade et al., 2020). The EVs are constantly shedding and sharing their products with the extra- or intracellular milieu which is correlated with the niche for proliferation and survival used by the different pathogens. The role and impact of EVs secreted by parasites during infection have been highlighted in several studies. However, the capacity of EVs to modulate the host-cell response is not clear.

The EVsT are produced in the different life cycle phases of the parasite and participate in the host cell infection process (Torrecilhas et al., 2020). In addition, several signaling cascades are activated by EVsT components modulating host-cell responses (Torrecilhas et al., 2020) (Figure 1A). They can modulate the cytoskeleton as well as the invasion of the metacyclic trypomastigotes by inducing tyrosine kinase phosphorylation and the actin nucleation (Yoshida and Cortez, 2008; Torrecilhas et al., 2020).

In *T. cruzi* infection, it is proposed that the intracellular life cycle should be responsible not only for parasite-parasite transmission but also for parasite-host cells, since the EVsT develop in a compartmentalized environment which increases their probability of coupling and delivery within the host cell (Torró et al., 2018). Thus, the EVsT can function as effectors in the host-parasite interaction mechanisms modulating the host immune response, increasing the number of cells infected as well as the parasitaemia (Moreira et al., 2019).

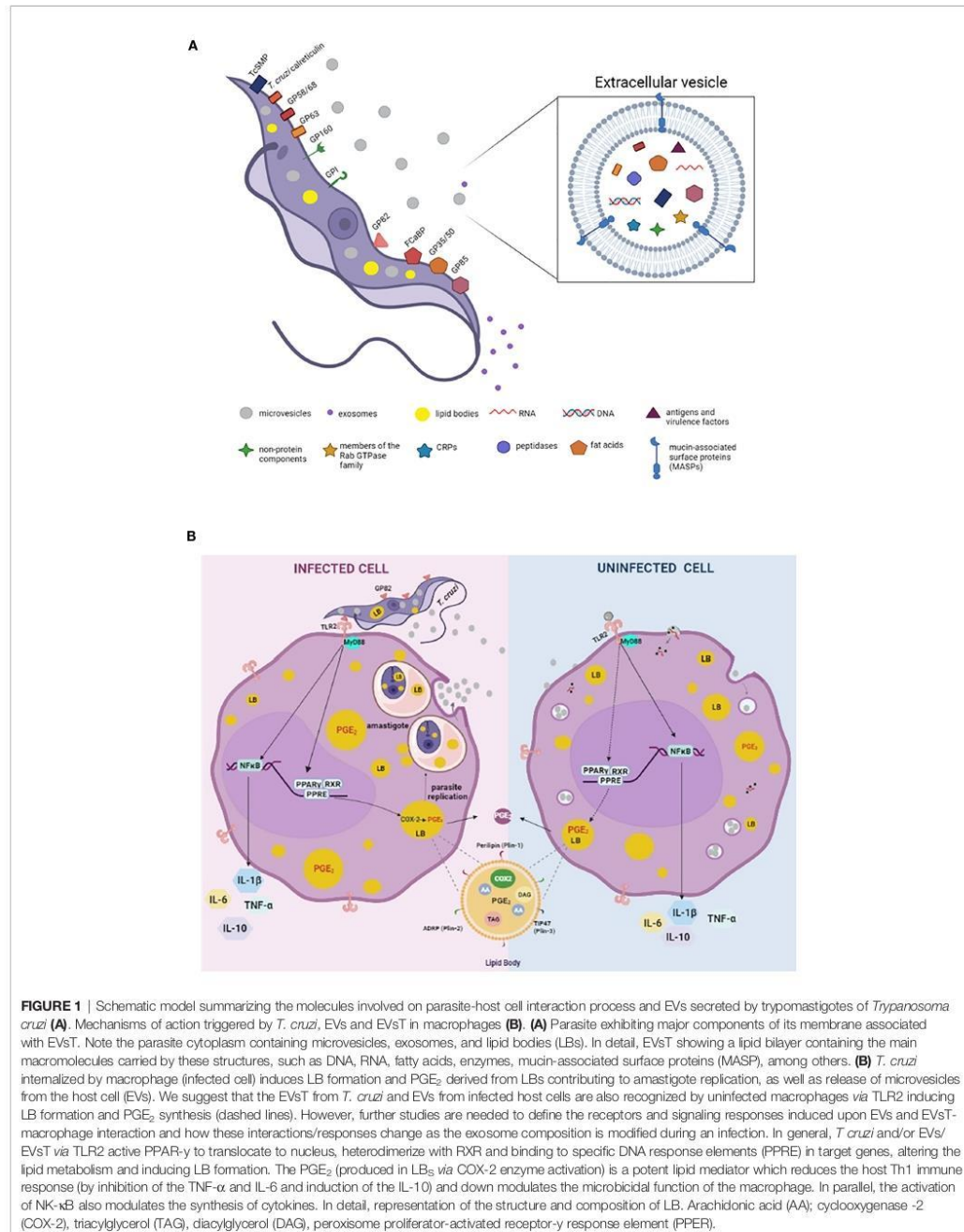
The role of the EVs in the immune system modulation is controversial. In general, some studies have demonstrated that the EVs present a protective role (Oliveira et al., 2010; Cronemberger-Andrade et al., 2014; Nogueira et al., 2015; Ribeiro et al., 2018). However, in other studies, the EVsT have a role in the evasion mechanism of the immune response, followed by an increase (50% to 250%) in parasitaemia in mice cells (Lovo-Martins et al., 2018; Moreira et al., 2019).

In the early stages of *T. cruzi* infection, the parasites promote the release of vesicles from the host cell plasma membrane,

TABLE 1 | Extracellular vesicles (EVs) in *T. cruzi* and other parasites.

Pathogen	Reference	EV	Origin	Study model	Methodology
<i>T. cruzi</i>	Bautista-López et al., 2017	M / E	Trypomastigotes (Tulahuen strain) / Vero cells	<i>in vitro</i>	UC, proteomic, WB, SEM
	Bayer-Santos et al., 2013	M / E	Epimastigotes and trypomastigotes (Dm28c clone)	<i>in vitro</i>	UC, proteomic, NTA, Sucrose-density gradient, TEM
	Cestari et al., 2012	M	THP-1 and mouse blood (BALB/c mice)	<i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	UC, FC, TEM
	Choudhuri and Garg, 2020	M	Trypomastigotes (SylvioX10/4, ATCC 50823) / C2C12, Raw 264.7, blood samples (WT and Parp1 ^{-/-})	<i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	UC, NTA, ZetaView, PCR, CL-ELISA, WB
	Cronemberger-Andrade et al., 2020	M / E	Trypomastigotes (Y strain) / THP-1	<i>in vitro</i>	UC, SEC, proteomic, SEM, NTA
	De Pablos et al., 2016	M / E	Trypomastigotes (CL- Brener, PAN4 strains)	<i>in vivo</i>	UC, TEM
	Garcia-Silva et al., 2014	M / E	Trypomastigotes (Dm 28c clone)	<i>in vitro</i>	UC, TEM, Bradford
	Lovo-Martins et al., 2018	M / E	Trypomastigotes (Y strain)	<i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	UC, NTA
	Lozano et al., 2017	M / E	Amastigote, epimastigotes, trypomastigotes (PAN4 strain) / Vero cells	<i>in vitro</i>	UC, SEM, TEM, confocal laser scanning microscopy, Micro-BCA, WB
	Madeira et al., 2021	M / E	Trypomastigotes (Y strain) and Plasma of chronic Chagas disease patients	<i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	UC, CL-ELISA, NTA, SEM
	Moreira et al., 2019	E	Trypomastigotes (PAN4 strain)	<i>in vitro</i>	UC, TEM, NTA, DLS, WB, Micro-BCA
	Neves et al., 2014	M / E	Trypomastigotes (Y strain and CL-Brener clone)	<i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	UC, SEM, TEM, Bradford
	Nogueira et al., 2015	M	Trypomastigotes (Colombiana, YuYu, Y and CL-14 strain)	<i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	UC, SEC, SEM, NTA, CL-ELISA, Micro-BCA
	Ramirez et al., 2017	M	Epimastigotes and trypomastigotes (Sylvio X10/6, Y, CL strains) / THP-1	<i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	UC, FC, proteomic, Bradford
	Ribeiro et al., 2018	M / E	Trypomastigotes (Y and YuYu strains)	<i>in vitro</i>	UC, SEC, SEM, NTA, CL-ELISA, WB, proteomic
Others					
<i>Toxoplasma gondii</i>	Beauvillain et al., 2007	E	Dendritic cell (SRDC)	<i>in vivo</i>	UC, SEM, Micro-BCA
<i>Leishmania amazonensis</i>	Cronemberger-Andrade et al., 2014	M / E	Macrophages (Bone marrow cells - BALB/c mice)	<i>in vitro</i>	UC, FC, TEM, Micro-BCA
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG and <i>M. tuberculosis</i>	Giri and Schorey, 2008	E	<i>M. tuberculosis</i> and <i>M. bovis</i> BCG-infected macrophages (J774 cell line)	<i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	UC, Sucrose-density gradient, FC, Micro-BCA, WB, TEM
<i>Leishmania infantum</i> , <i>L. braziliensis</i> and <i>L. amazonensis</i>	Nogueira et al., 2020	M / E	<i>L. infantum</i> (MCAN/BR/89/BA262 strain), <i>L. braziliensis</i> (MHOM/BR/01/BA788 strain), and <i>L. amazonensis</i> (MHOM/BR/87/BA125 strain) promastigotes	<i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	UC, NTA, SEM, Micro-BCA
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Oliveira et al., 2010	M / E	<i>C. neoformans</i> (HEC3393, B3501, Cap 67 strains)	<i>in vitro</i>	UC, confocal laser scanning microscopy, quantitative fluorimetric Amplex Red sterol assay kit
<i>Leishmania donovani</i> and <i>L. major</i>	Silverman et al., 2010	E	<i>L. donovani</i> (Sudan S2, 1SR, 1SR HSP1002/2, Bob, BobLPG22/2 strains) and <i>L. major</i> (Fredlin strain) amastigotes	<i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	UC, mass spectrometry, Sucrose-density gradient, WB
<i>Candida albicans</i>	Vargas et al., 2015	M / E	<i>C. albicans</i> (11, ATCC 90028, ATCC SC5314 strains)	<i>in vitro</i>	UC, TEM, DLS, SDS-PAGE, immunoblotting, proteomic, quantitative fluorimetric kit

M, Microvesicles; E, Exosomes; UC, Ultracentrifugation; WB, Western Blot; SEM, Scanning Electron Microscopy; TEM, Transmission Electron Microscopy; FC, Flow Cytometry; DLS, Dynamic Light Scattering; NTA, Nanoparticle Tracking Analysis; SEC, Size-exclusion Chromatography; CL-ELISA, Chemiluminescent Enzyme-linked Immunosorbent Assay; Micro-BCA, bicinchoninic acid assay; Micro-BCA, protein assay kit; PCR, Polymerase Chain Reaction; CLSM, Confocal Laser Scanning Microscopy.



which may contribute to their survival (Cestari et al., 2012; Bautista-López et al., 2017). According to Ramirez et al., 2017, the close contact between the membranes results in the bidirectional fusion of microvesicles (host-parasite and vice-versa), thus facilitating the interaction between the parasite and the host cell plasma membranes. In metacyclic, tissue culture-derived trypomastigote and noninfective epimastigote, *T. cruzi* forms were shown to induce different levels of EVs release from host cells (Ramirez et al., 2017). Furthermore, the EVs released during the interaction of the parasite with host cells were able to increase (around 40-50%) the host cell invasion by metacyclic trypomastigotes (Ramirez et al., 2017).

In the *T. cruzi* infection, the mobilization of intracellular Ca^{2+} deposits by the host cell during the cell invasion leads to the depolarization of the host plasma membrane, the depolymerization of F-actin and to lysosomal recruitment to the point of infection (Tardieux et al., 1994; Caler et al., 2000; Scharfstein et al., 2000). The family of small membrane proteins of *T. cruzi* (TcSMP) detected in the EVsT trigger Ca^{2+} signaling and mobilization/exocytosis of lysosomes, events that induces parasitophorous vacuoles formation and invasion of the parasite (Neves et al., 2014; Martins et al., 2015). Thus, contributing to the invasion of host cells and the increase in the percentage of cellular parasitism (Moreira et al., 2019).

Furthermore, the evasion of the complement-mediated response is triggered by the formation of EVs in host cells that are induced by metacyclic trypomastigotes (Cestari et al., 2012; Lidani et al., 2017). The release of EVs from the parasitized cells is done as an escape mechanism of the innate immunity response, by invading host cells and inhibiting complement-mediated lysis and also facilitating host cell invasion. The parasite has been shown to be able to escape the immune system by depositing host cell-derived EVs on its surface, which inhibits the action of C3 convertase (Cestari et al., 2012). Once trypomastigotes reach the bloodstream, the parasite bypasses complement-mediated lysis and opsonization with the aid of surface proteins such as calreticulin and the complement regulatory protein (CRP) also called GP160. The Gp160 and the conserved regions of the N- and C-terminal of the mucin-associated surface proteins (MASPs) were found in the EVs secreted by trypomastigotes (De Pablos et al., 2016). The Gp160 is a trypomastigote GPI anchor surface protein that binds to C3b and C4b dissociating the classical and alternative C3 convertase from complement (Norris et al., 1991; Norris, 1998).

The EVs can also contribute to the activation of the immune response with the release of proinflammatory cytokines (Torró et al., 2018). Different strains of *T. cruzi* have been shown to release EVsT and promote the activation of macrophages via TLR2 (Nogueira et al., 2015). Cronemberger-Andrade et al., 2020, showed that THP-1 cells infected by EVsT were able to induce the activation and translocation of NF- κ B via TLR2 signaling. In addition, the EVs released by uninfected THP-1 cells also activated the cells via TLR2 (Cronemberger-Andrade et al., 2020). Furthermore, the EVs enriched with α -galactosyl triggered proinflammatory responses in macrophages via TLR2-signaling pathway (Nogueira et al., 2015; Ribeiro et al., 2018), (Figure 1B). Also, Choudhuri and Garg, 2020, demonstrated a

proinflammatory response in macrophages stimulated by EVsT and EVs from infected cells and plasma of acutely and chronically infected mice, in a mechanism dependent on PARP1 (a DNA repair enzyme). EVs containing oxidized DNA fragments are recognized by cytosolic DNA sensors, cyclic GMP-AMP synthase (cGAS) and as consequence they synergize with PARP1 inducing a NF- κ B-mediated proinflammatory cytokine production (Choudhuri and Garg, 2020).

However, in infection-derived inflammatory processes, the pre-treatment with EVsT from Y strain (EVsY) can downmodulate the release of TNF- α and nitric oxide (around 50%) as well as the increase in cardiac parasitism (2.5 times) in mice (Lovo-Martins et al., 2018). These data were associated with a reduction in TNF- α in plasma, decreased production of TNF- α and IL-6 by the spleen cells of infected mice (Lovo-Martins et al., 2018). Also, macrophage stimulation with EVsY before infection by *T. cruzi* increased (around 100%) the internalization rate of the parasite and the release of infecting trypomastigotes by these cells (Lovo-Martins et al., 2018), (Figures 1A, B).

Recently, Madeira et al., 2021, observed a lower concentration of circulating EVs associated with differential activation of the immunological system in patients with chronic Chagas disease, with increased production of IFN- γ ; when compared with uninfected healthy controls (Madeira et al., 2021). This data was associated with parasite persistence suggesting that the EVs can be potential candidates as biomarkers during the course of Chagas disease.

COMPOSITION OF EVsT AND ITS IMPACT IN THE COURSE OF CHAGAS DISEASE

The EVs composition contains proteins involved in host-parasite interactions, signaling, traffic and membrane fusion, transporters, oxidation-reduction, oxidized DNA, small RNAs derived from tRNAs and rRNAs among others (Théry et al., 2002; Bayer-Santos et al., 2013; Bautista-López et al., 2017; Witwer and Théry, 2019; Choudhuri and Garg, 2020), (Figure 1A). Moreover, EVs contain specific proteins involved in vesicle formation and specific markers of the endosomal pathway, such as Rab GTPases, chaperones and tetraspanins (Ostrowski et al., 2010).

The EVsT also carry a wide range of potential virulence factors, such as peptidases (calpain cysteine peptidase, oligopeptidase, thermostable carboxypeptidase 1 or aminopeptidase P), responsible for the proteolysis of different peptide substrates (Alvarez et al., 2012), oxidized DNA (Choudhuri and Garg, 2020) and ribosomal subunit (Torró et al., 2018). The epimastigotes forms also release fragments of tRNA that can induce epigenetic changes in host cells, changing the expression profile of genes involved with cytoskeleton, extracellular matrix and immune response pathways (García-Silva et al., 2014; Torrecilhas et al., 2020).

The probability of the EVsT to reach distant cells is related to the cellular microenvironment of the infected tissue and its distance to the appropriate means of transport (blood and

lymphatic fluid) (Rank et al., 2011; Torr o et al., 2018). In addition, different post-translational modifications in the EVs nucleus shared by the different forms of the parasite can also cause changes in the vesicle composition, protein targets and/or biological functions (Torr o et al., 2018). Bayer-Santos et al., 2013, analyzed the proteomic composition of EVsT, confirming that a large proportion of the *T. cruzi* secretome is constitutively released *via* EVs (Bayer-Santos et al., 2013).

It has been demonstrated that *T. cruzi* PAMPs are poorly detected by the innate immune system at the beginning of the disease, delaying the activation of the immune response of infected host cells (Torr o et al., 2018). By immuno electron microscopic analysis, on the surface of the EVsT it was found mucin-associated proteins (MSPs), that induced an insufficient switching from IgM to IgG during the infection in mice, allowing the parasite to escape the humoral response (De Pablos et al., 2016). Similar data was observed in chagasic patients (Lozano et al., 2017).

In general, these studies suggest that EVsT are able to modulate the inflammatory response by inhibition of pro-inflammatory cytokine and NO production, as well as alteration on the humoral response in favor of the parasite (Torrecilhas et al., 2009; De Pablos et al., 2016; Lozano et al., 2017; Lovo-Martins et al., 2018).

In summary, the studies show that there is no consensus on the role of EVs during the acute and chronic phases of Chagas disease. Most of the studies discussed here during the acute phase of the disease suggest that EVs and EVsT collaborate with the development of the parasite escape mechanism. In the chronic phase there is insufficient IgG exchange during infection in mice, which allows the parasite to escape the humoral response, Choudhuri and Garg, 2020, demonstrating that EVs contained damaged DNA, thus collaborating to a pro-inflammatory profile during the chronic phase. (Choudhuri and Garg, 2020).

***T. cruzi* AND EVsT ELICITS LIPID BODY BIOGENESIS AND LIPID MEDIATOR SYNTHESIS IN MACROPHAGES DURING INFECTION**

Lipid body (LB) accumulation within macrophages is a common feature observed in models of Chagas disease and other parasite infections (D'Avila et al., 2008; Almeida et al., 2018). In *in vitro* and *in vivo* *T. cruzi* infection, LBs are present in both, host and parasite cells (Toledo et al., 2016). Moreover, EVsT induce LB formation and lipid mediator synthesis that modulate the host response in favor of the parasite (Lovo-Martins et al., 2018).

The mechanism of biogenesis of LBs is a regulated event highlighting the role of peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ), a member of the nuclear receptor family. When activated, PPAR- γ acts as a transcription factor, translocating to the nucleus and heterodimers with the retinoid X receptors in target genes. (Figure 1B) The PPAR- γ is involved in the mechanisms of synthesis of inflammatory mediators, fatty acid uptake and lipid storage in macrophages. Also, the activation of

the TLR2 initiates a signaling cascade that culminates in LB biogenesis through the PPAR- γ activation (Almeida et al., 2009; Almeida et al., 2014). This data suggests that the TLR2 activation by EVsT may also activate PPAR- γ translocation during the mechanism of LB formation in Chagas disease (Figure 1B).

In unstimulated cells, LBs are present in small numbers. However, in cells involved in inflammatory processes, infectious or non-infectious, the number of LBs can increase considerably, depending on the type of cell and the stimulus (Murphy, 2012). In the experimental infection by *T. cruzi* in rats and mice, it was demonstrated that the parasite promotes an intense inflammatory response characterized by monocytes migration to the infectious sites (Freire-De-Lima et al., 2000; Melo et al., 2003). In these sites, LBs formation in macrophages was associated with enhancement of parasitism, characterized by increased numbers of parasite nests in cardiomyocytes (Melo et al., 2003; Toledo et al., 2016).

