

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA, MICROBIOLOGIA E
IMUNOLOGIA

Pollyanna Amaral Salvador

**PAPEL DA OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA HIPERLIPÍDICA NO
DESENVOLVIMENTO DE CARCINOMA MAMÁRIO EXPERIMENTAL**

JUIZ DE FORA
2014

POLLYANNA AMARAL SALVADOR

**PAPEL DA OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA HIPERLIPÍDICA NO
DESENVOLVIMENTO DE CARCINOMA MAMÁRIO EXPERIMENTAL**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, na área de Imunologia e Doenças Infecto Parasitárias, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, na área de Imunologia e Doenças Infecto Parasitárias.

Orientadora: Prof^a Dra. Jacy Gameiro

Juiz de Fora

2014

Salvador, Pollyanna Amaral.

Papel da obesidade induzida por dieta hiperlipídica no desenvolvimento de carcinoma mamário experimental / Pollyanna Amaral Salvador. -- 2014.

71 p.

Orientadora: Jacy Gameiro

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2014.

1. Obesidade. 2. Câncer de mama. 3. Dieta Hiperlipídica. I. Gameiro, Jacy, orient. II. Título.

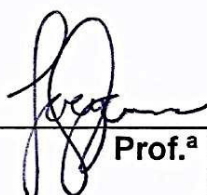
POLLYANNA AMARAL SALVADOR

Papel da obesidade induzida por dieta hiperlipídica no desenvolvimento de carcinoma mamário experimental

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em 24 de fevereiro de 2014.

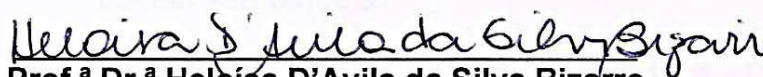
BANCA EXAMINADORA:



Prof.ª Dr.ª Jacy Gameiro
Orientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof.ª Dr.ª Patrícia Resende Alo Nagib Loyola
Universidade Federal de Goiás



Prof.ª Dr.ª Heloisa D'Avila da Silva Bizarro
Universidade Federal de Juiz de Fora

“Não é porque certas coisas são difíceis que nós não ousamos. É justamente porque não ousamos que tais coisas são difíceis.”

Sêneca (filósofo romano, 4 aC – 65 dC).

AGRADECIMENTO

Costumo dizer que Deus sempre coloca pessoas muito boas em meu caminho.

Para começar, Ele permitiu que eu viesse a esse mundo como membro de uma família maravilhosa. Meus pais, Paulo e Helena são exemplos de honestidade, garra e dedicação. Meu irmão, Paulo Henrique, sempre paciente, sereno e dono do abraço mais acolhedor que possa existir. Meus “primirmãos”, meus tios, meus avós, o nosso Melo... Companheiros de farras, de goles, de choros, de orações. Vocês são a base de minha vida! A vocês, meu amor incondicional!

Com a vinda para Juiz de Fora, novos caminhos se abriram e fui mais uma vez presenteada. A faculdade de Biologia me rendeu irmãos de alma, com os quais muito aprendi aos quais muito devo. Leda Lucinda (Ledinha), Nicolli Bellotti, Patrícia Duarte (Paty), Thiago Pereira (Patrick), Michelle Fernandes, Maria Elena de Castro (Leninha)... Apoio, companheirismo, conselhos, puxões de orelha e a certeza de muitas risadas nestes 10 anos.

Ao me formar, do CBR/UFJF, ousei alçar um voo ao Rio de Janeiro. E no INCa/MEDEX, recebi um novo presente. Posso dizer que tudo o que lá aprendi faz parte dos tijolos fundamentais desse projeto ora denominado dissertação. À professora Adriana Bonomo, agradeço pelo apoio e por ter me mostrado, pelo sim e pelo não, o que é ser um pesquisador. A Suelen Perobelli, agradeço por ter feito com que meus dias no Rio fossem um tanto quanto “mineiros”. Aos amigos “cariocas” devo agradecer pelos momentos felizes que vocês me proporcionaram na “Cidade Maravilhosa”.

Seguindo os impulsos do coração, do Rio de Janeiro aterrissei, literalmente, na Imuno JF, sendo novamente presenteada. Jacy, sem pestanejar, me acolheu de braços abertos, me ofereceu seu ombro amigo, seu colo de mãe. A essa orientadora, que é como mãe, agradeço pelo carinho, pela confiança, pelo apoio e compreensão, pelos conselhos, pela amizade e pelos ensinamentos. Junto dela, recebi de presente o “Gameiro’s Group”. E o que dizer deste grupo?! Amigos?! Companheiros?! Não só isso. Somos uma família! E como muito bem dito pela Jacy, o que nos faz uma família são as peculiaridades de cada um. A irreverência e o

companheirismo da Gabriela Menezes (Gabi); a timidez da Maria Júlia Meewes (Juju); a alegria da Sara Malaguti; a meiguice da Ana Gualberto (Aninha); o entusiasmo do Renan Carvalho; a jovialidade do Felipe Xavier; o bom humor do Diego Assis (Tisco) e minha imperatividade. Sinto-me muito feliz e agradecida por ter vocês ao meu lado, como meus companheiros.

Muito devo também aos amigos e companheiros de trabalho da Imuno JF. Aos professores Gilson Costa Macedo, Ana Paula Ferreira e Henrique Teixeira, as meninas da *Brucella*, a galerinha da asma, da EAE, da tuberculose... Também a professora Kézia Scopel e todos os alunos da parasito. O apoio, a confiança, as doações e o carinho de vocês foram de extrema importância. A Leidiana e a Sirley, agradeço pelo comprometimento com o trabalho, pela dedicação as tarefas, por toda boa vontade e disposição em nos ajudar.

Aos empecilhos impostos pela reforma no laboratório, devo a oportunidade de ter feito novos amigos no laboratório de Biologia Celular. As professoras Heloísa Bizarro, Patrícia Almeida e Rossana Melo abriram-nos as portas, nos entregaram as chaves de olhos fechados. Seus alunos, sempre dispostos e prestativos dispuseram todo o espaço e toda boa vontade para nos acolher. A vocês, minha imensa gratidão.

Deus não deixaria que eu encerrasse esse ciclo sem me presentear novamente. E eis que, quase ao fim dele, fui abençoada com um amor e uma nova família. Gláucio, meu príncipe, meu amigo, meu cúmplice, agradeço por toda alegria que você trouxe a minha vida, por toda dedicação, todo o amor e toda paciência durante a finalização deste trabalho.

Enfim, devo agradecer a Ele, nosso Pai Celestial. Sem suas bênçãos, nada disso seria possível.

RESUMO

A obesidade tornou-se um problema de saúde pública em todo o mundo. Um grande número de doenças, entre elas doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2 e diversos tipos de cânceres, incluindo câncer de mama na pós menopausa, estão associadas a obesidade.

O câncer de mama é a principal causa de mortalidade associada ao câncer em mulheres nos países desenvolvidos e sua incidência tem aumentado nos países em desenvolvimento. A maioria das mortes associadas ao câncer de mama resulta de uma doença metastática não controlada. Assim, torna-se importante investigar alterações do estilo de vida, incluindo os hábitos alimentares, capazes de diminuir o risco de desenvolvimento de câncer de mama e metástases.

Neste trabalho, investigamos o potencial de desenvolvimento do carcinoma mamário 4T1 e metástases em camundongos submetidos a uma dieta rica em lipídeos.

Camundongos BALB/c, fêmeas, com idade de 4 a 6 semanas foram alimentados com dieta padrão, onde 10% das kcal eram advindas de lipídeos, ou dieta rica em lipídeos, onde 60% das kcal eram advindas de lipídeos; durante 6 ou 16 semanas. O peso corporal, o consumo de ração e o perfil bioquímico foram registrados. Ao final deste período, receberam células tumorais da linhagem 4T1. O peso e o volume do tumor, bem como o desenvolvimento de metástases ósseas foram analisados. O perfil das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6, assim como o de leptina, foram avaliados.

Observou-se um aumento do peso corporal dos animais alimentados pela HFD, sem aumento do consumo de ração, a partir da segunda semana de dieta. Após 16 semanas de dieta, os animais obesos apresentaram aumento de gordura perigonadal e retroperitoneal. Além disso, demonstraram menor tolerância à glicose, aumento dos níveis séricos de leptina e colesterol.

Após receberem as células tumorais, a sobrevida dos animais obesos, alimentados durante 16 semanas, embora não significativa, foi menor. Estes animais também apresentaram tumores mais volumosos e mais pesados, além de aumento de metástases ósseas. O perfil de citocinas destes mesmos animais, depois de receberem o tumor, já num estágio avançado da doença, com desenvolvimento de tumores secundários, também foi alterado. Observou-se diminuição da expressão de leptina, acompanhada de diminuição de IL-6 e TNF- α .

Nossos resultados, em conjunto, demonstram que a ingestão de uma dieta rica em lipídeos é capaz de induzir a obesidade em camundongos BALB/c fêmeas e pode favorecer a progressão do câncer de mama.

Palavras-chave: Obesidade, câncer de mama, dieta hiperlipídica

ABSTRACT

Obesity has become a public health problem. A large number of diseases, including cardiovascular disease, type 2 diabetes and various cancers, including breast cancer in post-menopausal women, are associated with obesity.

Breast cancer is the mainly cause of cancer- related deaths in women in developed countries and its incidence has increased throughout the developing countries. Most deaths associated with breast cancer results from uncontrolled metastatic disease. Thus, is important to investigate changes in lifestyle, including dietary habits that are able to decrease the risk of developing breast cancer and metastasis.

In this work, we investigate the potential development of 4T1 mammary carcinoma and metastases in mice subjected to a high fat diet.

BALB/c, females, aged 4-6 weeks were fed with standard diet where 10% of kcal from fat or high-fat diet where 60% of kcal from fat; for 6 or 16 weeks. Body weight, feed intake and biochemical profile were analyzed. At the end of this period, mice of both groups received the 4T1 lineage tumor cells. The weight and volume of tumor and the development of bone metastases were examined. The profile of pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-6 as well as leptin was also evaluated.

It has been observed a body weight gain of the animals fed the HFD, without increasing the feed intake from the second weeks of diet. After 16 weeks of diet, the obese animals showed increased perigonadal and retroperitoneal fat. Moreover, they demonstrated reduced glucose tolerance, increased leptin and cholesterol serum levels.

After receiving the tumor cells, the survival of obese animals fed for 16 weeks, although not significant, was lower. These animals also showed tumors bulkier and heavier, and increase bone metastases. The cytokine profile of obese animals that received tumor, already at an advanced stage of the disease, with the development of secondary tumors, has also changed. We observed decreased expression of leptin, accompanied by decreased IL-6 and TNF- α .

Our results, taken together, show that eating a high-fat diet can induce obesity in BALB/c mice and may promote the progression of breast cancer.

Keywords: Obesity, breast cancer, high-fat diet

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 01: Representação da estimativa mundial de sobrepeso e obesidade entre mulheres e homens.	Pág. 13
Figura 02: Desenho esquemático demonstrando o desenvolvimento dos carcinomas mamários ductal e lobular invasivos.	Pág. 20
Figura 03: Representação esquemática do estabelecimento de metástases pela hipótese de auto sementeira.	Pág. 21
Figura 04: Representação esquemática do delineamento experimental.	Pág. 31
Figura 05: Desenho esquemático representando a marcação de orelha usada para identificação dos animais.	Pág. 32
Figura 06: Desenho esquemático demonstrando a localização anatômica das glândulas mamárias e o local de injeção das células tumorais.	Pág. 35
Figura 07: Desenho esquemático demonstrando a localização anatômica das gorduras retroperitoneais e perigonadais.	Pág. 37
Figura 08: Animais obesos apresentam aumento do peso corporal sem aumentar o consumo de ração.	Pág. 40
Figura 09: Aumento do peso das gorduras retroperitoneal e perigonadal ao longo de dezesseis semanas de dieta nos animais obesos.	Pág. 41
Figura 10: Diminuição da tolerância à glicose, com aumento da glicemia de animais obesos.	Pág. 42
Figura 11: Aumento da concentração de leptina no soro de animais obesos.	Pág. 42
Figura 12: Aumento dos níveis de colesterol total nos animais alimentados pela HFD.	Pág. 43
Figura 13: Níveis de triglicérides não foram alterados pela ingestão da HFD.	Pág. 43
Figura 14: Animais alimentados pela HFD durante 16 semanas apresentam diminuição do peso corporal após a injeção do tumor.....	Pág. 45

Figura 15: Mortalidade de animais controles e obesos, alimentados por 6 ou 16 semanas de dieta, após receberem as células tumorais.	Pág. 46
Figura 16: Peso da gordura perigonadal dos animais alimentados por 6 ou 16 semanas de dieta após receberem o tumor.	Pág. 47
Figura 17: Animais obesos alimentados durante 16 semanas de dieta apresentam tumores de maior peso e volume.	Pág. 48
Figura 18: Animais obesos, alimentados durante 16 semanas de dieta, apresentam aumento de metástases na medula óssea.	Pág. 49
Figura 19: Animais obesos tendem a apresentar mais metástases no linfonodo inguinal drenante do tumor.	Pág. 50
Figura 20: Animais obesos apresentam maior expressão de leptina no meio condicionado de tecido adiposo.	Pág. 52
Figura 21: Expressão alterada de IL-6 em cultura de medula óssea do ilíaco.	Pág. 53
Figura 22: Expressão de TNF- α no sobrenadante de cultura de medula óssea do ilíaco de animais acompanhados durante 6 ou 16 semanas de dieta.	Pág. 54
Figura 23: Aumento dos níveis séricos de leptina pode favorecer o estabelecimento do tumor e o desenvolvimento de metástases.	Pág. 59
Tabela 01: Componentes da ração rica em gordura (HFD).	Pág. 29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Bcl-2	“B-cell lymphoma 2” – Linfoma de células B 2
Bcl-xL	“B-cell lymphoma-extra large” – Linfoma de células B grandes
CCL2	“C-C motif chemokine 2” – Ligante de quimiocina 2
CCL5	“C-C motif chemokine 5” – Ligante de quimiocina 5
CCL11	“C-C motif chemokine 11” – Ligante de quimiocina 11
CD31	“Cluster of differentiation 31” – Grupamento de diferenciação 31
DMBA	“7,12-Dimethylbenz(a)anthracene” – 7-12-dimetilbenzeno (a)antraceno
DMEM	“Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium” – Meio Modificado de Dulbecco’s
HFD	“High-fat diet” – Dieta rica em gordura
IFN- γ	“Interferon gamma” – Interferon gama
IGF-1	“Insulin-like growth factor 1” – Fator de crescimento semelhante a insulina 1
IL-1 β	“Interleukin - 1 beta” – Interleucina - 1 beta
IL-2	“Interleukin - 2” – Interleucina - 2
IL-4	“Interleukin - 4” – Interleucina - 4
IL-5	“Interleukin - 5” – Interleucina - 5
IL-6	“Interleukin - 6” – Interleucina - 6
IL-8	“Interleukin - 8” – Interleucina - 8
IL-10	“Interleukin - 10” – Interleucina - 10
IL-12	“Interleukin - 12” – Interleucina - 12
IL-13	“Interleukin - 13” – Interleucina - 13
IL-17	“Interleukin – 17” – Interleucina - 17
IMC	Índice de massa corpórea
iNOS	“Inducible nitric oxide synthase” – Óxido nítrico sintase induzível
Ki67	Produto da expressão do gene MKI67
MAPK	“Mitogen-activated protein kinase” – Proteína quinase ativada por mitógeno

MCF-7	“Human breast adenocarcinoma cell line” – Linhagem celular de adenocarcinoma mamário humano
MCP-1	“Monocyte chemotactic protein - 1” – proteína quimiotática de monócitos - 1
MHC	“Major histocompatibility complex” – Complexo maior de histocompatibilidade
MMP2	“Matrix metalloproteinase - 2” – Metaloproteinase de matriz - 2
MMP9	“Matrix metalloproteinase - 9” – Metaloproteinase de matriz - 9
MMP11	“Matrix metalloproteinase - 11” – Metaloproteinase de matriz - 11
NF-κB	“Nuclear factor kappa B” – Fator nuclear kappa B
NK	“Natural killer cells” – Células exterminadoras naturais
Ob-R	“Receptor for leptin” – Receptor de leptina
PAI-1	“Plasminogen activator inhibitor-1” – Inibidor do ativador de plasminogênio 1
PBS	“Phosphate-buffered saline” – Tampão fosfato-salino
PI3K	“Phosphatidylinositide 3-kinases” – Fosfatidilinositideo 3 - quinase
RANKL	“Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand” – Receptor ativador do fator kappa B ligante
ROS	“Reactive oxygen species” – Espécies reativas de oxigênio
SFB	Soro fetal bovino
TGF-β	“Transforming growth factor beta” – Fator transformador de crescimento beta
Th1	“T helper 1” – T auxiliar 1
Th2	“T helper 2” – T auxiliar 2
TLR4	“Toll-like receptor 4” – Receptor do tipo Toll 4
TNF-α	“Tumor necrosis factor alpha” – Fator de necrose tumoral alpha
VEGF	“Vascular endothelial growth factor” – Fator de crescimento vascular endotelial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 O Sistema Imune na Obesidade	13
1.1.1 Modelos Experimentais de Obesidade.....	17
1.2 O Câncer de Mama.....	19
1.3 Obesidade e Câncer.....	23
2. OBJETIVOS.....	27
2.1 Objetivo Geral.....	27
2.2 Objetivos Específicos.....	27
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1 Animais.....	28
3.2 Dieta e Indução do Modelo de Obesidade.....	28
3.3 Cultura de Células da Linhagem 4T1.....	29
3.4 Delineamento Experimental.....	30
3.5 Eutanásias.....	32
3.6 Análises Bioquímicas.....	32
3.6.1 Glicemia.....	32
3.6.2 Colesterol e Triglicérides.....	33
3.7 Quantificação de Leptina	33
3.8 Indução do Modelo de Câncer de Mama Ortotópico <i>in vivo</i>	34
3.9 Quantificação do Volume do Tumor.....	34
3.10 Ensaio Clonogênico Metastático.....	35
3.11 Meio Condicionado de Gordura.....	36
3.12 Cultura de Células Estimuladas com Anti-CD3.....	36
3.13 Dosagem de Citocinas.....	37
3.14 Análise Estatística.....	38
4 RESULTADOS.....	39
4.1 Avaliação do Modelo de Obesidade.....	39
4.2 Influência da HFD na Sobrevida, no Crescimento Tumoral e no Desenvolvimento de Metástases.....	44
4.3 Influência da HFD no Perfil de Citocinas Pró Inflamatórias.....	51

5 DISCUSSÃO.....	55
6 CONCLUSÃO.....	60
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

1 INTRODUÇÃO

1.1 O SISTEMA IMUNE NA OBESIDADE

A obesidade tornou-se um problema de saúde pública em todo o mundo. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2008, mais de 1,4 bilhão de adultos estava acima do peso. Destes mais de 200 milhões de homens e quase 300 milhões de mulheres eram obesos. Em geral, cerca de 35% da população adulta mundial encontra-se em sobrepeso, enquanto 11% é considerada obesa. No Brasil, os dados também são alarmantes. Estudos epidemiológicos apontam que aproximadamente 60% das mulheres e 54% dos homens encontram-se em sobrepeso (Figura 01).

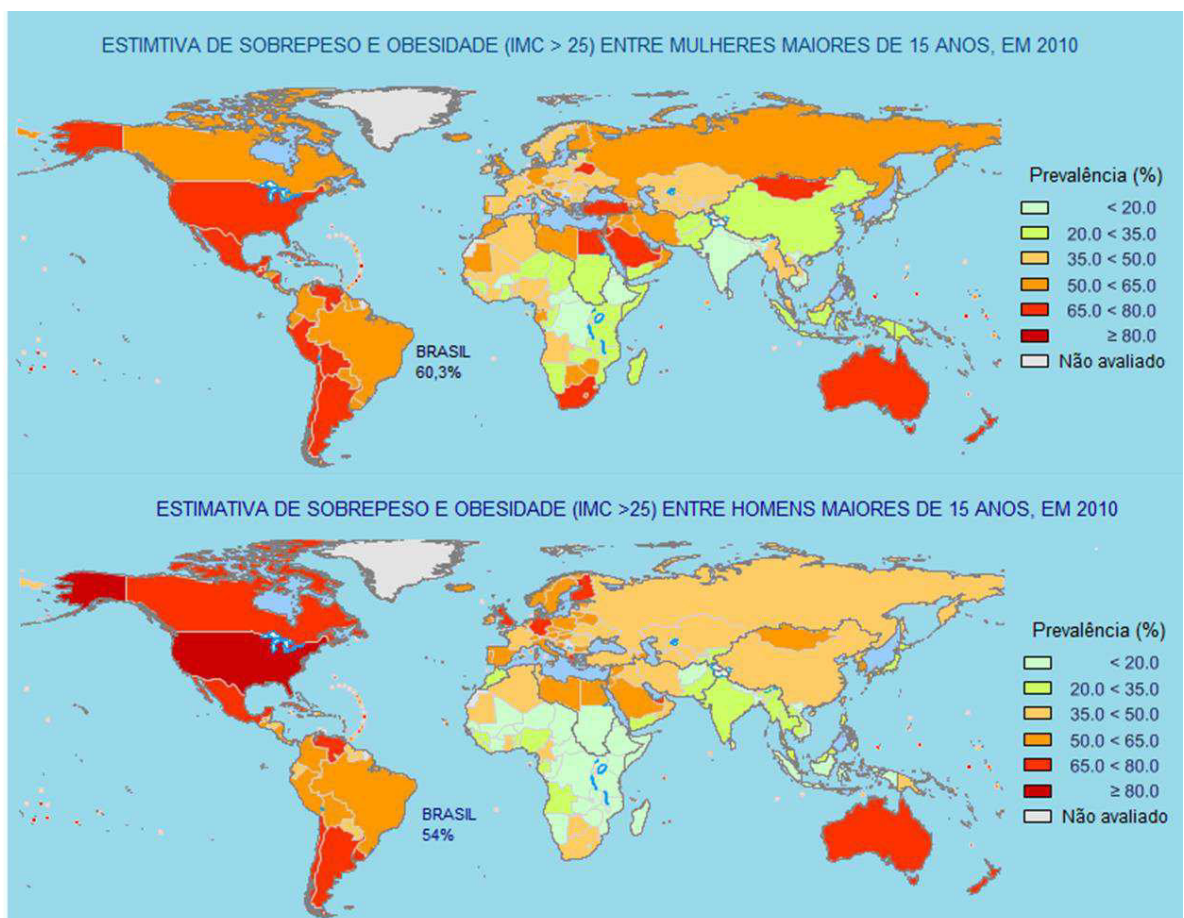


Figura 01: Representação da estimativa mundial de sobrepeso e obesidade entre mulheres e homens. (Adaptado de WHO, 2013).

