



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Rosângela Mayer Gonçalves

**O papel central da enzima ciclooxygenase-2 na inflamação do tecido adiposo,
síntese local de estrogênio e carcinogênese mamária em animais expostos à dieta
obesogênica**

Florianópolis

2021

Rosângela Mayer Gonçalves

**O papel central da enzima ciclooxigenase-2 na inflamação do tecido adiposo,
síntese local de estrogênio e carcinogênese mamária em animais expostos à
dieta obesogênica**

Tese submetida ao Programa de Pós Graduação
em Farmacologia da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do título de
Doutora em Farmacologia
Orientador: Prof. Alfeu Zanotto Filho, Dr.
Coorientador: Prof^a. Fabíola Branco Fillipin
Monteiro, Dr^a.

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Gonçalves, Rosângela Mayer

O papel central da enzima ciclooxigenase-2 na inflamação do tecido adiposo, síntese local de estrogênio e carcinogênese mamária em animais expostos à dieta obesogênica. / Rosângela Mayer Gonçalves ; orientador, Alfeu Zanotto Filho, coorientador, Fabíola Branco Fillipin Monteiro, 2021.

104 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Câncer de mama. 3. Obesidade. 4. Tecido adiposo mamário. 5. Inflamação. I. Zanotto Filho, Alfeu. II. Monteiro, Fabíola Branco Fillipin. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Farmacologia. IV. Título.

Rosângela Mayer Gonçalves

**O papel central da enzima ciclooxigenase-2 na inflamação do tecido adiposo,
síntese local de estrogênio e carcinogênese mamária em animais expostos à
dieta obesogênica**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca
examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. José Eduardo da Silva Santos, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Marília Cerqueira Leite Seelaender, Dr.(a)
Universidade de São Paulo

Prof.(a) Patrícia Abrão Possik, Dr.(a)
Instituto Nacional de Câncer

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi
julgado adequado para obtenção do título de doutora em Farmacologia.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof.(a) Alfeu Zanotto Filho, Dr.
Orientador

Florianópolis, 2021

Este trabalho é dedicado ao meu esposo Thomas que sempre esteve ao meu lado, como meu maior incentivador.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao meu marido Thomas por todo apoio que sempre me deu durante esta jornada acadêmica, por sempre estar ao meu lado me incentivando, principalmente nos momentos de dúvida e desânimo. Muito obrigada por ser meu companheiro nessa jornada, por entender as minhas ausências. Obrigada também por ter trazido a Stella, nossa “filhotona” de 4 patinhas, ela que me fez companhia durante o desenvolvimento deste trabalho, me distraíndo e me alegrando.

Agradeço aos meus pais, Rudinei e Anila que sempre me apoiaram e incentivaram, por terem me ensinado a importância do comprometimento com tudo que assumimos fazer. Obrigada por enfrentarem comigo este novo desafio e, acima de tudo, agradeço por estarem sempre ao meu lado, por me concederem um porto seguro para onde eu sempre posso voltar. Gostaria de agradecer ao meu irmão e sua família, aos meus afilhados, obrigada por serem sempre tão carinhosos nos momentos de encontro, e por entenderem minhas ausências.

Um muito obrigado especial ao meu orientador, Dr. Alfeu Zanotto Filho, que durante a minha jornada acadêmica foi quem mais me ensinou, me mostrando como se faz uma pesquisa séria e comprometida. Levarei o teu exemplo de professor e pesquisador comigo, obrigada por compartilhar as tuas experiências, por abrir as portas para o novo. Agradeço por toda a caminhada que tive oportunidade de fazer sob a luz da tua orientação. Agradeço pelas conversas que tivemos durante esses anos, que me deram coragem para continuar perseguindo os meus objetivos.

Agradeço a Dra. Fabíola, por ter sido minha coorientadora, obrigada pelas importantes contribuições realizadas durante este período.

Aos companheiros de bancada quero agradecer, imensamente, por terem tornado os dias mais leves e produtivos, agradeço a Marina, Raquel, Jonathan, Marcelo, Vitória e Tuany, por terem sido excelentes companheiros nesses anos. Em especial quero agradecer a “Mary” e a “Rachel” por terem sido a força que eu precisei, vocês são mulheres fantásticas, pesquisadoras incríveis e amigas sem igual. Obrigada por estarem ao meu lado durante esses anos, obrigada pela amizade além do laboratório.

Agradeço aos colegas/amigos de Departamento, pelos momentos de especial crescimento que compartilhamos. Muito obrigada, aos professores da Farmacologia que sempre estiveram dispostos a compartilhar o que sabem, sempre me acolhendo

com carinho. Agradeço a todos os professores que abriram as portas dos seus laboratórios para que eu pudesse realizar o meu trabalho, proporcionando que eu gerasse dados com maior robustez.

Agradeço ao grupo do Projeto Fritz Müller pelo tanto que tive oportunidade de aprender com vocês. Muito obrigada, Prof. Tonussi, Cris, Prof. Betty, Edu, Fabi e Thomas, olhar para as belezas da natureza ao lado de vocês foi uma experiência que levarei sempre comigo. Vocês me ensinaram que devemos levar a pesquisa para além dos muros da Universidade.

Um agradecimento especial ao CNPq e CAPES pelo apoio financeiro recebido durante o doutorado, à Universidade Federal de Santa Catarina, ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e seus funcionários, ao LAMEB (Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia), LCME (Laboratório Central de Microscopia Eletrônica) e ao Biotério da universidade (Central e Setorial). Agradeço também aqueles que de alguma forma colaboraram para a realização desta etapa e não foram mencionados.

RESUMO

A obesidade é um dos principais fatores de risco associados ao câncer de mama, especialmente em mulheres na pós-menopausa. No tecido mamário de mulheres obesas, a produção de prostaglandina E2 (PGE2), a partir da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2), tem sido correlacionada com inflamação mamária, e biossíntese local de estrogênio através da via da aromatase. Usando um modelo de carcinogênese induzida por 7,12-dimetilbenzantraceno e acetato de medroxiprogesterona (DMBA/MPA) em camundongos, demonstramos que uma dieta obesogênica contendo alto teor de gordura e açúcar (*high-sugar/fat*; HSF) promove inflamação do tecido adiposo mamário (TAM) e produção local de estrogênio, acelerando a formação de tumores mamários por meio de um mecanismo dependente de COX-2. A dieta HSF aumentou os níveis dos mediadores pró-inflamatórios MCP-1, IL-6, COX-2 e PGE2 no TAM, acompanhados pela formação de estruturas conhecidas como “coroas de macrófagos” (*crown-like structures of breast* - CLS-B), assim como pelo aumento dos níveis de aromatase e estrogênio no tecido mamário quando comparado a animais alimentados com dieta padrão. O tratamento com um inibidor seletivo de COX-2, etoricoxibe, diminuiu os níveis de PGE2, IL-6 e MCP-1, e a formação das CLS-B, bem como reduziu os níveis da proteína aromatase e a biossíntese de estrogênio no tecido mamário dos camundongos alimentados com a dieta HSF. Os animais tratados com etoricoxibe combinado com dieta HSF apresentaram aumento no tempo de latência de surgimento e diminuição na incidência de tumores mamários, os quais contribuíram para uma sobrevivência prolongada destes animais quando comparado aos animais alimentados apenas com a dieta HSF. A inibição do processo de angiogênese também parece estar envolvida com o prolongamento da sobrevivência dos animais tratados com o inibidor de COX-2. Além disso, estudos em linhagens de câncer de mama demonstraram que a inibição de COX-2, ou silenciamento por siRNA, não apresentou impacto na viabilidade celular, embora a enzima se mostrou envolvida na invasão celular e produção de secretoma pro-angiogênico. Em conclusão, o aumento da expressão de COX-2 induzida pela dieta obesogênica parece ser suficiente para promover inflamação e biossíntese local de estrogênio, acelerando a formação de tumores mamários em animais. Portanto, nossos dados sugerem que estratégias farmacológicas e não-farmacológicas para reduzir a atividade de COX-2 no tecido

mamário podem mitigar fatores de risco importantes para o câncer de mama em mulheres obesas.

Palavras-chave: ciclooxigenase-2; câncer de mama; obesidade; tecido adiposo mamário; inflamação.

ABSTRACT

Obesity is a major risk factor for breast cancer, especially in post-menopausal women. In the breast tissue of obese women, cyclooxygenase-2 (COX-2)-dependent prostaglandin E2 (PGE2) production has been correlated with inflammation and local estrogen biosynthesis via aromatase enzyme upregulation. Using a *mouse* model of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene combined with medroxyprogesterone-acetate (DMBA/MPA)-induced carcinogenesis, we demonstrated that an obesogenic diet promotes mammary tissue inflammation and local estrogen production, and accelerates mammary tumor formation in a COX-2-dependent manner. High-sugar/fat (HSF) diet augmented the levels of the pro-inflammatory mediators MCP-1, IL-6, COX-2, and PGE2 in the mammary tissue, and this was accompanied by crown-like structures (CLS-B) formation and aromatase/estrogen upregulation. Treatment with a COX-2 selective inhibitor, Etoricoxib, decreased PGE2, IL-6, MCP-1, and CLS-B formation as well as reduced aromatase protein and estrogen levels in the mammary tissue of mice fed a HSF diet. Etoricoxib-treated mice showed increased latency and decreased incidence of mammary tumors, which resulted in prolonged survival when compared to HSF alone. Inhibition of tumor angiogenesis also seemed to account for the prolonged survival of COX-2 inhibitor-treated mice. In conclusion, obesogenic diet-induced COX-2 is sufficient to trigger inflammation, local estrogen biosynthesis, and mammary tumorigenesis. This biological landscape suggests that pharmacological and non-pharmacological strategies to reduce COX-2 activity in the breast tissue may result in decreased expression of diverse breast cancer risk factors in obese women.

Keywords: cyclooxygenase-2; breast cancer; obesity, mammary adipose tissue; inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mudanças no tecido adiposo em quadro de obesidade.	17
Figura 2 – Subtipos moleculares de câncer de mama.	21
Figura 3 – Interações paracrinas entre os macrófagos e outros tipos celulares.	26
Figura 4 - Esquema da via de sinalização da PGE2.	30
Figura 5 – Parâmetros de obesidade no modelo DMBA/MPA.	54
Figura 6 – Caracterização do tecido adiposo.	56
Figura 7 – O inibidor de COX-2, etoricoxibe, retarda a formação de tumores e prolonga a sobrevida no modelo de carcinogênese mamária.	58
Figura 8 – Níveis de COX-2 e PGE2 mediante tratamento com etoricoxibe.	59
Figura 9 – Efeitos das dietas controle e HSF na presença ou ausência de etoricoxibe sobre parâmetros metabólicos em modelo de carcinogênese por DMBA/MPA.	60
Figura 10 – Etoricoxibe retarda a progressão de tumores mamários.	62
Figura 11 – Efeito do tratamento com inibidores de COX-2, celecoxibe e etoricoxibe em linhagens celulares de câncer de mama, <i>in vitro</i>	64
Figura 12 – Efeito dos inibidores de COX-2 sobre características de malignidade tumoral <i>in vitro</i> : invasividade, migração e angiogênese.	66
Figura 13 – Caracterização por IHC dos tumores formados no modelo DMBA/MPA	68
Figura 14 – COX-2 medeia a biossíntese local de estrogênio induzida pela dieta HSF, e o impacto da OVX sobre o desenvolvimento tumoral.	70
Figura 15 – A inibição de COX-2 reduz a formação de CLS-B.	72
Figura 16 – Efeito do etoricoxibe sobre os níveis de citocinas, e imunofluorescência para marcação de macrófagos no TAM.	73
Figura 17 – Representação esquemática resumindo os principais achados no presente estudo.	85

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Desenho experimental das dietas HSF e controle e indução de tumores com DMBA/MPA.	41
Esquema 2 – Desenho experimental do modelo de indução tumoral em animais ovariectomizados (OVX) ou <i>sham</i> nas diferentes dietas e tratamento com inibidor de COX-2.	41
Esquema 3 – Desenho experimental do modelo de dieta HSF e indução tumoral com células de Ehrlich.	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINEs – Anti-inflamatórios não esteroidais
ATP – Adenosina trifosfato
cAMP – Monofosfato cíclico de adenosina
CK14 – Citoqueratina-14
CLS-B – do inglês *Crown like structure of Breast*
COX – Ciclooxygenase
CT – Colesterol total
DAB – 3,3-Dimaminobenzidina
DAG – Diacilglicerol
DMBA – 7,12-dimetilbenzantraceno
DMEM – do inglês: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
DMSO – Dimetilsulfóxido
ECM – Matriz extracelular
EGF – Fator de crescimento epidermal
EMT – Transição epitélio-mesenquimal
EP – Receptor de Prostaglandina E2
GLU – Glicose
GSK3 – Glicogênio sintase cinase 3
H&E – Hematoxilina & eosina
HER2 – Receptor do fator de crescimento epidermal 2
HIF-1 – Fator induzido por hipóxia-1
HSF – *High-sugar/fat*
IHC – Imuno-histoquímica
IL-10 – Interleucina-10
IL12-p70 – Interleucina 12-p70
IL-1 β – Interleucina-1 β
IL-4 – Interleucina 4
IL-6 – Interleucina-6
IL-8 – Interleucina 8
IMC – Índice de massa corporal
IP₃ – Trisfosfato de Inositol 3

LPS – Lipopolissacarídeo
MC – Meio condicionado
MCP-1 – Proteína quimiotática para monócitos-1
MPA - Acetato de medroxiprogesterona
MTT - (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio brometo)
NF- κ B – Fator nuclear *kappa* B
OMS – Organização Mundial da Saúde
OVX – Ovariectomia
PFA – Paraformaldeído
PG – Prostaglandina
PGE2 – Prostaglandina E2
PGI2 – Prostaciclina
PI3K – Fosfoinosítídeo 3-cinase
PKA – Proteína cinase A
PKC – Proteína quinase C
RE – Receptor de estrogênio
RP – Receptor de progesterona
SFB – Soro fetal Bovino
TAM – Tecido adiposo mamário
TARP – Tecido adiposo Retroperitoneal
TAV – Tecido adiposo visceral
TG – Triglicerídeos
TGF- α – Fator de crescimento transformador- α
TLR4 – Receptor do tipo *toll-4*
TNBC – Câncer de mama triplo negativo (do inglês: *Triple-negative breast cancer*)
TNF- α – Fator de necrose tumoral-alfa
VEGF – Fator de crescimento endotélio vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	OBESIDADE E TECIDO ADIPOSEO	15
1.2	CÂNCER DE MAMA.....	19
1.3	OBESIDADE E CÂNCER DE MAMA: BASES MOLECULARES.....	23
1.4	VIA DA COX-2/PGE2: BIOLOGIA, FARMACOLOGIA E ENVOLVIMENTO EM CANCER DE MAMA.	27
2	JUSTIFICATIVA	34
3	HIPÓTESE	35
4	OBJETIVOS	36
4.1	OBJETIVO GERAL.....	36
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
5	MATERIAL E MÉTODOS	38
5.1	ANIMAIS.....	38
5.2	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	38
5.2.1	Dietas	38
5.2.2	Indução de tumor de mama por DMBA/MPA e tratamento farmacológico	39
5.2.3	Protocolo de ovariectomia bilateral (OVX)	40
5.2.4	Desenhos experimentais	41
5.2.5	Modelo Implante Ortotrópico de Tumor de Ehrlich	42
5.2.6	Ingesta calórica, eficiência alimentar e adiposidade	43
5.2.7	Coleta dos tecidos	44
5.2.8	Parâmetros bioquímicos	44
5.2.9	Histologia por coloração de H&E	44
5.2.10	Cultivo <i>ex-vivo</i> do tecido adiposo mamário	45
5.2.11	Determinação de citocinas por citometria de fluxo	45
5.2.12	Quantificação de PGE2 e 17β-estradiol por ELISA	46
5.2.13	Imunodeteccção de proteínas por <i>Western blot</i>	46
5.2.14	Imuno-histoquímica (IHC)	47
5.2.15	Imunofluorescência	48
5.2.16	Cultivo celular	48
5.2.17	RNA de Interferência (siRNA)	49

5.2.18	Viabilidade celular	49
5.2.19	Ensaio de invasão celular	49
5.2.20	Preparo do meio condicionado e angiogênese <i>in vitro</i>	50
5.2.21	Ensaio de migração celular	51
5.2.22	Bioinformática	51
5.2.23	Análises estatísticas	52
6	RESULTADOS	53
6.1	PARÂMETROS DE ADIPOSIDADE, METABOLISMO, INFLAMAÇÃO E TUMORIGÊNESE EM CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM DIETA HSF E EXPOSTOS AO PROTOCOLO DMBA/MPA.....	53
6.2	A INIBIÇÃO DE COX-2 REDUZ OS NÍVEIS MAMÁRIOS DE PGE2, AUMENTA A LATÊNCIA TUMORAL E PROLONGA A SOBREVIVÊNCIA DOS CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM A DIETA HSF	57
6.3	A INIBIÇÃO DE COX-2 DIMINUI A PROGRESSÃO DE TUMORES MAMÁRIOS ASSOCIADO COM A INIBIÇÃO DA ANGIOGÊNESE E INVASÃO, E INDEPENDENTE DE EFEITOS NA VIABILIDADE CELULAR.....	60
6.4	O INIBIDOR DE COX-2 DIMINUI OS NÍVEIS DE AROMATASE E ESTROGÊNIO NO TAM DOS CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM DIETA HSF	67
6.5	ETORICOXIBE REDUZ OS NÍVEIS DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS E A FORMAÇÃO DAS CLS-B NO TAM DOS CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM DIETA HSF.....	71
7	DISCUSSÃO	74
8	CONCLUSÃO	86
9	REFERÊNCIAS.....	87
	ANEXO A – ARTIGO	101
	ANEXO B – ARTIGOS EM COLABORAÇÃO.....	102

1 INTRODUÇÃO

1.1 OBESIDADE E TECIDO ADIPOSEO

A obesidade é definida como um acúmulo excessivo de gordura que apresenta risco para a saúde, pois está acompanhada por inflamação sistêmica leve e crônica. É o resultado da interação entre diferentes fatores, incluindo componentes genéticos, metabólicos, comportamentais e ambientais. A atual classificação, segundo o índice de massa corporal (IMC), sugere diferentes graus, de acordo com o peso e altura [peso (kg) / altura (m) * altura (m)]. Indivíduos com sobrepeso apresentam IMC igual ou maior que 25 kg/m² e representam cerca de 39% dos adultos no mundo, cerca de 1,9 bilhões de pessoas, das quais, 650 milhões são classificadas como indivíduos com obesidade (IMC ≥ 30 kg/m²) (OMS, 2021). Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) (2021), a obesidade está mais prevalente em mulheres do que em homens, 14,9 e 10,8%, respectivamente. Os impactos sociais gerados pela obesidade são maiores que os da fome ou da desnutrição (GONZÁLEZ-MUNIESA et al., 2017). Dados brasileiros sobre obesidade indicam que 20% da população >18 anos é classificada como obesa, com IMC >30 kg/m². E 55,4% da população é composta por indivíduos com sobrepeso (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

A principal função do tecido adiposo é armazenar energia e o excesso de carboidratos da dieta para períodos de necessidade energética, como no estado de jejum. No entanto, com o atual aumento da disponibilidade e ingestão calórica, associada ao sedentarismo, ocorre um significativo desbalanço entre consumo e gasto calórico, o que acaba levando ao sobrepeso e obesidade (GUZIK et al., 2017). De modo geral, as complicações trazidas pela obesidade agravam outras doenças, principalmente, quando ocorre maior acúmulo no tecido adiposo visceral (DESPRÉS; LEMIEUX, 2006; ROSEN; SPIEGELMAN, 2014). No tecido adiposo, o adipócito é a célula responsável por estocar o excesso de carboidratos, em forma de triglicerídeos (TG) (DESPRÉS; LEMIEUX, 2006; KARPE; PINNICK, 2015). Quando um adipócito atinge seu limite de hipertrofia, ele entra em necrose e extravasa o seu conteúdo em forma de ácidos graxos livres (HOWE et al., 2013). Por muito tempo o tecido adiposo foi considerado apenas um órgão estoque, até que em meados de 1994, Zhang e

colaboradores identificaram sua função endócrina, ou seja, além de estocar energia em forma de TG nos adipócitos, ele é capaz de sintetizar e secretar fatores que permitem sua interação endócrina com outros órgãos (ZHANG et al., 1994). Entre as substâncias secretadas estão os hormônios, como a leptina e adiponectina, e as citocinas, como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) (HOTAMISLIGIL; SHARGILL; SPIEGELMAN, 1993) e a interleucina 6 (IL-6), entre outras (FANTUZZI, 2005; HAUNER, 2004; PEINADO et al., 2012; WAJCHENBERG, 2000). Além das funções inflamatórias, as adipocinas e citocinas têm variadas funções fisiológicas, tais como: controle da ingesta alimentar, homeostase energética, aumento da sensibilidade à insulina, angiogênese, proteção vascular e regulação da pressão arterial (HAVEL, 2004) (Fig. 1).

A leptina é majoritariamente expressa nos adipócitos e sua principal função é ativar, no sistema nervoso central, a homeostase energética. Ela se liga ao receptor de leptina (Lep-R), no hipotálamo, inibindo a liberação de peptídeos orexigênicos (neuropeptídeo Y e peptídeo relacionado à proteína Agouti-AGRP)), e estimulando a liberação de peptídeos anorexigênicos (corticotrofina –CRH; pró-opiomelanocortina – POMC), o que resulta em uma redução da ingesta alimentar (FRIEDMAN, 2019; KALRA et al., 1999). Em homeostase, a leptina é responsável pelo controle da ingesta alimentar, mantendo o peso corporal e o dispêndio energético em níveis adequados. Como majoritariamente é produzida nos adipócitos, seus níveis são positivamente relacionados com a quantidade de gordura corporal, e esses níveis são regulados por alterações nutricionais e hormonais (CARO et al., 1996; FRIEDMAN, 2019). O problema mais recorrente na obesidade é a perda de função do receptor da leptina, que resulta na resistência à leptina e ocasiona um excesso de ingesta alimentar (GUYENET; SCHWARTZ, 2012). A leptina possui efeitos pró-inflamatórios, promovendo a produção de IFN- γ e estimulando as células T, assim como contribui no processo de diferenciação dos macrófagos, estimulando o fenótipo pró-inflamatório que é responsável pela liberação de citocinas como TNF- α e IL-6 (KULKARNI; BOWERS, 2021; LOFFREDA et al., 1998) (Fig.1).

A adiponectina, por sua vez, também é produzida no adipócito, mas está negativamente relacionada à quantidade de gordura corporal (HOTTA et al., 2001). Seus níveis são encontrados elevados em indivíduos com peso considerado adequado. A adiponectina aumenta a sensibilidade à insulina, aumenta a oxidação de

ácidos graxos no fígado e músculos e diminui a expressão de proteínas de adesão (antiaterogênicas) (KERSHAW; FLIER, 2004). A presença da adiponectina reduz os níveis de $\text{TNF-}\alpha$, diminui a quimiotaxia de macrófagos, aumenta a produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, e inibe as pró-inflamatórias, como IL-6. Indivíduos com obesidade ou com resistência à insulina tem redução nos níveis circulantes de adiponectina (SPRANGER et al., 2003) (Fig.1).

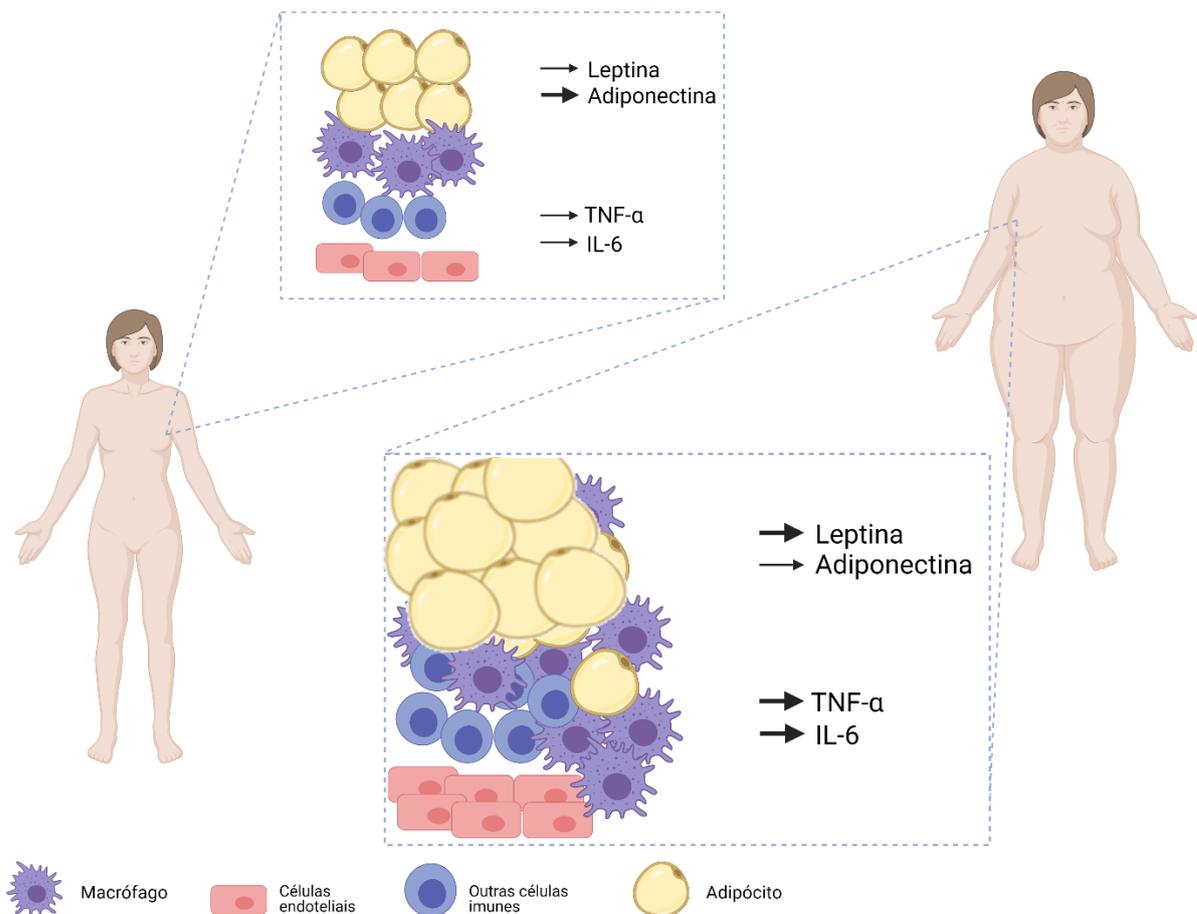


Figura 1 - Mudanças no tecido adiposo em quadro de obesidade.

O tecido adiposo pode ser fracionado em adipócitos, contendo lipídeos, e na fração do estroma, que contém os pré-adipócitos, macrófagos, outras células imunes e células endoteliais. No estado obeso, há um aumento no tamanho e número dos adipócitos bem como aumento na quantidade de células inflamatórias na fração estromal. Essas mudanças na composição do tecido adiposo resultam no aumento da secreção de leptina e citocinas inflamatórias, com diminuição na secreção de adiponectina. IL-6 - interleucina-6; $\text{TNF}\alpha$ – fator de necrose tumoral- α . (Adaptação da autora com BioRender.com (KHANDEKAR; COHEN; SPIEGELMAN, 2011))

O tecido adiposo é constituído por diferentes tipos celulares e, entre os principais componentes responsivos às alterações hormonais e inflamatórias do tecido adiposo estão os macrófagos (FANTUZZI, 2005; LUMENG; BODZIN; SALTIEL, 2007). O tecido adiposo hipertrofiado secreta adipocinas que podem induzir e manter uma ativação de baixo-grau do sistema imune inato. Entre os fatores secretados para atrair as células imunes para o tecido adiposo, a proteína quimiotáxica para monócitos-1 (MCP-1) tem sido demonstrada como crucial no processo de infiltração de macrófagos (DOMMEL; BLÜHER, 2021; FAIN, 2006; KHANDEKAR; COHEN; SPIEGELMAN, 2011). A liberação de fatores de atração como a MCP-1 resulta no aumento do número de macrófagos presentes no tecido adiposo de indivíduos obesos, quando comparado com indivíduos magros. Porém, além das diferenças quantitativas no número de macrófagos, os indivíduos normoponderais possuem macrófagos uniformemente pequenos, isolados/dispersos e em fenótipo inativado. Enquanto que os macrófagos de indivíduos obesos são ativados para um perfil pró-inflamatório, e formam agregados ao redor dos adipócitos que originam as estruturas em forma de coroa (CLS) (WEISBERG et al., 2003).

Acredita-se que o mecanismo subjacente à formação das CLS envolve a presença de tecido adiposo inflamado e em hipóxia, devido à hipertrofia dos adipócitos, os quais ocasionam uma redução na vascularização resultando em necrose celular. Esse estado hipóxico estimula a formação de novos vasos através do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e ativa o fator induzido por hipóxia 1 (HIF-1) (TRAYHURN; WOOD, 2005). A hipóxia e a consequente ativação de macrófagos pró-inflamatórios promovem aumento na produção de adipocinas, secreção de citocinas pró-inflamatórias (CANCELLO et al., 2005) e prostaglandinas (SUBBARAMAIAH et al., 2012) no microambiente do tecido adiposo, podendo, até mesmo, ter impacto sistêmico (OUCHI et al., 2011). Essa inflamação subclínica e crônica observada em indivíduos obesos parece contribuir significativamente para o estabelecimento e agravamento de diversas doenças do sistema cardiovascular, diabetes, câncer e, até mesmo, infecções por vírus como o SARS-CoV2 (STEFAN; BIRKENFELD; SCHULZE, 2021).

1.2 CÂNCER DE MAMA

Câncer é o termo utilizado para identificar um grande número de doenças que têm em comum a habilidade de proliferação celular descontrolada. Associado a esse aumento proliferativo, outros fenótipos típicos do câncer foram estabelecidos, como a evasão imunológica, imortalidade celular, promoção de inflamação, capacidade de metástase, angiogênese, instabilidade genômica e mutações, resistência à morte celular e, finalmente, desregulação da bioenergética celular (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

O desenvolvimento do câncer requer várias etapas, sendo as 3 principais: i) Iniciação, que requer mudanças estáveis no genoma celular (mutações, deleções ou ampliações gênicas) podendo ser espontâneas ou induzidas por exposição ambiental; ii) Promoção, fase em que ocorre proliferação do clone celular mutado pela constante exposição ao agente promotor e; iii) Progressão, fase irreversível em que novas alterações genômicas se somam a mudanças no microambiente tumoral, processos de pressão seletiva e seleção clonal, resultando em uma população de células malignas bem adaptadas e com alto potencial de invasão tecidual e semeadura metastática (BASU, 2018).

Com relação aos números relacionados à incidência de câncer, levantamento recente indicou que em 2018 foram contabilizados 18,1 milhões de novos casos, e 9,6 milhões de mortes por câncer mundialmente (FERLAY et al., 2019). Entre as mulheres, o câncer de mama é o de maior ocorrência e, surpreendentemente, 70% das mortes por câncer de mama ocorrem em países em desenvolvimento; aumento que acredita-se estar associado à maior expectativa de vida, urbanização e adoção do estilo de vida ocidental (LEE et al., 2012). No Brasil, para 2020, foi estimado que o câncer de mama contabilizaria 29,7% dos casos de câncer entre as mulheres, sendo o tipo tumoral mais incidente entre elas. Em 2018, o índice de mortalidade para o câncer de mama foi de 16,4%, com 18.068 mortes. Ainda, estima-se que para cada ano do triênio 2020-2022, irão ocorrer 66.280 novos casos de câncer de mama, no Brasil (INCA, 2019).