Although not presenting a typical membrane, LBs are delimited by an electron-dense hemi-membrane formed by a hydrophilic monolayer composed of phospholipids and structural proteins. The hydrophobic core consists mainly of neutral lipids such as triacylglycerol (TAG – the major components of LBs), diacylglycerol (DAG) and cholesterol ester, as well as unsaturated fatty acids, such as arachidonic acid (AA) and oleic acid (OA) (Murphy, 2001; Walther et al., 2017).

The LBs hemi-membrane display structural proteins from perilipin family (PLIN), including perilipin/PLIN1, PLIN2/ADRP (for "adipose differentiation-related protein"), PLIN3/TIP47 (for "tail-interacting protein of 47 Kda") (Figure 1B). The LBs present proteins involved in cell signaling processes, in vesicular transport, histones and cytokines in eukaryotic cells (Bozza et al., 2009; Li et al., 2012). Therefore, the LBs directly or indirectly act as hubs for many cell functions, such as metabolic processes, energy, store of neutral lipids for membrane synthesis, membrane traffic, intracellular signaling, lipid metabolism and the production of several inflammatory mediators (Walther et al., 2017; Almeida et al., 2018).

These organelles are considered intracellular sites of substrates and enzymes involved in the synthesis of lipid mediators biologically active, such as eicosanoids (D'Avila et al., 2006; D'Avila et al., 2011; Almeida et al., 2018). Arachidonic acid (AA) is the precursor of the eicosanoids, which is metabolized by enzymes, such as cyclooxygenase-2 (COX-2), to produce lipid mediators such as prostaglandins (PGs). Earlier studies have demonstrated that during *T. cruzi* infection, macrophages were positively immunostained for COX-2, (Freire-De-Lima et al., 2000; D'Avila et al., 2011). Although a COX-like enzyme has been reported in parasites, they do not express mammalian homologues COX-1 or COX-2. Thus, a synthesis of PGs is performed by PG synthases, which has already been identified in parasites with homology to humans (Kubata et al., 2007). Trypomastigotes stimulated with AA showed an increased number of LBs, representing sites of PGE₂ synthase (Toledo et al., 2016). In all these studies, both macrophages and parasite released large amounts of PGE₂ from new formed-LBs.

In summary, these data support the hypothesis that PGE₂ synthesis derived from LBs in infected cells are involved in the production of inflammatory mediators which can potentially inhibit the Th1 response in the host promoting the replication and survival of the parasite *via* enhancement of IL-10 production and a drastic reduction of TNF- α (D'Avila et al., 2011; Kalinski, 2012). Moreover, *T. cruzi* LBs are involved in the mechanism of release of the immunosuppressive inflammatory mediators, acting as an evasion strategy by the parasite (Toledo et al., 2016).

Interestingly, LBs biogenesis and PGE₂ synthesis have been observed in infected cells and in cells that do not contain internalized parasites, suggesting paracrine stimulation or a bystander amplification for the formation of these organelles and PGE₂ derived from LBs during *in vivo* and *in vitro* infections (Melo et al., 2003; D'Avila et al., 2011). This intercellular communication can occur through host-host cells or host-parasite mediators. Corroborating this fact, Lovo-Martins et al., 2018, demonstrated that EVsT from the Y strain alone were able to induce LBs and PGE₂ production by macrophages. In addition to LB formation, EVsT-stimulated macrophages showed higher PGE₂ production than non-stimulated macrophages (Lovo-Martins et al., 2018). PGE₂ derived from LBs inhibit the synthesis of TNF- α and antigen presentation, causing decreased NO production, thus allowing intracellular parasite survival (Freire-De-Lima et al., 2000; D'Avila et al., 2011).

Lovo-Martins et al., 2018, also demonstrated that infected macrophages primed with EVsT produced more PGE₂ (10 times) and less TNF- α and IL-6 (around 90% and 80%, respectively) than infected macrophages without prior EVsT exposure (Lovo-Martins et al., 2018). These authors hypothesized that EVsT could be down modulating the expression and activity of COX-2. As a result, the immune modulation exerted by PGE₂ production induced by EVsT seems to be important specifically in the beginning of the infection. In general, these data suggest that EVsT create a more favourable environment for *T. cruzi* infection, with a reduction in inflammatory cytokines and in the trypanocidal molecule NO.

These data support the role of EVsT in the complex pathogenesis of the acute phase of Chagas disease and provide new insights for a better understanding of the parasite-host interaction. However, the functionality of the EVs and the charges they carry in their compartments as well as the relevance of these products to the host cell should be further studied, as little is known about the ability of the EVs to modulate the conditions of the host cell.

REFERENCES

- Akers, J. C., Gonda, D., Kim, R., Carter, B. S., and Chen, C. C. (2013). Biogenesis of Extracellular Vesicles (EV): Exosomes, Microvesicles, Retrovirus-Like Vesicles, and Apoptotic Bodies. *J. Neurooncol.* 1 (113), 1–115. doi: 10.1007/s11060-013-1084-8
- Almeida, P. E., Roque, N. R., Magalhães, K. G., Mattos, K. A., Teixeira, L., Maya-Monteiro, C., et al. (2014). Differential TLR2 Downstream Signaling Regulates Lipid Metabolism and Cytokine Production Triggered by *Mycobacterium bovis* BCG Infection. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1841 (1), 97–107. doi: 10.1016/j.bbalip.2013.10.008

CONCLUSION

The EVs shedding is a highly conserved parasite-host-cell interaction mechanism. The interaction between *T. cruzi* and its host cells is a bidirectional phenomenon, with thousands of EVs shared during the process. In this mini-review, we discuss the paradoxical role of EVs, which might coexist and affect differently the host response, presenting on one hand a protective role while in other studies, it contributes to the evasion mechanism, mainly through the modulation of the lipid metabolism for the production of PGE₂. Also, in this mini-review, we mentioned several typical implications of EVs during *T. cruzi* infection, with an important impact in the host-lipid metabolism even in uninfected cells. Thus, the importance of EVs in the modulation of the host immune response presents a potential target for biomarkers of the Chagas disease progression.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

HD and PA drafted the manuscript. AA and LC edited figures. HD, AA, NS, LC, PR, JC, and PA wrote and approved the final version of the paper. PA and HD edited the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Brasil (CNPq) (309523/2019-2), FAPDF and Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular/UNB. AA is PhD student supported by a UFJF (Federal University of Juiz de Fora) fellowship. NS and LC are PhD students supported by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) fellowship.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Cassiana M. Boya for the English language revision.

- Almeida, P. E., Silva, A. R., Maya-Monteiro, C. M., Torocsik, D., D'Avila, H., Dezso, B., et al. (2009). *Mycobacterium bovis* bacillus *calmette-Guerin* Infection Induces TLR2-Dependent Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Expression and Activation: Functions in Inflammation, Lipid Metabolism, and Pathogenesis. *J. Immunol.* 183 (2), 1337–1345. doi: 10.1515/crll.1891.108.269
- Almeida, P. E. de, Toledo, D. A. M., Rodrigues, G. S. C., and D'Avila, H. (2018). Lipid Bodies as Sites of Prostaglandin E2 Synthesis During Chagas Disease: Impact in the Parasite Escape Mechanism. *Front. Microbiol.* 9, 499 (Mar). doi: 10.3389/fmicb.2018.00499

- Alvarez, V. E., Niemirowicz, G. T., and Cazzulo, J. J. (2012). The Peptidases of *Trypanosoma Cruzi*: Digestive Enzymes, Virulence Factors, and Mediators of Autophagy and Programmed Cell Death. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1824 (1), 195–206. doi: 10.1016/j.bbapap.2011.05.011
- Babatunde, K. A., and Subramanian, B. Y. (2020). Role of Extracellular Vesicles in Cellular Cross Talk in Malaria. *Front. Immunol.* 11, 22. doi: 10.3389/fimmu.2020.00022
- Bautista-López, N. L., Ndao, M., and Camargo, V. (2017). Characterization and Diagnostic Application of *Trypanosoma Cruzi* Trypomastigote Excreted-Secreted Antigens Shed in Extracellular Vesicles Released From Infected Mammalian Cells. *J. Clin. Microbiol.* 55 (3), 744–758. doi: 10.1128/JCM.01649-16
- Bayer-Santos, E., Aguilar-Bonavides, C., Rodrigues, S. P., Cordero, E. M., Marques, A. F., Varela-Ramirez, A., et al. (2013). Proteomic Analysis of *Trypanosoma Cruzi* Secretome: Characterization of Two Populations of Extracellular Vesicles and Soluble Proteins. *J. Proteome Res.* 12 (2), 883–975. doi: 10.1021/pr300947g
- Beauvillain, C., Ruiz, S., Guiton, R., Bout, D., and Dimier-Poisson, I. (2007). A Vaccine Based on Exosomes Secreted by a Dendritic Cell Line Confers Protection Against *T. Gondii* Infection in Syngeneic and Allogeneic Mice. *Microbes Infect.* 9 (14–15), 1614–1622. doi: 10.1016/j.micinf.2007.07.002
- Bozza, P. T., Magalhães, K. G., and Weller Peter, F. (2009). Leukocyte Lipid Bodies - Biogenesis and Functions in Inflammation. *Biochim. Biophys. Acta* 1791 (6), 540–551. doi: 10.1016/j.bbap.2009.01.005
- Caler, E. V., Morty, R. E., Burleigh, B. A., and Andrews, N. W. (2000). Dual Role of Signaling Pathways Leading to Ca²⁺ and Cyclic AMP Elevation in Host Cell Invasion by *Trypanosoma Cruzi*. *Infect. Immun.* 68 (12), 6602–6105. doi: 10.1128/IAI.68.12.6602-6610.2000
- Campos, F. M. F., Franklin, B. S., Teixeira-carvalho, A., Filho, A. L. S., De Paula, S. C. O., Fontes, C. J., et al. (2010). Augmented Plasma Microparticles During Acute Plasmodium Vivax Infection. *Malaria J.* 9 (1), 3275. doi: 10.1186/1475-2875-9-327
- Cestari, I., Ansa-Addo, E., Deolindo, P., Inal, J. M., and Ramirez, M. I. (2012). *Trypanosoma cruzi* Immune Evasion Mediated by Host Cell-Derived Microvesicles. *J. Immunol.* 188 (4), 1942–1525. doi: 10.4049/jimmunol.1102053
- Choudhuri, S., and Garg, N. J. (2020). PARP1-CGAS-NF-KB Pathway of Proinflammatory Macrophage Activation by Extracellular Vesicles Released During *Trypanosoma Cruzi* Infection and Chagas Disease. *PLoS Pathog.* 16 (4), 1–275. doi: 10.1371/journal.ppat.1008474
- Cronemberger-Andrade, A., Aragão-França, L., de Araujo, C. F., Rocha, V. J., Borges-Silva, M. da C., Figueiras, C. P., et al. (2014). Extracellular Vesicles From Leishmania-Infected Macrophages Confer an Anti-Infection Cytokine-Production Profile to Naïve Macrophages. *PLoS Neglect. Trop. Dis.* 8 (9), 1–105. doi: 10.1371/journal.pntd.0003161
- Cronemberger-Andrade, A., Xander, P., Soares, R. P., Pessoa, N. L., Campos, M. A., Cameron, C., et al. (2020). *Trypanosoma cruzi*-Infected Human Macrophages Shed Proinflammatory Extracellular Vesicles That Enhance Host-Cell Invasion via Toll-Like Receptor 2. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10, 99. doi: 10.3389/fcimb.2020.00099
- D'Ávila, H., Freire-de-Lima, C. G., Roque, N. R., Teixeira, L., Barja-Fidalgo, C., Silva, A. R., et al. (2011). Host Cell Lipid Bodies Triggered by *Trypanosoma Cruzi* Infection and Enhanced by the Uptake of Apoptotic Cells Are Associated With Prostaglandin E2 Generation and Increased Parasite Growth. *J. Infect. Dis.* 204 (6), 951–615. doi: 10.1093/infdis/jir432
- D'Ávila, H., Maya-monteiro, C. M., and Bozza, P. T. (2008). Lipid Bodies in Innate Immune Response to Bacterial and Parasite Infections. *Int. Immunopharmacol.* 8 (10), 1308–1155. doi: 10.1016/j.intimp.2008.01.035
- D'Ávila, H., Melo, R. C. N., Parreira, G. G., Werneck-Barroso, E., Castro-Faria-Neto, H. C., and Bozza, P. T. (2006). *Mycobacterium Bovis Bacillus Calmette-Guerin* Induces TLR2-Mediated Formation of Lipid Bodies: Intracellular Domains for Eicosanoid Synthesis *In Vivo*. *J. Immunol.* 176 (5), 3087–3097. doi: 10.4049/jimmunol.176.5.3087
- De Pablos, L. M., Lozano, I. M. D., Jercic, M. I., Quinzada, M., Giménez, M. J., Calabuig, E., et al. (2016). The C-Terminal Region of *Trypanosoma cruzi* MASPs Is Antigenic and Secreted via Exovesicles. *Sci. Rep.* 6 (June), 1–12. doi: 10.1038/srep27293
- Dong, G., Filho, A. L., and Olivier, M. (2019). Modulation of Host-Pathogen Communication by Extracellular Vesicles (EVs) of the Protozoan Parasite *Leishmania*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9, 100. doi: 10.3389/fcimb.2019.00100
- Freire-De-Lima, C. G., Nascimento, D. O., Soares, M. B. P., Bozza, P. T., Castro-Faria-Neto, H. C., De Mello, F. G., et al. (2000). Uptake of Apoptotic Cells Drives the Growth of a Pathogenic Trypanosome in Macrophages. *Nature*, 403, 199–203. doi: 10.1038/35003208
- Garcia-Silva, M. R., Neves, R. F. C. D., Cabrera-Cabrera, F., Sanguinetti, J., Medeiros, L. C., Robello, C., et al. (2014). Extracellular Vesicles Shed by *Trypanosoma Cruzi* Are Linked to Small RNA Pathways, Life Cycle Regulation, and Susceptibility to Infection of Mammalian Cells. *Parasitol. Res.* 113 (1), 285–304. doi: 10.1007/s00436-013-3655-1
- Giri, P. K., and Schorey, J. S. (2008). Exosomes Derived From M. Bovis BCG Infected Macrophages Activate Antigen-Specific CD4+ and CD8+ T Cells *In Vitro* and *In Vivo*. *PLoS One* 3 (6), 1–105. doi: 10.1371/journal.pone.0002461
- Gonçalves, M. F., Umezawa, E. S., Katzin, A. M., de Souza, W., Alves, M. J. M., Zingales, B., et al. (1991). *Trypanosoma Cruzi*: Shedding of Surface Antigens as Membrane Vesicles. *Exp. Parasitol.* 72 (1), 43–535. doi: 10.1016/0014-4894(91)90119-H
- Kalinski, P. (2012). Regulation of Immune Responses by Prostaglandin E2. *J. Immunol.* 188 (1), 21–28. doi: 10.4049/jimmunol.1101029
- Kubata, B. K., Duzsenko, M., Samuel Martin, K., and Urade, Y. (2007). Molecular Basis for Prostaglandin Production in Hosts and Parasites. *Trends Parasitol.* 23 (7), 325–315. doi: 10.1016/j.pt.2007.05.005
- Lidani, K. C. F., Bavia, L., Ambrosio, A. R., and de Messias-Reason, I. J. (2017). The Complement System: A Prey of *Trypanosoma Cruzi*. *Front. Microbiol.* 8, 607. doi: 10.3389/fmicb.2017.00607
- Li, Z., Thiel, K., Thul, P. J., Beller, M., Kühnlein, R. P., and Welte, M. A. (2012). Lipid Droplets Control the Maternal Histone Supply of *Drosophila* Embryos. *Curr. Biol.* 22 (22), 2104–2135. doi: 10.1016/j.cub.2012.09.018
- Lovo-Martins, M. I., Malvezi, A. D., Zanluqui, N. G., Lucchetti, B. F. C., Tatakahara, V. L. H., Mörking, P. A., et al. (2018). Extracellular Vesicles Shed By *Trypanosoma Cruzi* Potentiate Infection and Elicit Lipid Body Formation and PGE2 Production in Murine Macrophages. *Front. Immunol.* 9, 896 (Apr). doi: 10.3389/fimmu.2018.00896
- Lozano, D. I. M., Pablos, L. M. De, Longhi, S. A., Zago, M. P., Schijman, A. G., and Osuna, A. (2017). Immune Complexes in Chronic Chagas Disease Patients Are Formed by Exovesicles From *Trypanosoma Cruzi* Carrying the Conserved MASP N-Terminal Region. *Sci. Rep.* 7, 1–14. doi: 10.1038/srep44451
- Madeira, R. P., Romera, L. M. D., Buck, P. De C., Mady, C., Ianni, B. M., and Torrecilhas, A. C. (2021). New Biomarker in Chagas Disease: Extracellular Vesicles Isolated From Peripheral Blood in Chronic Chagas Disease Patients Modulate the Human Immune Response. *J. Immunol. Res.* 11, 6650670. doi: 10.1155/2021/6650670
- Mantel, P. Y., and Marti, M. (2014). The Role of Extracellular Vesicles in Plasmodium and Other Protozoan Parasites. *Cell. Microbiol.* 16 (3), 344–545. doi: 10.1111/cmi.12259
- Marcella, A., Martin-Jaular, L., Trellis, M., de Menezes-Neto, A., Osuna, A., Bernal, D., et al. (2014). Extracellular Vesicles in Parasitic Diseases. *J. Extracellular Vesicles* 3 (1), 1–155. doi: 10.3402/jev.v3.25040
- Martins, N. O., de Souza, R. T., Cordero, E. M., Maldonado, D. C., Cortez, C., Marini, M. M., et al. (2015). Molecular Characterization of a Novel Family of *Trypanosoma Cruzi* Surface Membrane Proteins (TcSMP) Involved in Mammalian Host Cell Invasion. *PLoS Neglect. Trop. Dis.* 9 (11), 1–28. doi: 10.1371/journal.pntd.0004216
- Melo, R. C. N., Ávila, H. D., Fabrino, D. L., Almeida, P. E., and Bozza, P. T. (2003). Macrophage Lipid Body Induction by Chagas Disease *In Vivo*: Putative Intracellular Domains for Eicosanoid Formation During Infection. *Tissue Cell* 35 (1), 59–67. doi: 10.1016/S0040-8166(02)00105-2
- Moreira, L. R., Serrano, F. R., and Osuna, A. (2019). Extracellular Vesicles of *Trypanosoma Cruzi* Tissue-Culture Cell-Derived Trypomastigotes: Induction of Physiological Changes in Non-Parasitized Culture Cells. *PLoS Neglect. Trop. Dis.* 13 (2), 1–265. doi: 10.1371/journal.pntd.0007163
- Murphy, D. J. (2001). The Biogenesis and Functions of Lipid Bodies in Animals, Plants and Microorganisms. *Progress Lipid Res* 40 (5), 325–438. doi: 10.1016/S0163-7827(01)00013-3
- Murphy, D. J. (2012). The Dynamic Roles of Intracellular Lipid Droplets: From Archaea to Mammals. *Heterocyclic Commun.* 249 (3), 541–585. doi: 10.1007/s00709-011-0329-
- Neves, R. F. C., Fernandes, A. C. S., Meyer-Fernandes, J. R., and Souto-Padrón, T. (2014). *Trypanosoma Cruzi*-Secreted Vesicles Have Acid and Alkaline