Em 2011, foi estimada a existência de mais de 40 milhões de crianças, menores de cinco anos, com excesso de peso em todo o mundo das quais, aproximadamente, 35 milhões vivem nos países em desenvolvimento. A obesidade infantil é um grave problema de saúde pública, visto que crianças em sobrepeso ou obesas tendem a permanecer obesas na idade adulta e são mais propensas a desenvolver doenças associadas à obesidade. Além disso, estudos apontam redução de cinco a vinte anos na expectativa de vida, de acordo com o grau de obesidade (FONTAINE e BAROFSKY, 2001; WHO, 2013).

Sobrepeso e obesidade, em adultos, são comumente classificados através do Índice de Massa Corporal (IMC). São considerados adultos em sobrepeso aqueles que apresentam IMC maior ou igual a 25, enquanto que os obesos adultos devem apresentar IMC maior ou igual a 30 (WHO, 2013).

Um grande número de doenças, incluindo resistência a insulina, diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e diversos tipos de câncer, tais como cânceres hematológicos, câncer de próstata, câncer de cólon, câncer de mama na pós-menopausa, entre outros, está associado a obesidade. (KHANDEKAR, COHEN e SPIEGELMAN, 2011).

Um acúmulo de adipócitos, correlacionado a um elevado IMC caracterizam, biologicamente, a obesidade. Trata-se de uma síndrome metabólica multifatorial, com interação entre hormônios, neuropeptídios e citocinas, acarretando consequências ao eixo neuro-imuno-endócrino (DIXIT, 2008).

Muitos estudos relacionando a interação de hormônios, células, neuropeptídios e citocinas à fisiologia dos sistemas neuroendócrino e imunológico, bem como a resposta imunológica, têm sido realizados (CHROUSOS, 1995; CORREIA-DE-SANTANA *et al.*, 2009; DARDENNE *et al.*, 2009; MENDES-DA-CRUZ *et al.* 2009; PEREZ *et al.* 2009, SAVINO, 2010).

A leptina é um dos principais hormônios associados à obesidade. Produzida, principalmente, pelo tecido adiposo, proporcionalmente a massa de gordura e, em níveis inferiores em tecidos como o estômago, placenta e músculo esquelético, é um exemplo evidente de hormônio que atua tanto no sistema neuroendócrino quanto imunológico (ROBERTSON *et al.*, 2008; LEINNINGER *et al.*, 2008).

Foi primeiramente descrita como um regulador da saciedade e do controle de peso. No entanto, sabe-se que a leptina pode também afetar a homeostase do timo, aumentar a quimiotaxia de neutrófilos, induzir a secreção de interleucina 1 (IL-1),

interleucina 6 (IL-6) e do fator de necrose tumoral alpha (TNF- α , do inglês “tumor necrosis factor”); aumentar a expressão de moléculas de adesão, a expressão de moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC, do inglês “major histocompatibility complex”), a atividade fagocítica de macrófagos, além de aumentar a secreção de perforinas por células NK. Inibe respostas do tipo T “helper” 2 (Th2), promovendo a diferenciação de células T “helper” 1 (Th1), o aumento de linfócitos T CD8 e macrófagos; é capaz de induzir a proliferação de linfócitos T CD4 e a produção de interleucina 2 (IL-2) por essas células e pode ainda modular o aparecimento e a progressão de respostas autoimunes em modelos animais dessas doenças (ZHAO *et al.*, 2003; LA CAVA e MATARESE, 2004; BERNOITIENE *et al.*, 2006; LAM e LU, 2007, MATARESE *et al.*, 2008; LIKUNI *et al.*, 2008; CARLTON *et al.*, 2012).

Camundongos obesos, deficientes de leptina (*ob/ob*) ou deficientes do receptor de leptina (*db/db*), não são apenas gravemente obesos, mas apresentam também uma série de deficiências secundárias, como: anormalidades na reprodução, na hematopoiese, na angiogênese, na secreção de insulina, no metabolismo ósseo, lipídico e de glicose, além de importantes alterações na imunidade inata e adaptativa (BANNETT *et al.*, 1996; CHEHAB, LIM e LU, 1996; LORD *et al.*, 1998; SIERRA-HONIGMAM *et al.*, 1998; PARK *et al.*, 2001; LAM e LU, 2007; SANCHEZ-MAGALET *et al.*, 2009). Existem também relatos de que humanos com deficiência de leptina apresentam susceptibilidade a doenças infecciosas oportunistas, com menor proliferação de linfócitos T CD4, ausência de IFN- γ (do inglês “interferon gamma”), menor produção de interleucina 4 (IL-4) e interleucina 10 (IL-10) e aumento da secreção do fator de crescimento tumoral do tipo beta (TGF- β , do inglês “tumor growth factor”). Interessantemente, a administração exógena de leptina é capaz de restaurar as funções imunológicas desses indivíduos (LAM e LU, 2007).

Diversas evidências apontam a obesidade como um estado inflamatório crônico de baixo grau que contribui para o desenvolvimento de desordens relacionadas à obesidade, em especial, à disfunção metabólica (SHOELSON, LEE e GOLDFINE, 2006). Sabe-se que o tecido adiposo funciona também como uma glândula endócrina capaz de secretar diversas substâncias bioativas. Tais substâncias, denominadas coletivamente como adipocinas, podem alterar a composição de tecidos, incluindo alterações no número, no fenótipo e na localização de células imunes e vasculares. Indivíduos obesos comumente apresentam um aumento dos

níveis de citocinas pró-inflamatórias no sangue, em função do excesso de tecido adiposo e até mesmo de uma disfunção dos adipócitos, o que pode levar a respostas imunes alteradas, conduzindo a patogênese de diversas doenças. (BERG e SCHERER, 2005; NORIYUKI *et al.*, 2011).

Os mais abundantes depósitos de tecido adiposo são o visceral e o subcutâneo, que produzem perfis exclusivos de adipocinas, tais como TNF- α e IL-8 (SAMARAS *et al.*, 2010). No entanto, acúmulos de adipócitos podem ser encontrados por todo corpo, associados a diversos órgãos, como coração, rins, medula óssea, pulmões e grandes vasos sanguíneos com evidências de indução de um estado pró-inflamatório nessas regiões (CHATTERJEE *et al.*, 2009).

Muitas células do sistema imunológico estão presentes no tecido adiposo, dentre elas: macrófagos, linfócitos, neutrófilos e células dendríticas (SCHIPPER *et al.*, 2012). O tecido adiposo tanto de indivíduos obesos como nos modelos animais de obesidade apresenta um grande infiltrado de macrófagos e o recrutamento dessas células está ligado à inflamação sistêmica e a resistência à insulina, sendo os maiores responsáveis pela produção de citocinas pró-inflamatórias (XU *et al.*, 2003; WEISBERG *et al.*, 2003).

Diferentes subtipos de macrófagos estão envolvidos na inflamação do tecido adiposo induzida pela obesidade. Macrófagos que se acumulam no tecido adiposo de obesos são, principalmente, M1 ou macrófagos classicamente ativados; enquanto que aqueles do tecido adiposo de camundongos magros são do tipo M2 ou alternativamente ativados (LUMENG, BODZIN e SALTIEL, 2007). Estímulos gerados por citocinas do tipo Th1, incluindo IFN- γ , ou por produtos bacterianos e sinalização via receptores do tipo Toll-Like leva a geração de macrófagos M1, capazes de produzir altas concentrações de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-12; e geram radicais livres através da expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e de espécies reativas de oxigênio (ROS) (CHAWLA *et al.*, 2011). Em contraste, macrófagos são polarizados para o fenótipo M2 por citocinas do tipo Th2, como IL-4 e IL-13 (ODEGAARD *et al.*, 2008). Funcionalmente, macrófagos M2 estão associados com a reparação de tecidos lesados e a resolução da inflamação (GORDON, 2003). Desta forma, macrófagos M1 promovem a resistência à insulina e macrófagos M2 protegem contra a resistência à insulina induzida pela obesidade (ODEGAARD e CHAWLA, 2011).

Outras células imunológicas parecem alteradas na obesidade. Modelos experimentais de camundongos obesos *ob/ob* apresentam atrofia tímica e defeitos associados à resposta de linfócitos T, reduzida capacidade de apresentação de antígenos pelas células dendríticas e diminuída capacidade de ativar a proliferação de linfócitos T (LA CAVA e MATARESE, 2004; MACIA *et al.*, 2006). Uma menor diversidade de células T também foi observada em modelos animais de obesidade, sugerindo imunovigilância prejudicada (YANG, *et al.*, 2009). Além disso, animais *db/db*, com deficiência no receptor de leptina, apresentam um déficit de células NK, além de menor citotoxicidade destas células, resultante do desenvolvimento anormal das mesmas nestes animais (LA CAVA e MATARESE, 2004). O menor número de células NK com função citotóxica alterada também é observado em humanos (O'SHEA *et al.*, 2010), demonstrando que os modelos experimentais de obesidade apresentam características semelhantes aquelas observadas em humanos e são úteis para o estudo desta patologia.

1.1.1 MODELOS EXPERIMENTAIS DE OBESIDADE

A indução da obesidade pode ser realizada, em animais, por alterações neuroendócrinas, nutricionais ou genéticas. A grande similaridade entre o genoma dos roedores e o dos seres humanos tornam esses modelos animais uma importante ferramenta para o estudo da obesidade (VON DIEMEN, TRINDADE e TRINDADE, 2006).

Os principais modelos para indução de obesidade em ratos e camundongos são: lesões do núcleo hipotalâmico ventromedial, ovariectomia, dieta hipercalórica e manipulações genéticas.

A administração de glutamato monossódico (MSG) a ratos ou camundongos recém-nascidos provoca a destruição dos núcleos hipotalâmicos ventromedial e arqueado. Nesse caso, os animais desenvolvem a obesidade devido à falta de controle entre a absorção e o gasto de energia (LORDEN e CAUDLE, 1986). Sabe-se que neste modelo não há um aumento da ingestão de alimentos. Segundo

Djazayery (1979), a obesidade induzida quimicamente ocorre devido à diminuição da taxa metabólica destes animais. Lesões no núcleo hipotalâmico ventromedial também podem ser desenvolvidas por correntes elétricas capazes de causar a destruição bilateral dos núcleos hipotalâmicos, levando a obesidade. Sabe-se que a lesão elétrica do hipotálamo provoca aumento do nível de leptina, a redução do total de neuropeptídeo Y, mantendo as flutuações do ciclo circadiano e parece haver uma perda do “feedback” entre os mecanismos de insulina e leptina (DUBE *et al.*, 1999).

A partir de observações de que mulheres na pós-menopausa apresentam uma série de alterações metabólicas, incluindo ganho de peso, um novo modelo de obesidade surgiu através da ovariectomia. É um modelo bastante útil para se estudar as modificações pelas quais as mulheres passam ao fim de sua idade fértil. A remoção das gônadas provoca uma queda nos níveis de leptina, associada a um período de hiperfagia e acentuado ganho de peso. Sete semanas após a ovariectomia, os níveis de leptina são restaurados chegando a níveis mais elevados que os pré-operatórios (CHU *et al.*, 1999; AINSLIE *et al.*, 2001; CHEN e HEIMAN, 2001; KIMURA *et al.*, 2002; MELI *et al.*, 2004).

O modelo mais simples de indução de obesidade e, possivelmente, aquele que mais se assemelha a realidade da obesidade em humanos é o modelo de dietas hipercalóricas. Vários tipos de dietas são eficazes na indução da obesidade. Algumas delas atingem valores hipercalóricos pela adição de carboidratos e outras pela adição de gorduras (VON DIEMEN, 2006). Meguid e colaboradores, em 2004, induziram o modelo usando uma dieta cuja composição consistiu em 48% de ração convencional, 8% de óleo de milho e 44% leite condensado, sendo os animais alimentados durante 7 a 12 semanas. Usando dietas hipercalóricas compostas por 17,4% de carboidratos, 42,9% de proteínas e 39,7 % de gordura ou 21% de carboidratos, 24% de proteínas e 55% de gordura, Prunet-Marcassus e colaboradores também induziram o modelo de obesidade por dieta, em 2004.

Em 1990, quando foram identificados cinco diferentes genes causadores da obesidade, os modelos genéticos começaram a ser usados. Existem mais de 50 tipos diferentes de modelos genéticos de obesidade em roedores. No final de 1994, o gene da obesidade de rato foi clonado (*ob/ob*) e cerca de um ano depois se clonou o gene do diabetes (*db/db*). Diversos estudos mostraram que esses genes pertenciam a mesma via metabólica e que o *db/db* poderia ser um receptor do *ob/ob*. Posteriormente, o produto do gene *ob/ob* foi identificado e denominado como leptina.

Assim, os animais *ob/ob* desenvolvem uma síndrome que inclui hiperfagia, diabetes e obesidade, cuja origem se deve a ausência de leptina ou a presença não funcional desse hormônio. Os animais *db/db* apresentam uma mutação que faz com que haja a resistência à leptina, ou seja, eles possuem leptina, mas não um receptor funcional para o hormônio. Estes animais são hiperinsulinêmicos, intolerantes a glicose, apresentam alterações neuroendócrinas e termogênicas, além de hiperfagia e infertilidade (CHAGNON e BOUCHARD, 1996; ROBINSON, DINULESCO e CONE, 2000; BROCKMANN e BEVOVA, 2002).

Investigar as causas e os efeitos da indução de obesidade em modelos experimentais pode proporcionar a melhor compreensão da fisiopatologia desta doença e novas opções para prevenção e tratamento. No entanto, é necessário escolher o modelo que melhor se adapta as características a serem pesquisadas, sejam elas ambientais ou genéticas (VON DIEMEN, TRINDADE e TRINDADE, 2006).

1.2 O CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é o tipo mais frequente de câncer em mulheres, apresentando incidência crescente e alta taxa de mortalidade. Estima-se que, nos Estados Unidos, esta seja a segunda principal causa de morte associada a câncer em mulheres e que a maioria destas mortes resulte de doença metastática não controlada (DISANTIS *et al.*, 2014). É um câncer capaz de propagar-se para outras partes do corpo dentro de três anos do diagnóstico inicial em cerca de 10 a 15% dos casos (HELMAN e HARRIS, 2000). As células dos tumores sólidos, incluindo o carcinoma de mama, migram através do sistema linfático ou circulatório e invadem outros órgãos à distância por mecanismos ainda pouco definidos.

Dentre os carcinomas mamários, o carcinoma ductal invasivo é o tipo mais comum de câncer de mama, perfazendo um total de 80% de todos os casos de câncer de mama. Nesta patologia, um câncer que se inicia nos ductos de leite é capaz de invadir e se espalhar pelos tecidos mamários circundantes (Fig. 02)

Inicialmente, é assintomático, sendo na maioria das vezes detectado por alterações na mamografia ou pelo aparecimento de um nódulo palpável no tecido mamário (breastcancer.org).

O segundo tipo mais comum de câncer de mama é o carcinoma lobular invasivo, que se origina nos lóbulos produtores de leite, podendo invadir e se espalhar pelos tecidos adjacentes, conforme demonstrado na figura 02. Perfaz um total de 10% dos casos de câncer de mama e tende a ocorrer em mulheres mais velhas do que aquelas acometidas pelo carcinoma ductal invasivo. Os carcinomas lobulares invasivos tendem a ser mais difíceis de visualizar em mamografias porque em vez de formar um nódulo, as células cancerosas se espalham para o tecido conjuntivo circundante (estroma mamário) e formam estruturas em linha (breastcancer.org).

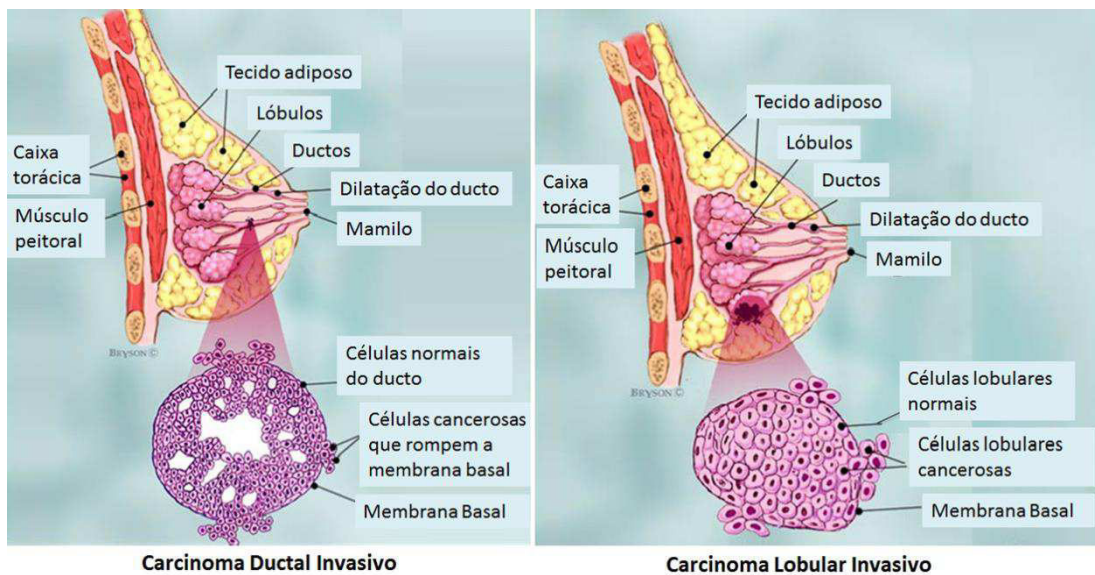


Figura 02: Desenho esquemático demonstrando o desenvolvimento dos carcinomas mamários ductal e lobular invasivos. (Adaptado de www.breastcancer.org).

A metástase, principal causa de morte em pacientes com câncer, ocorre quando as células tumorais deixam seus locais de origem e migram para locais adjacentes ou distantes. Em 1874, foi proposto por De Morgan que as células tumorais progrediam de forma linear, atingindo primeiramente os linfonodos e, posteriormente, locais distantes (revisto por COMEN, 2012). No entanto, foi

observado que mulheres, após mastectomia total, mesmo sem comprometimento dos linfonodos axilares, desenvolviam doença metastática. Assim, foi postulada a hipótese de que as células tumorais podem se propagar por via linfática e também pela circulação sistêmica (SHAPIRO e FUGMANN, 1957; FISHER, 1977). Mais recentemente, foi proposto o modelo de auto sementeira, acreditando-se que as células tumorais possuem a capacidade de migrar de um local para outro, podendo se estabelecer em locais próximos ao tumor primário, em locais distantes, bem como recolonizar o sítio do tumor primário (Fig. 03). Com esta hipótese, também foi afirmada a ideia de que tumores pequenos podem ser altamente metastáticos, bem como tumores de grande volume podem apresentar uma pequena capacidade metastática (NORTON e MASSAGUE, 2006). Sabe-se que tumores primários podem ser bastante heterogêneos e, desta forma, apresentar células cancerosas com diferentes capacidades de disseminação. Logo, um pequeno número de células com capacidade metastática podem ocasionar metástases significativas (LIU *et al.*, 2010). Além disso, dada à heterogeneidade do tumor, os clones de células tumorais podem se adaptar a diferentes ambientes, em diferentes órgãos (GERLINGER *et al.*, 2012). Também foi demonstrado que as células cancerosas podem apresentar assinaturas genéticas específicas, capazes de dirigi-las, especificamente, a determinados órgãos (MINN *et al.*, 2005).