O câncer de mama é uma doença heterogênea que compreende uma grande diversidade de tipos celulares e alterações genéticas (DAI et al., 2016). Uma das

classificações mais utilizadas clinicamente, é realizada de acordo com as características moleculares do tumor mamário em análise de imuno-histoquímica (IHC). Com relação à expressão dos receptores de estrogênio (RE), de progesterona (RP) e do receptor do fator de crescimento epidermal 2 (do inglês: *Human Epidermal growth factor receptor-type 2* - HER2); e também o câncer de mama triplo-negativo (do inglês: *Triple-negative breast cancer* - TNBC), que não expressa nenhum dos 3 receptores citados anteriormente (ANDERSON; SCHWAB; MARTINEZ, 2014). Além da classificação imuno-histoquímica, perfis moleculares obtidos a partir de dados de transcriptoma, e análise de preditores Pam50, classificam os tumores de mama nos subtipos Luminal A, Luminal B, Her2-enriquecido, tipo-Basal e tipo-Normal (PARKER et al., 2009; RAJ-KUMAR et al., 2019). O subtipo luminal A é o mais frequente e menos agressivo, dado que o diagnóstico tende a ocorrer em estadiamento inicial e pelo fato de expressar receptores hormonais tipo RE (e/ou RP), o que permite controle farmacológico por tratamento adjuvante com tamoxifeno (Fig.2). No outro extremo encontram-se os tumores tipo basal, os quais possuem uma boa sobreposição molecular com o subtipo histológico TNBC, sendo diagnosticados em estadiamento mais avançado, e sendo tratados com quimioterapia citotóxica, uma vez que não são sensíveis a terapia antiestrogênica ou anti-HER2 (WOLFF et al., 2013) (Fig. 2). Entretanto, a aplicação e relevância clínica dos subtipos moleculares está em estudo e, na maior parte do mundo, as decisões terapêuticas são baseadas em histologia e imuno-histoquímica para RE, RP, HER2 e Ki67.

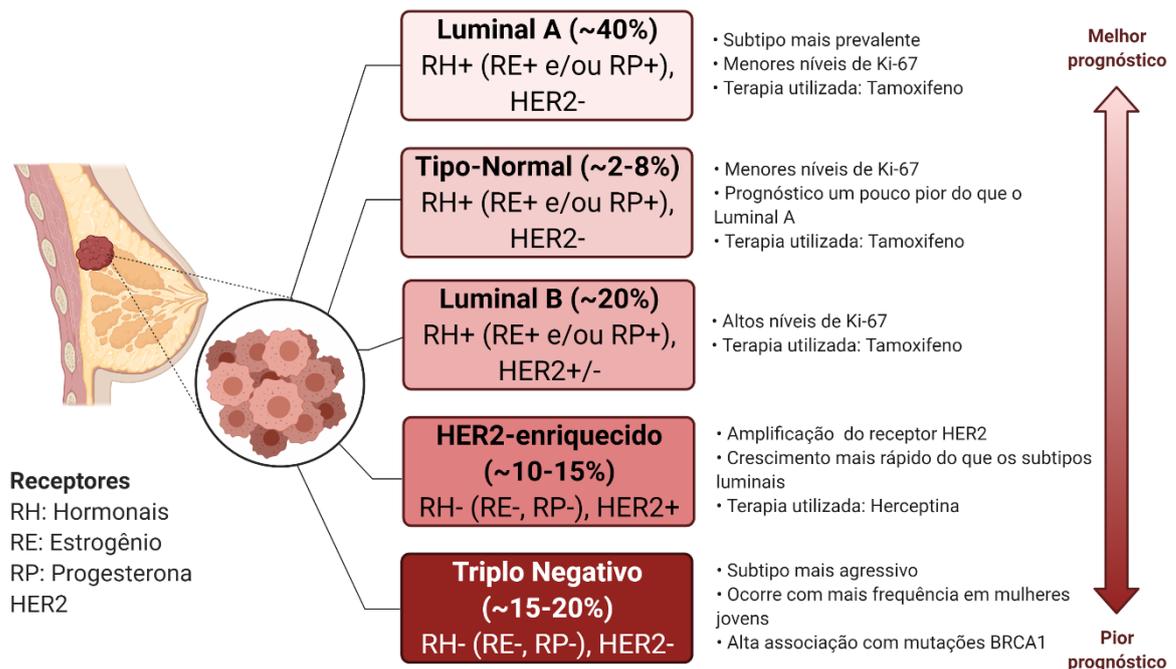


Figura 2 – Subtipos moleculares de câncer de mama.

Classificação baseada nos marcadores moleculares, diferenciando de acordo com os receptores ativos. Modelo que apresenta os quatro subtipos bem conhecidos (Luminal A, Luminal B, HER2-superexpresso e Triplo-negativo). (Criado pela autora com BioRender.com).

No contexto dos cânceres de mama associados à obesidade, tema desta tese, destaca-se o papel do estrogênio. O estrogênio tem um importante papel em diversos processos fisiológicos, incluindo regulação do metabolismo energético, resposta ao estresse, bem como no desenvolvimento das características sexuais. Em mulheres na pré-menopausa, o estrogênio é produzido predominantemente nos ovários (CUI; SHEN; LI, 2013). O hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) é liberado pelo hipotálamo estimulando a secreção do hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH). O FSH, por sua vez, estimula a biossíntese de estrogênio nos folículos ovarianos em crescimento, que então age no hipotálamo para induzir a produção de LH. A liberação aguda de LH ativa a ovulação e o desenvolvimento do corpo lúteo, sendo que todo esse processo está relacionado com o período reprodutivo da mulher (KELSEY; GAMMON; JOHN, 1993). Além da participação no controle do ciclo estral, o estrogênio também foi descrito como indutor do desenvolvimento de tumores mamários em experimentos com roedores e, por exercer efeito proliferativo tanto direta quanto indiretamente, no cultivo de células humanas de

câncer de mama (LUPULESCU, 1993). O efeito direto na iniciação tumoral pode ocorrer através da indução de enzimas e proteínas envolvidas na síntese de DNA e através da ativação de oncogenes. Já o efeito indireto pode ocorrer através do estímulo da secreção de prolactina e pela produção de fatores de crescimento como fator de crescimento transformador- α (TGF- α) e o fator de crescimento epidermal (EGF) (CLEMONS; GOSS, 2001). O efeito do estrogênio sobre a regulação gênica e proliferação celular é mediado por dois receptores, RE α e RE β , que pertencem à superfamília de receptores nucleares e funcionam como fatores de transcrição regulados por ligantes. Cerca de 70% dos tumores mamários humanos expressam RE α (LU; KATZENELLENBOGEN, 2017). O RE α tem grande importância no desenvolvimento tumoral, e é utilizado como um biomarcador molecular, para determinar o uso ou não de terapia endócrina (THOMAS; GUSTAFSSON, 2011). A terapia endócrina consiste principalmente no uso de tamoxifeno, antagonista dos receptores de estrogênio na mama.

Após a menopausa a produção ovariana de estrogênio é reduzida para níveis insignificantes. No entanto, é paradoxal, que a maioria dos cânceres de mama RE- positivo ocorram após a menopausa, quando os níveis circulantes de estrogênio são menores. Por outro lado, o estrogênio pode ser sintetizado a partir de outros precursores hormonais, como a progesterona, que pode ser convertida à androstenediona, e essa é convertida à testosterona e então aromatizada em estradiol. Esse processo ocorre localmente na mama e é conhecido como síntese periférica de estrogênio. Essa biossíntese local de estrogênio na mama, e o aumento dos níveis do mesmo no sangue podem estar diretamente associados com o estímulo à proliferação de células mutadas (LARIONOV; BERSTEIN; MILLER, 2002), de modo que o estrogênio atua como promotor e não iniciador tumoral.

A biossíntese do estrogênio ocorre pela ação da enzima aromatase que catalisa um dos passos finais na conversão dos andrógenos em estrogênio (SEBASTIAN; BULUN, 2001). A aromatase é normalmente expressa em tecidos como cérebro, tecido adiposo, placenta, vasos sanguíneos e pele (MOLEHIN et al., 2021; SIMPSON et al., 1994). Sua expressão no tecido adiposo é sugerida como o principal componente molecular promotor de tumores dependentes de estrogênio depois da menopausa (BROWN et al., 2017; THOMAS; GUSTAFSSON, 2011).

Como vimos acima, os fatores hormonais tem grande importância no desenvolvimento tumoral, sendo que, entre os fatores etiológicos podemos destacar a idade da primeira menstruação, idade do primeiro filho, tempo de amamentação, idade da menopausa, sobrepeso, histórico familiar, uso de álcool, uso de contraceptivos orais, terapia hormonal para menopausa (BARNARD; BOEKE; TAMIMI, 2015) e exposição à radiação (YALCIN, 2013), bem como estilo de vida e fatores ambientais (RUDOLPH; CHANG-CLAUDE; SCHMIDT, 2016).

Dentro do estilo de vida, o consumo de uma dieta não saudável, que muitas vezes resulta em obesidade, é um fator central para o desenvolvimento de tumores (DANAIEI et al., 2005). O ganho de peso por si só é um dos principais fatores de risco para o câncer de mama, especialmente depois da menopausa. Mulheres que têm um aumento de peso de até 20 kg durante a vida adulta dobram o risco de desenvolver a doença (VRIELING et al., 2010). Neste contexto, há estudos clínicos que demonstram uma correlação significativa entre a obesidade e a incidência de câncer de mama, especialmente em mulheres na pós-menopausa (NAMAZI et al., 2019; SIMPSON; BROWN, 2013). Em modelo animal de camundongos BALB/c fêmea submetidas a uma dieta *high fat* (60% kcal de gordura) observou-se um aumento na proliferação de células epiteliais da glândula mamária, com redução no tempo latência tumoral e aumento da vascularização dos tumores formados; os quais foram acompanhados pela expressão de genes inflamatórios e de fatores de crescimento celular (ZHAO et al., 2013).

1.3 OBESIDADE E CÂNCER DE MAMA: BASES MOLECULARES

Desde a constatação da correlação entre obesidade e câncer de mama, muitos pesquisadores voltaram esforços para identificar os mecanismos que estabelecem a obesidade como um fator de risco para o desenvolvimento de tumores da mama. Como acima mencionado, a enzima aromatase é a principal responsável pela biossíntese de estrogênio em outros tecidos, que não o ovário (MCTIERNAN et al., 2006). No contexto do câncer de mama, o tecido adiposo mamário (TAM) é quem parece estar envolvido na síntese local do estrogênio, o qual atua como agente promotor da proliferação das células neoplásicas. Em pacientes obesas, o aumento

dos níveis de aromatase não se dá apenas pela presença do tecido adiposo, mas principalmente pela inflamação associada a ele (BOWERS et al., 2015; SUBBARAMAIAH et al., 2012). Na investigação dos possíveis mecanismos, foi hipotetizado que a PGE2 produzida no microambiente tumoral poderia estimular a atividade da aromatase no tecido adiposo (SUBBARAMAIAH; HUDIS; DANNENBERG, 2011). Para isso, foram utilizadas culturas com tecido adiposo subcutâneo de mulheres submetidas a abdominoplastia. Esse tecido foi tratado com PGE2 *ex-vivo*, e o que se observou foi um aumento na atividade da aromatase na presença de PGE2, enquanto o tecido sem o tratamento com PGE2 não apresentou atividade (ZHAO et al., 1996). Em estudos posteriores, a expressão da aromatase foi correlacionada positivamente com a expressão da enzima COX-2, produtora da PGE2, e com o tamanho tumoral em amostras de tumores mamários. Os autores sugeriram que um mecanismo parácrino e autócrino estaria envolvido no desenvolvimento de tumores hormônio dependentes, através da biossíntese local de estrogênio (BRUEGGEMEIER et al., 1999).

A obesidade é um fator de risco para o desenvolvimento de câncer de mama com receptor hormonal positivo em mulheres na pós-menopausa (CLEARY; GROSSMANN, 2009; HULKA; MOORMAN, 2008; KRUIJSDIJK; WALL; VISSEREN, 2009). Em humanos, a obesidade causa uma inflamação subclínica no tecido adiposo (CANCELLO et al., 2005; CINTI et al., 2005; KRUIJSDIJK; WALL; VISSEREN, 2009), caracterizada pela presença de adipócitos necróticos circundados por macrófagos, formando as CLS (CINTI et al., 2005; MCNELIS; OLEFSKY, 2014; MURANO et al., 2008; WEISBERG et al., 2003). Esses macrófagos produzem uma grande variedade de mediadores pró-inflamatórios (MCNELIS; OLEFSKY, 2014; SUGANAMI; OGAWA, 2010; XU et al., 2003). Nas mulheres obesas, níveis aumentados de mediadores pró-inflamatórios são encontrados na circulação e podem contribuir com a progressão tumoral e mortalidade (BACHELOT et al., 2003; DANDONA et al., 1998; VOZAROVA et al., 2001). A presença das CLS no TAM é proposta como biomarcador para o aumento no risco de câncer de mama e também como um indicativo de mau prognóstico em pacientes diagnosticadas (MORRIS et al., 2011).

Não exclusivo ao contexto da obesidade, a presença das CLS também foi positiva/aumentada no tecido adiposo de mulheres com IMC normal em pós-menopausa, mas com parâmetros bioquímicos típicos de obesidade metabólica.

Essas mulheres possuíam uma maior massa gorda, com altos níveis de expressão de aromatase em tecido mamário e adipócitos hipertrofiados, indicando uma disfunção metabólica sistêmica independente de um IMC de sobrepeso ou obesidade (IYENGAR et al., 2017, 2018). A expressão de marcadores inflamatórios, como as citocinas TNF- α e MCP-1, e PGE2, foi encontrada aumentada em mulheres na pós-menopausa independente do IMC (IYENGAR; HUDIS; DANNENBERG, 2015). Dito isso, foi sugerido que a medida do IMC pode não ser a ideal para prever as alterações do tecido adiposo que predispõem a neoplasias da mama. Esses estudos dão um importante destaque à presença das CLS, no TAM e, como vimos, as CLS são formadas pelo recrutamento de um grande número de macrófagos. Os macrófagos presentes em CLS produzem diversos mediadores que alteram o microambiente da mama, e entre eles está a PGE2. Uma vez secretada no microambiente do tecido adiposo, a PGE2 ativa os receptores EP, localizados nos pré-adipócitos, e, pela ativação da via cAMP-PKA, estimula a expressão da aromatase (gene CYP19), resultando em aumento da síntese local de estrogênio. O estrogênio formado atua como promotor da proliferação de células previamente mutadas (BOWERS et al., 2014; HOWE et al., 2013; SUBBARAMAIAH et al., 2012; SUNDARAM; JOHNSON; MAKOWSKI, 2013) (Fig. 3).

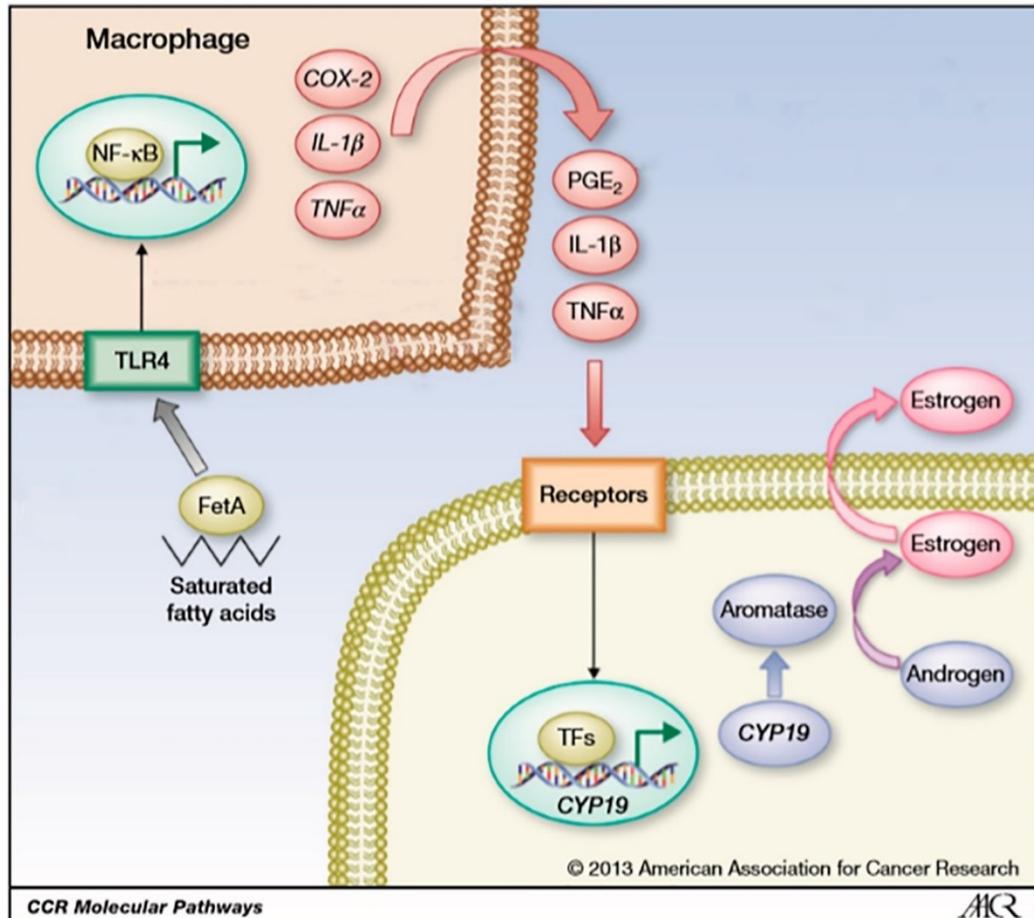


Figura 3 – Interações paracrinas entre os macrófagos e outros tipos celulares.

As interações entre os macrófagos e as células proximais estabelecem um ambiente inflamatório no TAM obeso, resultando em ativação da expressão de genes dependentes de $RE\alpha$. Os ácidos graxos liberados pelos adipócitos, como resultado da lipólise associada a obesidade, se complexam com Fetuina-A (FetA) e ativam a sinalização do receptor TLR4, resultando em aumento da atividade de NF- κ B nos macrófagos. NF- κ B induz a expressão de genes pró-inflamatórios incluindo COX-2, IL-1 β e TNF- α em macrófagos. Citocinas e PGE₂ produzida por COX-2 ativam a transcrição do gene CYP19 que codifica aromatase em células próximas, como os pré-adipócitos, levando à uma elevada expressão e ativação de aromatase. Consequentemente, a biossíntese de estrogênio é aumentada, que se manifesta pelo aumento na expressão dos genes dos receptores RE. Consequências da inflamação do tecido adiposo incluem aumento nos níveis de citocinas circulantes bem como acúmulo de PGE₂ (fonte: HOWE et al., 2013).

Não exclusivo ao estrogênio, o estado inflamatório crônico não apenas contribui para o aparecimento de resistência à insulina e doenças cardiovasculares, mas também parece estimular a proliferação e progressão de células malignas. Moléculas pró-inflamatórias favorecem a multiplicação celular. A hipertrofia do tecido adiposo ocasiona aumento nos níveis circulantes de fatores de crescimento, citocinas e adipocinas, como leptina, TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-1 β (HARVEY; LASHINGER;

HURSTING, 2011). A leptina, por exemplo, pode estimular a via de transição epitélio-mesenquimal (EMT), típica de cânceres em progressão metastática (RIOS GARCIA et al., 2017). O papel do ambiente inflamatório na progressão tumoral é reforçado pelos estudos com inibidores de aromatase, os quais não apresentaram resultados satisfatórios na inibição da progressão tumoral e das recidivas em pacientes obesas (GNANT et al., 2013; SESTAK et al., 2010), sugerindo que não apenas o estrogênio local, mas também os mediadores inflamatórios presentes no microambiente mamário podem estar contribuindo para a oncogênese em obesas. A falha dos inibidores de aromatase aponta para a possibilidade de abordagem da via inflamatória na prevenção e inibição da recidiva em pacientes obesas. Nesse contexto, as ciclooxigenases podem ser alvos promissores na tentativa de reduzir a inflamação do TAM em obesas (DIORIO et al., 2012).

1.4 VIA DA COX-2/PGE2: BIOLOGIA, FARMACOLOGIA E ENVOLVIMENTO EM CANCER DE MAMA.

Dentre os constituintes do microambiente tumoral e do TAM de obesas, destacamos a presença dos prostanoídes, que tem um importante papel na inflamação estudada nesta tese. Os prostanoídes são um grupo de mediadores lipídicos que incluem as prostaglandinas e os tromboxanos. Sob estímulo celular, os prostanoídes são sintetizados a partir do ácido araquidônico pela ação das COX e liberados para o meio extracelular, exercendo várias atividades fisiológicas e patológicas em diferentes tipos celulares (TSUBOI; SUGIMOTO; ICHIKAWA, 2002) (Fig. 4). A família das COX compreende 3 isoenzimas: a COX-1 (constitutiva), COX-2 (induzida) e a COX-3 (SIMMONS; BOTTING; HLA, 2004). A ciclooxigenase-1 (COX-1) é expressa constitutivamente na maioria dos tecidos, enquanto que, muitos tecidos saudáveis não apresentam expressão em níveis detectáveis de COX-2. Embora alguns tecidos como o rim e o endotélio vascular expressem constitutivamente a COX-2, sua produção é tipicamente associada com ambientes inflamatórios, o que a torna um dos alvos farmacológicos mais importantes no tratamento de quadros inflamatórios, e de dor associada à inflamação (DUBOIS et al., 1998).

Entre os prostanoides, a PGE2 é encontrada aumentada nos tumores de mama, e é descrita como participante da progressão tumoral (BOWERS; DEGRAFFENRIED, 2015). As prostaglandinas possuem meia vida curta, por isso sua ação acaba ocorrendo localmente de maneira autócrina ou parácrina, interagindo com os receptores específicos localizados nos tecidos proximais (SOBOLEWSKI et al., 2010). A PGE2 age em receptores de membrana acoplados a proteína G, denominados EP1, EP2, EP3 e EP4. A ativação dos diferentes receptores resulta em diferentes respostas biológicas. EP1 é acoplado à proteína Gq, sendo seu segundo mensageiro o trifosfato de inositol (IP₃) e o diacilglicerol (DAG), que são responsáveis pela mobilização de cálcio e proteína quinase C (PKC), que por sua vez ativa as respostas intracelulares como exocitose em células endócrinas e contração muscular (KAWAHARA et al., 2015). EP2 e EP4 são acoplados com Gs, que é responsável pela ativação da adenilato ciclase, enzima que catalisa a conversão de ATP em cAMP, um potente ativador da proteína quinase A (PKA). EP2 e EP4 também estimulam a fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K) e a glicogênio sintase quinase 3 (GSK3). A GSK3 é relacionada com proliferação celular por promover a fosforilação de β -catenina e sua subsequente degradação pelo proteossoma 26S. Finalmente, o receptor EP3 é acoplado com proteína Gi, e sua ativação por PGE2 inibe a enzima adenilato ciclase, diminuindo a ativação da via cAMP/PKA (SOBOLEWSKI et al., 2010). Os receptores EP se encontram desregulados em células de câncer de mama, com aumento na expressão de EP1, EP2 e EP4 e diminuição na expressão de EP3 (KUNDU et al., 2014; READER; HOLT; FULTON, 2011). Os receptores EP também estão localizados no tecido adiposo, sendo que nos pré-adipócitos se encontra expresso o receptor EP4, e nos adipócitos maduros o está localizado o receptor EP3 (BØRGLUM et al., 1999) (Fig. 4). Por essa razão, a modulação farmacológica da atividade dos receptores EP, indiretamente por meio de inibidores de COX-2, pode modificar fenótipos tanto de células adiposas quanto tumorais no microambiente mamário.

Além dos quadros de dor e inflamação, a via da COX-2/PGE2 também participa de mecanismos de proliferação celular, apoptose e metástase, portanto, contribuindo para a progressão de diversos cânceres humanos, como câncer colorretal, pulmão e mama (SOBOLEWSKI et al., 2010; ZARGHI; ARFAEI, 2011). Os níveis de mRNA e proteína COX-2 são aumentados em amostras de câncer de mama quando comparados ao tecido mamário sadio, e tal perfil também está presente em outros

tumores sólidos como os carcinomas colorretal, pulmonar, gástrico, pancreático e da próstata (YOSHINAKA et al., 2006). Em um estudo de imuno-histoquímica incluindo 1576 amostras de carcinoma mamário, a expressão de COX-2, de moderada a forte, representou 37% das amostras analisadas, e estas foram associadas com pior prognóstico, formação de tumores mais invasivos e menor sobrevida dos pacientes (RISTIMÄKI et al., 2002). Outros pesquisadores encontraram a expressão de COX-2 aumentada em todas as 13 amostras tumorais analisadas por RT-PCR (PARRETT et al., 1997). Além disso, uma alta expressão e atividade de COX-2 foi verificada em modelos com animais transgênicos superexpressando HER2 (HOWE et al., 2001). Neste estudo, a superexpressão de COX-2 foi suficiente para a iniciação da carcinogênese em camundongos Her2/neu após múltiplas gestações, confirmando que COX-2 tem um papel crucial no desenvolvimento do câncer de mama (HARRIS et al., 2000). Ainda, a superexpressão de COX-2 em glândula mamária foi suficiente para o desenvolvimento de tumor mamário em modelo de camundongo (LIU et al., 2001). Em adição, diferentes linhagens celulares de câncer de mama (RE-positivo MCF7 e RE-negativo MDA-MB231) apresentam níveis flutuantes de COX-2, que influenciam a transição epitélio-mesenquimal e a invasividade (BOCCA et al., 2011).

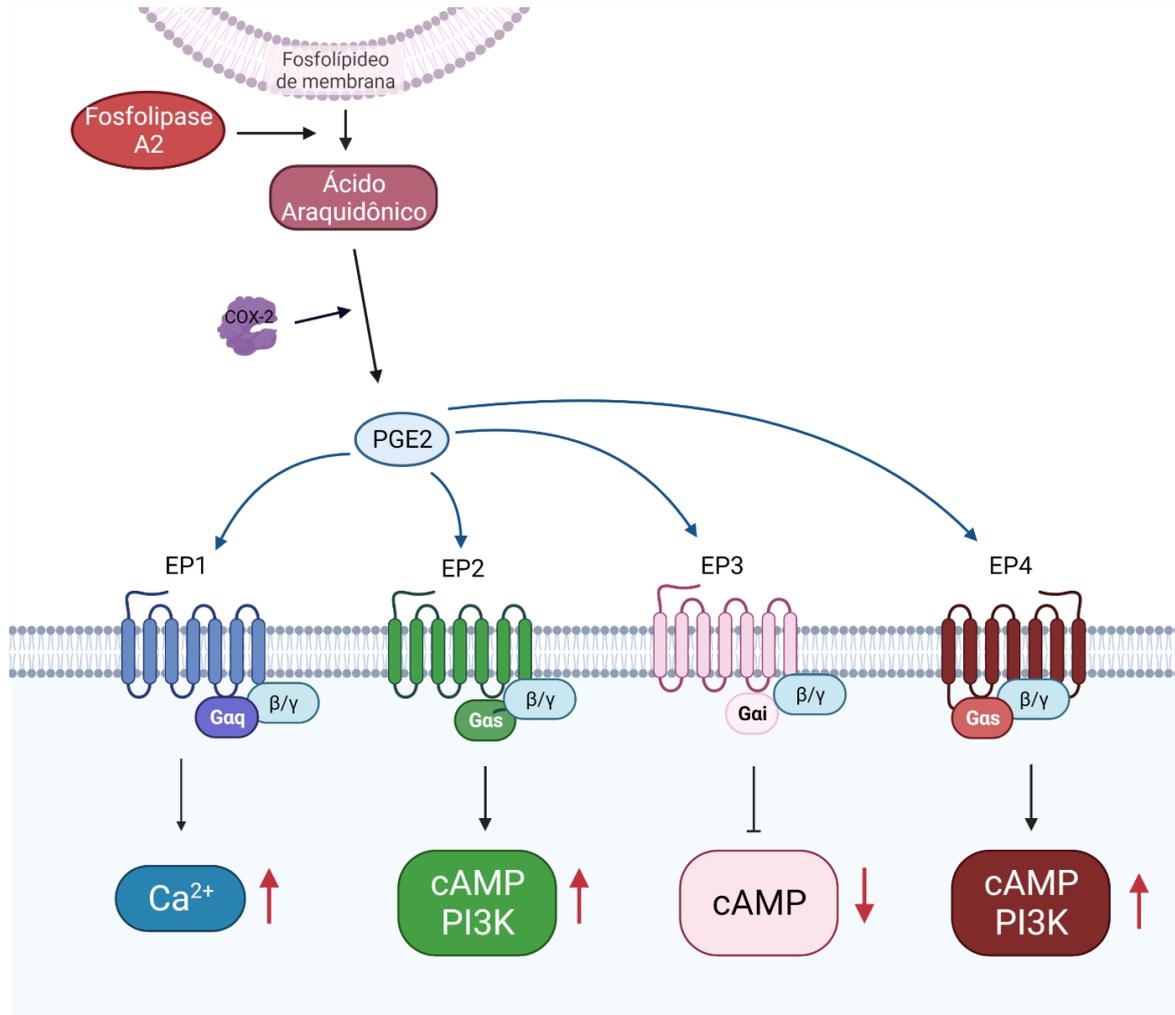


Figura 4 - Esquema da via de sinalização da PGE2.

A partir dos fosfolípidos de membrana a fosfolipase A2 produz ácido araquidônico, e este sofre a ação da enzima COX-2 e origina PGE2. PGE2 age sobre os seus receptores ativando diferentes respostas intracelulares. COX-2, ciclooxigenase-2; PGE2, prostaglandina 2; EP, receptores de prostaglandina (1, 2, 3, 4) (Criado pela autora com BioRender.com).

Devido à importante participação da COX e PGE2 nos quadros inflamatórios, de transmissão da dor e febre, os inibidores de COX, também chamados de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), exercem funções anti-inflamatórias, analgésicas e antitérmicas. São frequentemente utilizados no tratamento de doenças articulares degenerativas, doença reumatoide, e lesões por trauma muscular ou articular associadas com quadros de dor e inflamação. Os AINEs de primeira geração são inibidores não-seletivos de COX, tendo afinidade tanto por COX-1 quanto por COX-2. O primeiro fármaco deste tipo a ser produzido foi a aspirina (ácido acetilsalicílico), e desde então ela vem sendo amplamente utilizada (SIMMONS; BOTTING; HLA, 2004). Outros fármacos não-seletivos para COX-1/2 incluem o

diclofenaco, ibuprofeno e naproxeno. Os inibidores não-seletivos de COX têm grandes vantagens. No entanto, o seu consumo pode causar efeitos de toxicidade, principalmente, no trato gastrointestinal dado que a inibição da COX-1 resulta em diminuição da produção de muco citoprotetor na mucosa gástrica, o que pode levar à formação de úlcera gástrica especialmente no uso prolongado (CLÀRIA, 2003; HINZ; BRUNE, 2002; SIMMONS; BOTTING; HLA, 2004; TURINI; DUBOIS, 2002).

Com o passar do tempo, e com a possibilidade de utilizar ferramentas mais avançadas nas pesquisas foi possível entender um pouco melhor sobre a natureza patofisiológica da inflamação, permitindo que surgissem os AINEs de segunda geração, com maior seletividade para a COX induzida, que é a forma responsável pela produção de PGs pró-inflamatórias. A isoforma COX-2 apresenta um canal de ligação ao substrato hidrofóbico expandido, e também tem a presença de uma “bolsa” lateral hidrofílica, que são responsáveis pela especificidade de seus inibidores (HINZ; BRUNE, 2002). Os primeiros inibidores de COX-2 desenvolvidos foram o celecoxibe e o rofecoxibe, que foram introduzidos na clínica em 1998 e 1999. Atualmente, existem mais 4 inibidores seletivos de COX-2 (Coxibes): valdecoxibe, parecoxibe, lumiracoxibe e o etoricoxibe (PRATICÒ; DOGNÉ, 2005). A vantagem desses inibidores é que não causam danos ao sistema gástrico, com baixo perfil de toxicidade. No entanto, seu uso está associado com aumento no risco de ocorrência de eventos cardiovasculares, incluindo infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral. Tal complicação fisiológica ocorre uma vez que os inibidores de COX-2 diminuem os níveis do antitrombótico PGI₂ nos vasos sanguíneos, resultando em distúrbio da homeostase hemostática (CLÀRIA, 2003; PRATICÒ; DOGNÉ, 2005). Devido a isso, alguns dos representantes deste grupo foram retirados do mercado, como o rofecoxibe (2004) e o valdecoxibe (2005) (EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA), 2005).