- Phosphatase Activities Capable of Increasing Parasite Adhesion and Infection. *Parasitol. Res.* 113 (8), 2961–2725. doi: 10.1007/s00436-014-3958-x
- Nogueira, P. M., de Menezes-Neto, A., Borges, V. M., Descoteaux, A., Torrecilhas, A. C., Xander, P., et al. (2020). Immunomodulatory Properties of *Leishmania* Extracellular Vesicles During Host-Parasite Interaction: Differential Activation of TLRs and NF- κ B Translocation by Dermotropic and Viscerotropic Species. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10, 380. doi: 10.3389/fcimb.2020.00380
- Nogueira, P. M., Ribeiro, K., Silveira, A. C. O., Campos, J. H., Martins-Filho, O. A., Bela, S. R., et al. (2015). Vesicles From Different *Trypanosoma Cruzi* Strains Trigger Differential Innate and Chronic Immune Responses. *J. Extracellular Vesicles* 4 (1), 1–16. doi: 10.3402/jev.v4.28734
- Norris, K. A. (1998). Stable Transfection of *Trypanosoma Cruzi* Epimastigotes With the Trypomastigote-Specific Complement Regulatory Protein CDNA Confers Complement Resistance. *Infect. Immun.* 66 (6), 2460–2465. doi: 10.1128/iai.66.6.2460-2465.1998
- Norris, K. A., Bradt, B., Cooper, N. R., and So, M. (1991). Characterization of a *Trypanosoma Cruzi* C3 Binding Protein With Functional and Genetic Similarities to the Human Complement Regulatory Protein, Decay-Accelerating Factor. *J. Immunol.* 147 (7), 2240–2247.
- Oliveira, L., Freire-de-lima, G., Nosanchuk, J. D., Casadevall, A., Rodrigues, M. L., and Nimrichter, L. (2010). Extracellular Vesicles From *Cryptococcus Neofomans* Modulate Macrophage Functions. *Infect. Immun.* 78 (4), 1601–1695. doi: 10.1128/IAI.01171-09
- Ostrowski, M., Carmo, N. B., Krumeich, S., Fanget, I., Raposo, G., Savina, A., et al. (2010). Rab27a and Rab27b Control Different Steps of the Exosome Secretion Pathway. *Nat. Cell Biol.* 12 (1), 19–30. doi: 10.1038/ncb2000
- Palacios, A., Gupta, S., Rodriguez, G.M., and Prados-rosales, R. (2021). Extracellular Vesicles in the Context of *Mycobacterium Tuberculosis* Infection. *Mol. Immunol.* 133 (Jan), 175–181. doi: 10.1016/j.molimm.2021.02.010
- Ramirez, M. I., Deolindo, P., de Messias-Reason, I. J., Arigi, E. A., Choi, H., Almeida, I. C., et al. (2017). Dynamic Flux of Microvesicles Modulate Parasite-Host Cell Interaction of *Trypanosoma Cruzi* in Eukaryotic Cells. *Cell. Microbiol.* 19 (4), 1–155. doi: 10.1111/cmi.12672
- Rank, A., Nieuwland, R., Crispin, A., Grütznher, S., Iberer, M., Toth, B., et al. (2011). Clearance of Platelet Microparticles *In Vivo*. *Platelets* 22 (2), 111–116. doi: 10.3109/09537104.2010.520373
- Ribeiro, K. S., Vasconcellos, C. L., Soares, R. P., Mendes, M. T., Ellis, C. C., Aguilera-Flores, M., et al. (2018). Proteomic Analysis Reveals Different Composition of Extracellular Vesicles Released by Two *Trypanosoma Cruzi* Strains Associated With Their Distinct Interaction With Host Cells. *J. Extracellular Vesicles* 7, 213–228. doi: 10.1080/20013078.2018.1463779
- Scharfstein, J., Schmitz, V., Morandi, V., Capella, M. M. A., Lima, A. P. C. A., Morrot, A., et al. (2000). Host Cell Invasion by *Trypanosoma Cruzi* Is Potentiated by Activation of Bradykinin B2 Receptors. *J. Exp. Med.* 192 (9), 1289–1995. doi: 10.1084/jem.192.9.1289
- Silveira, J.F. Da, Abrahamsohn, P. A., and Colli, W. (1979). Plasma Membrane Vesicles Isolated From Epimastigote Forms of *Trypanosoma Cruzi*. *BBA - Biomembr.* 550 (2), 222–325. doi: 10.1016/0005-2736(79)90209-8
- Silverman, J. M., Clos, J., Horakova, E., Wang, A. Y., Wiesigig, M., Kelly, I., et al. (2010). *Leishmania* Exosomes Modulate Innate and Adaptive Immune Responses Through Effects on Monocytes and Dendritic Cells. *J. Immunol.* 185 (9), 5011–5022. doi: 10.4049/jimmunol.1000541
- Tardieux, I., Nathanson, M. H., and Andrews, N. W. (1994). Role in Host Cell Invasion of *Trypanosoma Cruzi*-Induced Cytosolic-Free Ca^{2+} Transients. *J. Exp. Med.* 179 (3), 1017–1225. doi: 10.1084/jem.179.3.1017
- Théry, C., Zitvogel, L., and Amigorena, S. (2002). Exosomes: Composition, Biogenesis and Function. *Nat. Rev. Immunol.* 2 (8), 569–795. doi: 10.1038/nri855
- Toledo, D. A. M., Roque, N. R., Teixeira, L., Milán-Garcés, E. A., Carneiro, A. B., Almeida, M. R., et al. (2016). Lipid Body Organelles Within the Parasite. *Trypanosoma cruzi*: A Role Intracellular Arachidonic Acid Metabolism. *PLoS One* 11 (8), 1–22. doi: 10.1371/journal.pone.0160433
- Torrecilhas, A. C., Schumacher, R. L., Alves, M. J. M., and Colli, W. (2012). Vesicles as Carriers of Virulence Factors in Parasitic Protozoan Diseases. *Microbes Infect.* 14 (15), 1465–1745. doi: 10.1016/j.micinf.2012.07.008
- Torrecilhas, A. C., Soares, R. P., Schenkman, S., Fernández-Prada, C., and Olivier, M. (2020). Extracellular Vesicles in Trypanosomatids: Host Cell Communication.” *Host Cell Communication. Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10, 602502. doi: 10.3389/fcimb.2020.602502
- Torrecilhas, A. C., Tonelli, R. R., Pavanelli, W. R., da Silva, J. S., Schumacher, R. L., de Souza, W., et al. (2009). *Trypanosoma Cruzi*: Parasite Shed Vesicles Increase Heart Parasitism and Generate an Intense Inflammatory Response. *Microbes Infect.* 11 (1), 29–39. doi: 10.1016/j.micinf.2008.10.003
- Torró, L. M. P., Moreira, L. R., and Osuna, A. (2018). Extracellular Vesicles in Chagas Disease: A New Passenger for an Old Disease. *Front. Microbiol.* 9, 1190. doi: 10.3389/fmicb.2018.01190
- Van Niel, G., Angelo, G. D., and Raposo, G. (2018). Shedding Light on the Cell Biology of Extracellular Vesicles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19 (4), 1–16. doi: 10.1038/nrm.2017.125
- Vargas, G., Rocha, J. D., Oliveira, D. L., Albuquerque, P. C., Frases, S., Santos, S. S., et al. (2015). Compositional and Immunobiological Analyses of Extracellular Vesicles Released by *Candida Albicans*. *Cell. Microbiol.* 17 (3), 389–407. doi: 10.1111/cmi.12374
- Walther, T. C., Chung, J., and Farese, R. V. Jr. (2017). Lipid Droplet Biogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 33 (Oct), 491–5100. doi: 10.1146/2Fannurev-cellbio-100616-060608
- Witwer, K. W., and Théry, C. (2019). Extracellular Vesicles or Exosomes? On Primacy, Precision, and Popularity Influencing a Choice of Nomenclature. *J. Extracellular Vesicles* 8 (1), 1–7. doi: 10.1080/20013078.2019.1648167
- Yoshida, N., and Cortez, M. (2008). *Trypanosoma Cruzi*: Parasite and Host Cell Signaling During the Invasion Process. *Subcellular Biochem.* 47, 82–91. doi: 10.1007/978-0-387-78267-6_6

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

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 D'Avila, Souza, Albertoni, Campos, Rampinelli, Correa and Almeida. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



Contents lists available at ScienceDirect

Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/saa

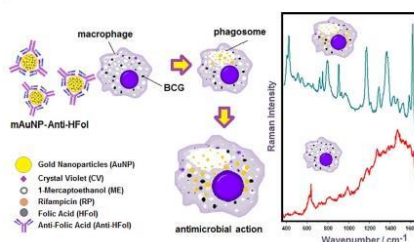
Accessing BCG in infected macrophages by antibody-mediated drug delivery system and tracking by surface-enhanced Raman scattering spectroscopy

Francieli R.A. Lima^a, Laíris C. Campos^b, Gilson C. Macedo^c, Heloisa D' Avila^{b,1}, Antonio C. Sant'Ana^{a,1,*}^a Laboratório de Nanoestruturas Plasmônicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, 36036-900, Brazil^b Laboratório de Biologia Celular, Universidade Federal de Juiz de Fora, 36036-900, Brazil^c Laboratório de Imunologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, 36036-900, Brazil

HIGHLIGHTS

- Au nanoparticles modified with antibody, carrying rifampicin to infected macrophages.
- Antibiotic drug delivery led to the combat of BCG bacteria infecting macrophages.
- The uptake of gold nanocarrier in macrophage was monitored by SERS spectroscopy.
- Anti-folic acid was anchored on gold surface bonding to previous adsorbed folic acid.
- Antibody modifying gold surface interacted with macrophages by non-specific portions.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 December 2020

Received in revised form 12 February 2021

Accepted 1 March 2021

Available online 9 March 2021

Keywords:

Bacterial resistance
Nanodevices
Plasmonic sensors
Tuberculosis

ABSTRACT

Gold nanoparticles (AuNP) modified with antibody and rifampicin (RP) were tested against *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG), which previously generated in vitro infection of macrophages from mice. Such a drug delivery system works as nanocarrier for RP and presented lower toxicity for macrophages cells than each separated component. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) spectroscopy and fluorescence microscopy were used as analytical tools for the characterization of the internalization of gold nanocarriers into macrophage cells. The effective antibiotic action of RP, when combined with gold nanocarrier, was confirmed by dead-live assay of BCG bacteria lysed from macrophages after incubation. Such results indicate the delivery of RP to BCG bacteria, which were infecting macrophages, occurred with remarkable efficiency. It was rationalized based on the strategy used for the adsorption of antibody molecules on gold surface.

© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author

E-mail address: antonio.sant@ufjf.edu.br (A.C. Sant'Ana).¹ These authors collaborated equally for the development of this work.<https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.119660>

1386-1425/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The use of gold nanoparticles (AuNP) for the building of drug carrier nanodevices is a hot research area in growing expansion [1–4]. Such systems have been used for drug vectorization with the improvement of the efficiency of medicines by the modification of the metallic surface with adsorbates, which present specific

interactions with target tissues [5–7]. Gold nanodevices are suitable for such biological applications once that allow the coadsorption of drugs and targeting molecules as antibodies, peptides or biomolecules enhancing their affinity by receptors present in the surface of target cells [8–11]. This kind of approach can lead to the high specificity of nanocarriers for target cells minimizing side effects of drugs, so uncomfortable for the patients, and collaborating for the effectiveness of the treatment [12–14]. It is noteworthy the relative low toxicity of gold nanomaterials when used as nanocarriers, in comparison with other metals [15,16].

Gold nanostructures have plasmonic properties that lead to the enhancement of electrical field of the incident electromagnetic radiation on their surfaces [17]. Such an effect allows the enhancement of the Raman signal of molecules adsorbed on the metallic surfaces, being the condition for their use in surface-enhanced Raman scattering (SERS) spectroscopy [18–21]. This technique is an outstanding analytical tool for identifying the presence of analytes in trace concentration, but also allows the understanding of adsorption mechanisms involving chemical interactions of each molecular component with the metallic surface [22–27]. Consequently, SERS studies allow the mastery of the anchorage mechanisms of drug adsorption on plasmonic surfaces. On the other hand, dye molecules have been used as SERS probes when coadsorbed with other components on gold nanocarrier surfaces, allowing the tracking of gold nanodevices in the target tissue [28–31]. It is possible since molecular probes present higher SERS signal than any other constituent, generally due to additional resonant Raman effect.

Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guérin (BCG) is a bacterial species used as model for infection by *Mycobacterium tuberculosis* [32–34] and particularly suitable for understanding intracellular process in infected macrophage cells [35–37]. Rifampicin (RP) is an antibiotic with widespread use in the treatment of tuberculosis, but presents intense undesirable effects for the reason that high dosages are necessary, besides allowing the appearance of bacterial resistivity during the prolonged treatment [38]. The appearance of multidrug resistant bacteria involved in tuberculosis treatment and in several other bacterial diseases indicates the necessity of the development of alternative procedures to lead to the enhancement of the efficiency in the combat of infections. The desired innovative treatments have to be conducted in shorter times for minimizing the desistance of patients [39,40]. In this way, the use of nanocarriers with high specificity, to enhance the action of drugs in infection diseases through delivery mechanisms, has shown itself as a relevant alternative to solve this problem [41–43].

In the present work AuNP modified with the antibiotic RP were synthesized with the coadsorption of several other molecules, each one with specific role as described below: 1-mercaptoethanol (ME) is a surface modifier, which can lead to strong interaction of RP with the metal [44], besides favouring the anchorage of several other components on gold surface through hydrogen bonds [45]; folic acid (HFol) that was used as an antigen to favour the chemical adsorption of the chosen antibody [46]; monoclonal anti-folic acid antibody (Anti-HFol), which was used for interaction with adsorbed HFol due to specific affinity, allowing their unspecific portion Fc remain available for the recognition of macrophage cells from mice; and crystal violet (CV) was used as a molecular probe for tracking interactions of AuNP with macrophages by SERS spectroscopy [8]. Such a composition was used for the combat of BCG bacteria, previously infecting macrophages. The toxicity of each component for macrophages was evaluated, as well as the effectiveness of such a nanodevice in both the specificity in the macrophage recognition and the combat of internalized BCG.

2. Experimental

2.1. Materials and synthesis procedures

The reactants trisodium citrate dihydrate (>99%), tetrachloroauric (III) acid (HAuCl₄) (>99.9%), CV (>90%), ME (>99%), RP (>97%), HFol (>97%) and Anti-HFol (15 mM) were purchased from Sigma-Aldrich. Deionized water, with Milli-Q pattern was used in all preparations. All glassware was washed before using with aqua regia solution, followed by copious washing with deionized water.

AuNP suspension was obtained as follow [47], 50 mL of 2.94×10^{-4} mol L⁻¹ HAuCl₄ aqueous solution was added to 1 mL of 0.0388 mol L⁻¹ trisodium citrate aqueous solution, previously heated until boiling condition. The AuNP synthesis was characterized by UV–VIS spectroscopy by using a Shimadzu UV-1800 spectrophotometer and Scanning Electron Microscopy (SEM) from a FEI–Magellan Field Emission Gun microscope.

The volume of 450 μ L of AuNP were modified by the addition, in the following order, of 90 μ L of CV at 1.0×10^{-6} mol L⁻¹, 90 μ L of ME at 1.0×10^{-5} mol L⁻¹, 90 μ L of RP in different concentrations (from 50 to 0.05 μ mol L⁻¹), 90 μ L of HFol at 1.0×10^{-5} mol L⁻¹ and 90 μ L of Anti-HFol at 1.0×10^{-10} mol L⁻¹. It is expected that all components are coadsorbed on metallic surface as represented in Fig. 1. All solutions were prepared in water, except RP that was prepared in ethanol. The AuNP modified with all components but Anti-HFol was named mAuNP, and after the addition of the antibody it was termed mAuNP-Anti-HFol.

2.2. Biological procedures

2.2.1. Macrophage sample preparation

Macrophage cells were obtained from male C57B16 mice, aged 6 to 8 weeks and weighing between 20 and 25 g, provided by the Centro de Biologia da Reprodução from Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). All experimental procedures were endorsed by Ethics Committee (CEUA, N° 021/2015). Mice were maintained by laboratory facilities of the Departamento de Biologia Animal in Instituto de Ciências Biológicas in UFJF, whit control of light and temperature and free access to food and water. Macrophage cells were obtained from peritoneal cavity of mice, after washing with 5 mL of sterile RPMI 1640 culture medium containing 1% of streptomycin and penicillin and collected in centrifuge tubes. It was made three pools from three animals each and they were maintained in ice bath. In the sequence, the wash was centrifuged under cooling at 4 °C by 1100 rpm and 5 min.

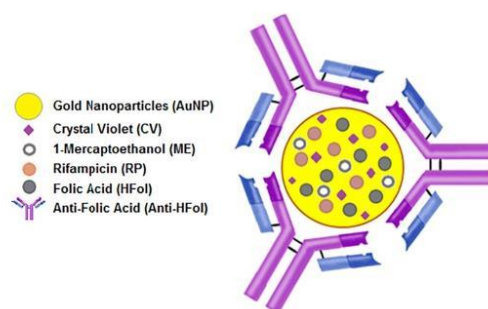


Fig. 1. Scheme of a particle of mAuNP-Anti-HFol.

2.2.2. Evaluation of macrophage cell viability and incubation

After the centrifugation, cells were suspended in RPMI culture medium containing 1% of streptomycin and penicillin and 2% of fetal bovine serum. Cells were quantified and their viability evaluated in Neubauer chamber after mix 20 μL of macrophage sample with 380 μL of 0.4% Tripan Blue dye solution. All samples presented cell viability > 95% and this parameter was used to prepare the solution for plating and culture. In a plate with 24 wells, containing circular coverslips, macrophages were plating with ca. 5.0×10^5 cells per well, in RPMI culture medium containing 1% of streptomycin and penicillin and 2% of fetal bovine serum. The plate was incubated overnight at 37 °C under CO₂ atmosphere to provide the adherence of the macrophages to the coverslip surfaces. After this, the wells were washed two times with the same culture medium to remove those no-adhered cells.

In each well was then added 100 μL of the same culture medium and either 900 μL of either mAuNP suspension or 450 μL of non-modified AuNP suspension and 450 μL of water, to preserve the concentration of AuNP. The plate was again incubated for 24 h in the same conditions described above and, after this, the wells were washed and 0.4% Tripan Blue dye solution was added. The dead cells were counted, in triplicate, in an optic microscope. The same procedure was used to evaluate the cell viabilities by using each isolated component CV, HFol, ME and mAuNP-Anti-HFol in the absence or presence of RP in different concentrations. Solutions containing only RP from 50 to 0.05 $\mu\text{mol L}^{-1}$ concentration range were also tested in the same preparation conditions. All viability cell assays were done in triplicate. A blank assay with ethanol 0.02% was always done, since this was the solvent of the RP solutions.

2.2.3. Internalization of mAuNP-Anti-HFol into BCG-infected macrophages analysed by fluorescence microscopy

An ampoule with 40 mg of lyophilized *Mycobacterium bovis* (BCG – strain: Moreau), from Fundação Athaulfo de Paiva, was diluted to 4 mL with solution of RPMI 1640. The macrophages were infected by BCG (MOI, 3:1) during 1 h, followed by three RPMI washes to remove non-internalized BCG. After wash it was added, in each well, 450 μL of RPMI culture medium containing 1% of streptomycin and penicillin and 2% of foetal bovine serum, together 50 μL of mAuNP-Anti-HFol aqueous suspension. The plate was incubated at 37 °C for 24 h under CO₂ atmosphere to provide the internalization of mAuNP-Anti-HFol into BCG-infected macrophages. The analysis of such internalization was done in a BX-51 Olympus fluorescence microscope, equipped with 100x lens, U-MVB filter and colour camera XC-50, with emitted light in the region of blue, with simultaneous evaluation of the fluorescence molecular probe. Such plates were also investigated through SERS spectroscopy. The evaluation of cells was made directly on the circular glass coverslips present in each well.

2.2.4. Evaluation of the interactions of mAuNP-Anti-HFol with BCG-infected macrophages by SERS spectroscopy

SERS spectra were recorded on coverslips, containing macrophage cells, after incubation with mAuNP and mAuNP-Anti-HFol, in different concentrations of RP, followed by washing with culture medium and drying as described in 2.2.3 section. SERS spectra were obtained by using a Senterra-Bruker spectrometer, coupled with an Olympus optical microscope, equipped with 50 \times objective lens, diffraction grating with 1800 grooves per mm and thermoelectrically cooled charge coupled device detector. The excitation line with wavelength at 632.8 nm, was obtained from a He-Ne laser and the collection pattern was 20 s, with 2 mW laser power. The plotted spectra are the average of those obtained with higher signal from triplicate assays.

2.2.5. Evaluation of BCG viability from infected macrophages after incubation with mAuNP-Anti-HFol

BCG viability assay was made based on the protocol of Live/Dead™ BacLight™ kit (Molecular Probes Eugene, inc, ThermoFisher Scientific, OR, USA, #L7012) for fluorescence microscopy. The macrophages were lysed with 0.1% saponin solution after incubation with mAuNP-Anti-HFol, as described above, and BCG bacteria were collected. It was added 3 μL of Live/Dead dyes in 1 mL of bacterial suspension and incubated in the dark for 15 min [33]. After this procedure, 5 μL were pressed between glass coverslips and the count of stained bacteria was done in a fluorescence microscope at 3 slots in each sample, according to the manufacturer's instructions (Molecular Probes).

2.2.6. Statistical analysis in cell viability experiments

The results were expressed as mean \pm standard error of the mean; data were analysed statistically by means of ANOVA software, followed by the Neuman-Keuls-Student's test; levels of significance were set at $p \leq 0.05$; all statistical results were obtained by using GraphPad Prism 5.0 software.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of the AuNP synthesis

The AuNP aqueous suspension was characterized through UV–VIS spectroscopy as presented in Fig. 2a, where a localized surface plasmon resonance band can be observed at around 522 nm. Such a feature indicates AuNP were formed with a narrow size distribution. The SEM micrograph was obtained from this sample and that hypothesis was confirmed, as can be observed in the Fig. 2b. The synthesized AuNP presented quasi-spherical shapes, which consist of anisotropic polyhedrons [48], with dimensions varying between 10 and 30 nm, as determined by SEM images.