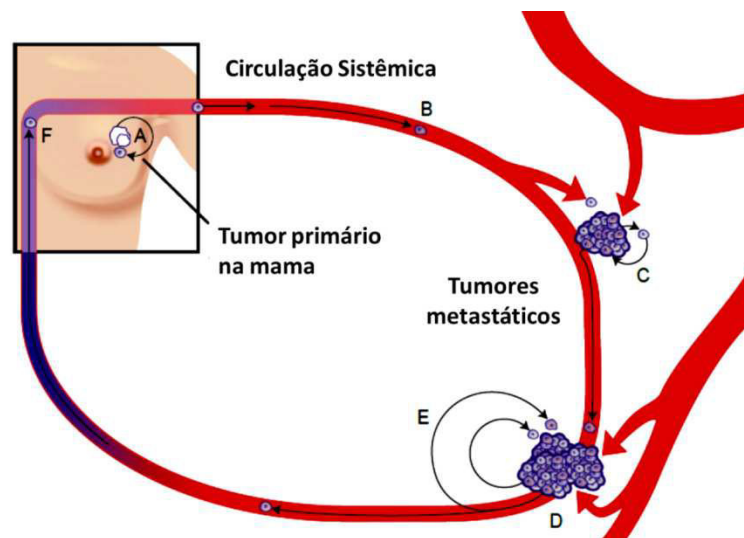


Figura 03: Representação esquemática do estabelecimento de metástases pela hipótese de auto sementeira. As células cancerosas deixam o tumor primário e podem circular de volta para o tumor primário (A) ou seguir através da circulação, como uma célula de tumoral circulante (B). As células tumorais circulantes podem se disseminar em locais distantes (C, D), proliferar no próprio tumor secundário (E), ou voltar ao sítio de tumor primário (F). (Adaptado de Comen, 2012).

É bem documentado que as células tumorais derivadas de carcinomas de mama, frequentemente, se disseminam por via hematológica e progridem preferencialmente no microambiente da medula óssea. A presença de células tumorais circulantes no sangue periférico ou disseminadas na medula óssea é de grande relevância clínica e representa um pior prognóstico (LIANIDOU *et al.*, 2010). Estima-se que 70% das pacientes desenvolvem metástases ósseas, mesmo após a completa remoção do tumor primário. As células tumorais aderem à superfície endosteal da medula óssea e colonizam o osso, utilizando de fatores que, além de estimularem o crescimento tumoral, alteram seus fenótipos tornando-as resistentes às respostas anti-tumorais (KAKONEN e MUNDY, 2003). As terapias atuais que incluem cirurgia, terapia hormonal, quimioterapia, radioterapia e outras combinações não são completamente eficazes para o tratamento de metástases de câncer de mama (ALI, HARVEY e LIPTON, 2003).

O estabelecimento de modelos experimentais que representem fielmente os processos metastáticos ósseos que ocorrem *in vivo* é o maior desafio para o estudo de metástases (TAO *et al.*, 2008). Modelos xenogênicos obtidos pela injeção de células tumorais humanas em camundongos imunocomprometidos são extensivamente utilizados para o estudo do crescimento tumoral, estabelecimento de metástases e validação de produtos gênicos específicos do tumor como possíveis alvos-terapêuticos. Entretanto, esses modelos não são capazes de estabelecer eficientemente esses processos e quando o fazem, são observadas diferentes propriedades metastáticas (BIBBY, 2004). Em contrapartida, modelos experimentais singênicos, que utilizam células tumorais murinas, estabelecem metástases mais eficientemente e apresentam características metastáticas similares àquelas observadas em humanos (HEPPNER, MILLER e SHEKHAR, 2000). Além disso, os modelos murinos singênicos permitem que toda a análise seja realizada em animais com funções imunológicas normais. Sabe-se que o sistema imunológico desempenha um papel importante no desenvolvimento e progressão de câncer e modelos que podem ser usados em animais imunocompetentes são essenciais para a análise da progressão e avaliação de terapias anti-tumorais.

Um modelo animal clinicamente relevante para geração de metástases espontâneas foi estabelecido em camundongos BALB/c. A linhagem celular de carcinoma de mama, denominada 4T1, derivada espontaneamente de um tumor mamário murino, ortotopicamente introduzida em camundongos BALB/c, é altamente

tumorigênica e invasiva, sendo capaz de originar metástases para os mesmos órgãos afetados pelo câncer de mama em humanos, incluindo osso, pulmão, fígado e cérebro (MILLER, 1983; LELEKAKIS, 1999). Além disso, o tumor primário pode ser removido cirurgicamente, e a doença metastática pode continuar a ser estudada, de forma semelhante à que ocorre na prática clínica com pacientes humanos. Em consequência da heterogeneidade desse carcinoma, várias linhagens parentais de 4T1 foram isoladas e caracterizadas e seguem vias divergentes de aquisição de fenótipos metastáticos, sendo que uma delas, a 67NR, permanece no sítio primário (LELEKAKIS, 1999).

Devido à alta capacidade de exibir metástases nos mesmos sítios afetados pelo câncer de mama humano, o modelo de carcinoma mamário murino 4T1 representa um sistema ideal para o estudo de metástases, regimes terapêuticos, investigações de bases moleculares, celulares e patológicas de câncer de mama em diversos órgãos e tecidos.

1.3 OBESIDADE E CÂNCER

Estima-se que 15 a 30% das mortes causadas por câncer nos Estados Unidos seja atribuída ao sobrepeso e obesidade (World Cancer Research/American Cancer Research, 2007).

Estudos epidemiológicos indicam que o consumo de dieta rica em gordura, independente do tipo de gordura, pode levar ao aumento do risco de desenvolvimento de câncer de mama invasivo em mulheres na pós-menopausa. Sabe-se também que um elevado IMC está associado ao pior prognóstico de câncer de mama (WHITEMAN *et al.*, 2005; THIEBAUT *et al.*, 2007; DAWOOD *et al.*, 2008).

Os mecanismos que vinculam a obesidade e desenvolvimento de câncer incluem resistência à insulina, hiperinsulinemia crônica, maior biodisponibilidade de hormônios esteróides, inflamação local e secreção de adipocinas pelo tecido adiposo (CALLE, 2007).

Além de apresentarem níveis alterados de moléculas inflamatórias, indivíduos obesos apresentam também elevadas concentrações do Fator de Crescimento Vascular e Endotelial (VEGF, do inglês “vascular endothelial growth factor”), do Inibidor do Ativador de Plasminogênio -1 (PAI-1, do inglês “plasminogen activator inhibitor-1”) e do Fator de Crescimento Semelhante a Insulina -1 (IGF-1, do inglês “insulin-like growth factor 1”) que estão diretamente relacionados a expansão de tumores (HURSTING e BERGER, 2010). Estudos clínicos e *in vitro* também demonstraram que a leptina, presente em altas concentrações em obesos, está relacionada ao desenvolvimento de câncer, dentre eles, câncer de mama (GARCIA-ROBLES, SEGURA-ORTEGA e FAFUTIS-MORIS, 2013).

Sabe-se que o aumento dos níveis de leptina, TNF- α e insulina levam ao aumento da produção de IL-6 pelos adipócitos. Por sua vez, a ativação da IL-6 está relacionada à transcrição de proteínas sinalizadoras ligadas a proliferação, sobrevivência e invasão de células tumorais (LYSAGHT *et al.*, 2011). Ao investigar o papel do TNF- α e da hiperinsulinemia no desenvolvimento de câncer de colo retal em animais obesos, demonstrou-se que esses animais possuíam um infiltrado inflamatório no cólon, rico em macrófagos e leucócitos, associados a danos nas células epiteliais. Os animais obesos também apresentaram tumores mais proeminentes e associou-se isso a altos níveis de TNF- α , podendo esta citocina estar diretamente relacionada ao crescimento de tumores de cólon em animais obesos (FLORES *et al.*, 2011).

James e colaboradores, em 2012, ao avaliar camundongos obesos induzidos por dieta e portadores de carcinoma de células renais em modelo ortotópico, observou que os animais obesos apresentaram aumento do infiltrado local de células T e crescimento precoce do tumor quando comparados aos animais magros. Além disso, a ativação e a funcionalidade das células dendríticas dos animais obesos foi prejudicada, sugerindo que a obesidade pode diminuir a eficácia de imunoterapias baseadas no uso de células dendríticas.

Um alto percentual de tecido adiposo visceral está relacionado à menor concentração de testosterona e a maior agressividade de tumores de próstata. Ao avaliar pacientes chineses submetidos à prostatectomia total, Qu e colaboradores, em 2013, observaram que, embora o IMC não estivesse relacionado a um pior prognóstico da patologia, o percentual mais elevado de tecido adiposo visceral foi preditivo de um maior escore patológico do tumor de próstata, bem como de maiores

probabilidades de extravasamento da cápsula prostática e de invasão da vesícula seminal. Com isso, sugeriram que a distribuição da gordura abdominal está associada a um alto risco de desenvolvimento de câncer de próstata.

A obesidade também está relacionada com o desenvolvimento de tumores de mama. Sabe-se que o tecido mamário adulto é composto, em grande parte, por adipócitos, a principal célula do tecido adiposo, e o número desses adipócitos pode ultrapassar o número de células epiteliais (LIN e POLLARD, 2007). Além disso, é bem documentado que em indivíduos obesos, ocorre diminuição da maturação de pré-adipócitos em adipócitos e alteração do balanço entre leptina e adiponectina (VONA-DAVIS e ROSE, 2009; SIMONS *et al.*, 2010). As citocinas secretadas pelos pré-adipócitos atraem monócitos e altas concentrações locais de leptina promovem a conversão de monócitos em macrófagos, que contribuem para a produção local de citocinas pró-inflamatórias e fatores pró-angiogênicos (VONA-DAVIS e ROSE, 2009). Estes mecanismos, além de bloquearem a maturação de pré-adipócitos em adipócitos, dão origem a um microambiente favorável ao crescimento de tumores (CAMPBELL *et al.*, 2010; ZEYDA *et al.*, 2010).

Os altos níveis de ácidos graxos livres, observados em indivíduos obesos, também podem estimular a produção de citocinas pelos pré-adipócitos. Foi demonstrado que os ácidos graxos livres ativam a sinalização de receptores Toll-like 4 (TLR4) e aumentam a secreção de IL-6, CCL2, CCL5 e CCL11, o que também prejudica a diferenciação dos pré-adipócitos (POULAIN-GODEFROY e FROGUEL, 2007). Várias dessas citocinas, especialmente CCL2 e CCL5, suprimem a imunidade antitumoral mediada por células T (SORIA e BEM-BARUCH, 2008).

Em 2011, foi demonstrado por Subbaramaih e colaboradores, usando modelos genéticos de obesidade e também em modelos de obesidade induzida por dieta, aumento das coroas de macrófagos ao redor de adipócitos na glândula mamária de camundongos obesos. Estes animais também apresentaram altos níveis de mediadores pró-inflamatórios e do fator nuclear κ B (NF - κ B) induzindo o aumento de aromatase. A indução da aromatase aumentaria a produção local de estrogênio e este fato favoreceria o crescimento de tumores de mama sensíveis ao estrogênio.

Ao avaliar a influência de uma dieta hipercalórica na progressão do tumor de mama humano que apresenta o receptor de estrogênio (ER-positivo), Lamas e colaboradores, em 2013, observaram maior crescimento do tumor, um aumento da expressão de Ki67, acompanhado de diminuição da clivagem de caspase-3 e menor

expressão dos receptores de estrogênio β (ER- β) e de progesterona, além de menor citotoxicidade de células “natural killer” (NK) no baço dos animais alimentados pela dieta hipercalórica. Sugeriram então que uma dieta hipercalórica, mesmo sem aumento do peso corporal, pode aumentar a proliferação deste tumor e reduzir a apoptose do mesmo.

Llaverias e colaboradores, em 2011, examinaram o papel do colesterol na regulação e na progressão de tumor mamário em um modelo de camundongo transgênico. Sugeriram que o colesterol acelera a formação de tumores e aumenta a angiogênese, dando maior agressividade a esses tumores.

Kim e colaboradores, em 2011, demonstraram que o consumo prolongado de uma dieta rica em gordura tem pouco efeito sobre o consumo energético e o peso corporal de camundongos BALB/c, mas leva ao aumento do crescimento do tumor e de metástases pulmonares, além de maior mortalidade quando esses animais receberam células de carcinoma mamário 4T1. Esses animais também apresentaram maior infiltrado de macrófagos no tecido adiposo e níveis séricos de leptina mais elevados.

Sabe-se que as metaloproteinases de matriz (MMP) modulam a invasão tecidual das células tumorais e promovem a metástase. Todo o microambiente inflamatório, ocasionado pela obesidade, e a grande produção de citocinas, tais como IL-1, IL-5, IL-6, IL-17 nesse microambiente, favorecem a ativação de MMP-2, MMP-9 e MMP-11. Em conjunto, estes fatores favorecem um pior prognóstico do carcinoma mamário e podem promover a metástase (EIRÓ *et al.*, 2013; SIMPSON e BROWN, 2013).

Diante destas constatações, é evidente que há uma relação íntima entre obesidade, alterações metabólicas e imunológicas e o desenvolvimento de tumores. No entanto, muitos estudos ainda são necessários para se entender essa relação. Assim, considerando-se o progressivo crescimento de quadros de obesidade em todo o mundo, as elevadas taxas de mortalidade e morbidade associadas a esta doença e os impactos que causa no sistema imunológico, estudos que avaliem o desenvolvimento de tumores e o papel do imunometabolismo nesta progressão são extremamente relevantes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o impacto da obesidade no estabelecimento do tumor de mama e metástases em animais que receberam a linhagem de célula tumoral 4T1.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o tempo de dieta mais adequado para indução de obesidade em camundongos BALB/c fêmeas;
- Avaliar o perfil bioquímico desses camundongos ao longo das semanas de dieta, bem como o acúmulo de tecido adiposo nas regiões retroperitoneais e perigonadais, além da concentração de leptina no soro;
- Avaliar o crescimento tumoral e metástases através de medidas de peso e volume do tumor e ensaios clonogênicos;
- Avaliar a concentração das citocinas TNF- α e IL-6 na medula óssea do íliaco dos animais dos diferentes grupos experimentais, bem como a concentração de leptina no meio condicionado de gordura.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos BALB/c, fêmeas, com idade entre 4 e 6 semanas e peso entre 18 e 20g, obtidos da colônia do Biotério de Centro de Biologia da Reprodução, da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Os animais foram acondicionados em gaiolas de polipropileno, cobertas com cama de maravalha, dotadas de cocho para ração e local para mamadeira com água filtrada. Cada gaiola, medindo 30x20x13 cm, continha cinco animais e foi mantida em armários climatizados (ALESCO), localizados em alojamento com ciclo de fotoperíodo de 12h claro/12h escuro, controlado automaticamente, durante todo o procedimento experimental.

O protocolo experimental do presente trabalho foi submetido à Comissão de Ética no Uso dos Animais da Universidade Federal de Juiz de Fora, recebendo aprovação, certificada no Protocolo de nº 039/2012 – CEUA.

3.2 DIETA E INDUÇÃO DO MODELO DE OBESIDADE

Para realização destes experimentos, os animais designados como controles foram alimentados com a ração comercial padrão (Nuvilab), na qual 10% das quilocalorias (kcal) eram advindas de lipídeos, 20% de proteínas e 70% de carboidratos. Já os animais designados como obesos receberam uma dieta rica em gordura (HFD, do inglês “high fat diet”), onde 20% das quilocalorias eram obtidas a partir de carboidratos, 20% de proteínas e 60% de lipídeos, totalizando 35,2% de lipídeos na composição.

A ração HFD foi produzida em nosso laboratório. Para tal, cada ingrediente foi cuidadosamente pesado e homogeneizado com o auxílio de um multiprocessador (PHILLIPS/WALITA). A massa originada foi acondicionada em recipientes plásticos e mantida congelada (-20°C) até o momento de distribuição nas gaiolas, por um prazo máximo de dois meses. Os ingredientes para o preparo dessa ração foram adquiridos da empresa PRAGSOLUÇÕES Biotecnologia e a composição está descrita na tabela 01.

Tabela 01: Componentes da ração rica em gordura (HFD)

Ingrediente	Peso (g)
Caseína	200,0
Sacarose	100,0
Amido de milho	115,5
Amido Dextrinizado	132,0
Banha	312,0
Óleo de soja	40,0
Celulose	50,0
Mistura de minerais AIN-93	35,0
Mistura de vitaminas AIN-93	10,0
L- Cistina	3,0
Bitartarato de Colina	2,5

3.3 CULTURA DE CÉLULAS DA LINHAGEM 4T1

A linhagem de tumor mamário murino 4T1 nos foi gentilmente cedida pela Dra. Adriana Bonomo, da Universidade Federal do Rio de Janeiro. As células foram cultivadas em Meio Modificado de Dulbecco's (DMEM, do inglês "Dulbecco's Modified Eagle's Medium") com 4500mg/L de glicose (DMEM high glucose –

SIGMA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de L-Glutamina (GIBCO) e 1% de antibiótico (100 unidades/ mL de penicilina e 100 ug/mL de estreptomicina – GIBCO) a 37°C e 5% de CO₂.

Após atingirem cerca de 80% de confluência, as células foram lavadas com tampão salino fosfato (PBS) 0,15M, pH 7,4 (2,8 mM Na₂PO₄; 7,2 mM Na₂HPO₄; 0,14M NaCl). Em seguida, foram incubadas com solução de Tripsina - EDTA 0,25% (GIBCO), durante 5 min., a 37°C. Após a incubação, a suspensão celular foi centrifugada a 1500rpm, durante 5 min., a 4°C. Para verificação da viabilidade celular, depois de ressuspendidas em DMEM, foram diluídas em Azul de Tripán 0,2% e contadas em Câmara de Neubauer.

3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para avaliarmos o impacto da obesidade sobre o crescimento do tumor mamário e metástases, utilizamos o modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica. Todo o estudo consistiu de quatro grandes experimentos, conforme demonstrado no fluxograma a seguir (Fig. 04).

Primeiramente, foi caracterizado o modelo de obesidade. Para isso, os animais foram pesados semanalmente e tiveram o consumo de ração controlado. Foram realizadas eutanásias após 6, 8, 12 e 16 semanas de dieta para as seguintes análises: (i) glicemia de jejum e tolerância à glicose; (ii) quantificação das gorduras retroperitoneal e perigonadal; (iii) dosagens de colesterol total e triglicérides no soro dos animais acompanhados durante 6, 12 e 16 semanas de dieta, bem como a dosagem de leptina.

No segundo experimento, os animais receberam dieta hiperlipídica ou controle durante 6 ou 16 semanas. Ao fim do período de dieta, foram inoculados com 5×10^4 células tumorais da linhagem 4T1, concentração previamente definida por Kim e colaboradores (2011), e acompanhados durante 50 dias para análise do percentual de sobrevida e do volume tumoral.

Em um terceiro experimento, após serem acompanhados durante 6 ou 16 semanas de dieta, os animais receberam as células tumorais e foram eutanasiados

após 14, 17, 24 e 30 dias da injeção para as seguintes análises: (i) quantificação do peso do tumoral e da gordura perigonadal; (ii) avaliação de metástases através de ensaio clonogênico metastático da medula óssea do íliaco e dos linfonodos drenantes do tumor.

No quarto experimento, os animais, após 6 ou 16 semanas de dieta, foram divididos nos grupos: controle sem tumor (CTR ST), obeso sem tumor (OB ST), controle com tumor (CTR 4T1) e obeso com tumor (OB 4T1). As eutanásias ocorreram no dia 14 após a injeção do tumor e no dia 35 a fim de analisar a concentração das citocinas TNF- α e IL-6 a partir de cultura de células da medula óssea do íliaco, bem como a concentração de leptina no meio condicionado de tecido adiposo dos animais alimentados por 16 semanas.

