



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

Barbara dos Santos

**EFEITOS DA DIETA HIPERLIPÍDICA SOBRE A MORFOLOGIA MAMÁRIA E O
CRESCIMENTO DE TUMORES DE MAMA EM CAMUNDONGOS**

Florianópolis
2024

Barbara dos Santos

**EFEITOS DA DIETA HIPERLIPÍDICA SOBRE A MORFOLOGIA MAMÁRIA E O
CRESCIMENTO DE TUMORES DE MAMA EM CAMUNDONGOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós
Graduação em Bioquímica da Universidade Federal
de Santa Catarina como requisito parcial para a
obtenção do título de Mestra em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Alfeu Zanotto-Filho

Florianópolis

2024

dos Santos, Barbara

EFEITOS DA DIETA HIPERLIPÍDICA SOBRE A MORFOLOGIA MAMÁRIA E O CRESCIMENTO DE TUMORES DE MAMA EM CAMUNDONGOS / Barbara dos Santos ; orientador, Alfeu Zanotto-Filho, 2024.

68 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Bioquímica. 2. Câncer de mama. 3. Obesidade. 4. Glândula mamária. I. Zanotto-Filho, Alfeu. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

Barbara dos Santos

**EFEITOS DA DIETA HIPERLIPÍDICA SOBRE A MORFOLOGIA MAMÁRIA E O
CRESCIMENTO DE TUMORES DE MAMA EM CAMUNDONGOS**

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 08 de fevereiro de 2024 pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Marcelo Farina, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Raquel Nascimento das Neves, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Alexandre Pastoris Muller, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Bioquímica

Insira neste espaço a
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof. Alfeu Zanotto-Filho Dr.
Orientador

Florianópolis, 2024

Dedico essa dissertação aos meus pais, Alvani e Marcos, por todo o amor e incentivo aos meus estudos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer ao meu orientador Prof. Alfeu, pela oportunidade de desenvolver meu mestrado no LABCANCER. Desde o início você me recebeu de portas abertas e aceitou o desafio de me orientar. Obrigada pela confiança no meu trabalho, pelo acolhimento nos desafios ao longo desses dois anos, por estar sempre disponível e pelos ensinamentos.

Aos meus colegas do LABCANCER, minha gratidão é imensa. O laço forte que criamos será eternamente guardado no meu coração. Em especial, agradeço ao Jonathan, pela parceria incrível nesse trabalho e na vida, e pela paciência e ajuda durante todo o meu Mestrado. À Andressa não só pela amizade incrível, mas pelo apoio emocional em todos os momentos. À Nauana, por ser sempre tão solícita e disposta a me ensinar. E a Raquel pelo acolhimento desde a minha chegada no laboratório, pela amizade e por sempre me lembrar do meu potencial. Também não poderia deixar de agradecer minha eterna dupla acadêmica e de vida Monique, por aguentar todos os meus desabafos e comemorar comigo cada vitória.

Agradeço também aos coordenadores e corpo técnico do LAMEB, que são extremamente competentes e solícitos. Sem a estrutura oferecida pelo LAMEB não seria possível desenvolver diversas análises presentes nesse trabalho.

Aos biólogos do setor de histologia do Hospital Universitário (HU), por toda a ajuda na confecção dos blocos histológicos. As meninas não só me ajudaram a desenvolver as técnicas histológicas, mas se dispuseram sempre a me ensinar todos os passos.

Aos laboratórios Lidoc e Lummertz da Rocha, pela parceria em análises desse trabalho. O apoio de vocês foi fundamental para o desenvolvimento dessa pesquisa. Em especial, agradeço a Natália que não mediu esforços para me auxiliar durante a minha trajetória.

Meus sinceros agradecimentos a Universidade Federal de Santa Catarina, que vem sendo minha segunda casa por 9 anos, pelo apoio estrutural e financeiro. Agradeço também ao PPGBQA pelo acolhimento, pelas oportunidades de aprendizado e pelas amizades que pude formar durante esse tempo. E também agradeço a FAPESC, que concedeu minha bolsa de pesquisa e possibilitou o desenvolvimento do meu projeto de mestrado.

Agradeço ao meu namorado Guilherme, por todo o apoio e compreensão ao longo desses anos. Você foi a pessoa que vibrou comigo desde o momento da minha aprovação no mestrado, aquele que me enaltece sempre e principalmente apoiou o meu sonho de ser cientista.

E, sobretudo, agradeço à minha família pelo amor, educação e incentivo. Agradeço aos meus pais, Alvani e Marcos, pelo amor incondicional, e por me ensinar que esse sentimento deve estar sempre presente em tudo o que fazemos. Obrigado por me ensinarem valores extremamente valiosos, que irei levar para a vida. Essa conquista é nossa, amo vocês!

*“Only when our clever brain and our human heart work together in harmony
can we achieve our true potential.” Jane Goodall*

RESUMO

O câncer de mama é a neoplasia mais prevalente em mulheres em todo o mundo, e a obesidade é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento desta neoplasia. O excesso de gordura corporal está associado ao desenvolvimento da maioria dos subtipos de câncer de mama, incluindo os hormônio-independentes. Usando como modelos de carcinogênese os implantes mamários de células 4T1 em camundongos Balb-c e tumor sólido de Ehrlich (TSE) em camundongos Swiss, buscamos compreender as alterações ocasionadas pela obesidade sobre a glândula mamária, e a correlação desta condição com o crescimento tumoral. Ambas as linhagens de camundongos analisadas foram alimentadas com uma dieta rica em gordura saturada (35% de banha de porco) por 16 semanas. Ao fim do protocolo, a dieta hiperlipídica foi capaz de promover um fenótipo tipo-obeso nos camundongos, caracterizado pelo aumento de peso corporal, acúmulo de tecido adiposo visceral, maiores picos glicêmicos e danos hepáticos. Esse fenótipo pôde ser associado ao maior crescimento dos tumores 4T1 e TSE. Os camundongos alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram alterações sobre o tecido mamário, como a hiperplasia de botões alveolares e aumento de ramificações ductais, acompanhado de uma maior expressão do marcador de macrófagos F4/80. No entanto a análise das populações mioeloides no tecido mamário dos animais Swiss não demonstrou expansão. Em conclusão, nossos dados sugerem que a dieta hiperlipídica promove um fenótipo tipo-obeso e altera o microambiente do tecido mamário em camundongos Swiss e Balb/c, promovendo maior crescimento tumoral.

Palavras-chave: câncer de mama, obesidade, glândula mamária.

ABSTRACT

Breast cancer is the most prevalent neoplasm in women worldwide, and obesity is a key risk factor for the development of this condition. Excess body fat is associated with the development of most subtypes of breast cancer, including hormone-independent types. Using 4T1 mammary cell implants in Balb-c mice and Ehrlich solid tumor (TSE) in Swiss mice as carcinogenesis models, we aimed to understand the changes caused by obesity in the mammary gland and the correlation of this condition with tumor growth. Both mouse strains were fed a high-fat diet (35% lard) for 16 weeks. At the end of the protocol, the high-fat diet was able to induce an obese-like phenotype in the mice, characterized by increased body weight, accumulation of visceral adipose tissue, glycemic changes, and liver damage. This phenotype may be associated with the enhanced growth of 4T1 and TSE tumors. Mice fed a high-fat diet showed alterations in mammary tissue, such as hyperplasia of alveolar buds and increased ductal branching, accompanied by higher expression of the F4/80 macrophage marker. However, the analysis of myeloid populations in mammary tissue of Swiss animals did not show expansion. In conclusion, our data suggest that a high-fat diet promotes an obese-like phenotype and alters the microenvironment of mammary tissue in Swiss and Balb/c mice, promoting increased tumor growth

Keywords: breast cancer; obesity; mammary gland.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Adaptação do tecido adiposo à obesidade	19
Figura 2 – Etapas da carcinogênese	21
Figura 3 – <i>Hallmarks</i> do câncer	23
Figura 4 – Desenvolvimento da glândula mamária	25
Figura 5 – Classificação dos subtipos moleculares do câncer de mama	27
Figura 6 – Variação do peso e consumo alimentar induzido pela dieta rica em gordura em camundongos Balb-c	46
Figura 7 – Variação do peso e consumo alimentar induzido pela dieta rica em gordura em camundongos Swiss	47
Figura 8 – Caracterização do tecido adiposo e hepático	48
Figura 9 – Efeitos da dieta hiperlipídica sobre a glicemia e metabolismo de lipídeos	49
Figura 10 – Impacto da dieta hiperlipídica sobre o crescimento tumoral	50
Figura 11 – Caracterização do tecido mamário	52
Figura 12 – Coloração <i>whole mount</i> das glândulas mamárias.	53
Figura 13 – Efeitos da dieta hiperlipídica sobre as glândulas GMC e GMT de Swiss	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AICR	Instituto Americano para Pesquisa em Câncer (do inglês: <i>American Institute for Cancer Research – AICR</i>)
ANOVA	Análise de Variância
APC	Aloficocianina
ATP	Adenosina Trifosfato
cDNA	DNA Complementar de Primeira Fita
CEUA	Comitê de Ética em Pesquisa da UFSC
CLS	Coroas de macrófagos (do inglês: <i>Crown like structure - CLS</i>)
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CTL	Dieta Controle
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
EMT	Transição Epitelial-Mesenquimal (do inglês: <i>epithelial mesenchymal transition</i>)
FACS	Citometria de Fluxo FACS (do inglês: <i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>)
FITC	Fluoresceína isotiocianato
GMC	Glândulas Mamárias Contralaterais ao Tumor
GMT	Glândula Mamária em Contato com o Tumor
GP-130	Receptor de Estrogênio Acoplado à Proteína G1
H&E	Hematoxilina e Eosina
HER2	Fator de crescimento epidermal 2 (do inglês: <i>Human Epidermal growth factor receptor-type 2</i>).
HFD	Dieta Hiperlipídica (do inglês: <i>high fat diet</i>)
IGF-I	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IHC	Imuno-histoquímica
IL-12	Interleucina-12
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-23	Interleucina-23
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8

IMC	Índice de Mama Corporal
INCA	Instituto Nacional do Câncer
Ki67	do inglês: <i>Antigen Kiel 67 – Ki67</i>
LABIOEX	Laboratório de Bioquímica Experimental
mRNA	RNA mensageiro
oGTT	Teste Oral de Tolerância a Glicose
OMS	Organização Mundial da Saúde
Pam50	(do inglês: <i>Prediction Analysis of Microarray 50 – Pam50</i>)
PE	Ficoeritrina
PerCP-Cy5.5	PerCP-Cianina 5.5
RE	Receptor de Estrogênio
RP	Receptor de Progesterona
SASP	Fenótipo Secretor Associado ao Estado Senescente
TAV	Tecido Adiposo Visceral
TEB	Botões terminais (do inglês: “ <i>Terminal end buds - TEB</i> ”)
TNBC	Câncer de mama triplo-negativo (do inglês: <i>Triple negative Breast Cancer- TNBC</i>)
TNF	Fator de Necrose Tumoral- α
TSE	Tumores Sólidos de Ehrlich
V450	Horizon V450
WCRF	Fundo Mundial para Pesquisa em Câncer (do inglês: <i>World Cancer Research Fund – WCRF</i>)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Obesidade e Tecido adiposo.....	16
1.2 Câncer.....	19
1.3 Glândula mamária e o câncer de mama.....	23
1.4 Obesidade e câncer de mama.....	28
2. JUSTIFICATIVA	30
3. OBJETIVOS.....	32
3.1 Objetivo geral.....	32
3.2 Objetivos específicos.....	32
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1 Animais.....	33
4.2 Procedimentos experimentais.....	33
4.2.1 Dieta hipercalórica (High-fat diet, HFD), monitoramento de peso e consumo...33	
4.2.2 Modelos de implante tumoral.....	34
4.2.2.1 Modelo de adenocarcinoma mamário 4T1 em camundongos Balb-c.....	34
4.2.2.1 Modelo de adenocarcinoma mamário de Ehrlich em camundongos Swiss....	34
4.2.3 Teste oral de tolerância a glicose (oGTT).....	35
4.2.4 Desenho experimental.....	36
4.2.5 Coleta dos tecidos.....	37
4.2.6 Ingesta calórica, eficiência alimentar e adiposidade.....	39
4.2.7 Análise de marcadores bioquímicos plasmáticos.....	39
4.2.8 Histologia por coloração de H&E.....	39
4.2.9 Imuno-histoquímica (IHC).....	40
4.2.10 Análise da morfologia da glândula mamária (Whole-mount).....	40
4.2.11 RT-qPCR da glândula mamária.....	42
4.2.12 Citometria de fluxo do tecido mamário (FACS).....	43
4.3 Análises estatísticas.....	44
5. RESULTADOS.....	45

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS DA DIETA HIPERLIPÍDICA SOBRE O PERFIL ALIMENTAR, MORFOLOGIA DOS TECIDOS ADIPOSEO E HEPÁTICO, E O METABOLISMO ENERGÉTICO DE CAMUNDONGOS.....	45
5.2 A DIETA HIPERLIPÍDICA PROMOVEU UM MAIOR CRESCIMENTO DE TUMORES HORMÔNIO INDEPENDENTES NOS CAMUNDONGOS BALB-C E SWISS.....	50
5.3 IMPACTOS DO CONSUMO DE UMA DIETA HIPERLIPÍDICA SOBRE A GLÂNDULA MAMÁRIA DE CAMUNDONGOS BALB-C E SWISS.....	51
6. DISCUSSÃO.....	56
7. CONCLUSÃO.....	61
8. REFERÊNCIAS.....	62
9. ANEXO.....	69

1. INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade e Tecido adiposo

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o sobrepeso e a obesidade são definidos como um acúmulo anormal ou excessivo de gordura que apresenta risco à saúde (OMS, 2023). O diagnóstico de obesidade é realizado a partir da avaliação da composição física do paciente, que inclui o cálculo do Índice de Massa Corporal (IMC). Este cálculo considera as medidas do peso corpóreo e estatura do indivíduo. Uma pessoa com IMC acima de 25 é considerada com sobrepeso, e acima de 30 recebe o diagnóstico de obesidade. Estima-se que em 2030, 57,8 % (3,3 bilhões) da população mundial estará com sobrepeso, sendo que as consequências geradas pela obesidade já são maiores que as da fome (GONZÁLEZ-MUNIESA et al., 2017). No Brasil, segundo os últimos dados da Pesquisa Nacional de Saúde PNS/2019, cerca de 60% dos adultos brasileiros se encontram com sobrepeso (96 milhões) e 1 em cada 4 tem obesidade (RENDIMENTO, 2021). É importante salientar que o IMC fornece uma medida útil de sobrepeso e obesidade em nível populacional, pois é a mesma medição para ambos os sexos e para todas as idades dos adultos. No entanto, deve ser considerado apenas como uma referência quando se trata dos indivíduos, pois é influenciado por fatores como massa muscular, estrutura óssea e distribuição da gordura corporal. Por esse motivo, sugere-se que o cálculo de IMC seja acompanhado da mensuração da circunferência abdominal, auxiliando a identificar a distribuição de gordura corporal (CERHAN et al., 2014; SAHAKYAN et al., 2015).

O tecido adiposo é um órgão essencial para a sobrevivência, pois, além de armazenar energia para períodos de necessidade, é um importante regulador endócrino. A atual disponibilidade de nutrientes e o sedentarismo são fatores que contribuem para um grande desbalanço entre o consumo e gasto calórico, o que pode levar à hiperplasia e hipertrofia do tecido adiposo, caracterizando sobrepeso e obesidade (SAKERS et al., 2022). Além disso, a etiologia da obesidade é bastante complexa, envolvendo circunstâncias como padrões socioeconômicos, aspectos comportamentais (uso de drogas, escolhas alimentares, padrão de sono, etc.), fatores genéticos, epigenéticos e ambientais. Todos esses componentes impactam diretamente no consumo alimentar, na metabolização dos nutrientes e no estoque energético, contribuindo para o estabelecimento desta condição (GUZIK et al., 2017).

A heterogeneidade dos indivíduos acometidos pela obesidade também dificulta a compreensão da mesma. Classicamente, a obesidade é classificada em dois tipos: obesidade ginoide e obesidade androide. A obesidade ginoide é caracterizada pelo acúmulo de gordura na região inferior do corpo, como quadris, coxas e nádegas, sendo mais comum em mulheres. A gordura depositada nessa região é predominantemente do tipo subcutânea, possuindo um perfil imunológico mais anti-inflamatório que a gordura visceral, depositada na região central do corpo. Já a obesidade androide é caracterizada pelo acúmulo de gordura nas regiões do abdômen, cintura e costas, e é mais comum em homens. A gordura depositada nessas regiões é predominantemente visceral, sendo este um tipo de tecido adiposo com perfil imunológico pró-inflamatório (LEE et al., 2015; OKOSUN; SEALE; LYN, 2015).

Além de uma classificação espacial, o tecido adiposo pode ser classificado de acordo com suas características morfofuncionais, sendo os principais tipos o tecido adiposo branco e marrom. O tecido adiposo marrom atua na termorregulação corporal, dissipando energia e produzindo calor. Este tecido é mais abundante em bebês, mas também está presente em adultos, funcionando como um sistema de aquecimento para o fornecimento de sangue aos órgãos vitais. Estudos recentes têm demonstrado uma correlação negativa entre a quantidade de tecido adiposo marrom e o IMC de adultos. No entanto, o papel deste tipo de tecido na etiologia da obesidade ainda precisa ser melhor elucidado (HERZ et al., 2021; LIU et al., 2022).