O celecoxibe é o inibidor de COX-2 mais utilizado nos estudos realizados em câncer de mama, e sua seletividade é aproximadamente 10x maior para COX-2 em relação à COX-1. Além das abordagens clínicas, foi demonstrado que o celecoxibe induziu apoptose em linhagem celular MDA-MB-231 de câncer de mama. No modelo *in vivo*, com inoculação dessas mesmas células em camundongos, o tratamento com celecoxibe promoveu a redução da vascularização e maior necrose tumoral, reduzindo a cinética de crescimentos dos tumores implantados (BASU et al., 2005). Além disso, os estudos em modelos genéticos de câncer de mama em animais mostram que a

supressão do gene da COX-2 em camundongos Her2/neu reduziu a tumorigênese e angiogênese mamária (HOWE et al., 2005). Entretanto, inibidores mais seletivos como o etoricoxibe, que é aproximadamente 100x mais seletivo para COX-2 (RIENDEAU et al., 2001; SHAH; KOTADIYA, 2020), não têm sido estudados no contexto de cânceres de mama. Em estudos já realizados com ele, em outros modelos tumorais, foi verificado um efeito anti-angiogênico (NADDA et al., 2012). Em modelo animal de indução de câncer colorretal, o tratamento com etoricoxibe foi capaz de inibir a via NF- κ B em estágios iniciais do desenvolvimento tumoral, com consequente indução de morte celular por apoptose em modelo murino (GHANGHAS et al., 2016).

A relação entre o uso de AINES e câncer de mama também vem sendo avaliada em múltiplos estudos clínicos. Em humanos, foi demonstrado, em um estudo retrospectivo, que pacientes obesas com câncer de mama RE α -positivo, tratadas diariamente com AINE, associado à terapia adjuvante, apresentaram redução na recorrência tumoral de 52 % e um atraso de 28 meses no tempo para a recorrência (BOWERS et al., 2014). Outro estudo, demonstrou que o uso de ibuprofeno (\geq 3 dias/semana) reduziu a recorrência de câncer de mama em pacientes pré e pós-menopausa (KWAN et al., 2007). Além disso, em estudo de fase II onde foi conduzida a combinação de celecoxibe com 5-fluoruracila, epirrubicina e ciclofosfamida (FEC), seguido de docetaxel, observou-se que a inibição de COX-2 foi bem tolerada por 80 % dos pacientes com câncer de mama invasivo (CHOW et al., 2013). Uma alternativa ao uso dos inibidores seletivos de COX-2 é o uso da aspirina. Alguns estudos clínicos foram conduzidos com o intuito de investigar o impacto da inibição de COX em indivíduos com risco de desenvolver tumores. No entanto, os resultados destas coortes de pacientes ainda são contraditórios, talvez devido à dificuldade em estabelecer alguns tipos de controle nestes experimentos, tais como o tipo de AINE utilizado, a dosagem e frequência de administração. Recentemente, um estudo realizado em uma coorte de 62.512 mulheres, na pós-menopausa, e que em algum momento tomaram algum inibidor de COX, não encontrou correlação entre o consumo do AINE e a redução no risco de desenvolver câncer de mama (CAIRAT et al., 2020). Já em outro estudo recentemente concluído, no qual se investigou o impacto do uso de aspirina em diferentes tipos tumorais, foi observado que o uso de aspirina, em qualquer frequência, modificou o desfecho de sobrevida dos pacientes com câncer de mama e bexiga: quanto maior a frequência de consumo (mais de uma vez por

semana), maior o tempo de sobrevida. O estudo não encontrou associação significativa entre o uso de aspirina e incidência de câncer. E também, os outros tipos tumorais contemplados no estudo, como o câncer de pâncreas e esôfago, não se mostraram responsivos ao tratamento com aspirina (LOOMANS-KROPP; PINSKY; UMAR, 2021).

Tal inconclusividade nos dados estudos clínicos sugere a necessidade de uma melhor compreensão da magnitude de importância da COX-2, e do uso de seus inibidores, na gênese e prevenção do câncer de mama. Nesse contexto, o uso de modelos animais de desenvolvimento tumoral - que contemplem desde a fase de iniciação, promoção e progressão em ambiente experimental controlado - parece ser importante para a determinação das variáveis experimentais relevantes na oncogênese mamária.

2 JUSTIFICATIVA

O câncer de mama é o tumor que mais afeta a saúde da mulher, sendo desencadeado tanto por fatores genéticos hereditários quanto por componentes externos. No que se refere às causas evitáveis do câncer de mama, o consumo de alimentos de baixo valor nutricional e elevado poder calórico e o sedentarismo, intimamente ligados à obesidade, se caracterizam como fatores de risco para o desenvolvimento de câncer. Estudos recentes correlacionam a obesidade com maiores chances de desenvolver câncer de mama, e tal fenômeno está associado ao estado inflamatório reportado no tecido adiposo de mulheres com sobrepeso, obesas, e com obesidade metabólica. A presença das CLS-B no TAM vem sendo consistentemente caracterizada como um dos principais biomarcadores de inflamação relacionados com maior risco de desenvolvimento de câncer de mama. A hipótese atual postula que a presença das CLS no tecido adiposo resulta em uma maior liberação de citocinas e fatores inflamatórios e, entre elas, destaca-se a enzima COX-2, que produz PGE2 envolvida na via da biossíntese de estrogênio. Entretanto, o problema central de pesquisa, objeto desta tese, se dá no fato de que os estudos prévios apenas estabelecem correlações entre as alterações inflamatórias no tecido adiposo e o risco para o desenvolvimento de câncer de mama. Por outro lado, nenhuma publicação, até o momento, estabeleceu se a COX-2 apresenta um papel central na inflamação do TAM, síntese local de estrogênio e oncogênese em contexto obesogênico.

3 HIPÓTESE

Estudos recentes têm mostrado uma correlação positiva entre a obesidade e a incidência de câncer de mama. Isso se dá devido ao estabelecimento de um estado inflamatório no tecido adiposo, que estimula a produção de PGE2, via aumento da expressão de COX-2, nos macrófagos associados ao TAM. A produção de PGE2 estimula a aromatase nos pré-adipócitos, aumentando os níveis de estrogênio, e potencialmente estimulando a fase de promoção de tumores mamários. A hipótese é que a inibição farmacológica seletiva de COX-2 irá inibir a carcinogênese mamária e diminuir a progressão tumoral estimulada por uma dieta obesogênica através da diminuição da inflamação e da expressão de aromatase no tecido mamário, resultando em menores níveis teciduais de estrogênio.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Determinar o efeito da inibição seletiva de COX-2 na carcinogênese mamária, e sua associação com alterações inflamatórias e hormonais no TAM, em modelo murino de câncer de mama associado à obesidade.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar as alterações metabólicas, ganho de peso e adiposidade em camundongos alimentados com uma dieta HSF e submetidos ao modelo de oncogênese mamária induzida por DMBA/MPA;
2. Avaliar o efeito da dieta obesogênica sobre a latência de aparecimento de tumores mamários induzidos por DMBA/MPA;
3. Determinar o efeito preventivo do tratamento com o inibidor seletivo de COX-2, etoricoxibe, na latência de aparecimento, incidência e progressão tumoral em modelo de oncogênese mamária induzida por DMBA/MPA em animais alimentados com dieta controle e HSF;
4. Determinar o impacto da dieta HSF e tratamento com inibidor de COX-2 no conteúdo de aromatase níveis teciduais de estrogênio, presença de CLS-B e marcadores inflamatórios (COX-2, PGE2, IL-6, IL-10, TNF- α , MCP-1, IFN- γ e IL12-p70) no TAM de animais controle e alimentados com dieta HSF;
5. Caracterizar o perfil de expressão dos receptores hormonais (RE, RP e HER2) nos tumores mamários induzidos por DMBA/MPA em camundongos;
6. Avaliar a dependência da função ovariana para a carcinogênese mamária induzida por DMBA/MPA em animais submetidos a dieta obesogênica;
7. Determinar o efeito do etoricoxibe sobre o crescimento tumoral em tumores estrogênio-independentes de Ehrlich em contexto de dieta controle;

8. Examinar o efeito dos inibidores da COX-2 na viabilidade, invasão, migração e potencial angiogênico de linhagens de câncer de mama *in vitro*.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS

Os experimentos em animais foram conduzidos e reportados de acordo com os princípios éticos para o uso de animais de experimentação preconizados no ARRIVE (<https://www.nc3rs.org.uk/arrive-guidelines>) e diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), de modo a minimizar a dor e sofrimento animal ao longo dos estudos. O estudo animal foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFSC (CEUA) sob o número de protocolo 9334240518. Os experimentos foram conduzidos em camundongos fêmeas *Swiss (Mus musculus)* com idades a partir de 30 dias, fornecidas pelo Biotério Central da UFSC. Foram alocados 6-7 animais por caixa, mantidos em ambiente com temperatura e ventilação controladas, cama de maravalha autoclavada, temperatura constante de 22 ± 1 °C, ciclo de 12 h claro/escuro, e alimentados com *pellets* de ração controle, ou ração HSF e água à vontade. Em todos os protocolos, os animais foram monitorados diariamente e, ao sinal de alterações como letargia, locomoção alterada, dispneia, perda de rápida ou excessiva de peso, eriçamento de pelos e/ou tumores com 1,5 cm³, os mesmos foram eutanasiados.

5.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

5.2.1 Dietas

Camundongos *Swiss* fêmeas com 30 dias, foram divididas em 2 grupos, um grupo foi alimentado com ração HSF consistindo de 35% de gordura (banha de porco); 20% de proteína (caseína); 31,1% de carboidratos (14% de sacarose, 3,9% de amido de milho e 13,2% de maltodextrina); 4% de óleo de soja; 5% de fibra (microcelulose); 0,25% de colina; 0,18% de L-cistina; 3,5% de minerais e 1% de mix vitamínico, totalizando uma energia bruta de ~5,5 kcal/g. O grupo com dieta controle foi alimentado com uma dieta composta por 66,1% de carboidratos (7% de sacarose, 45,9% de amido de milho e 13,2% de matodextrina); 20% de proteína (caseína); 4%

de óleo de soja; 5% de fibra (microcelulose) e colina, vitaminas, minerais e L-cistina como descrito acima, totalizando uma energia bruta de ~3,8 kcal/g. Os ingredientes da dieta foram comprados na empresa Essential Nutrition (Palhoça, SC, Brasil), e a banha de porco foi obtida da marca BRF Brasil *foods* (Itajaí, SC, Brasil). As rações foram preparadas semanalmente, e os *pellets* foram estocados por no máximo 7 dias a 4°C.

5.2.2 Indução de tumor de mama por DMBA/MPA e tratamento farmacológico

Os tumores foram induzidos em camundongos *Swiss* fêmeas de 45 dias pela administração de 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) (25 mg/kg, Sigma-Aldrich, EUA). O DMBA é um carcinógeno que é amplamente utilizado em modelos de carcinoma mamário. Após sua administração, o DMBA passa pelo processo de ativação metabólica na glândula mamária, os metabólitos do carcinógeno interagem com as células em proliferação localizadas nas regiões terminais (TEBs) formando adutos de DNA que resultam na ocorrência de mutações (KERDELHUÉ; FOREST; COUMOUL, 2016). O carcinógeno foi dissolvido em óleo de gergelim e administrado por gavagem na dose de ~1 mg/animal combinado com acetato de medroxiprogesterona (MPA) (1 mg/animal, Depo® Provera®, diluído em óleo de gergelim, 0,1 ml/animal, via subcutânea). A administração foi realizada uma vez por semana durante 5 semanas consecutivas. Sete dias após a última dose de DMBA/MPA, iniciou-se o tratamento com etoricoxibe (5 mg/kg/dia, Arcoxia©, dissolvido em salina - 0,9% NaCl) ou salina (0,9% NaCl). Os tratamentos de salina ou etoricoxibe foram realizados diariamente durante todo o período do experimento. A dose animal equivalente de etoricoxibe foi estimada utilizando a fórmula de conversão de dose humana equivalente (HED mg/kg) (NAIR; JACOB, 2016), assumindo uma dose humana típica de 60 mg/dia para um humano de 70 kg em um tratamento de condições inflamatórias. Esse valor foi ainda dividido por dois, por se tratar de um modelo de exposição prolongado, o que resultou em 5 mg/kg/dia de etoricoxibe. As regiões mamárias dos animais tratados com DMBA/MPA foram apalpadas duas vezes por semana, para averiguar o surgimento de nódulos. A latência de aparecimento do tumor, o número de animais com tumor e o número de tumores mamários por animal (multiplicidade) foram avaliados. A progressão tumoral – definida como o número de dias entre a detecção do tumor e a

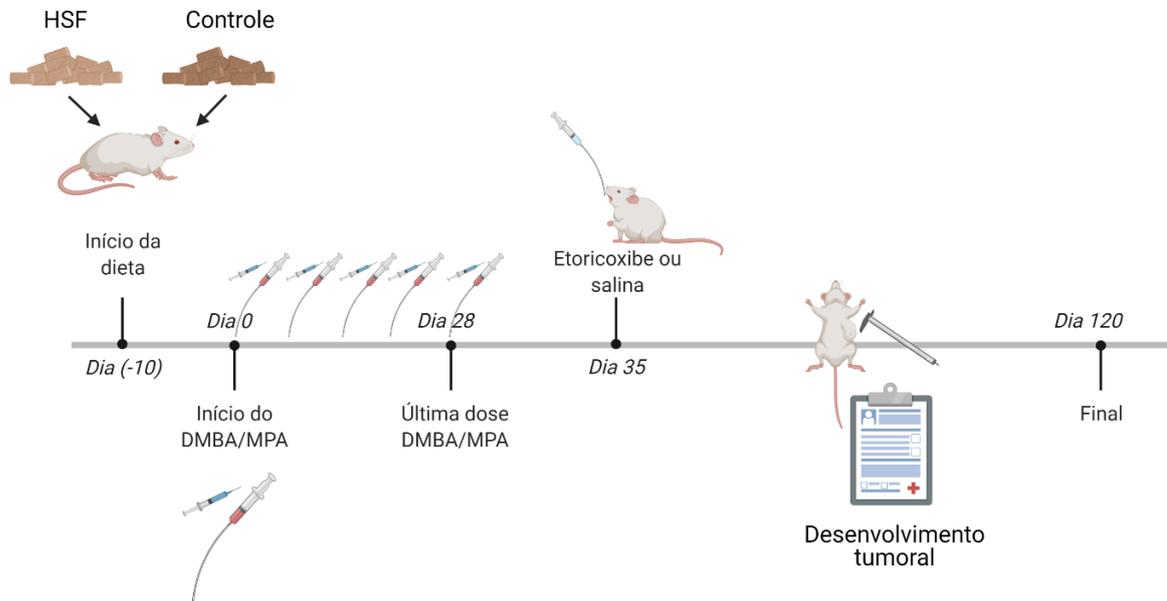
eutanásia – foi anotada para inferir a razão de crescimento tumoral e a malignidade. O volume dos tumores (mm^3) foi calculado de acordo com a fórmula: $0,5236 \times L1 \times (L2)^2$, onde L1 é o maior diâmetro e L2 o menor diâmetro do tumor; as medidas foram realizadas com auxílio de um paquímetro. Os animais em que o tumor alcançava $1,5 \text{ cm}^3$ eram eutanasiados. Os demais animais foram eutanasiados no tempo máximo de 120 dias após o início do protocolo de indução tumoral com DMBA/MPA.

5.2.3 Protocolo de ovariectomia bilateral (OVX)

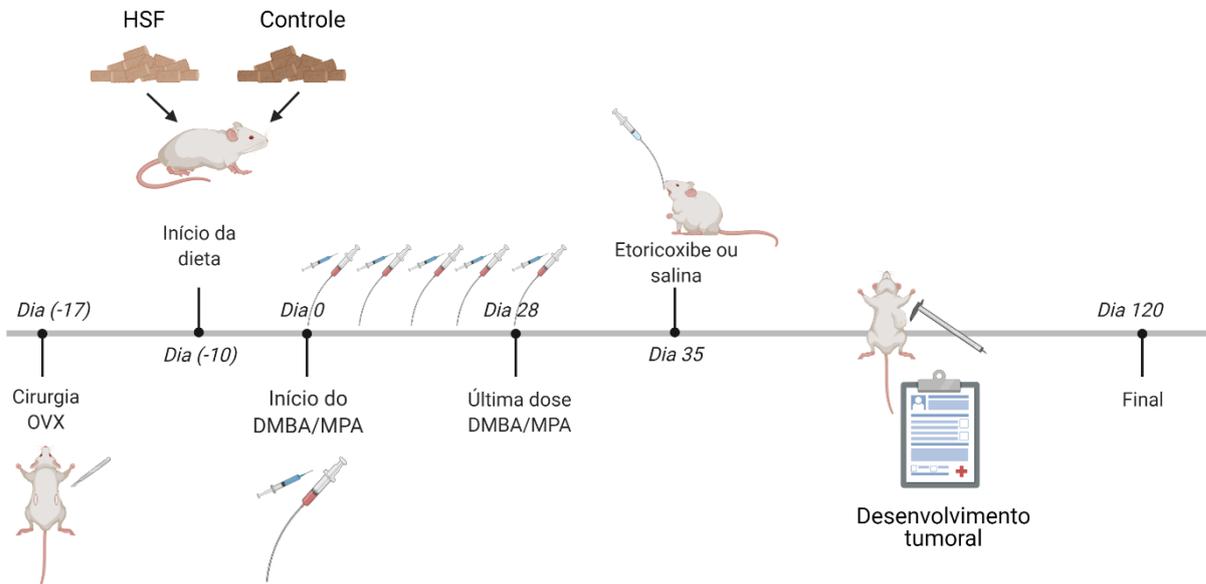
Do total de animais utilizados no estudo, 28 deles foram submetidos a cirurgia de retirada dos ovários (ou controle operado, *sham*). Camundongos fêmeas, com a idade de 28 dias foram ovariectomizadas (OVX - retirada dos ovários) e divididas em 4 grupos com $n = 7$. Os animais foram anestesiados por inalação de isoflurano/oxigênio combinado com tramadol (5 mg/kg, administração subcutânea para analgesia), e foi realizada uma ovariectomia bilateral, sob condições de assepsia. Inicialmente, as laterais da região abdominal foram raspadas e limpas com álcool iodado. Uma incisão de 1cm foi feita em cada um dos lados através da pele e da parede muscular. Com sutura estéril absorvível (Categute 4-0, Technofio), o corno uterino foi trançado (o mais próximo possível do ovário) e o ovário foi removido. A abertura foi fechada em duas camadas, ou seja, músculo e pele usando sutura estéril. Após a cirurgia, os animais foram alojados individualmente por algumas horas para permitir recuperação e depois reagrupados nas caixas de alojamento. A administração de tramadol (5mg/kg, subcutânea) prosseguiu por mais 2 dias após a cirurgia para minimização de dor. A indução tumoral seguiu o protocolo do item 5.2.2. Para o tratamento, os animais foram divididos em grupos de 7 animais, de acordo com a dieta que receberam (dieta controle ou HSF), *sham* ou ovariectomizadas, e em cada dieta houve um grupo tratado com etoricoxibe (5 mg/kg) e outro grupo controle que recebeu apenas veículo (salina 0.9%). Os grupos tratados com etoricoxibe receberam doses diárias do fármaco diluído em veículo (0,9% NaCl) por via oral (gavagem). A administração do fármaco começou 7 dias após a última dose do carcinógeno (indução com DMBA).

5.2.4 Desenhos experimentais

Seguem abaixo os desenhos experimentais utilizados nos experimentos de indução tumoral por DMBA/MPA em animais submetidos a diferentes dietas (n=19).



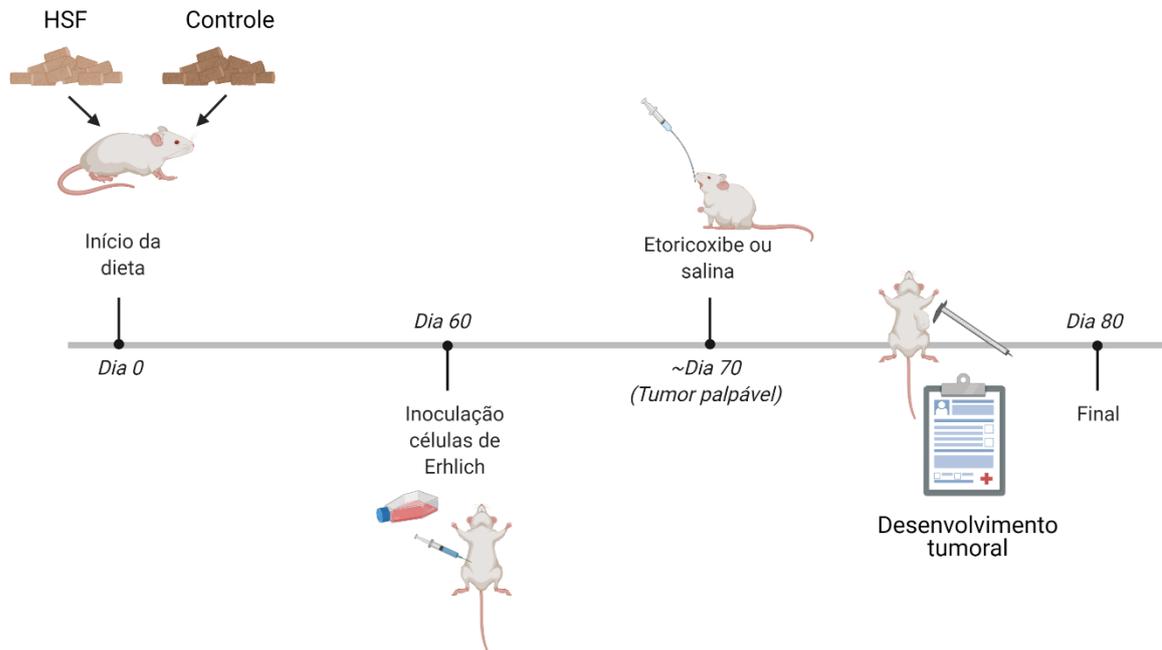
Esquema 1 – Desenho experimental das dietas HSF e controle e indução de tumores com DMBA/MPA.



Esquema 2 – Desenho experimental do modelo de indução tumoral em animais ovariectomizados (OVX) ou sham nas diferentes dietas e tratamento com inibidor de COX-2.

5.2.5 Modelo Implante Ortotópico de Tumor de Ehrlich

Para avaliar o efeito antitumoral do etoricoxibe em contexto de tumores previamente estabelecidos, aparte dos potenciais impactos na latência que afetam a interpretação da progressão tumoral no modelo DMBA/MPA, foi utilizado um modelo de implante ortotópico de células de adenocarcinoma mamário de Ehrlich em camundongos *Swiss* (PALERMO-NETO; MASSOCO; DE SOUZA, 2003). As células de Ehrlich foram descongeladas e submetidas a passagens intraperitoneais em camundongos, na forma de tumores ascíticos. As células ascíticas foram então coletadas, preparadas na densidade de 3×10^6 células em 0,1 ml de PBS estéril, e inoculadas na mama #4 do camundongo fêmea de 90 dias (EL-SISI et al., 2017). Uma vez que os tumores foram palpáveis (~10 dias após o implante), os camundongos foram divididos em 4 grupos: i) dieta controle/salina (0,9% NaCl; 0,2 ml/dose); ii) dieta controle/Etoricoxibe (5 mg/kg; 0,2 ml/dose); iii) dieta HSF/salina (0,9% NaCl, 0,2 ml/dose) e i.v.) dieta HSF/Etoricoxibe (5 mg/kg, 0,2 ml/dose). A administração foi realizada por gavagem, uma vez por dia, por um total de 10 dias. O crescimento dos tumores foi monitorado usando um paquímetro, e o volume dos tumores (mm^3) foi calculado de acordo com a fórmula: $0,5236 \times L1 \times (L2)^2$, onde L1 é o maior tamanho e L2 o menor diâmetro do tumor.



Esquema 3 – Desenho experimental do modelo de dieta HSF e indução tumoral com células de Ehrlich.

5.2.6 Ingesta calórica, eficiência alimentar e adiposidade

O ganho de peso corporal de cada animal foi monitorado semanalmente. O ganho de peso dos animais foi calculado e expresso em % comparando com o seu peso inicial. A ingestão alimentar de cada animal foi determinada por medidas diárias de consumo, pela diferença no peso da ração oferecida aos animais dividido pelo número de animais na caixa. A fórmula utilizada para esse cálculo foi $([\text{total de ração ingerida na caixa (g)}/\text{número de animais por caixa}]/\text{peso de cada animal (g)}) \times 100$. O resultado foi expresso em gramas (g) de comida ingerida por 100 g de massa corporal. A ingestão calórica por animal ($\text{kcal}/\text{day}/\text{mouse}$) foi determinada usando o conteúdo calórico das dietas: dieta controle (3,8 kcal/g) e dieta HSF (5,5 kcal/g). A eficiência alimentar foi calculada considerando a ingestão calórica e o ganho de peso durante o período analisado. Os dados apresentados se referem a um período de acompanhamento de 60 dias, contados a partir do primeiro dia das dietas. Ao final do experimento, os pesos relativos do TAM – retirado da região abdominal/inguinal contralateral ao tumor – tecido adiposo visceral e tecido retroperitoneal foram calculados da seguinte maneira: $(\text{peso do tecido}/\text{peso final do animal}) \times 100$.

5.2.7 Coleta dos tecidos

Os animais foram eutanasiados por uma overdose de cetamina/xilazina (intraperitonealmente). O sangue total foi coletado, e o soro foi separado por centrifugação (1500 x g/15 min temperatura ambiente) e congelado a -80°C. O TAM, visceral, retroperitoneal e os tumores foram coletados, pesados, e fracionados de acordo com cada procedimento a ser realizado. Parte dos tecidos foi imediatamente fixada em 4% de paraformaldeído (PFA) para a coloração Hematoxilina e Eosina (H&E) e imuno-histoquímica (IHC), ou então foram congelados a -80 °C para imunoblot, imunofluorescência, e outra parte foi imediatamente transferida para experimentos de cultivo *ex vivo* (descrito abaixo).

5.2.8 Parâmetros bioquímicos

Os níveis de colesterol total, triglicerídeos e glicose foram quantificados no soro através do kit comercial da Labtest liquiform (cat #76, #87, and #133, respectivamente) de acordo com as instruções do fabricante. (Labtest, MG, Brasil).

5.2.9 Histologia por coloração de H&E

Fragmentos do tumor e do TAM foram fixados em 4% de PFA por 18-24 h em temperatura ambiente. Após fixação, os tecidos foram desidratados em banhos seriais de etanol e xilol, seguido inclusão em parafina (52 °C). Os blocos de parafina foram cortados em seções de 5 µm (Microtomo Leica RM2255). As seções foram depositadas em lâminas e submetidas a coloração automatizada de H&E (Leica AutoSatainer XL). Imagens dos cortes do tecido adiposo foram adquiridas utilizando o escâner automatizado (Slide Scanner Axio Scan Z1 – Zeiss) na ampliação de 100x. Cinco campos por amostra/lâmina foram contados e anotados. O número total de adipócitos nas microfotografias foi estimado utilizando o *software* Zeiss Zen. O volume médio (pL) dos adipócitos do TAM por amostra foi calculado a partir do diâmetro (volume = $4/3 \times \pi \times \text{raio}^3$) de cada célula completa medida no campo, e foi feita a média dos 5 campos por amostra. As CLS-B foram contadas manualmente utilizando microscópio de luz (Leica DMI3000b) na ampliação de 100x, sendo expresso a quantidade por 1 cm² (número/campo). A coloração por H&E também foi utilizada

para contagem do número de vasos nos tumores induzidos por DMBA/MPA, os quais foram expressos pela soma do número de vasos presentes em 8 campos na ampliação de 100x.

5.2.10 Cultivo *ex-vivo* do tecido adiposo mamário

Foi realizada cultura do TAM como previamente descrito (CARSWELL; LEE; FRIED, 2012). Imediatamente após a dissecação do tecido, um pequeno pedaço do mesmo (~100 mg) foi lavado em 0,9% de salina estéril e, em seguida, incubado em placas de cultivo celular de 35-mm contendo 2 ml de meio de cultivo *Dulbecco's modified Eagle* (DMEM) suplementado com 1x de solução de antibiótico-antimicótico (Sigma-Aldrich) e 10% de soro fetal bovino (SFB), mantido à 37°C em incubadora umidificada com 5% de CO₂. Alíquotas do sobrenadante foram coletadas após 24 h de incubação para quantificação de citocinas por citometria de fluxo pelo ensaio de detecção de *beads* (CBA), e também foi realizada a quantificação de PGE2 e 17β-estradiol por ELISA.

5.2.11 Determinação de citocinas por citometria de fluxo

Os níveis de 6 citocinas (IL-6, IL-10, TNF-α, MCP-1, IFN-γ e IL12-p70) foram medidos no meio de cultura coletado da incubação *ex vivo* do TAM através da técnica de detecção de *beads* por citometria de fluxo (BD *Cytometric Bead Array Mouse Inflammation Kit* – CBA, BD Biosciences). Brevemente, 25 μL dos mix de *beads* de captura foram incubados com 50 μL das amostras e 25 μL do reagente de detecção PE. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 2 h no escuro, e centrifugadas em 200 x g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de *beads* ressuspenso em tampão de lavagem 1x. A leitura da fluorescência foi realizada no citômetro BD FACSCanto II (BD Biosciences). Os dados foram calculados utilizando o *software* FCAP Array v3.0 (BD Biosciences), utilizando como referência a curva padrão fornecida no kit. As amostras foram diluídas 20x para quantificação das citocinas IL-6 e MCP-1, e a concentração das citocinas nos cultivos de 24 h foi expressa como ng/g de tecido adiposo por poço.

5.2.12 Quantificação de PGE2 e 17 β -estradiol por ELISA

Os níveis de 17- β -estradiol e PGE2 no meio de cultivo *ex vivo* do TAM foram quantificados usando o kit de ELISA para prostaglandina E2 (n^o 514010, Cayman Chemical) e o kit de ELISA para 17- β -estradiol (ab108667, ABCAM), respectivamente, de acordo com protocolo do fabricante. Os dados foram expressos como ng/g de tecido adiposo por poço. Os níveis de PGE2 também foram avaliados nas alíquotas de DMEM coletadas do cultivo de células MDA-MB231 seguido o protocolo já mencionado.

5.2.13 Imunodeteção de proteínas por *Western blot*

Amostras do TAM foram homogeneizadas em tampão de lise RIPA (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, Triton X100 1%, 0,25% deoxicolato de sódio, 100 mM EDTA) contendo inibidores de fosfatase e protease (1 mM PMSF, 1mM ortovanadato de sódio e 1 mM de NaF, Sigma-Aldrich) e clarificados por centrifugação a 14000 x g por 10 min a 4°C. A quantidade de proteína foi quantificada pelo método de *Lowry*. As proteínas (50 μ g) foram separadas por 10% SDS-PAGE (Mini-Protean, Bio-Rad) e eletro-transferidas em membrana de nitrocelulose usando sistema semi-seco (Hoefer TE77). A membranas foram coradas com Ponceau S, lavadas com tampão Tris-salina 0,1% de Tween-20 (TBS-T) e bloqueadas com 5% de leite em pó desnatado diluído em TBS-T, por 1 h à temperatura ambiente. Os anticorpos primários utilizados incluem oanti-COX-2 (sc- 19999, Santa Cruz Biotechnology), anti-CYP19A1/aromatase (#18995-, Abcam), e anti- β -actina (#8457, Cell Signaling Technology). Os anticorpos primários foram incubados sob a diluição de 1:1000 (4°C, *overnight*). Após a incubação com o primário, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com HRP (1:2000, Santa Cruz Biotechnology) por 2 h à temperatura ambiente, lavadas 3x com TBS-T, e as bandas foram capturadas usando o ChemiDoc MP (Bio-Rad) ou filmes de raio-X. A β -actina foi avaliada depois do *stripping* dos anticorpos para COX-2 e aromatase. O *software* ImageJ foi utilizado para quantificar as bandas de proteína, e o imunoconteúdo foi expresso pela comparação com a intensidade média das bandas do grupo controle por membrana.