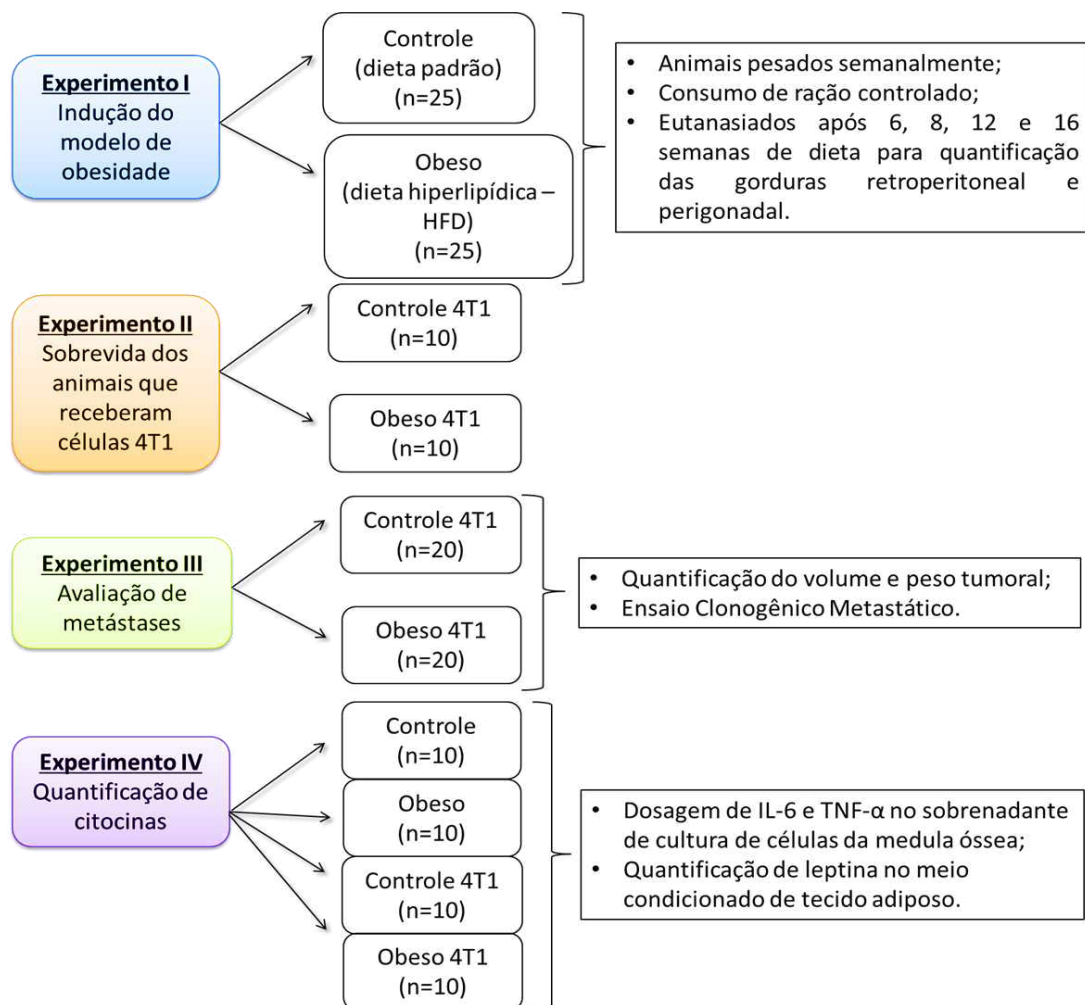


Figura 04: Representação esquemática do delineamento experimental.

Para que pudéssemos acompanhar os animais durante todos os procedimentos experimentais, estes foram devidamente identificados através de marcação na orelha. A representação esquemática desta identificação pode ser observada na figura 05.

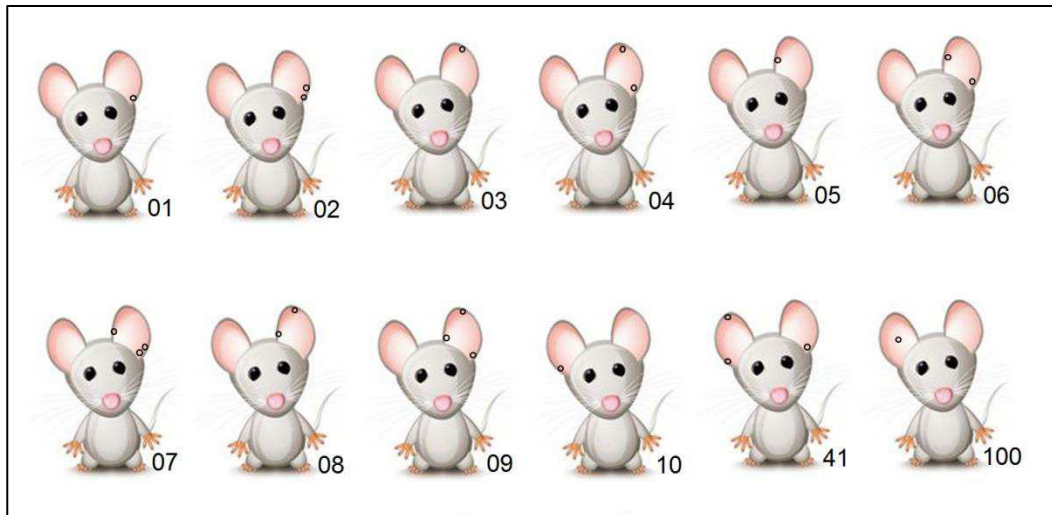


Figura 05: Desenho esquemático representando a marcação de orelha usada para identificação dos animais.

3.5 EUTANÁSIAS

As eutanásias foram realizadas por aprofundamento da anestesia utilizando Quetamina (100mg/kg) e um relaxante muscular, a Xilazina (10mg/kg), por via intraperitoneal, seguidas de exsanguinação por punção cardíaca.

3.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

3.6.1 Glicemia

Para quantificação da glicemia, os animais foram mantidos em jejum por 10h e ao final desse período, uma pequena amostra de sangue foi recolhida da veia da cauda e a glicemia de jejum quantificada com o auxílio de um glicosímetro (ACCU-CHECK Performa). Em seguida, os animais receberam, por via intraperitoneal, 2g/kg de peso corporal de solução de glicose, na concentração de 100mg/mL para realizarmos o teste de tolerância à glicose (TTG). A glicemia foi novamente quantificada após 60 minutos.

3.6.2 Colesterol e Triglicérides

O sangue periférico foi recolhido após a eutanásia dos animais e armazenado em tubos do tipo Eppendorfs, a temperatura ambiente, até a retração do coágulo. Em seguida, o material foi armazenado em geladeira até o momento da centrifugação. As amostras foram então centrifugadas a 14000 rpm, por 3 minutos. Os soros foram cuidadosamente aspirados, transferidos para tubos limpos, previamente identificados, e armazenados em freezer a -80°C até o momento do processamento.

Para quantificação de colesterol total e triglicérides, as amostras foram enviadas ao Laboratório de Análise Hematológica e Bioquímica do Centro de Biologia da Reprodução, da Universidade Federal de Juiz de Fora. As dosagens foram realizadas através de método colorimétrico enzimático, utilizando kits comerciais Labtest. As leituras foram realizadas através do aparelho Labmax Progress®.

3.7 QUANTIFICAÇÃO DE LEPTINA

A concentração de leptina no soro e no meio condicionado de gordura (obtido como descrito no item 3.11) foi determinada por ELISA (R&D Systems), seguindo as recomendações apresentadas no protocolo do fabricante.

A leitura da densidade ótica foi realizada em leitor de microplacas (SPECTRAMAX 190, Molecular Devices) a 450 nm.

Os cálculos das concentrações obtidas foram realizados a partir da curva padrão, obtida das diferentes concentrações do anticorpo recombinante.

3.8 INDUÇÃO DO MODELO DE CÂNCER DE MAMA ORTOTÓPICO *IN VIVO*

Após seis ou dezesseis semanas do início da dieta, os animais receberam 5×10^4 células 4T1 (Kim *et al.*, 2011), num volume total de 100uL, injetadas no tecido subcutâneo, na região da primeira glândula mamária inguinal direita (Fig. 06). No experimento em que se fez necessário a existência de grupos controle e obesos sem tumor, os animais receberam solução fisiológica 0,9%, injetada na mesma região e em igual volume dos animais que receberam as células tumorais.

Todos os animais continuaram sendo alimentados com as respectivas dietas até o momento da eutanásia.

3.9 QUANTIFICAÇÃO DO VOLUME DO TUMOR

O volume tumoral foi mensurado com o auxílio de um paquímetro após 14, 17, 24 e 30 dias da indução e calculado de acordo com a fórmula: diâmetro maior x (diâmetro menor)² x 0,52 (KIM *et al.*, 2011).

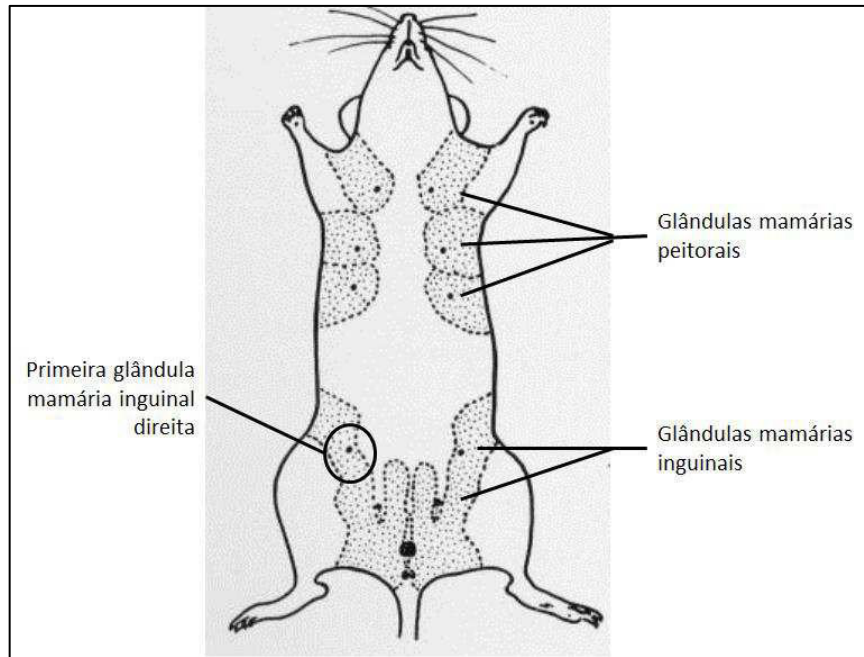


Figura 06: Desenho esquemático demonstrando a localização anatômica das glândulas mamárias e o local de injeção das células tumorais. (Adaptado de Murphy E.D., chapter 27 Characteristic Tumors, in E.L. Green Ed., "Biology of the Laboratory Mouse").

3.10 ENSAIO CLONOGÊNICO METASTÁTICO

Para realização deste ensaio, foram utilizadas células dos linfonodos periféricos drenantes do tumor e células da medula óssea do íliaco.

Os linfonodos foram removidos e macerados sob um pedaço de tecido de algodão (Trama 40 – Voil) em meio DMEM suplementado com 10% de SFB.

Os ossos íliacos foram recolhidos e incubados por 1h, a 37°C, em meio DMEM, suplementado com 10% de SFB, 0,5mg/mL de colagenase tipo I (SIGMA-ALDRICH) e 100ug/mL de DNase (SIGMA-ALDRICH). Ao término da incubação, os ossos foram macerados com o auxílio de cadinho e pistilo e o produto da maceração foi filtrado em filtro do tipo “cell strainer” de 40um.

As suspensões celulares foram centrifugadas a 1500rpm, a 4°C, por 5 minutos. Em seguida, os “pellets” foram ressuspensos e as células contadas em

Câmara de Neubauer, diluídas em Azul de Tripán 0,2% para avaliação da viabilidade celular.

Em placas de cultura de 6 poços, foram plaqueadas 10^6 células/mL. A partir dessa diluição, diluições seriadas foram realizadas até que se atingisse a concentração mínima de 10 células/mL. A cultura foi mantida a 37°C e 5% de CO₂ por 14 dias. Ao término desse período, os sobrenadantes foram descartados, as placas lavadas com PBS, fixadas com Metanol e coradas com Azul de Metileno 1%. Os aglomerados de células tumorais, corados em azul, puderam então ser quantificados.

3.11 MEIO CONDICIONADO DE GORDURA

Para produção do meio condicionado de gordura, a gordura perigonadal foi removida e colocada em cultura em meio DMEM não suplementado com SFB, na proporção de 1g/mL. A cultura foi mantida a 37°C e 5% de CO₂ por 24h. Ao final deste período, o sobrenadante foi recolhido, aliqotado e mantido a -80°C até sua utilização.

A título de ilustração, a localização anatômica das gorduras retroperitoneal e perigonadal pode ser observada na figura abaixo (Fig. 07).

3.12 CULTURA DE CÉLULAS ESTIMULADAS COM ANTI-CD3

As células da medula óssea foram obtidas do osso ilíaco após incubação por 1h, a 37°C, em meio DMEM, suplementado com 10% de SFB, 0,5mg/mL de collagenase tipo I (SIGMA- ALDRICH) e 100ug/mL de DNase (SIGMA- ALDRICH) e maceração com o auxílio de cadinho e pistilo. Em seguida, suspensão celular obtida foi centrifugada a 1500rpm, 4°C, por 5 minutos. Os “pellets” foram ressuspensos e

contados em Câmara de Neubauer, excluindo-se as células inviáveis com a utilização de Azul de Tripán 0,2%.

Uma concentração de 10^7 células/mL foi colocada em cultura, em placas de 96 poços, por 72h. Para essa cultura foi utilizado DMEM suplementado com 10% de SFB e acrescido de 1ug/mL de anti-CD3. Ao final do período de cultura, as placas foram centrifugas a 1500rpm, 4°C, por 5 minutos. Os sobrenadantes foram recolhidos, aliquotados e armazenados a -80°C.

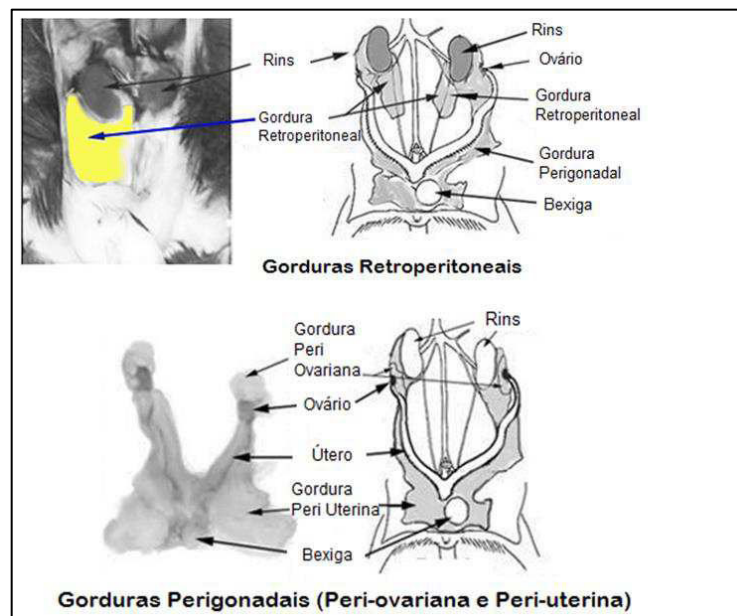


Figura 07: Desenho esquemático demonstrando a localização anatômica das gorduras retroperitoneais e perigonadais. (Adaptado de “The Anatomy of the Laboratory Animals” – A Anatomia de Animais de Laboratório de Margareth J. Cook, 1965)

3.13 DOSAGEM DE CITOCINAS

A concentração de citocinas no sobrenadante de cultura de células da medula óssea foi determinada por ELISA. Foram utilizados kits comerciais (R&D Systems)

das citocinas TNF- α e IL-6. Os ensaios foram realizados em duplicatas, seguindo as recomendações dos protocolos do fabricante.

A leitura da densidade ótica foi realizada em leitor de microplacas (SPECTRAMAX 190, Molecular Devices), a 450nm.

A quantificação das citocinas foi calculada a partir das curvas padrão, obtidas das diferentes concentrações dos respectivos recombinantes (TNF- α e IL-6).

3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A confecção dos gráficos e as análises estatísticas foram realizadas através do programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software). Foram utilizadas análises de variância (ANOVA) de um fator, seguidas de pós-teste de Bonferroni. As médias foram consideradas diferentes quando a probabilidade de serem iguais foi menor que 5% ($p \leq 0,05$), de acordo com os testes indicados.

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DO MODELO DE OBESIDADE

Para determinar qual seria o melhor tempo de dieta capaz de induzir ganho de peso corporal compatível com o quadro de obesidade, em camundongos BALB/c fêmeas, os animais foram alimentados com a dieta controle ou com HFD por 16 semanas e pesados semanalmente ao longo desse período. O consumo de ração também foi controlado.

Foi observado aumento significativo de peso dos animais alimentados pela dieta HFD, designados como obesos, a partir da segunda semana de dieta, conforme demonstrado na figura 08a. Durante todo o período, o consumo de ração dos animais obesos foi menor que o dos animais controle (Fig. 08b), indicando que o ganho de peso se deve a ingestão de uma dieta rica em lipídeos e não a hiperfagia.

Houve também aumento das gorduras retroperitoneal e perigonadal nos animais obesos em relação aos controles a partir de 12 semanas de dieta. (Fig. 09).

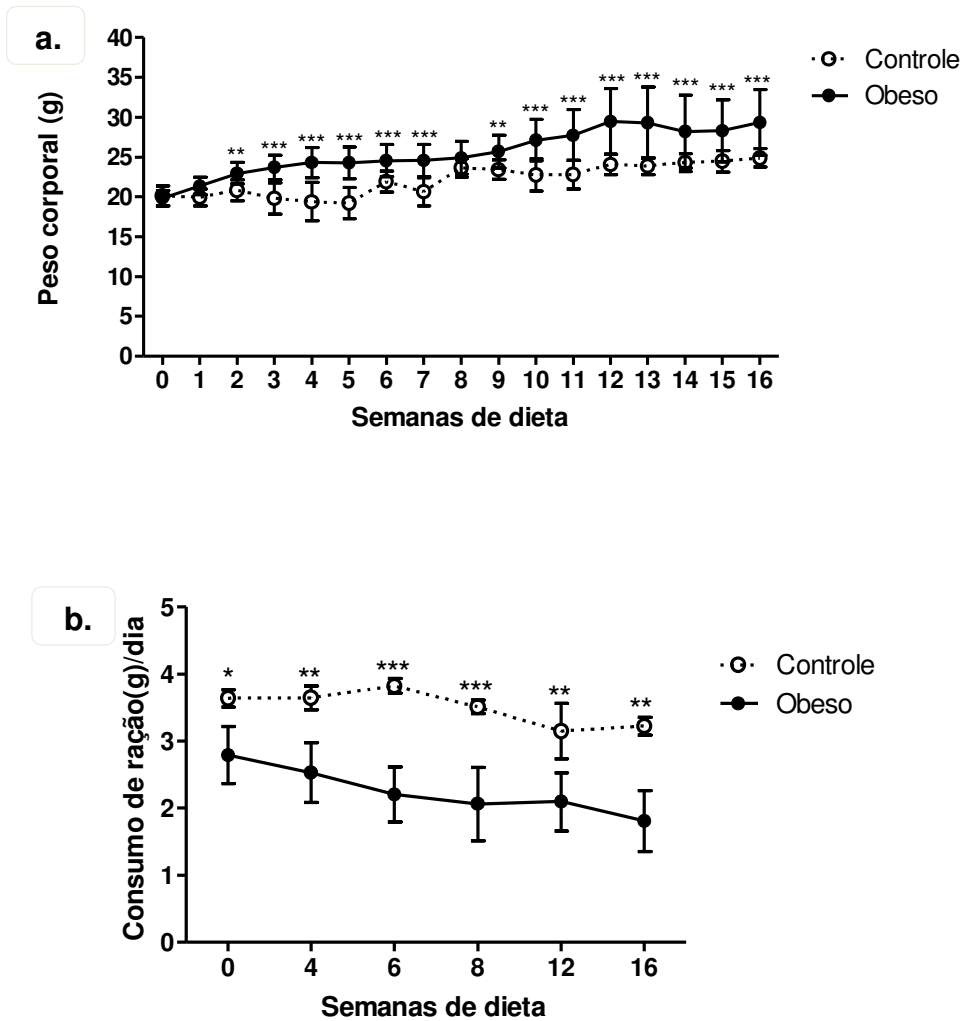


Figura 08: Animais obesos apresentam aumento do peso corporal sem aumentar o consumo de ração. **a.** Ganho de peso corporal ao longo de dezesseis semanas de dieta. **b.** Consumo médio diário de ração por animal ao longo de dezesseis semanas de dieta. Cada ponto representa a média \pm o desvio padrão (SD, do inglês “standard deviation”). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; significativamente diferente do grupo controle ($n=25$).

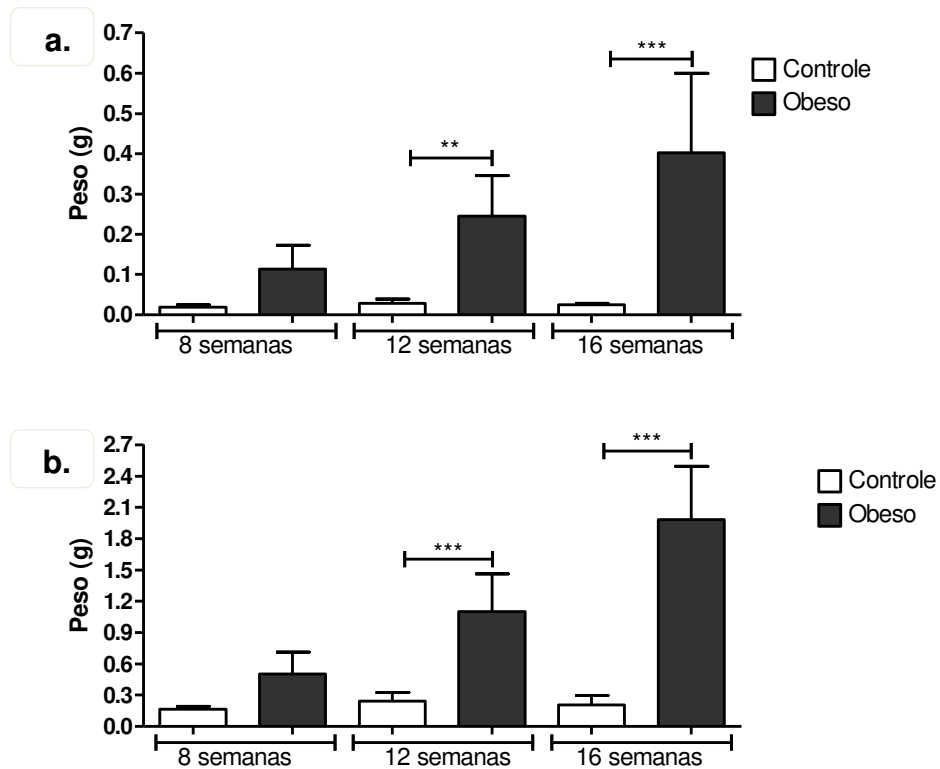


Figura 09: Aumento do peso das gorduras retroperitoneal (a.) e perigonadal (b.) ao longo de dezesseis semanas de dieta nos animais obesos. Cada barra representa a média \pm SD. ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; significativamente diferente do grupo controle (n=5).