O tecido adiposo branco é o tipo de tecido adiposo mais abundante nos seres humanos. Além de armazenar energia, os adipócitos brancos também secretam diversas substâncias bioativas, como adipocinas, que desempenham importantes funções reguladoras no organismo (SAKERS et al., 2022). O tecido adiposo branco é composto por diferentes tipos de células, incluindo pré-adipócitos, adipócitos maduros, células imunes (principalmente macrófagos) e células mesenquimais, além da presença de matriz extracelular. Os adipócitos maduros são as células mais abundantes no tecido adiposo branco, representando cerca de 80% do volume total do órgão (FUSTER et al., 2016).

Em indivíduos saudáveis, ocorre um aumento da razão hiperplasia/hipertrofia dos adipócitos, favorecendo um ambiente tecidual anti-inflamatório. Em condições de balanço energético positivo, o acúmulo de tecido adiposo ocorre de forma gradual. O aumento de ácidos graxos no tecido adiposo, principalmente sob a forma de

triacilglicerol, resulta em hiperplasia e hipertrofia dos adipócitos, muitas vezes levando à ruptura da membrana plasmática dessas células, causando um extravasamento do conteúdo intracelular (LINGOHR; BUETTNER; RHODES, 2002). Esse processo é geralmente acompanhado pela polarização dos macrófagos do tipo M2 para M1, que passam a apresentar um perfil pró-inflamatório. Os macrófagos M1 secretam fatores inflamatórios, como o fator de necrose tumoral- α (TNF), a interleucina-6 (IL-6), a interleucina-1 β (IL-1 β), a interleucina-12 (IL-12) e a interleucina-23 (IL-23) (CASTOLDI et al., 2015; OUCHI et al., 2011). Além disso, à medida que a hipertrofia adipocitária progride, a MCP-1 (proteína quimioatraente de monócitos 1) recruta novos monócitos circulantes, que se infiltram no tecido adiposo branco e polarizam-se em M1, dando continuidade ao ambiente inflamatório gerado. Paralelo a esse ambiente pró-inflamatório, os fatores anti-inflamatórios como IL-10 e adiponectina diminuem, resultando na redução da sensibilidade à insulina e diminuição da função vascular, levando ao desenvolvimento de fibrose e hipóxia (Figura 1) (KUSMINSKI; BICKEL; SCHERER, 2016).

Além da resistência à insulina, a obesidade também pode levar a outras alterações metabólicas, como aumento dos níveis de colesterol, triglicerídeos e ácido úrico. Esses fatores, somados ao estado de inflamação crônica, podem aumentar o risco de desenvolver doenças como a diabetes mellitus tipo 2, doenças cardiovasculares e o câncer (GONZÁLEZ-MUNIESA et al., 2017). O reconhecimento da associação entre obesidade e outras comorbidades, sejam elas causadas ou precedidas por esta condição, é essencial para que a equipe de médicos de atenção primária possa diagnosticar e tratar adequadamente seus pacientes obesos, visando uma melhor qualidade de vida (MOIZÉ et al., 2010).

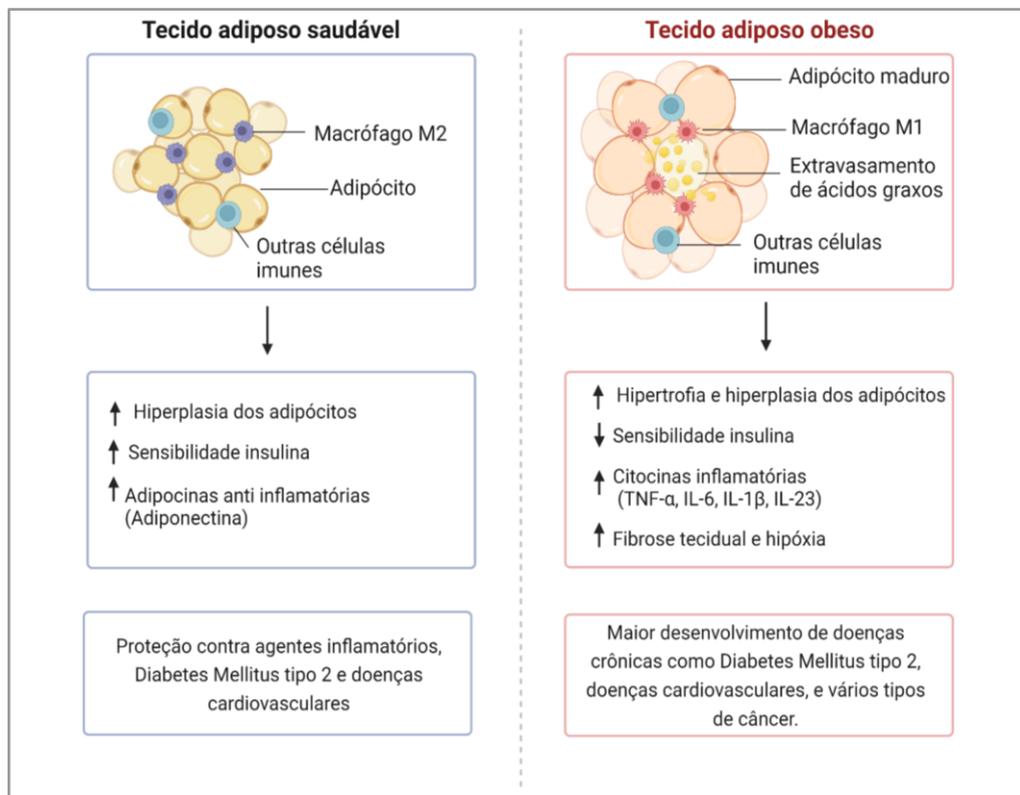


Figura 1. Adaptação do tecido adiposo à obesidade. O tecido adiposo saudável responde ao acúmulo energético aumentando o número de adipócitos, que possuem um perfil imunológico prioritariamente anti-inflamatório. No estado obeso, há um aumento no tamanho e número dos adipócitos, bem como na quantidade de células inflamatórias (macrófagos) na fração estromal. Essas mudanças na composição do tecido adiposo resultam no aumento da secreção de citocinas inflamatórias, diminuição da sensibilidade à insulina, formação de fibrose tecidual e hipóxia. TNF α – fator de necrose tumoral- α ; IL-6 - interleucina-6; IL-1b - interleucina-1b; IL-23 - interleucina-23. Fonte da ilustração: elaborada pela autora com BioRender.com.

1.2 Câncer

O câncer é um dos principais problemas de saúde pública no mundo, sendo responsável por mais de 9,9 milhões de mortes em 2020. Segundo dados da Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC), em 2040, o número de casos de câncer deve chegar a 30,2 milhões. No Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), o país deverá registrar cerca de 704 mil novos casos de câncer para cada ano de 2023 a 2025, com destaque para as regiões sul e sudeste, que concentram cerca de 70% da incidência. Considerando-se todos os demais tipos de cânceres, os mais frequentes na população brasileira são o câncer de mama (73.610 casos), próstata (71.730 casos), cólon e reto (45.630 casos), pulmão (32.560 casos) e estômago (21.480 casos) (INCA, 2023).

Os cânceres são doenças que têm como base comum a mutação genética e a habilidade de proliferação celular sustentada (HANAHAN, 2022a). O processo de formação do câncer (carcinogênese) é bastante complexo, sendo composto por etapas que demandam numerosas alterações e modificações em nível celular, que podem variar entre os diferentes tipos de tumores e indivíduos (Figura 2). A primeira etapa do processo de carcinogênese é a iniciação, que requer alterações genéticas estáveis na célula, como mutações, deleções ou amplificações gênicas em genes oncogenes ou supressores tumorais, com ganho ou perda de função em proteínas-chave do ciclo celular, reparo de DNA e/ou vias de sinalização mitótica, entre outros (WESTON; HARRIS, 2003). Essas alterações podem ser espontâneas ou induzidas por carcinógenos, como radiação, substâncias químicas ou alguns vírus. Uma célula cancerosa geralmente apresenta múltiplas alterações genéticas, o que lhe confere maior capacidade de adaptação ao meio, proliferação e sobrevivência. Um mecanismo bem descrito, são as alterações que afetam genes que controlam o ciclo celular e reparo de DNA, levando à inativação de proteínas que impedem a replicação do DNA, até que o dano seja reparado, como clássico gene da proteína p53 (WESTON; HARRIS, 2003). Quando essas alterações não são reparadas, ativam-se vias de sinalização que desencadeiam o processo de apoptose. No entanto, se o dano é induzido com frequência, a replicação do DNA pode ocorrer antes que o reparo seja concluído, levando à transmissão das alterações genéticas às células filhas (KASTAN; BARTEK, 2004).

A partir da estimulação por agentes promotores, como hormônios e fatores de crescimento, a célula mutada começa a se proliferar, caracterizando o estágio de Promoção. Essa proliferação exacerbada promove uma instabilidade genômica, que juntamente com a pressão seletiva do microambiente, geram novas alterações genéticas. A exposição contínua a esses agentes promotores leva à expansão do clone celular mutado e à formação de lesões pré-cancerosas ou tumores benignos. Por fim, temos a etapa de Progressão, fase irreversível em que novas alterações genômicas se somam às mudanças no microambiente tumoral, processos de pressão seletiva e seleção clonal. Essas alterações podem resultar em uma população de células malignas bem adaptadas e com alto potencial de invasão tecidual e disseminação metastática (BASU, 2018).

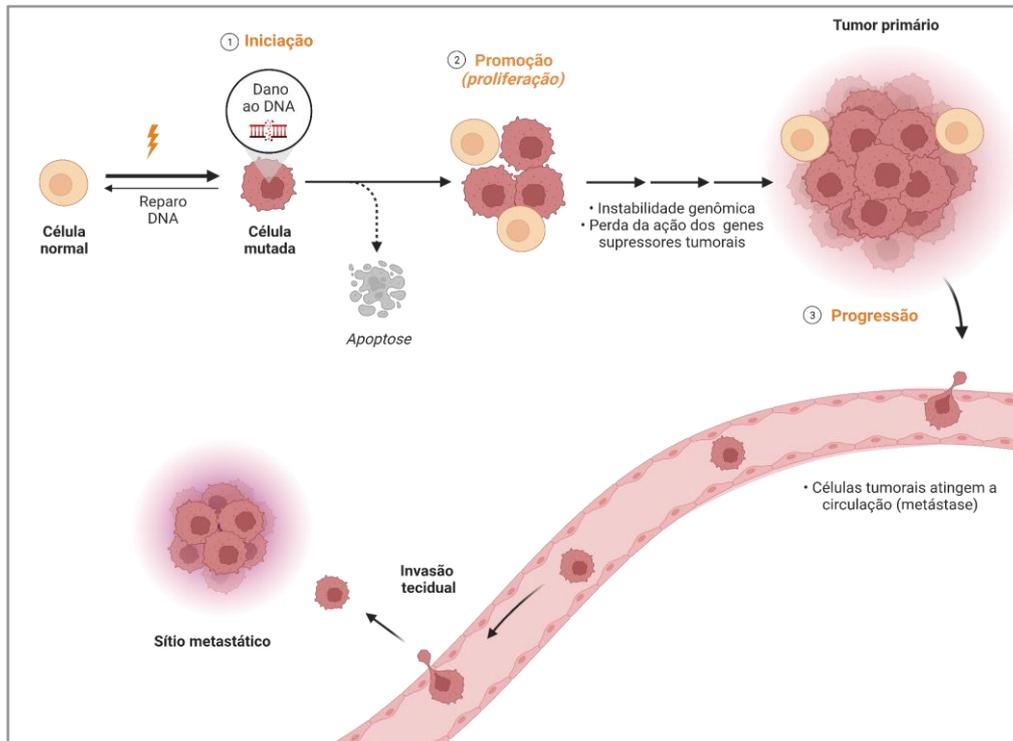


Figura 2. Etapas da carcinogênese. A carcinogênese é um processo progressivo que leva ao desenvolvimento de câncer. A primeira etapa é a Iniciação, na qual ocorre uma alteração genética que torna a célula suscetível ao câncer. A segunda etapa é a Promoção, na qual a célula alterada se multiplica e adquire um conjunto de mutações. A terceira e última etapa é a progressão, na qual a célula adquire características que permitem sua invasão e metástase. Fonte da ilustração: elaborada pela autora com BioRender.com.

Nos anos 2000, Hanahan e Weinberg descreveram seis capacidades funcionais (*Hallmarks of cancer*) que as células cancerosas adquirem durante o processo de transformação neoplásica, sendo elas: sustentação da sinalização proliferativa, evasão de supressores de crescimento, imortalidade replicativa (retardamento do encurtamento dos telômeros), ativação da invasão celular e metástase, indução da angiogênese e resistência a morte celular programada (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Em 2011, os mesmos pesquisadores realizaram uma atualização e outras quatro características foram adicionadas (HANAHAN; WEINBERG, 2011). A reprogramação do metabolismo energético foi uma delas, sendo um fator crucial para o crescimento e sobrevivência das células tumorais. As células cancerígenas possuem a capacidade de reprogramar o seu metabolismo para realizar prioritariamente glicólise, independentemente da presença de oxigênio. Isso favorece a produção rápida de ATP (adenosina trifosfato), e a geração de biomassa para crescimento celular (através do desvio da glicose- 6 fosfato para a via das

pentoses fosfato). Esse fenômeno de glicólise aeróbica característico dos tecidos tumorais é conhecido como efeito Warburg (CRUZ-BERMÚDEZ et al., 2021). Além da reprogramação do metabolismo energético, a inflamação promovida pelo tumor (que beneficia a progressão tumoral), a instabilidade genômica e a evasão do sistema imunológico são características importantes para o desenvolvimento do câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2011) (Figura 3).

Recentemente, Hanahan propôs outras quatro características funcionais as quais podem ser incorporadas como componentes centrais dos *hallmarks* ao longo do tempo (HANAHAN, 2022). Dentre essas novas características encontra-se o desbloqueio da plasticidade fenotípica, processo que permite que as células já diferenciadas sejam capazes de recuperar a capacidade de mudar sua morfologia e função, favorecendo as células cancerosas a evadir a diferenciação terminal. A reprogramação epigenética não mutacional e os microbiomas polimórficos foram outras características acrescentadas. A reprogramação epigenética não mutacional é definida por mudanças na expressão gênica que são puramente reguladas por fatores epigenéticos. Já os microbiomas polimórficos são microbiotas residentes em diferentes tecidos ou neoplasias que podem contribuir ou interferir na aquisição de capacidades funcionais pelas células cancerosas, seja por meio da produção de toxinas bacterianas que danificam o DNA, ou pela produção de fatores imunomoduladores e moléculas que mimetizam sinais proliferativos. Por fim, a senescência celular foi uma capacidade funcional adicionada aos *hallmarks* do câncer. Ela é uma condição irreversível em que as células deixam de se dividir. Esse mecanismo pode ter um papel protetor contra o câncer, pois impede que as células mutadas se dividam e formem tumores. No entanto, estudos recentes mostraram que as células senescentes também podem promover a progressão do câncer por meio por meio do fenótipo secretor associado ao estado senescente (SASP), constituído

por citocinas e fatores que estimulam a proliferação celular (HANAHAN, 2022; KHALIL; DIAB-ASSAF; LEMAITRE, 2023).

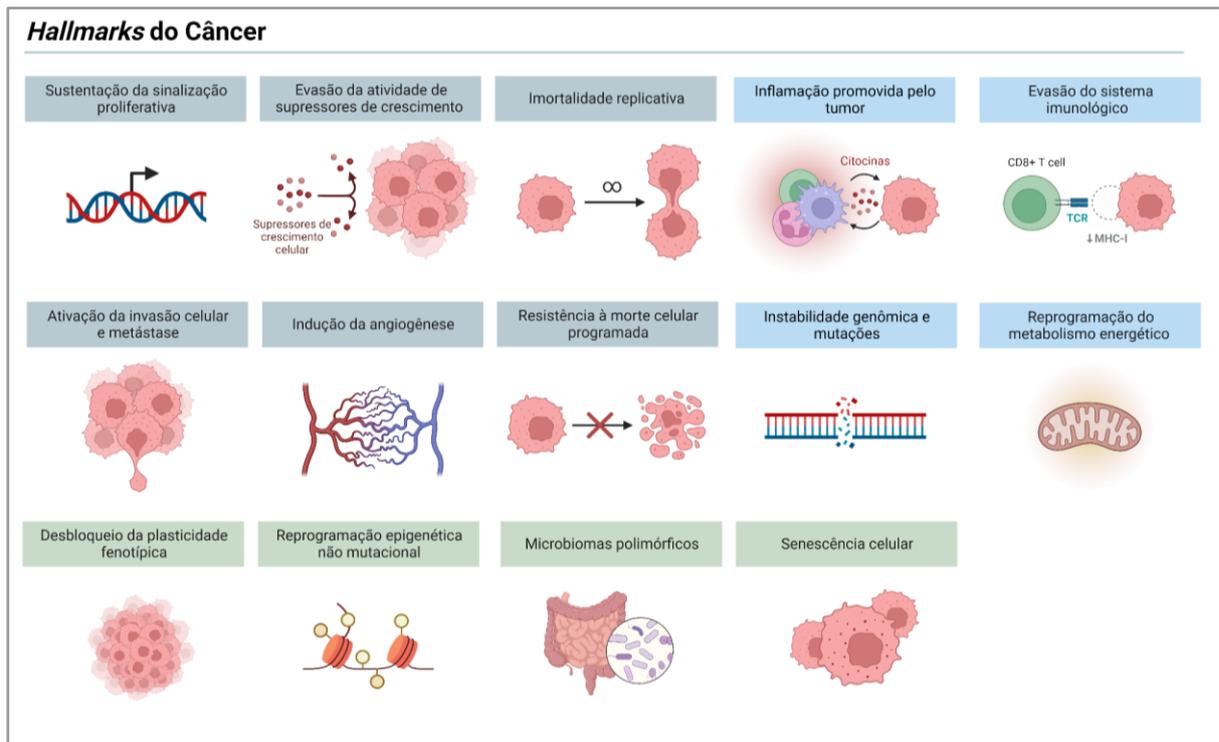


Figura 3. Hallmarks do câncer. Os hallmarks do câncer são considerados as “marcas” principais do câncer. As características em cinza e azul foram definidas por Hanahan e Weinberg, nos anos de 2000 e 2011, respectivamente. Já aquelas escritas em verde foram propostas por Hanahan no ano de 2022. Fonte da ilustração: elaborada pela autora com BioRender.com.