5.2.14 Imuno-histoquímica (IHC)

Os tecidos emblocados em parafina foram cortados em secções de 4 μm . Brevemente, as secções foram desparafinizadas, hidratadas e fervidas em tampão citrato (pH 6,0) para a recuperação de antígeno. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com 3-10% de peróxido de hidrogênio diluído em metanol (10 min), e as secções foram então bloqueadas com 12% de leite em pós desnatado diluído em TBS-T por 40 min. O anticorpo primário foi incubado overnight a 4°C, em câmara úmida, seguido por uma incubação com um anti-*mouse*/anti-*rabbit* (Novolink Polymer Detection System, Leica Biosystems) seguindo as instruções do fabricante. Os controles negativos tiveram o anticorpo primário substituído por um diluente de anticorpo ou isotipo de controle IgG. 3,3-Diaminobenzidina (DAB) foi usado como cromógeno, e as secções foram contracoradas com hematoxilina de Meyer por 1 min, lavadas com água, e montadas em lamínula com meio Permount (Thermo Fisher). Os anticorpos primários utilizados foram o anti-receptor de progesterona (clone hPRa2, diluído 1:50, NeoMarks), o anti-receptor de estrogênio α (clone AER314, diluído 1:200, Thermo Fisher), o anti-HER2 (clone c-erB2, diluído 1:200, Dako), o anti-pan-citoqueratina (clone AE1-AE3, diluído 1:500, Dako), o anti-citoqueratina-14 (clone LL002, diluído 1:1000, Thermo Fisher), o anti-COX-2 (sc-19999, diluído 1:100, Santa Cruz Biotechnology), e o anti-CDC47/Mcm7 (clone Ab-2 47D141, diluído 1:300, NeoMarks). A expressão de HER2 foi quantificada pelo escore de acordo com (WOLFF et al., 2013) (0= sem coloração de membrana ou incompleta e coloração de membrana fracamente perceptível em $\leq 10\%$ das células tumorais; 1 + = coloração de membrana incompleta e fracamente perceptível em $\geq 10\%$ das células tumorais; 2 + = coloração incompleta e/ou moderada em 10% das células tumorais ou coloração de membrana completa e intensa em $\leq 10\%$ das células tumorais; e 3 + = coloração da membrana completa e intensa em 10% das células tumorais). Em nosso estudo, apenas as marcações com escore de 3 + foram consideradas positivas. O índice de expressão de CDC47 e COX-2 foi obtido estimando o percentual de células positivas em 500 células tumorais avaliadas (MARIA DE SOUZA et al., 2012). Os escores dos RE e RP foram definidos de acordo com a ASCO e o Colégio Americano de Patologia, que recomendam que os ensaios de RE e RP sejam considerados positivos se houver ao menos 1% de marcações positivas no núcleo nas amostras testadas (HAMMOND et

al., 2010). A estratificação desses receptores ocorre de acordo como percentual de núcleos imunorreativos: 0, negativo; 1 + (1%-25%); 2 + (26%-50%); 3 + (51%-75%) e 4 + (76%-100%). O diagnóstico de tumores epiteliais foi confirmado com os anticorpos anti-pan-citoqueratina e anti-citoqueratina-14.

5.2.15 Imunofluorescência

Amostras do TAM foram coradas como previamente descrito, com poucas modificações (SILVA et al., 2019). Brevemente, amostras de TAM congeladas foram descongeladas por 30 min à temperatura ambiente, lavadas com PBS 1x, e fixadas por 1 h com 1% PFA/PBS. As amostras foram então bloqueadas por 1 h com 5% BSA/PBS à temperatura ambiente, e incubadas com anticorpo anti-*mouse*-CD11b (clone M1/70, BD Biosciences) conjugado com fluorocromo PE diluído a 1:100 com tampão de bloqueio (overnight a 4°C). As amostras foram lavadas 3 vezes com PBS gelado e o núcleo foi corado com DAPI por 5 min. Enfim, as secções foram lavadas e foi realizada a montagem com Mowiol® (Sigma-Aldrich). As lâminas foram estocadas por 72 h no escuro a 4°C até a obtenção das imagens. As imagens foram capturadas utilizando microscópio confocal invertido (Leica DMI6000 B) e as imagens foram preparadas utilizando o *software* ImageJ.

5.2.16 Cultivo celular

As linhagens celulares MDA-MB231, SKBR3 e MCF7 foram obtidas da ATCC e utilizadas em passagens por menos de 3 meses após descongelamento. As células foram mantidas em meio de cultivo DMEM ou RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de SFB e antibiótico:antimitótico 1x (Sigma-Aldrich), de acordo com o recomendado para cada linhagem, e mantidas em incubadora umidificada e 5% de CO₂ a 37 °C. As células foram tratadas entre 50-60% de confluência. Soluções de etoricoxibe (sc-218446, Santa Cruz) e celecoxibe (cat#PZ0008, Sigma-Aldrich) foram preparadas nas concentrações de 50-100 mM em DMSO e estocadas a -20°C.

5.2.17 RNA de Interferência (siRNA)

O siRNA para COX-2 (sc-29279) e o controle negativo siRNA-A (sc-37007) foram adquiridos na Santa Cruz Biotechnology. As transfecções foram realizadas usando o reagente lipofectamina RNAiMAX (Invitrogen) seguindo protocolo padrão do fabricante. O silenciamento de COX-2 foi confirmado em 48 h após a transfecção por imunoblot, e o impacto na viabilidade celular foi verificado em 96 h após a transfecção por ensaio de MTT.

5.2.18 Viabilidade celular

Para avaliar viabilidade celular foi utilizado o ensaio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). A viabilidade celular foi quantificada pela redução do MTT à formazan, que indica a atividade de desidrogenases mitocondriais em células viáveis. As células foram cultivadas como descrito anteriormente, plaqueadas e, após 24 h, foram submetidas ao tratamento de interesse. Após o tempo de tratamento, o meio de cultura foi retirado, os poços foram lavados 2x com PBS, e foi adicionado 100 µL de MTT (0,5 mg/mL). Após incubação em estufa de cultivo por 30 min, a solução de MTT foi descartada e 100 µL de DMSO foi adicionado. A placa foi agitada e a leitura realizada em 560-630 nm ($A_{560}-A_{630}$) (Multileitora Spectramax Paradigm, Molecular Devices). Os dados de viabilidade foram expressos em percentual comparado as células não tratadas (Viabilidade = 100%).

5.2.19 Ensaio de invasão celular

O efeito do etoricoxibe no potencial de invasão da matriz extracelular (ECM) por células de câncer de mama foi avaliado utilizando o Ensaio de Invasão Celular QCM ECM (cat#ECM-554, Merck Millipore) segundo protocolo já realizado por nosso grupo (ZANOTTO-FILHO et al., 2018). Inicialmente, as células foram tripsinizadas, centrifugadas e 250.000 células suspensas em 50 µL de DMEM sem soro foram adicionadas na câmara superior (revestidos com matriz extracelular e poros de 8 µm). Em seguida, 200 µL DMEM livre de soro, com ou sem inibidores de COX-2, foram adicionados sobre as células plaqueadas nas câmaras superiores. A câmara inferior consistiu de DMEM suplementado com 20% de SFB como um quimioatraente. Após

48 h em incubadora de cultivo celular, as células que invadiram a câmara inferior foram marcadas com corante de fluorescência CyQuant GR por 15 min, e a fluorescência foi lida a 480/520 nm. O percentual de células invasoras foi comparado com uma curva padrão de células da mesma linhagem e os dados foram expressos como % de invasão celular. Nos experimentos com siRNA, as células com COX-2 depletada e os controles de siRNA foram mantidas por 48 h pós-transfecção para que o knockdown fosse eficiente, antes da tripsinização e inoculação nas câmaras de *transwell*.

5.2.20 Preparo do meio condicionado e angiogênese *in vitro*

Ensaio de angiogênese *in vitro* foram realizados para determinar se a inibição da produção de prostaglandina dependente de COX-2 afeta o potencial angiogênico do secretoma de células MDA-MB231. Para o preparo do meio condicionado (MC), células MDA-MB231 cultivadas em placas de 12 poços foram tratadas com 3 doses de celecoxibe e etoricoxibe (1, 10, 25 μ M) por 6 h, permitindo a incorporação do fármaco, ou siRNA (48 h de pré-incubação), lavadas com PBS estéril e incubadas com 700 μ L de DMEM fresco suplementado com 5% de SFB por um tempo adicional de 48 h. Ao final das 48 h, o MC foi coletado e imediatamente utilizado para o ensaio de angiogênese, com o intuito de reduzir a perda de atividade associada ao congelamento. Para angiogênese, foi utilizado o kit Angio-phase (MBL international) como previamente descrito por nosso grupo (ZANOTTO-FILHO et al., 2018). Brevemente, uma mistura células endoteliais humanas (patenteadas) são co-plaqueadas em placas de 24 poços e incubadas com o MC das células de câncer de mama ou DMEM fresco (DMEM grupo controle) por um total de 10 dias para a formação de estruturas filiformes dos túbulos anastomosados, que se assemelham ao leito capilar. O meio condicionado foi trocado e renovado a cada 3 dias. Ao final do tratamento, as células foram fixadas e imunocoradas com anticorpo anti-CD31 (ab28364, Abcam). Após incubação do anticorpo secundário, o ELISA de fosfatase alcalina (AP) foi realizado utilizando o substrato solúvel p-nitrofenil-fosfato (pNPP) cujo produto foi lido colorimetricamente a 405 nm. Como um controle para a localização da expressão de CD31, em alguns experimentos, a reação da AP foi realizada com o substrato BCIP/NBT, que forma um precipitado insolúvel. VEGF recombinante e PGE2

purificada (Cat#14010, Cayman Chemical) foram utilizados como controle positivo para indução de estruturas tipo-vaso.

5.2.21 Ensaio de migração celular

As células MDA-MB231 foram cultivadas em placas de 24 poços e, ao atingirem a confluência de 90%, o SFB foi reduzido para 1% (overnight). As células em monocamada foram então “riscadas” com uma pipeta de 200 μ L para a formação de uma ranhura. Após lavagem com PBS para retirar as células soltas no meio, as células foram fotografadas, e então foi realizada a incubação de DMEM com 1% SFB acrescido de celecoxibe ou etoricoxibe em diferentes concentrações. Nas células com COX-2 depletada por siRNA, a transfecção do siRNA foi feita por 48 h, e só então foi realizada a ranhura na monocamada. A migração das células foi monitorada nos tempos 0, 6 e 24 h utilizando um microscópio com contraste de fase (Olympus IX83) na amplificação de 100x. A área da ranhura pré- e pós-tratamento foi quantificada utilizando o *software* ImageJ e a razão de fechamento foi expressa em percentual. A privação completa de soro não foi usada devida a perda de viabilidade das células MDA- MB231 após 24 h de privação.

5.2.22 Bioinformática

Para avaliar os níveis constitutivos da expressão de COX-2 entre as diferentes linhagens de câncer de mama, dados públicos de Sequenciamento de RNA (RNAseq) da plataforma E-MTAB-2706, compreendendo 675 linhagens tumorais sequenciadas, foram baixados do banco de dados EBI-*ArrayExpress* e importados para o ambiente de análise R. As linhagens celulares de câncer de mama foram filtradas, e 58 delas foram anotadas em relação ao seu status de RE, HER2 (+ou-), e *claudin-low* com base em caracterizações anteriormente publicadas (DAI et al., 2017; KAO et al., 2009; PRAT et al., 2010, 2013). As diferenças de composição nas bibliotecas de sequenciamento de RNA (*counts*) entre as linhagens celulares foram normalizadas pelo método o método da média aparada dos valores M (*Trimmed means of M-values*; TMM) seguido do cálculo de contagens por milhão (CPM), ambos usando o pacote *edgeR*. Em seguida, adicionamos 1 aos valores da matriz CPM, e calculamos seu

log10 para comparação estatística. O mapa de calor foi construído usando o pacote *pheatmap*.

5.2.23 Análises estatísticas

Os experimentos *in vitro* foram repetidos 3 vezes em triplicata, e os dados dos experimentos independentes foram plotados juntos. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (SD). Os dados dos experimentos *in vivo* foram plotados como gráficos *box-and-whiskers* para facilitar a visualização da dispersão dos dados. Os testes estatísticos D'Agostino-Pearson e Shapiro-Wilk foram aplicados para avaliar a normalidade dos dados. O teste T não-pareado foi utilizado para as comparações de 2 grupos. Análise de variância de uma via ou duas vias (ANOVA) seguidas pelos testes de *post-hoc* de Tukey ou Bonferroni, respectivamente, foram aplicadas quando grupos múltiplos foram comparados. As curvas de Kaplan-Meier foram comparadas utilizando o teste *log-rank* (Mantel-Cox). O teste exato de Fisher (*Fisher exact*) foi utilizado para comparar proporções entre 2 grupos. Os gráficos e as análises estatísticas foram realizados utilizando o *software* GraphPad Prism 5 (GraphPad).

6 RESULTADOS

6.1 PARÂMETROS DE ADIPOSIDADE, METABOLISMO, INFLAMAÇÃO E TUMORIGÊNESE EM CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM DIETA HSF E EXPOSTOS AO PROTOCOLO DMBA/MPA

Inicialmente, decidimos validar se a dieta HSF promove um fenótipo tipo obeso nos camundongos expostos ao protocolo de indução tumoral por DMBA/MPA. Isso foi necessário dado que estudos prévios demonstraram que o DMBA afeta no ganho de peso em camundongos C57BL/6J alimentados com dieta *high-fat* (HSIEH; PENG; CHOU, 2017). Assim, investigamos se a presença do mutagênico afetaria a composição corporal e os parâmetros bioquímicos induzidos pela dieta HSF em nosso modelo quando comparado a animais não submetidos ao tratamento com o carcinógeno.

De fato, a administração de DMBA/MPA afetou o ganho de peso corporal nos camundongos alimentados com a dieta HSF quando comparado aos animais alimentados com a dieta HSF, mas sem o DMBA/MPA (Fig. 5A; $p < 0,05$ na interação dieta:DMBA em ANOVA de duas vias). Na ausência do DMBA/MPA, a média de ganho de peso foi 65% e 43% maior no grupo HSF do que nos grupos alimentados com dieta controle nos tempos de 30 e 90 dias de tratamento, respectivamente. Por outro lado, os animais alimentados com HSF e expostos ao DMBA/MPA tiveram ganho de peso corporal similar aos animais em dieta controle (Fig. 5A). Os camundongos alimentados com a dieta HSF mostraram uma diminuição na ingesta diária de calorias de 14-17% independente da exposição ao DMBA/MPA (Fig. 5B), que foi relacionado com menor consumo de ração no grupo HSF. Apesar disso, a dieta HSF forneceu as calorias necessárias, que resultaram em melhor eficiência alimentar nos animais alimentados na ausência de DMBA/MPA (Fig. 5C). Em contraste, a exposição ao DMBA/MPA afetou a eficiência alimentar em ambas as dietas (Fig. 5C).

Apesar de impactar o ganho de peso, a exposição ao DMBA/MPA não impediu o acúmulo dos tecidos adiposos mamário, retroperitoneal e visceral nos camundongos alimentados com dieta HSF (Fig. 5D), apesar de a magnitude da adiposidade do TAM ser menor no grupo HSF/DMBA/MPA comparado com o grupo alimentado com HSF

sem o DMBA/MPA ($p < 0,05$ na interação da dieta:DMBA; ANOVA de duas vias) (Fig. 5D). Esses dados estão de acordo com os resultados dos marcadores de adiposidade avaliados no modelo DMBA combinado com dieta rica em gordura em camundongos (HSIEH; PENG; CHOU, 2017). No que se refere as alterações do metabolismo de glicose e lipídeos, a dieta HSF aumentou os níveis de glicose (GLU), colesterol total (CT) e TG no soro dos animais tratados com DMBA/MPA (Fig. 5E).

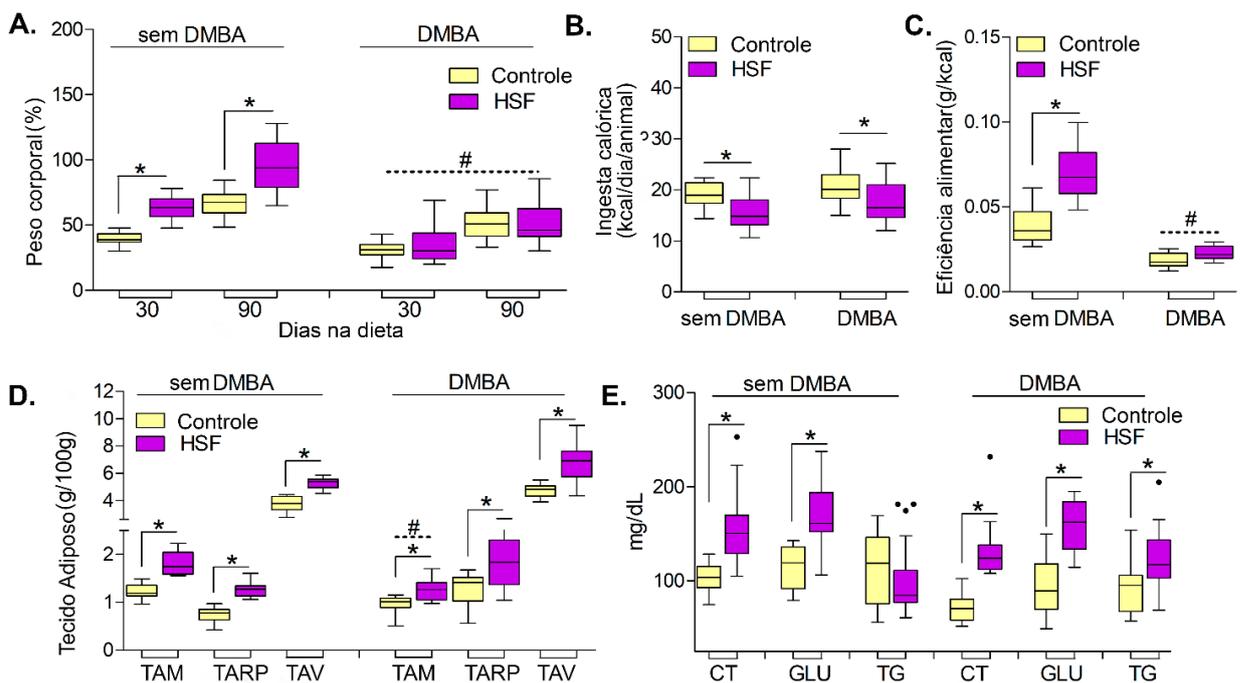


Figura 5 – Parâmetros de obesidade no modelo DMBA/MPA. (A) O ganho de peso, (B) ingesta calórica, (C) eficiência alimentar, (D) peso dos tecidos adiposos coletados e (E) bioquímica do soro das fêmeas alimentadas com a dieta HSF ou dieta controle, e o efeito do protocolo indutor tumoral com DMBA/MPA sobre esses parâmetros. Camundongos com 35 dias de idade foram alimentados com dieta HSF ou dieta controle por 10 dias seguida da administração de 5 doses de DMBA/MPA (1 dose por semana) ou administração do veículo. As coortes de animais “DMBA” ou “sem DMBA” foram monitoradas por um total de 120 ou 90 dias, respectivamente. As dietas foram mantidas durante todo o período do experimento. Em A, o gráfico representa o ganho de peso durante 30 e 90 dias do protocolo de dieta. Os parâmetros B e C foram monitorados durante 60 dias de dieta, D e E foram avaliados em amostras coletadas ao final do experimento, seja por finalização respeitando os parâmetros humanitários, ou pelo fim do protocolo experimental. Em A-E, *representa diferença nas comparações indicadas (teste-t não-pareado, $p < 0,05$); # representa interação entre dieta e DMBA/MPA ($p < 0,05$, ANOVA de duas vias, post-hoc Bonferroni). N amostral: sem DMBA ($n=12$ /grupo), DMBA ($n=19$ /grupo). TAM (tecido adiposo mamário), TARP (tecido adiposo retroperitoneal) e TAV (tecido adiposo visceral); CT (colesterol total), GLU (glicose) e TG (triglicerídeo); “controle” (dieta controle); HSF (dieta *high-sugar/fat*).

Corroborando o ganho de peso do TAM (Fig. 5D), os camundongos alimentados com dieta HSF exibiram números por campo diminuídos (Fig. 6A) e

volume celular aumentado (Fig. 6B) dos adipócitos mamários quando comparados com camundongos alimentados com dieta controle (Fig. 6A-6C). A histologia do TAM também revelou alguns aglomerados de células circundando alguns adipócitos (Fig. 6C), sugerindo a presença de CLS-B, especialmente no grupo HSF. Tais estruturas foram positivas para o marcador de monócito/macrófago CD11b em imunofluorescência (Fig. 6D).

O tratamento com dieta HSF também aumentou os níveis de PGE2, MCP-1 e IL-6 no TAM isolado ao final dos experimentos (entre 90 e 120 dias depois da primeira dose de DMBA/MPA). Inesperadamente, TNF- α e IL-10 não mostraram alterações entre os grupos (Fig. 6F), e IFN- γ e IL12-p70 apresentaram níveis não detectáveis pelo método CBA. Por fim, a avaliação do fenótipo tumoral mostrou que a dieta HSF acelerou a tumorigênese mamária induzida por DMBA/MPA quando comparada com a dieta controle (Fig. 6E). Ao final dos 120 dias, depois da primeira dose de DMBA/MPA, a incidência tumoral foi de 58% (11/19 camundongos) no grupo HSF *versus* 21% (4/19 camundongos) no grupo de dieta controle ($p=0,045$; teste exato de Fisher). Dois animais alimentados com a dieta HSF desenvolveram neoplasia linfóide em adição aos tumores mamários.

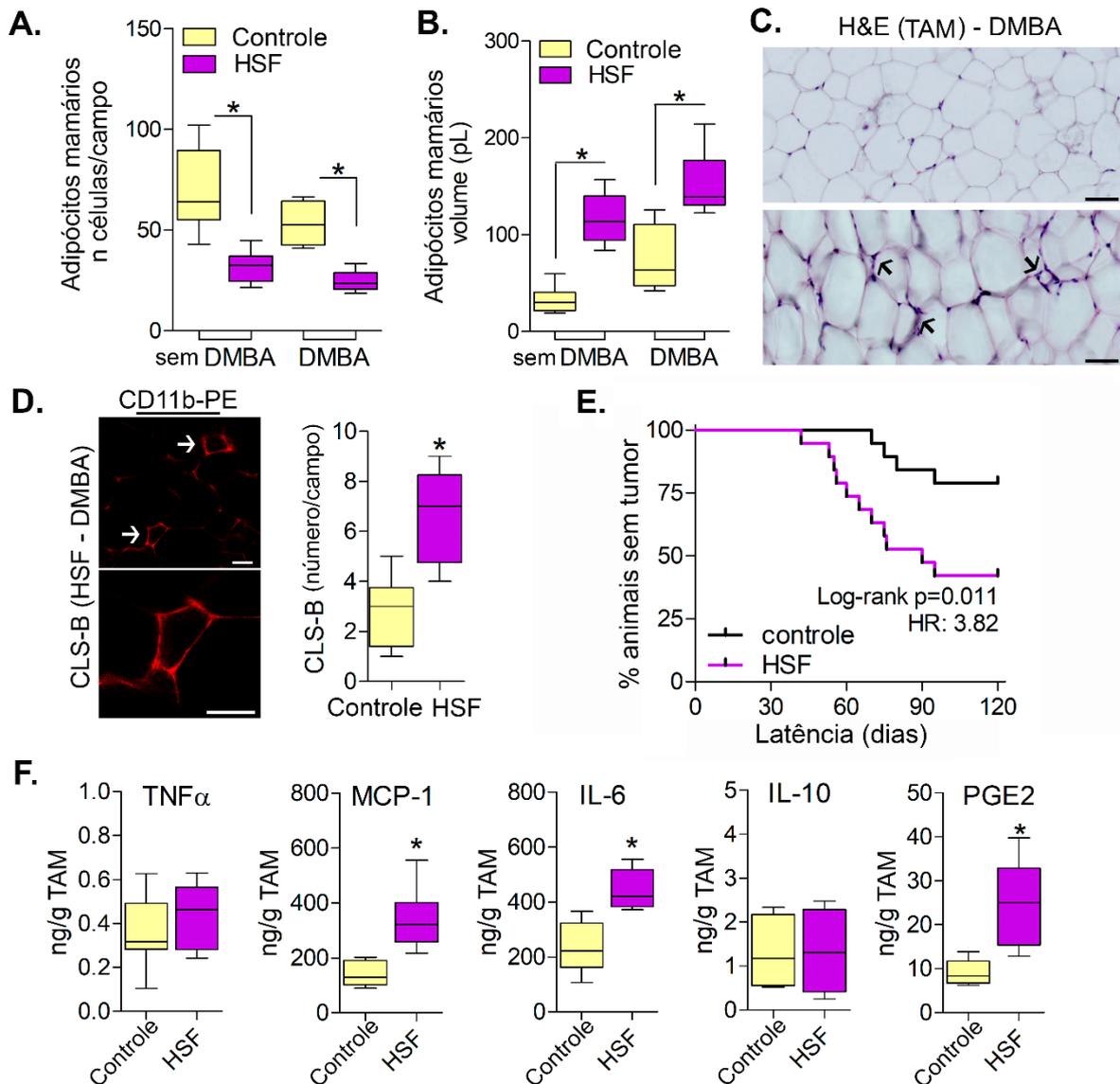


Figura 6 – Caracterização do tecido adiposo. (A-B) Número de adipócitos mamários por campo e volume celular, (C) e histologia representativa por H&E do TAM dos animais alimentados com dieta controle e dieta HSF. (D) Imunofluorescência de CD11b e quantificação das CLS-B no TAM dos animais alimentados com a dieta controle e dieta HSF. Em C e D, as flechas indicam a localização de estruturas tipo CLS-B, barra de 50 µm. (F) A quantificação das citocinas e os níveis de PGE2 no ensaio por ELISA, foram realizados com o sobrenadante obtido a partir do cultivo *ex vivo* do TAM de animais expostos ao DMBA/MPA e alimentados ou com a dieta controle ou a dieta HSF. Em A, B e D, os *representam a diferença entre as comparações do grupo dieta controle, ou entre as comparações indicadas (teste-t, $p < 0,05$, $n = 6$ /grupo). (E) O gráfico de Kaplan-Meier mostra o efeito das dietas controle e HSF sobre a latência tumoral (% animais livres de tumor) em camundongos expostos ao DMBA/MPA. O valor de p por log-rank e *hazard ratio* (HR) também são mostradas ($n = 19$ /grupo). “controle” (dieta controle); HSF (dieta *high-sugar/fat*).

6.2 A INIBIÇÃO DE COX-2 REDUZ OS NÍVEIS MAMÁRIOS DE PGE2, AUMENTA A LATÊNCIA TUMORAL E PROLONGA A SOBREVIDA DOS CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM A DIETA HSF

Em seguida, utilizamos o modelo de carcinogênese HSF-DMBA/MPA para avaliar o impacto da inibição de COX-2 sobre a carcinogênese mamária. Para isso, os grupos “dieta controle” e “dieta HSF” foram tratados com o inibidor seletivo de COX-2, etoricoxibe, ou com salina/veículo por 85 dias, como delineado na Figura 7A. De acordo com os resultados na Figura 7, a dieta HSF diminuiu tanto a latência quanto a sobrevida dos animais. Por outro lado, animais alimentados com HSF e tratados com etoricoxibe apresentaram uma maior latência de aparecimento de tumores mamários e maior sobrevida (Fig. 7B e 7C). O grupo HSF mostrou média de latência tumoral e sobrevida total de 71 e 99 dias, respectivamente, enquanto esses parâmetros não foram atingidos nos grupos HSF+etoricoxibe e dieta controle. No contexto da dieta controle, o efeito anti-carcinogênico do etoricoxibe não foi perceptível devido à menor incidência tumoral na janela de tempo avaliada (Fig. 7B-D). Nota-se que 69% (11/16) dos camundongos alimentados com a dieta HSF apresentaram tumores ao passo que a incidência foi reduzida para 37% (7/19) no grupo HSF+etoricoxibe (Fig. 7D). Com relação à multiplicidade tumoral, a maioria dos animais apresentou apenas um tumor palpável, e 4 animais da dieta HSF apresentaram 2 ou mais tumores. Os outros grupos apresentaram apenas 1 ou 2 camundongos, no máximo, com duas massas tumorais mamárias (Fig. 7D). Mortes não relacionadas aos tumores foram observadas em 2/19 (10,5%) no grupo etoricoxibe e 3/19 (15,8%) no grupo HSF; sendo esses casos excluídos das análises.

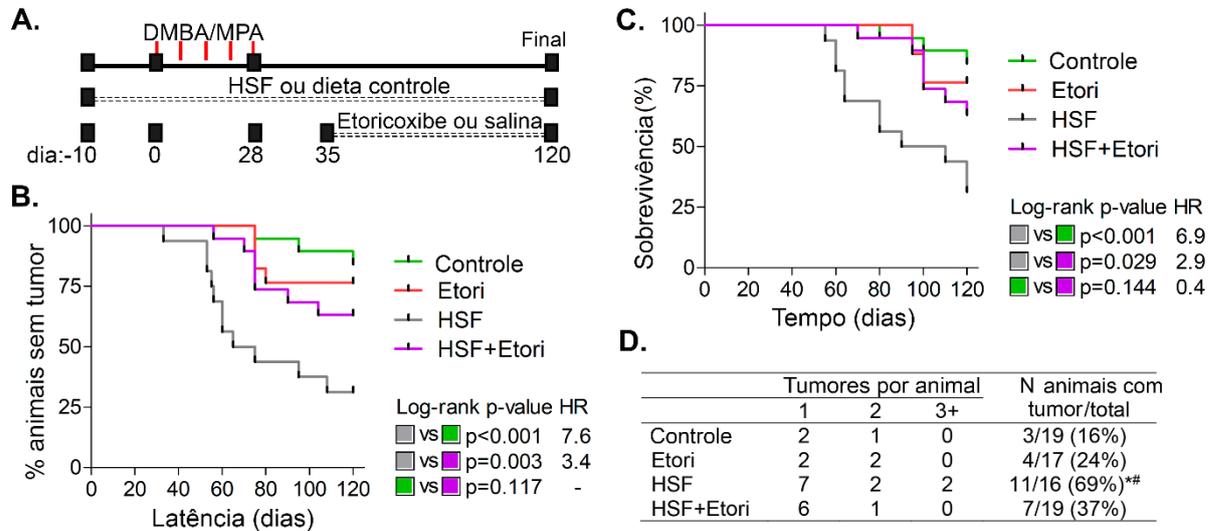


Figura 7 – O inibidor de COX-2, etoricoxibe, retarda a formação de tumores e prolonga a sobrevida no modelo de carcinogênese mamária. (A) Desenho experimental: camundongos *Swiss* fêmeas foram alimentadas com a dieta controle ou HSF por 10 dias, antes da indução dos tumores com DMBA/MPA (5 doses, 1/semana). Sete dias depois do fim do protocolo DMBA/MPA, os grupos dieta controle e dieta HSF foram subdivididos e tratados com etoricoxibe (5mg/kg/dia) ou salina (n=19/grupo) por um total de 120 dias ou até que fosse constatado algum tipo de critério de eutanásia nos animais. (B-C) Gráfico de Kaplan-Meier mostrando o efeito da dieta e etoricoxibe na (B) latência tumoral (% de animais livres de tumor) e (C) sobrevida no modelo DMBA/MPA. O valor de p por log-rank e *hazard-ratio* (HR) também estão mostrados. (D) A incidência tumoral e a multiplicidade de tumores entre os grupos. *p<0,05 comparando com o grupo controle, # p=0,061 comparando o grupo “HSF+Etori” (teste de Fisher). “controle” (dieta controle + salina); Etori (dieta controle + etoricoxibe); HSF (dieta HSF + salina); HSF+Etori (dieta HSF + etoricoxibe).