Os animais submetidos ou não a dieta também passaram por caracterização do perfil bioquímico.

Sabendo que a obesidade e o diabetes tipo 2 são doenças fortemente relacionadas, foi avaliado o índice glicêmico, analisando a glicemia de jejum e a tolerância a glicose, através de TTG. Foi constatado um aumento da glicemia dos animais obesos após receberem glicose a partir de 6 semanas de dieta (Fig. 10). Este é um indício de menor tolerância à glicose no grupo obeso, podendo indicar uma alteração metabólica ao nível resistência à insulina. Inoue *et al.*, em 2012, encontraram resultados semelhantes ao avaliar camundongos C57BL/6 alimentados com HFD por 12 semanas.

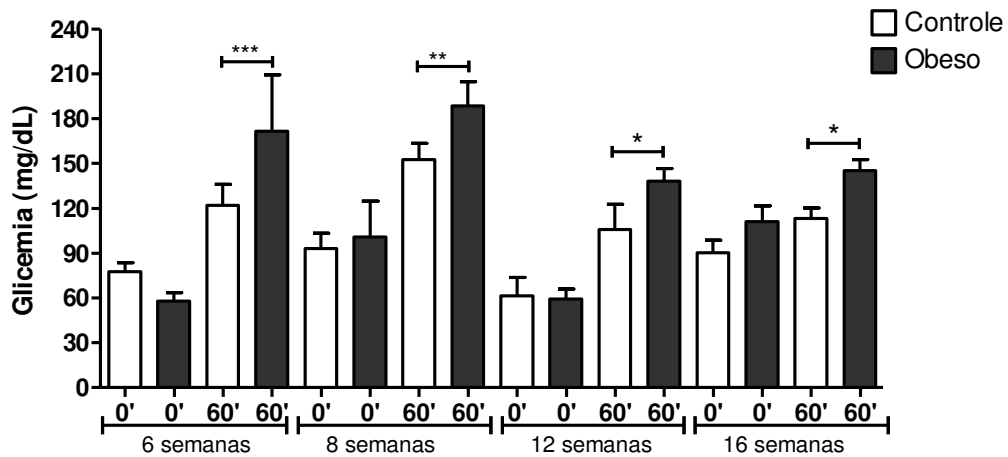


Figura 10: Diminuição da tolerância à glicose, com aumento da glicemia de animais obesos. A glicemia foi quantificada em jejum (0') e após 60 minutos do início do TTG (60'). Cada barra representa a média \pm SD. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; significativamente diferente do grupo controle (n=5).

A leptina, um dos principais hormônios associados à obesidade, também foi quantificada. Conforme demonstrado na figura 11, a partir de 12 semanas de dieta, os animais obesos já apresentavam níveis significativamente maiores de leptina no soro, e após 16 semanas, a diferença nos níveis de leptina entre animais obesos e controle era acentuadamente maior.

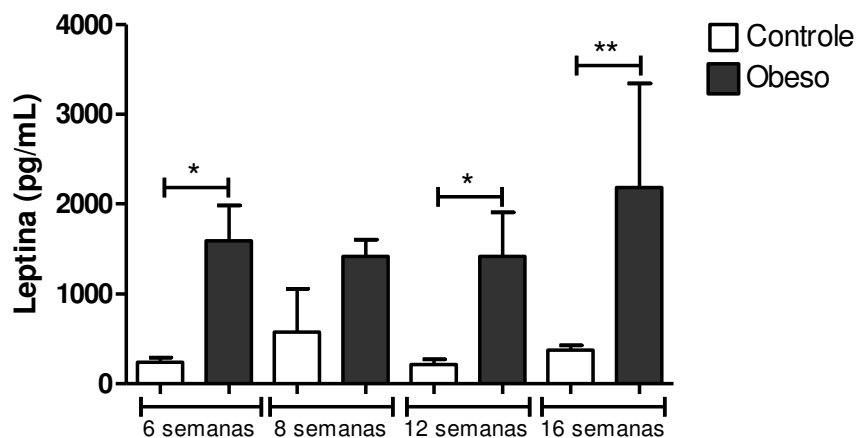


Figura 11: Aumento da concentração de leptina no soro de animais obesos. Cada barra representa a média \pm SD. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; significativamente diferente do grupo controle (n=5).

Os níveis de colesterol total e triglicérides também foram avaliados, visto que há uma forte correlação entre obesidade e hiperlipidemia. Observou-se aumento do colesterol total dos animais que receberam a dieta rica em lipídeos após 6, 12 e 16 semanas de dieta (Fig. 12). No entanto, os níveis de triglicérides foram semelhantes entre os animais alimentados pela dieta padrão e hiperlipídica (Fig.13). O aumento dos níveis de colesterol total e triglicérides foram observados por Inoue e colaboradores, em 2012.

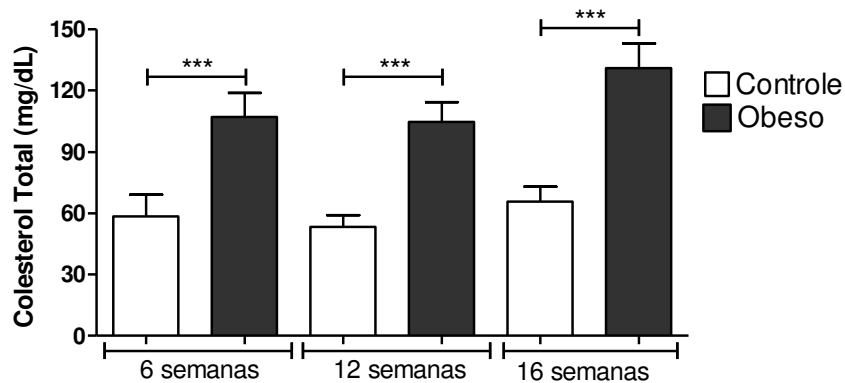


Figura 12: Aumento dos níveis de colesterol total nos animais alimentados pela HFD. Cada barra representa a média \pm SD. *** $p \leq 0,001$; significativamente diferente do grupo controle (n=5).

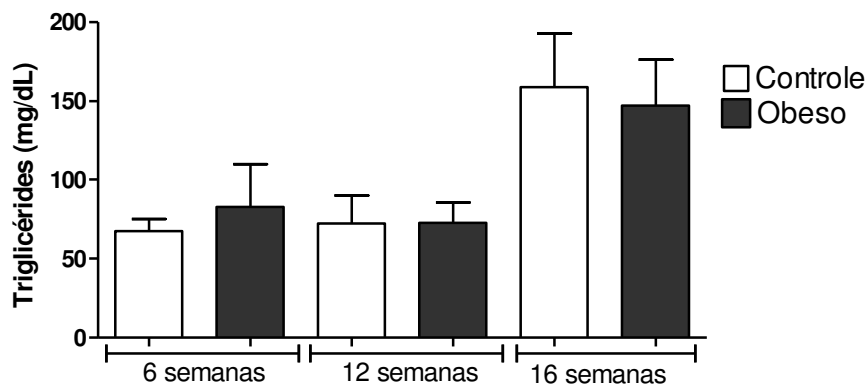


Figura 13: Níveis de triglicérides não foram alterados pela ingestão da HFD. Cada barra representa a média \pm SD. (n=5).

Diante dos resultados obtidos até o momento, sugerimos que nossos animais alimentados com uma dieta rica em lipídeos por 16 semanas desenvolveram um quadro característico de obesidade, com aumento do peso corporal, das gorduras retroperitoneal perigonadal, bem como alterações significativas em importantes parâmetros bioquímicos associados à obesidade, podendo apresentar alterações metabólicas características dessa doença. No entanto, para que pudéssemos avaliar os possíveis efeitos da idade sobre a resposta imunológica ao tumor, animais alimentados por 6 semanas de dieta foram também analisados.

4.2 INFLUÊNCIA DA HFD NA SOBREVIDA, NO CRESCIMENTO TUMORAL E NO DESENVOLVIMENTO DE METÁSTASES

A disfunção metabólica característica da obesidade leva a um estado inflamatório crônico nos indivíduos obesos. É bem documentado que este microambiente inflamatório, rico em citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento e diversas células do sistema imunológico torna-se um ambiente propício ao desenvolvimento de tumores (GILBERT e SLINGERLAND, 2012). Assim, foi primeiramente avaliada a influência do consumo da HFD sobre a sobrevivência destes animais, o crescimento tumoral e o estabelecimento de metástases tumorais.

Os animais dos grupos controle e obeso receberam as respectivas dietas por 6 ou 16 semanas e ao final foram inoculados com 5×10^4 células 4T1, num volume total de 100ul, por via subcutânea, na região da primeira glândula mamária inguinal direita. Estes animais tiveram o peso corporal quantificado semanalmente, bem como o consumo de ração, durante todo o período experimental. Já a partir da segunda semana de dieta, houve um aumento do peso corporal (Fig. 14a. e 14c.). O consumo de ração dos animais obesos foi menor que o dos controles em todo o período (Fig.14b. e 14d). Após 6 semanas da injeção do tumor, os animais obesos alimentados por 16 semanas, apresentaram diminuição do peso corporal, não associada a uma menor ingestão de ração, conforme demonstrado na figura 14.

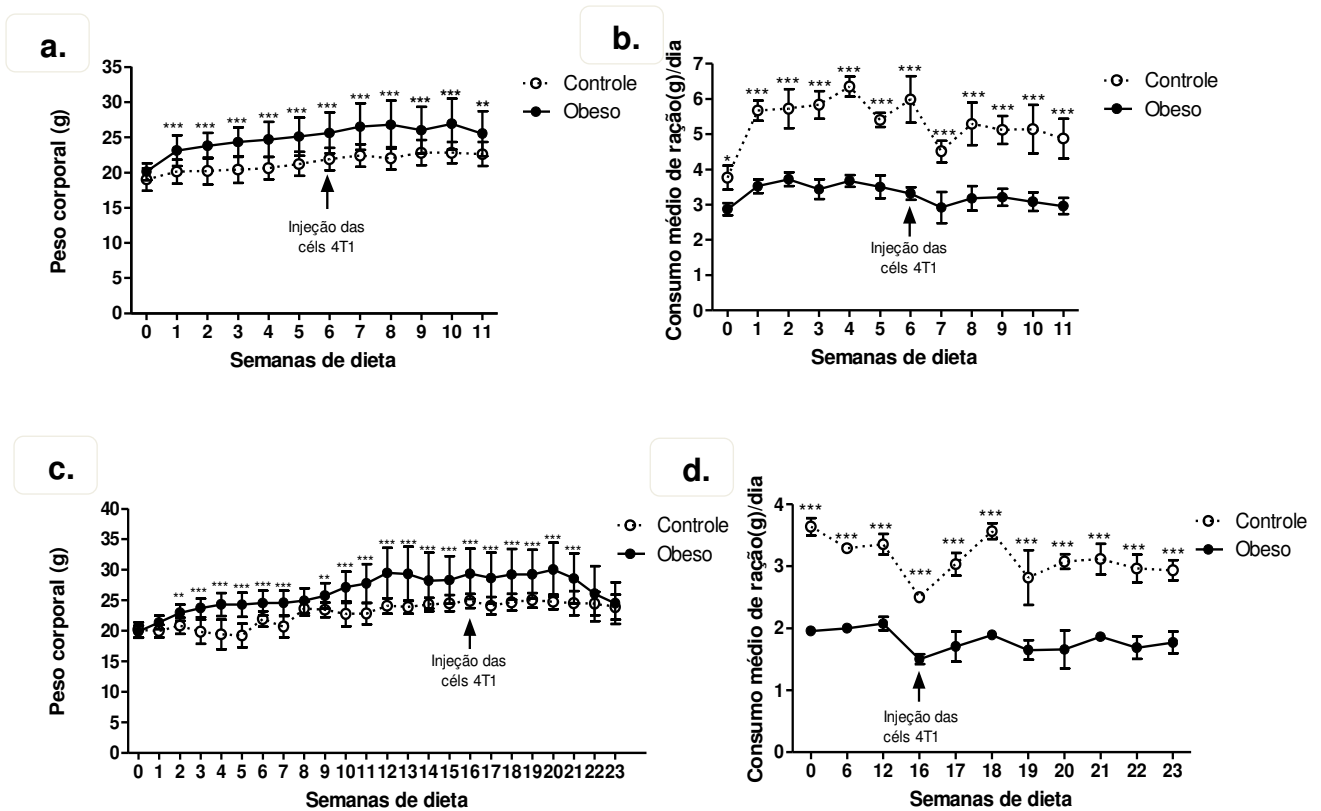


Figura 14: Animais alimentados pela HFD durante 16 semanas apresentam diminuição do peso corporal após a injeção do tumor. **a.** Peso corporal (g) dos animais alimentados durante 6 semanas. **b.** Consumo de ração (g/dia) dos animais alimentados por 6 semanas. **c.** Peso corporal (g) dos animais acompanhados durante 16 semanas de dieta. **d.** Consumo de ração (g/dia) dos animais acompanhados durante 16 semanas de dieta. Cada ponto representa a média \pm SD. ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; significativamente diferente do grupo controle ($n=20$).

Ao avaliarmos a sobrevida dos animais controles e obesos, alimentados durante 6 semanas de dieta, após receberem as células tumorais, observamos menor percentual de sobrevivência dos animais controles em torno de 40 dias após a injeção do tumor (Fig. 15a.). No entanto, a sobrevida dos animais obesos alimentados durante 16 semanas de dieta foi menor que a dos animais controles, embora não tenham sido observadas diferenças significativas (Fig. 15b.). Aos 44 dias após a injeção do tumor, 33% dos animais controles ainda sobreviviam, contra 22% de obesos. Aos 55 dias, a sobrevida de controles era de 22%, enquanto que a de obesos era de apenas 11%. Essa menor sobrevida dos animais obesos, alimentados por um longo período com uma dieta rica em lipídeos, pode estar associada a um pior prognóstico tumoral, com aumento de metástases, favorecido pelo estado inflamatório gerado pelo acúmulo de tecido adiposo.

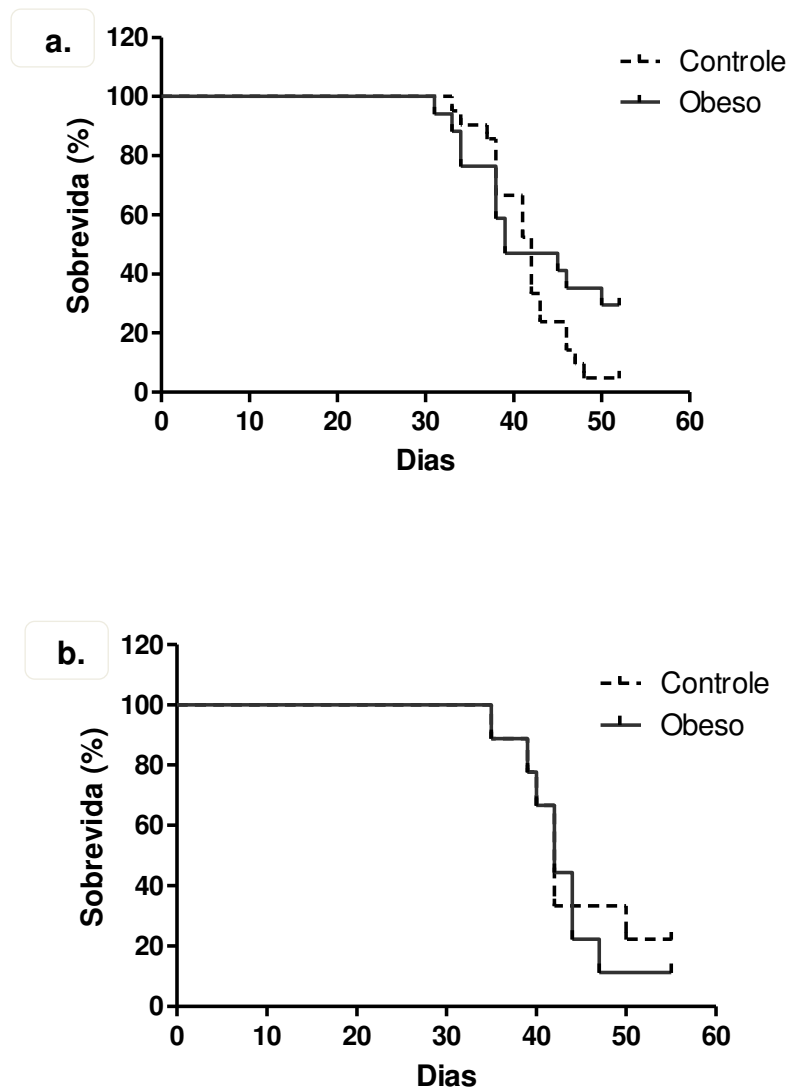


Figura 15: Mortalidade de animais controles e obesos, alimentados por 6 (a.) ou 16 semanas de dieta (b.), após receberem as células tumorais. Todos os animais receberam 5×10^4 células 4T1 e tiveram a mortalidade avaliada pela curva de sobrevivência de Kaplan-Meier. (n=10)

A fim de avaliar a influência da obesidade no tamanho do tumor e no desenvolvimento de metástases nestes animais, tanto nos alimentados durante 6 semanas quanto nos alimentados por 16 semanas, os mesmos foram eutanasiados após 14, 17, 24 e 30 dias da injeção do tumor. A gordura perigonadal foi removida e pesada. Foi observada diminuição do peso da gordura perigonadal dos animais obesos com o avanço do estágio de desenvolvimento do tumor (Fig. 16).

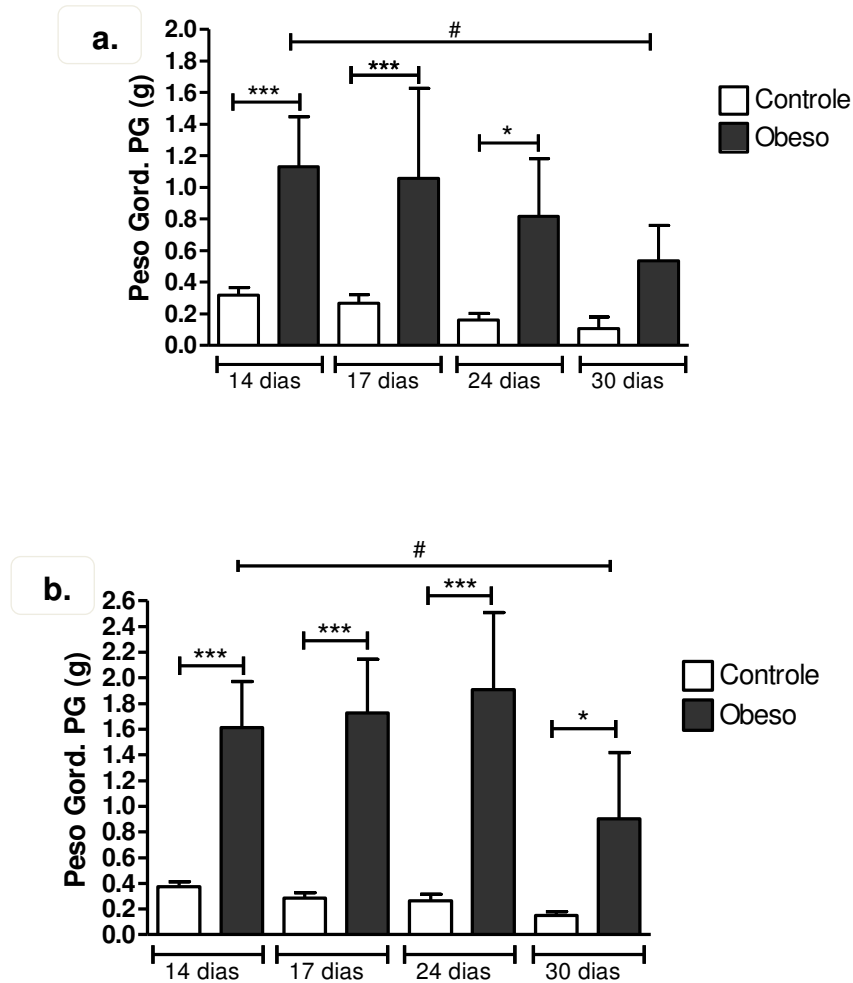


Figura 16: Peso da gordura perigonadal (PG) dos animais alimentados por 6 (a.) ou 16 semanas de dieta (b.) após receberem o tumor. Cada barra representa a média \pm SD. * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$; significativamente diferente do grupo controle. # $p \leq 0,05$, quando os grupos de 14 e 30 dias foram comparados ($n=5$).