3.2. Macrophage cell viability

Fig. 3 presents the viability assay of macrophage cells, before infection with BCG, against components and preparations used in this work.

Fig. 3a shows that CV, ME and HFol were more toxic to macrophage cells than when they were coadsorbed on the surface of gold (mAuNP). Noteworthy, non-modified AuNP was less toxic for such cells, which presented 97% of viability. Fig. 3b shows RP presented relevant toxicity for macrophage cells from 5 to 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ concentration range. Fig. 3c and 3d present cell viabilities with RP concentration altering in the same range, but adsorbed on the surface of either mAuNP or mAuNP-Anti-HFol, respectively. Such preparations presented low toxicity for macrophages, but increasing with RP concentration, and such viability values were near of those obtained with RP alone.

Table 1 presents some values extracted from the results of the toxicity of RP for macrophage cells, when alone or in combinations with mAuNP or mAuNP-Anti-HFol (Fig. 3b, 3c and 3d). From such values one can be observe that, in the presence of Anti-HFol, preparations with RP in higher concentrations presented a tendency to be less toxic for macrophage cells. In conclusion, the coadsorption of all components in the metallic surface diminished their toxic effects, probably due to steric effects, since the presence of adsorbed macromolecules precludes the interactions of such chemical agents with the cell wall.

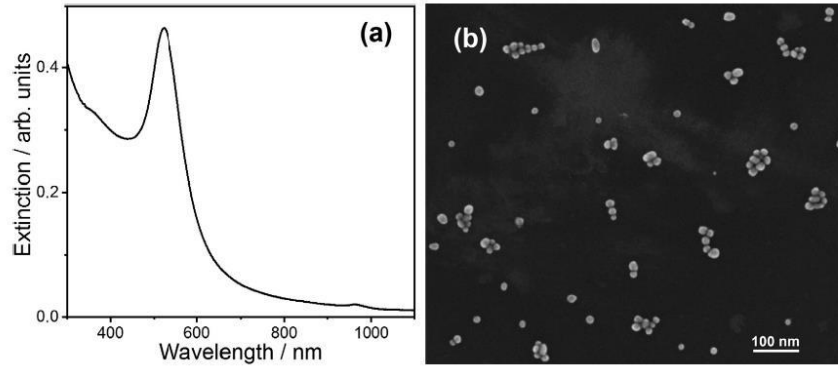


Fig. 2. (a) UV-VIS spectrum of AuNP aqueous suspension; (b) SEM micrograph of AuNP samples dried on Si substrate.

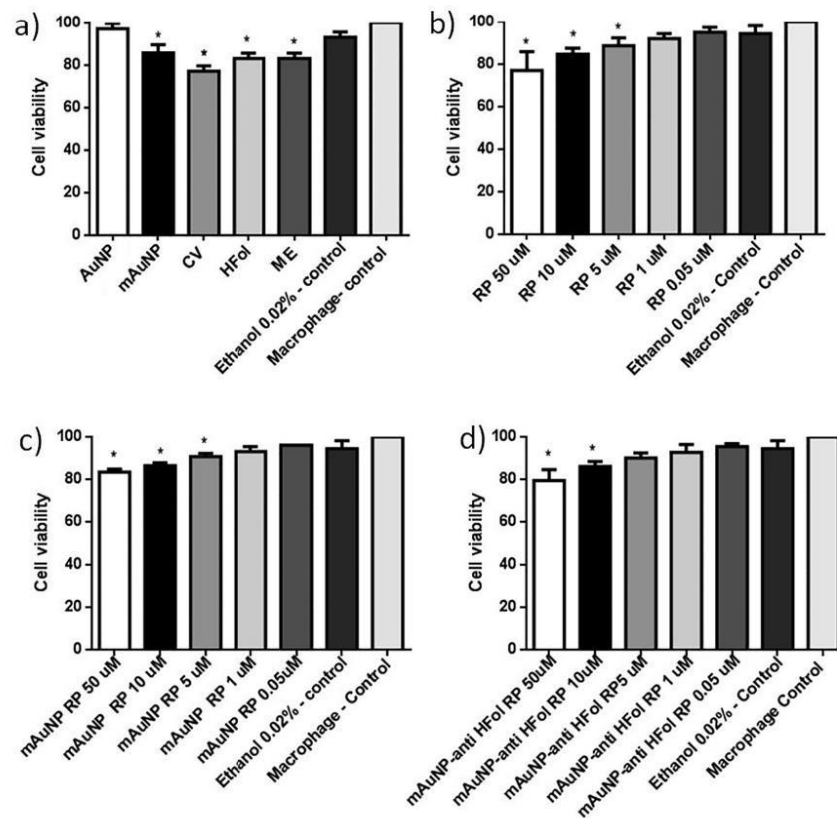


Fig. 3. Cell viability assay for macrophages incubated with (a) each component used to synthesis of mAuNP-Anti-HFol, (b) RP in different concentrations, (c) mAuNP and (d) mAuNP-Anti-HFol with different concentrations of RP. * $p < 0.05$ between control macrophages and treated groups.

Table 1

Percentage of viable macrophages after incubation with RP, in different concentrations, in the absence and presence of mAuNP and mAuNP-Anti-HFol.

RP concentration ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	50	10	5	1	0.05
RP	77.0	84.7	86.7	92.0	95.0
mAuNP	79.3	86.0	90.0	92.6	95.3
mAuNP-Anti-HFol	83.3	86.3	90.3	93.0	96.0

3.3. Interactions of mAuNP-Anti-HFol with BCG-infected macrophages evaluated by fluorescence microscopy and SERS spectroscopy

Fig. 4 shows images obtained by fluorescence microscopy of DAPI-dyed nuclei of macrophages before and after incubation with mAuNP-Anti-HFol.

It is possible to observe in the fluorescence image from Fig. 4b the presence of circular light stains near nuclei, after the macrophages were exposed to mAuNP-Anti-HFol. Such features have dimensions which allow us associate them with clusters of metallic nanoparticles with size around hundreds of nanometers. However, before the exposition of macrophages to nanocarriers (Fig. 4a) this image pattern with such stains was not observed. In this way it is possible to infer that mAuNP-Anti-HFol undergo internalization into macrophage cells.

SERS spectra of CV are presented in Fig. 5. They were recorded on BCG-infected macrophages before and after the incubation with either mAuNP-Anti-HFol or mAuNP, after the biological film was washed and dried.

The average SERS spectra of CV plotted in Fig. 5a-c were obtained from triplicate samples of macrophages incubated with mAuNP-Anti-HFol when concentrations of RP were altered. Even though a variation in the mean SERS signal of CV is present, it is clear the presence of the molecular probe in the macrophages. The higher signal-to-noise ratios indicate the definitive presence of plasmonic nanoparticles as consequence of effective interactions of mAuNP-Anti-HFol with the macrophage cells. It is possible that clusters of gold nanocarriers were formed due to the chemical environment in the interior of macrophages, leading to the formation of hot spots that were responsible for the enhancement of the SERS signal. On the other hand, after the incubation of macrophages with mAuNP, which contend adsorbed CV, but have Anti-HFol absent in the composition (Fig. 5d), the SERS spectra of CV could not be definitively characterized, allowing to infer the interactions of mAuNP with the cells were severely hindered. The last result indicates that after the incubation, the washing process was efficient to remove the greater part of mAuNP, which are not strongly bonded to macrophage membranes. In agreement, before the incubation of macrophages with any preparation none SERS signal was observed (Fig. 5e). One can be rationalize that

Anti-HFol was adsorbed on the surface of mAuNP through its interaction with the previously adsorbed antigen HFol. In such conditions the Fc portion of the antibody was available to be recognised by the macrophages and it was definitively essential for the phagocytosis process. It is important to note that adsorbed CV on gold surfaces presents strong SERS signal, due to the Resonance Raman Effect with the used laser line, superimposing its SERS response over all coadsorbed substances, being for this reason a conspicuous molecular probe. Such observed more intense SERS bands of CV are in agreement with its published SERS pattern and can be ascribed to adsorption mechanism involving charge transfer between nitrogen atoms and the metal surface [49]. In particular on gold surfaces, enhanced bands at 1616 and 1367 cm^{-1} , assigned to C = C stretching and $C_{\text{ring}}-N$ stretching modes, respectively, indicate the ring involved in the bond with the metallic surface is tilted [45].

3.4. BCG mortality of bacteria lysed from macrophages after incubation with mAuNP-Anti-HFol

After the incubation of BCG-infected macrophages with mAuNP-Anti-HFol, the lysing of them was induced and BCG bacteria were collected and evaluated for their metabolic performance. Counts of dead and living cells are presented in the histogram of Fig. 6.

Different assays with distinct concentrations of RP resulted in high mortality of BCG bacteria, which were significantly greater than that observed in the control assay. The mortalities were higher than 60% for all concentrations of RP and for 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ it was around 95.8%. Clearly the mortality was higher as RP concentration increased. Such results allow stating mAuNP-Anti-HFol was internalized and RP was active against BCG bacteria in the interior of macrophages.

It is noteworthy the role of ME in this composition, since from previous works we could observe that this mercaptan is a strong hydrogen bond promoter and favored the adsorption of HFol [46]. The presence of this adsorbate certainly was fundamental for the anchorage of Anti-HFol antibody on the metallic surface. One cannot be discarded the possibility of hydrogen bonds, mediated by ME, collaborates also for additional interactions of

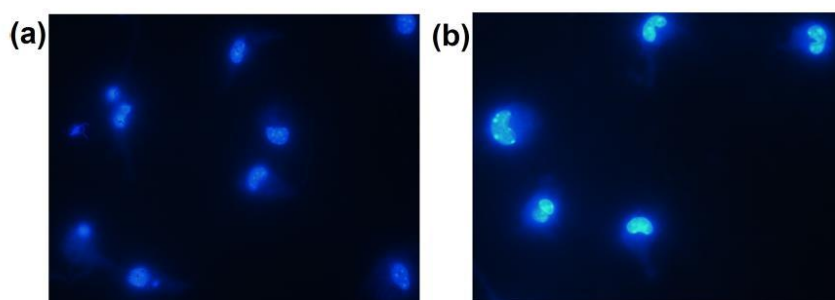


Fig. 4. Fluorescence images of nuclei of macrophages stained by DAPI, obtained (a) before and (b) after the exposition to mAuNP-Anti-HFol. Size images: 100 $\mu\text{m} \times 130 \mu\text{m}$.

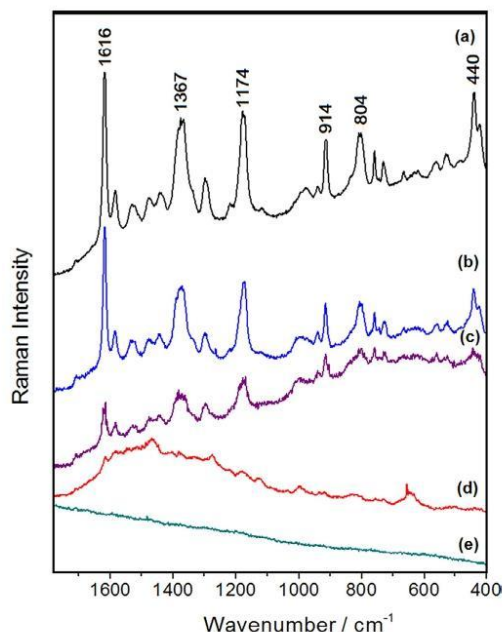


Fig. 5. SERS spectra of CV recorded on macrophage cells after the incubation with mAuNP-Anti-HFol in different RP concentrations: (a) $0.05 \mu\text{mol L}^{-1}$, (b) $1.0 \mu\text{mol L}^{-1}$, (c) $5.0 \mu\text{mol L}^{-1}$ and (d) after the incubation with mAuNP; (e) Raman spectrum recorded on macrophages before the incubation with mAuNP-Anti-HFol.

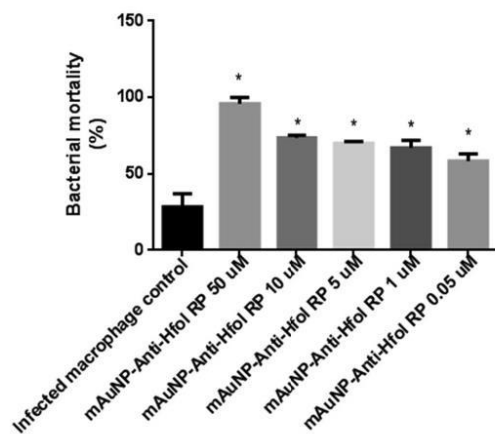


Fig. 6. Mortality of BCG after lysing of infected macrophage incubated with mAuNP-Anti-HFol, in different concentrations of RP. * $p < 0.05$ between infected macrophage and mAuNP-Anti-HFol treated groups.

Anti-HFol, since this surface modifier presented important role in the adsorption of macromolecules on gold surface as proved by SERS spectroscopy of bovine serum albumin [45]. Such strong enlace allowed this composition works as RP nanocarrier when it was recognized by macrophage receptors. Nevertheless, the

enhancement of RP interactions with ME-modified gold surface, also previously observed [44], allowed the internalization of mAuNP-Anti-HFol, which led to the carrying of active antibiotic molecules into the cells.

4. Conclusions

The use of mAuNP-Anti-HFol as nanocarriers of RP to combat BCG bacteria infecting macrophages presented outstanding results in vitro. The efficiency of the drug delivery was proven by the enhancement of the mortality of bacteria, which were tested after the lysis of macrophages.

The assays to evaluate the toxicity of drug nanocarriers for macrophages showed the preparations had low toxicity and mAuNP-Anti-HFol were less toxic than each isolated component used in their synthesis. Fluorescence microscopy indicated that interactions of mAuNP-Anti-HFol with macrophage cells can have occurred, with the consequent internalization of drug nanocarriers. SERS spectroscopy supported this assumption, since the SERS signal of the CV molecular probe only was observed when mAuNP were appended with coadsorbed Anti-HFol antibody. Such results can be ascribed to the phagocytosis of mAuNP-Anti-HFol favored by the recognition of the non-specific Fc portion of antibodies by macrophage cells, since Fab was compromised by specific interactions with HFol, also coadsorbed on gold surfaces. The counting of the number of dead and living BCG cells, after the lysis of macrophages, which were previously incubated with mAuNP-Anti-HFol, showed the mortality of bacteria approaches to 95% for the composition containing $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ of RP.

These set of results strongly indicates the internalization of mAuNP-Anti-HFol in macrophage cells occurred, preserving the activity of the drug. Therefore, it is possible to visualize perspectives for new strategies to avoid the loss of efficiency of antibiotics due to long time use through their association with drug delivery systems and thus, making a way to face the problem of bacterial resistance.

CRediT authorship contribution statement

Franciely R.A. Lima: Investigation, Validation, Formal analysis. **Laíris C. Campos:** Investigation, Validation, Formal analysis. **Gilson C. Macedo:** Conceptualization, Methodology. **Heloisa D' Avila:** Conceptualization, Methodology, Resources, Supervision, Project administration, Funding acquisition. **Antonio C. Sant'Ana:** Conceptualization, Methodology, Resources, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

Declaration of Competing Interest

The authors declared that there is no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thanks CNPq and FAPEMIG (CEX-APQ-02392-15; PRONEM APQ-01283-14), Brazilian Funding Agencies, by financial support. Such a study was financed in part by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. The authors also thanks INMETRO for the record of the SEM micrograph.

References

- [1] C. Zong, M.X. Xu, L.J. Xu, T. Wei, X. Ma, X.S. Zheng, R. Hu, B. Ren, Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for Bioanalysis: Reliability and Challenges, *Chem. Rev.* 118 (2018) 4946–4980.