Para caracterizar o eixo COX-2/PGE2 nas amostras de TAM, coletou-se o TAM contralateral aos tumores mamários formados, de modo a minimizar a interferência do tumor no microambiente tecidual mamário. Ensaios de ELISA demonstraram que a dieta HSF aumentou a produção de PGE2 nas culturas *ex vivo* do TAM (Fig. 8A), e esse efeito foi paralelo ao aumento dos níveis da proteína COX-2 (Fig. 8B) no TAM dos camundongos alimentados com a dieta HSF. Etoricoxibe diminuiu os níveis da proteína COX-2 (Fig. 8A) e de PGE2 (Fig. 8B) no TAM, assim validando que o efeito do fármaco utilizado no modelo foi capaz de diminuir a produção de PGE2, indicando a inibição da atividade de COX-2 *in vivo*. Por outro lado, o tratamento com etoricoxibe não promoveu benefícios na desregulação metabólica e nos parâmetros de adiposidade nos camundongos alimentados com dieta HSF. Os camundongos alimentados com a dieta HSF combinado com etoricoxibe mostraram acúmulo de

gordura no fígado, níveis de glicose e colesterol, ganho de peso, adiposidade visceral e eficiência alimentar semelhantes aos dados encontrados no grupo HSF (Fig. 9). Apenas a ingesta calórica mostrou uma diminuição estatisticamente significativa no grupo combinando HSF+etoricoxibe quando comparado ao grupo HSF e aos grupos da dieta controle (Fig. 9). Juntos, esses dados sugerem que o papel anti-carcinogênico da inibição de COX-2 nos camundongos alimentados com a dieta HSF envolve uma modulação do microambiente mamário ao invés de apresentar efeito sistêmico sobre os parâmetros relacionados à obesidade.

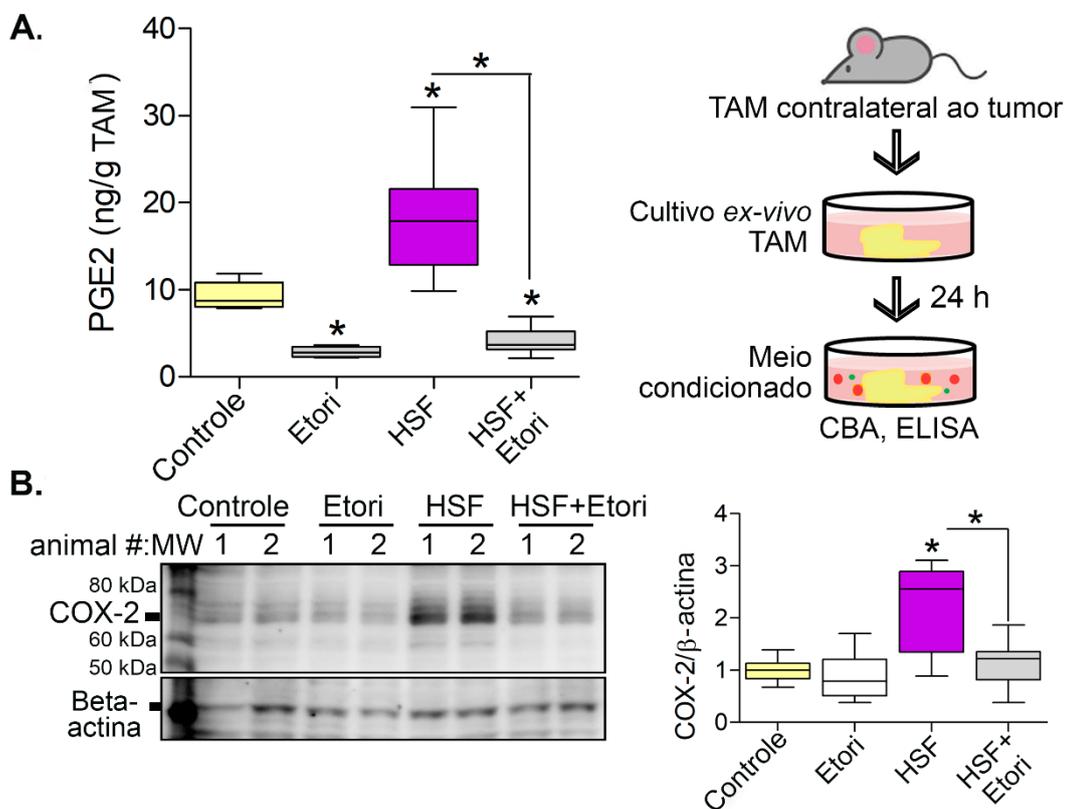


Figura 8 – Níveis de COX-2 e PGE2 mediante tratamento com etoricoxibe. (A) Quantificação de PGE2 por ELISA no sobrenadante retirado do cultivo *ex vivo* do TAM (n=6/grupo). (B) *Imunoblots* de COX-2 e β -actina no lisado do TAM (2 animais/grupo, representativo), e quantificação de COX-2, pela razão da intensidade da banda COX-2/ β -actina (n=6/grupo). “controle” (dieta controle + salina); Etori (dieta controle + etoricoxibe); HSF (dieta HSF + salina); HSF+Etori (dieta HSF + etoricoxibe). *diferença com relação ao grupo controle ou entre as comparações indicadas (ANOVA de uma via, post-hoc Tukey, $p < 0,05$).

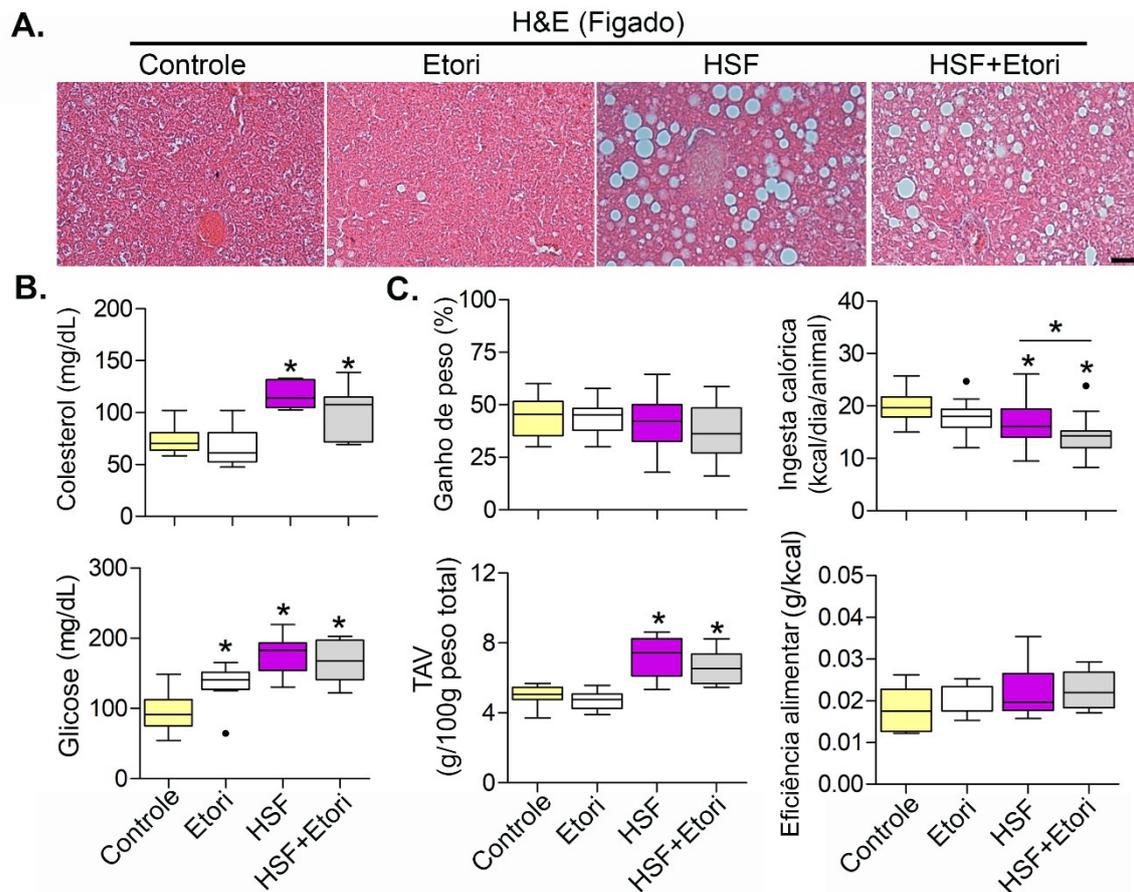


Figura 9 – Efeitos das dietas controle e HSF na presença ou ausência de etoricoxibe sobre parâmetros metabólicos em modelo de carcinogênese por DMBA/MPA. (A) Imagens representativas do acúmulo lipídico em cortes histológicos de fígado (coloração de H&E, aumento de 100x). (B) Níveis séricos de glicose e colesterol total (n=10/grupo). (C) Eficiência alimentar, ingesta calórica, ganho de peso (intervalo de 60 dias) e acúmulo de TAV (n=16-19/grupo). “Controle” (dieta controle + salina); “Etori” (dieta controle + etoricoxibe); “HSF” (dieta HSF + salina); “HSF+Etori” (dieta HSF + etoricoxibe). *diferente em relação ao grupo controle ou entre as comparações indicadas (ANOVA de 1 via, post-hoc Tukey, $p < 0,05$).

6.3 A INIBIÇÃO DE COX-2 DIMINUI A PROGRESSÃO DE TUMORES MAMÁRIOS ASSOCIADO COM A INIBIÇÃO DA ANGIOGÊNESE E INVASÃO, E INDEPENDENTE DE EFEITOS NA VIABILIDADE CELULAR

Em nosso modelo, o número de dias entre a detecção do tumor e a eutanásia foi chamado de “tempo de progressão” (Fig. 10A). Portanto, o efeito do etoricoxibe no prolongamento da sobrevivência (Fig. 7) poderia estar sendo atribuído ao aumento da latência do tumor, ao tempo de progressão para a eutanásia, ou ambos. Para avaliar o efeito da inibição de COX-2 na progressão tumoral, nós categorizamos os

camundongos que desenvolveram tumores mamários e foram eutanasiados antes do final do experimento em grupos “salina” e “etori”, independente da dieta consumida. Foram incluídos 2 animais no grupo controle e 11 animais na dieta HSF (grupo “salina”; n=13) *versus* 4 animais tratados com etoricoxibe em dieta controle e 7 animais do grupo HSF+etoricoxibe (grupo “etori”; n=11) (Fig. 10A). Em todos os casos, a progressão tumoral foi atribuída ao crescimento do tumor, e alcance de critérios de eutanásia, e não à perda de peso ou eventos neuro-locomotores. O tratamento com etoricoxibe aumentou o tempo médio de progressão tumoral de 13 dias no grupo salina, para 20 dias no grupo tratado com etoricoxibe (Fig. 10A). Corroborando esse resultado, o tratamento com etoricoxibe também diminuiu a taxa de crescimento tumoral em camundongos *Swiss* que foram submetidos ao implante do tumor mamário de Ehrlich e alimentados com dieta controle (Fig. 10B). Importante destacar que o consumo da dieta HSF, iniciado 60 dias antes dos implantes das células de Ehrlich, e seguido ao longo dos tratamentos com salina ou etori, não afetou a cinética de crescimento tumoral quando comparado com o grupo dieta controle (dado não mostrado). Através da avaliação do número de vasos nos tumores mamários do modelo DMBA/MPA, observamos que a dieta HSF gerou tumores mais angiogênicos do que a dieta controle, e o etoricoxibe diminuiu a angiogênese em ambos os grupos dieta controle e dieta HSF (Fig. 10C). Por outro lado, foi observado que nem a dieta HSF nem o etoricoxibe modularam a expressão do marcador mitótico CDC47 nos tumores mamários gerados no modelo DMBA/MPA (Fig. 10D). Todos os tumores apresentaram marcação positiva para CDC47 e a positividade de CDC47 ficou entre 54% e 96%, sem diferenças entre os grupos (Fig. 10D). Além disso, nos tumores gerados no modelo DMBA/MPA, as células positivas para COX-2 correspondem a menos de 10% das células tumorais avaliadas por IHC, sem diferenças entre as dietas e o tratamento com o inibidor de COX-2 (Fig. 10D). Juntos, esses resultados sugerem que o prolongamento no tempo de progressão induzido pelo tratamento com etoricoxibe parece envolver mecanismos de inibição da angiogênese sem afetar diretamente a proliferação das células tumorais *in vivo*.

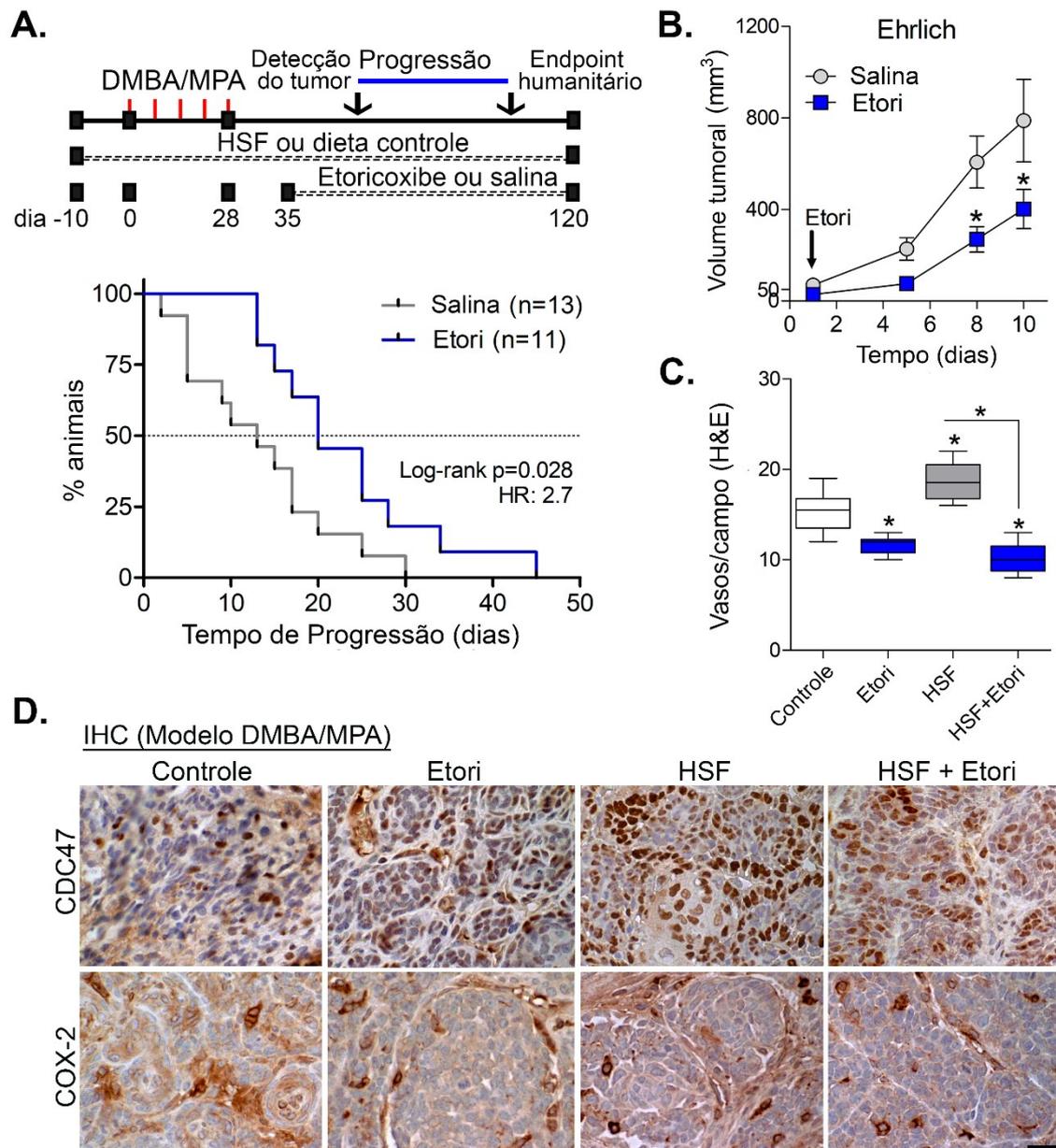


Figura 10 – Etoricoxibe retarda a progressão de tumores mamários. (A) Curvas de Kaplan-Meier mostrando o tempo de progressão dos animais tratados com salina *versus* etoricoxibe (dados da coorte da figura 7). O painel também mostra como a progressão tumoral foi estimada no modelo DMBA/MPA. “Salina” (2 controles e 11 animais HSF; $n=13$) e “Etori” (4 Etori e 7 animais HSF+Etori; $n=11$), os animais representados nesses grupos foram aqueles cuja finalização se deu devido ao aparecimento do tumor, antes do final do experimento (120 dias). Valor do p para o teste de log-rank e HR também se encontram representados na figura. (B) Cinética de crescimento de implantes de células tumorais de Ehrlich em gordura mamária de camundongos *Swiss* fêmea tratadas com salina ou etoricoxibe (5mg/kg/dia; gavagem). (C) Número de microvasos nos tumores mamários induzidos por DMBA/MPA, em animais alimentados com a dieta controle ou HSF, com ou sem etoricoxibe; a avaliação foi por H&E (amostras foram retiradas da coorte da Figura 7). 6 tumores (1 por animal) do grupo HSF e HSF+Etori foram randomicamente selecionados para análise. Os outros 2 grupos consistem de 4 tumores mamários formados em 3 camundongos do grupo controle e 6 tumores isolados de 4 camundongos no grupo etoricoxibe (detalhado na Figura 7D). (D) IHC representativa da análise das proteínas CDC47 e COX-2 entre os diferentes grupos experimentais no modelo

DMBA/MPA (aumento de 600x), marcação realizada nos tumores mamários. *diferença em relação ao grupo “salina” ou “controle”, considerando o mesmo tempo de tratamento, ou nas comparações indicadas (em B, ANOVA de duas vias, post hoc Bonferroni, $p < 0,05$, $n=6$ /grupo; em C, ANOVA de uma via).

Vários estudos têm demonstrado o efeito antiproliferativo e citotóxico de inibidores de COX-2, principalmente o celecoxibe, em modelos *in vitro* de células de câncer de mama, e implantes xenógrafos (BASU et al., 2004, 2005; GRÖSCH et al., 2006; JEON; SUH, 2013; WANG et al., 2017). Contudo, nossos dados mostram que a depleção de COX-2 por siRNA não afeta a viabilidade da linhagem celular MDA-MB231 (Fig. 11A), a qual expressa constitutivamente a proteína COX-2 (Fig. 11A blot). Comparando os níveis de mRNA de COX-2/PTGS2 em um painel de sequenciamento de RNA de linhagens de câncer de mama, observamos que a expressão de COX-2 ocorre principalmente em células RE-negativo, principalmente nas linhagens do subtipo *claudin-low* quando comparadas com as células RE-positivo (Fig. 11B). Esses dados são particularmente importantes, dado que a viabilidade celular nos experimentos com as linhagens celulares MDA-MB231 (RE-negativo/*claudin-low*), MCF7 (RE-positivo) e SKBR3 (HER2-positivo) não apontaram nenhuma alteração de viabilidade ou citotoxicidade do etori, enquanto o celecoxibe teve efeitos citotóxicos a partir da dose de 50 μ M (Fig. 11C). Notavelmente, essas concentrações de celecoxibe foram muito maiores do que aquelas necessárias para diminuir os níveis de PGE2 em células MDA-MB231 (Fig. 11D). Além disso, as células MCF7 não expressam a proteína COX-2 (Fig. 11A) e não produzem níveis significativos de PGE2 (Fig. 11D), mesmo assim foram sensíveis ao tratamento com celecoxibe em altas concentrações (50-100 μ M). Estes resultados sugerem que o celecoxibe apresenta efeitos não-seletivos (off-target) que não são observados com o etoricoxibe.

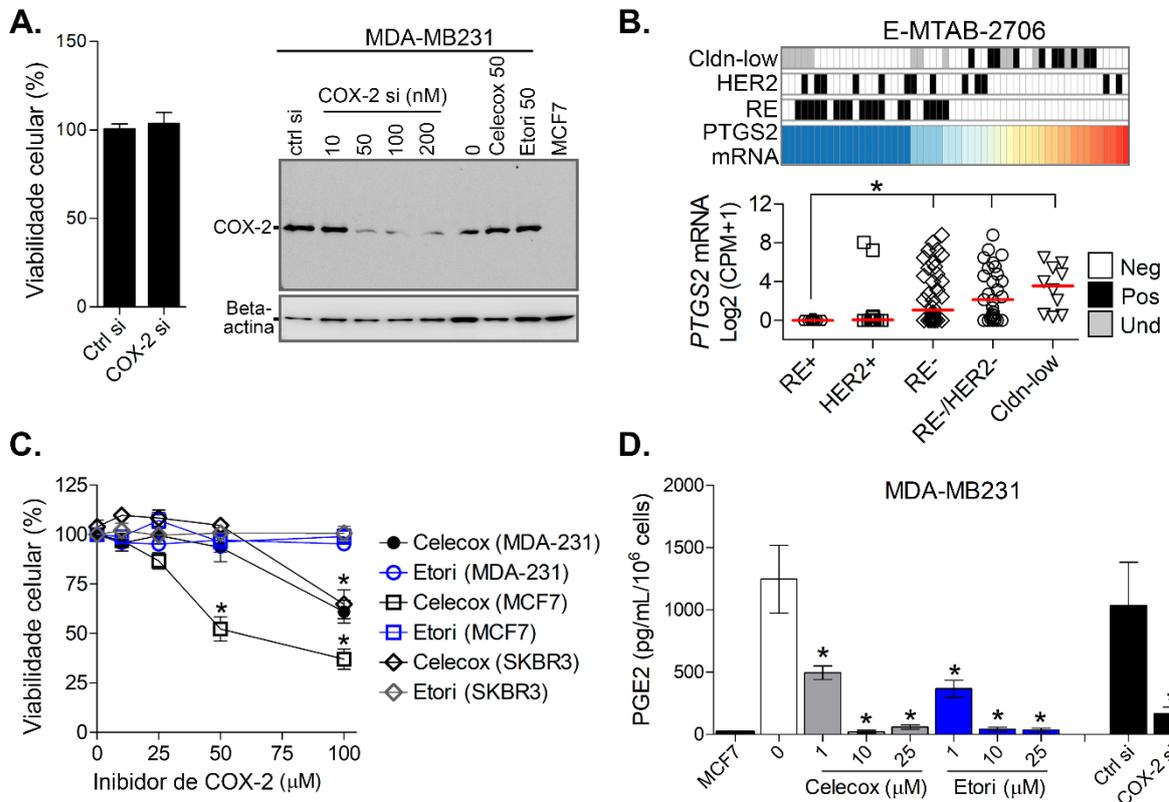


Figura 11 – Efeito do tratamento com inibidores de COX-2, celecoxibe e etoricoxibe em linhagens celulares de câncer de mama, *in vitro*. (A) Viabilidade celular em linhagem de câncer de mama MDA-MB231 após 96 h de transfecção com siRNA para COX-2 ou siRNA controle (100 nM), como avaliado por MTT. *Imunoblots* para a validação da depleção de COX-2 por siRNA (48 h pós-transfecção), e o efeito dos inibidores de COX-2 (48 h de tratamento) no imunocnteúdo de COX-2 (B) Expressão de COX-2 (PTGS2 mRNA) em um painel de sequenciamento de RNA de linhagens celulares de câncer de mama (E-MTAB-2706) agrupadas de acordo com a classificação para RE, HER2 e *claudin-low*. Status dos receptores e indicação do fenótipo *claudin-low*: negativo (Neg), positivo (Pos) ou indeterminado (Ind). RE- (linhagens RE-negativo); RE+ (linhagens RE-positivo); RE-/HER2- (linhagens duplo negativas); *cldn-low* (*claudin-low*). *diferença entre as comparações indicadas (Kruskal-Wallis post hoc Dunns; $p < 0,05$). (C) Experimento de viabilidade celular (MTT) mostrando o efeito de diferentes concentrações de etoricoxibe e celecoxibe nas linhagens celulares MDA-MB231, SKBR3 e MCF7 após 72 h de tratamento. *diferença em relação ao grupo controle/0 μ M e ao grupo etoricoxibe nas mesmas concentrações (ANOVA de 2 vias, Bonferroni; $p < 0,05$). (D) Efeito de diferentes concentrações de etoricoxibe e celecoxibe, e o efeito do siRNA de COX-2 na produção de PGE2 em células MDA-MB231 determinado por ELISA (48 h de tratamento). celecox (celecoxibe), etori (etoricoxibe), ctrl si (controle do padrão de siRNA). No painel B: “Controle” (dieta controle + salina); “Etori” (dieta controle + etoricoxibe); “HSF” (dieta HSF + salina); “HSF+Etori” (dieta HSF + etoricoxibe). Em D: *representa a diferença estatística com relação aos grupos controle ou 0 μ M (ANOVA de 1 via, Tukey, $p < 0,05$), ou entre as comparações indicadas, ou com relação ao grupo “ctrl si” (teste-t, $p < 0,05$).

Levando em conta que as células do tumor mamário induzido por DMBA/MPA não expressam altos níveis de COX-2 (Fig. 11), e que o etoricoxibe não afeta a viabilidade celular *in vitro*, nós avaliamos se o etoricoxibe afeta outras características

de malignidade em câncer como invasão, migração e angiogênese (Fig. 12A-C). O ensaio *transwell* mostrou que tanto o etoricoxibe quanto o celecoxibe inibiram, parcialmente, a invasão celular na linhagem MDA-MB231 (Fig. 12A), enquanto que a migração, em ensaio de cicatrização, não foi alterada (Fig. 12B). Notavelmente, o efeito dos inibidores de COX-2 ocorreu apenas em concentrações suficientes para inibir quase que completamente a produção de PGE2 pelas células MDA-MB231 (10 e 25 μ M), quando comparamos com os dados de ELISA para PGE2 (Fig. 11D). O efeito anti-invasivo da inibição de COX-2 foi confirmada pela depleção de COX-2 por siRNA na linhagem MDA-MB231 (Fig. 12A). Finalmente, nós produzimos MC de células MDA-MB231 não tratadas, tratadas com etori/celecoxibe, e de células transfectadas com siRNA para COX-2, e comparamos o potencial angiogênico em um modelo de angiogênese com células HUVEC *in vitro* (Fig. 12C). O MC das células não tratadas estimulou a angiogênese quando comparado ao meio DMEM fresco (não condicionado), enquanto que o MC preparado a partir de células MDA-MB231 tratadas com etori/celecoxibe, ou com COX-2 depletada por siRNA, exibiram um efeito angiogênico reduzido quando comparado ao MC controle (Fig. 12C). PGE2 purificada e VEGF recombinante foram utilizados como controles positivos (Fig. 12C). Sendo assim, esses resultados indicam que o tempo prolongado de progressão associado ao tratamento de etoricoxibe pode ser atribuído a efeitos antiangiogênicos/ anti-invasivos ao invés de efeitos antiproliferativos do fármaco.

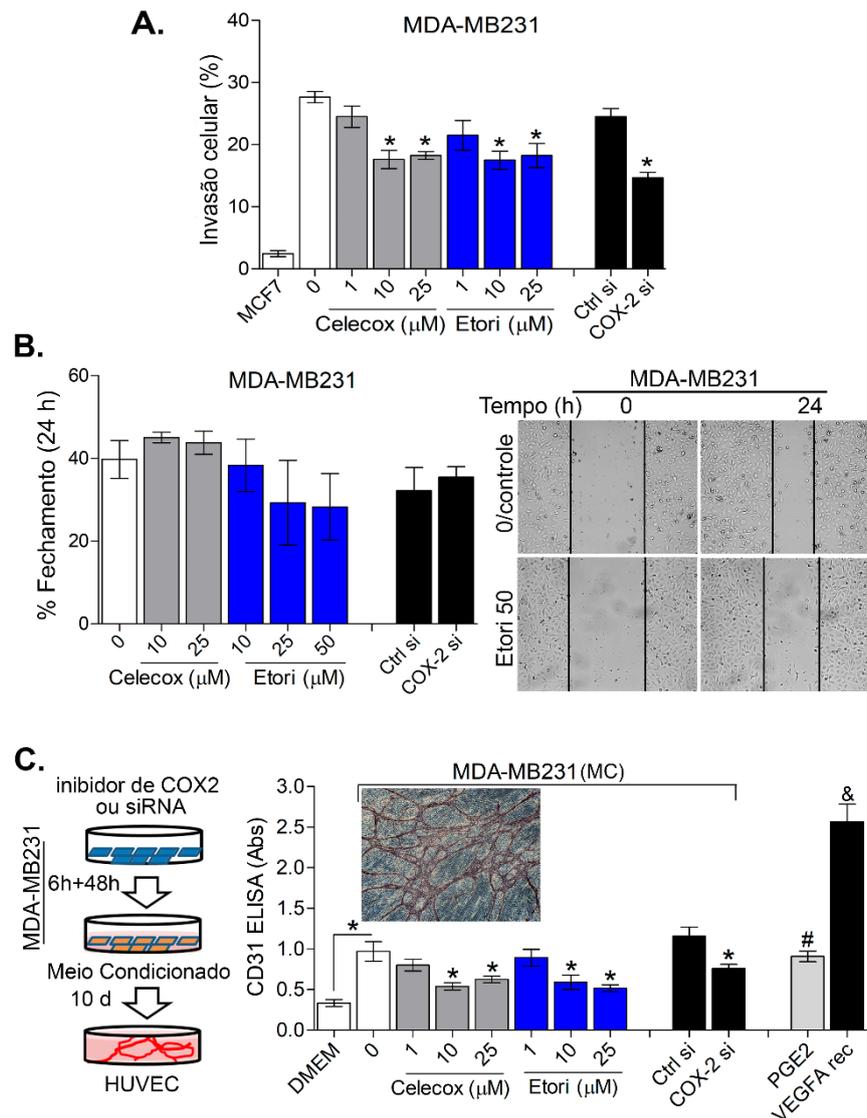


Figura 12 – Efeito dos inibidores de COX-2 sobre características de malignidade tumoral in vitro: invasividade, migração e angiogênese. (A) Ensaio *transwell* de invasão celular e (B) ensaio de migração celular (*wound healing*) mostrando o impacto dos inibidores de COX-2 e da depleção de COX-2 por siRNA na capacidade migratória e invasiva das células MDA-MB231. (C) Efeito do MC preparado a partir de células MDA-MB231 transfectadas com siRNA para COX-2 ou tratadas com inibidores de COX-2 sobre a angiogênese *in vitro*. As células MDA-MB231 foram tratadas por 6 h com etoricoxibe/celecoxibe ou siRNA para permitir que a droga ou o siRNA fossem captados, lavadas, e então um novo meio fresco e livre de fármacos foi adicionado para condicionamento por 48 h. O MC foi incubado por 10 dias com células endoteliais, e o imunocôntido de CD31 foi avaliado por ELISA. O “DMEM” corresponde ao grupo de meio controle não-condicionado. PGE2 e VEGFA recombinante foram utilizados como controles positivos de angiogênese. A microfotografia mostra a coloração de CD31 por IHC em estruturas tipo-vasos. celecox (celecoxibe), etori (etoricoxibe), ctrl si (controle do padrão de siRNA). No painel B: “Controle” (dieta controle + salina); “Etori” (dieta controle + etoricoxibe); “HSF” (dieta HSF + salina); “HSF+Etori” (dieta HSF + etoricoxibe). *representa a diferença estatística com relação aos grupos “controle” ou “0 μM” (ANOVA de 1 via, Tukey, $p < 0,05$), ou entre as comparações indicadas; ou com relação ao grupo “ctrl si” (teste-t, $p < 0,05$). #diferente do grupo “DMEM”, e &diferente de todos os outros grupos (ANOVA de 1 via, Tukey, $p < 0,05$)

6.4 O INIBIDOR DE COX-2 DIMINUI OS NÍVEIS DE AROMATASE E ESTROGÊNIO NO TAM DOS CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM DIETA HSF

O nosso próximo passo foi examinar a expressão dos receptores hormonais nos tumores induzidos por DMBA/MPA, e verificar se a dieta HSF promovia biossíntese local de estrogênio via mecanismos dependentes de COX-2/PGE2. Por imuno-histoquímica, encontramos que a maioria dos tumores induzidos por DMBA/MPA expressa RE e/ou RP (16/22, ~73%), enquanto que os tumores triplo-negativo foram menos frequentes (6/22, ~27%). A marcação para HER2 não mostrou padrões de membrana ou mostrou padrões fracos/quase imperceptíveis, sendo assim, esses tumores foram considerados negativos (Fig. 13). Dos 25 tumores analisados, três amostras foram inconclusivas. Nenhuma associação entre a positividade do receptor hormonal e o tipo de dieta foi observada. Em adição, alguns tumores induzidos por DMBA/MPA expressaram o marcador basal citoqueratina-14 (CK-14), cuja marcação parece estar localizada na camada das células basais dos dutos mamários. Todas as amostras analisadas apresentaram forte atividade proliferativa das células tumorais mamárias, como caracterizado pela alta expressão de CDC47 (Fig. 13).