1.3 Glândula mamária e o câncer de mama

A glândula mamária é um órgão secretor responsável pela produção e liberação de leite durante a lactação. É constituída por um tecido epitelial (parênquima) inserido em um estroma composto por tecido adiposo, conjuntivo, vasos sanguíneos e nervos. Este parênquima é formado por ductos que ligam os lobos ao mamilo, onde atinge a superfície corporal. Cada lobo é composto por unidades menores chamadas lóbulos, sendo estes os locais de armazenamento dos alvéolos, estruturas responsáveis pela produção de leite (COLLELUORI et al., 2021).

A anatomia interna da glândula mamária de roedores e mamíferos humanos possui as mesmas estruturas principais descritas anteriormente. Enquanto as mulheres possuem um par de glândulas mamárias, os murinos possuem cinco pares, sendo três localizados na região cérvico-torácica, anteriormente, e dois na região

inguinal posterior. Em ambas as espécies o estroma é composto principalmente por tecido adiposo, porém nos humanos os adipócitos são menos abundantes do que em roedores devido a maior presença de tecido conjuntivo (DONTU; INCE, 2015).

O desenvolvimento da glândula mamária é um processo complexo e bem regulado que ocorre principalmente no período pós-natal. Durante a embriogênese, forma-se uma árvore de ductos rudimentar, que inclui um ducto primário e alguns ramos secundários. Essa estrutura se mantém simples até a entrada na puberdade (Fig. 4), onde pela ação de hormônios como o estrogênio, o sistema de ductos se alonga e ramifica, ocupando todo o corpo adiposo da glândula mamária (KRISANITS et al., 2020; RICHERT et al., 2000). Em uma comparação de idades, temos que a etapa da puberdade em camundongos ocorre entre os 30 e 60 dias de idade (BRUST; SCHINDLER; LEWEJOHANN, 2015), embora o crescimento maturacional da maioria dos processos biológicos se estenda até os 90 dias (FLURKEY; MCURRER; HARRISON, 2007). Já nos humanos, o período da puberdade abrange em média dos 9-13 anos de idade (LOURENÇO; QUEIROZ, 2010).

A infiltração e o alongamento dos ductos ocorrem devido à intensa atividade mitótica dos botões terminais (*TEBs - Terminal end buds*), estruturas em forma de cápsula que ficam no final de cada ducto lactífero e orientam a formação da árvore ductal na puberdade. Ao decorrer da puberdade, surgem novos dutos primários que se formam pela bifurcação dos TEBs, bem como ramos laterais secundários. Uma vez que os TEBs alcançam as bordas da camada de gordura mamária, eles regridem (PAINE; LEWIS, 2017). Na glândula mamária de adultos, pequenos ramos laterais terciários se formam ao longo dos ductos em resposta ao ciclo dos hormônios ovarianos, preenchendo ainda mais a árvore ductal madura. Além disso, as estruturas lóbulo-alveolares (também conhecidos como botões alveolares) começam a se formar (STERNLICHT, 2005).

Durante a gravidez, ocorre uma extensa remodelação tecidual na glândula mamária. As alterações hormonais que ocorrem no início desse período (liberação de prolactina, lactogênios placentários e progesterona) aumentam a proliferação celular e o desenvolvimento dos botões alveolares que crescem e se diferenciam em alvéolos secretores de leite ao final da gestação. Durante a lactação, os alvéolos estão totalmente maduros e as células luminais sintetizam e secretam componentes do leite no lúmen. Após o desmame, a glândula mamária é remodelada, retornando ao estado adulto. Esse processo chama-se involução e é caracterizado pela apoptose das células alveolares e um intenso remodelamento do epitélio mamário, que atinge um aspecto semelhante ao anterior à gestação. Ao longo de todas as fases de desenvolvimento da glândula mamária, as células da mama apresentam características que são comumente encontradas em células cancerosas, como invasão, reinício da proliferação celular e resistência à apoptose (WISEMAN; WERB, 2002).

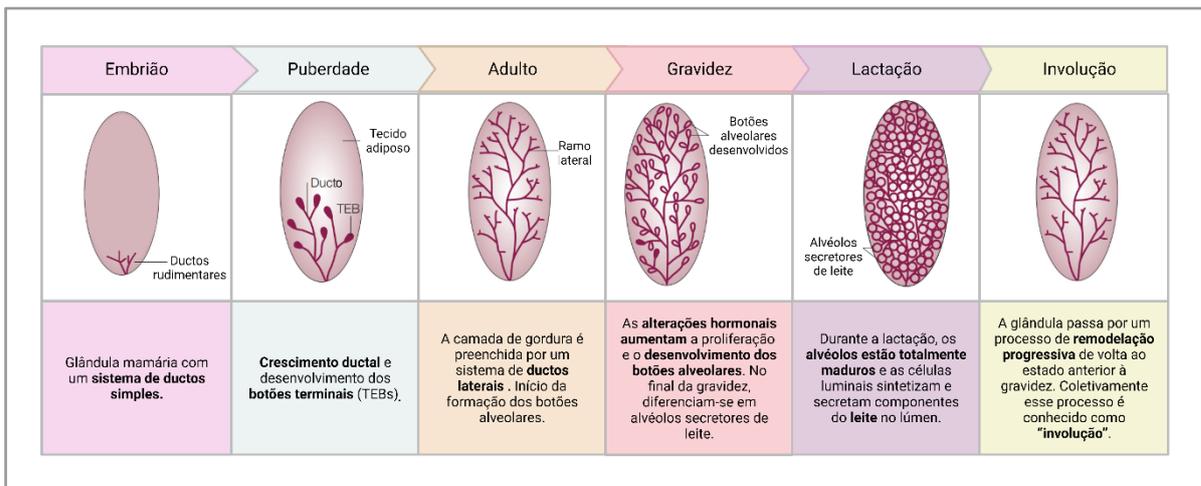


Figura 4. Desenvolvimento da glândula mamária. O desenvolvimento da glândula mamária é um processo contínuo nas fêmeas, desde a fase embrionária até a vida adulta. Durante a gravidez, esse órgão cresce e se desenvolve para produzir leite, que é essencial para a alimentação da prole. Após o parto, a glândula mamária começa a involuir, preparando-se para uma próxima gestação. Fonte da ilustração: elaborada pela autora com BioRender.com.

O câncer de mama é uma doença heterogênea que compreende uma grande diversidade de tipos celulares (subtipos histológicos) e alterações genéticas (subtipos moleculares). Esta neoplasia pode se iniciar em diferentes partes da mama, no entanto na maioria dos casos tem início nas células epiteliais da camada mais interna que reveste os ductos mamários (DAI et al., 2016). De acordo com o IARC, o câncer

de mama é o mais incidente em mulheres, correspondendo a 24,5% do total de casos de câncer femininos no mundo em 2020, com aproximadamente 2,3 milhões de novos casos ao ano. No Brasil, as estimativas são de 73.610 novos casos de câncer de mama no período de 2023 a 2025, correspondendo a um risco estimado de 66,54 casos novos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2023).

Uma das classificações mais utilizadas clinicamente para o câncer de mama é a classificação imuno-histoquímica (IHC). Esta classificação é baseada na expressão de proteínas específicas sendo elas: receptores de estrogênio (RE), de progesterona (RP) e do fator de crescimento epidermal 2 (do inglês: *Human Epidermal growth factor receptor-type 2 - HER2*). Tumores de mama que expressam RE e/ou RP são classificados como “receptor hormonal positivos” (RH+), tumores que possuem superexpressam/amplificam HER2 são classificados como HER2+, e os tumores de mama que não expressam nenhum desses três marcadores (RE, RP e HER2) são conhecidos como cânceres de mama triplo-negativos (TNBC, do inglês: *Triple negative Breast Cancer*) (ANDERSON; SCHWAB; MARTINEZ, 2014). Além dos marcadores hormonais e HER2, outros testes moleculares e genéticos podem fornecer informações adicionais sobre o perfil de agressividade do tumor, incluindo a expressão de genes relacionados à proliferação celular, como o Ki67 (do inglês: *Antigen Kiel 67*). Essas informações podem ser usadas para personalizar o tratamento e prever a resposta do paciente a terapias específicas.

Além da classificação imuno-histoquímica, os perfis moleculares obtidos a partir da análise de preditores Pam50 (do inglês: *Prediction Analysis of Microarray 50*), classificam os tumores de mama em cinco subtipos: Luminal A, Luminal B, Her2-enriquecido, tipo-Basal e tipo-Normal (PARKER et al., 2009; RAJ-KUMAR et al., 2019). Os subtipos luminais são os mais frequentes e apresentam expressão gênica semelhante às células epiteliais da mama. Subtipos como o Luminal A tendem a ser menos agressivos, pois geralmente são diagnosticados em estágio inicial e expressam receptores hormonais (RE e/ou RP) e baixos níveis de ki67, o que permite controle farmacológico por tratamento adjuvante com tamoxifeno (KOBOLDT et al., 2012). Por outro lado, o subtipo luminal B (RE e/ou RP+, HER2+/-, e ki67 alto) possui um perfil mais proliferativo, e requer tratamento mais agressivo, envolvendo quimioterapia ou terapia-alvo. Os subtipos HER2+ são caracterizados pela amplificação ou superexpressão do gene *HER2/neu*. Esses tumores tendem a ser mais agressivos, porém os pacientes se beneficiam com terapias específicas

direcionadas a essa proteína, como o anticorpo anti-HER2, trastuzumab. Já os tumores tipo-basal, caracterizados por uma expressão gênica semelhante às células basais da mama, possuem uma boa sobreposição molecular com o subtipo histológico TNBC (PRAT; PEROU, 2011). Esses tumores normalmente são diagnosticados em estágio mais avançado e tratados com quimioterapia citotóxica, pois não são sensíveis à terapia antiestrogênica ou anti-HER2 (WOLFF et al., 2013). A aplicação e relevância clínica dos subtipos moleculares de câncer de mama estão em estudo e, na maior parte do mundo, as decisões terapêuticas são baseadas em histologia e imunohistoquímica para as proteínas RE, RP, HER2 e Ki67.

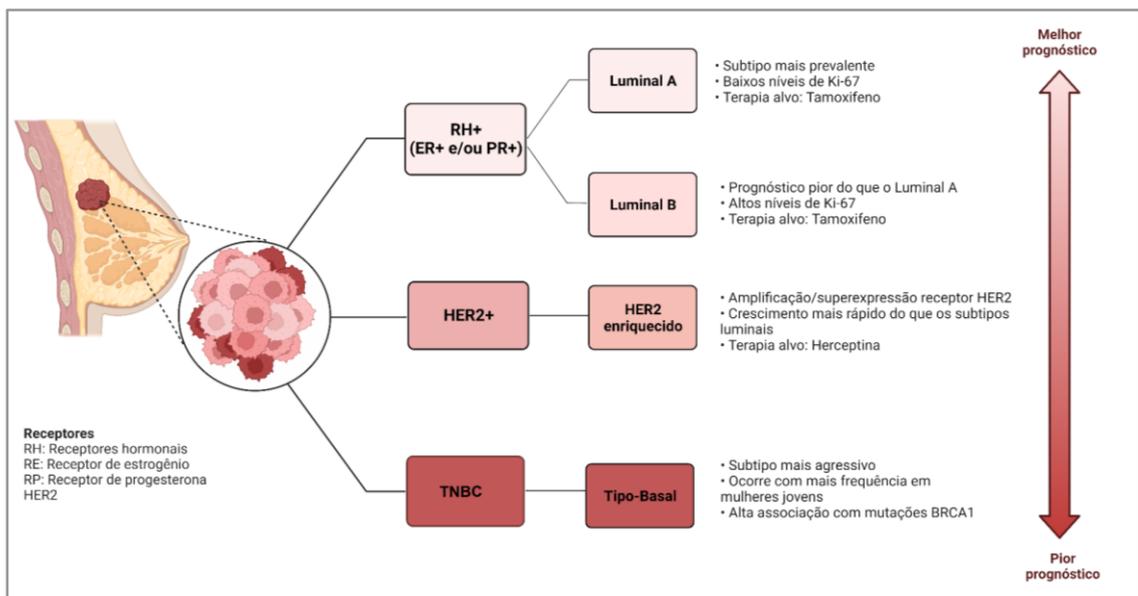


Figura 5. Classificação dos subtipos moleculares do câncer de mama. Esquema demonstrando a classificação baseada nos marcadores moleculares, diferenciando de acordo com os receptores ativos. Fonte da ilustração: elaborada pela autora com BioRender.com.

O câncer de mama é considerado uma doença complexa que resulta da interação de múltiplos fatores, sendo estes genéticos, ambientais, comportamentais e reprodutivos (KRISANITS et al., 2020). A idade tem sido descrita como o principal fator de risco para o desenvolvimento desta neoplasia, principalmente em mulheres acima dos 50 anos de idade (FENG et al., 2018). No entanto, existem muitos fatores de risco modificáveis, ou seja, que podem ser minimizados ou revertidos através dos hábitos de vida, que estão correlacionados com o aumento no risco de câncer de mama. Estima-se que aproximadamente 30% dos casos de câncer de mama no mundo estejam associadas a esses fatores (HARVIE; HOWELL; EVANS, 2015;

JIRALERSPONG; GOODWIN, 2016), sendo que o consumo de uma dieta não saudável, que muitas vezes resulta na síndrome metabólica e/ou obesidade, é um fator de destaque para o desenvolvimento de tumores (DANAEI et al., 2005; LOHMANN et al., 2021).

1.4 Obesidade e câncer de mama

De acordo com a World Cancer Research Fund (WCRF) e a American Institute for Cancer Research (AICR) a obesidade, certas exposições alimentares e o sedentarismo são fatores de risco para o surgimento e recidiva do câncer de mama (KORN et al., 2022). O ganho de peso, por si só, é um dos principais fatores de risco para esta neoplasia, especialmente depois da menopausa, sendo que mulheres que têm um aumento de peso de até 20 kg durante a vida adulta dobram o risco de desenvolver o câncer de mama (HARVIE; HOOPER; HOWELL, 2003). Tal associação já foi reproduzida em modelos animais. Por exemplo, camundongos fêmeas submetidos a uma dieta high fat (60% kcal de gordura) apresentaram um aumento na proliferação celular da glândula mamária, aumentando a vascularização do tumor e reduzindo a latência tumoral, os quais foram acompanhados pelo aumento na expressão de genes inflamatórios e de fatores de crescimento celular (ZHAO et al., 2013)

A obesidade provoca alterações metabólicas, hormonais e inflamatórias no organismo, que podem explicar a sua associação ao câncer. A correlação entre ganho de peso e obesidade como fator de risco para câncer de mama foi primeiramente estabelecida na pós-menopausa (HARBORG et al., 2023; MIZIAK et al., 2023; SAVOLAINEN-PELTONEN et al., 2014). Aliás, a maioria dos cânceres de mama pós-menopausa são do tipo estrogênio-dependentes. Importante notar que isso parece ser contraditório, dado que ao longo da perda da função ovariana, os níveis de estrogênio deveriam estar em queda. Entretanto, os níveis de estrogênio circulante permanecem altos em mulheres obesas, e isso se deve à superexpressão da enzima aromatase no tecido adiposo de pacientes obesos. A enzima aromatase é a principal responsável pela biossíntese de estrogênio nos tecidos (HARBORG et al., 2023; MCTIERNAN et al., 2006). No contexto do câncer de mama, o tecido adiposo mamário 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 também pela inflamação associada a ele (BOWERS et al., 2015).

A maioria dos estudos sobre câncer de mama e obesidade se concentra em tumores positivos para receptores hormonais na pós-menopausa. No entanto, foi estabelecido que o diagnóstico de TNBC é mais prevalente entre indivíduos classificados como obesos em oposição àqueles que não são obesos. Os TNBC vem sendo associados com a obesidade, na qual o excesso de gordura corporal foi identificado como um dos fatores que contribuem para o aumento da incidência deste subtipo mais agressivo de câncer de mama (LEE; FANG, 2023). Estudos recentes revelaram que animais obesos exibem um estado de hipóxia no tecido adiposo. Essa hipóxia leva a interações entre as células adiposas e as células do estroma, impulsionando o início e a progressão do tumor (ALCALÁ et al., 2017; LEE; FANG, 2023; TODORČEVIĆ et al., 2021). Apesar de não possuírem receptores de estrogênio do tipo alfa, sendo este o mais abundante, grande parte dos tumores hormônio independentes expressam receptores de estrogênio beta, assim como o receptor de estrogênio acoplado à proteína G1 (GPER-1), podendo desencadear a responsividade ao estrogênio e aumento da proliferação celular através de vias não genômicas (VAN BARELE et al., 2021). Além do estrogênio produzido localmente pelo eixo estrogênio-aromatase, outros hormônios como a insulina, leptina e adiponectina parecem contribuir para um aumento da proliferação celular e a maior prevalência do câncer de mama (DAVIS; KAKLAMANI, 2011). Uma das ações da insulina está associada ao aumento de hormônios estrógenos, juntamente com o aumento da concentração do Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-I), que em sequência ativa o Receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), promovendo o aumento da proliferação celular (JARDÉ et al., 2011; LERO; SHAW, 2021).