O peso e o volume tumoral foram avaliados e, com o avanço da doença, houve aumento significativo do peso e do volume do tumor dos animais obesos acompanhados durante 16 semanas de dieta, conforme demonstrado nas figuras 17c. e 17d., respectivamente.

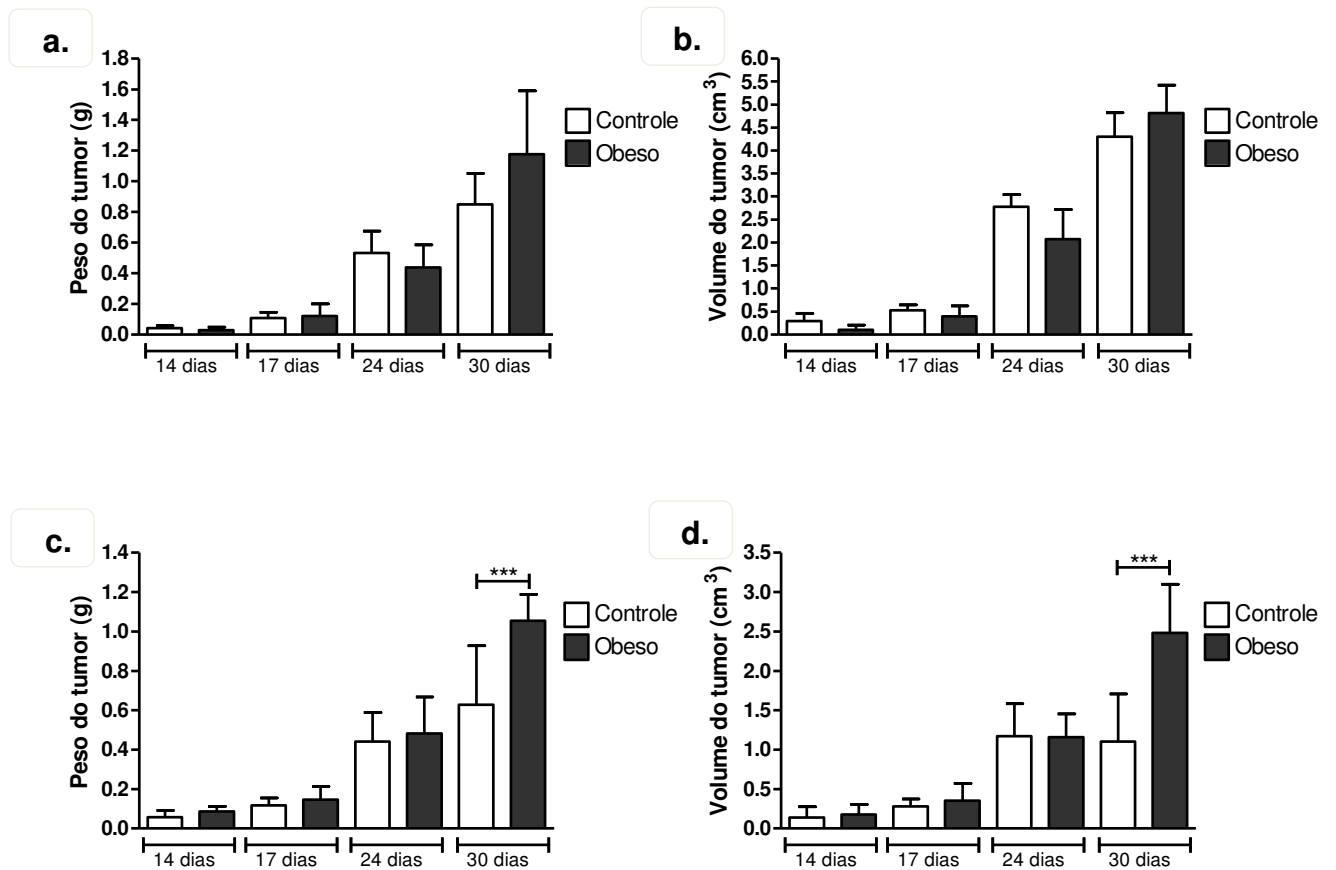


Figura 17: Animais obesos alimentados durante 16 semanas de dieta apresentam tumores de maior peso e volume. **a. – b.** Peso e volume do tumor de animais acompanhados durante 6 semanas de dieta. **c. – d.** Peso e volume do tumor de animais acompanhados durante 16 semanas de dieta. Os diâmetros do tumor foram mensurados com o auxílio de um paquímetro e o volume calculado aplicando-se a fórmula: $(\text{diâmetro maior}) \times (\text{diâmetro menor})^2 \times 0,52$. Cada barra representa a média \pm SD. *** $p \leq 0,001$; significativamente diferente do grupo controle ($n=5$).

Uma vez que os animais obesos alimentados durante 16 semanas apresentavam tumor de maior peso e de maior volume quando comparados aos animais controle, inferimos que apresentariam também mais metástases ósseas e isso foi comprovado através do Ensaio Clonogênico Metastático. Interessantemente um aumento progressivo dos clones de células 4T1 foi observado na medula óssea dos animais obesos, com diferença significativa em relação aos controles após 30 dias da injeção do tumor (Fig. 18). Resultados semelhantes foram observados ao se avaliar a existência de metástases no linfonodo inguinal, drenante do tumor (Fig. 19), no entanto, por se tratar da análise de um único experimento onde foi obtido um “pool” de linfonodos, não foi realizado nenhum teste estatístico.

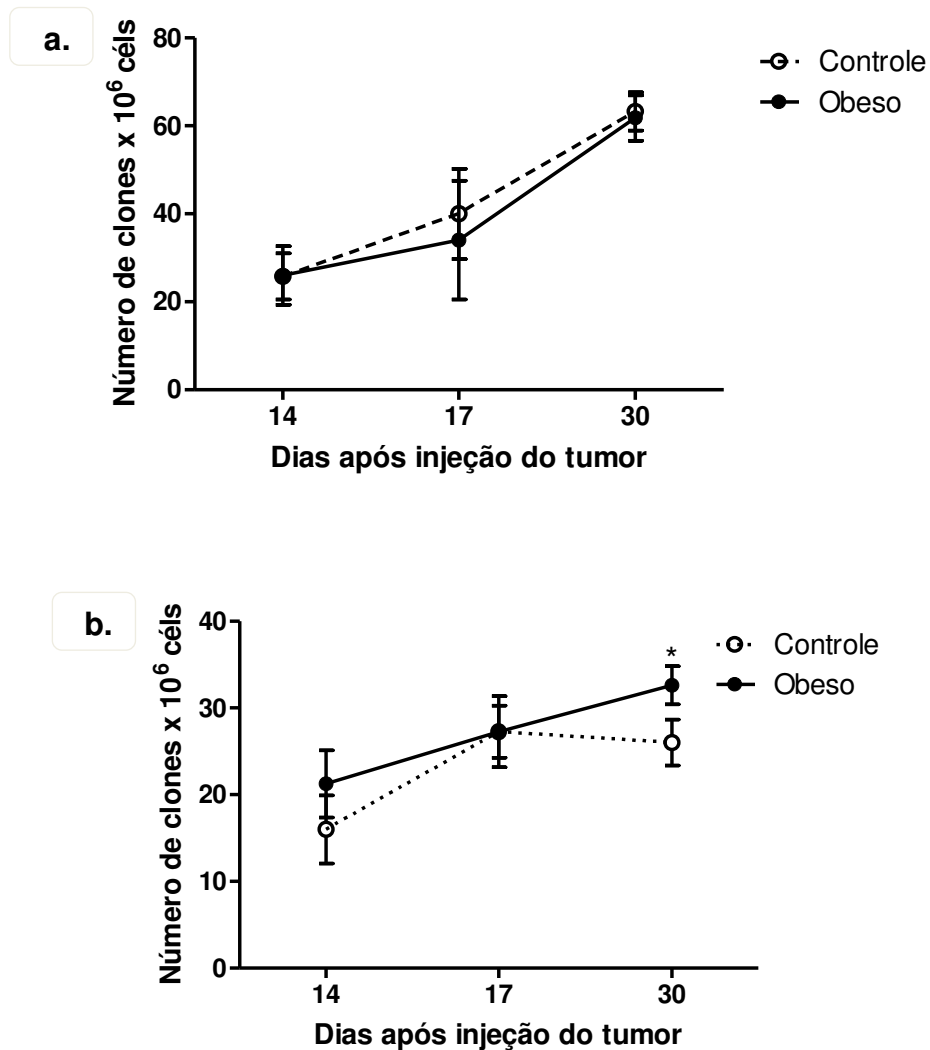


Figura 18: Animais obesos, alimentados durante 16 semanas de dieta, apresentam aumento de metástases na medula óssea. **a.** Clones de células tumorais presentes na medula óssea dos animais alimentados durante 6 semanas de dieta. **b.** Clones de células tumorais presentes na medula óssea dos animais alimentados durante 16 semanas de dieta. Cada ponto representa a média \pm SD. * $p \leq 0,05$; significativamente diferente do grupo controle ($n=5$).

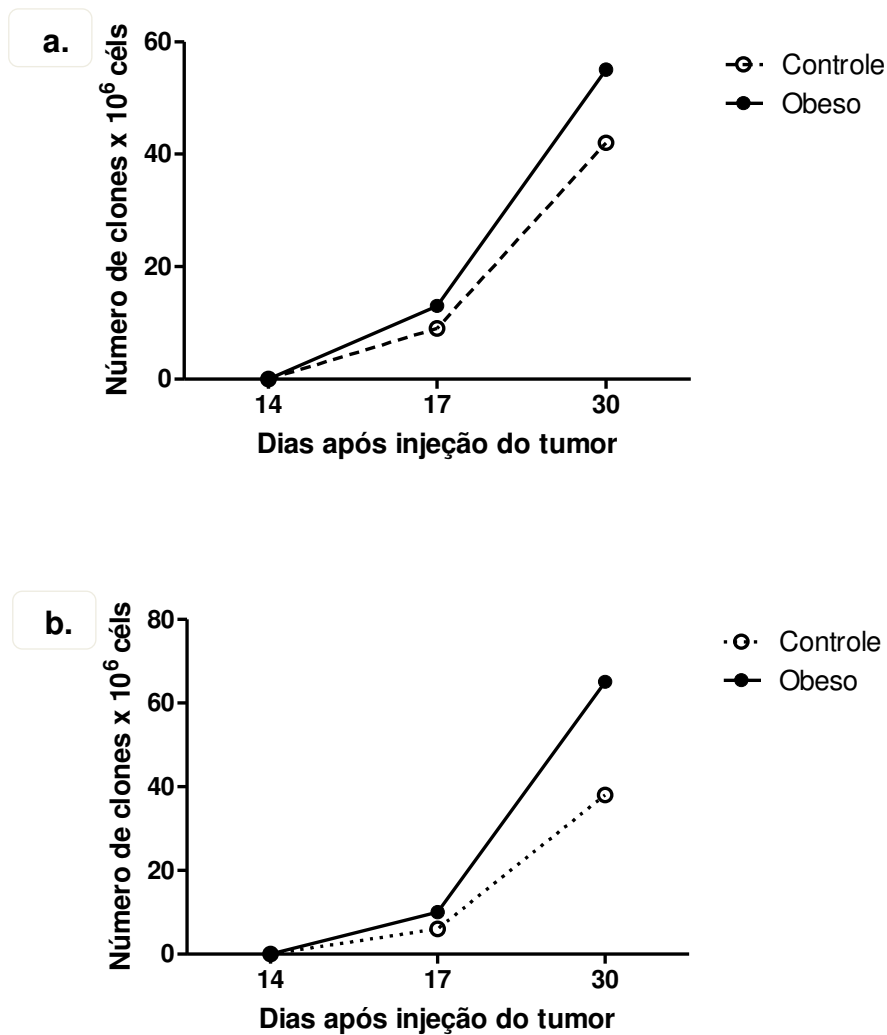


Figura 19: Animais obesos tendem a apresentar mais metástases no linfonodo inguinal drenante do tumor. **a.** Clones de células tumorais presentes no linfonodo drenante do tumor dos animais alimentados durante 6 semanas de dieta. **b.** Clones de células tumorais presentes no linfonodo drenante do tumor dos animais alimentados durante 16 semanas de dieta. Resultados apresentados sem análise estatística, uma vez que são referentes a um ensaio realizado com um “pool” de linfonodos.

A diminuição da gordura perigonadal dos animais alimentados com a HFD por 16 semanas, associada também a diminuição do peso corporal, pode demonstrar estado de caquexia dos animais, acompanhado de grande número de metástases tumorais. A este estágio avançado de doença também pode ser associada a maior mortalidade dos animais obesos alimentados durante 16 semanas de dieta, mesmo que não significativa.

Em conjunto, estes resultados podem indicar a existência de um carcinoma mamário mais agressivo nos animais obesos, acompanhados durante 16 semanas de dieta, quando comparados aos controles.

4.3 INFLUÊNCIA DA HFD NO PERFIL DE CITOCINAS PRÓ INFLAMATÓRIAS

Diversos trabalhos demonstram uma correlação positiva entre níveis alterados de citocinas inflamatórias, obesidade e desenvolvimento de tumores. Desta forma, nós avaliamos o perfil das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α , bem como os níveis de leptina, dos animais controle e obesos em dois estágios de desenvolvimento do tumor.

A leptina é o principal hormônio associado à obesidade. Derivada, principalmente, do tecido adiposo, é capaz de induzir a secreção de citocinas como IL-6 e TNF- α , além de alterar perfis de diversas células do sistema imunológico. A quantificação dos níveis de leptina no meio condicionado de gordura dos animais acompanhados durante 16 semanas de dieta e que receberam ou não células tumorais, demonstrou que os animais alimentados com a dieta HFD apresentaram níveis significativamente maiores de leptina (Fig. 20). Os animais que receberam as células tumorais, aos 35 dias após a injeção do tumor, tempo em que foi observado estágio avançado de desenvolvimento do tumor, com grande número de metástases, apresentaram drástica redução dos níveis de leptina, associada também a diminuição da gordura perigonadal nestes mesmos animais, conforme demonstrado na figura 16. Estes achados indicam que a leptina pode ter papel crucial no estabelecimento e na progressão inicial do tumor, induzindo fatores de crescimento capazes de favorecer o desenvolvimento de metástases. Além disso, foi demonstrado por Wazir e colaboradores, em 2012, a expressão de leptina e seu receptor em amostras do carcinoma mamário humano MCF-7, sugerindo que esta pode estar envolvida na progressão tumoral.

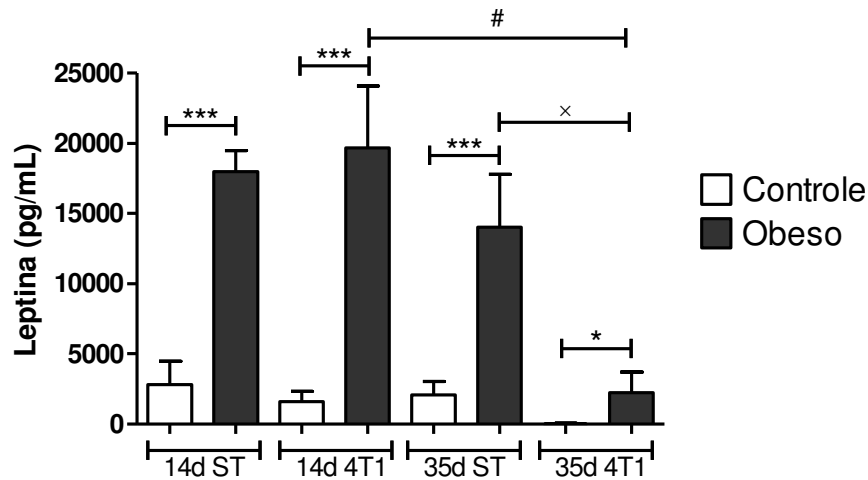


Figura 20: Animais obesos apresentam maior expressão de leptina no meio condicionado de tecido adiposo. As análises foram realizadas em animais controles e obesos, acompanhados durante 16 semanas de dieta, sem tumor (ST) e com tumor (4T1), após 14 e 35 dias da injeção do tumor (14d e 35d). Cada barra representa a média \pm SD. * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$; significativamente diferente do grupo controle; $^x p \leq 0,001$, quando os grupos obesos de 35 dias foram comparados entre si; # $p \leq 0,001$, quando o grupo obeso com 14 dias de tumor foi comparado ao grupo obeso com 35 dias de tumor. (n=5).

Ao avaliarmos os níveis de IL-6 nos sobrenadantes de cultura da medula óssea do íliaco, observamos que os animais obesos, alimentados por 16 semanas, que receberam tumor, após 35 dias da injeção do mesmo, apresentaram diminuição significativa da expressão desta citocina (Fig. 21b.). Os animais alimentados durante 6 semanas não apresentaram diferenças significativas na expressão desta citocina (Fig. 21a.).

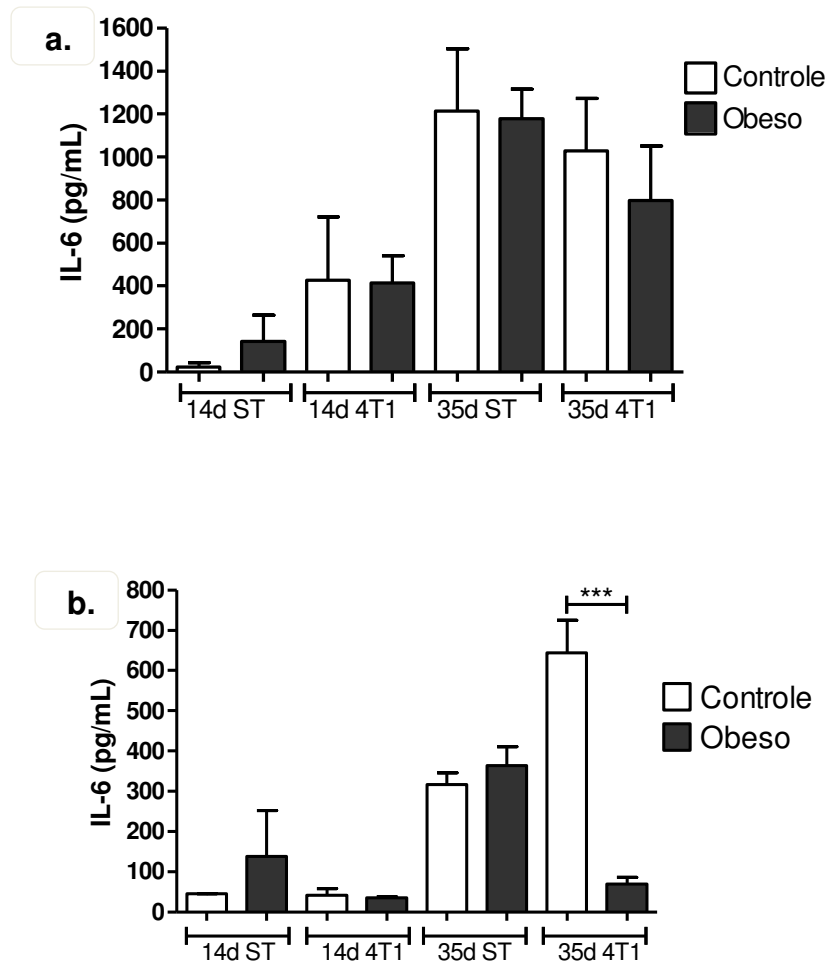


Figura 21: Expressão alterada de IL-6 em cultura de medula óssea do íliaco. As análises foram realizadas em animais controles e obesos, alimentados durante 6 (a.) ou 16 semanas (b.), sem tumor (ST) e com tumor (4T1), após 14 e 35 dias da injeção do tumor (14d e 35d). Cada barra representa a média \pm SD. *** $p \leq 0,001$; significativamente diferente do grupo controle; (n=5).

A expressão de TNF- α também foi alterada. A análise desta citocina no sobrenadante de cultura de medula óssea do íliaco revelou que os animais obesos alimentados por 16 semanas e que receberam o tumor apresentaram diminuição da expressão TNF- α , tanto aos 14 quanto aos 35 dias após a injeção do tumor (Fig. 22b.). Não foram observadas diferenças significativas na expressão desta citocina na cultura de medula óssea dos animais acompanhados durante 6 semanas de dieta (Fig. 22a.).