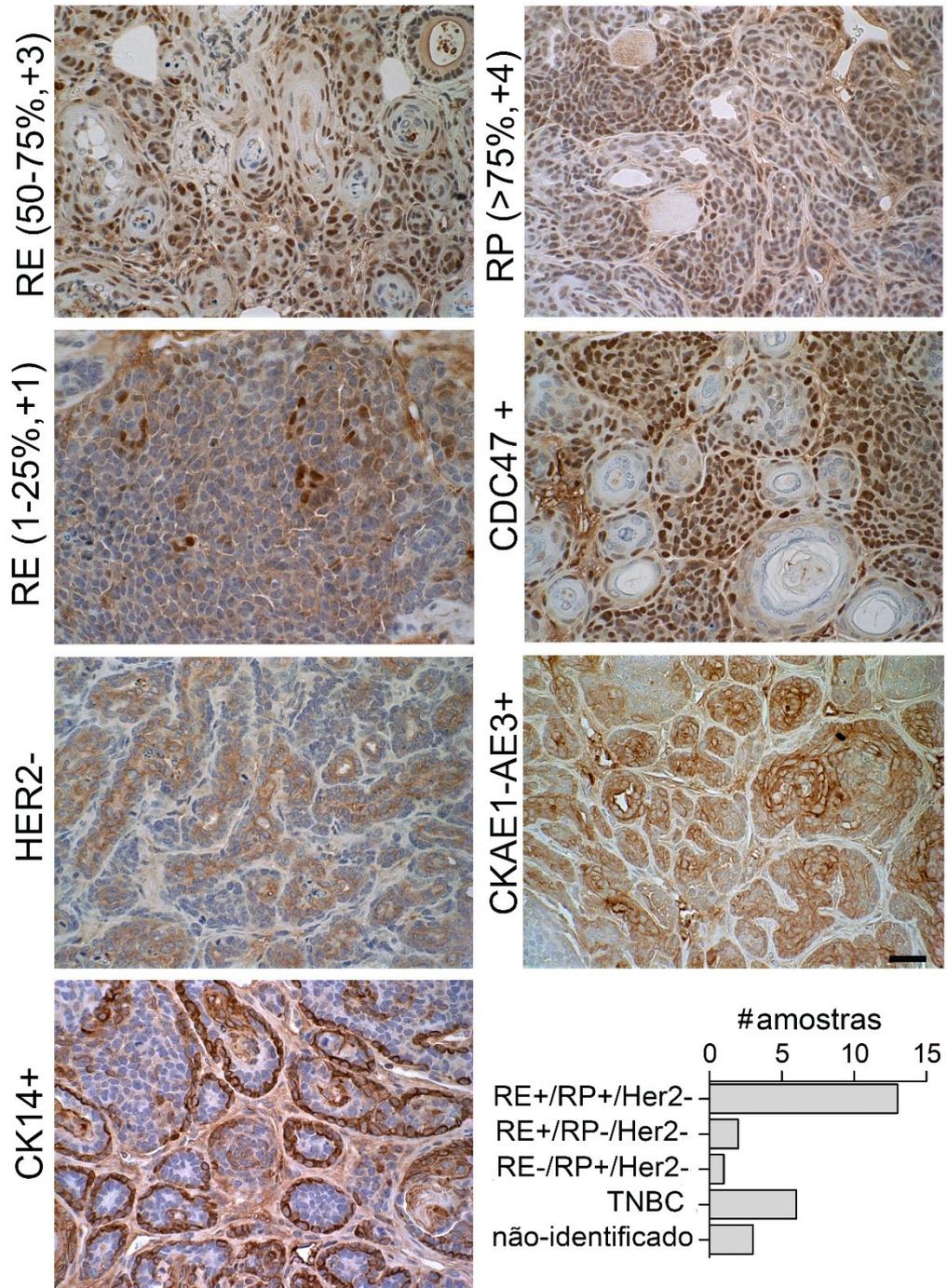


Figura 13 – Caracterização por IHC dos tumores formados no modelo DMBA/MPA. Imagem representativa da marcação por IHC dos receptores RE, RP e HER2, dos marcadores de proliferação CDC47 e das citoqueratinas (CK14, e pan-CKAE1-AE3) nos tumores mamários induzidos por DMBA/MPA (aumento de 600x). O número de tumores classificados de acordo com a expressão dos receptores também é mostrado. Essa análise incluiu 25 tumores mamários gerados na coorte da Figura 7.

Corroborando a maior proporção de tumores RE/RP-positivos em nosso protocolo, os camundongos alimentados com a dieta HSF mostraram aumento nos níveis da proteína aromatase (Fig. 14A) e produção de estrogênio (Fig. 14B) no tecido mamário, quando comparados aos níveis encontrados em animais do grupo dieta controle. E o TAM dos camundongos alimentados com dieta HSF combinada com etoricoxibe mostrou níveis da proteína aromatase (Fig. 14A) e produção de estrogênio (Fig. 14B) similares àqueles encontrados no grupo da dieta controle.

A cirurgia da ovariectomia bilateral (OVX) realizada antes da exposição ao DMBA/MPA preveniu a carcinogênese, e levou a uma carga tumoral mínima em ambas as dietas HSF e controle, quando comparado com camundongos não-operados (Fig. 14C). Esses resultados indicam que os tumores induzidos por DMBA/MPA são hormônio—dependentes em algum estágio do seu desenvolvimento, e requerem um ambiente proliferativo na glândula mamária para se desenvolverem. Também é importante destacar que nem mesmo a progesterona (MPA) utilizada para promover a proliferação das células epiteliais mamárias no protocolo do DMBA não foi suficiente para contornar o efeito inibidor da OVX na carcinogênese.

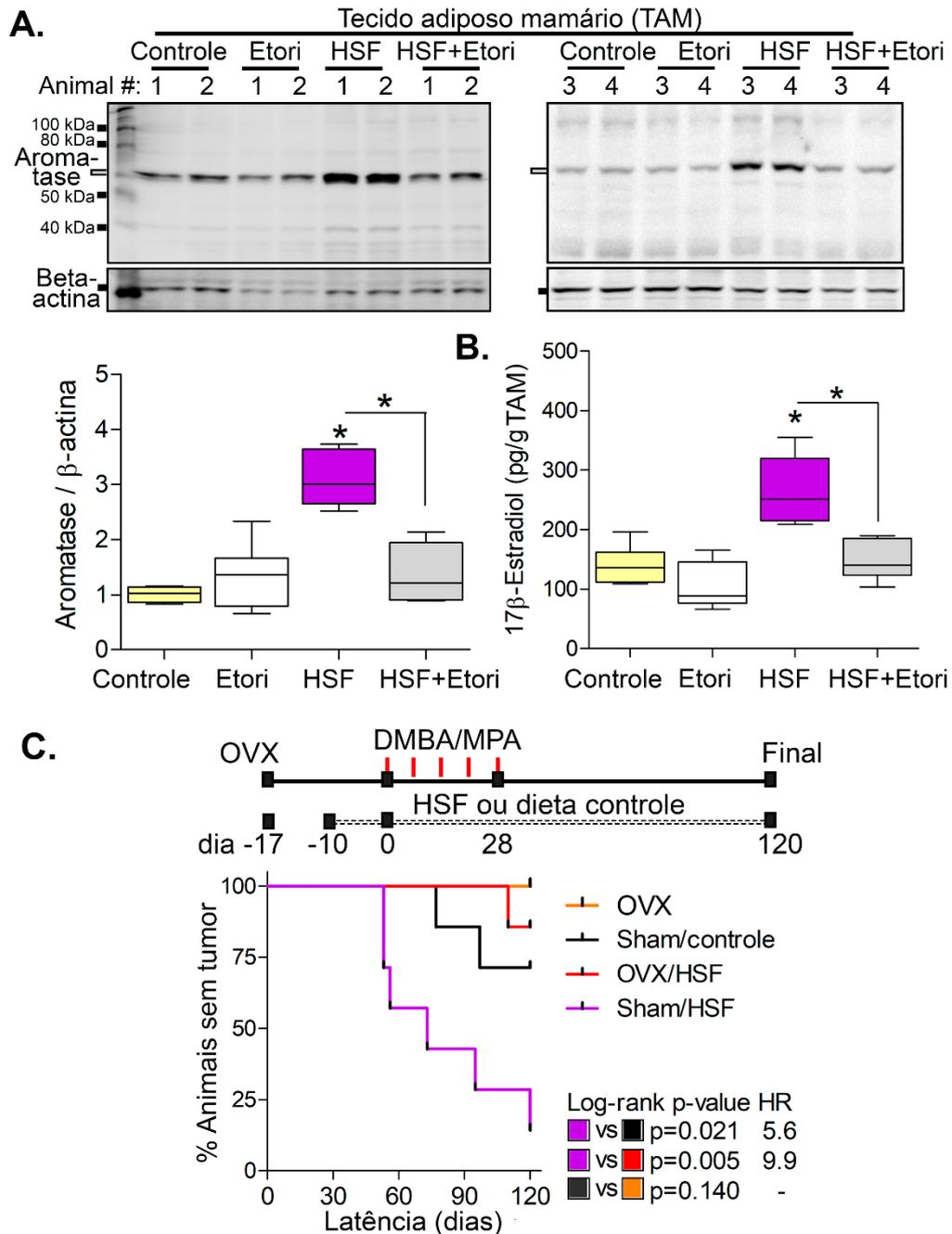


Figura 14 – COX-2 medeia a biossíntese local de estrogênio induzida pela dieta HSF, e o impacto da OVX sobre o desenvolvimento tumoral. (A) *Imunoblot* para aromatase e β -actina no lisado do TAM (representativo de 4 camundongos/grupo), e representação por box-plot da razão entre a intensidade das bandas aromatase/ β -actina (n=6/grupo). (B) Quantificação de 17- β -estradiol, por ELISA, no sobrenadante coletado da cultura *ex vivo* do TAM (n=6/grupo). “Controle” (dieta controle + salina); “Etori” (dieta controle + etoricoxibe); “HSF” (dieta HSF + salina); “HSF+Etori” (dieta HSF + etoricoxibe). *representa a diferença estatística com relação ao grupo controle, ou entre as comparações indicadas (ANOVA de 1 via, post hoc Tukey, $p < 0,05$). (C) Kaplan-Meier representando o impacto da OVX e *sham* na latência tumoral (% de animais sem tumores) em camundongos tratados com DMBA/MPA e alimentados com dieta controle ou dieta HSF. O valor de p de log-rank e a *hazard ratio* (HR) estão mostrados para a comparação entre as curvas (n=7/grupo). *sham* (grupo com falsa operação); OVX (ovariectomizados).

6.5 ETORICOXIBE REDUZ OS NÍVEIS DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS E A FORMAÇÃO DAS CLS-B NO TAM DOS CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM DIETA HSF

Objetivando estabelecer uma relação de causa e efeito entre o aumento de COX-2/PGE2 e a inflamação do TAM, avaliamos o impacto da inibição de COX-2 no número de CLS-B e na produção de citocinas. A coloração por H&E do TAM dos camundongos expostos ao DMBA/MPA e que receberam as diferentes dietas revelou que o tratamento com etoricoxibe reduziu o número de figuras histológicas compatíveis com as CLS-B nos animais alimentados com a dieta HSF (Fig. 15A). A imunofluorescência confirmou que as células presentes ao redor dos adipócitos mamários expressam o marcador de monócitos/macrófagos CD11b (SILVA et al., 2019). A presença das estruturas CLS-B expressando CD11b foi maior no grupo HSF, enquanto que a marcação de CD11b nos grupos da dieta controle e no grupo HSF+etoricoxibe foi mais disperse, o que se mostra consistente com o padrão de células mieloides residentes no tecido adiposo (Fig. 16A). Interessantemente, as CLS-B apresentaram expressão da proteína COX-2, como pode ser visualizado na marcação por IHC no TAM dos camundongos alimentados com a dieta HSF (Fig. 15B). A quantificação das CLS-B indicou que etoricoxibe reduziu o número de CLS-B nos animais alimentados com a dieta HSF quando comparado ao grupo HSF sem etoricoxibe (Fig. 15C). Etoricoxibe também inibiu o aumento nos níveis das proteínas IL-6 e MCP-1, induzidas pela dieta HSF no modelo de cultivo *ex-vivo* de TAM, ao passo que os níveis de TNF- α e IL-10 permaneceram inalterados entre os grupos avaliados (Fig. 16B). Finalmente, os efeitos da dieta HSF na hipertrofia (ou seja, volume celular e quantidade por campo de microscopia) dos adipócitos mamários não foi alterada pelo tratamento com inibidor de COX-2 (Fig. 15D).

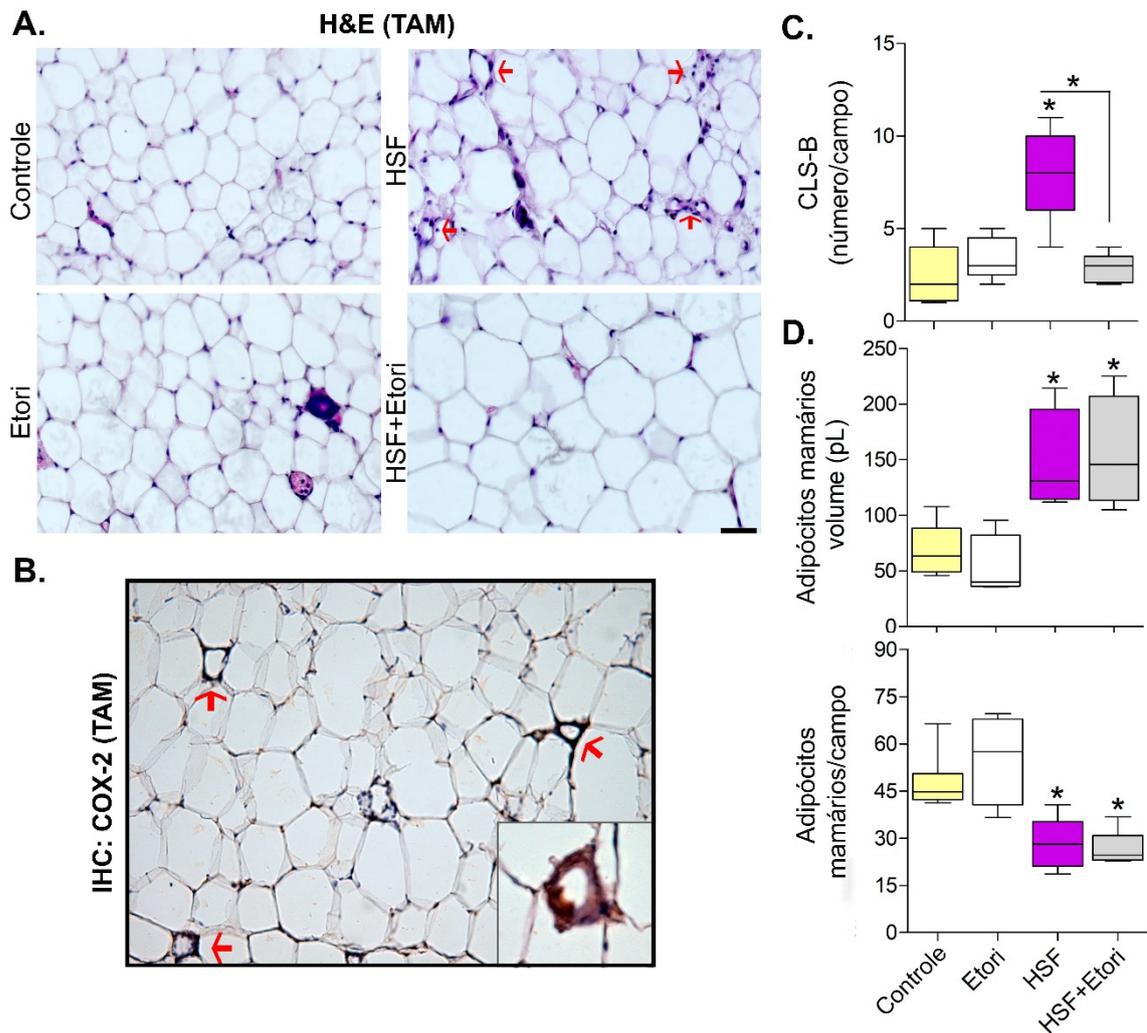


Figura 15 – A inibição de COX-2 reduz a formação de CLS-B. (A) Coloração por H&E representativa do TAM nos diferentes tratamentos. (B) Imagem representativa da análise por IHC da proteína COX-2 no TAM de animais alimentados com dieta HSF, mostrando COX-2 localizada nas CLS-B. (C) Quantificação das CLS-B no TAM marcado por H&E. (D) Volume e número de adipócitos no TAM de animais alimentados com dieta controle ou HSF, com ou sem o tratamento com etoricoxibe. Em A e B as flechas indicam estruturas identificadas como CLS-B (barra de 50 μ m). Os tecidos utilizados nessas análises foram gerados pela coorte de animais da Figura 7. “Controle” (dieta controle + salina); “Etori” (dieta controle + etoricoxibe); “HSF” (dieta HSF + salina); “HSF+Etori” (dieta HSF + etoricoxibe). Em C e D, *representa a diferença estatística em relação ao grupo “controle” ou entre as comparações indicadas (ANOVA de 1 via, post hoc Tukey, n=6/grupo).

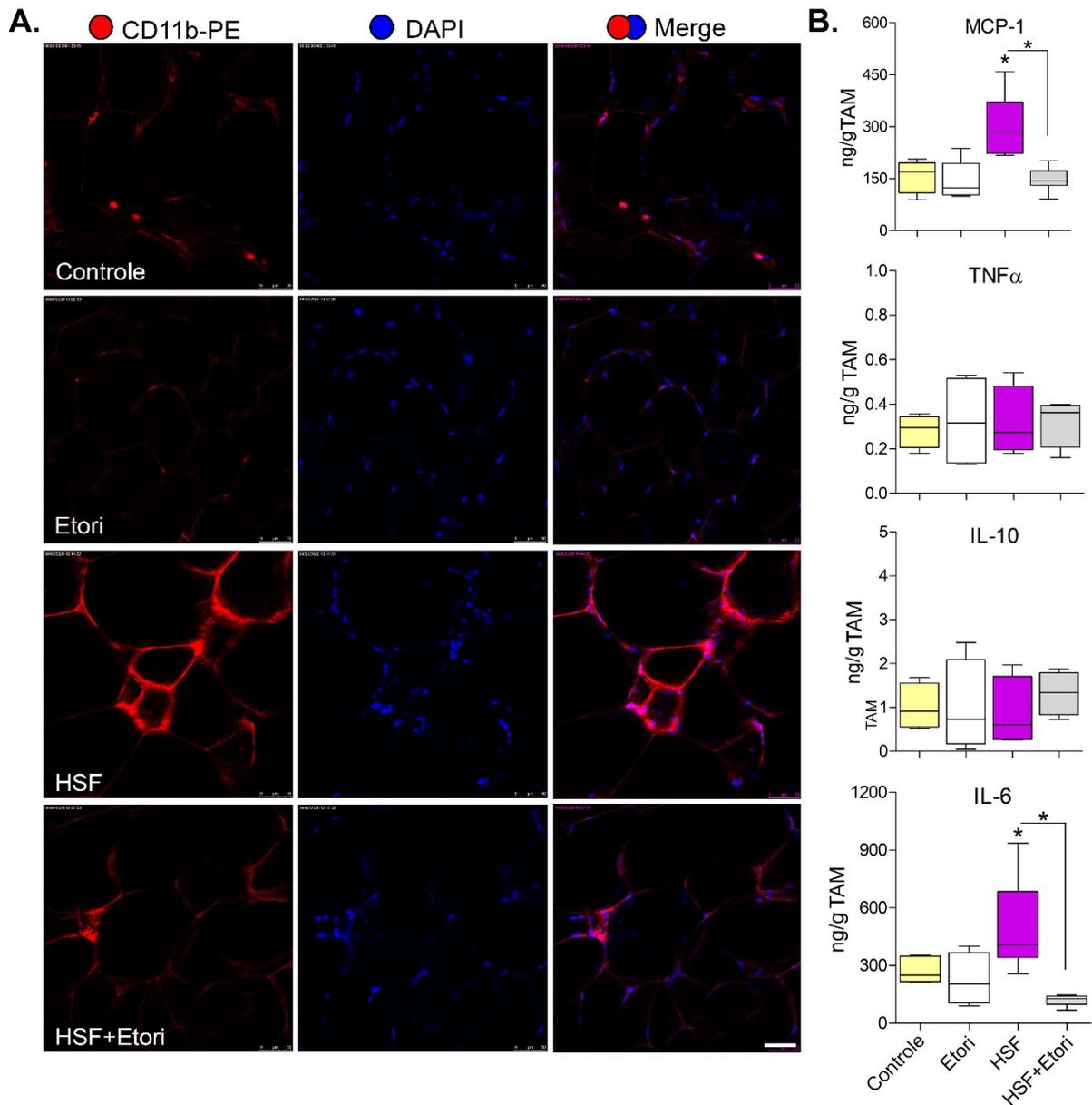


Figura 16 – Efeito do etoricoxibe sobre os níveis de citocinas, e imunofluorescência para marcação de macrófagos no TAM. (A) Imunofluorescência de CD11b em TAM coletado de camundongos alimentados com a dieta controle e a dieta HSF com ou sem o tratamento com etoricoxibe. (B) Ensaio CBA para detecção de citocinas no sobrenadante do cultivo *ex vivo* de TAM isolada de camundongos alimentados nas diferentes dietas, com ou sem etoricoxibe, no modelo de indução tumoral por DMBA/MPA. “Controle” (dieta controle + salina); “Etori” (dieta controle + etoricoxibe); “HSF” (dieta HSF + salina); “HSF+Etori” (dieta HSF + etoricoxibe). *representa a diferença estatística em relação ao grupo “controle” ou entre as comparações indicadas (ANOVA de 1 via, post hoc Tukey, n=6/grupo).

7 DISCUSSÃO

A obesidade atingiu níveis epidêmicos em todo o mundo. Sendo que por muito tempo ela foi associada com países de alta renda, hoje ela também atinge níveis preocupantes em países de baixa e média renda, principalmente em centros urbanos (OMS, 2021). Isso se deve principalmente aos hábitos alimentares adotados pela população, que consome alimentos com altos teores calóricos e que, associado ao estilo de vida sedentário, resultam em alto acúmulo calórico e baixo gasto energético. A principal consequência do desbalanço entre consumo e gasto energético é o aumento do tecido adiposo, pela hipertrofia dos adipócitos e consequente recrutamento de células imunes (ENGIN; ENGIN; GONUL, 2019; GUZIK et al., 2017).

Durante o quadro de obesidade, esse desbalanço gera um estado inflamatório constante, o que resulta em uma inflamação crônica do tecido adiposo branco, que histologicamente pode ser definida pela presença das CLS-B circundando os adipócitos necróticos. Esta é uma importante característica associando a obesidade com o risco de câncer de mama. Os macrófagos presentes nas CLS-B permanecem neste ambiente em colapso para realizar a remoção lipídica. Porém, como essas alterações no microambiente adiposo são contínuas, principalmente, em indivíduos que consomem alimentos com altos teores de gordura, os macrófagos são recrutados continuamente e acabam por formar células gigantes multinucleadas, o que resulta na formação de um microambiente tecidual com inflamação crônica (CINTI et al., 2005). Esses macrófagos produzem PGE2 via COX-2, bem como, citocinas como TNF- α , MCP-1 e IL-6. Experimentos com cultivo celular demonstraram que PGE2 derivado dos macrófagos estimula pré-adipócitos mamários a expressar aromatase, que por sua vez, aumenta a biossíntese local de estrogênio que pode facilitar a proliferação de tumores mamários (BHARDWAJ et al., 2013, 2015; CH'NG; JAAFAR; TUAN SHARIF, 2011; CRESPI; BOTTAI; SANTARPIA, 2016; HARVEY; LASHINGER; HURSTING, 2011; HOTAMISLIGIL, 2017; HOWE et al., 2013; MORRIS et al., 2011; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ et al., 2019; SUBBARAMAIAH et al., 2012, 2011).

Neste estudo, desenvolvemos um modelo com camundongos para investigar o papel de COX-2 nos cânceres de mama induzidos por uma dieta com alto teor de gordura animal. Como indutor tumoral utilizamos a combinação entre o carcinógeno DMBA e o estimulante hormonal MPA. Assim, esse modelo tem como vantagem contemplar as várias etapas da tumorigênese, isto é, a indução e a promoção tumoral,

em animais imunocompetentes. E ainda, tem a capacidade de originar tumores com características muito semelhantes às encontradas nos tumores mamários humanos, como os graus de agressividade morfológica que são semelhantes aos encontrados na classificação dos tumores mamários em mulheres (COSTA; SOLANAS; ESCRICH, 2002). Embora dispendioso, acreditamos que modelos de gênese tumoral são mais realísticos para estudos de prevenção quando comparados aos implantes tumorais de linhagens celulares, uma vez que as últimas não passam pela pressão de seleção clonal e estabelecimento gradual de um microambiente tumoral como um tumor gerado com células do próprio animal. O modelo aqui utilizado nos permitiu estudar os efeitos da promoção tumoral causados pela dieta, e avaliar o efeito da inibição de COX-2 nos tumores iniciados por DMBA. O uso do MPA, por sua vez, aumenta a incidência, diminui a latência e direciona para uma tumorigênese mamária mais seletiva quando combinado com DMBA (ABBA et al., 2016; ALDAZ et al., 1996). Nossos resultados mostraram que camundongos *Swiss* possuem uma suscetibilidade menor para tumores induzidos por DMBA/MPA, com um baixo número de indivíduos desenvolvendo tumores no grupo controle, pelo menos durante a janela de tempo do estudo. No entanto, a dieta HSF aumentou o risco do desenvolvimento de tumores mamários nesses animais, e esse é um dado que consideramos importante, dada a baixa susceptibilidade desses animais. A menor ocorrência de tumores em camundongos já foi previamente descrita, quando se constatou que menores doses de DMBA são necessárias para induzir tumores mamários em ratos, enquanto que, em camundongos são necessárias múltiplas doses, e como visto em outros estudos, existe a necessidade de administração, concomitante, de hormônios exógenos para auxiliar no desenvolvimento de tumores mamários em camundongos (ALDAZ et al., 1996).

Com o modelo desenvolvido, tínhamos o objetivo de validar o impacto do consumo da dieta HSF na incidência tumoral, em um ambiente submetido à ação do indutor químico de tumores. Para isso, era importante avaliar as características obesogênicas da ração produzida em nosso laboratório, principalmente, com relação ao impacto nos níveis e ativação de marcadores inflamatórios. Classicamente os modelos de obesidade são reconhecidos por resultarem em um fenótipo marcado por aumento de peso corporal global. Geralmente, os trabalhos de obesidade encontram um aumento de 10-25% do peso corporal dos animais com obesidade moderada

comparados com o grupo controle, já para obesidade severa o aumento costuma ser de 40% (HARIRI; THIBAUT, 2010). Apesar disso, também é sabido que a administração de DMBA prejudica o ganho de peso induzido pela dieta *high-fat*. No estudo, de Hsieh e colaboradores, os camundongos C57BL/6J alimentados com a dieta *high-fat* apresentaram aumento significativo de peso até o momento em que foi iniciada a administração do DMBA, a partir daí o ganho de peso dos animais foi menor, quando comparado com o grupo que continuou recebendo apenas a dieta *high-fat* (HSIEH; PENG; CHOU, 2017). Nossos dados reproduziram muito fidedignamente esse perfil. Por outro lado, os animais submetidos a dieta HSF apresentaram níveis de adiposidade aumentado, alterações de glicemia, colesterol e TG típicas de síndrome metabólica, além das alterações inflamatórias classicamente descritas em contextos de obesidade. Estudos clínicos mostram que a obesidade não é apenas caracterizada por uma alteração no peso global, ou no IMC, mas também pode ser definida pelas alterações no tecido adiposo, mudanças nos parâmetros metabólicos, inflamatórios e hormonais (IYENGAR et al., 2017). Com relação a isso, Iyengar e colaboradores, recentemente reportaram que adipócitos hipertrofiados, dislipidemia, elevados níveis de aromatase e aumento nos níveis circulantes de fatores pró-inflamatórios foram encontrados em mulheres não-obesas, o que foi definido como síndrome metabólica associada ao risco de câncer de mama (IYENGAR et al., 2017). Em camundongos BALB/C, uma dieta *high-fat* estimulou a formação de tumores mamários sem afetar o ganho de peso corporal e o peso dos tecidos, e isso foi acompanhado de aumento na proliferação de células epiteliais mamárias (ZHAO et al., 2013). Portanto, torna evidente que fatores como quantidade de calorias, tipo e teor de gordura, cronicidade e fatores genéticos cooperam para definir o potencial pró-inflamatório e tumorigênico das dietas *high-fat*, e esses fenótipos não necessariamente requerem ganho de peso para se manifestarem (BERGER, 2017).

Para se estudar a obesidade animal, pode-se optar por diferentes modelos: um deles é a utilização de animais geneticamente modificados, que espontaneamente irão atingir o fenótipo obeso, e o outro é a utilização de dietas indutoras de obesidade (SPEAKMAN et al., 2007). Os modelos de dieta tendem a demonstrar melhor as interações entre a doença estudada e o ambiente no qual ela está inserida, sendo possível identificar estímulos microambientais (FUCHS et al., 2018). A composição da dieta obesogênica representa um importante fator nos modelos de indução de

obesidade. O principal constituinte de uma dieta obesogênica são as gorduras. Os percentuais de gordura utilizados, geralmente, variam entre 45 e 60%. No entanto, estudos recentes questionam esses valores, dado que são muito maiores do que aqueles consumidos por humanos, e resultam em exagerada resposta metabólica (BASTÍAS-PÉREZ; SERRA; HERRERO, 2020; SPEAKMAN, 2019). O uso de modelos com dietas, reduzidas em teor de gordura podem alcançar um perfil mais parecido com a ingesta alimentar humana. Tal conceito vai ao encontro com a nossa escolha de utilizar um percentual de 35% de gordura, acrescida de um aumento no percentual de sacarose. A utilização de banha de porco nas dietas obesogênicas é um importante fator, pois o uso de outras fontes de gordura não geram o mesmo perfil inflamatório. O óleo de milho, por exemplo, quando utilizado no preparo de ração, apresentou menor número de CLS formadas em comparação com a dieta à base de banha de porco (PAVLISOVA et al., 2016). As consequências do consumo de uma dieta com alto teor de gordura animal são o aumento nos níveis de glicose e esteatose hepática (SHI et al., 2009), como observado em nosso modelo, e a associação de dieta com OVX, resultou em aumento nos níveis de marcadores inflamatórios como a MCP-1, COX-2 e macrófagos, e maior atividade da aromatase (BHARDWAJ et al., 2015).

Como visto acima, a dieta HSF tem potencial para desencadear alterações no tecido adiposo, que resultam no estabelecimento de uma inflamação crônica e subclínica, responsável por recrutar macrófagos. Os nossos resultados indicaram que a sinalização COX-2/PGE2 tem um papel direcional na inflamação do TAM, na síntese local de estrogênio e na tumorigênese mamária induzida pela dieta HSF. Prolongada exposição à dieta aumentou os níveis de marcadores inflamatórios mamários, como as CLS-B, PGE2 e citocinas, e promoveu a síntese local de estrogênio. Isso corrobora os fenótipos descritos no tecido mamário de mulheres obesas e no TAM de camundongos obesos e alimentados com dieta *high-fat* (BHARDWAJ et al., 2013, 2015; SUBBARAMAIAH et al., 2013). Nossos dados indicam que o TAM pró-inflamado/estrogênico está correlacionado com a ocorrência mais acelerada de carcinogênese mamária. E o dado fenotípico mais relevante deste estudo foi a demonstração de que a enzima COX-2 tem um papel fundamental na carcinogênese mamaria e manutenção do estado inflamatório do tecido adiposo, uma vez que múltiplos fenótipos foram inibidos nos animais tratados com etoricoxibe.