Na obesidade, o aumento do tecido adiposo, principalmente tecido adiposo branco, ocasiona aumento dos níveis circulantes de fatores de crescimento, citocinas e adipocinas, como leptina, fator de necrose tumoral α (TNF) e interleucinas IL-6, IL-8, IL-1 β (HARVEY; LASHINGER; HURSTING, 2011). A leptina e a adiponectina, que são secretadas pelo tecido adiposo e frequentemente pelos tumores de mama, atuam através de uma série de vias de sinalização associadas aos *hallmarks* do câncer como desregulação da apoptose e do ciclo celular, angiogênese e sobrevivência celular (JARDÉ et al., 2011). Em pessoas obesas, ocorre um aumento de leptina e diminuição de adiponectina, que parecem estimular a via de transição epitelial-mesenquimal

(EMT), típica de cânceres em progressão metastática (RIOS GARCIA et al., 2017). Em um estudo prévio, nosso grupo de pesquisa demonstrou que animais tratados com dieta hiperlipídica (35 % calorias a partir de lipídeos) estimulou o acúmulo de macrófagos em forma de estruturas tipo-coroa (crown-like structures (CLS), produção de prostaglandina E2 (PGE2), IL-6 e MCP-1, e expressão de aromatase em tecido adiposo mamário de camundongos Swiss. Esse fenótipo foi associado ao aumento da formação de tumores quando os animais foram expostos ao carcinógeno mamário dimetil-benzantraceno; os quais foram revertidos pelo tratamento com o inibidor de ciclo-oxigenase-2, etoricoxibe (GONÇALVES et al., 2021).

Sendo assim, sabendo-se que a literatura embasa uma correlação positiva entre obesidade e câncer de mama, a hipótese do nosso trabalho é de que uma dieta hiperlipídica administrada desde a puberdade em camundongos, é capaz de promover alterações morfológicas e moleculares no tecido mamário, gerando um microambiente propício para a proliferação celular do epitélio, o que poderia favorecer o crescimento de tumores de mama.

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. O consumo de alimentos de baixo valor nutricional e elevado poder calórico, bem como o sedentarismo, são fatores de risco evitáveis para esta neoplasia. Esses fatores estão intimamente ligados à obesidade, que é um dos principais fatores de risco para o câncer de mama. A compreensão dos mecanismos que interligam a obesidade e o câncer de mama tem se tornado uma meta importante na pesquisa clínica. No entanto, o entendimento da fisiopatologia dessa relação é complexo, sendo que os efeitos morfológicos sobre a glândula mamária e mecanismos de sinalização inflamatória precisam ser melhor elucidados, principalmente no contexto dos cânceres de mama hormônio-independentes. Esses tipos de cânceres são caracterizados por células com baixas concentrações de receptores hormonais e atingem principalmente mulheres jovens. Tendo em vista que a obesidade vem acometendo pessoas em fases cada vez mais precoces da vida, compreender os efeitos dessa condição sobre a biologia da glândula mamária desde a puberdade pode contribuir para o

entendimento e a correlação dessas alterações com os cânceres de mama hormônio-independententes.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho é caracterizar as alterações morfológicas e inflamatórias na glândula mamária em modelos de obesidade induzida por dieta hiperlipídica, e observar a influência desta alimentação sobre o crescimento tumoral.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Desenvolver uma dieta com alto teor de gordura capaz de induzir a obesidade em camundongos fêmeas Balb-c e Swiss;
- II. Monitorar as alterações de ganho de peso corporal, peso da gordura mamária e visceral, e parâmetros bioquímicos plasmáticos (colesterol total, triglicerídeos, enzima fosfatase alcalina, alanina aminotransferase (ALT) e glicemia) nos grupos de camundongos fêmeas Balb-c e Swiss alimentados com dieta hiperlipídica (HFD) e dieta controle (CTL);
- III. Avaliar a morfologia do tecido hepático, glândula mamária e gordura visceral nos grupos de camundongos fêmeas Balb-c e Swiss alimentados com dieta hiperlipídica (HFD) e dieta controle (CTL);
- IV. Avaliar a morfologia total da glândula mamária adjacente ao tumor e contralateral ao tumor (*whole-mount*), e determinar o perfil de macrófagos totais, M1 e M2 no tecido mamário dos animais submetidos ao protocolo de dieta acima;
- V. Quantificar a cinética do crescimento de implantes mamários de células de câncer triplo negativo (4T1) e estrogênio independente (Tumor de Ehrlich), bem como determinar o imuno conteúdo de Ki67 (marcador de proliferação celular), através de imuno-histoquímica (IHC).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 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>), 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 7886101122. Os experimentos foram conduzidos em camundongos Balb-c fêmeas (n = 13 por grupo; 40 dias pp.) com peso médio de 17 g, e Swiss fêmeas (n = 11 por grupo; 60 dias pp.) com peso médio de 32 g. Os camundongos Swiss foram fornecidos pelo Biotério Central da UFSC, e os camundongos Balb-c pelo Laboratório de Bioquímica Experimental – LABIOEX. Foram alocados 6-11 animais por caixa, mantidos em ambiente com temperatura e ventilação controlada, temperatura constante de $22 \pm 1^\circ$ C, ciclo de 12 h claro/escuro, e alimentados com ração e água *ad libitum*. Em todos os protocolos, os animais foram monitorados diariamente e, ao sinal de pontos de terminação humanizada (de acordo com a RN33 do CONCEA, de 18/11/2016) como letargia, locomoção alterada, dispneia, perda rápida ou excessiva de peso, eriçamento de pelos e/ou tumores com tamanho superior à $1,5 \text{ cm}^3$, os mesmos foram eutanasiados. Ao final dos experimentos os animais foram submetidos à eutanásia por meio de anestesia com cetamina/xilazina (90/10 mg/kg), seguida por exsanguinação por punção cardíaca.

4.2 Procedimentos experimentais

4.2.1 Dieta hipercalórica (*High fat diet*, HFD), monitoramento de peso e consumo: Camundongos Balb-c e Swiss foram divididos em grupos alimentados com dieta controle ou uma dieta rica em gordura (HFD). A ração HFD foi feita a partir de 52% de farelo da ração controle (ProLab 22PB), 13% açúcar e 35% de banha de porco (Pamplona ®) gelada. A energia bruta é de 5,64 kcal/g, sendo 55,7% kcal/g provenientes da banha de porco. Como dieta controle utilizada foi ração para roedores ProLab 22PB normocalórica, com energia bruta de 3,8 kcal/g. Os ingredientes foram misturados e armazenados por 1h na geladeira. Esse período serve para que a textura

da massa se torne mais firme e fácil de manusear. Após esse intervalo, a massa foi moldada em *pellets* e armazenada na geladeira, pronta para ser fornecida aos animais. A ração HFD foi preparada semanalmente, e os pellets estocados por no máximo 7 dias a 4 °C, evitando a oxidação da gordura e alteração da palatabilidade. O consumo de ração e água foi monitorado duas vezes por semana (mensurando a quantidade fornecida e a restante de água e ração), assim como os animais foram pesados nos mesmos períodos para acompanhar o efeito da dieta no peso, consumo alimentar/calórico e de água.

4.2.2 Modelos de implante tumoral

4.2.2.1 Modelo de adenocarcinoma mamário 4T1 em camundongos Balb-c.: Para avaliar o papel da dieta como um promotor tumoral em animais Balb-c, foi utilizado o modelo de adenocarcinoma mamário 4T1 (PULASKI; OSTRAND-ROSENBERG, 2001). Previamente à inoculação dos tumores, os animais foram submetidos à dieta HFD ou dieta controle. Um dia antes da inoculação dos tumores, a região das mamas foi depilada com creme depilatório (Creme depilatório corporal Essentials, Panvel ®) para melhor visualização da área. No momento da inoculação, os animais foram previamente anestesiados com isoflurano 4% (fase de indução), seguido de 1-2% (fase de manutenção) misturados com oxigênio. As células 4T1 foram descongeladas e somente inoculadas nos animais após a terceira passagem em cultura. Com os animais Balb-c anestesiados, 7×10^5 células 4T1 suspensas em 50 μ l de tampão fosfato (PBS) foram inoculadas na quarta glândula mamárias do lado direito de camundongos fêmeas após 90 dias em dieta. O implante foi realizado com uma seringa 1 mL e agulha de 24 G (gauge), pinçando o mamilo e inoculando as células no tecido subcutâneo. Após os tumores serem palpáveis (7-10 dias), iniciou-se a medição do volume tumoral com o auxílio de um paquímetro digital, por um máximo de 28 dias; ou menos em caso de pontos de terminação humanizada serem observados (Esquema 1). Para calcular o volume tumoral de ambos os modelos, foi utilizada a fórmula: $\text{volume (mm}^3\text{)} = (a \times b^2)/2$, onde 'a' representa o maior diâmetro tumoral e 'b' o menor diâmetro em milímetros. Ao final, os animais foram submetidos à eutanásia e os tecidos isolados para as análises bioquímicas e moleculares.

4.2.2.1 Modelo de adenocarcinoma mamário de Ehrlich em camundongos Swiss:

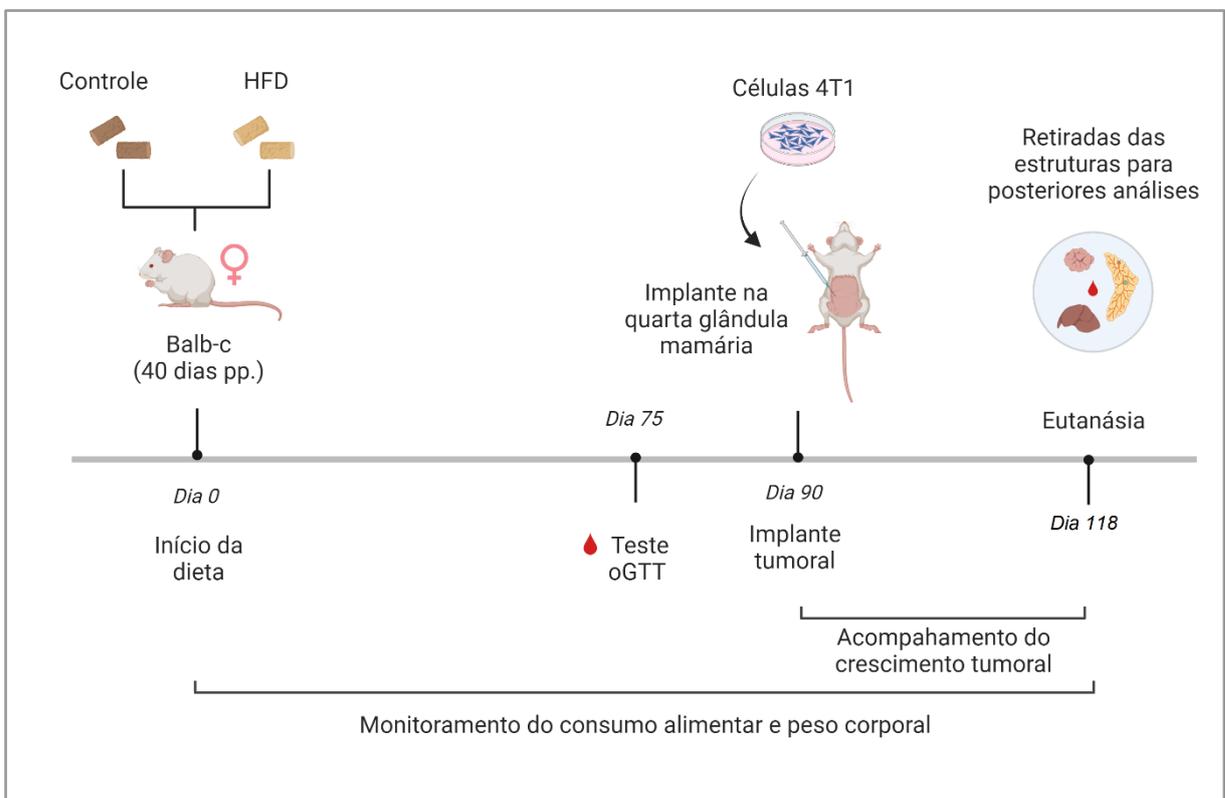
Para avaliar o potencial promotor tumoral da dieta em animais Swiss, foi utilizado o modelo de implante ortotópico de células de adenocarcinoma mamário de Ehrlich (PALERMO-NETO; DE OLIVEIRA MASSOCO; ROBESPIERRE DE SOUZA, 2003). Novamente, os animais foram submetidos à dieta HFD ou dieta controle antes da inoculação dos tumores, e tiveram a região da mama depiladas. Para a indução de tumores sólidos nos camundongos Swiss fêmeas, as células de Ehrlich foram descongeladas e submetidas a passagens intraperitoneais em 4 camundongos, na forma de tumores ascíticos. Os repiques *in vivo* foram repetidos 3 vezes e, 7 dias pós-inoculação do terceiro repique, os tumores ascíticos foram coletados para que as células fossem implantadas. Após a coleta, as células foram contadas, e 3×10^6 células foram suspensas em PBS e implantadas na região da quarta glândula mamária do lado direito dos camundongos fêmeas após 90 dias de dieta. O implante foi realizado da mesma maneira como descrito no modelo tumoral 4T1, e os tumores cresceram na forma sólida, dando origem aos tumores sólidos de Ehrlich (TSE). Após os tumores serem palpáveis (7-10 dias), iniciou-se a medição do volume tumoral com o auxílio de um paquímetro digital, por 21 dias (Esquema 2). Para calcular o volume tumoral de ambos os modelos, foi utilizada a fórmula: $\text{volume (mm}^3) = (a \times b^2) / 2$, onde 'a' representa o maior diâmetro tumoral e 'b' o menor diâmetro em milímetros. Todos os animais Swiss submetidos a dieta controle ou HFD (n=11/grupo) receberam o implante de células tumorais. No entanto, um animal controle e dois animais do grupo HFD não desenvolveram o tumor, sendo excluídos das análises referentes à glândula mamária.

4.2.3 Teste oral de tolerância a glicose (oGTT): O teste foi realizado 2 semanas antes da indução do tumor em animais em jejum de 8 h (8h da manhã – 16h da tarde) e conscientes. Inicialmente foi realizada a coleta de sangue pela veia caudal para a determinação da glicemia (tempo "0") com o uso de um glicosímetro (AccuChek Guide, Roche Diagnostics). Imediatamente, foi administrada solução de glicose 30% (1,5 g/Kg de m.c., gavagem orogástrica) e foram coletadas amostras de sangue provenientes da veia caudal dos camundongos aos 20, 60 e 120 min para a determinação da concentração de glicose sanguínea. A área sob a curva (do inglês: *area under the curve* - AUC) foi calculada mediante a glicemia basal de cada animal do grupo (RAFACHO et al., 2007). Para o teste oGTT foram utilizados 8 animais/ grupo no teste com camundongos Balb-c, e 9 animais/ grupo no teste com animais Swiss.

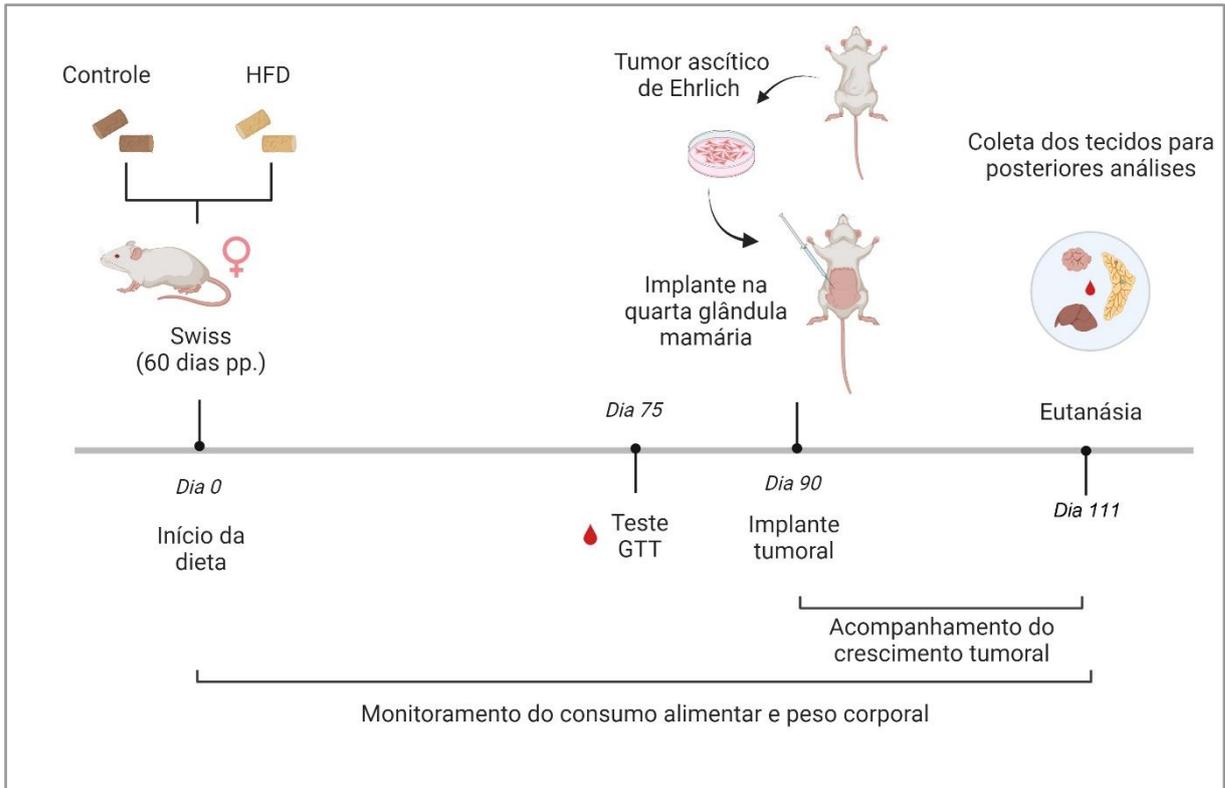
Esses números de animais atingem a recomendação de que pelo menos 5 animais por grupo sejam utilizados em testes de tolerância metabólica (BENEDÉ-UBIETO et al., 2020).