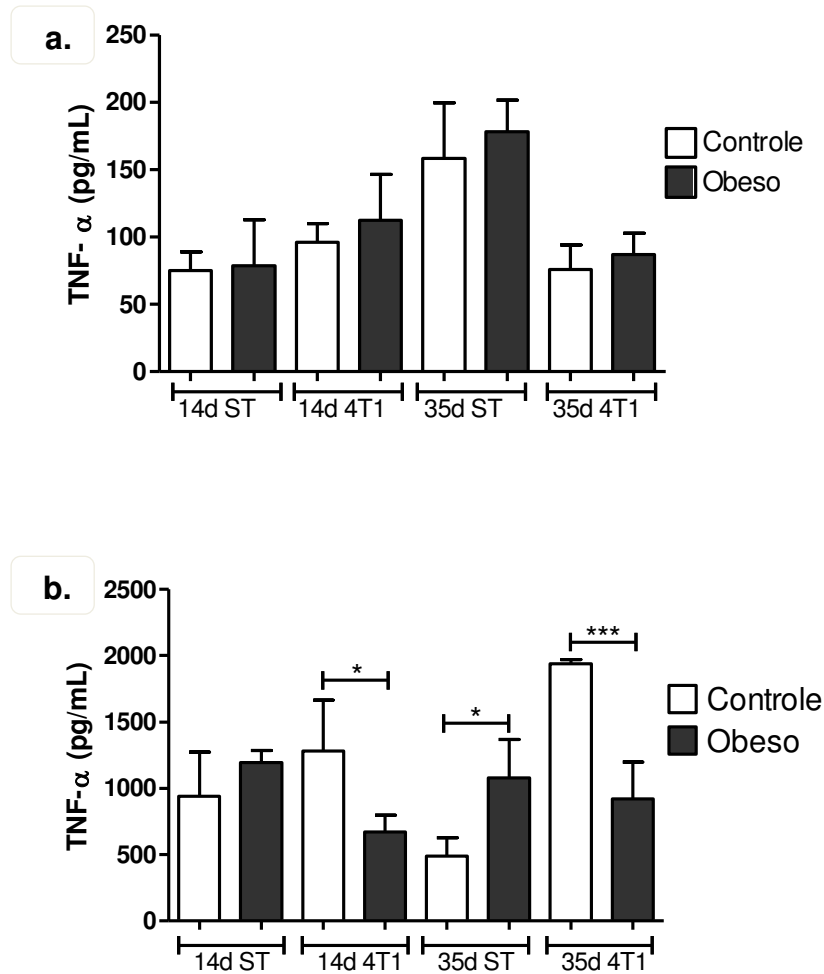


Figura 22: Expressão de TNF- α no sobrenadante de cultura de medula óssea do ilíaco de animais acompanhados durante 6 (a.) ou 16 semanas de dieta (b.). As análises foram realizadas em animais controles e obesos, sem tumor (ST) e com tumor (4T1), após 14 e 35 dias da injeção do tumor (14d e 35d). Cada barra representa a média \pm SD. * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$; significativamente diferente do grupo controle; (n=5).

Conforme demonstrado, aos 35 dias após a injeção do tumor, houve diminuição significativa da gordura perigonadal, dos níveis de leptina, TNF- α e IL-6. Desta forma, parece que a leptina, aliada a outras alterações, possui papel fundamental no desenvolvimento de tumores dos animais obesos.

5 DISCUSSÃO

A obesidade atingiu proporções epidêmicas em todo o mundo. Comumente associada a países de alta renda, a obesidade é também prevalente em países de renda baixa e média. Estima-se que pelo menos 2,8 milhões de pessoas morram a cada ano como resultado de excesso de peso ou obesidade. Além disso, 44% dos casos de diabetes, 23% dos casos de doenças isquêmicas do coração e entre 7% e 41% de determinados casos de câncer são atribuídos ao excesso de peso e obesidade (WHO, 2013).

O desenvolvimento de tumores, como por exemplo, o câncer de mama, está altamente associado a inflamação e as alterações imunometabólicas características dos quadros de obesidade. Contudo, novos estudos ainda são necessários para entender esta complexa relação.

No presente estudo, foi avaliado o impacto da obesidade no estabelecimento do tumor de mama e metástases, a partir do perfil imunológico do animal obeso que recebeu a linhagem de célula tumoral 4T1.

Primeiramente, o ganho de peso corporal, a ingestão alimentar, o ganho de gordura retroperitoneal e perigonadal, a glicemia e o perfil lipídico de animais alimentados com dieta controle ou HFD ao longo de 16 semanas foi analisado.

Em 2010, Olson e colaboradores caracterizaram os camundongos BALB/c como animais resistentes a obesidade por apresentarem um pequeno ganho de peso corporal ao serem alimentados com HFD por um longo período. Kim e colaboradores (2011) e Zhao e colaboradores (2013) compartilharam esta ideia. Nossos resultados demonstram ganho de peso corporal nos animais HFD comparados aos controles já a partir da segunda semana de dieta, além de menor consumo de ração por esses animais; aumento de peso das gorduras retroperitoneal e perigonadal a partir de 12 semanas de dieta; menor tolerância à glicose; aumento dos níveis de leptina e colesterol total, corroborando os resultados apresentados em estudos realizados com camundongos C57BL/6, alimentados com HFD por diferentes períodos (KIM *et al.*, 2011; INOUE *et al.*, 2012). As alterações de peso corporal, gordura retroperitoneal e perigonadal, além de alterações em importantes

parâmetros bioquímicos associados à obesidade, caracterizam os animais alimentados com HFD como obesos.

Ao observar a influência da HFD na sobrevida dos animais, no crescimento tumoral e no estabelecimento de metástases, foi observado que os animais obesos, alimentados pela HFD durante 16 semanas, apresentaram menor sobrevida, embora sem significância estatística, aumento do peso e do volume do tumor, bem como aumento dos clones de células tumorais na medula óssea do íliaco. Estes animais também apresentaram diminuição do peso corporal e da gordura perigonadal, sugerindo um estado de caquexia associado ao avanço do tumor. Em conjunto, estes resultados indicam de que os animais obesos apresentam carcinoma mais agressivo quando comparados aos controles.

Kim e colaboradores, em 2011, observaram aumento de nódulos tumorais no pulmão e no fígado de animais que receberam células 4T1 e foram alimentados com HFD, além de maior volume e peso do tumor desses animais, e menor sobrevida, ratificando nossos resultados.

Ainda, Zhao e colaboradores, em 2013, ao avaliar a influência da ingestão de HFD no desenvolvimento da glândula mamária durante a puberdade, observaram que os animais alimentados pela HFD e tratados com 7,12- dimetilbenz(a)antraceno (DMBA), um agente tumorigênico, apresentaram aumento do número de eosinófilos na glândula mamária, aumento do número de lesões epiteliais anormais, maior proliferação celular, aumento de RANKL nas células epiteliais na mama, aumento da vascularização e de macrófagos M2 quando comparados aos animais que receberam a dieta padrão. Entretanto, os animais alimentados pela HFD não apresentaram ganho significativo de peso corporal, assim como não apresentaram grandes alterações nos níveis de glicose, insulina, estrógeno e progesterona.

A ingestão de HFD também foi associada ao aumento dos níveis de Ki67, ciclina A e D1, Bcl-x, Bcl-2, CD31, VEGF no tecido tumoral, além de alterações nos níveis séricos de insulina, IFN- γ , leptina e MCP-1. O crescimento de tumores sólidos, o número e o volume dos nódulos tumorais no pulmão dos animais alimentados pela HFD também foram aumentados, observando-se discreto aumento do peso corporal (PARK *et al.*, 2012).

Ao avaliar os efeitos da HFD sobre a progressão do câncer de mama da linhagem celular MCF-7 em camundongos BALB/c atímicos, Lamas e colaboradores, 2013, observaram que, apesar de não apresentarem aumento do peso corporal, nos

animais alimentados pela HFD o crescimento tumoral foi aumentado, bem como a expressão de Ki67, um marcador de proliferação celular; enquanto que a citotoxicidade de células NK do baço foi diminuída, demonstrando que a ingestão da HFD pode contribuir para a modulação de diversas funções celulares.

A literatura mostra evidências indicando que na obesidade há uma diminuição da maturação de pré-adipócitos em adipócitos, bem como uma ruptura do equilíbrio de duas grandes adipocinas: a leptina e a adiponectina. A adiponectina é anti-angiogênica, anti-proliferativa e promove a maturação de adipócitos. Adipócitos maduros produzem leptina e adiponectina, enquanto que pré-adipócitos secretam altos níveis de leptina (SIMONS *et al.*, 2005; VONA-DAVIS e ROSE, 2009).

Em indivíduos obesos, há alta expressão de leptina e baixa expressão de adiponectina. Na inflamação crônica em obesos, as citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1 β e IFN- γ tem a capacidade de bloquear a maturação dos pré-adipócitos, aumentando ainda mais a produção de leptina. (SIMONS *et al.*, 2005). A alta concentração de leptina no local atrai monócitos e promove a conversão destes em macrófagos. Os macrófagos contribuem para a produção local de citocinas pró-inflamatórias e fatores pró-angiogênicos (NAUGLER e KARIN, 2008; VONA-DAVIS e ROSE, 2009; ROBERTS, DIVE e RENEHAN, 2010).

A produção de citocinas pelos pré-adipócitos pode ser estimulada pelos elevados níveis de ácidos graxos circulantes observados em obesos. Os ácidos graxos circulantes, por sua vez, podem ativar a sinalização via receptor Toll-like 4 (TLR4) e aumentar a secreção de IL-6, CCL2, CCL5 e CCL11, prejudicando a diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos (POULAIN-GODEFROY e FROGUEL, 2007).

Muitos estudos têm demonstrado que o aumento dos níveis circulantes de IL-8, IL-6, CCL2 e CCL5 estão associados a um pior prognóstico em casos de câncer (revisado por GILBERT e SLINGERLAND, 2012).

A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória envolvida em diversos processos fisiológicos e patológicos do organismo, tais como: respostas imunes, hematopoiese, respostas de fase aguda e inflamação. Pode também atuar como fator de crescimento de tumores, contribuindo para a recorrência e metástases de câncer de mama, inibindo a apoptose das células tumorais, promovendo a angiogênese e aumentando a adesão de células tumorais disseminadas (SEMESIUK *et al.*, 2013; TRIPSIANIS *et al.*, 2013).

O TNF- α tem sido demonstrado como um dos principais mediadores inflamatórios e é capaz de alterar a expressão de fatores de crescimento e outras citocinas através de diversas vias de transdução de sinais (SEMESIUK *et al.*, 2013). Soria e colaboradores, em 2011, demonstraram que o TNF- α é pouco expresso pelas células epiteliais mamárias normais, mas sua incidência é significativamente elevada em células tumorais, indicando que esta citocina pode estar relacionada à progressão do câncer de mama.

Foi demonstrado por Lysaght e colaboradores, em 2011, que o aumento de leptina e TNF- α induz a secreção de IL-6 pelos adipócitos e esta secreção aumentada de IL-6 está relacionada à transcrição de proteínas sinalizadoras ligadas a proliferação e invasão de células tumorais. Além disso, a capacidade de animais obesos apresentarem tumores de cólon mais proeminentes foi associada a maior expressão de TNF- α , demonstrado por Flores e colaboradores, em 2012.

Nossos resultados demonstram redução da expressão de IL-6 e TNF- α no sobrenadante de cultura de medula óssea dos animais obesos, alimentados durante 16 semanas de dieta, aos 35 dias após a injeção do tumor. Associada a diminuição destas citocinas, foi observada redução de cerca de três vezes na expressão de leptina no meio condicionado de gordura quando os animais obesos com 14 dias de tumor foram comparados aos obesos com 35 dias de tumor.

O perfil de citocinas pró-inflamatórias apresentado em nossos experimentos contradiz diversos trabalhos que demonstram aumento da expressão dessas citocinas associado à obesidade e ao desenvolvimento de tumores. No entanto, é possível que a leptina, aliada a outras alterações, seja a principal molécula associada ao maior volume e peso do tumor nos animais obesos, e também uma molécula modulatória importante nas metástases ósseas observadas nestes animais, visto que alguns estudos têm demonstrado uma correlação entre maior expressão do receptor de leptina (Ob-R), altos níveis de leptina e pior progressão tumoral. Em 2004, Ishikawa, Kitayama e Nagawa ao avaliarem amostras de pacientes observaram que 83% das amostras de carcinoma ductal invasivo expressavam o receptor Ob-R, além de uma super expressão leptina em 91% dos casos e desenvolvimento de metástases em 34% dos pacientes cujas amostras expressavam Ob-R. Wazir e colaboradores, em 2012, também observaram maior expressão de leptina e seu receptor em amostras de câncer de mama, demonstrando que a leptina desempenha um papel significativo no processo de

carcinogênese da mama. Park e colaboradores, em 2010, ao avaliarem a ação fisiológica da leptina periférica no microambiente tumoral, observaram que na ausência do Ob-R, há uma diminuição da fosforilação de resíduos de tirosina e um aumento da fosforilação de resíduos de serina, preservando a função mitocondrial e prevenindo, desta forma, a agressividade tumoral. Também foi observado por Frankenberry e colaboradores (2006) que altos níveis de leptina circulante contribuem para a proliferação do câncer de mama, ativando vias de sinalização de MAPK e PI3K, envolvidas no crescimento e na sobrevivência celular. Vale ressaltar que os níveis de adiponectina podem influenciar diretamente a relação entre leptina e pior prognóstico tumoral dos animais obesos. Contudo, acreditamos fortemente que, em nosso modelo de estudo, a leptina desempenha um papel central no estabelecimento do tumor e no desenvolvimento de metástases, o que nos leva a desenhar o seguinte esquema:

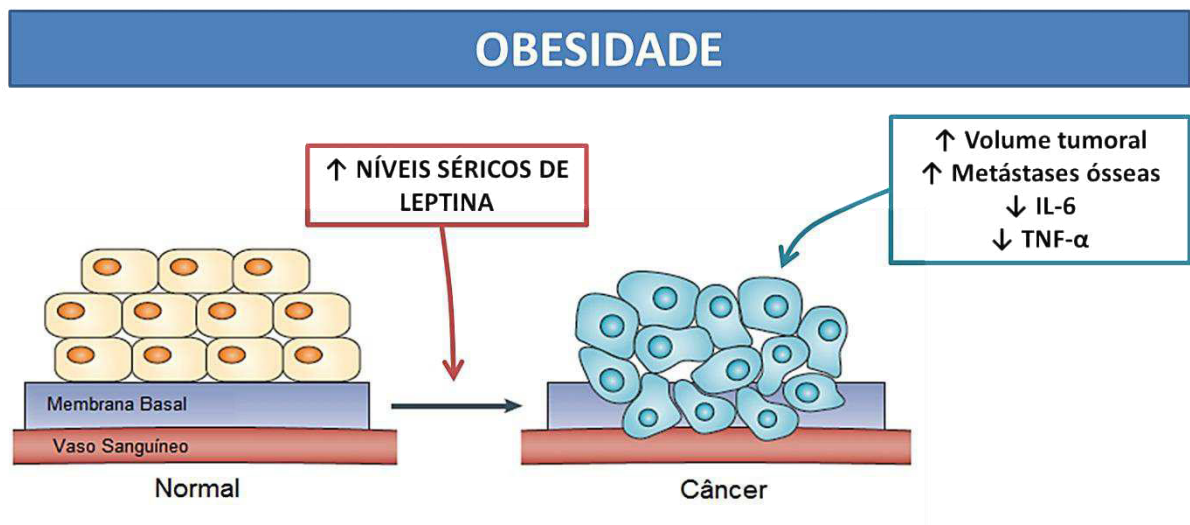


Figura 23: Aumento dos níveis séricos de leptina pode favorecer o estabelecimento do tumor e o desenvolvimento de metástases. Animais alimentados pela HFD durante 16 semanas de dieta apresentam tumores de maior peso e maior volume, aumento de metástases ósseas e diminuição dos níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α após a disseminação do tumor.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos com este trabalho nos permitem concluir que a ingestão de uma dieta rica em lipídeos por um longo período é capaz de induzir alterações metabólicas características de quadros de obesidade em camundongos BALB/c fêmeas e pode aumentar a progressão do câncer de mama, aumentando o número de metástases ósseas e a mortalidade associada a este câncer. Neste sentido, a obesidade atua como um fator de pior prognóstico neste tipo de patologia, podendo ser a leptina uma importante adipocina moduladora do estabelecimento tumoral e metástases. Entretanto, estudos que avaliem os mecanismos celulares e as possíveis vias de sinalização envolvidas na migração e proliferação das células tumorais em animais obesos ainda se fazem necessários.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ainslie, D.A.; Morris, M.J.; Wittert, G.; Turnbull, H.; Proietto, J.; Thorburn, A.W. 2001. Estrogen deficiency causes central leptin insensitivity and increased hypothalamic neuropeptide Y. **International Journal of Obesity and Related Metabolism Disorders**, **25(11)**:1680-8.

Ali, S.M.; Harvey, H.A.; Lipton, A. 2003. Metastatic breast cancer: overview of treatment. **Clinical Orthopedics and Related Research**, **415(Suppl)**:S132-S137.
 Bennett, B.D.; Solar, G. P.; Yuan, J. Q.; Mathias, J.; Thomas, G. R.; Matthews, W. 1996. A role for leptin and its cognate receptor in hematopoiesis. **Current Biology**, **6**: 1170–1180.

Berg, A. H.; Scherer, P. E. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. 2005. **Circulation Research**, **96**; 939–949.

Bernotiene, E.; Palmer, G.; Gabay, C. 2006. The role of leptin in innate and adaptive immune responses. **Arthritis Research Therapy**, **8**:217.

Bibby, M.C. 2004. Orthotopic models of cancer for preclinical drug evaluation: advantages and disadvantages. **European Journal of Cancer**, **40(6)**:852-857.

Brockmann, G.A.; Bevova, M.R. 2002. Using mouse models to dissect the genetics of obesity. **Trends in Genetics**, **18(7)**:367-76.

Calle, E.E. 2007. Obesity and cancer. **BMJ**, **335(7630)**: 1107-8.

Campbell, M.J.; Tonlaar, N.Y.; Garwood, E.R.; Huo, D.; Moore, D.H.; Khramtsov, A.I.; Au, A.; Baehner, F.; Chen, Y.; Malaka, D.O.; Lin, A.; Adeyanju, O. O.; Li, S.; Gong, C.; McGrath, M.; Olopade, O.I.; Esserman, L.J. 2010. Proliferating macrophages associated with high grade, hormone receptor negative breast cancer and poor clinical outcome. **Breast Cancer Research and Treatment**, **128**:703–11.

Carlton, E.D.; Demas, G.E.; French, S.S. 2012. Leptin, a neuroendocrine mediator of immune responses, inflammation and sickness behaviors. **Hormonal Behaviors**, **62(3)**:272-279.

Chagnon, Y. C.; Bouchard, C. 1996. Genetics of obesity: advances from rodents studies. **Trends in Genetics**, **12**(11): 441-4.

Chatterjee, T. K.; Stoll, L. L.; Denning, G. M.; Harrelson, A.; Blomkalns, A. L.; Idelman, G.; Rothenberg, F. G.; Neltner, B.; Romig-Martin, S. A.; Dickson, W.; Rudich, S.; Weintraub, N. L. 2009. Proinflammatory phenotype of perivascular adipocytes: influence of high-fat feeding. **Circulation Research**, **104**; 541–549.

Chawla, A.; Nguyen, K.D.; Goh, Y.P. 2011. Macrophage –mediated inflammation in metabolic disease. **Nature Review Immunology**, **11**: 738-49.

Chehab, F.; Lim, M.; Lu, R. 1996. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. **Nature Genetics**, **12**, 318–320.

Chen, Y.; Heiman, M.L. 2001. Increased weight gain after ovariectomy is not a consequence of leptin resistance. **American Journal of the Physiology, Endocrinology and Metabolism**, **280**(2):E315-22.

Chrousos, G. P. 1995. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune – mediated inflammation. **New England Journal of Medicine**, **332**(20): 1351-62.

Chu, S.C.; Chou, Y.C.; Liu, J.Y.; Chen, C.H.; Shyu, J.C.; Chou, F.P. 1999. Fluctuation of serum leptin level in rats after ovariectomy and the influence of estrogen supplement. **Life Science**, **64**(24):2299-306.

Comen, E. A. Tracking the Seed and Tending the Soil: Evolving Concepts in Metastatic Breast Cancer. **Discovery Medicine** / **075**. Disponível em <<http://www.discoverymedicine.com/Elizabeth-A-Comen/2012/08/22/tracking-the-seed-and-tending-the-soil-evolving-concepts-in-metastatic-breast-cancer/>>. Acessado em 15 mar. 2014.

Correa-de-Santana, E.; Paez-Pereda, M.; Theodoropoulou, M.; Renner, U.; Stalla, J.; Stalla, G. K.; Savino W. 2009. Modulation of growth hormone and prolactin secretion in *Trypanosoma cruzi* infected mammosomatotrophic cells. **Neuroimmunomodulation**, **16**: 208-212.

Dardenne, M.; Smaniotto, S.; de Mello-Coelho, V.; Villa-Verde, D.M.; Savino, W. 2009. Growth hormone modulates migration of developing T cells. **Annals of the New York Academy of Sciences**, **1153**:1-5.

DeSantis, C.; Ma, J.; Bryan, L.; Jemal, A. 2014. Breast Cancer Statistics. **CA: a cancer journal for clinicians**, **64(1)**:52-62.

Dixit, V. D. 2008. Adipose-immune interactions during obesity and caloric restriction: reciprocal mechanisms regulating immunity and health span. **Journal of Leukocyte Biology**, **84**:882-892.