Os macrófagos, uma vez no tecido adiposo, se organizam nas CLS-B e secretam PGE2 que, por sua vez parece ser um importante mediador da síntese de estrogênio no tecido mamário via aromatase (SÁNCHEZ-JIMÉNEZ et al., 2019). Classicamente, a ativação dos macrófagos ocorre pela presença de um lipopolissacarídeo (LPS), presente na parede celular de bactérias gram-negativas que, no contexto de obesidade, são liberadas pelo aumento da permeabilidade intestinal. Uma vez na circulação, o LPS pode chegar ao tecido adiposo (CÂNDIDO; BRESSAN; ALFENAS, 2018; PARK et al., 2009; PROCTOR et al., 2017; SCHUMANN et al., 1990). Entretanto, além do LPS presente no microambiente do tecido adiposo, os adipócitos necróticos extravasam os TG, em forma de ácidos graxos livres, para o meio externo. Os principais ácidos graxos secretados são o palmítico e esteárico, que são ácidos graxos saturados que apresentam função quase exclusivamente energética ao organismo. Muitos trabalhos descrevem esses ácidos graxos livres como possíveis agonistas do receptor TLR4 localizado nos macrófagos (HOTAMISLIGIL, 2017; MCNELIS; OLEFSKY, 2014; NGUYEN et al., 2017). No entanto, mecanisticamente, essa hipótese da participação dos ácidos graxos na ativação de TLR4, ainda permanece um pouco controversa. Alguns autores sugerem que os ácidos graxos são agonistas do receptor TLR4, e que a ligação direta ocorre pela ação de co-ligantes como fetuin-A, que é liberada pelo fígado (HOWE et al., 2013; PAL et al., 2012). Outros autores indicam que a ativação não ocorre por ligação direta ao receptor TLR4 (LANCASTER et al., 2018), daí a importância do LPS extravasado pela permeabilidade intestinal. O que é consenso é que o excesso de ácidos graxos livres ativa uma resposta inflamatória no tecido adiposo, durante a obesidade, e para que essa ativação ocorra é necessária a presença do receptor TLR4, visto que em modelos animais com depleção do receptor não houve ativação inflamatória (LANCASTER et al., 2018). Uma vez infiltrados no tecido adiposo, os macrófagos maduros passam a interagir com os adipócitos, em um *loop* parácrino envolvendo liberação de TNF- α e outras citocinas (pelos macrófagos) e liberação de ácidos graxos (pelos adipócitos), o que mantém a inflamação constante (ROGERO; CALDER, 2018; SUGANAMI et al., 2007). A participação de TLR4, e a interação desta via com a via da PGE2, assim como os sistemas de retroalimentação da inflamação tecidual em obesidade são bastante desconhecidas. Note que, em nossos dados, o etoricoxibe diminui o conteúdo de COX-2 no TAM, embora ele seja um inibidor da atividade

enzimática de COX-2, e não um modulador de expressão. CLS-B e as citocinas IL-6 e MCP-1 também foram diminuídas pelo tratamento com etoricoxibe. Esses dados indicam que a COX-2 contribui de maneira central para a manutenção do estado inflamatório do TAM. Por outro lado, não podemos excluir que um efeito do etoricoxibe sobre outros compartimentos - como as alterações intestinais pro-inflamatórias que provavelmente ocorrem em animais alimentados com HSF – não sejam relevantes para o efeito do inibidor de COX-2 em nosso modelo.

Em nosso modelo, as células presentes nas CLS-B expressam a proteína COX-2, e o inibidor de COX-2 diminuiu o número de CLS-B no TAM dos camundongos alimentados com a dieta HSF. O etoricoxibe reduziu os níveis da proteína MCP-1, sugerindo que a sinalização COX-2/PGE2 pode cooperar com a formação das CLS-B, possivelmente, por impulsionar o recrutamento de macrófagos. Recentes evidências mostraram que os macrófagos isolados do tecido adiposo de animais alimentados com dieta *high-fat* e de pacientes obesos expressam múltiplos fenótipos, e essas subpopulações não são adequadamente caracterizadas pelos perfis clássicos M1/M2 tipicamente reportados nos estudos de polarização de macrófagos *in vitro* (HILL et al., 2018; SERBULEA et al., 2018; SILVA et al., 2019). Por utilizarmos apenas um marcador geral de monócitos/macrófagos, o CD11b, nossos resultados não permitem definir o estado de polarização dos macrófagos dentro das CLS-B nem as fontes de PGE2 e citocinas no TAM dos camundongos alimentados com a dieta HSF. Assim, uma fenotipagem mais abrangente das CLS-B e das subpopulações de macrófagos residentes no TAM fornecerá uma melhor compreensão do microambiente que favorece os cânceres de mama associados à obesidade.

Nos estudos citados anteriormente, a hipótese do mecanismo de produção de PGE2 e o consequente aumento de estrogênio, coloca os pré-adipócitos como células-alvo da PGE2 produzida por macrófagos presentes em CLS-B, via ativação de receptores EP, levando à expressão de aromatase e biossíntese de estrogênio. O estrogênio local, por sua vez, atuaria promovendo a proliferação, migração e inibição da apoptose de clones tumorais eventualmente presentes no tecido mamário. Somado a esse mecanismo, alguns pesquisadores também sugerem que a PGE2 produzida nos macrófagos pode atuar diretamente sobre as células tumorais, estimulando os receptores EP, principalmente EP4 e ditando a progressão tumoral. Sabe-se que produção de PGE2, que é aumentada pela obesidade, pode estimular diretamente a

migração e invasividade e inibir a apoptose em células de câncer de mama (BOWERS; DEGRAFFENRIED, 2015; MAJUMDER et al., 2018). O nosso modelo corrobora esses dados, assim como mostra que a COX-2 não parece estar envolvida diretamente na proliferação celular *in vitro* e *in vivo*, uma vez que o etoricoxibe não impacta a viabilidade celular *in vitro* nem alterou a expressão de CDC47 nos modelos animais.

O tratamento com o inibidor seletivo de COX-2 foi suficiente para prevenir a inflamação do TAM e a produção de estrogênio induzida pela dieta HSF, que foi acompanhada pelo aumento da latência tumoral, diminuição de incidência e prolongada sobrevida. Considerando que o tratamento com etoricoxibe começou apenas depois do protocolo de indução tumoral por DMBA/MPA, é bem provável que os benefícios da inibição de COX-2 estejam associados com o bloqueio da etapa de promoção tumoral ao invés da iniciação/mutagenese. A respeito disso, estudos seminais dentro deste tema reportaram que os níveis de PGE2 tumorais são inversamente correlacionados com a latência dos tumores induzidos por DMBA em ratos (FOECKING et al., 1982). Notavelmente, em nosso modelo, o etoricoxibe reduziu a inflamação e carcinogênese mamária sem melhorar os efeitos deletérios da dieta sobre a glicemia, colesterol ou dos níveis de depósitos de gordura, indicando que adiposidade e desregulação metabólica, *per se*, não são suficientes para ativar a carcinogênese, a inflamação tecidual parece ser um componente chave do processo.

Níveis comparáveis ao grupo controle de PGE2 nos camundongos tratados com etoricoxibe foram correlacionados com a redução dos níveis de aromatase e síntese de estrogênio no TAM. Como a OVX anulou o efeito tumorigênico de DMBA/MPA e a maioria dos tumores foram RE/RP-positivos no nosso modelo, poderíamos intuitivamente concluir que a inibição do eixo aromatase-estrogênio poderia explicar o mecanismo pelo qual o inibidor de COX-2 mitigou a carcinogênese induzida pela dieta HSF. Por outro lado, estudos anteriores mostraram que OVX combinado com dieta *high-fat* foi mais efetivo do que dieta *high-fat* sozinha em promover um estado pró-inflamatório – com aumento de IL-6, TNF- α , MCP-1, PGE2, CLS-B e aumento de aromatase - no TAM de camundongos C57BL/6J (SUBBARAMAIAH et al., 2011). Em modelo similar, a reposição hormonal com estrogênio exerceu uma atividade anti-inflamatória, reduzindo a expressão dessas mesmas citocinas e diminuindo a expressão de aromatase no TAM de camundongos OVX alimentados com dieta *high-fat* (BHARDWAJ et al., 2015). No entanto, o efeito

da reposição de estrogênio sobre a carcinogênese mamária não foi avaliado. Baseado nessas evidências, nós deveríamos esperar mais tumores nos animais OVX alimentados com a dieta HSF. No entanto, a dieta HSF não foi suficiente para induzir tumores nos animais OVX em no nosso modelo. Uma peculiaridade do modelo usado nesse projeto se dá no fato de a carcinogênese mamária induzida por DMBA e dieta *high-fat* tem melhor desempenho em camundongos peripuberais (AUPPERLEE et al., 2015), uma vez que o epitélio mamário é altamente proliferativo e propenso à mutagênese neste estágio de desenvolvimento animal. Assim, é plausível que a curta exposição à dieta HSF em nosso modelo – ou seja, por 10 dias antes do início da indução por DMBA/MPA – não seja suficiente para compensar a abrupta depleção de estrogênio e involução da glândula mamária causada pela OVX. Iniciar o protocolo dietético em um tempo anterior ou maior, utilizar dietas com maior teor de gordura ou, ainda, utilizar camundongos geneticamente obesos poderiam ser meios para contornar essas limitações, de modo a termos um modelo de câncer de mama associado a obesidade em menopausa. Ainda, em modelo de indução tumoral associado à cirurgia de OVX, foi utilizada a suplementação com testosterona, que manteve o crescimento dos tumores, enquanto que a cirurgia de OVX sozinha impediu o crescimento tumoral em ratas Sprague-Dawley (COS et al., 2006).

Importante considerar que os efeitos pró-tumorigênicos da dieta *high-fat* não são limitados ao contexto de tumores RE-positivos. A obesidade tem também sido identificada como um fator de risco para câncer de mama triplo-negativo em humanos, dado que mulheres com IMC >30 têm cerca de 20% mais chances de desenvolverem tumores TNBC do que mulheres não-obesas (PIEROBON; FRANKENFELD, 2013), através de mecanismos similares aos encontrados nos tumores RE-positivos, como o acúmulo de citocinas pro-inflamatórias e envolvimento de macrófagos no TAM (TIWARI et al., 2019). Em um estudo recente, foi identificada associação entre mutação em BRCA1/2 e o surgimento precoce de tumor em mulheres na pré-menopausa e obesas. A mutação em BRCA1/2 foi correlacionada com o aumento nos níveis de aromatase e leptina no tecido adiposo das pacientes. Foram encontradas correlações positivas entre os níveis da proteína-C reativa circulante e da IL-6 com o IMC. Nos estudos que avaliam a associação entre obesidade e as mutações germinativas de BRCA1/2, a obesidade é indicada como um fator cooperante com as a instabilidade genômica causada pelas mutações germinativas (IYENGAR et al.,

2021). Por consequência, cria-se um microambiente favorável à iniciação (por mutação em BRCA1/2) e à promoção tumoral (por inflamação) no TAM; embora esse ponto seja especulativo. É interessante considerar o contexto de tumores triplo-negativos em nosso modelo, dado que 27% dos tumores gerados foram triplo-negativos. Uma dieta *high-fat* favorece a angiogênese no TAM e recrutamento de macrófagos e induz uma latência menor de tumores RE-negativos em camundongos expostos ao DMBA sem MPA (AUPPERLEE et al., 2015). Em um modelo utilizando ratos Zucker, o contexto obesogênico gerou uma maior proporção de tumores RE-negativo quando comparado aos camundongos normoponderais (HAKKAK et al., 2007). Em um estudo de meta-análise envolvendo 27 publicações foi identificada uma correlação positiva entre a obesidade e uma modesta redução no tempo livre de doença e na sobrevida total em todos os subtipos de câncer mama analisados (RH+HER2-; HER2+ e TNBC) (LOHMANN et al., 2021). Sendo assim, é improvável que a via COX-2/PGE2-aromatase/estrogênio seja o único mecanismo pelo qual a inflamação induzida pela obesidade aumenta a tumorigênese mamária.

Outro fator inflamatório aumentando nos animais alimentados com a dieta HSF foi a citocina IL-6 que, mediante tratamento com etoricoxibe, teve seus níveis diminuídos. Estudos com etoricoxibe em outros modelos inflamatórios observaram que o etoricoxibe reduziu significativamente os níveis de IL-6, enquanto o AINE diclofenaco não alterou os níveis da citocina (LAKOTA et al., 2018). Em pacientes com artrite reumatoide, o tratamento com etoricoxibe e celecoxibe promoveu redução nos níveis de IL-6 e IL-1 β em amostra de soro (THEODORIDOU et al., 2017). A inibição de COX-2 reduziu a ativação de NF- κ B, através da inibição da dissociação do complexo I κ B/NF- κ B, e com isso afetou a transcrição de citocinas inflamatórias (MACK STRONG et al., 2001). E como COX-2 é um gene alvo de NF- κ B, podemos considerar um eventual mecanismo de retroalimentação sendo ativado, e que explicar os efeitos amplos do etoricoxibe sobre diferentes marcadores inflamatórios em nosso modelo.

A investigação do efeito terapêutico do etoricoxibe em tumores já formados indicou que os tumores de Ehrlich foram sensíveis ao tratamento com o inibidor de COX-2, o qual reduziu a cinética de crescimento tumoral. No entanto, os implantes tumorais de Ehrlich em animais submetidos à dieta HSF não apresentaram crescimento acelerado quando comparado a animais em dieta controle. A pouca interação entre microambiente mamário e a promoção dos tumores de Ehrlich pode

ser decorrente de uma autossuficiência destas células tumorais, no que se refere à produção dos seus fatores de crescimento, e também ao fato de estes tumores não serem dependentes do estrogênio local estimulado pela dieta HSF (JAGANATHAN et al., 2010). Outros tipos celulares poderiam ser utilizados, como é o caso da linhagem 4T1, que é isogênica em camundongos BALB/C, e tende a ser mais imunogênica e passível de interações mais complexas com o microambiente do tecido adiposo do que as células de Ehrlich (LECHNER et al., 2013).

Além de prevenir a formação de tumores, o etoricoxibe também atrasou a progressão dos tumores formados. Considerando esse resultado, hipotetizamos que a inibição de COX-2 poderia levar a outros efeitos além da modulação do microambiente do TAM envolvido na gênese dos tumores. Por exemplo, inibidores de COX-2, como celecoxibe, inibiram a ativação da via angiogênica por meio da regulação do fator de crescimento endotelial vascular VEGF em linhagem MDA-MB231 *in vitro* (BASU et al., 2005). O celecoxibe também apresenta alto potencial antiproliferativo (GRÖSCH et al., 2006), promove parada no ciclo celular e induz a expressão de caspase-3 em células tumorais (WANG et al., 2017). Os inibidores de COX-2 também mostraram aumentar a sensibilização de células tumorais para tratamento com outros quimioterápicos *in vitro* (XIA et al., 2009). Além disso, o celecoxibe reduziu o crescimento tumoral em modelos animais de câncer de mama, com aumento na apoptose das células tumorais, e redução da angiogênese e promoção da necrose nas massas tumorais (BASU et al., 2004, 2005). O celecoxibe, administrado misturado na dieta, também preveniu a carcinogênese induzida por DMBA em ratos, aumentando o período de latência para o surgimento de tumores (ABOU-ISSA et al., 2001; DAI et al., 2012). O tratamento com celecoxibe reduziu a multiplicidade e o volume relativo dos tumores mamários quando comparado com os animais controle (HARRIS et al., 2000; JANG et al., 2002; MILIARAS et al., 2009).

Em nossos estudos *in vitro*, nós comparamos o celecoxibe e o etoricoxibe, com a finalidade de detectar as concentrações requeridas para gerar citotoxicidade com doses capazes de inibir a produção de PGE2 bem como verificamos o efeito da depleção de COX-2 em diferentes parâmetros *in vitro*. Tornou-se claro que a COX-2 não é fundamental para a viabilidade/proliferação das 3 linhagens celulares de câncer de mama testadas. A respeito disso, a toxicidade de celecoxibe é provavelmente um efeito não-seletivo que ocorre em concentrações mais altas do que as requeridas para

inibir a produção de PGE₂, além de ocorrerem independentemente do nível de expressão de COX-2 nas células de câncer de mama (GRÖSCH et al., 2006). De fato, estudos prévios têm reportado que etoricoxibe exibe uma maior seletividade por COX-2 quando comparado com celecoxibe e outros inibidores de COX-2. O etoricoxibe inibiu a atividade de COX-2, em amostras de sangue humano, com um IC₅₀ de 1,1 µM, comparado com um IC₅₀ de 116 µM para COX-1. Logo, sua seletividade é 106 vezes maior para COX-2 do que para COX-1. Em estudos clínicos com pacientes com osteoartrite, o etoricoxibe mostrou ser mais efetivo do que os AINEs tradicionais (BROOKS; KUBLER, 2006; RIENDEAU et al., 2001). Diferente dos dados com celecoxibe, o etoricoxibe não teve efeito no índice de mitose/proliferação nos tumores gerados *in vivo*, como determinado pelo marcador CDC47 – nem alterou a viabilidade celular *in vitro*. Por outro lado, o etoricoxibe exerceu atividade anti-angiogênica nos tumores induzidos por DMBA/MPA, assim como o secretoma dependente de COX-2, produzido a partir de células de câncer de mama, estimulou a angiogênese *in vitro*, um efeito clássico da PGE₂ (LALA; NANDI; MAJUMDER, 2018; MAJUMDER et al., 2014). Consistente com isso, o tratamento com celecoxibe em modelo xenógrafo com MDA-MB231 resultou em redução de vascularização e necrose tumoral (BASU et al., 2005). Portanto, a inibição da angiogênese induzida por COX-2, em adição aos efeitos anti-inflamatórios e anti-estrogênico no TAM, pode estar envolvido no aumento do tempo de progressão e prolongamento da sobrevivência dos animais tratados com etoricoxibe.

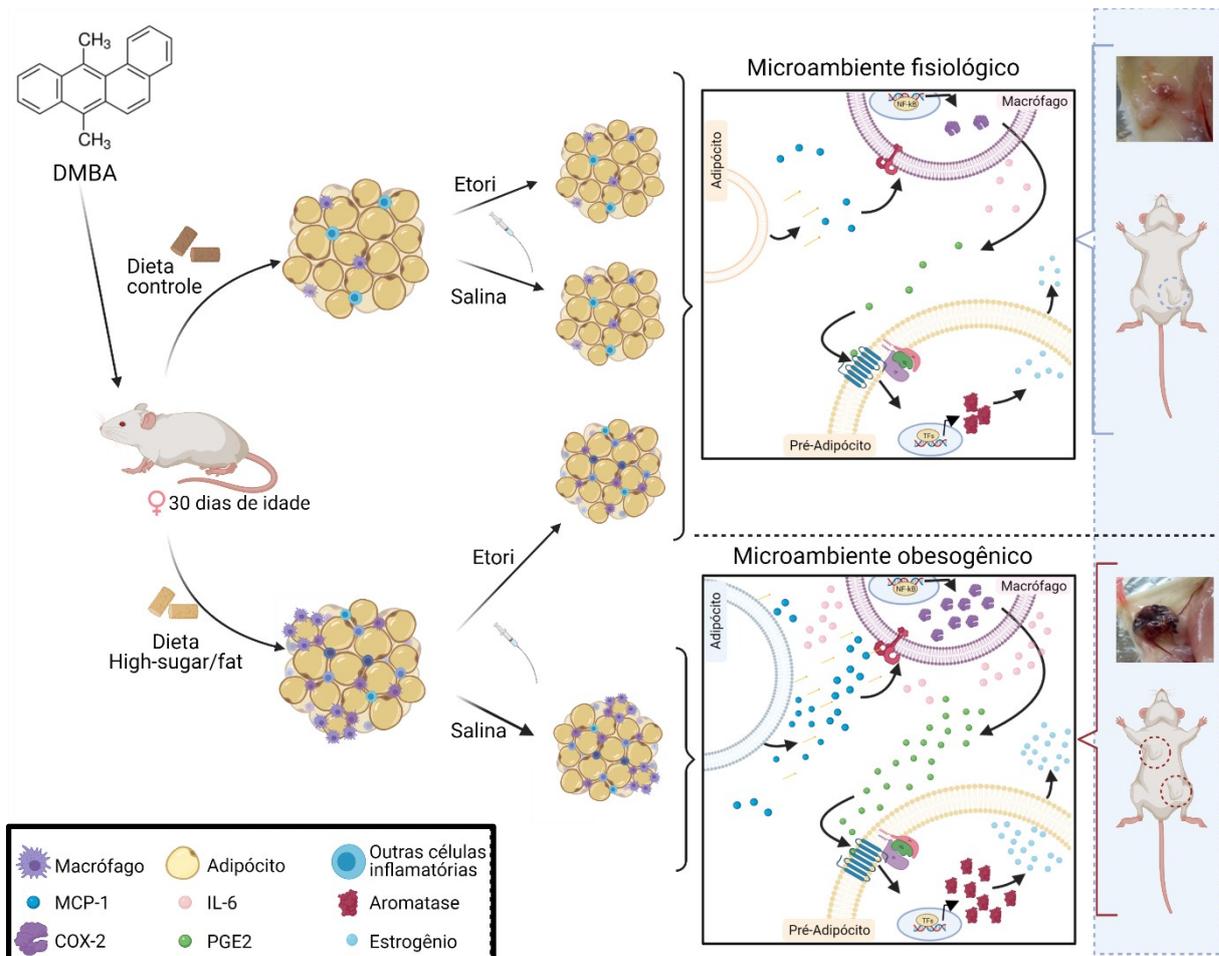


Figura 17 – Representação esquemática resumindo os principais achados no presente estudo. O desenho experimental deste trabalho utilizou como ponto de partida o consumo de duas diferentes dietas, uma obesogênica e outra controle. O ponto em comum entre os dois grupos foi a administração do carcinógeno DMBA/MPA. Os animais foram então divididos em subgrupos para a administração do tratamento com o inibidor de COX-2, etoricoxibe, ou veículo. A partir daí, foi verificado o impacto da dieta e do tratamento com o etoricoxibe, no desenvolvimento tumoral e, por fim, foi feita uma caracterização dos microambientes resultantes, bem como dos tumores desenvolvidos. Os animais alimentados com a dieta HSF desenvolveram um microambiente com maiores níveis de citocinas inflamatórias como IL-6, MCP-1, maior expressão de COX-2 e aromatase, formação de CLS-B, e aumento na produção de PGE2 e estrogênio no TAM. Os animais alimentados com dieta HSF desenvolveram tumores mais angiogênicos e de progressão mais rápida. Já os animais da dieta HSF tratados com etoricoxibe apresentaram redução dos níveis dos marcadores inflamatórios, CLS-B e do eixo aromatase/estrogênio comparáveis aos verificados em animais alimentados com dieta normocalórica. Essas mudanças na bioquímica do tecido adiposo foram associadas a uma menor latência de surgimento e menor sobrevida em animais alimentados com dieta HSF; um efeito prevenido pela inibição de COX-2 pelo etoricoxibe. MCP-1, Proteína quimiotática para monócitos-1; COX-2, ciclooxigenase-2; IL-6, interleucina-6; PGE2, prostaglandina E2; Etori, etoricoxibe; DMBA, 7,12-dimetilbenzantraceno. (Criado pela a autora com BioRender.com)

8 CONCLUSÃO

Em resumo, os dados apresentados neste trabalho mostram que COX-2 tem um papel central na tumorigênese mamária induzida pela dieta HSF. COX-2 contribui para a formação das CLS-B, produção de citocinas, e pelo aumento do eixo aromatase/estrogênio no TAM de camundongos alimentados com a dieta HSF. Apesar de a inibição de COX-2 não melhorar a adiposidade e as mudanças metabólicas, a inibição da inflamação no TAM pelo etoricoxibe foi suficiente para aumentar a latência tumoral, diminuir a progressão e prolongar a sobrevivência dos camundongos alimentados com dieta HSF. Esse panorama biológico sugere que estratégias farmacológicas e não-farmacológicas voltadas para a redução da atividade de COX-2, e inflamação como um todo, no tecido mamário podem resultar em diminuição da expressão de diversos fatores de risco para o câncer de mama em mulheres obesas, assim como podem apontar mecanismos que explicam a correlação entre o consumo de AINES e o risco diminuído de câncer de mama.

9 REFERÊNCIAS

- ABBA, M. C. et al. DMBA induced mouse mammary tumors display high incidence of activating *Pik3ca*H1047 and loss of function *Pten* mutations. **Oncotarget**, v. 7, n. 39, p. 64289–64299, set. 2016.
- ABOU-ISSA, H. M. et al. Dose-response effects of the COX-2 inhibitor, celecoxib, on the chemoprevention of mammary carcinogenesis. **Anticancer research**, v. 21, n. 5, p. 3425–3432, 2001.
- ALDAZ, C. M. et al. Medroxyprogesterone acetate accelerates the development and increases the incidence of mouse mammary tumors induced by dimethylbenzanthracene. **Carcinogenesis**, v. 17, n. 9, p. 2069–2072, set. 1996.
- ANDERSON, K. N.; SCHWAB, R. B.; MARTINEZ, M. E. Reproductive Risk Factors and Breast Cancer Subtypes: A Review of the Literature. **Breast Cancer Res Treat**, v. 144, n. 1, p. 1–10, 2014.
- AUPPERLEE, M. D. et al. Puberty-specific promotion of mammary tumorigenesis by a high animal fat diet. **Breast cancer research : BCR**, v. 17, n. 1, p. 138, nov. 2015.
- BACHELOT, T. et al. Prognostic value of serum levels of interleukin 6 and of serum and plasma levels of vascular endothelial growth factor in hormone-refractory metastatic breast cancer patients. **British Journal of Cancer**, v. 88, p. 1721–1726, 2003.
- BARNARD, M. E.; BOEKE, C. E.; TAMIMI, R. M. Established breast cancer risk factors and risk of intrinsic tumor subtypes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1856, n. 1, p. 73–85, 2015.
- BASTÍAS-PÉREZ, M.; SERRA, D.; HERRERO, L. Dietary options for rodents in the study of obesity. **Nutrients**, v. 12, n. 3234, p. 1–19, 2020.
- BASU, A. K. DNA damage, mutagenesis and cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 970, p. 1–13, 2018.
- BASU, G. D. et al. Cyclooxygenase-2 inhibitor induces apoptosis in breast cancer cells in an in vivo model of spontaneous metastatic breast cancer. **Molecular cancer research : MCR**, v. 2, n. 11, p. 632–642, nov. 2004.
- BASU, G. D. et al. Mechanisms underlying the growth inhibitory effects of the cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib in human breast cancer cells. **Breast cancer research : BCR**, v. 7, n. 4, 2005.
- BERGER, N. A. **Crown-like Structures in Breast Adipose Tissue from Normal Weight Women: Important Impact.** *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)* United States, abr. 2017.
- BHARDWAJ, P. et al. Caloric restriction reverses obesity-induced mammary gland inflammation in mice. **Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)**, v. 6, n. 4, p. 282–289, abr. 2013.

- BHARDWAJ, P. et al. Estrogen protects against obesity-induced mammary gland inflammation in mice. **Cancer Prevention Research**, v. 8, n. 8, p. 751–759, 2015.
- BOCCA, C. et al. Antiproliferative effects of COX-2 inhibitor celecoxib on human breast cancer cell lines. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 350, p. 59–70, 2011.
- BØRGLUM, J. D. et al. Differential expression of prostaglandin receptor mRNAs during adipose cell differentiation. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, v. 57, n. 5–6, p. 305–317, 1999.
- BOWERS, L. W. et al. NSAID use reduces breast cancer recurrence in overweight and obese women: Role of prostaglandin-aromatase interactions. **Cancer Research**, v. 74, n. 16, p. 4446–4457, 2014.
- BOWERS, L. W. et al. Obesity-associated systemic interleukin-6 promotes pre-adipocyte aromatase expression via increased breast cancer cell prostaglandin E2 production. **Breast Cancer Res Treat**, v. 149, n. 1, p. 49–57, 2015.
- BOWERS, L. W.; DEGRAFFENRIED, L. A. Targeting the COX-2 Pathway to Improve Therapeutic Response in the Obese Breast Cancer Patient Population. **Curr Pharmacol Rep.**, v. 1, n. 5, p. 336–345, 2015.
- BROOKS, P.; KUBLER, P. Etoricoxib for arthritis and pain management. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 2, n. 1, p. 45–57, 2006.
- BROWN, K. A. et al. Menopause is a determinant of breast aromatase expression and its associations with BMI, inflammation, and systemic markers. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 102, n. 5, p. 1692–1701, 2017.
- BRUEGGEMEIER, R. W. et al. Correlation of aromatase and cyclooxygenase gene expression in human breast cancer specimens. **Cancer Letters**, v. 140, p. 27–35, 1999.
- CAIRAT, M. et al. Use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and breast cancer risk in a prospective cohort of postmenopausal women. **Breast Cancer Research**, v. 22, n. 118, p. 1–14, 2020.
- CANCELLO, R. et al. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. **Diabetes**, v. 54, n. 8, p. 2277–2286, 2005.
- CÂNDIDO, T. L. N.; BRESSAN, J.; ALFENAS, R. DE C. G. Dysbiosis and metabolic endotoxemia induced by high-fat diet. **Nutrición Hospitalaria**, 2018.
- CARO, J. F. et al. Leptin: The tale of an obesity gene. **Diabetes**, v. 45, n. 11, p. 1455–1462, 1996.
- CARSWELL, K. A.; LEE, M.-J.; FRIED, S. K. Culture of Isolated Human Adipocytes and Isolated Adipose Tissue. **Methods Mol Biol.** 2012, v. 806, p. 203–214, 2012.
- CH'NG, E. S.; JAAFAR, H.; TUAN SHARIF, S. E. Breast Tumor Angiogenesis and

Tumor-Associated Macrophages: Histopathologist's Perspective. **Pathology Research International**, v. 2011, p. 1–13, 2011.

CHOW, L. W. et al. Concurrent celecoxib with 5-fluorouracil/epirubicin/cyclophosphamide followed by docetaxel for stages II-III invasive breast cancer: The OOTR-N001 study. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 22, n. 3, p. 299–307, 2013.

CINTI, S. et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. **Journal of Lipid Research**, v. 46, n. 11, p. 2347–2355, 2005.

CLÀRIA, J. Cyclooxygenase-2 Biology. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, p. 2177–2190, 2003.

CLEARY, M. P.; GROSSMANN, M. E. Minireview : Obesity and Breast Cancer : The Estrogen Connection. **Endocrinology**, v. 150, n. 6, p. 2537–2542, 2009.

CLEMONS, M.; GOSS, P. Estrogen and the Risk of Breast Cancer. **N Engl J Med**, v. 344, p. 276–285, 2001.

COS, S. et al. Melatonin inhibits the growth of DMBA-induced mammary tumors by decreasing the local biosynthesis of estrogens through the modulation of aromatase activity. **International Journal of Cancer**, v. 118, p. 274–278, 2006.

COSTA, I.; SOLANAS, M.; ESCRICH, E. Histopathologic characterization of mammary neoplastic lesions induced with 7,12 dimethylbenz(a)anthracene in the rat: A comparative analysis with human breast tumors. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 126, n. 8, p. 915–927, 2002.

CRESPI, E.; BOTTAI, G.; SANTARPIA, L. Role of inflammation in obesity-related breast cancer. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 31, p. 114–122, 2016.

CUI, J.; SHEN, Y.; LI, R. Estrogen synthesis and signaling pathways during ageing: from periphery to brain. **Trends Mol Med**, v. 19, n. 3, p. 197–209, 2013.

DAI, X. et al. Cancer hallmarks, biomarkers and breast cancer molecular subtypes. **Journal of Cancer**, v. 7, n. 10, p. 1281–1294, 2016.

DAI, X. et al. Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. **Journal of Cancer**, v. 8, n. 16, p. 3131–3141, 2017.

DAI, Z.-J. et al. Antitumor activity of the selective cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, on breast cancer in Vitro and in Vivo. **Cancer cell international**, v. 12, n. 1, p. 53, dez. 2012.