4.2.4 Desenho experimental

Seguem abaixo os desenhos experimentais utilizados nos experimentos de indução tumoral por 4T1 ou Ehrlich em animais submetidos a diferentes dietas (n=16-20).



Esquema 1 - Desenho experimental das dietas controle e HFD e indução de tumores 4T1 em camundongos Balb-c. Fonte da ilustração: elaborada pela autora com BioRender.com.

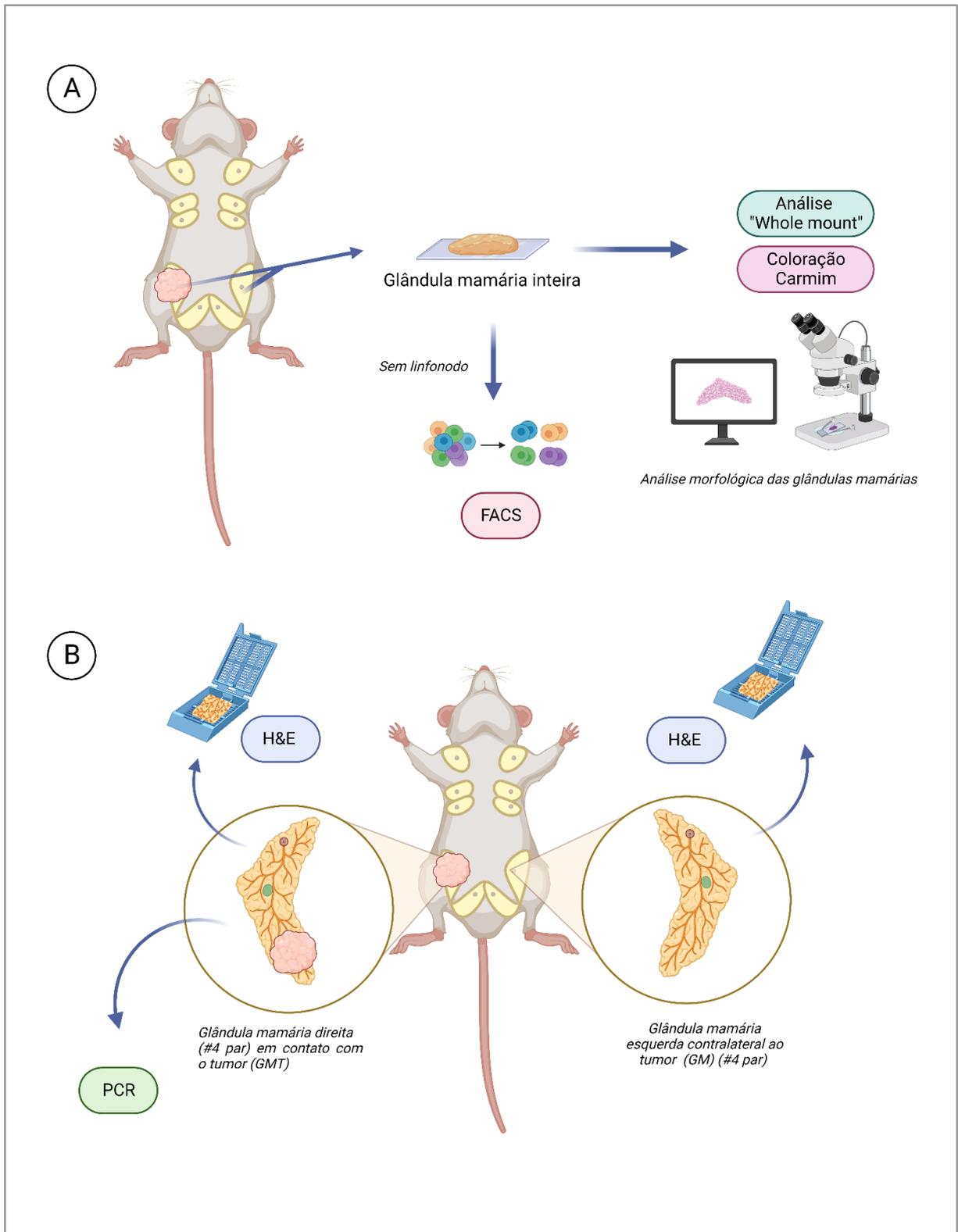


Esquema 2 - Desenho experimental das dietas controle e HFD e indução de tumores Ehrlich em camundongos Swiss. Fonte da ilustração: elaborada pela autora com BioRender.com.

4.2.5 Coleta dos tecidos

Os animais foram eutanasiados por meio de anestesia com cetamina/xilazina (90/10 mg/kg) intraperitonealmente. O sangue total foi coletado (punção cardíaca), e o soro foi separado por centrifugação (1500 x g/15 min temperatura ambiente) e congelado a -80°C. A glândula mamária, tecido adiposo perigonadal e retroperitoneal, bem como os tumores e tecido hepático foram coletados, pesados, e fracionados de acordo com cada procedimento a ser realizado. Parte dos tecidos foi imediatamente fixada em formalina 4% para a coloração Hematoxilina e Eosina (H&E) e imunohistoquímica (IHC). As glândulas mamárias tiveram três destinos para análise (Esquema 3). Alguns animais tiveram a sua glândula mamária inteira retirada, pesada e processada para a análise de “Whole mount” (descrita abaixo). Outros animais tiveram parte da glândula mamária fixada em formalina para análises histológica (H&E), e parte do tecido armazenado em trizol para posteriores análises de RT-qPCR. Por fim, alguns animais tiveram as glândulas mamárias diretamente homogeneizadas para a análise de citometria de fluxo (FACS). É importante salientar que o linfonodo

não foi processado juntamente com o tecido mamário, na tentativa de priorizar o microambiente do tecido/tumor.



Esquema 3 - Representação esquemática das análises realizadas com as glândulas mamárias dos camundongos controle e submetidos a dieta HFD. Fonte da ilustração: elaborada pela autora com BioRender.com.

4.2.6 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 ingesta 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 ingesta calórica por animal (kcal/dia/animal) foi determinada usando o conteúdo calórico das dietas: dieta controle (3,8 kcal/g) e dieta HSF (5,64 kcal/g). Ao final do experimento, os pesos relativos ao tecido adiposo mamário (TAM) – retirado da região abdominal/inguinal contralateral ao tumor – tecido adiposo visceral (calculado a partir das gorduras perigonadal, retroperitoneal e omental), fígado, e baço foram calculados da seguinte maneira: $(\text{peso do tecido}/\text{peso final do animal}) \times 100$.

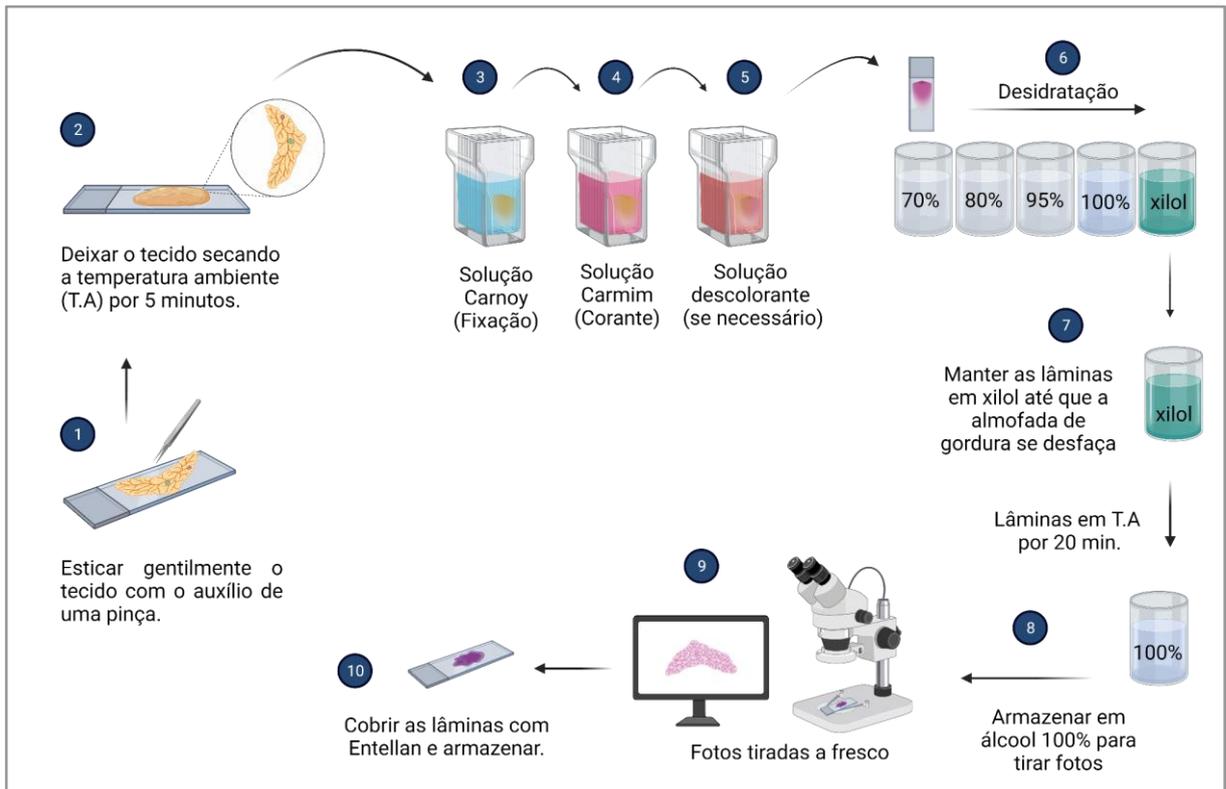
4.2.7 Análise de marcadores bioquímicos plasmáticos: O sangue foi coletado por punção cardíaca, sendo mantido em tubos heparinizados e o soro isolado após centrifugação (1500 x g/15 min temperatura ambiente). Os níveis plasmáticos de colesterol total, triglicerídeos, aspartato aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina foram determinados por métodos enzimáticos através do uso de kits comerciais da marca Labtest Diagnóstica ® (Lagoa Santa MG, Brasil).

4.2.8 Histologia por coloração de H&E: Após a eutanásia os órgãos e tumores foram coletados e imediatamente cortados e fixados em formalina 4%. Após fixação, os tecidos foram desidratados em banhos seriais de etanol e xilol, seguido por inclusão em parafina (52 °C). Os blocos de parafina foram cortados em seções de 5 µm (Micrótomo 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 através de fotografias tiradas com o Microscópio Vertical Bx41 OLYMPUS. Cinco amostras foram analisada. O número total de adipócitos, bem como a sua área, foi contabilizado, analisando 6 campos/lâmina utilizando o software ImageJ em fotografias com ampliação de 400x.

4.2.9 Imuno-histoquímica (IHC): Os tecidos tumorais e da glândula mamária foram cortados em seções de 4 µm de espessura (Micrótomo Leica RM2255, Leica Biosystems) e montados em lâminas de aderência TOMO®. As lâminas foram incubadas por 40 minutos a 50°C e, em seguida, por 10 minutos a 60°C, seguido por xileno (2x, 8 minutos), gradiente de etanol (100°; 5 minutos, 95° e 70°; 3 minutos) e água destilada (5 minutos) para desparafinização e hidratação das seções tumorais. Para a recuperação de epítomos, foi utilizado o método de recuperação de antígeno com tampão de citrato de sódio (10 mM de citrato de sódio, 0,05% Tween 20, pH 6,0) aquecido no microondas (3 ciclos de 3 minutos em 30% de potência, com intervalos de 2 minutos). A permeabilização do tecido foi realizada com 0,2% de Triton-X100 em PBS por 20 minutos. As proteínas foram bloqueadas em 1% de albumina em TTBS (tampão TBS + 1% de Tween 20) por 1h à temperatura ambiente e lavadas com tampão fosfato (PBS) por 2 minutos. Foi utilizado o anticorpo Ki67 (Invitrogen, MA5-14520) na diluição de 1:100 em 1% BSA/TTBS, *overnight* em uma câmara escura umidificada a 4°C. As amostras foram lavadas com tampão fosfato (PBS) por 2 minutos, e a atividade da peroxidase endógena foi inibida com 0,3% de H₂O₂ em metanol por 20 minutos. As amostras foram lavadas com PBS (2 minutos) e incubadas com anticorpo anti-IgG HRP conjugado (1:1000, anti-rabbit Ab6721, Abcam) durante 1h à temperatura ambiente (23 ± 1°C). As lâminas foram reveladas usando o DAB Substrate Kit (ab64238) (Abcam) de acordo com as instruções do fabricante, incubadas com o Kit por 5 minutos, e contrastadas com hematoxilina de Mayer por 2 minutos. Após, as lâminas foram montadas com Entellan (Merck Millipore). O controle negativo correspondente foi realizado para cada amostra, seguindo o mesmo protocolo, com a exclusão do anticorpo primário. Oito campos por amostra foram fotografados no microscópio Olympus BX41 (Japão) em um aumento de 400x, e o resultado final foi mensurado através da contagem da média dos campos/lâmina.

4.2.10 Análise da morfologia da glândula mamária (Whole-mount): A metodologia utilizada para a análise da morfologia geral das glândulas mamárias foi baseada no protocolo de Cornelia et. al., (2018). No dia da eutanásia, as glândulas mamárias da região do par #4 foram dispostas sob lâminas histológicas e deixadas secar por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as glândulas foram imersas na solução Carnoy (75% álcool etílico absoluto + 25% ácido acético) para fixação (24 - 48h dependendo da espessura do tecido). Após a etapa de fixação, as lâminas foram

coradas com uma solução de corante Carmim preparado da seguinte forma: Adicionou-se 1g de corante carmim + 2,5 g de sulfato de potássio e alumínio em 500 mL de água destilada. A solução foi fervida por 20 minutos, filtrada e armazenada para uso. Após atingir a temperatura ambiente, a solução de corante foi adicionada às lâminas e retiradas quando o linfonodo (estrutura mais espessa) estivesse bem corado. Devido a diferença de espessura entre as glândulas mamárias dos camundongos Balb-c para os Swiss, nos Balb-c foi utilizado uma solução de descoloração (400 mL de álcool 70% + 5 mL de HCL 2M) para retirada do *background* rosado e melhor visualização das estruturas. Não houve necessidade de utilizar esse passo para as glândulas mamárias dos animais Swiss. Após a coloração (e descoloração quando necessário), as glândulas foram desidratadas em álcool (5 minutos em cada uma das seguintes concentrações 70, 80, 95 e 100%) seguido de xilol, onde ficaram imersas por no mínimo 2 dias. Esse passo auxilia na retirada dos lipídios e melhor visualização das estruturas. Quanto maior a quantidade de lipídios, maior o tempo necessário no xilol. Após 7 dias, todas as lâminas do grupo controle já tinham perdido grande parte do tecido adiposo. As glândulas mamárias do grupo HFD ficaram 2 semanas no xilol. No dia da retirada das fotos, as glândulas mamárias foram deixadas por 20 min na capela para que xilol evaporasse e depois armazenadas em álcool absoluto até obter-se todas as imagens necessárias. As fotografias do tecido mamário foram obtidas através do Estereoscópio SZX16 OLYMPUS em aumento de 0,5x. Após as fotos retiradas, as lâminas foram cobertas com Entellan e armazenadas em caixas específicas para lâminas histológicas.

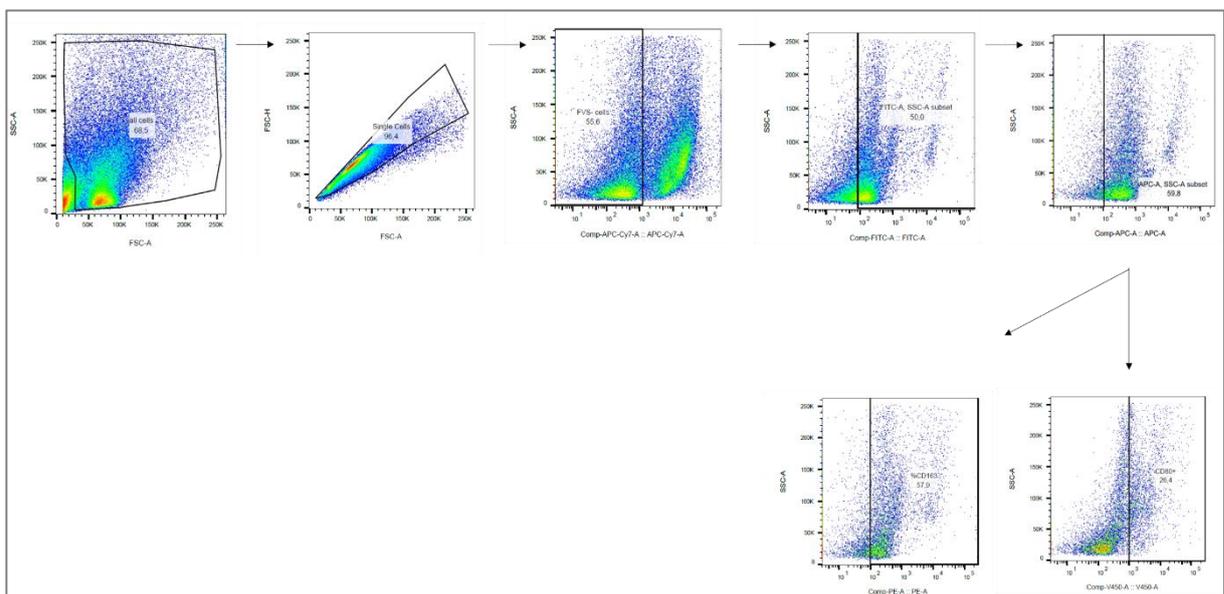


Esquema 4 - Representação esquemática da coloração carmim para glândulas mamárias (*Whole mount*). Fonte da ilustração: elaborada pela autora com BioRender.com.