- [2] N.S. Abadeer, C.J. Murphy, Recent Progress in Cancer Thermal Therapy Using Gold Nanoparticles, *J. Phys. Chem. C* 120 (2016) 4691–4716.
- [3] R.C. Jin, C.J. Zeng, M. Zhou, Y.X. Chen, Atomically Precise Colloidal Metal Nanoclusters and Nanoparticles: Fundamentals and Opportunities, *Chem. Rev.* 116 (2016) 10346–10413.
- [4] H.H. Jeong, E. Choi, E. Ellis, T.C. Lee, Recent advances in gold nanoparticles for biomedical applications: from hybrid structures to multi-functionality, *J. Mater. Chem. B* 7 (2019) 3480–3496.
- [5] H.R. Ali, M.R.K. Ali, Y. Wu, S.A. Selim, H.F.M. Abdelaal, E.A. Nasr, M.A. El-Sayed, Gold Nanorods as Drug Delivery Vehicles for Rifampicin Greatly Improve the Efficacy of Combating Mycobacterium tuberculosis with Good Biocompatibility with the Host Cells, *Bioconjug. Chem.* 27 (2016) 2486–2492.
- [6] M.R.K. Ali, S.R. Parikkanvalappil, M.A. El-Sayed, Enhancing the Efficiency of Gold Nanoparticles Treatment of Cancer by Increasing Their Rate of Endocytosis and Cell Accumulation Using Rifampicin, *J. Am. Chem. Soc.* 136 (2014) 4464–4467.
- [7] X.L. Hu, N. Kwon, K.C. Yan, A.C. Sedgwick, G.R. Chen, X.P. He, T.D. James, J. Yoon, Bio-Conjugated Advanced Materials for Targeted Disease Therapeutics, *Adv. Funct. Mater.* 30 (2020).
- [8] R.A.R. Teixeira, A.A.B. Lataliza, N.R.B. Raposo, L.A.S. Costa, A.C. Sant'Ana, Insights on the transport of tamoxifen by gold nanoparticles for MCF-7 breast cancer cells based on SERS spectroscopy, *Colloids Surfaces B-Biointerfaces* 170 (2018) 712–717.
- [9] G. Farahavar, S.S. Abolmaali, N. Gholijani, F. Nejatollahi, Antibody-guided nanomedicines as novel breakthrough therapeutic, diagnostic and theranostic tools, *Biomater. Sci.* 7 (2019) 4000–4016.
- [10] R. Rattan, S. Bhattacharjee, H. Zong, C. Swain, M.A. Siddiqui, S.H. Visovatti, Y. Kanthi, S. Desai, D.J. Pinsky, S.N. Goonewardena, Nanoparticle-macrophage interactions: A balance between clearance and cell-specific targeting, *Bioorg. Med. Chem.* 25 (2017) 4487–4496.
- [11] L.P.F. Peixoto, J.F.L. Santos, G.F.S. Andrade, Plasmonic nanobiosensor based on Au nanorods with improved sensitivity: A comparative study for two different configurations, *Anal. Chim. Acta* 1084 (2019) 71–77.
- [12] F. Andrade, D. Rafael, M. Videira, D. Ferreira, A. Sosniak, B. Sarmento, Nanotechnology and pulmonary delivery to overcome resistance in infectious diseases, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65 (2013) 1816–1827.
- [13] A.K. Khan, R. Rashid, G. Murtaza, A. Zahra, Gold Nanoparticles: Synthesis and Applications in Drug Delivery, *Trop. J. Pharm. Res.* 13 (2014) 1169–1177.
- [14] S. Bamrungsap, Z.L. Zhao, T. Chen, L. Wang, C.M. Li, T. Fu, W.H. Tan, Nanotechnology in therapeutics: a focus on nanoparticles as a drug delivery system, *Nanomedicine* 7 (2012) 1253–1271.
- [15] A.S. Thakor, J. Jokest, C. Zavaleta, T.F. Massoud, S.S. Gambhir, Gold Nanoparticles: A Revival in Precious Metal Administration to Patients, *Nano Lett.* 11 (2011) 4029–4036.
- [16] J. Yu, X.J. Loh, Y.F. Luo, S.F. Ge, X.Q. Fan, J. Ruan, Insights into the epigenetic effects of nanomaterials on cells, *Biomater. Sci.* 8 (2020) 763–775.
- [17] J. Reguera, J. Langer, D.J. de Aberasturi, L.M. Liz-Marzan, Anisotropic metal nanoparticles for surface enhanced Raman scattering, *Chem. Soc. Rev.* 46 (2017) 3866–3885.
- [18] A.H. Nguyen, X. Ma, H.G. Park, S.J. Sim, Low-blinking SERS substrate for switchable detection of kanamycin, *Sensors Actuators B-Chemical* 282 (2019) 765–773.
- [19] J. Langer, D.J. de Aberasturi, J. Aizpuru, R.A. Alvarez-Puebla, B. Auguie, J.J. Baumberg, G.C. Bazan, S.E.J. Bell, A. Boisen, A.G. Brolo, J. Choo, D. Cialla-May, V. Deckert, L. Fabris, K. Faulds, F.J.G. de Abajo, R. Goodacre, D. Graham, A.J. Haes, C.L. Haynes, C. Huck, T. Itoh, M. Ka, J. Kneipp, N.A. Kotov, H. Kuang, E.C. Le Ru, H.K. Lee, J.F. Li, X.Y. Ling, S.A. Maier, T. Mayerhofer, M. Moskovits, K. Murakoshi, J.M. Nam, S. Nie, Y. Ozaki, I. Pastoriza-Santos, J. Perez-Juste, J. Popp, A. Pucci, S. Reich, B. Ren, G.C. Schatz, T. Shegai, S. Schlucker, L.L. Tay, K.G. Thomas, Z.Q. Tian, R.P. Van Duyne, T. Vo-Dinh, Y. Wang, K.A. Willets, C. Xu, H. Xu, Y. Xu, Y.S. Yamamoto, B. Zhao, L.M. Liz-Marzan, Present and Future of Surface-Enhanced Raman Scattering, *ACS Nano* 14 (2020) 28–117.
- [20] W.A. El-Said, D.M. Fouad, S.A. El-Safty, Ultrasensitive label-free detection of cardiac biomarker myoglobin based on surface-enhanced Raman spectroscopy, *Sensors Actuators B-Chemical* 228 (2016) 401–409.
- [21] M. Shorie, V. Kumar, H. Kaur, K. Singh, V.K. Tomer, P. Sabherwal, Plasmonic DNA hotspots made from tungsten disulfide nanosheets and gold nanoparticles for ultrasensitive aptamer-based SERS detection of myoglobin, *Microchim. Acta* 185 (2018).
- [22] F. Tian, F. Bonnier, A. Casey, A.E. Shanahan, H.J. Byrne, Surface enhanced Raman scattering with gold nanoparticles: effect of particle shape, *Anal. Methods* 6 (2014) 9116–9123.
- [23] S. Muneer, G.A. Ayoko, N. Islam, E.L. Izake, Utilizing the thiol chemistry of biomolecules for the rapid determination of anti-TNF-alpha drug in blood, *Talanta* 208 (2020).
- [24] A.M. Paul, Z. Fan, S.S. Sinha, Y.L. Shi, L.D. Le, F.W. Bai, P.C. Ray, Bioconjugated Gold Nanoparticle Based SERS Probe for Ultrasensitive Identification of Mosquito-Borne Viruses Using Raman Fingerprinting, *J. Phys. Chem. C* 119 (2015) 23669–23675.
- [25] B.G. daFonseca, L.A.S. Costa, A.C. Sant'Ana, Insights of adsorption mechanisms of Trp-peptides on plasmonic surfaces by SERS, *Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 190 (2018) 383–391.
- [26] A. Krolikowska, J. Cukras, M. Witkowski, D. Tymecka, A. Hernik-Magon, A. Misicka, W. Dzwolak, SERS and DFT Study of Noble-Metal-Anchored Cys-Trp/Trp-Cys Dipeptides: Influence of Main-Chain Direction and Terminal Modifications, *J. Phys. Chem. C* 124 (2020) 7097–7116.
- [27] D. Lee, S. Hussain, J. Yeo, Y. Pang, Adsorption of dipeptide L-alanyl-L-tryptophan on gold colloidal nanoparticles studied by surface-enhanced Raman spectroscopy, *Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 247 (2021).
- [28] S. Sloan-Dennison, M.R. Bevins, B.T. Scarpitti, V.K. Sauve, Z.D. Schultz, Protein corona-resistant SERS tags for live cell detection of integrin receptors, *Analyst* 144 (2019) 5538–5546.
- [29] X.M. Qian, X.H. Peng, D.O. Ansari, Q. Yin-Goen, G.Z. Chen, D.M. Shin, L. Yang, A. N. Young, M.D. Wang, S.M. Nie, In vivo tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced Raman nanoparticle tags, *Nat. Biotechnol.* 26 (2008) 83–90.
- [30] T. Vo-Dinh, Y. Liu, A.M. Fales, H. Ngo, H.N. Wang, J.K. Register, H. Yuan, S.J. Norton, G.D. Griffin, SERS Nanosensors and Nanoreporters: Golden Opportunities in Biomedical Applications, *Wiley Interdisciplinary Reviews-Nanomedicine Nanobiotechnology* 7 (2015) 17–33.
- [31] W. Xie, L. Su, A.G. Shen, A. Materny, J.M. Hu, Application of surface-enhanced Raman scattering in cell analysis, *J. Raman Spectrosc.* 42 (2011) 1248–1254.
- [32] H. D'Avila, R.C.N. Melo, G.G. Parreira, E. Werneck-Barroso, H.C. Castro-Faria-Neto, P.T. Bozza, Mycobacterium bovis bacillus calmette-guerin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: Intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo, *J. Immunol.* 176 (2006) 3087–3097.
- [33] P.E. Almeida, A.R. Silva, C.M. Maya-Monteiro, D. Torocsik, H. D'Avila, B. Dezzo, K.G. Magalhaes, H.C. Castro-Faria-Neto, L. Nagy, P.T. Bozza, Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin Infection Induces TLR2-Dependent Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma Expression and Activation: Functions in Inflammation Lipid Metabolism, and Pathogenesis, *J. Immunology* 183 (2009) 1337–1345.
- [34] P. Costa, A. Amaro, A. Botelho, J. Inacio, P.V. Baptista, Gold nanoprobe assay for the identification of mycobacteria of the Mycobacterium tuberculosis complex, *Clin. Microbiol. Infect.* 16 (2010) 1464–1469.
- [35] G. Mitchell, C. Chen, D.A. Portnoy, Strategies Used by Bacteria to Grow in Macrophages, *Microbiology Spectrum* 4 (2016).
- [36] R. Kalluni, F. Fenaroli, D. Westmoreland, L. Ulanova, A. Maleki, N. Roos, M.P. Madsen, G. Koster, W. Egge-Jacobsen, S. Wilson, H. Roberg-Larsen, G.K. Khuller, A. Singh, B. Nystrom, G. Griffiths, Poly(lactide-co-glycolide)-rifampicin nanoparticles efficiently clear Mycobacterium bovis BCG infection in macrophages and remain membrane-bound in phago-lysosomes, *J. Cell Sci.* 126 (2013), 3043–+.
- [37] W.R. Berrington, T.R. Hawn, Mycobacterium tuberculosis, macrophages, and the innate immune response: does common variation matter?, *Immunol. Rev.* 219 (2007) 167–186.
- [38] C. Lange, K. Dheda, D. Chesov, A.M. Mandalakas, Z. Udwadia, C.R. Horsburgh, Management of drug-resistant tuberculosis, *Lancet* 394 (2019) 953–966.
- [39] R. Pandey, G.K. Khuller, Solid lipid particle-based inhalable sustained drug delivery system against experimental tuberculosis, *Tuberculosis* 85 (2005) 227–234.
- [40] A.J. Huh, Y.J. Kwon, "Nanoantibiotics": A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era, *J. Control. Release* 156 (2011) 128–145.
- [41] U. Ikoba, H.S. Peng, H.C. Li, C. Miller, C.X. Yu, Q. Wang, Nanocarriers in therapy of infectious and inflammatory diseases, *Nanoscale* 7 (2015) 4291–4305.
- [42] K.J. Xu, Z.C. Liang, X. Ding, H.Y. Hu, S.Q. Liu, M. Nurmik, S. Bi, F.S. Hu, Z.K. Ji, J.J. Ren, S.G. Yang, Y.Y. Yang, L.J. Li, Nanomaterials in the Prevention, Diagnosis, and Treatment of Mycobacterium Tuberculosis Infections, *Adv. Healthcare Mater.* 7 (2018).
- [43] V.V. Giau, S.S.A. An, J. Hulme, Recent advances in the treatment of pathogenic infections using antibiotics and nano-drug delivery vehicles, *Drug Design Development Therapy* 13 (2019) 327–343.
- [44] A.L. Filgueiras, F.R.A. Lima, D.F. de Carvalho, M.A. Meirelles, D. Paschoal, H.F. dos Santos, S. Sanchez-Cortes, A.C. Sant'Ana, The adsorption of rifampicin on gold or silver surfaces mediated by 2-mercaptoethanol investigated by surface-enhanced Raman scattering spectroscopy, *Vib. Spectrosc.* 86 (2016) 75–80.
- [45] L.D. Noman, A.C. Sant'Ana, The control of the adsorption of bovine serum albumin on mercaptan-modified gold thin films investigated by SERS spectroscopy, *Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 204 (2018) 119–124.
- [46] R.A.R. Teixeira, F.R.A. Lima, P.C. Silva, L.A.S. Costa, A.C. Sant'Ana, Tracking chemical interactions of folic acid on gold surface by SERS spectroscopy, *Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 223 (2019).
- [47] G. Frens, Controlled nucleation for regulation of particle-size in monodisperse gold suspensions, *Nature-Physical Science* 241 (1973) 20–22.
- [48] Y.N. Xia, Y.J. Xiong, B. Lim, S.E. Skrabalak, Shape-Controlled Synthesis of Metal Nanocrystals: Simple Chemistry Meets Complex Physics?, *Angewandte Chemie-International Edition* 48 (2009) 60–103.
- [49] M.V. Canameres, C. Chenal, R.L. Birke, J.R. Lombardi, DFT, SERS, and Single-Molecule SERS of Crystal Violet, *J. Phys. Chem. C* 112 (2008) 20295–20300.

1 – Pedido de depósito de patente em colaboração:

Composição envolvendo nanopartícula de ouro, rifampicina e anticorpo para combate *'in vitro'* da bactéria bacilo Calmett-Guérin infectando macrófagos”, Instituição de registro: INPI – Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 25/04/2019

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCIOLY, M. T.; PACHECO, P.; MONTEIRO, C.M. M.; CARROSSINI, N.; ROBBS, B. K.; OLIVEIRA, S. S.; KAUFMANN, C.; DIAZ, J. A. M.; BOZZA, P. T.; VIOLA, J. P. B. Lipid Bodies are reservoirs of Cyclooxygenase-2 and sites of Prostaglandin – E2 Synthesis in Color Cancer Cells. *The Journal of Cancer Research*, v. 68, p. 1732-1740, 2008

ACKERMAN, D.; TUMANOV, S.; QIU, B.; MICHALOPOULOU, E.; SPATA, M.; AZZAM, A.; XIE, H.; SIMON, M. C.; KAMPHORST, J. J. Triglycerides promote lipid homeostasis during hypoxic stress by balancing fatty acid saturation, *Cell Reports*, 24(10): 2596-2605, 2018.

ADAM, J. K.; ODHAV, B.; BHOOLA, K. D. Immune Responses in Cancer. *Pharmacology & Therapeutics*, 99: 113-132, 2003.

AHMADIAN, M.; SUH, J. M.; HAH, N.; LIDDLE, C.; ATKINS, A. R.; DOWNES, M.; EVANS, R. M. PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nature Medicine*, 99(5), 557–566, 2013.

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*, 124, p. 783-801, 2006.

ALIMIRAH, F., PENG, X., YUAN, L., MEHTA, R. R., VON KNETHEN, A., CHOUBEY, D., & MEHTA, R. G. Crosstalk between the peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) and the vitamin D receptor (VDR) in human breast cancer cells: PPAR γ binds to VDR and inhibits 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 mediated transactivation. *Experimental Cell Research*, 318(19), 2490–2497, 2012.

ALMEIDA, P. E.; CARNEIRO, A. B.; SILVA, A. R.; BOZZA, P. T. PPAR γ Expression and Function in Mycobacterial Infection: Roles in Lipid Metabolism, Immunity, and Bacterial Killing. *PPAR Research*, 2012.

ALMEIDA, P. E.; ROQUE, N. R.; MAGALHÃES, K. G.; MATTOS, K. A.; TEIXEIRA, L.; MAYA-MONTEIRO, C.; ALMEIDA, C. J.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; RYFFEL, B.; QUESNIAUX, V. F. J.; BOZZA, P. T. Differential TLR2 downstream signaling regulates lipid metabolism and cytokine production triggered by *Mycobacterium bovis* BCG infection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1841(1): 97–107, 2014.

ALMEIDA, P. E.; SILVA, A. R.; MAYA-MONTEIRO, C. M.; TOROCHSIK, D.; D'AVILA, H.; DEZSO, B.; MAGALHAES, K. G.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; NAGY, L.; BOZZA, P. T. *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin infection induces TLR2-dependent peroxisome proliferator-activated receptor expression and activation: functions in inflammation, lipid metabolism, and pathogenesis. *The Journal of Immunology*, v. 183, p. 1337-1345, 2009.

ALMEIDA, P. E.; TOLEDO, D. A. M.; RODRIGUES, G. S. C.; D'ÁVILA, H. LIPID Bodies as Sites of Prostaglandin E2 Synthesis during Chagas Disease: Impact in the Parasite Escape Mechanism. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, 2018.

ALVAREZ, H. M.; MAYER, F.; FABRITIUS, D.; STEINBUCHER, A. Formation of intracytoplasmic lipid inclusions by *Rhodococcus opacus* strain PD630. *Archives of Microbiology*, 165, 377–386, 1996.

ARIMURA, N.; HORIBA, T.; IMAGAWA, M.; SHIMIZU, M.; SATO, R. The Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Regulates Expression of the Perilipin Gene in Adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 279(11), 10070–10076, 2004.

ARRESE, E. L.; SAUDALE, F. Z.; SOULAGES, J. L. Lipid Droplets as Signaling Platforms Linking Metabolic and Cellular Functions. *National Institutes of Health*, v. 7, p.07-16, 2014.

ASANO, L.; WATANABE, M.; RYODEN, Y.; USUDA, K.; YAMAGUCHI, T.; KHAMBU, B.; TAKASHIMA, M.; SATO, S.; SAKAI, J.; NAGASAWA, K. UESUGI, M. Vitamin D Metabolite, 25-Hydroxyvitamin D, regulates lipid metabolism by inducing degradation of SREBP/SCAP. *Cell Chemical Biology*, 24, p. 207-217, 2017.

ASLAKSON, C.J.; MILLER, F. R. Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumour. *Cancer Research*, 52: 1399–405, 1992.

ASSUMPÇÃO, J. A.F.; MAGALHÃES, K. G.; CORREA, J. R. The role of ppar γ and autophagy in ros production, lipid droplets biogenesis and its involvement with colorectal cancer cells modulation. *Cancer Cell International*, 17:82, 2017.

BAENKE, F.; PECK, P.; MIESS, H.; SCHULZE, A. Hooked on fat: the role of lipid synthesis in cancer metabolism and tumour development. *Disease Models & Mechanisms*, 6, p. 1353-1363, 2013.

BAKER, A. K.; WANG, R.; MACKMAN, N.; LUYENDYK, J. P. Rapamycin enhances LPS induction of tissue factor and tumor necrosis factor- α expression in macrophages by reducing IL-10 expression. *Molecular Immunology*, 46(11-12): 2249–2255, 2009.

BALKWILL, F. TNF-alpha in promotion and progression of cancer. *Cancer Metastasis Reviews*, 25, p. 409–416, 2006.

BELL, N. H.; EPSTEIN, S.; GREENE, A.; SHARY, J. OEXMANN, M. J.; SHAW, S. Evidence for alteration of the vitamin D-endocrine system in obese subjects. *The Journal of Clinical Investigation*, 76 (1): 370-373, 1985.

BELORIBI-DJEFAFLIA, S.; VASSEUR, S.; GUILLAUMOND, F. Lipid metabolic reprogramming in cancer cells. *Oncogenesis*, 5, 2016.

BENSAAD, K.; FAVARO, E.; LEWIS, C.A.; PECK, B.; LORD, S.; COLLINS, J.M.; PINNICK, K.E.; WIGFIELD, S.; BUFFA, F.M.; LI, J.L.; ZHANG, Q.; WAKELAM, M. J. O.; KARPE, P.; SCHULZE, A.; HARRIS, A. L. Fatty acid uptake and lipid storage induced by HIF-1 α contribute to cell growth and survival after hypoxia-reoxygenation. *Cell Reports*, 9, p. 349–365, 2014.

BERCOVICI, N.; GUÉRIN, M. V.; TRAUTMANN, A.; DONNADIEU, E. The Remarkable Plasticity of Macrophages: A chance to fight cancer. *Frontiers in Immunology*, v. 10, 2019.

BERGER, J.; MOLLER, D. E. The Mechanisms of Action of PPARs. *Annual Review of Medicine*, 53(1), 409–435, 2002.

BERTAZZA, L.; MOCELLIN, S. The Dual Role of Tumor Necrosis Factor (TNF) in Cancer Biology. *Current Medicinal Chemistry*, 17(29), 3337–3352, 2010.

BI, J., XIANG, Y.; CHEN, H., LIU, Z.; GRONKE, S.; KUHNLEIN, R. P.; HUANG, X. Opposite and redundant roles of the two *Drosophila* perilipins in lipid mobilization. *Journal of Cell Science*, 125(15), 3568–3577, 2012.

BIANCHINI, G., BALKO, J. M., MAYER, I. A., SANDERS, M. E., GIANNI, L. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nature reviews. Clinical oncology*, 13(11), 674–690, 2016.

BICKEL, P. E.; TANSEY, J. T.; WELTE, M. A. PAT proteins, an ancient Family of lipid droplets proteins that regulate cellular lipid stores. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1791 (6): 419-440, 2009.

BOLAND, G., BUTT, I., PRASAD, R.; KNOX, W. F.; BUNDRED, N. J. COX-2 expression is associated with an aggressive phenotype in ductal carcinoma in situ. *British Journal of Cancer* 90, 423–429, 2004

BORTMAN, P.; FOLGUEIRA, M. A. A. K.; KATAYAMA, M. L. H.; SNITCOVSKY, I. M. L.; BRENTANI, M. M. Antiproliferative effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on breast cells – a mini review. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 35 (1): 1-9, 2002.

BOSILJCIC, M.; CEDERBERG, R. A.; HAMILTON, M. J.; LePARD, N. E.; HARBOURNE, B. T.; COLLIER, J. L.; HALVORSEN, E. C. et al. Targeting myeloid-derived suppressor cells in combination with primary mammary tumor resection reduces metastatic growth in the lungs. *Breast Cancer Research*, 21:103, 2019.

BOUGARNE, N.; WEYERS, B.; DESMET, S. J.; DECKERS, J.; RAY, D. W., STAELS, B.; DE BOSSCHER, K. Molecular actions of PPAR α in lipid metabolism and inflammation. *Endocrine Reviews*, 39 (5): 760-802, 2018

BOUHLEL, M. A.; DERUDAS, B.; RIGAMONTI, E.; DIEVART, R.; BROZEK, J.; HAULON, S.; ZAWADZKI, C.; JUDE, B.; TORPIER, G.; MARX, N.; STAELS, B.; CHINETI-GBAGUIDI, G. PPAR γ Activation Primes Human Monocytes into

Alternative M2 Macrophages with Anti-inflammatory Properties. *Cell Metabolism*, 6, p. 137-143, 2007.

BOUILLON, R. Comparative analysis of nutritional guidelines for vitamin D. *Nature Reviews Endocrinology*, 13(8), 466–479, 2017.

BOUILLON, R.; EELEN, G.; VERLINDEN, L.; MATHIEU, C.; CARMELIET, G.; VERSTUYF, A. Vitamin D and cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 102(1-5), 156–162, 2006.

BOZZA, P. T.; BAKKER-ABREU, I.; NAVARRO-XAVIER, R. A.; BANDEIRA-MELO, C. Lipid body function in eicosanoid synthesis: An update. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*, 85(5): 205–213, 2011.

BOZZA, P.T.; BANDEIRA-MELO, C. Mechanisms of Leukocyte lipid body formation and function in inflammation. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 100, p. 113-120, 2005.

BOZZA, P. T.; MAGALHÃES, K.G.; WELLER, P.F. Leukocyte lipid bodies – biogenesis and functions in inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1791(6): 540–551, 2009.

BOZZA, P. T.; PAYNE, J. L.; MORHAM, S. G.; LANGENBACH, R.; SMITHIES, O.; WELLER, P. F. Leukocyte lipid body formation and eicosanoid generation: cyclooxygenase-independent inhibition by aspirin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(20): 11091–11096, 1996.

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

BRASAEMLE, D. L. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *Journal of Lipid Research*, v. 48, p. 2547-2559, 2007.

BRAUN, M. M., HELZLSOUER, K. J., HOLLIS, B. W., & COMSTOCK, G. W. *Colon Cancer and Serum Vitamin D Metabolite Levels 10–17 Years prior to Diagnosis. American Journal of Epidemiology*, 142(6), 608–608, 1995.

BRAY, F.; FERLAY, J; SOERJOMATARAM, I. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer Journal of Clinicians*, 68, 394–424, 2018.