DANAEI, G. et al. Causes of cancer in the world: Comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. **Lancet**, v. 366, n. 9499, p. 1784–1793, 2005.

DANDONA, P. et al. Tumor Necrosis Factor- α in Sera of Obese Patients: Fall with Weight Loss. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 83, n. 8, p. 2907–2910, 1998.

DESPRÉS, J. P.; LEMIEUX, I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. **Nature**, v. 444, p. 881–887, 2006.

DIORIO, C. et al. Aromatase inhibitors in obese breast cancer patients are not associated with increased plasma estradiol levels. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 136, n. 2, p. 573–579, 2012.

DOMMEL, S.; BLÜHER, M. Does C-C motif chemokine ligand 2 (CCL2) link obesity to a pro-inflammatory state? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, p. 1–21, 2021.

DUBOIS, R. N. et al. Cyclooxygenase in biology and disease. **The FASEB Journal**, v. 12, n. 12, p. 1063–1073, 1998.

EL-SISI, A. E. et al. Oxamate potentiates taxol chemotherapeutic efficacy in experimentally-induced solid ehrlich carcinoma (SEC) in mice. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie**, v. 95, p. 1565–1573, nov. 2017.

ENGİN, A. B.; ENGIN, A.; GONUL, I. I. The effect of adipocyte–macrophage crosstalk in obesity-related breast cancer. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 62, n. 3, p. R201–R222, 2019.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). EMEA/265602/2005. Public statement on Valdyn (valdecoxib) – Withdrawal of the marketing authorisation in the European Union.

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Public_statement/2009/12/WC500018326.pdf (data wejścia: 03.06.2014). **European Medicines Agency**, 2005.

FAIN, J. N. Release of Interleukins and Other Inflammatory Cytokines by Human Adipose Tissue Is Enhanced in Obesity and Primarily due to the Nonfat Cells. **Vitamins and Hormones**, v. 74, n. 06, p. 443–477, 2006.

FANTUZZI, G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 115, n. 5, p. 911–919, 2005.

FERLAY, J. et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **International Journal of Cancer**, v. 144, n. 8, p. 1941–1953, 2019.

FOECKING, M. K. et al. Hormone dependence of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary tumor growth: correlation with prostaglandin E2 content. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 69, n. 2, p. 443–446, ago. 1982.

FRIEDMAN, J. M. Leptin and the endocrine control of energy balance. **Nature Metabolism**, v. 1, n. 8, p. 754–764, 2019.

FUCHS, T. et al. Animal models in metabolic syndrome. **Revista do Colegio Brasileiro de Cirurgioes**, v. 45, n. 5, p. 1–10, 2018.

GHANGHAS, P. et al. Chemopreventive action of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the inflammatory pathways in colon cancer. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 78, p. 239–247, 2016.

GNANT, M. et al. The predictive impact of body mass index on the efficacy of extended adjuvant endocrine treatment with anastrozole in postmenopausal patients with breast cancer: An analysis of the randomised ABCSG-6a trial. **British Journal of Cancer**, v. 109, p. 589–596, 2013.

GONZÁLEZ-MUNIESA, P. et al. Obesity. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, 2017.

GRÖSCH, S. et al. Cyclooxygenase-2 (COX-2)-independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 inhibitors. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 98, n. 11, p. 736–747, jun. 2006.

GUYENET, S. J.; SCHWARTZ, M. W. Regulation of food intake, energy balance, and body fat mass: Implications for the pathogenesis and treatment of obesity. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 97, n. 3, p. 745–755, 2012.

GUZIK, T. J. et al. The role of infiltrating immune cells in dysfunctional adipose tissue. **Cardiovascular Research**, v. 113, n. 9, p. 1009–1023, 2017.

HAKKAK, R. et al. Estrogen Receptor Expression of DMBA-Induced Mammary Tumors in Intact and Ovariectomized Lean and Obese Zucker Rats. **The FASEB Journal**, v. 21, n. 5, p. A734–A734, abr. 2007.

HAMMOND, M. E. H. et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 134, n. 7, p. e48-72, jul. 2010.

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

HARIRI, N.; THIBAUT, L. High-fat diet-induced obesity in animal models. **Nutrition Research Reviews**, v. 23, p. 270–299, 2010.

HARRIS, R. E. et al. Chemoprevention of breast cancer in rats by celecoxib, a cyclooxygenase 2 inhibitor. **Cancer research**, v. 60, n. 8, p. 2101–2103, abr. 2000.

HARVEY, A. E.; LASHINGER, L. M.; HURSTING, S. D. The growing challenge of obesity and cancer: An inflammatory issue. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1229, n. 1, p. 45–52, 2011.

HAUNER, H. The new concept of adipose tissue function. **Physiology and Behavior**, v. 83, n. 4, p. 653–658, 2004.

HAVEL, P. J. Regulation of Energy Balance and Carbohydrate/Lipid Metabolism. **Diabetes**, v. 53, 2004.

HILL, D. A. et al. Distinct macrophage populations direct inflammatory versus physiological changes in adipose tissue. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 22, p. E5096–E5105, maio 2018.

HINZ, B.; BRUNE, K. A. Y. Cyclooxygenase-2 — 10 Years Later. **THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS**, v. 300, n. 2, p. 367–375, 2002.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. **Nature**, v. 542, n. 7640, p. 177–185, 2017.

HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : Direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, v. 259, p. 87–91, 1993.

HOTTA, K. et al. Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. **Diabetes**, v. 50, n. 5, p. 1126–1133, 2001.

HOWE, L. R. et al. Cyclooxygenase-2: A target for the prevention and treatment of breast cancer. **Endocrine-Related Cancer**, v. 8, p. 97–114, 2001.

HOWE, L. R. et al. HER2/neu-induced mammary tumorigenesis and angiogenesis are reduced in cyclooxygenase-2 knockout mice. **Cancer Research**, v. 65, n. 21, p. 10113–10119, 2005.

HOWE, L. R. et al. Molecular pathways: Adipose inflammation as a mediator of obesity-associated cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 22, p. 6074–6083, 2013.

HSIEH, C. C.; PENG, S. H.; CHOU, M. J. Obesity enhances carcinogen 7, 12-Dimethylbenz [a] anthracene -induced tumorigenesis in vitro and in vivo. **Food and Chemical Toxicology**, v. 110, p. 156–164, 2017.

HULKA, B. S.; MOORMAN, P. G. Breast cancer: Hormones and other risk factors. **Maturitas**, v. 61, n. 1, p. 203–213, 2008.

INCA; INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa/2020: Incidência de Câncer no Brasil**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>>.

IYENGAR, N. M. et al. Metabolic Obesity, Adipose Inflammation and Elevated Breast Aromatase in Women with Normal Body Mass Index. **Cancer prevention research**, abr. 2017.

IYENGAR, N. M. et al. Association of Body Fat and Risk of Breast Cancer in Postmenopausal Women With Normal Body Mass Index A Secondary Analysis of a

- Randomized Clinical Trial and Observational Study. **JAMA Oncology**, p. 1–9, 2018.
- IYENGAR, N. M. et al. Effects of obesity on breast aromatase expression and systemic metabolism in inflammation in women with BRCA1 or BRCA2 mutations. **npj Breast Cancer**, v. 18, p. 1–7, 2021.
- IYENGAR, N. M.; HUDIS, C. A.; DANNENBERG, A. J. Obesity and cancer: local and systemic mechanisms. **Annual review of medicine**, v. 66, p. 297–309, 2015.
- JAGANATHAN, S. K. et al. Effect of honey and eugenol on ehrlich ascites and solid carcinoma. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, p. 1–6, 2010.
- JANG, T. J. et al. Chemopreventive effect of celecoxib and expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 on chemically-induced rat mammary tumours. **International journal of experimental pathology**, v. 83, n. 4, p. 173–182, ago. 2002.
- JEON, Y.-W.; SUH, Y. J. Synergistic apoptotic effect of celecoxib and luteolin on breast cancer cells. **Oncology reports**, v. 29, n. 2, p. 819–825, fev. 2013.
- KALRA, S. P. et al. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. **Endocrine Reviews**, v. 20, n. 1, p. 68–100, 1999.
- KAO, J. et al. Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery. **PloS one**, v. 4, n. 7, p. e6146, jul. 2009.
- KARPE, F.; PINNICK, K. E. Biology of upper-body and lower-body adipose tissue - Link to whole-body phenotypes. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 11, n. 2, p. 90–100, 2015.
- KAWAHARA, K. et al. Prostaglandin E2-induced inflammation: Relevance of prostaglandin E receptors. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1851, p. 414–421, 2015.
- KELSEY, J. L.; GAMMON, M. D.; JOHN, E. M. Reproductive and Hormonal Risk Factors: Reproductive Factors and Breast Cancer. **Epidemiologic Reviews**, v. 15, n. 1, p. 36–47, 1993.
- KERDELHUÉ, B.; FOREST, C.; COUMOUL, X. Dimethyl-Benz(a)anthracene: A mammary carcinogen and a neuroendocrine disruptor. **Biochimie Open**, v. 3, p. 49–55, 2016.
- KERSHAW, E. E.; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 89, n. 6, p. 2548–2556, 2004.
- KHANDEKAR, M. J.; COHEN, P.; SPIEGELMAN, B. M. Molecular mechanisms of cancer development in obesity. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 12, p. 886–895, 2011.
- KRUIJSDIJK, R. C. M. VAN; WALL, E. VAN DER; VISSEREN, F. L. J. Obesity and

Cancer : The Role of Dysfunctional Adipose Tissue. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** **2009**;**18(10)**., v. 18, n. 10, p. 2569–2579, 2009.

KULKARNI, A.; BOWERS, L. W. The role of immune dysfunction in obesity-associated cancer risk, progression, and metastasis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 2021.

KUNDU, N. et al. Prostaglandin e receptor EP4 is a therapeutic target in breast cancer cells with stem-like properties. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 143, n. 1, p. 19–31, 2014.

KWAN, M. L. et al. NSAIDs and breast cancer recurrence in a prospective cohort study. **Cancer Causes and Control**, v. 18, n. 6, p. 613–620, 2007.

LAKOTA, K. et al. Analysis of drug effects on primary human coronary artery endothelial cells activated by serum amyloid a. **Mediators of Inflammation**, p. 1–11, 2018.

LALA, P. K.; NANDI, P.; MAJUMDER, M. Roles of prostaglandins in tumor-associated lymphangiogenesis with special reference to breast cancer. **Cancer metastasis reviews**, v. 37, n. 2–3, p. 369–384, set. 2018.

LANCASTER, G. I. et al. Evidence that TLR4 Is Not a Receptor for Saturated Fatty Acids but Mediates Lipid-Induced Inflammation by Reprogramming Macrophage Metabolism. **Cell Metabolism**, v. 27, p. 1096–1110, 2018.

LARIONOV, A. A.; BERSTEIN, L. M.; MILLER, W. R. Local uptake and synthesis of oestrone in normal and malignant postmenopausal breast tissues. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 81, p. 57–64, 2002.

LECHNER, M. G. et al. Immunogenicity of murine solid tumor models as a defining feature of in vivo behavior and response to immunotherapy Melissa. **J Immunother.**, v. 36, n. 9, p. 477–489, 2013.

LEE, B. L. et al. Breast cancer in Brazil: Present status and future goals. **The Lancet Oncology**, v. 13, n. 3, p. e95–e102, 2012.

LIU, C. H. et al. Overexpression of Cyclooxygenase-2 is Sufficient to Induce Tumorigenesis in Transgenic Mice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 21, p. 18563–18569, 2001.

LOFFREDA, S. et al. Leptin regulates proinflammatory immune responses S. **FASEB J.**, v. 12, p. 57–65, 1998.

LOHMANN, A. E. et al. Association of obesity with breast cancer outcome in relation to cancer subtypes. **Journal of the National Cancer Institute**, 2021.

LOOMANS-KROPP, H. A.; PINSKY, P.; UMAR, A. Evaluation of Aspirin Use With Cancer Incidence and Survival Among Older Adults in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial. **JAMA network**, v. 4, n. 1, p. 1–13, 2021.

- LU, W.; KATZENELLENBOGEN, B. S. Estrogen Receptor- β Modulation of the ER α -p53 Loop Regulating Gene Expression, Proliferation and Apoptosis in Breast Cancer. **Horm Cancer**, v. 8, n. 4, p. 230–242, 2017.
- LUMENG, C. N.; BODZIN, J. L.; SALTIEL, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 1, p. 175–184, 2007.
- LUPULESCU, A. Estrogen use and cancer risk: A review. **Cancer Investigation**, v. 13, n. 3, p. 287–295, 1993.
- MACK STRONG, V. E. et al. NS-398 treatment after trauma modifies NF- κ B activation and improves survival. **Journal of Surgical Research**, v. 98, p. 40–46, 2001.
- MAJUMDER, M. et al. Prostaglandin E2 receptor EP4 as the common target on cancer cells and macrophages to abolish angiogenesis, lymphangiogenesis, metastasis, and stem-like cell functions. **Cancer science**, v. 105, n. 9, p. 1142–1151, set. 2014.
- MAJUMDER, M. et al. EP4 as a therapeutic target for aggressive human breast cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1019, p. 1–20, 2018.
- MARIA DE SOUZA, C. et al. Thalidomide attenuates mammary cancer associated-inflammation, angiogenesis and tumor growth in mice. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie**, v. 66, n. 7, p. 491–498, out. 2012.
- MCNELIS, J. C.; OLEFSKY, J. M. Macrophages, Immunity, and Metabolic Disease. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 36–48, 2014.
- MCTIERNAN, A. et al. Relation of BMI and physical activity to sex hormones in postmenopausal women. **Obesity**, v. 14, n. 9, p. 1662–1677, 2006.
- MILIARAS, S. et al. Effects of rich-in-fat diets and highly selective COX-2 inhibitors on 7,12-dimethylbenz-(A)-anthracene-induced tumor growth. **International journal of immunopathology and pharmacology**, v. 22, n. 2, p. 323–332, 2009.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Vigitel Brasil 2019**. [s.l: s.n.].
- MOLEHIN, D. et al. Regulation of aromatase in cancer. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 2021.
- MORRIS, P. G. et al. Inflammation and increased aromatase expression occur in the breast tissue of obese women with breast cancer. **Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)**, v. 4, n. 7, p. 1021–1029, jul. 2011.
- MURANO, I. et al. Dead adipocytes, detected as crown-like structures, are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice. **Journal of Lipid Research**, v. 49, p. 1562–1568, 2008.
- NADDA, N. et al. Angiostatic role of the selective cyclooxygenase-2 inhibitor etoricoxib (MK0663) in experimental lung cancer. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 66,

n. 6, p. 474–483, 2012.

NAIR, A. B.; JACOB, S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. **Journal of basic and clinical pharmacy**, v. 7, n. 2, p. 27–31, mar. 2016.

NAMAZI, N. et al. The association between fat mass and the risk of breast cancer: A systematic review and meta-analysis. **Clinical Nutrition**, v. 38, n. 4, p. 1496–1503, 2019.

NGUYEN, N. M. et al. Maternal intake of high n-6 polyunsaturated fatty acid diet during pregnancy causes transgenerational increase in mammary cancer risk in mice. **Breast Cancer Research**, v. 19, n. 77, p. 1–13, 2017.

OMS. **Obesity and Overweight.**

OUCHI, N. et al. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, p. 85–97, 2011.

PAL, D. et al. Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance. **Nature Medicine**, v. 18, n. 8, p. 1279–1285, 2012.

PALERMO-NETO, J.; MASSOCO, C. D. O.; DE SOUZA, W. R. Effects of physical and psychological stressors on behavior, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 17, n. 1, p. 43–54, 2003.

PARK, B. S. et al. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. **Nature**, v. 458, p. 1191–1195, 2009.

PARKER, J. S. et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 8, p. 1160–1167, 2009.

PARRETT, M. L. et al. Cyclooxygenase-2 gene expression in human breast cancer. **International Journal of Oncology**, v. 10, p. 503–507, 1997.

PAVLISOVA, J. et al. Corn oil versus lard: Metabolic effects of omega-3 fatty acids in mice fed obesogenic diets with different fatty acid composition. **Biochimie**, v. 124, p. 150–162, 2016.

PEINADO, J. R. et al. Proteomic characterization of adipose tissue constituents, a necessary step for understanding adipose tissue complexity. **Proteomics**, v. 12, p. 607–620, 2012.

PIEROBON, M.; FRANKENFELD, C. L. Obesity as a risk factor for triple-negative breast cancers: a systematic review and meta-analysis. **Breast cancer research and treatment**, v. 137, n. 1, p. 307–314, jan. 2013.

PRAT, A. et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. **Breast cancer research : BCR**, v. 12, p. 1–18, 2010.

PRAT, A. et al. Characterization of cell lines derived from breast cancers and normal mammary tissues for the study of the intrinsic molecular subtypes. **Breast cancer**

research and treatment, v. 142, p. 237–255, nov. 2013.

PRATICÒ, D.; DOGNÉ, J. M. Selective cyclooxygenase-2 inhibitors development in cardiovascular medicine. **Circulation**, v. 112, p. 1073–1079, 2005.

PROCTOR, C. et al. Diet, gut microbiota and cognition. **Metabolic Brain Disease**, v. 32, p. 1–17, 2017.

RAJ-KUMAR, P. K. et al. PCA-PAM50 improves consistency between breast cancer intrinsic and clinical subtyping reclassifying a subset of luminal A tumors as luminal B. **Scientific Reports**, v. 9, n. 7956, p. 1–13, 2019.

READER, J.; HOLT, D.; FULTON, A. Prostaglandin E2 EP receptors as therapeutic targets in breast cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 30, p. 449–463, 2011.

RIENDEAU, D. et al. Etoricoxib (MK-0663): Preclinical Profile and Comparison with Other Agents That Selectively Inhibit Cyclooxygenase-2. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 296, n. 2, p. 558–566, 2001.

RIOS GARCIA, M. et al. Acetyl-CoA Carboxylase 1-Dependent Protein Acetylation Controls Breast Cancer Metastasis and Recurrence. **Cell Metabolism**, v. 26, n. 6, p. 842–855.e5, 2017.

RISTIMÄKI, A. et al. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. **Cancer Research**, v. 62, p. 632–635, 2002.

ROGERO, M. M.; CALDER, P. C. Obesity, inflammation, toll-like receptor 4 and fatty acids. **Nutrients**, v. 10, n. 432, p. 1–19, 2018.

ROSEN, E. D.; SPIEGELMAN, B. M. What we talk about when we talk about fat. **Cell**, v. 156, p. 20–44, 2014.

RUDOLPH, A.; CHANG-CLAUDE, J.; SCHMIDT, M. K. Gene-environment interaction and risk of breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 114, n. 2, p. 125–133, 2016.

SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, F. et al. Obesity and Breast Cancer: Role of Leptin. **Frontiers in oncology**, v. 9, p. 1–12, 2019.

SCHUMANN, R. R. et al. Structure and Function of Lipopolysaccharide Binding Protein. **Science**, v. 249, p. 1429–1432, 1990.

SEBASTIAN, S.; BULUN, S. E. GENETICS OF ENDOCRINE DISEASE A Highly Complex Organization of the Regulatory Region of the Human CYP19 (Aromatase) Gene Revealed by the Human Genome Project. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, n. 10, p. 4600–4602, 2001.

SERBULEA, V. et al. Macrophage phenotype and bioenergetics are controlled by oxidized phospholipids identified in lean and obese adipose tissue. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 27, p. E6254–E6263, jul. 2018.

SESTAK, I. et al. Effect of body mass index on recurrences in tamoxifen and anastrozole treated women: An exploratory analysis from the ATAC trial. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 21, p. 3411–3415, 2010.

SHAH, J.; KOTADIYA, R. A Critical Review on Analytical Methods for Recently Approved FDC Drugs: Pregabalin and Etoricoxib. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 0, n. 0, p. 1–21, 2020.

SHI, H. et al. Diet Induced Obese Mice Are Leptin Insufficient After Weight Reduction. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 17, n. 9, p. 1702–1709, 2009.

SILVA, H. M. et al. Vasculature-associated fat macrophages readily adapt to inflammatory and metabolic challenges. **Journal of Experimental Medicine**, v. 216, n. 4, p. 786–806, 2019.

SIMMONS, D. L.; BOTTING, R. M.; HLA, T. Cyclooxygenase isozymes: The biology of prostaglandin synthesis and inhibition. **Pharmacological Reviews**, v. 56, n. 3, p. 387–437, 2004.

SIMPSON, E. R. et al. Aromatase Cytochrome P450, The Enzyme Responsible for Estrogen Biosynthesis. **Endocrine Reviews**, v. 15, n. 3, p. 342–355, 1994.

SIMPSON, E. R.; BROWN, K. A. Obesity and breast cancer : role of inflammation and aromatase. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 51, n. 3, p. T51–T59, 2013.

SOBOLEWSKI, C. et al. The role of cyclooxygenase-2 in cell proliferation and cell death in human malignancies. **International Journal of Cell Biology**, v. 2010, 2010.

SPEAKMAN, J. et al. Animal models of obesity. **Obesity**, v. 8, p. 55–61, 2007.

SPEAKMAN, J. R. Use of high-fat diets to study rodent obesity as a model of human obesity. **International Journal of Obesity**, v. 43, p. 1491–1492, 2019.

SPRANGER, J. et al. Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. **The Lancet**, v. 361, n. 9353, p. 226–228, 2003.

STEFAN, N.; BIRKENFELD, A. L.; SCHULZE, M. B. Global pandemics interconnected — obesity, impaired metabolic health and COVID-19. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 17, p. 135–149, 2021.

SUBBARAMAIAH, K. et al. Obesity is associated with inflammation and elevated aromatase expression in the mouse mammary gland. **Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)**, v. 4, n. 3, p. 329–346, mar. 2011.

SUBBARAMAIAH, K. et al. Increased levels of COX-2 and prostaglandin E2 contribute to elevated aromatase expression in inflamed breast tissue of obese women. **Cancer Discovery**, v. 2, n. 4, p. 356–365, 2012.

SUBBARAMAIAH, K. et al. Dietary polyphenols suppress elevated levels of proinflammatory mediators and aromatase in the mammary gland of obese mice. **Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)**, v. 6, n. 9, p. 886–897, set. 2013.

SUBBARAMAIAH, K.; HUDIS, C. A.; DANNENBERG, A. J. The prostaglandin transporter regulates adipogenesis and aromatase transcription. **Cancer Prevention Research**, v. 4, n. 2, p. 194–206, 2011.

SUGANAMI, T. et al. Role of the Toll-like receptor 4/NF- κ B pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 27, n. 1, p. 84–91, 2007.

SUGANAMI, T.; OGAWA, Y. Adipose tissue macrophages : their role in adipose tissue remodeling. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 88, p. 33–39, 2010.

SUNDARAM, S.; JOHNSON, A.; MAKOWSKI, L. Obesity, metabolism and the microenvironment: Links to cancer. **Journal of Carcinogenesis**, v. 12, n. 19, p. 1–10, 2013.

THEODORIDOU, A. et al. In vivo study of pro-inflammatory cytokine changes in serum and synovial fluid during treatment with celecoxib and etoricoxib and correlation with VAS pain change and synovial membrane penetration index in patients with inflammatory arthritis. **Mediterranean Journal of Rheumatology**, v. 28, n. 1, p. 33–40, 2017.

THOMAS, C.; GUSTAFSSON, J.-ÅKE. The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy. **Nature Publishing Group**, v. 11, p. 597–608, 2011.

TIWARI, P. et al. Metabolically activated adipose tissue macrophages link obesity to triple-negative breast cancer. **The Journal of experimental medicine**, v. 216, n. 6, p. 1345–1358, jun. 2019.

TRAYHURN, P.; WOOD, I. S. Signalling role of adipose tissue: Adipokines and inflammation in obesity. **Biochemical Society Transactions**, v. 33, n. 5, p. 1078–1081, 2005.

TSUBOI, K.; SUGIMOTO, Y.; ICHIKAWA, A. Prostanoid receptor subtypes. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, v. 68–69, p. 535–556, 2002.

TURINI, M. E.; DUBOIS, R. N. Cyclooxygenase-2: A therapeutic target. **Annual Review of Medicine**, v. 53, p. 35–57, 2002.

VOZAROVA, B. et al. Circulating Interleukin-6 in Relation to Adiposity , Insulin Action , and Insulin Secretion. **OBESITY RESEARCH**, v. 9, p. 414–417, 2001.

VRIELING, A. et al. Adult weight gain in relation to breast cancer risk by estrogen and progesterone receptor status: A meta-Analysis. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 123, n. 3, p. 641–649, 2010.

WAJCHENBERG, B. L. Tecido Adiposo como Glândula Endócrina. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 44, n. 1, 2000.

WANG, G. et al. Celecoxib induced apoptosis against different breast cancer cell lines

by down-regulated NF- κ B pathway. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 490, n. 3, p. 969–976, ago. 2017.

WEISBERG, S. P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 12, p. 1796–1808, 2003.

WOLFF, A. C. et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 31, n. 31, p. 3997–4013, nov. 2013.

XIA, W. et al. Celecoxib enhanced the sensitivity of cancer cells to anticancer drugs by inhibition of the expression of P-glycoprotein through a COX-2-independent manner. **Journal of cellular biochemistry**, v. 108, n. 1, p. 181–194, set. 2009.

XU, H. et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 12, p. 1821–1830, 2003.

YALCIN, B. Staging, risk assessment and screening of breast cancer. **Experimental Oncology**, v. 35, n. 4, p. 238–245, 2013.

YOSHINAKA, R. et al. COX-2 inhibitor celecoxib suppresses tumor growth and lung metastasis of a murine mammary cancer. **Anticancer Research**, v. 26, p. 4245–4254, 2006.

ZANOTTO-FILHO, A. et al. Sorafenib improves alkylating therapy by blocking induced inflammation, invasion and angiogenesis in breast cancer cells. **Cancer Letters**, v. 425, p. 101–115, 2018.

ZARGHI, A.; ARFAEI, S. Selective COX-2 Inhibitors: A Review of Their Structure-Activity Relationships. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 10, n. 4, p. 655–683, 2011.

ZHANG, Y. et al. **Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue** *Nature*, 1994.

ZHAO, Y. et al. Estrogen biosynthesis proximal to a breast tumor is stimulated by PGE₂ via cyclic AMP, leading to activation of promoter II of the CYP19 (aromatase) gene. **Endocrinology**, v. 137, n. 12, p. 5739–5742, 1996.

ZHAO, Y. et al. Pubertal high fat diet: effects on mammary cancer development. **Breast cancer research : BCR**, v. 15, n. 5, p. R100, 2013.

ANEXO A – ARTIGO

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.01.003>

Cancer Letters 502 (2021) 44–57



Contents lists available at ScienceDirect

Cancer Letters

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

COX-2 promotes mammary adipose tissue inflammation, local estrogen biosynthesis, and carcinogenesis in high-sugar/fat diet treated mice

Rosângela Mayer Gonçalves^a, Marina Delgobo^a, Jonathan Paulo Agnes^a, Raquel Nascimento das Neves^a, Marcelo Falchetti^a, Tuany Casagrande^a, Ana Paula Vargas Garcia^b, Thaynan Cunha Vieira^b, Nauana Somensi^c, Maciel Alencar Bruxel^d, Daniel Augusto Gasparin Bueno Mendes^e, Alex Rafacho^d, André Báfica^e, Daniel Pens Gelain^c, José Cláudio Fonseca Moreira^e, Geovanni Dantas Cassali^b, Alexander James Roy Bishop^f, Alfeu Zanotto-Filho^{a, g}

^a Laboratório de Farmacologia e Bioquímica do Câncer (LabCancer), Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, 88049-900, Brazil

^b Laboratório de Patologia Comparada, Departamento de Patologia Geral, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, 31270-901, Minas Gerais, Brazil

^c Centro de Estudos em Estresse Oxidativo (CEEEO), Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 90035-003, Brazil

^d Laboratório de Investigação de Doenças Crônicas (LIDoC), Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, 88049-900, Brazil

^e Laboratório de Imunobiologia (LIDI), Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, 88049-900, Brazil

^f Greehey Children's Cancer Research Institute, University of Texas Health at San Antonio, San Antonio, TX, 78229, USA

ARTICLE INFO

Keywords:
Cyclooxygenase-2
Prostaglandin E2
Cytokines
Aromatase
Crown-like structures

ABSTRACT

Obesity is a major risk factor for breast cancer, especially in post-menopausal women. In the breast tissue of obese women, cyclooxygenase-2 (COX-2)-dependent prostaglandin E2 (PGE2) production has been correlated with inflammation and local estrogen biosynthesis via aromatase. Using a mouse model of 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene/medroxyprogesterone-acetate (DMBA/MPA)-induced carcinogenesis, we demonstrated that an obesogenic diet promotes mammary tissue inflammation and local estrogen production, and accelerates mammary tumor formation in a COX-2-dependent manner. High-sugar/fat (HSF) diet augmented the levels of the pro-inflammatory mediators MCP-1, IL-6, COX-2, and PGE2 in mammary tissue, and this was accompanied by crown-like structures of breast (CLS-B) formation and aromatase/estrogen upregulation. Treatment with a COX-2 selective inhibitor, etoricoxib, decreased PGE2, IL-6, MCP-1, and CLS-B formation as well as reduced aromatase protein and estrogen levels in the mammary tissue of mice fed a HSF diet. Etoricoxib-treated mice showed increased latency and decreased incidence of mammary tumors, which resulted in prolonged animal survival when compared to HSF diet alone. Inhibition of tumor angiogenesis also seemed to account for the prolonged survival of COX-2 inhibitor-treated animals. In conclusion, obesogenic diet-induced COX-2 is sufficient to trigger inflammation, local estrogen biosynthesis, and mammary tumorigenesis.

ANEXO B – ARTIGOS EM COLABORAÇÃO

Artigos publicados durante o período do doutorado

1. Neves B.J, Agnes J.P, Gomes M.N, Donza M.R.H, **Rosângela Mayer Gonçalves**, Delgobo M, Neto L.R.S, Senger M.R, Silva-Junior F.P, Ferreira S.B, Zanotto-Filho A, Andrade C.H. Efficient identification of novel anti-glioma lead compounds by machine learning models. Eur J Med Chem. 2020. doi: 10.1016/j.ejmech.2019.111981.
2. **Rosângela Mayer Gonçalves**, Agnes J.P, Delgobo M, de Souza P.O, Thomé M.P, Heimfarth L, Lenz G, Moreira J.C.F, Zanotto-Filho A. Late autophagy inhibitor chloroquine improves efficacy of the histone deacetylase inhibitor SAHA and temozolomide in gliomas. Biochem Pharmacol. 2019 Mar 13 Published online 2019 Mar 13. doi: 10.1016/j.bcp.2019.03.015.
3. Delgobo M, Agnes J.P, **Rosângela Mayer Gonçalves**, Dos Santos V.W, Parisotto E.B, Zamoner A, Zanotto-Filho A. N-acetylcysteine and alpha-lipoic acid improve antioxidant defenses and decrease oxidative stress, inflammation and serum lipid levels in ovariectomized rats via estrogen-independent mechanisms. J Nutr Biochem. 2019 Mar 10; 67: 190–200. Published online 2019 Mar 10. doi: 10.1016/j.jnutbio.2019.02.012.
4. de Souza P.O, Bianchi S.E, Figueiró F, Heimfarth L, Moresco K.S, **Rosângela Mayer Gonçalves**, Hoppe J.B, Klein C.P, Salbego C.G, Gelain D.P, Bassani V.L, Zanotto-Filho A, Moreira J.C.F. Anticancer activity of flavonoids isolated from *Achyrocline satureioides* in gliomas cell lines. Toxicology in Vitro. 2018. doi:10.1016/j.tiv.2018.04.013.
5. Zanotto-Filho A, Rajamanickam S, Loranc E, Masamsetti P, Gorthi A, Romero J.C, Tonapi S, **Rosângela Mayer Gonçalves**, Reddick R.L, Benavides R, Kuhn J, Chen Y, Bishop A.J.R. Sorafenib improves alkylating therapy by blocking induced inflammation, invasion and angiogenesis in breast cancer cells. Cancer Lett. Published online 2018 Mar 30. doi: 10.1016/j.canlet.2018.03.037.