4.2.11 RT-qPCR da glândula mamária: O RNA mensageiro total (mRNA) do tecido mamário foi extraído usando TRIzol (Invitrogen) de acordo com o protocolo do fabricante. Foram utilizados 1000 ng de mRNA para sintetizar o DNA complementar de primeira fita (cDNA) usando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (ThermoFischer) em termociclador SimpliAmp (ThermoFischer). As reações de amplificação e quantificação foram realizadas com a plataforma PCR em Tempo Real HT 7900 (ThermoFischer). Cada reação consistiu em 5 μ l de PowerUp SYBR Green Master Mix (ThermoFischer), 100 nM de primers forward e reverse, água livre de nuclease e 1 μ l de cDNA. As condições de ciclagem foram: 50°C por 2 min, 95°C por 2 min e 40 ciclos de 95°C por 15 seg, 55°C por 15 seg e 72°C por 1 min. Os níveis relativos de transcrição foram calculados usando o método $\Delta\Delta$ CT e normalizados para o gene $\beta 2m$ (F: CATGGCTCGCTCGGTGAC; R: CAGTTCAGTATGTTCCGGCTTCC) sendo este um transcrito com expressão estável e indicado para tecido adiposo (Gong, et al; 2016). Foi analisado o gene *ADGRE1* (F: CTTTGGCTATGGGCTTCCAGTC; R: GCAAGGAGGACAGAGTTTATCGTG), correspondente a proteína marcadora de macrófagos F4/80.

4.2.12 Citometria de fluxo do tecido mamário (FACS): As glândulas mamárias sem o linfonodo foram utilizadas para a análise de citometria de fluxo (Esquema 3). Após a coleta, o tecido mamário foi imediatamente adicionado em uma placa de petri contendo 1mL de meio de cultura DMEM/F12 e imediatamente picotado com auxílio de um bisturi. Após o tecido apresentar uma massa homogênea, esta foi transferida ao meio de digestão (2 mg/mL de colagenase em meio DMEM/F12) e incubada em banho maria 37°C por uma 1h e 30 minutos. Ao todo, foram analisadas 5 glândulas dos animais HFD e 7 animais controle. A cada 10 minutos, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, realizou-se uma homogeneização mecânica no tecido, ressuspensando o líquido 15 vezes. Após o período de incubação com a colagenase, adicionamos 20 mL de tampão salina gelado (NaCl 0,9% pH 7,4), e centrifugamos 300 x g por 5 minutos a 4°C, a fim de retirar o máximo de gordura. O sobrenadante foi filtrado utilizando filtro de 100 nm (EASYstrainer™, Greiner). Após a filtragem, centrifugamos as células a 500 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensado em 1 mL de tampão salina gelado. As células foram contadas e distribuídas igualmente em poços de uma placa de 96, visando minimizar a perda de célula nas próximas centrifugações. Depois, as células foram centrifugadas novamente 300 x g por 5 minutos à 4°C, e o sobrenadante descartado. Para determinar a viabilidade celular, foi adicionado 100 uL de o BD Horizon™ Fixable Viability Stain 450 (FVS450) (BD Biosciences, EUA) por poço (1:1000), e a placa incubada por 10 minutos no escuro à temperatura ambiente. O FVS450 permite ver a diferenciação de células de mamíferos viáveis de não viáveis de acordo com a intensidade de fluorescência das células, medida por citometria de fluxo. Após a incubação, foi adicionado 100 uL de tampão salina, seguida por uma centrifugação de 300 x g por 5 minutos à 4°C. Ao pellet recém formado, foi adicionado o FC-Block (1:100; Mouse BD Fc Block) seguido por uma incubação de 5 minutos a 4°C. O FC-Block é utilizado para bloquear a ligação não específica pelos receptores FC presentes nas células. Após o bloqueio, as amostras foram incubadas com um mix dos seguintes anticorpos: anti-CD45 (BD Pharmingen™ Cat: 561874) conjugado com fluoresceína (FITC), anti-CD11b (BD Pharmingen™ Cat: 550993) conjugado com PerCP-Cianina 5.5 (PerCP-Cy5.5), anti-F4/80 (eBioscience™ Cat: 17-4801-82) conjugado com alofocianina (APC), anti-CD163 (BD Pharmingen™ Cat: 155307) conjugado com ficoeritrina (PE) e anti-CD80 (BD Pharmingen™ Cat: 560523) conjugado com Horizon

V450 (V450). A incubação foi realizada por 40 minutos a 4 °C, seguida pela adição de 100 µL de tampão salina em cada amostra. Uma última centrifugação de 300 x g por 5 minutos é realizada, e o pellet formado foi ressuspensionado em 300 µL de tampão salina, resultando nas amostras prontas para a análise. As células foram analisadas no citômetro de fluxo FACSVerse™ BD (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). Aproximadamente 1.000.000 eventos foram adquiridos em cada análise. A análise de todos os resultados obtidos pelo citômetro de fluxo FACSVerse™ BD foi realizada no software FlowJo X (Tree Star Inc, Ashland, Oregon, EUA), seguindo a estratégia de gate abaixo.



Esquema 5 - Estratégia de gate de citometria de fluxo para análise de macrófagos mamários

4.3 Análises estatísticas

Primeiramente, os testes estatísticos D'Agostino-Pearson e Shapiro-Wilk foram aplicados para avaliar a normalidade dos dados, e após foi utilizado o teste de GRUBBS ($\alpha = 0,05$) para detecção de possíveis outliers. Para comparação entre dois grupos foi utilizado o teste t de Student para dados paramétricos e Mann-Whitney para dados não paramétricos ou dados heterocedásticos. A Análise de variância (ANOVA) duas vias seguidas pelos testes de post-hoc Sidak foram aplicadas quando grupos múltiplos foram comparados. Os resultados foram representados como média +/- desvio padrão (S.D.) e considerados significativos quando $p < 0,05$. Os gráficos e as análises estatísticas foram realizados utilizando o software GraphPad Prism 8.4 (GraphPad).

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS DA DIETA HIPERLIPÍDICA SOBRE O PERFIL ALIMENTAR, MORFOLOGIA DOS TECIDOS ADIPOSEO E HEPÁTICO, E O METABOLISMO ENERGÉTICO DE CAMUNDONGOS.

De início, procuramos estabelecer uma dieta hiperlipídica (HFD) capaz de induzir o fenótipo tipo-obeso nos camundongos das linhagens Balb-c e Swiss, submetidos ao protocolo de indução tumoral para o câncer de mama. A nomenclatura "fenótipo tipo-obeso" foi utilizada pois não há parâmetros padronizados para definir a obesidade em roedores (LUTZ; WOODS, 2012; MARTINS et al., 2022). Um estudo anterior do nosso grupo (GONÇALVES et al., 2021) já havia demonstrado que uma dieta com 35% de gordura (banha de porco) foi eficaz em promover esse fenótipo. Após alguns testes de receitas, elaboramos uma dieta de mesmo percentual de gordura, que se manteve palatável e com o consumo facilmente mensurável. Ao longo de todo o período de dieta, o peso dos animais, bem como o consumo da ração, foi verificado duas vezes por semana.

Os animais Balb-c submetidos à dieta HFD obtiveram uma média de peso corporal similar ao grupo alimentado com dieta padrão (CTL), durante todo período analisado (Fig. 6B), o que é evidenciado nas imagens retiradas no último dia de protocolo (Fig. 6A). Isso se deve a heterogeneidade de pesos dentro dos grupos analisados, visto que, quando avaliado o ganho de peso por animal, os animais HFD obtiveram um maior ganho de peso já a partir dos 30 dias de dieta em relação ao grupo CTL (Fig. 6C). Em relação ao consumo alimentar, os animais Balb-c consumiram uma menor quantidade de ração e água (Fig. 6D e 6E). A dieta HFD é mais calórica, com isso esse comportamento alimentar refletiu uma mesma ingesta calórica entre os grupos (Fig. 6F).

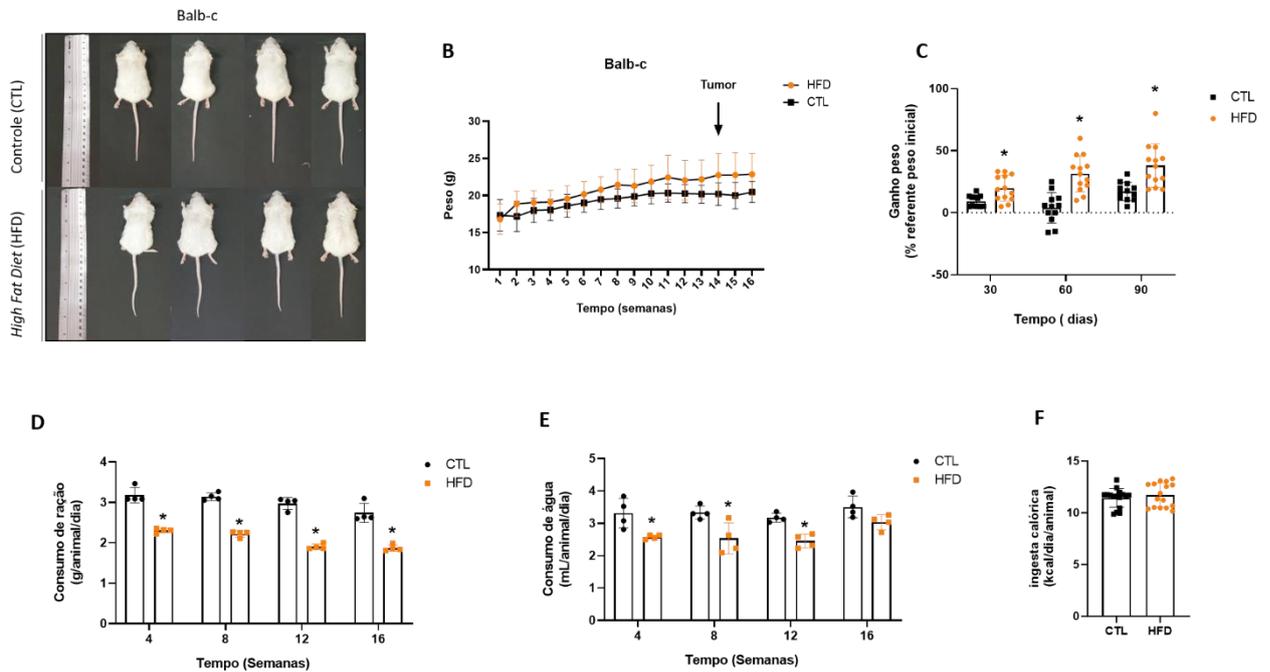


Figura 6. Variação do peso e consumo alimentar induzido pela dieta rica em gordura em camundongos Balb-c. Após 3 meses de dieta *high fat* (HFD) ou dieta padrão (CTL), os camundongos Balb-c receberam os implantes tumorais de células 4T1. (A) Imagem representativa dos camundongos dos grupos CTL e HFD fotografadas imediatamente antes da eutanásia, (B) acompanhamento do peso dos animais ao longo das 16 semanas de protocolo, (C) média de ganho de peso por animal em relação ao seu peso inicial. O consumo de ração e água foi mensurado duas vezes por semana ao longo de todo o protocolo. (D) Consumo de ração e (E) consumo de água. (F) ingestão calórica média (kcal/dia/animal) durante 16 semanas do protocolo. Os dados são representados como média \pm SD. Gráficos B, C e F possuem $n=13$. Gráficos D e E $n= 4$ onde cada n representa a média de consumo por animal durante uma semana. *Outliers* foram retirados através do teste de Grubbs. * $p < 0,05$, em comparação com o grupo controle após ANOVA de duas vias seguida pós teste Sidak (Gráficos B, C, D e E) ou Test T de Student (Gráfico F). CTL (grupo controle) e HFD (grupo alimentado com dieta *high fat*).

Os camundongos Swiss alimentados com dieta HFD obtiveram um maior peso corporal comparado ao grupo CTL (Fig. 7B-C) desde a segunda semana de dieta, sendo que ao fim do protocolo, os animais alimentados com dieta hiperlipídica obtiveram um peso corporal 56% maior do que os animais alimentados com dieta padrão (μ CTL = 44,18 g; μ HFD = 68,36 g). O padrão de consumo alimentar foi bastante semelhante ao observado nos camundongos Balb-c. Os animais Swiss do grupo HFD consumiram uma menor quantidade de ração e água do que o grupo CTL

(Fig. 7D-E), refletindo em uma ingestão calórica semelhante entre os grupos ao longo do protocolo.

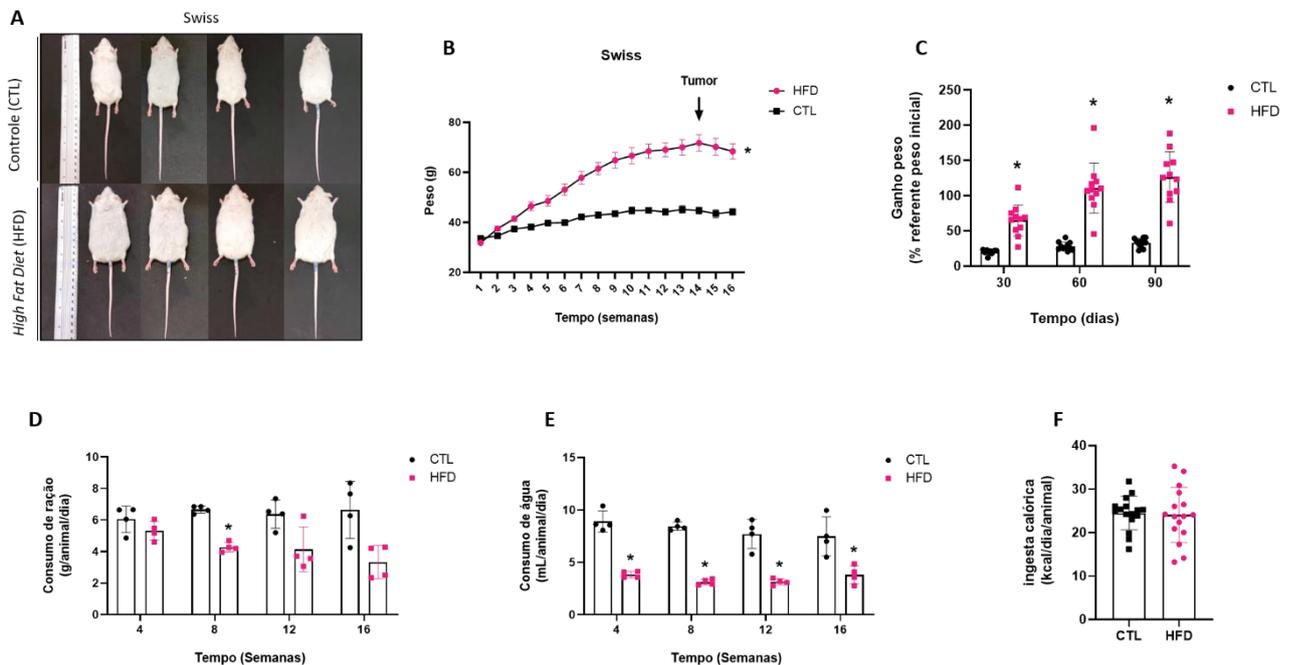


Figura 7. Variação do peso e consumo alimentar induzido pela dieta rica em gordura em camundongos Swiss. Após 3 meses de dieta *high fat* (HFD) ou dieta padrão (CTL), os camundongos Swiss receberam os implantes tumorais de células de Ehrlich. (A) Imagem representativa dos camundongos dos grupos CTL e HFD fotografadas imediatamente antes da eutanásia, (B) acompanhamento do peso dos animais ao longo das 16 semanas meses de protocolo, (C) média de ganho de peso por animal em relação ao seu peso inicial. O consumo de ração e água foi mensurado duas vezes por semana ao longo de todo o protocolo. (D) Consumo de ração e (E) consumo de água. (F) ingestão calórica média (kcal/dia/animal) durante 16 semanas do protocolo. Os dados são representados como média \pm SD. Gráficos B, C e F possuem $n=11$. Gráficos D e E $n=4$ onde cada n representa a média de consumo por animal durante uma semana. *Outliers* foram retirados através do teste de Grubbs. * $p < 0,05$, em comparação com o grupo controle após ANOVA de duas vias seguida pós teste Sidak (Gráficos B, C, D e E) ou Test T de Student (Gráfico F). CTL (grupo controle) e HFD (grupo alimentado com dieta *high fat*).

Após caracterizar os efeitos da dieta hiperlipídica sobre o perfil alimentar, analisamos a morfologia e o peso dos tecidos adiposo visceral (TAV) e hepático, como forma de confirmar o fenótipo tipo-obeso. Foi observado um acúmulo de tecido adiposo nos animais HFD de ambas as linhagens de camundongos (Fig. 8B e 8E). Além disso, tanto nos animais Balb-c quanto Swiss, a histologia do TAV revelou certos aglomerados de células circundando alguns adipócitos, sugerindo a presença de

coroas de macrófagos (CLS - *Crown like structure*), especialmente no grupo HFD (Fig. 8A-D). No entanto, é necessário quantificar a presença de CLSs para confirmar a maior frequência observada neste grupo.