BRENTON, J. D., CAREY, L. A., AHMED, A. A.; CALDAS, C. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *Journal of Clinical Oncology*, 23, 7350–7360, 2005.

BROKE; T. G.; PETERS-GOLDEN, M. Activation and regulation of cellular eicosanoid biosynthesis. *Scientific World Journal*, v. 7, p. 1273-1284, 2007.

BROWN, E. J.; ALBERS, M. W.; BUM SHIN, T.; ICHIKAWA, K.; KEITH, C. T.; LANE, W. S.; SCHREIBER, S. L. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin–receptor complex. *Nature*, 369(6483), 756–758, 1994.

BROWN, J. M.; RECHT, L.; STROBER, S. The Promise of Targeting Macrophages in Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research*, 23(13): 3241-3250, 2017.

BROZYNA, A. A.; HOFFMAN, R. M.; SLOMINSKI, A. T. Relevance of Vitamin D in Melanoma Development, Progression and Therapy. *Anticancer Research*, 40(1): 473–489, 2020.

CARSWELL, E.A.; OLD, L.J.; KASSEL, R.L.; GREEN, S., FIORE, N., WILLIAMSON, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 72:3666, 1975.

CASTRO, L. C. G. O sistema endocrinológico vitamina D. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 55 (8): 566-575, 2011.

CELI, F. S.; SHULDINER, A. R. The role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in diabetes and obesity. *Current Diabetes Reports*, 2(2), 179–185, 2002.

CHA, Y. I.; DUBOIS, R. N. NSAIDs and Cancer Prevention: Targets Downstream of COX-2. *Annual Review of Medicine*, 58(1), 239–252, 2007.

CHEN, J.; LONG, F. mTOR signaling in skeletal development and disease. *Bone Research*, 6(1), 2018.

CHEN, K.; CHEN, Z.; WU, D.; ZHANG, L.; LIN, X.; SU, J.; RODRIGUEZ, B.; XI, Y.; XIA, Z.; CHEN, X.; SHI, X.; WANG, Q.; LI, W. Broad H3K4me3 is associated with increased transcription elongation and enhancer activity at tumor-suppressor genes. *Nature genetics*, v. 47, n.10, p.1149-1158, 2015.

CHEN, L.; DENG, H.; CUI, H.; FANG, J.; ZUO, Z.; DENG, J.; LI, Y.; WANG, X.; ZHAO, L. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*, 9(6): 7204-7218, 2018.

CHIANG, G. G.; ABRAHAM, R. T. Targeting the mTOR signaling network in cancer. *Trends in Molecular Medicine*, 13(10): 433-442, 2007.

CHOUVET, C.; VICARD, E.; DEVONEC, M.; SAEZ, S. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibitory effect on the growth of two human breast cancer cell lines (MCF-7, BT-20). *Journal of Steroid Biochemistry*, 24(1), 373–376, 1986.

CHUNG, J.; KUO, C. J.; CRABTREE, G. R.; BLENIS, J. Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation of and signaling by the 70 kd S6 protein kinases. *Cell*, 69(7), 1227–1236, 1992.

CIQUEIRA, M. B.; et al. Subtipos Moleculares de Câncer de Mama. Feminina, v. 39, n. 10, 2011.

CLEATOR, S.; HELLER, W.; COOMES, R. C. Triple-negative breast cancer: therapeutic options. *The Lancet Oncology*, 8(3):235-244, 2007.

COLOMBO, J.; RAHAL, P. Alterações Genéticas em Câncer de Cabeça e Pescoço. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 55, n. 2, p. 165-174, 2009.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and Cancer. *Nature*, v. 420, p. 860-867, 2002.

CRUCERIU, D.; BALASICI, O.; BERINDAN-NEAGOE, I. The dual role of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in breast cancer: molecular insights and therapeutic approaches. *Cellular Oncology*, 43(1): 1-18, 2020.

CRUSZ, S. M.; BALKWILL, F. R. Inflammation and cancer: advances and new agents. *Nature*, v. 12, p. 584-596, 2015.

CRUVINEL, W. M.; JUNIOR, D. M.; ARAUJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S. SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C. Sistema Imunitário – Parte 1: Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 50, n. 4, p. 434-461, 2010.

CRUZ, A. L. S.; BARRETO, E. A.; FAZOLINI, N. P. B.; VIOLA, J. P. B.; BOZZA, P. T. Lipid Droplets: plataformas with multiple functions in câncer hallmarks. *Cell Death & Disease*, 11:105, 2020.

CRUZ, A. L. S., CARROSSINI, N.; TEIXEIRA, L. K.; RIBEIRO-PINTO, L. F.; BOZZA, P. T.; VIOLA, J. P. Cell Cycle Progression Regulates Biogenesis and Cellular Localization of Lipid Droplets. *Molecular and Cellular Biology*, 39(9), 2019.

CRUZADO, J. M. Nonimmunosuppressive effects of mammalian target of rapamycin inhibitors. *Transplantation Reviews*, 22, 73-81, 2008.

DALEN, K. T.; SCHOONJANS, K.; ULVEN, S. M.; WEEDON-FEKJAER, M. S.; BENTZEN, T. G.; KOUTNIKOVA, H.; AUWERX, J.; NEBB, H. I. Adipose Tissue Expression of the Lipid Droplet-Associating Proteins S3-12 and Perilipin Is Controlled by Peroxisome Proliferator Activated Receptor- γ . *Diabetes*, 53(5), 1243–1252, 2004.

DANCEY, J. mTOR signaling and drug development in cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 7(4), 209–219, 2010.

D'ÁVILA, H., ALMEIDA, P. E., ROQUE, N. R., CASTRO-FARIA-NETO, H. C., & BOZZA, P. T. Toll-like receptor-2-mediated CC chemokine receptor 3 and eotaxin-driven eosinophil influx induced by *Mycobacterium bovis* BCG pleurisy. *Infection and immunity*, v. 75, p. 1507-1511, 2007.

D'AVILA, H.; LIMA, C. G. F.; ROQUE, N. R.; TEIXEIRA, L.; FIDALGO, C. B.; SILVA, A.R.; MELO, R. C. N.; DosREIS, G. A.; FARIA-NETO, H. C.; BOZZA, P. T. Host Cell Lipid Bodies Triggered by *Trypanosoma cruzi* Infection and Enhanced by the Uptake of Apoptotic Cells Are Associated with Prostaglandin E2 Generation and Increased Parasite Growth. *The Journal of Infectious Diseases*, 204(6): 951-961, 2011.

D'AVILA, H.; MELO, R. C. N.; PARREIRA, G. G.; WERNECK-BARROSO, E.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; BOZZA, P.T. *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin Induces TLR2-Mediated Formation of Lipid Bodies: Intracellular Domains for Eicosanoid Synthesis in Vivo. *The Journal of Immunology*, v. 176, n.5, p. 3087-3097, 2006.

D'AVILA, H.; SOUZA, N. P.; ALBERTONI, A. L. S.; CAMPOS, L. C.; RAMPINELLI, P. G.; CORREA, J. R.; ALMEIDA, P. E. Impact of the Extracellular Vesicles Derived from *Trypanosoma cruzi*: A Paradox in Host Response and Lipid Metabolism Modulation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 11, 2021.

DATTA-MITRA, A., MITRA, A., RAY, R., RAYCHAUDHURI, S. P., & KUNDU-RAYCHAUDHURI, S. 1,25-dihydroxyvitamin D3-3-bromoacetate, a novel vitamin D analog induces immunosuppression through PI3K/Akt/mTOR signaling cascade. *International Immunopharmacology*, 17(3), 744–751, 2013.

DAZERT, E.; HALL, M. N. mTOR signaling in disease. *Current Opinion in Cell Biology*, 23(6), 744–755, 2011.

DE ASSIS, E.F.; SILVA, A. R.; CAIADO, L. F.; MARATHE, G. K.; ZIMMERMAN, G.A.; PRESCOTT, S.M.; MCINTYRE, T.M.; BOZZA, P.T.; DE CASTROFARIA-NETO, H.C. Synergism between platelet-activating factor-like phospholipids and peroxisome proliferator activated receptor gamma agonists generated during low density lipoprotein oxidation that induces lipid body formation in leukocytes. *The Journal of Immunology*, 171 (4): 2090-2098, 2003.

DE SOUZA SILVA, E. V.; NASCENTE, E. de P.; PACHECO MIGUEL, M.; FONSECA ALVES, C. E.; BRIANEZI DIGNANI DE MOURA, V. M. Elucidando a imunovigilância e imunoeedição tumoral: uma revisão abrangente. *Ciência Animal Brasileira*, Goiânia, v. 22, n. 1, 2021.

DEEP, G.; SCHLAEPFER, I. R. Aberrant Lipid Metabolism Promotes Prostate Cancer: Role in Cell Survival under Hypoxia and Extracellular Vesicles Biogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 2016.

DEN BROK, M. H.; RAAIJMAKERS, T. K.; COLLADO-CAMPS, E.; ADEMA, G. J. Lipid Droplets as Immune Modulators in Myeloid Cells. *Trends in Immunology*, 39(5), 380–392, 2018.

DENNIS, E. A.; NORRIS, P. C. Eicosanoid storm in infection and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 15(8), 511–523, 2015.

DEXTER, D.L., KOWALSKI, H.M., BLAZAR, B.A., FLIGIEL, Z., VOGEL, R., HEPPNER, G.H. Heterogeneity of tumor cells from a single mouse mammary tumor. *Cancer Research*, 38:3174-3181, 1978

DONG, H.; CZAJA, M. J. Regulation of lipid droplets by autophagy. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 22(6), 234–240, 2011.

DUBOIS, R. N.; ABRAMSON, S. B.; CROFFORD, L.; GUPTA, R. A.; SIMON, L. S.; VAN DE PUTTE, L. B.; LIPSKY, P. E. Cyclooxygenase in biology and disease. *The FASEB Journal*, 12, p. 1063–1073, 1998.

DUNN, G., BRUCE, A., IKEDA, H. ET AL. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3, 991–998,2002.

DVORAK, A. M.; WELLER, P.F.; HARVEY, V.S.; MORGAN, E.S.; DVORAK, H.F. Ultrastructural localization of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) to isolated, purified fractions of guinea pig peritoneal macrophage and line 10 hepatocarcinoma cell lipid bodies. *International Archives of Allergy and Immunology*, 101:136 –142, 1993.

EASTON, J. B.; HOUGHTON, P. J. mTOR and cancer therapy. *Oncogene*, v. 25, p. 6436-6446, 2006.

EVANGELISTA, G. C.; SALVADOR, P. A.; SOARES, S. M. A.; BARROS, L. R. C.; XAVIER, F. H. C.; ABDO, L. M.; GUALBERTO, A. C. M.; MACEDO, G. C.; CLAVIJO-SALOMON, M. A.; GAMEIRO, J. 4T1 Mammary Carcinoma colonization of metastatic niches is accelerated by obesity. *Frontiers in Oncology*, v.9, p. 01-12, 2019.

EWING, J. Cancer as a Public Health Problem. *Public Health Reports*, 44 (35), p. 2093-2101, 1929

EYLES, D. W.; BURNE, T. H. J.; MCGRATH, J. J. Vitamin D, effects on brain development, adult brain function and the links between low levels of vitamin D and neuropsychiatric disease. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 34(1), 47–64, 2013.

FARESE JR, R. V.; WALTHER, T. C. Lipid Droplets Finally Get a Little R-E-S-P-E-C-T. *Cell*, 139(5):855-60, 2009.

FARIA, M., H., G.; RABENHORST, S., H., B. Impacto do oncogene C-MYC no câncer. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 52(2): 165-171, 2006.

FAZOLINI, N. P. B.; CRUZ, A. L. S.; WERNECK, M. B. F.; VIOLA, J. P. B.; MONTEIRO, C. M. M.; BOZZA, P. T. Leptin Activation of mTOR pathway in intestinal epithelial cell triggers lipid formation, cytokine production and increased cell proliferation. *Cell Cycle*, v. 14, p. 2666-2676, 2015.

FELDMAN, D.; KRISHNAN, A. V.; SWAMI, S.; GIOVANNUCCI, E.; FELDMAN, B. J. The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. *Nature Reviews Cancer*, 14(5), 342–357, 2014.

FERRARI, A. L.; ROBEIRO, M. F. M.; RECHE, M.; BRUM, I. S.; KOHEK, M. B.; CORLETA, H. V. E.; CAPP, E. Expressão dos protoncogenes c-fos, c-myc e c-jun em miométrio normal e miomas humanos. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v. 28, p. 590-595, 2006.

FLETCHER, L.; EVANS, T. M.; WATTS, L. T.; JIMENEZ, D. J. DIGICAYLIOGLU, M. Rapamycin Treatment Improves Neuron Viability in na In Vitro Model of Stroke. *Plos One*, v. 8, 2013.

FOUAD, Y. A.; AANEI, C. Revisiting the hallmarkers of Cancer. *American Journal Cancer Research*, 7(5): 1016-1036, 2017.

FOULKES, W.D.; SMITH, I.E., REIS-FILHO, J.S. Triple-negative breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, 363(20):1938-48, 2010.

FRIEND, S. H.; DRYJA, T. P.; WEINBERG, R. A. Oncogenes and tumor-suppressing genes. *The New England Journal of Medicine*, v. 318, n. 10, p. 618-622, 1988.

FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. (2005). Macrophages in Inflammation. *Current Drug Target -Inflammation & Allergy*, 4(3): 281–286, 2005.

FUMAROLA, C.; LA MONICA, S.; ALFIERI, R. R.; BORRA, E.; GUIDOTTI, G. G. Cell size reduction induced by inhibition of the mTOR/ S6K-signaling pathway protects Jurkat cells from apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 12, 1344–1357, 2005.

FUNK, C.D. Leukotriene Modifiers as Potential Therapeutics for cardiovascular disease. *Nature Reviews*, v. 4, p. 664-672, 2005.

GAO, Y.; UM, C. Y.; FEDIRKO, V.; RUTHERFORD, R. E.; SEABROOK, M. E.; BARRY, E. L.; BARON, J. A.; BOSTICK, R. M. Effects of supplemental vitamin D and calcium on markers of proliferation, differentiation, and apoptosis in the normal colorectal mucosa of colorectal adenoma patients. *Plos One*, 13(12), 2018.

GARLAND, C. F.; GARLAND, F. C. Do Sunlight and Vitamin D Reduce the Likelihood of Colon Cancer? *International Journal of Epidemiology*, 9(3), 227–231, 1980.

- GAROFALO CS, E. Leptin and cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 2005; 207:12–22, 2005.
- GINGRAS, A. C.; RAUGHT, B.; SONENBERG, N. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes & Development*, 15(7): 807-826, 2001.
- GOLDSZMID, R. S.; DZUTSEV, A.; TRINCHIERI, G. Host Immune response to infection and cancer: unexpected commonalities. *Cell Host Microbe*, 15(3): 295-305, 2014.
- GONÇALVES, L. E. D. O Papel Da Vitamina D no Metabolismo de Macrófagos Durante a Infecção por *Trypanossoma cruzi* In vitro. 2020. 74f. Trabalho De Conclusão de Curso – Universidade Federal de Juiz de For a, Juiz de For a.
- GONZALEZ, H.; HAGERLING, C.; WERB, Z. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. *Genes & Development*, 32: 1267-1284, 2018.
- GORDON, S.; PLÜDDEMANN, A. Tissue macrophages: heterogeneity and functions. *BMC Biology*, 15:53, 2017.
- GORELIK, L.; FLAVELL, R. A. Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor- β signaling in T cells. *Nature Medicine*, 7(10):1118–1122, 2001.
- GORGA, A.; RINDONE, G. M.; REGUEIRA, M.; PELLIZZARI, E. H.; CAMBEROS, M. C.; CIGORRAGA, S. B.; RIERA, M. F.; GALARDO, M. N.; MERONI, S. B. PPAR γ activation regulates lipid droplet formation and lactate production in rat Sertoli cells. *Cell and Tissue Research*, 369(3), 611–624, 2017.
- GORINI, S.; ANGELIS, A.; BERRINO, L.; MALARA, N.; ROSANO, G.; FERRARO, E. Chemotherapeutic Drugs and Mitochondrial Dysfunctions: Focus on Doxorubicin, Trastuzumab, and Sunitinib. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, p. 1-16, 2018.
- GRIVENNIKOV, S.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*, 140, p. 883-899, 2010.
- GRYGIEL-GÓRNIAK, B. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications – a review. *Nutrition Journal*, 13(17), 2014.
- GUANO, F.; POURQUIER, P.; TINELLI, S.; BINASCHI, M.; BIGIONI, M.; ANIMATI, F.; MANZINI, S.; ZUNINO, F.; KOHLHAGEN, G.; POMMIER, Y.; CAPRANICO, G. Topoisomerase poisoning activity of novel disaccharide anthracyclines. *Molecular Pharmacology*, 56:77–84, 1999.

- GUERTIN, D. A.; SABATINI, D. M. Na Expanding role for mTOR in cancer. *Trends in Molecular Medicine*, 11(8): 353-361, 2005.
- HAM, J. S.; PARK, H. Y.; RYU, K. J.; KO, Y. H.; KIM, W. S.; KIM, S. J. Elevated serum interleukin-10 level and M2 macrophage infiltration are associated with poor survival in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Oncotarget*, 8(44): 76231-76240, 2017.
- HAN, L.; SHEN, W. J.; BITTNER, S.; KRAEMER, F. B.; AZHAR, S. PPARs: regulators of metabolism and as therapeutic targets in cardiovascular disease. Part II: PPAR- β/δ and PPAR- γ . *Future Cardiology*, 13(3): 279-296, 2017.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell*, v. 100, p. 5770, 2000.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. "Hallmarks of cancer: the next generation". *Cell*, vol.144, p.646-74, 2011.
- HARBECK, N.; PENAULT-LLORCA, F.; CORTES, J.; GNANT, M.; HOUSSAMI, N.; POORTMANS, P.; RUDDY, K.; TSANG, J.; CARDOSO, F. Breast Cancer. *Nature Reviews: Disease Primers*, 5:66, 2019.
- HAYASHI, H.; SAKAI, T. Biological significance of local TGF- β activation in liver diseases. *Frontiers in Physiology*, v. 3, 2012.
- HUA, H.; KONG, Q.; ZHANG, H.; WANG, J.; LUO, T.; JIANG, Y. Targeting mTOR for cancer therapy. *Journal of Hematology & Oncology*, 12(1), 2019.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativa 2020. Incidência do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2020.
- IP, W. K. E.; HOSHI, N.; SHOUVAL, D. S.; SNAPPER, S.; MEDZHITOV, R. Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. *Science*, 356(6337), 513–519, 2017.
- ISSEMAN, I.; GREEN, S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*, 347, p. 645-650, 1990.
- ITAKURA, E.; HUANG, R.R.; WEN, D. R.; PAUL, E.; WUNSCH, P.; H.; COCHRAN, A. J. IL-10 expression by primary tumor cells correlates with melanoma progression from radial to vertical growth phase and development of metastatic competence. *Nature Modern Pathology*, 24, p. 801-809, 2011.
- JACINTO, E.; LOEWITH, R.; SCHMIDT, A.; LIN, S.; RUEGG, M. A.; HALL, A.; HALL, M. N. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nature Cell Biology*, 6: 1122-1128, 2004.

JAMES, S. Y.; MERCER, E.; BRADY, M.; BINDERUP, L.; COLSTON, K. W. EB1089, a synthetic analogue of vitamin D, induces apoptosis in breast cancer in vivo and in vitro. *British Journal of Pharmacology*, 125, p. 953-962, 1998.

JARC, E; PETAN, T. A twist of FATE: Lipid droplets and inflammatory lipid mediators. *Biochimie*, 2019.

JARC, E.; PETAN, T. Lipid Droplets and the management of Cellular Stress. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 92(3):435-452, 2019.

JEON, S. M.; SHIN, E. A. Exploring vitamin D metabolism and function in cancer. *Experimental & Molecular Medicine*, 50:20, 2018.

JIANG, C.; LIU, S.; CAO, Y.; SHAN, H. High glucose induces autophagy through PPAR γ -dependent pathway in human nucleus pulposus cells. *PPAR Research*, 2018, 2018.

JOSHI, A. S.; NEBENFUEHR, B.; CHOUDHARY, V.; SATPUTE-KRISHNAN, P.; LEVINE, T. P.; GOLDEN, A.; PRINZ, W. A. Lipid droplet and peroxisome biogenesis occur at the same ER subdomains. *Nature Communications*, 9:2940, 2018.

KARIN, M.; GRETEN, F. R. NF- κ B: Linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nature Reviews Immunology*, 5(10): 749-759, 2005.

KASAHARA, T.; MATSUSHIMA, K. Macrophage signaling, apoptosis, lectins and leukocyte trafficking. *Trends in Immunology*, 22(11): 593-594, 2001.