Djazayery, A.; Miller, D. S.; Stock, M. J. 1979. Energy balances in obese mice. **Nutrition and Metabolism**, **23(5)**:357-67.

Dube, M.G.; Xu, B.; Kalra, P.S.; Sninsky, C.A.; Kalra, S.P. 1999. Disruption in neuropeptide Y and leptin signaling in obese ventromedial hypothalamic-lesioned rats. **Brain Reserch**, **816(1)**:38-46.

Eiró, N.; Fernandez-Garcia, B.; González, L.O.; Vizoso, F.J. 2013. Cytokines related to MMP-11 expression by inflammatory cells and breast cancer metastasis. **Oncoimmunology**, **2(5)**:e24010.

Fisher B. 1977. Biological and clinical considerations regarding the use of surgery and chemotherapy in the treatment of primary breast cancer. **Cancer** **40(1 Suppl)**:574-587.

Flores, M.B.; Rocha, G.Z.; Damas-Souza, D.M.; Osório-Costa, F.; Dias, M.M.; Ropelle, E.R.; Camargo, J.A.; de Carvalho, R.B.; Carvalho, H.F.; Saad, M.J.; Carvalheira, J.B. 2012. Obesity- Induced Increase in Tumor Necrosis Factor- α Leads to Development of Colon Cancer in Mice. **Gastroenterology**, **143(3)**:741-53.

Fontaine, K. R.; Barofsky, I. 2001. Obesity and health-related quality of life. **Obesity Review**, **2**:173-182.

Frankenberry, K. A.; Skinner, H.; Somasundar, P.; McFadden, D. W.; Vona-Davis, L. C. 2006. Leptin receptor expression and cell signaling in breast cancer. **International Journal of Oncology** **28**: 985-993.

García-Robles, M.J.; Segura-Ortega, J.E.; Fafutis-Morris, M. 2013. The Biology of Leptin and its implications in Breast Cancer: a general view. **Journal of Interferon & Cytokine Research**. [Epub ahead of print]

Gerlinger, M.; Rowan, A. J.; Horswell, S.; Larkin, J.; Endesfelder, D.; Gronroos, E.; Martinez, P.; Matthews, N.; Stewart, A.; Tarpey, P.; Varela, I.; Phillimore, B.; Begum,

S.; McDonald, N. Q.; Butler, A.; Jones, D.; Raine, K.; Latimer, C.; Santos, C. R.; Nohadani, M.; Eklund, A. C.; Spencer-Dene, B.; Clark, G.; Pickering, L.; Stamp, G.; Gore, M.; Szallasi, Z.; Downward, J.; Futreal, P. A.; Swanton, C. 2012. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. **New England Journal of Medicine** **366(10)**:883-892.

Gilbert, C.A.; Slingerland, J.M. 2012. Cytokines, Obesity and Cancer: new insights on mechanisms linking obesity to cancer risk and progression. **Annual Review of Medicine**, **64**:45-57.

Gordon, S. 2003. Alternative activation of macrophages. **Nature Review Immunology**, **3**, 23–35.

Helman, S.; Harris, J.R. 2000. Diseases of Breast Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

Hursting, S.D.; Berger, N.A. 2010. Energy balance, host related factors and cancer progression. **Journal of Clinical Oncology**, **28**:4058-4065.

Inoue, E.; Ichiki, T.; Takeda, K.; Matsuura, H.; Hashimoto, T.; Ikeda, J.; Kamiharaguchi, A.; Sunagawa, K. 2012. Beraprost sodium, a stable prostacyclin analogue, improves insulin resistance in high-fat diet-induced obese mice. **The Journal of Endocrinology**, **(3)**: 285-91.

Ishikawa, M.; Kitayama, J.; Nagawa, H. 2004. Enhanced expression of leptin and leptin receptor (OB-R) in human breast cancer. **Clinical Cancer Research** **10(13)**: 4325-31.

James, B.R.; Tomanek-Chalkley, A.; Askeland, E.J.; Kucaba, T.; Griffith, T.S.; Norian, L.A. 2012. Diet induced obesity alters dendritic cell function in the presence and absence of tumor growth. **Journal of Immunology**, **189(3)**:1311-21.

Käkönen, S.M.; Mundy, G.R. 2003. Mechanisms of osteolytic bone metastases in breast carcinoma. **Cancer**, **97**:834-9.

Khandekar, M.J.; Cohen, P.; Spiegelman, B. M. 2011. Molecular mechanisms of cancer development in obesity. **Nature Reviews Cancer**, **24**; **11(12)**:886-95.

Kim, E. J.; Choi, M. R.; Park, H.; Kim, M.; Hong, J. E.; Lee, J.Y.; Chun, H.S.; Lee, K. W.; Yoon Park, J.H. 2011. Dietary fat increases solid tumor growth and metastasis of

4T1 murine mammary carcinoma cells and mortality in obesity-resistant BALB/c mice. **Breast Cancer Research**, **11**; 13(4):R78.

Kimura, M.; Irahara, M.; Yasui, T.; Saito, S.; Tezuka, M.; Yamano, S.; Kamada, M.; Aono, T. 2002. The obesity in bilateral ovariectomized rats is related to a decrease in the expression of leptin receptors in the brain. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, **290(4)**:1349-53.

La Cava, A.; Matarese, G. 2004. The weight of leptin in immunity. **Nature Review Immunology**, **4**:371-379.

Lam, Q.L.; Lu, L. Role of leptin in immunity. 2007. **Cellular and Molecular Immunology**, **4**:1-13.

Lamas, B.; Nachat-Kappes, R.; Goncalves-Mendes, N.; Mishellany, F.; Rossary, A.; Vasson, M.P.; Farges, M.C. 2013. Dietary fat without body weight gain increases in vivo MCF-7 human breast cancer cell growth and decreases natural killer cell cytotoxicity. **Molecular Carcinogenesis**. [Epub ahead of print].

Leininger, G.M.; Myers, M.G. Jr. 2008. LRb signals act within a distributed network of leptin responsive neurones to mediate leptin action. **Acta Physiological (Oxf)** **192**:49-59.

Lianidou, E.S.; Mavroudis, D.; Sotiropoulou, G.; Agelaki, S.; Pantel, K. 2010. What's new on circulating tumor cells? A meeting report. **Breast Cancer Research**, **12(4)**:307.

Likuni, N.; Lam, Q.L.; Lu, L.; Matarese, G.; La Cava, A. 2008. Leptin and Inflammation. **Current Immunological Review**, **4**:70-79.

Lin, E.Y.; Pollard, J.W. 2007. Tumor-associated macrophages press the angiogenic switch in breast cancer. **Cancer Research**, **67**:5064-66.

Liu, H.; Patel, M. R.; Prescher, J. A.; Patsialou, A.; Qian, D.; Lin, J.; Wen, S.; Chang, Y. F.; Bachmann, M. H.; Shimono, Y.; Dalerba, P.; Adorno, M.; Lobo, N.; Bueno, J.; Dirbas, F.M.; Goswami, S.; Somlo, G.; Condeelis, J.; Contag, C. H.; Gambhir, S. S.; Clarke, M. F. 2010. Cancer stem cells from human breast tumors are involved in spontaneous metastases in orthotopic mouse models. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** **107(42)**:18115-18120.

Llaverias, G.; Danilo, C.; Mercier, I.; Daumer, K.; Capozza, F.; Williams, T.M.; Sotgia, F.; Lisanti, M.P.; Frank, P.G. 2011. Role of cholesterol in the development and progression of breast cancer. **The American Journal of Pathology**, **178(1)**:402-12.

Lord, G.M.; Matarese, G.; Howard, J.K.; Baker, R.J.; Bloom, S.R.; Lechler, R.I. 1998. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. **Nature** **394**, 897–901.

Lorden, J.F.; Caudle, A. 1986. Behavioral and endocrinological effects of single injections of monosodium glutamate in the mouse. *Neurobehavior* **Toxicology and Teratology**, **8(5)**:509-19.

Lumeng, C. N.; Bodzin, J. L.; Saltiel, A. R. 2007. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **Journal of Clinical Investigation**, **117**, 175–184.

Lysaght, J.; Van Der Stok, E.P.; Allott, E.H.; Casey, R.; Donohoe, C.L.; Howard, J.M.; McGarrigle, S.A.; Ravi, N.; Reynolds, J.V.; Pidgeon, G.P. 2011. Pro-inflammatory and tumor proliferative properties of excess visceral adipose tissue. **Cancer Letters**, **312**:62-72.

Macia, L.; Delacre, M.; Abboud, G.; Ouk, T.S.; Delanoye, A.; Verwaerde, C.; Saule P.; Wolowczuk, I. 2006. Impairment of dendritic cell functionality and steady-state number in obese mice. **Journal of Immunology**, **177**:5997-6006.

Matarese, G.; Procaccini, C.; De Rosa, V. 2008. The intricate interface between immune and metabolic regulation: a role for leptin in the pathogenesis of multiple sclerosis? **Journal of the Leukocyte Biology**, **84**:893-899.

Meli, R.; Pacilio, M.; Raso, G.M.; Esposito, E.; Coppola, A.; Nasti, A.; Di Carlo, C.; Nappi, C.; Di Carlo, R. 2004. Estrogen and raloxifene modulate leptin and its receptor in hypothalamus and adipose tissue from ovariectomized rats. **Endocrinology**, **145(7)**: 3115-21.

Mendes-da-Cruz, D. A.; Lepelletier, Y.; Brignier, A. C.; Smaniotto, S.; Renand, A.; Milpied, P.; Dardenne, M.; Hermine, O.; Savino, W. 2009. Neuropilins, semaphorins, and their role in thymocyte development. **Annals of the New York Academy of Sciences**, **1153**:20-28.

Miller, F.R. 1983. Tumor subpopulation interactions in metastasis. **Invasion Metastasis**, **3(4)**:234-242.

Minn, A. J.; Gupta, G. P.; Siegel, P. M.; Bos, P. D.; Shu, W.; Giri, D. D.; Viale, A.; Olshen, A. B.; Gerald, W. L.; Massague, J. 2005. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. **Nature** **436(7050)**:518-524.

Naderali, E.K.; Fatani, S.; Williams, G. 2004. Chronic withdrawal of a high-palatable obesity-inducing diet completely reverses metabolic and vascular abnormalities associated with dietary-obesity in the rat. **Atherosclerosis**, **172**:63-9

Naugler, W.E.; Karin, M. 2008. The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer. **Trends in Molecular Medicine**, **14(3)**: 109-19.

Norton, L.; Massague, J. 2006. Is cancer a disease of self-seeding? **Nature Medicine** **12(8)**:875-878, 2006.

OBESITY. **World Health Organization**, 2013. Disponível em <http://www.who.int/topics/obesity/en/>. Acessado em 10 jan. 2014.

Odegaard, J. I.; Chawla, A. 2011. Alternative macrophage activation and metabolism. **Annual Review of Pathology**, **6**:275–97

Odegaard, J.I.; Ricardo-Gonzalez, R.R.; Red Eagle, A.; Vats, D.; Morel, C.R.; Goforth, M.H.; Subramanian, V.; Mukundan, L.; Ferrante, A.W.; Chawla, A. 2008. Alternative M2 activation of Kupffer cells by PPAR delta ameliorates obesity-induced insulin resistance. **Cell Metabolism**, **7**: 496–507.

Olson, L.K.; Tan, Y.; Zhao, Y.; Aupperlee, M.D.; Haslam, S.Z. 2010. Pubertal exposure to high fat diet causes mouse strain-dependent alterations in mammary gland development and estrogen responsiveness. **International Journal of Obesity**, **34**:1415-1426.

O'Shea, D.; Cawood, T.J.; O'Farrelly, C.; Lynch, L. 2010. Natural killer cells in obesity: impaired function and increased susceptibility to the effects of cigarette smoke. **PLoS One** **591**:e8660.

Ouchi, N.; Parker, J.L.; Lugust, J. J.; Walsh, K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. 2011. **Nature Reviews Immunology**, **11**: 85.

Park, H. Y.; Kwon, H. M.; Lim, H.J.; Hong, B.K.; Lee, J.Y.; Park, B.E.; Jang, Y.; Cho, S.Y.; Kim, H.S. 2001. Potential role of leptin in angiogenesis: leptin induces

endothelial cell proliferation and expression of matrix metalloproteinases in vivo and in vitro. **Experimental and Molecular Medicine**, **33**, 95–102.

Park, H.; Kim, M.; Kwon, G.T.; Lim, do Y.; Yu, R.; Sung, M.K.; Lee, K.W.; Daily, J.W.; Park, J.H. 2012. A high-fat diet increases angiogenesis, solid tumor growth, and lung metastasis of CT26 colon cancer cells in obesity-resistant BALB/c mice. **Molecular Carcinogenesis**, **51(11)**: 869-80.

Park, J.; Kusminski, C. M.; Chua, S. C.; Scherer, P. E. 2010. Leptin Receptor Signaling Supports Cancer Cell Metabolism through Suppression of Mitochondrial Respiration in Vivo. **The American Journal of Pathology** **177 (6)**: 3133-44.

Perez, A. R.; Bottasso, O.; Savino, W. 2009. The impact of infectious diseases upon neuroendocrine circuits. **Neuroimmunomodulation**, **16**:96-105.

Poulain-Godefroy, O.; Froguel, P. 2007. Preadipocyte response and impairment of differentiation in an inflammatory environment. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, **356**:662–67.

Prunet-Marcassus, B.; Desbazeille, M.; Bros, A.; Louhce, K.; Delagrangé, P.; Renard, P.; Casteilla, L.; Pénicaud, L. 2003. Melatonin reduces body weight gain in Sprague Dawlwy rats with diet-induced obesity. **Endocrinology**, **144**:5347-52.

Qu, Y.Y.; Dai, B.; Kong, Y.Y.; Chang, K.; Ye, D.W.; Yao, X.D.; Zhang, S.L.; Zhang, H.L.; Yang, W.Y. 2013. Influence of obesity on localized prostate cancer patients treated with radical prostatectomy. **Asian Journal of Andrology**. [Epub ahead of print]

Roberts, D.L.; Dive, C.; Renehan, A.G. 2010. Biological mechanisms linking obesity and cancer risk: new perspectives. **Annual Review of Medicine**, **61**:301-16.

Robertson, S.A.; Leininger, G.M.; Myers, M.G.Jr. 2008. Molecular and neural mediators of leptin action. **Physiological Behavior**, **94**:637-642.

Robinson, S.W.; Dinulesco, D.M.; Cone, R.D. 2000. Genetic models of obesity and energy balance in the mouse. **Annual Review of Genetics**, **34**:687-745.

Samaras, K.; Botelho, N. K.; Chisholm, D. J.; Lord, R. V. 2010. Subcutaneous and visceral adipose tissue gene expression of serum adipokines that predict type 2 diabetes. **Obesity**, **18**; 884–889.

Sánchez-Margalet, V.; Martín-Romero, C.; Santos-Alvarez, J. Goberna, R.; Najib, S.; Gonzalez-Yanes, C. 2003. Role of leptin as an immunomodulator of blood mononuclear cells: mechanisms of action. **Clinical and Experimental Immunology**, **133**, 11–19.

Schipper, H.S.; Prakken, B.; Halkhoven, E.; Boes, M. 2012. Adipose tissue-resident immune cells: key players in immunometabolism. **Trends Endocrinol Metabolism**, **23(8)**:407-15.

Semesiuk, N.I.; Zhylchuk, A.; Bezdenezhnykh, N.; Lykhova, A.; Vorontsova, A.L.; Zhylchuk, V.E.; Kudryavets, Y.I. 2013. Disseminated tumor cells and enhanced level of some cytokines in bone marrow and peripheral blood of breast cancer patients as predictive factors of tumor progression. **Experimental Oncology**, **35(4)**: 295-302.

Shapiro, D. M.; Fugmann, R. A. 1957. A role for chemotherapy as an adjunct to surgery. **Cancer Research** **17(11)**:1098-1101.

Shoelson, S. E.; Lee, J.; Goldfine, A. B. 2006. Inflammation and insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, **116**; 1793–1801.

Sierra-Honigmann, M. R.; Nath, A. K.; Murakami, C.; García-Cardena, G.; Papapetropoulos, A.; Sessa, W. C.; Madge, L. A.; Schechner, J. S.; Schwabb, M. B.; Polverini, P. J.; Flores-Riveros, J. R. 1998. Biological action of leptin as an angiogenic factor. **Science** **281**, 1683–1686.

Simons, P.J.; Van den Pangaart, P.S.; Van Roomen, C.P.; Aerts, J.M.; Boon, L. 2005. Cytokine-mediated modulation of leptin and adiponectin secretion during in vitro adipogenesis: evidence that tumor necrosis factor- α - and interleukin-1 β -treated human preadipocytes are potent leptin producers. **Cytokine** **32**:94–103.

Simpson, E.R.; Brown, K.A. 2013. Obesity and Breast Cancer: a tale of inflammation and dysregulates metabolism. **Molecular Endocrinology**, **27(5)**:715-25

Soria, G.; Ben-Baruch, A. 2008. The inflammatory chemokines CCL2 and CCL5 in breast cancer. **Cancer Letters**, **267**:271–85.

Soria, G.; Ofri-Shahak, M.; Haas, I.; Yaal-Hahoshen, N.; Leider-Trejo, L.; Leibovich-Rivkin, T.; Weitzenfeld, P.; Meshel, T.; Shabtai, E.; Gutman, M.; Ben-Baruch, A. 2011. Inflammatory mediators in breast cancer: coordinated expression of TNF- α & IL-1 β with CCL2 & CCL5 and effects on epithelial to mesenchymal transition. **BMC Cancer**, **11**:130-49.

Subbaramaiah, K.; Howe, L.R.; Bhardwaj, P.; Du, B.; Gravaghi, C.; Yantiss, R. K.; Zhou, X.K.; Blaho, V.A.; Hla, T.; Yang, P.; Kopelovich, L.; Hudis, C.A.; Dannenberg, A.J. 2011. Obesity is associated with inflammation and elevated aromatase expression in the mouse mammary gland. **Cancer Prevention Research (Philadelphia)** **4**:329–46.

Tao, K.; Fang, M.; Alroy, J.; Sahagian, G.G. 2008. Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer. **BMC Cancer**, **8**:228.

Tripsianis, G.; Papadopoulou, E.; Romanidis, K.; Katotomichelakis, M.; Anagnostopoulos, K.; Kontomanolis, E.; Botaitis, S.; Tentes, I.; Kortsaris, A. 2013. Overall survival and clinicopathological characteristics of patients with breast cancer in relation to the expression pattern of HER-2, IL-6, TNF- α , TGF- β 1. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, **14**(11):6813-20.

TYPES of breast cancer. **Breastcancer.org**. 2013. Disponível em <<http://www.breastcancer.org/symptoms/types/idc>>. Acessado em 15 mar. 2014.

Von Diemen, V.; Trindade, E.N.; Trindade, M.R. 2006. Experimental model to induce obesity in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, **21**(6):425-9.

Vona-Davis, L.; Rose, D.P. 2009. Angiogenesis, adipokines and breast cancer. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, **20**:193–201.

Wazir, U.; Sarakbi, W. A. L.; Jiang, W. G.; Mokbel, K. 2012. Leptin and leptin receptor expression. In human breast cancer. **Cancer Research** **72** (24 Suppl): Abstract nr P6-05-11.

Weisberg, S.P.; McCann, D.; Desai, M.; Rosenbaum, M.; Leibel, R.L.; Ferrante, A.W. Jr. 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue **Journal of Clinical Investigation**, **112**, 1796–1808.

Xu, H.; Barnes, G.T.; Yang, Q.; Tan, G.; Yang, D.; Chou, C.J.; Sole, J.; Nichols, A.; Ross, J.S.; Tartaglia, L.A.; Chen, H. 2003. Chronic inflammation in fat plays a crucial

role in the development of obesity-related insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, **112(12)**: 1821–1830.

Xu, H.; Barnes, G.T.; Yang, Q.; Tan, G.; Yang, D.; Chou, C. J.; Sole, J.; Nichols, A.; Ross, J.S.; Tartaglia, L. A.; Chen, H. 2003. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, **112**, 1821–1830.

Yang, H.; Youm, Y.H.; Vandamagsar, B.; Rood, J.; Kumar, K.G.; Butler, A.A.; Dixit, V.D. 2009. Obesity accelerates thymic aging. **Blood**, **114**: 3803-3812.

Zeyda, M.; Gollinger, K.; Kriehuber, E.; Kiefer, F.W.; Neuhofer, A.; Stulnig, T.M. 2010. Newly identified adipose tissue macrophage populations in obesity with distinct chemokine and chemokine receptor expression. **International Journal of Obesity**, **34**:1684–94.

Zhao, Y.; Sun, R.; You, L.; Gao, C.; Tian, Z. 2003. Expression of leptin receptors and response to leptin stimulation of human natural killer cell lines. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, **300**:247-252.

Zhao, Y.; Tan, Y. S.; Aupperlee, M. D.; Langohr, I. M.; Kirk, E. L.; Troester, M. A.; Schwartz, R. C.; Haslam, S. Z. 2013. Pubertal high fat diet: effects on mammary cancer development. **Breast Cancer Research**, **15(5)**:R100.