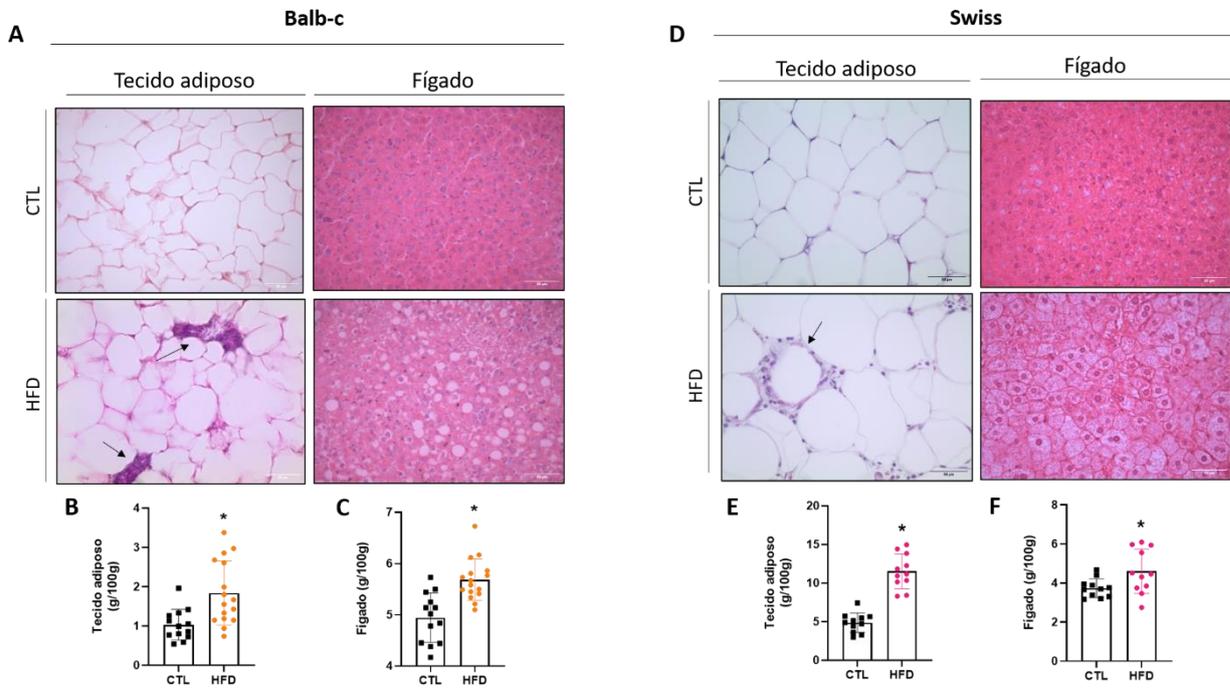


Figura 8. Caracterização do tecido adiposo e hepático. (A) Histologia representativa por H&E do tecido adiposo e hepático (B) peso do tecido adiposo visceral (retroperitoneal e perigonadal) e (C) peso do fígado dos camundongos Balb-c. (D) Histologia representativa por H&E do tecido adiposo e hepático (E) peso do tecido adiposo visceral (retroperitoneal e perigonadal) e (F) peso do fígado dos camundongos Swiss. Em A e D, as flechas pretas a localização de estruturas tipo CLS, barra de 50 μ m. Os dados são representados como média \pm SD. Balb-c (n=13); Swiss (n=11). * $p < 0,05$, em comparação com o grupo controle após Test T de Student.

Em relação ao tecido hepático, os animais Balb-c apresentaram um fígado com peso significativamente maior que o grupo controle (Fig. 8C), com a presença de macrovesículas de gorduras no citoplasma dos hepatócitos, indicando uma condição de esteatose hepática (Fig. 8A). Os animais Swiss alimentados com dieta hiperlipídica também apresentaram um fígado mais pesado que o grupo controle (Fig.8F), com a grande maioria dos hepatócitos apresentando várias microvesículas de gordura no citoplasma, também indicando uma esteatose hepática (Fig. 8A).

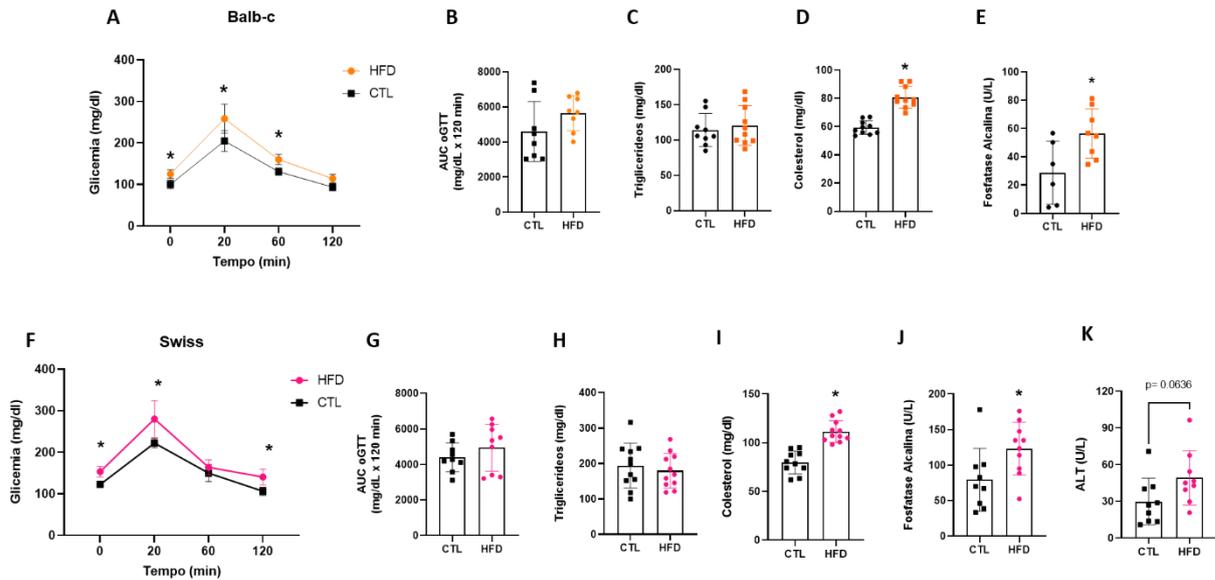


Figura 9. Efeitos da dieta hiperlipídica sobre a glicemia e metabolismo de lipídeos. (A e F) Glicemia durante oGTT e (A e F) área sob a curva de oGTT (B e G) dos animais Balb-c e Swiss, respectivamente. Níveis séricos de triglicerídeos (C e H), colesterol (D e I) e fosfatase alcalina (E e J) e alanina aminotransferase (K). Os gráficos em laranja (fileira de cima) são referentes aos animais Balb-c e os gráficos em rosa (fileira inferior) são referentes aos animais Swiss. Os dados são representados como média \pm SD. Balb-c (n=8); Swiss (n=9). * $p < 0,05$, em comparação com o grupo controle. (A e F) Foi utilizado ANOVA de duas vias, com pós teste de Sidak e Test T de Student para os demais gráficos.

No que se refere às alterações do metabolismo de glicose, tanto os animais Balb-c quanto Swiss obtiveram uma glicemia em jejum (tempo 0 da curva de glicemia) significativamente maior quando alimentados com dieta hiperlipídica, do que quando tratados com dieta padrão (Fig. 9A e 9F). Também, um maior pico glicêmico foi observado em ambas as linhagens alimentadas com dieta HFD nos primeiros minutos de teste (Fig. 9A e 9F). No entanto, a análise da área sob a curva (AUC) não revelou diferenças significativas entre os grupos (Fig. 9B e 9G). A respeito do metabolismo de lipídios, em ambas as linhagens de camundongos os níveis de triglicerídeos dos grupos HFD e CTL foram semelhantes, já a concentração de colesterol no sangue foi mais elevada nos animais HFD (Fig. 9D e 9I). Concluindo as análises bioquímicas, analisamos os níveis séricos da enzima fosfatase alcalina, produzida principalmente no fígado, que foram maiores nos animais do grupo HFD de ambas as linhagens de camundongos (Fig. 9E e 9J). Não conseguimos coletar muita amostra de sangue dos

animais Balb-c, por conta disso a análise da enzima alanina aminotransferase (ALT) foi realizada apenas nas amostras dos camundongos Swiss. Como resultado, a dieta HFD não promoveu alterações nos níveis séricos de ALT (Fig. 9K).

A partir dos dados obtidos até o momento, concluímos que a dieta hiperlipídica foi capaz de promover um fenótipo tipo-obeso nos camundongos Balb-c e Swiss, induzindo um aumento de adiposidade visceral, alterações na glicemia e colesterol, e o desenvolvimento de um quadro de esteatose hepática.

5.2 A DIETA HIPERLIPÍDICA PROMOVEU UM MAIOR CRESCIMENTO DE TUMORES HORMÔNIO INDEPENDENTES NOS CAMUNDONGOS BALB-C E SWISS

Para investigar os efeitos da dieta hiperlipídica no crescimento de tumores de mama hormônio-independentes, os camundongos Balb-c e Swiss foram alimentados com uma dieta rica em gordura por 12 semanas. Após esse período, as glândulas mamárias dos animais foram inoculadas com células tumorais, de modo a avaliar se alterações no microambiente tecidual da mama poderiam ser promotoras de crescimento tumoral.

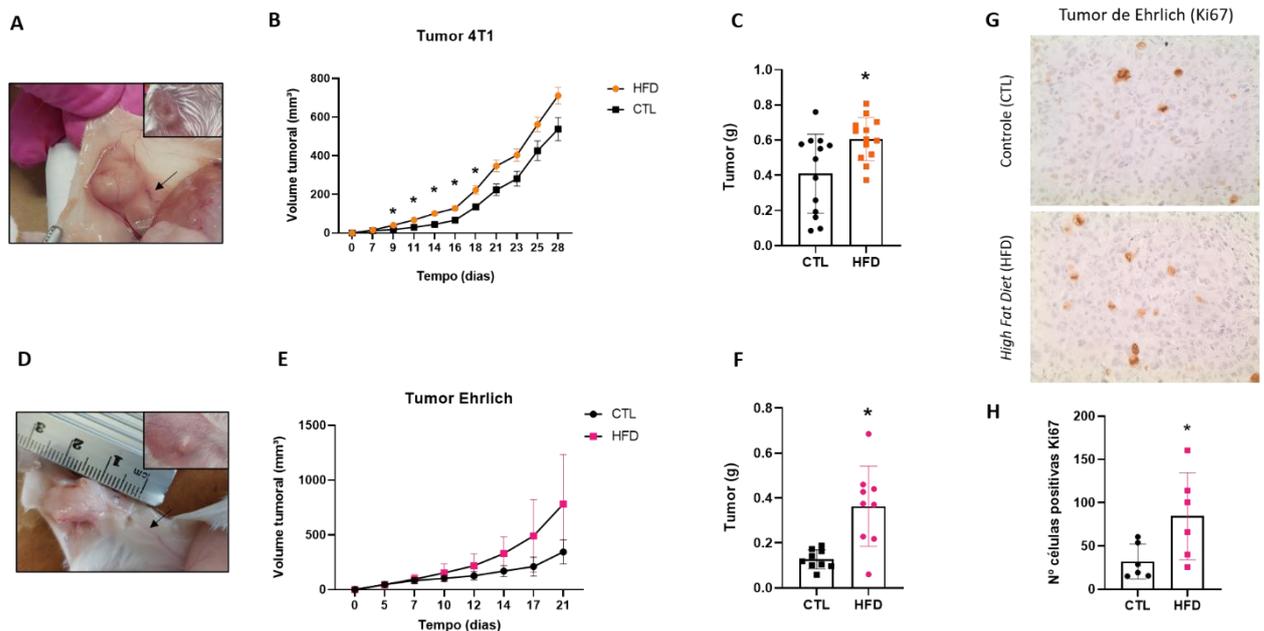


Figura 10. Impacto da dieta hiperlipídica sobre o crescimento tumoral. (A e D) Fotografias representativas dos tumores 4T1 e TSE. No canto superior direito encontra-se a foto externa do animal com foco no tumor em crescimento. A imagem maior mostra a massa tumoral desenvolvida na glândula mamária indicada pela seta preta. (B e E) Volume tumoral dos tumores de

mama 4T1 e tumor sólido de Ehrlich (TSE). (C) Peso dos tumores 4T1 e (F) Peso dos TSE. (G) IHC representativa da análise da proteína Ki67 nos TSE (aumento de 400x), (I) quantificação das células positivas para a marcação de Ki67(média da contagem de 8 campos/lâmina). Os dados são representados como média +/- SD. * $p < 0,05$, em comparação com o grupo controle. Gráficos B e C n=13. Gráficos E e F n=9. Gráfico H n=6. * $p < 0,05$, em comparação com o grupo controle após ANOVA de duas vias seguida pós teste Sidak (B e E) ou Test T de Student nos demais gráficos. CTL (grupo controle) e HFD (grupo alimentado com dieta *high fat*).

Uma das limitações desse trabalho foi a medição dos volumes tumorais. Utilizamos um paquímetro que nos permitiu mensurar dois diâmetros do tumor. No entanto, muitos dos tumores cresceram invadindo os tecidos profundos, o que dificultou a medição (Fig. 10B e 10E). Nos tumores de mama 4T1 conseguimos observar um maior volume tumoral no grupo HFD a partir da primeira semana, que não se mostrou mais significativo nas últimas medições (Fig. 10B). Já os tumores TSE obtiveram dados bastante heterogêneos e não foi possível observar alteração dos volumes tumorais em função da dieta ao longo do protocolo (Fig. 10E). Como forma de averiguar de forma mais precisa o efeito sobre o crescimento tumoral, ao fim do protocolo os tumores foram dissecados e pesados. A partir dessa medição, foi possível observar que os tumores de mama inoculados nos animais HFD tiveram mais peso em comparação com o grupo CTL, em ambas as linhagens de camundongo (Fig.10C e 10F). Dessa forma, os resultados acima demonstraram que a dieta hiperlipídica (HFD) promoveu um maior crescimento tumoral tanto no modelo de câncer de mama 4T1, quanto no tumor sólido de Ehrlich (TSE). Para avaliar a proliferação das células tumorais, foi realizada uma marcação por imuno-histoquímica da proteína Ki67 nos TSE (Fig. 10 G-H). Como quantificado na Figura 10H, os animais Swiss do grupo HFD apresentaram um maior número de células positivas para a marcação de Ki67 do que os animais do grupo controle.

5.3 IMPACTOS DO CONSUMO DE UMA DIETA HIPERLIPÍDICA SOBRE A GLÂNDULA MAMÁRIA DE CAMUNDONGOS BALB-C E SWISS

A glândula mamária é um órgão extremamente plástico que se mantém em desenvolvimento por grande parte da vida dos mamíferos (BISWAS et al., 2022; STERNLICHT, 2005). Como forma de avaliar os efeitos da dieta hiperlipídica sobre a mama dos camundongos Balb-c e Swiss, inicialmente realizamos uma análise

histológica com coloração de hematoxilina e eosina. Nos animais Balb-c observamos que o número de adipócitos, bem como o volume celular destas células, foi semelhante entre os grupos (Fig. 11B-C). Já na mama dos camundongos Swiss, a dieta HFD promoveu um acúmulo de tecido adiposo mamário (Fig. 11H), e uma diminuição do número de adipócitos, acompanhado por um aumento da área celular (Fig. 11 F-G). Como forma de analisar a expressão de macrófagos no tecido mamário, realizamos o RT-qPCR para o gene *Adgre1* (proteína F4/80), e observamos um aumento significativo deste transcrito nos animais do grupo HFD de ambas as linhagens analisadas (Fig. 11D e 11I).

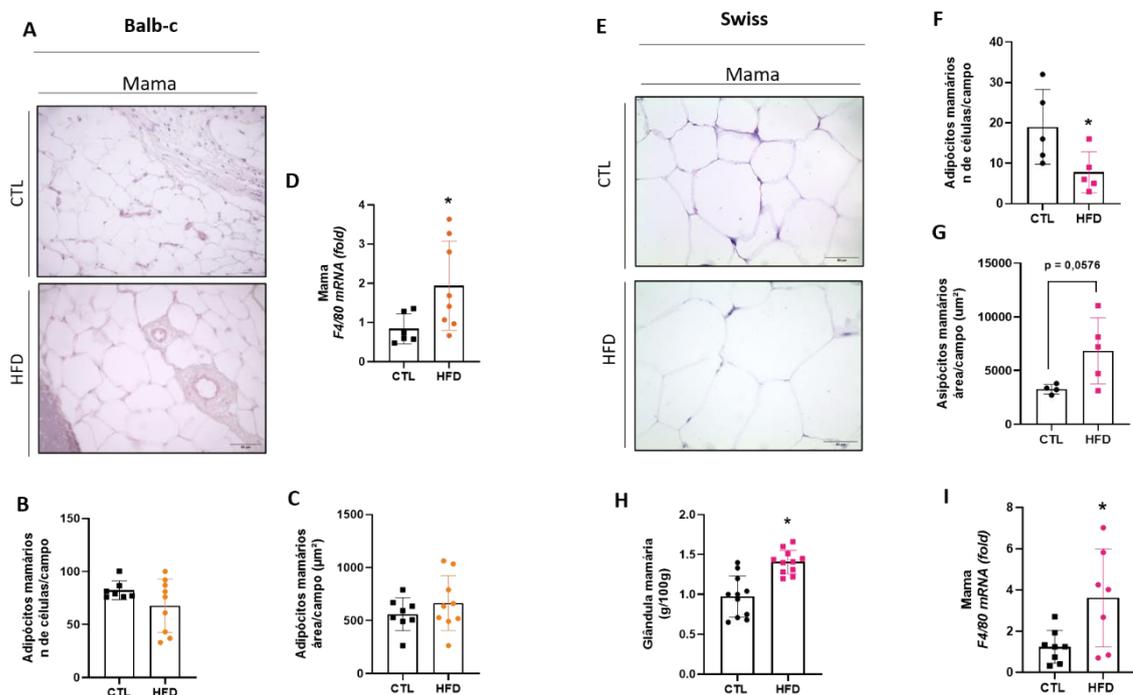


Figura 11. Caracterização do tecido mamário. (A e E) Histologia representativa por H&E do tecido mamário dos camundongos Balb-c e Swiss (B-C e F-G). Quantificação do número e área dos adipócitos mamários dos animais Balb-c e Swiss. A quantificação foi feita a partir da análise de 6 campos/lâmina. (H) Peso da glândula mamária dos animais Swiss. (D e I) RT-qPCR da proteína F4/80, marcadora de macrófagos dos animais Balb-c e Swiss. Os dados são representados como média +/- SD. Gráficos B, C, D e I n=8. Gráficos F e G n= 5 e gráfico H n=11, representando todos os animais dos grupos. *Outliers* foram retirados através do teste de Grubbs. * $p < 0,05$, em comparação com o grupo controle após Test T de Student.