KATO, S. The Function of Vitamin D Receptor in Vitamin D Action. *Journal of Biochemistry*, 127(5), 717–722, 2000.

KELLY, P. M. A.; DAVISON, R. S.; BLISS, E.; MCGEE, O'D. Macrophages in human breast disease: A quantitative immunohistochemical study. *British Journal of Cancer*, 57, p. 174-177, 1988.

KHANAPURE, S. P.; GARVEY, D. S.; JANERO, D. R.; LETTS, L. G. Eicosanoids in Inflammation: Biosynthesis, Pharmacology, and Therapeutic Frontiers. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 7(3): 311–340, 2007.

KIM, J.; BAE, J. S. Tumor-Associated Macrophages and Neutrophils in Tumor Microenvironment. *Mediators of Inflammation*, 2016(6058147), 2016.

KIM, J.; GUAN, K. L. mTOR as a central hub of nutrient signaling and cell growth. *Nature Cell Biology*, v. 21, p. 63-71, 2019.

KLAGSBRUN, M.; D'AMORE, P.A. Regulators of Angiogenesis. *Annu Rev Physiol.*, 53:217-39, 1991.

KOLATA, G. B. Vitamin D: Investigations of a New Steroid Hormone. *Science*, 187(4177), 1975.

KORNILUK, A.; KOPER, O.; KEMONA, H.; DYMICKA-PIEKARSKA, V. From inflammation to cancer. *Irish Journal of Medical Science*, 186: 57-62, 2017.

KROKER, A. J.; BRUNING, J. B. Review of the structural and dynamic mechanisms of PPAR γ partial agonism. *PPAR Research*, 2015.

KWON, H.J., WON, Y.S., SUH, H. W., JEON, J. H., SHAO, Y., YOON, S. R., ... CHOI, I. Vitamin D3 Upregulated Protein 1 Suppresses TNF- α Induced NF- κ B Activation in Hepatocarcinogenesis. *The Journal of Immunology*, 185(7), 3980–3989, 2010.

LAMOUILLE S.; DERYNCK, R. Cells size and invasion in TGF- β - induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway. *Journal of Cell Biology*. 178: 437-451, 2007.

LANDSKRON, G.; DE LA FUENTE, M.; THUWAJIT, P.; THUWAJIT, C.; HERMOSO, M. A. Chronic Inflammation and Cytokines in the tumor Microenvironment. *Journal of Immunology Research*, 2014.

LAPLANTE, M.; SABATINI, D. M. mTOR in signaling in growth control and disease. *Cell*, 149(2): 274-293, 2012.

LARIONOVA, I.; CHERDYNTSEVA, N.; LIU, T.; PATYSHEVA, M.; RAKINA, M.; KZHYSHKOWSKA. Interaction of tumor-associated macrophages and cancer chemotherapy. *Oncoimmunology*, 8(7), 2019.

LAURENTI, G.; BENEDETTI, E.; D'ANGELO, B.; CRISTIANO, L.; CINQUE, B.; RAYSI, S.; ALECCI, M; CERU, M. P.; CIFONE, M. G.; GALZIO, R.; GIORDANO, A.; CIMINI, A. Hypoxia induces peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) and lipid metabolism peroxisomal enzymes in human glioblastoma cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 112(12), 3891–3901, 2011.

LEBRUN, J.J. The dual role of TGF β in human cancer: From tumor suppression to cancer metastasis. *International Scholarly Research Network*. 2012:1-28. 2012

LEE, C.; JEONG, H.; BAE, Y.; SHIN, K.; KANG, S.; KIM, H.; OH, J.; BAE, H. Targeting of M2-like tumor-associated macrophages with a melittin-based proapoptotic peptide. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 7: 147, 2019.

LEE, E. Y. H. P.; MULLER, W. J. Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 2, p.01-18, 2010.

LELEKAKIS, M., MOSELEY, J., MARTIN, T., HARDS, D., WILLIAMS, E., HO, P., LOWEN, D., JAVNI, J., MILLER, F., SLAVIN, J., AND ANDERSON, R. A novel

orthotopic model of breast cancer metastasis to bone. *Clinical & Experimental Metastasis*, 17:163-170; 1999.

LEVI, B. D.; CLISH, C. B.; SCHMIDT, B.; GRONERT, K.; SERHAN, C. N. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nature Immunology*, 2(7):612-619, 2001.

LI, J.; KIM, S. G.; BLENIS, J. Rapamycin: one drug, many effects. *Cell Metabolism*, 19(3): 373–379, 2014.

LI, J.; MIHALCIOIU, M.; LI, L.; ZAKIKHANI, M.; CAMIRAND, A.; KREMER, R. Vitamin D prevents lipid accumulation in murine muscle through regulation of PPAR γ and perilipin-2 expression. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 177, 116–124, 2018.

LI, L., ZHENG, X., ZHOU, Q. *et al.* Metabolomics-Based Discovery of Molecular Signatures for Triple Negative Breast Cancer in Asian Female Population. *Scientific Reports*, **10**, 370, 2020.

LIN, W. W.; KARIN, M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *The Journal of the Clinical Investigation*, v. 17, n. 5, p. 1175-1183, 2007.

LIN, Y. XU, J.; LAN, H. Tumor-associated macrophages in tumor metastasis: biological roles and clinical applications. *Journal of Hematology & Oncology*, 12: 76, 2019.

LIU, X.; LI, J.; CADILHA, B. L.; MARKOTA, A.; VOIGT, C.; HUANG, Z.; LIN, P. P.; WANG, D. D.; *et al.* Epithelial-type systemic breast carcinoma cells with restricted mesenchymal transitions are a major source of metastasis. *Science Advances – Research Article*, 5, p. 01-18, 2019.

LIU, Z.; HAN, C.; FU, Y.X. Targeting innate sensing in the microenvironment to improve immunotherapy. *Cellular & Molecular Immunology*, p. 01-14, 2019.

MA, X.; YU, H. Global Burden of Cancer. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 79, p. 85-94, 2006.

MAAYAH, Z.; ZHANG, T.; FORREST, M. L.; ALRUSHAID, S.; DOSCHAK, M. R.; DAVIES, N. M.; EL-KADI, O. S. DOX-Vit D, a Novel Doxorubicin Delivery Approach, Inhibits Human Osteosarcoma Cell Proliferation by Inducing Apoptosis while Inhibiting Akt and mTOR Signaling Pathways. *Pharmaceutics*, 10(3), 2018.

MACCALLI, C.; SCARAMUZZA, S.; PARMINANI, G. TNK cells (NKG2D $^+$ CD8 $^+$ or CD4 $^+$ T lymphocytes) in control of human tumors. *Cancer Immunology Immunotherapy*; v. 58, p.801-808, 2009.

MAEDA, Y. NOJIMA, D.; WOSHINO, T.; TANKA, T. Structure and properties of oil bodies in diatoms. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372: 20160408, 2017.

MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P.; SICA, A.; BALKWILL, F. Cancer-related inflammation. *Nature*, 454 (7203):436-444, 2008.

MANTOVANI, A.; SOZZANI, S.; LOCATI, M.; ALLAVENA, P.; SICA, A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in Immunology*. 23, p. 549–555, 2002.

MATHEW, R.; KARANTZA-WADSWORTH, V.; WHITE, E. Role of autophagy in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 7(12), 961–967, 2007.

MARCINOWSKA-SUCHOWIERSKA, E.; KUPISZ-URBANSKA, M.; LUKASKIEWICZ, J.; PLUDOWSKI, P.; JONES, G. Vitamin D Toxicity – A clinical Perspective. *Frontiers in Endocrinology*, 9:550, 2018.

MARION-LETELLIER, R.; SAVOYE, G.; GHOSH, S. Fatty acids, eicosanoids and PPAR gamma. *European Journal of Pharmacology*, 785, 44–49., 2016.

MARTIN, S.; PARTON, R. G. Lipid Droplets: a unified view of a dynamic organelle. *Nature Reviews Cell Biology*, v. 5, p. 373-378, 2006.

MARTINEZ, M. A. R.; FRANCISCO, G.; CABRAL, L.S.; RUIZ, I. R. G.; FESTA NETO, C. Genética molecular aplicada ao câncer cutâneo não melanoma. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 81, n. 5, p. 405-419, 2006.

MARTINS e SILVA, J. Caracterização bioquímica e efeitos metabólicos do factor de necrose tumoral. *Acta Médica Portuguesa*, (1): 20-27, 1991.

MAYA-MONTEIRO, C.M., ALMEIDA, P.E.; D'AVILA, H.; MARTINS, A. S.; REZENDE, A. P.; CASTRO FARIA-NETO, H.; BOZZA; P. T. Leptin induces macrophage lipid body formation by a phosphatidylinositol 3-kinase- and mammalian target of rapamycin-dependent mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*, v..283, p. 2203-2210, 2008.

MEDEIROS, G. X. Envolvimento da vitamina D na resposta inflamatória durante a infecção experimental por *Mycobacterium bovis* BCG: Análise da formação de corpúsculos lipídicos e síntese de mediadores inflamatórios. 2020. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.

MEDREK, C.; PONTÉN, F.; JIRSTOM, K.; LEANDERSSON, K. The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients. *BMC Cancer*, v. 12, p. 01-09, 2012.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, v. 454, p. 428-435, 2008.

MELO, R. C. N.; D'AVILA, H.; WAN, H.-C.; BOZZA, P. T.; DVORAK, A. M.; WELLER, P.F. Lipid Bodies in Inflammatory Cells: Structure, Function and Current Imaging Techniques. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, v. 59, n. 5, p. 540-556, 2011.

MELO, R. C. N.; PAGANOTI, G. F.; DVORAK, A. M.; WELLER, P. F. The Internal Architecture of Leukocyte Lipid body Organelles Captured by ThreeDimensional Electron Microscopy Tomography. *PlosOne*, v. 8, n.3, p. 01-12, 2013.

MENDONÇA, R. J.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 84, n. 3, p. 257-262, 2009

MICHALIK, L.; AUWERX, J.; BERGER, J. P.; CHATTERJEE, V. K.; GLASS, C. K.; GONZALEZ, F. J.; GRIMALDI, P. A.; KADOWAKI, T.; LAZAR, M. A.; OTRAHILLY, S.; PALMER, C. N. A.; PLUTZKY, J.; REDDY, J. K.; SPIEGELMAN, B. M.; STAELS, B.; WAHLI, W. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *Pharmacological Reviews*, 58(4), 726–741, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Câncer de mama no Brasil: mortalidade está abaixo da média mundial. Disponível em: < <http://saude.gov.br/noticias/agencia-saude/45879-cancer-de-mama-no-brasil-mortalidade-esta-abaixo-da-media-mundial> >. Acesso em: 01 dezembro de 2019.

MINOTTI, G.; MENNA, P.; SALVATORELLI, E.; CAIRO, G.; GIANNI, L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews*, vol. 56, no. 2, pp. 185–229, 2004.

MITHAL, A., WAHL, D. A., BONJOUR, J.-P., BURCKHARDT, P., DAWSON-HUGHES, B., EISMAN, J. A.; FULEIHAN, E. H.; JOSSE, R. G.; LIPS, P.; MORALES-TORRES, J. Global vitamin D status and determinants of hypovitaminosis D. *Osteoporosis International*, 20(11), 1807–1820, 2009.

MIURA, S.; GAN, J.W.; BRZOSTOWSKI, J.; PARISI, M. J.; SCHULTZ, C.J.; LONDOS, C.; OLIVER, B.; KIMMEL, A. R. Functional Conservation for Lipid Storage Droplet Association among Perilipin, ADRP, and TIP-47 (PAT)-related proteins in Mammals, *Drosophila*, and *Dictyostelium*. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(35):32253-32257, 2002.

MOCELLIN, S.; NITTI, D. TNF and cancer: the two sides of the coin. *Frontiers in Bioscience*, 13:2774-2783, 2008.

MOGHADDAM, A. S.; MOHAMMADIAN, S.; VAZINI, H.; TAGHADOSI, M.; ESMAEILI, S.A.; MARDANI, F.; SEIFE, B.; MOHAMMADI, A.; AFSHARI, J. T.;

SAHEBKAR, A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *Journal of Cellular Physiology*, 233(9), 6425–6440, 2018.

MONTFORT, A.; COLACIOS, C.; LEVADE, T.; ANDRIEU-ABADIE, N.; MEYER, N.; SÉGUI, B. The TNF Paradox in Cancer Progression and Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 10:1818, 2019.

MOORE, K. J.; ROSEN, E. D.; FITZGERALD, M. L.; RANDOW, F.; ANDEERSSON, L. P.; ALTSHULER, D.; MILSTONE, D. S.; MORTENSEN, R. M.; SPIEGELMAN, B. M.; FREEMAN, M. W. The role of PPAR- γ in macrophage differentiation and cholesterol uptake. *Nature*, 7(1):41-47, 2001.

MORENO, J.; KRISHNAN, A. V.; PEEHL, D. M.; FELDMAN, D. Mechanisms of Vitamin-D mediated Growth Inhibition in Prostate Cancer Cells: Inhibition of the Prostaglandin Pathway. *Anticancer Research*, 26, 2525-2530, 2006.

MOTOJIMA, K. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR): Structure, Mechanisms of Activation and Diverse Functions. *Cell Structure and Function*, 18(5), 267–277, 1993.

MULIADITAN, T., CARON, J., OKESOLA, M., OPZOOMER, J. W., KOSTI, P., GEORGOULI, M., GORDON, P., LALL, S., KUZEVA, D. M., PEDRO, L., SHIELDS, J. D., GILLETT, C. E., DIEBOLD, S. S., SANZ-MORENO, V., NG, T., HOSTE, E., ARNOLD, J. N. Macrophages are exploited from an innate wound healing response to facilitate cancer metastasis. *Nature communications*, 9(1), 2951, 2018.

MURPHY, D.J. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Progress in Lipid Research*, 40:325–438, 2001.

NAGAI, H.; KIM, Y. H. Cancer prevention from the perspective of global cancer burden patterns. *Journal of Thoracic Disease*, 9 (3): 448-451, 2017.

NAIR, S.; REN, J. Autophagy and cardiovascular aging - Lesson learned from rapamycin. *Cell Cycle*, 11(11): 2092-2099, 2012.

NAKANISHI, M.; ROSENBERG, D. W. Multifaceted roles of PGE2 in inflammation and cancer. *Seminars in Immunopathology*, 35(2): 123–137, 2013.

NARDI, F.; FITCHEV, P.; BROOKS, K. M.; FRANCO, O. E.; CHENG, K.; HAYWARD, S. W.; WELTE, M. A.; CRAWFORD, S. E. Lipid droplet velocity is a microenvironmental sensor of aggressive tumors regulated by V-ATPase and PEDF. *Laboratory Investigation*, 99, p.1822–1834, 2019.

NECKMANN, U.; WOLOWCZYK, C.; HALL, M.; ALMAAS, E.; REN, J.; ZHAO, S. JOHANNESSEN, B.; SKOTHEIM, R. I. et al. *GREM1* is associated with metastasis and predicts poor prognosis in ER-negative breast cancer patients. *Cell Communication and Signaling*, 17:140, 2019.

NEPOMUCENO, R. R.; BALATONI, C. E.; NATKUNAM, Y.; SNOW, A. L.; KRAMS, S. M.; MARTINEZ, O. M. Rapamycin Inhibits the Interleukin 10 Signal Transduction Pathway and the Growth of Epstein Barr Virus B-cell Lymphomas. *Cancer Research*, 63, p. 4472-4480, 2003.

NETTEBROK, N. T.; BOHNERT, M. Born this way—Biogenesis of lipid droplets from specialized ER subdomains. *BBA - Molecular and Cell Biology of Lipid*, 1865 (1), 2020.

NIKIFOROV, Y. E.; NIKIFOROVA, N., M. Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. *Nature Reviews Endocrinology*, v. 7, p. 569-80, 2011.

NORMAN, A. W. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 88, p. 491-499, 2008.

NORRIS, P. C.; DENNIS, E. A. A Lipidomic Perspective on Inflammatory Macrophage Eicosanoid Signaling. *Advances in Biological Regulation*, 0: 99-110, 2014.

O'DONNELL, J. S., TENG, M. W. L.; SMYTH, M. J. Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol* 16, 151–167, 2019.

OLZMANN, J. A.; CARVALHO, P. Dynamics and functions of lipid droplets. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20, p.137–155, 2018.

ONAL, G.; KUTLU, O.; GOZUACIK, D.; EMRE, S. D. Lipid Droplets in Health and Disease. *Lipids in Health and Disease*, 16: 128, 2017.

OSBORNE, C., WILSON, P.; TRIPATHY, D. Oncogenes and Tumor Suppressor Genes in Breast Cancer: Potential Diagnostic and Therapeutic Applications. *The Oncologist*, 9: 361-377, 2004.

OTTAVIANI, E.; FRANCESCHI, C. The invertebrate phagocytic immunocyte: clues to a common Evolution of immune and neuroendocrine systems. *Immunology today*, 18:169–174, 1997.

PALOMINO, D. C. T.; MARTI, L. C. Quimiocinas e Imunidade. *Einstein*, 13(3): 469 - 473, 2015.

PERL, A. Activation of mTOR (mechanistic target of rapamycin) in rheumatic diseases. *Nature Reviews Rheumatology*, 12(3), 169–182, 2016.

PETAN, T.; JARC, E.; JUSOVIĆ, M. Lipid Droplets in Cancer: Guardians of fat in a Stressful World. *Molecules*, 23(8), 2018.

PFEFFER, C. M.; SINGH, A. T. K. Apoptosis: A target for Anticancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 448, 2018.

PIEROTTI, M.; FRATTINI, M.; MOLINARI, F.; SOZZI, G.; CROCE. Oncogene. In: BAST JR, R. C. et al. Holland-Frei Cancer Medicine Cloth. 9 ed. Wiley-Blackwell, 2017. cap.4, p. 47-69.

PILZ, S.; ZITTERMANN, A.; TRUMMER, C.; THEILER-SCHWETZ, V.; LERCHBAUM, E.; KEPPEL, M. H.; GRUBLER, M. R.; MARZ, W.; PANDIS, M. Vitamin D testing and treatment: a narrative review of current evidence. *Endocrine Connections*, 8(2): 27-43, 2019.

PIZER, E.S.; CHREST, F.J.; DIGIUSEPPE, J.A.; HAN, W.F. Pharmacological inhibitors of mammalian fatty acid synthase suppress DNA replication and induce apoptosis in tumor cell lines. *Cancer Research*, 58: 4611-4615, 1998.

PLUM, L. A.; DELUCA, H. F. Vitamin D, disease and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(12), 941–955, 2010.

POPESCU, N. C.; ZIMONJIC, D. B. Molecular Cytogenetic Characterization of Cancer Cell Alterations. *Cancer Genet Cytogenet* 93:19-21, 1997.

PREVOST-BLONDEL, A. E.; ROTH, F. M.; ROSENTHAL, H. PIRCHER, Crucial role of TNF-alpha in CD8 T cell-mediated elimination of 3LL-A9 Lewis lung carcinoma cells in vivo. *Journal of Immunology*, 164, 3645-3651, 2000.

PROVISIEIRO, D. P.; NEGRI, M.; ANGELIS, C.; GENNARO, G.; PATALANO, R.; SIMEOLI, C.; PAPA, F. FERRIGNO, R.; AURIEMMA, R. S.; MARTINO, M. C.; COLAO, A.; PIVONELLO, R.; PIVONELLO, C. Vitamin D reverts resistance to the mTOR inhibitor everolimus in hepatocellular carcinoma through the activation of a miR-375/oncogenes circuit. *Scientific Reports*, 9(11695), 2019.

PULASKI, B. A. Mouse 4T1 Breast Tumor Model. *Current Protocols in Immunology*. New York: John Wiley and Sons, Inc; 2001, cap.20, p. 20.2.1.

PULASKI, B.A., TERMAN, D., KHAN, S., MEULLER, E., OSTRAND-ROSENBERG, S. Cooperativity of *Staphylococcal aureus* enterotoxin B superantigen, major histocompatibility complex class II, and CD80 for immunotherapy of advanced metastases in a clinically relevant post-operative mouse breast cancer model. *Cancer Research*, 60:2710-2715, 2000.

QIU, B.; ACKERMAN, D.; SANCHEZ, D.J.; LI, B.; OCHOCKI, J.D.; GRAZIOLI, A.; BOBROVNIKOVA-MARJON, E.; DIEHL, J.A.; KEITH, B.; SIMON, M.C. HIF2 α -dependent lipid storage promotes endoplasmic reticulum homeostasis in clear-cell renal cell carcinoma. *Cancer Discovery*, 5 (6): 652–667, 2015.

RAFFO, C. C.; HUBIE, D. P.; ZANINI, G. L.; et al. Perfil histológico e imuno-histoquímico das pacientes com câncer de mama operadas no Hospital Santa Casa de Curitiba no período de 2014 e 2015. *Arq Med Hosp Fac Cienc Med Santa Casa São Paulo*; 62(3):139-45, 2017

RAHBI, S.; RABHI, I.; TRENTIN, B.; PIQUEMAL, D.; REGNAULT, B.; GOYARD, S.; LANG, T.; DESCOTEAUX, A.; ENNINGA, J.; TABBANE, L. G. Lipid Droplet Formation, their localization and Dynamics during *Leishmania major* Macrophage Infection. *Plos One*, v. 11, p. 01-19, 2016.

RIABOV, V.; GUDIMA, A.; WANG, N.; MICKLEY, A.; OREKHOV, A.; KZHYSKOWSKA, J. Role of tumor associated macrophages in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. *Frontiers in Physiology*, v. 5, 2014.

RICCIARDI, C. J.; BAE, J.; ESPOSITO, D.; KOMARNYTSKY, S.; HU, P.; CHEN, J.; ZHAO, L. 1,25-Dihydroxyvitamin D3/vitamin D receptor suppresses brown adipocyte differentiation and mitochondrial respiration. *European Journal of Nutrition*, 54(6), 1001–1012, 2014.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and Inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, v. 31, p. 986-1000, 2011.

ROBENEK, H.; ROBENEK, M. J.; BUERST, I.; LORKOWSKI, S.; HOFNAGEL, O.; TROYER, D.; SEVERS, N. J. Lipid Droplets gain PAT Family proteins by interaction with specialized Plasma Membrane domains. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(28):26330-26338, 2005.

RODRIGUES, G. S. C. A vitamina D como potencializadora da atividade antiparasitária de macrófagos na infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*. 2019. 110f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de fora.

RUSSELL, D. G.; HUANG, L.; VANDERVEN, B. C. Immunometabolism at the interface between macrophages and pathogens. *Nature Reviews Immunology*, v. 19, p. 291-304, 2019.

RUSSO, J.; RUSSO, I. H. The etiopathogenesis of breast cancer prevention. *Cancer Letters*, 90, p. 81-89, 1995.

SABATINI, D. M. mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nature Reviews Cancer*, 6, p. 729-734, 2006.

SABATINI, D. M.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; LUI, M.; TEMPST, P.; SNYDER, S. H. RAFT-1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell*, 78, p. 35-43, 1994.

SABZICHI, M.; MOHAMMADIAN, J.; MOHAMMADI, M.; JAHANFAR, F.; MOVASSAGH POUR, A. A.; HAMISHEHKAR, H.; OSTAD-RAHIMI, A. Vitamin D-Loaded Nanostructured Lipid Carrier (NLC): A New Strategy for Enhancing Efficacy of Doxorubicin in Breast Cancer Treatment. *Nutrition and Cancer*, 69(6), 840–848, 2017.

SALAMON, H.; BRUINERS, N.; LAKEHAL, K.; SHI, L.; RAVI, J.; YAMAGUCHI, K. D.; PINE, R.; GENNARO, M. L. Vitamin D regulates lipid metabolism in

Mycobacterium tuberculosis infection. The Journal of Immunology, 193(1): 30-34, 2014.

SANTOS, B. M.; COSTA, L. H. A.; ROCHA, M. J.; BRANCO, L. G. S. Central leukotrienes modulate fever tolerance to LPS in rats. Journal of Thermal Biology, 84, 245–249, 2019.

SAQCENA, M.; PATEL, D.; MENON, D.; MUKHOPADHYAY, S.; FOSTER, D.A. Apoptotic effects of high-dose rapamycin occur in S-phase of the cell cycle. Cell Cycle, 14(14):2285-2292, 2015.

SAXTON, R. A.; SABATINI, D. M. mTOR Signaling in growth, metabolism, and diseases. Cell, 168(6):960-976, 2017.

SCHOONJANS, K.; MARTIN, G.; STAELS, B.; AUWERX, J. Peroxisome proliferator-activated receptors, orphans with ligands and functions. Current Opinion in Lipidology, 8(3), 159–166, 1997.

SCHREIBER, R. D.; OLD, L. J.; SMYTH, M. J. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. Science, 331(6024), 1565-1570, 2004.

SEDRANI, S. H.; ELIDRISSY, A. W.; EL ARABI, K. M. Sunlight and vitamin D status in normal Saudi subjects. The American Journal of Clinical Nutrition, 38(1), 129–132, 1983.

SERHAN, C. N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. Nature Immunology, 6(12): 1191-1197, 2005.

SETHI, G.; SUNG, B.; AGGARWAL, B. TNF: A master switch for inflammation and cancer. Frontiers in Bioscience, 1(13): 5094-5107, 2008.

SETTEMBRE, C.; BALLABIO, A. Autophagy transcribed. Nature, 516, p. 40-41, 2014.

SHEEN-CHEN, SM., CHEN, WJ., ENG, HL. et al. Serum concentration of tumor necrosis factor in patients with breast cancer. Breast Cancer Res Treat 43, 211–215, 1997.

SHEN, L.; SHI, Q.; WANG, W. Double agents: genes with both oncogenic and tumor suppressor functions. Oncogenesis, 7:25, 2018.

SHYU JR, P.; WONG, X. F. A.; CRASTA, K.; THIBAUT, G. Dropping in on Lipid Droplets: insights into cellular stress and cancer. Bioscience Reports, 38 (5): 01-20, 2018.

SICA, A.; LARGHI, P.; MANCINO, A.; RUBINO, L.; PORTA, C.; TOTARO, M. G.; RIMOLDI, M.; BISWAS, S. K.; ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A. Macrophage

polarization in tumour progression. *Seminars in Cancer Biology*, 18(5), 349–355, 2008.

SIMBOLI-CAMPBELL, M.; NARVAEZ, C. J.; VANWEELDEN, K.; TENNISWOOD, M.; WELSH, J. Comparative effects of 1,25(OH)₂D₃ and EB1089 on cell cycle kinetics and apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 42(1): 31–41 1997.

SIMS, A. H.; HOWELL, A.; HOWELL, S. J.; CLARKE, R. B. Origins of breast cancer subtypes and therapeutics implications. *Nature Clinical Practice Oncology*, 4(9): 516-525, 2007.

SIRAJUDEEN, S.; SHAH, I.; AL MENHALI, A. A Narrative Role of Vitamin D and Its Receptor: With Current Evidence on the Gastric Tissues. *International Journal of Molecular Sciences*, 20 (15), 2019.

SOBOLEWSKI, C.; CERELLA, C.; DICATO, M.; GHIBELLI, L.; DIEDERICH, M. The Role of Cyclooxygenase-2 in Cell Proliferation and Cell Death in Human Malignancies. *International Journal of Cell Biology*, v. 2010, p.01-21, 2010.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA. Vitamina D: Novos Valores de Referência. Disponível em: <<https://www.endocrino.org.br/vitamina-d-novos-valores-de-referencia/>>. Acesso em:< 10 novembro 2019>.

SONG, X., DILLY, A. K.; KIM, S. Y.; CHOUDRY, H. A.; LEE, Y. J. Rapamycin-enhanced mitomycin C-induced apoptotic death is mediated through the S6K1–Bad–Bak pathway in peritoneal carcinomatosis. *Cell Death Disease* 5, e1281, 2014.

SOUZA-MOREIRA, L.; SOARES, V. C.; DIAS, S. S. G.; BOZZA, P. T. Adipose-derived mesenchymal stromal cells modulate lipid metabolism and lipid droplet biogenesis via AKT/mTOR-PPAR γ signaling in macrophages. *Scientific Reports*, 9:20304, 2019.

STEIN-WERBLOWSKY, R. Prostaglandin and Cancer. *Oncology*, 30(2), 169–176, 1974.

STINGL J, CALDAS C. Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. *Nature Rev Cancer*; 7:791-9, 2007.

STIO, M., MARTINESI, M., BRUNI, S., TREVES, C., MATHIEU, C., VERSTUYF, A., ... BONANOMI, A. G. The Vitamin D analogue TX 527 blocks NF- κ B activation in peripheral blood mononuclear cells of patients with Crohn's disease. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 103(1), 51–60, 2007.

SUGARMAN, B., AGGARWAL, B., HASS, P., FIGARI, I., PALLADINO, M., SHEPARD, H. Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on

proliferation of normal and transformed cells *in vitro*. *Science*, 230(4728), 943–945, 1985.

SWINNEN, J. V.; BRUSSELMANS, K.; VERHOEVEN, G. Increased lipogenesis in cancer cells: new players, novel targets. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 9(4): 358–365, 2006.

SZLOSAREK, P.; BALKWILL, F. Tumour necrosis factor- α : A potential target in the therapy of solid tumors. *Lancet Oncology*, 4, p. 565–573, 2003.

SZTALMACHOVA, M., GUMULEC, J.; RAUDENSKA, M.; POLANSKA, H.; HOLUBOVA, M.; BALVAN, J.; HUDCOVA, K.; KNOPFOVA, L.; KIZEK, R.; ADAM, V.; BABULUA, P.; MASARIK, M. Molecular response of 4T1-induced mouse mammary tumours and healthy tissues to zinc treatment. *International Journal of Oncology*, 46(4): 1810-1818, 2015.

TALLIMA, H.; EL RIDI, R. Arachidonic acid: Physiological roles and potential health benefits – A review. *Journal of Advanced Research*, 11, p. 33-41, 2018.

TAKEI, N.; NAWA, H. mTOR signaling and its roles and abnormal brain development. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, v. 7. 2014.

TAO, K.; FANG, M.; ALROY, J.; SAHAGIAN, G. G. Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer. *BMC Cancer*, 8:208, 2008.

TANIGUCHI, K.; KARIN, M. NF- κ B, inflammation, immunity and cancer: coming of age. *Nature Reviews Immunology*, v. 18, p. 309-3024, 2018.

TAUCHI-SATO, K.; OZEKI, S.; HOUJOU, T.; TAGUCHI, R.; FUJIMOTO, T. The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique fatty acid composition. *Journal of biological chemistry*, v. 277, n. 46, p. 44507-44512, 2002.

TAVARES, V.; HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. C. Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma Gama (PPAR γ): Estudo Molecular na Homeostase da Glicose, Metabolismo de Lipídeos e Abordagem Terapêutica. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 51(4): 526-533, 2007.

TAYMAZ-NIKERE, H.; KARABEKMEZ, M. E.; ERASLAN, S.; KIRDAR, B. Doxorubicin induces an extensive transcriptional and metabolic rewiring in yeast cells. *Scientific Reports*, 8:13672, 2018.

TERABE, M.; MATSUI, S., PARK, J.M.; MAMURA, M.; NOBEN-TRAUTH, N.; DONALDSON, D.D.; CHEN, W.; WAHL, S.M., et al. Transforming growth factor-beta production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence. *The Journal of Experimental Medicine*, 198(11):1741–1752, 2003.

TESAURO, C.; SIMONSEN, A. K.; ANDERSEN, M. B.; PETERSEN, K. W.; KRISTOFFERSEN, E. L.; et al. Topoisomerase I activity and sensitivity to camptothecin in breast cancer-derived cells: a comparative study. *BMC Cancer*, 19:1158, 2019.

THOMAS, M. K.; LLOYD-JONES, D. M.; THADHANI, R. I.; SHAW, A. C.; DERASKA, D. J.; KITCH, B. T.; VAMVAKAS, E. C.; DICK, I. M.; PRINCE, R. L.; FINKELSTEIN, J. S. Hypovitaminosis D in Medical Inpatients. *New England Journal of Medicine*, 338(12), 777–783, 1998.

THORN, C. F.; OSHIRO, C.; MARSH, S. et al. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenetic Genomics*, 21(7):440-446, 2011.

TILLEY, S. L.; COFFMAN, T. M.; KOLLER, B. H. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 108, n. 1, p. 15-23, 2001.

TIRINATO, I.; PAGLIARI, F.; LIMONGI, T.; MARINI, M.; FALQUI, A.; SECO, J.; CANDELORO, P.; LIBERALE, C.; DI FABRIZIO, E. Na Overview of Lipid Droplets in Cancer and Cancer Stem Cells. *Stem Cells International*, v. 2017, 2017.

TIRINATO, L., LIBERALE, C., DI FRANCO, S., CANDELORO, P., BENFANTE, A., LA ROCCA, R., ... DI FABRIZIO, E. Lipid Droplets: A New Player in Colorectal Cancer Stem Cells Unveiled by Spectroscopic Imaging. *STEM CELLS*, 33(1), 35–44, 2015.

TOLEDO, D. A. M.; D'AVILA, H.; MELO, R. C. N. Host Lipid Bodies as Platforms for intracellular Survival of Protozoan Parasites. *Frontiers in Immunology*, v. 7, p.01-06, 2016.

TSANG, C. K.; QI, H.; LIU, L. F.; ZHENG, X. F. S. Targeting mammalian target of rapamycin (mTOR) for health and diseases. *Drug Discovery Today*, 12(3/4): 112-124, 2007.

TURASHVILI, G.; BROGI, E. Tumor Heterogeneity in Breast Cancer. *Frontiers in Medicine*, v. 4, p. 01-11, 2017.

TYAGI, S.; GUPTA, P.; SAINI, A. S.; KAUSHAL, C.; SHARMA, S. The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 2(4), 236-240, 2011.

VALKOVIC, T.; DOBRILA, F.; MELATO, M.; SASSO, F.; RIZZARDI, C.; JONJIC, N. Correlation between vascular endothelial growth factor, angiogenesis, and tumor-associated macrophages in invasive ductal breast carcinoma. *Virchows Arch*. 440, 583–588, 2002.

VAN RAALTE, D. H.; LI, M.; PRITCHARD, P. H.; WASAN, K. M. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR)- α : A Pharmacological Target with a Promising Future. *Pharmaceutical Research*, 21(9), 1531–1538, 2004.

VARA, D.; MORELL, C.; RODRIGUEZ-HENCHE, N.; DIAZ-LAVIADA, I. Involvement of PPAR γ in the antitumoral action of cannabinoids on hepatocellular carcinoma. *Cell Death and Disease*, 4, 2013.

VESELY, M.D.; KERSHAW, M.H.; SCHREIBER, R.D.; SMYTH, M. J. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol.*; 29:235-71, 2011.

VEZINA, C.; KUDELSKI, A.; SEHGAL, S.N. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *The Journal of Antibiotics*, 28, 721–726, 1975.

VISSER, K. E.; EITCHEN, A.; COUSSENS, L. M. Paradoxal roles of the immune system during cancer development. *Nature Reviews*, v. 6, p. 24-37, 2006.

VOGELSTEIN, B. et al. Cancer genome landscapes. *Science*, v. 339, p. 1546–1558, 2013.

VOLODKO, N.; GUTOR, T.; PETRONCHAK, O.; HULEY, R.; DÚCKA, M.; SMARDA, J.; BORSIG, L.; BENES, P.; KNOPFOVÁ, L. Low infiltration of tumor-associated macrophages in high c-Myb-expressing breast tumors. *Scientific Reports*, 9:11634, 2019.

WAJANT, H.; SIEGMUND, D. TNFR1 and TNFR2 in the Control of the Life and Death Balance of Macrophages. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 7:91, 2019.

WANG, D.; DuBOIS, R. N. Prostaglandins and cancer. *Prostaglandins and Cancer*. *Gut*, v. 55, p. 115-122, 2006.

WANG, D.; DUBOIS, R. N. Eicosanoids and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 10(3), 181–193, 2010.

WANG, L. H.; WU, C. F.; RAJASEKARAN, N.; SHIN, Y. K. Loss of Tumor Suppressor Gene Function in Human Cancer: Na Overview. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 51: 2647-2693, 2018.

WANG, N.; LIANG, H.; ZEN, K. Molecular mechanisms that influence the macrophage M1-M2 polarization balance. *Frontiers in Immunology*, v. 5, p. 01-09, 2014.

WANG, Q.; WANG, X.; HERNANDEZ, A.; KIM, S.; EVERS, B. M. Inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway contributes to HT29 and Caco-2 intestinal cell differentiation. *Gastroenterology*, v. 120, p. 1381-1392, 2001.

WELLER, P. F.; DVORAK, A. M. Arachidonic acid incorporation by cytoplasmic lipid bodies of human eosinophils, *Blood* 65, P. 1269–1274, 1985.

WELSH, J. Induction of apoptosis in breast cancer cells in response to vitamin D and antiestrogens. *Biochemistry and Cell Biology*, 72(11-12): 537–545 1994.

WELTE, M. A. Expanding Roles for Lipid Droplets. *Current Biology*, 25, R470–R481, 2015.

WHO. Cancer fact sheet. Department of Sustainable Development and Healthy Environments Disponível em: <http://www.searo.who.int/entity/noncommunicable_diseases/advocacy/cancer_fact_sheet.pdf?ua=1>. Acesso em: 13 out. 2019.

WHO. Cancer. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>. Acesso em: 13 out. 2019.

WILMANSKI, T.; BUHMAN, K.; DONKIN, S. S.; BURGESS, J. R.; TEEGARDEN, D. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D inhibits de novo fatty acid synthesis and lipid accumulation in metastatic breast cancer cells through down-regulation of pyruvate carboxylase. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 40, p. 194–200, 2017.

WILSON, J.; BALKWILL, F. The role of cytokines in the epithelial cancer microenvironment. *Cancer Biol.*; 12:113-20, 2002.

WU, Y.; ZHOU, B. P. TNF- α / NF- κ B / Snail pathway in cancer cell migration and invasion. *British Journal of Cancer*, 102, p. 639-644, 2010.

WYNN, T. A., CHAWLA, A.; POLLARD, J. W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* 496, 445–455, 2013.

YAGOUBHI, A.; KHAZAEI, M.; HASANIAN, S. M.; AVAN, A.; CHO, W. C.; SOLEIMANPOUR, S. Bacteriotherapy in Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, p.01/221, 2019.

YANG, F.; TEVES, S. S.; KEMP, C. J.; HENIKOFF, S. Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta* 1845, 84–89, 2014.

YANG, L.; DONG, Y.; LI, Y.; WANG, D.; LIU, S.; WANG, D.; GAO, Q.; JI, S.; CHEN, X.; LEI, Q.; JIANG, W.; WANG, L.; ZHANG, B.; YU, J. J.; ZHANG, Y. IL-10 derived from M2 macrophage promotes cancer stemness via JAK1/STAT1/NF- κ B/Notch1 pathway in non-small cell lung cancer. *International Journal of Cancer*, 145, 1099–1110, 2019.

YELLEN, P.; SAQCENA, M.; SALLOUM, D.; et al. High-dose rapamycin induces apoptosis in human cancer cells by dissociating mTOR complex 1 and suppressing phosphorylation of 4E-BP1. *Cell Cycle*;10(22):3948-3956, 2011.

YOUSEFNIA, S.; MOMENZADEH, S.; FOROOTAN, F. S.; GHAEDI, K.; ESFAHANI, M. H. N. The influence of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) ligands on cancer cell tumorigenicity. *Gene*, 649, p. 14-22, 2018.

YOU, J. S.; JONES, P. A. *Cancer Genetics and Epigenetics: Two Sides of the Same Coin?* Cell Press, p. 09-20, 2012.

YU, T.; GAN, S.; ZHU, Q.; DAI, D.; LI, N.; WANG, H.; CHEN, X.; HOU, D.; WANG, Y.; PAN, Q.; XU, J.; ZHANG, X.; LIU, J.; PEI, S.; PENG, C.; WU, P.; ROMANO, S.; MAO, C.; HUANG, M.; ZHU, X.; SHEN, K.; QIN, J.; XIAO, Y. Modulation of M2 macrophage polarization by the crosstalk between Stat6 and TRIM24. *Nature Communications*, 10: 4353, 2019.

YU, W.; CASSARA, J.; WELLER, P. Phosphatidylinositide 3-kinase localizes to cytoplasmic lipid bodies in human polymorphonuclear leukocytes and other myeloid-derived cells. *Blood*, 95, 3: 1078- 1085, 2000.

ZHANG, R.; NAUGHTON, D. P. Vitamin D in health and disease: Current perspectives. *Nutrition Journal*, 9: 65, 2010.

ZHAO, L.; ZHANG, B. Doxorubicin induce cardiotoxicity through upregulation of death receptors mediated apoptosis in cardiomyocytes. *Scientific Reports*, 7: 44735, 2017.

ZHAO, M.; SUN, J.; ZHAO, Z. 2013. TSGene: a web resource for tumor suppressor genes. *Nucleic Acids Research*, v.41, p. D970-D976, 2013.

ZHU, G. D.; OKAMURA, W. H. Synthesis of Vitamin D (Calciferol). *Chemical Reviews*, 95(6), 1877–1952, 1995.