Buscando investigar as alterações macromorfológicas da glândula mamária, realizamos uma análise “*whole mount*”, sendo esta uma coloração da glândula por inteiro. A primeira alteração observada foi em relação ao tamanho das glândulas

mamárias. Os animais de ambas as linhagens que consumiram uma dieta rica em gordura apresentaram glândulas mamárias maiores, o que pode ser observado nas imagens de menor aumento possível (0,22x), onde as extremidades do órgão não foram visíveis. Mais precisamente, nos animais Swiss essa alteração confirma o dado de pesagem do tecido adiposo mamário acima descrito (Fig 11H).

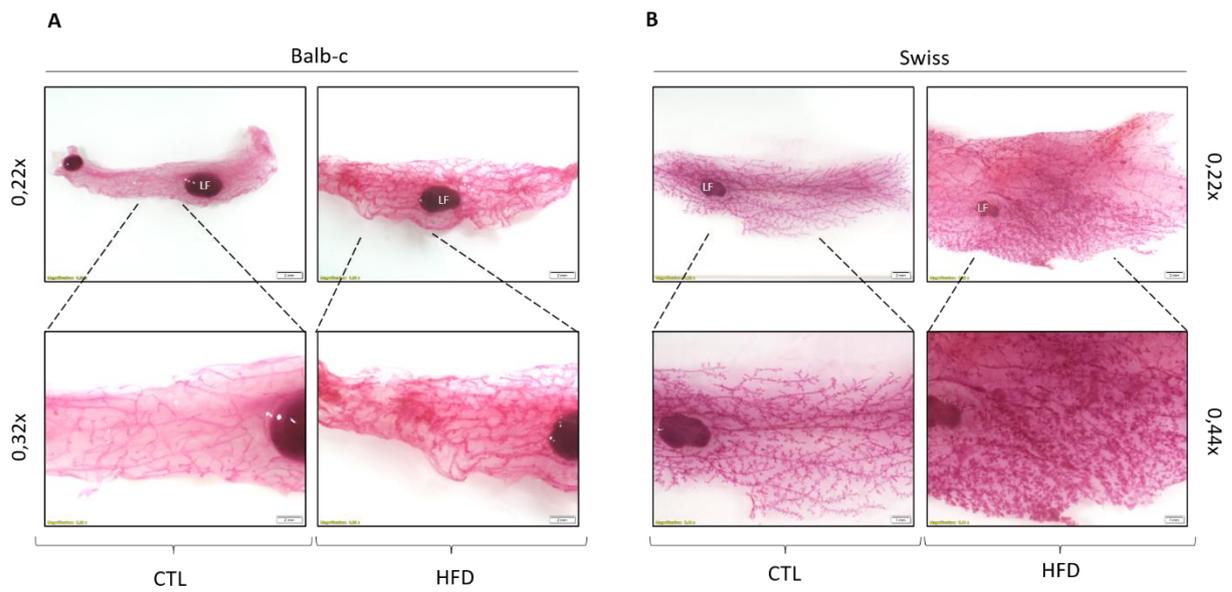


Figura 12. Coloração *whole mount* das glândulas mamárias. (A) Representação histológica das glândulas mamárias dos animais Balb-c do grupo CTL e HFD. (B) Representação histológica das glândulas mamárias dos animais Swiss do grupo CTL e HFD. LF = linfonodo. Imagens obtidas através do sistema de capturas de imagens CellSens Dimension 1.12 © acoplado ao Estereoscópio SZX16 © Olympus ©.

Nas glândulas mamárias dos animais Balb-c (Fig. 12A, Fig. Suplementar 1), conseguimos observar um maior número de ramificações dos ductos mamários no grupo HFD, evidenciada nas imagens com magnitude de 0,32x. Já nos camundongos Swiss, os animais do apresentaram glândulas mamárias com regiões hiperplásicas, principalmente na porção dos lóbulos localizados nas extremidades do tecido mamário (Fig. 12B, Fig. Suplementar 2). Esses resultados nos sugerem que a dieta rica em gordura alterou a morfologia das glândulas mamárias, gerando hiperplasia e aumentando a expressão gênica de macrófagos.

Baseados nos dados obtidos até então, questionamos se a massa tumoral e a modulação de seu microambiente poderiam alterar a morfologia das glândulas mamárias. Isso porque os resultados anteriores foram obtidos a partir de glândulas

contralaterais (GMC) às glândulas que receberam células tumorais (GMT). Para responder a essa pergunta, comparamos as glândulas mamárias GMC e GMT de animais Swiss alimentados com dieta rica em gordura e dieta padrão.

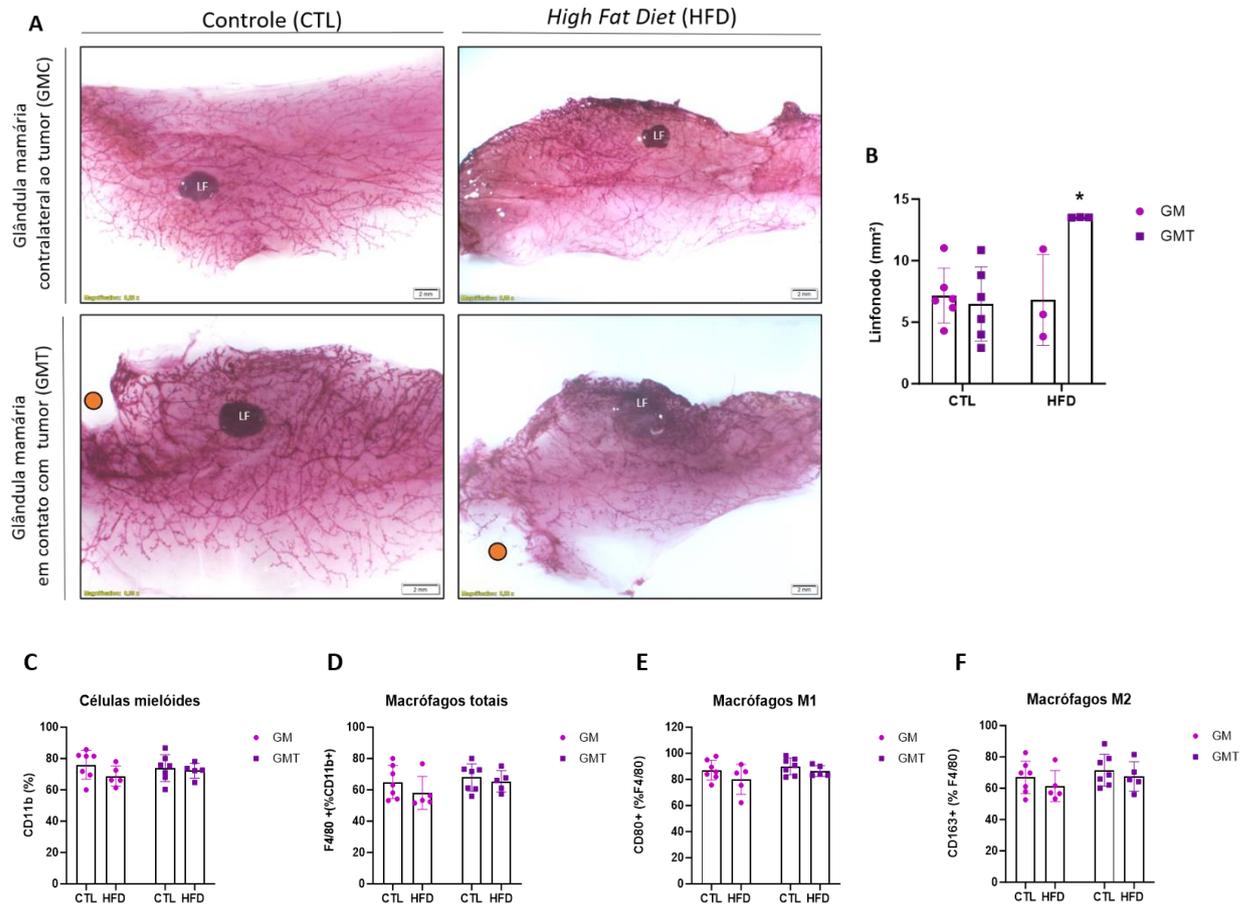


Figura 13. Efeitos da dieta hiperlipídica sobre as glândulas GMC e GMT de Swiss. (A) Representação histológica “Whole mount” das glândulas mamárias GMC e GMT. (B) Tamanho dos linfonodos (LF). (C-F) Quantificação das células imunes por citometria de fluxo (FACS) nos tecidos das glândulas mamárias GMC e GMT sem o linfonodo. Cada par de glândulas, GMC e GMT, são referentes ao mesmo animal. O círculo laranja indica a região onde estava a massa tumoral. (C) Células mielóides, (D) macrófagos totais, (E) macrófagos M1 e (F) macrófagos M2. Os dados são representados como média \pm SD. Gráfico B n= 3-6. O restante dos gráficos n= 7. Na análise de citometria de fluxo, algumas glândulas mamárias não foram contabilizadas devido ao baixo número de eventos finais. * $p < 0,05$, em comparação com o grupo controle após (B) Test T de Student ou (C-F) ANOVA de duas vias seguida pós teste Sidak. *Outliers* foram retirados através do teste de Grubbs. Imagens obtidas através do sistema de capturas de imagens CellSens Dimension 1.12 ® acoplado ao Estereoscópio SZX16 ® Olympus ®.

A partir das análises macromorfológicas das glândulas mamárias (Fig. 13A, Fig. Suplementar 3), foi possível observar que os animais do grupo controle obtiveram regiões hiperplásicas nas glândulas mamárias em contato com o tumor, o que não foi evidente nas suas glândulas contralaterais. Já nos animais HFD, a análise apenas qualitativa não nos permitiu verificar alterações evidentes no tecido mamário das glândulas GMC e GMT. Porém, ao verificar o tamanho do linfonodo foi possível observar que, no grupo HFD, o tamanho destas estruturas foi significativamente maior nas glândulas mamárias GMT do que nas GMC, indicando um aumento da atividade imunológica neste tecido (Fig.13B).

Por fim, para caracterizar a população de células imunes do tecido mamário, realizamos a análise por citometria de fluxo (FACS) dos marcadores de células mieloides gerais (CD11b), macrófagos (F4/80) e macrófagos M1 (CD80) e M2 (CD163), nas glândulas mamárias GMC e GMT. Os tecidos foram coletados e os linfonodos retirados, de modo a minimizar uma possível contaminação com células imunes linfonodais. Os resultados da análise demonstraram que as proporções destas populações celulares de origem mielóide foram semelhantes em todos os grupos (Fig. 13 C-F)

6. DISCUSSÃO

A obesidade é uma epidemia global, com prevalência crescente no Brasil, especialmente entre mulheres (ESTIVALETI et al., 2022). Essa condição é um importante fator de risco para o desenvolvimento de diversas doenças, incluindo o câncer de mama. A relação entre nutrição e câncer tem sido bem estabelecida, e estudos epidemiológicos têm demonstrado que a obesidade está associada a um aumento de 20 a 40% no risco de câncer de mama em mulheres pós-menopáusicas (MUNSELL et al., 2014; THAKKAR; SHIN; SUNG, 2022). Essa relação é bastante estudada no contexto de cânceres de mama hormônios positivos (SIMPSON; BROWN, 2013), porém os tumores hormônio independentes, principalmente os cânceres de mama triplo-negativos, são menos estudados no contexto da obesidade, e apresentam um desafio para clínica. Isso se deve a natureza mais agressiva desses tumores, e a falta de alvos moleculares específicos para um possível tratamento (GOURGUE et al., 2020).

Segundo recomendações da OMS (2023), o consumo diário de gordura deve ser inferior a 30% para evitar danos à saúde. Um dos modelos pré-clínicos de estudo para a obesidade é a ingestão de uma dieta hipercalórica por roedores (MARTINS et al., 2022). Os modelos de dieta são uma ferramenta eficaz para estudar as interações entre doenças e o ambiente em que elas ocorrem. Eles permitem identificar estímulos ambientais, como padrões alimentares por exemplo, que podem contribuir para o desenvolvimento da doença, além de mimetizar os mecanismos que promovem a obesidade e a síndrome metabólica em humanos. (FUCHS et al., 2018). A partir disso, neste trabalho desenvolvemos uma ração hiperlipídica (40% de gordura), sendo 35% proveniente da banha de porco, a qual ofertamos a duas linhagens de camundongos: Balb-c e Swiss.

Ao longo do protocolo de dieta, devido a heterogeneidade de pesos dos animais, não foi possível observar uma diferença significativa na média de peso entre os grupos HFD e CTL. No entanto, quando analisamos o ganho de peso dos animais, comparando o seu peso ao longo do tratamento com seu peso inicial, foi possível observar um maior ganho de peso no grupo HFD. Os animais Balb-c possuem uma maior resistência a obesidade induzida por dietas (RODRIGUEZ-NUNEZ et al., 2017). Dependendo do tempo de tratamento e da porcentagem de gordura da dieta hiperlipídica, resultados distintos são encontrados na literatura. Animais Balb-c

alimentados com uma dieta contendo 53% kcal provenientes de gordura por 10 semanas, não demonstraram um maior peso corporal quando comparados aos animais CTL (LI et al., 2020). Já camundongos Balb-c que receberam uma dieta com 35% de gordura por 16 semanas, apresentaram um ganho de peso significativo (EVANGELISTA et al., 2019). A linhagem Swiss é menos representada em estudos de obesidade. No entanto, esses camundongos também são metabolicamente sensíveis a dieta hiperlipídica, e desenvolvem obesidade e resistência à insulina (FREDIANI BRANT et al., 2014; SIKDER et al., 2014). A partir do consumo da nossa dieta *high fat*, os animais Swiss apresentaram um acentuado ganho de peso. Em um estudo de Marei e colaboradores, animais Swiss alimentados com uma dieta contendo 60% kcal provenientes gordura também tiveram um maior ganho de peso em comparação ao grupo controle (MAREI et al., 2020).

Seguindo com a avaliação de características obesogênicas, provocadas pela ração produzida em nosso laboratório, observamos que tanto os animais Balb-c quanto Swiss submetidos a dieta *high fat*, desenvolveram alterações no metabolismo de lipídeos e da glicose. Mais precisamente, os animais do grupo HFD apresentaram níveis de adiposidade aumentado, alterações de glicemia e colesterol, típicas de síndrome metabólica. Estudos clínicos mostram que a obesidade é uma condição multifatorial, caracterizada não apenas por um aumento no peso corporal ou no IMC, mas também por alterações no tecido adiposo, nos parâmetros metabólicos, inflamatórios e hormonais (IYENGAR et al., 2017). Uma das consequências do consumo de uma dieta com alto teor de gordura animal é o aumento nos níveis de glicose e esteatose hepática (SHI et al., 2009), o que foi observado em nosso modelo, nos animais alimentados com dieta HFD em ambas as linhagens de camundongo analisadas. Ainda, os animais do grupo HFD apresentaram um aumento significativo da enzima fosfatase alcalina (FA), indicadora de dano hepático. Embora não tão seletiva quanto as transaminases, estudos em humanos mostram que a FA pode ser utilizada como preditor de fibrose hepática em indivíduos obesos (ALI et al., 2021; KOCABAY et al., 2011).

Como visto acima, a dieta *high fat* promoveu um acúmulo de gordura visceral e alterações metabólicas, levando ao desenvolvimento do fenótipo tipo-obeso. Um dos objetivos do nosso estudo foi caracterizar as alterações causadas pela obesidade no desenvolvimento da glândula mamária, e na progressão do câncer neste local. Para isso, utilizamos duas linhagens de camundongos diferentes. O modelo de

carcinogênese mamária de células 4T1, um tumor de mama triplo-negativo, foi desenvolvido nos animais Balb-b. Já os animais Swiss, desenvolveram o tumor sólido de Ehrlich, câncer de mama classificado como hormônio-independente devido aos baixos níveis de receptor de estrogênio (AYDINER et al., 1997; FEITOSA et al., 2021). As células tumorais implantadas são provenientes de suas respectivas linhagens, ou seja, as células 4T1 foram originadas em animais Balb-c, e o tumor de Ehrlich em tumores de camundongos Swiss. Embora ambos os tumores sejam caracterizados como hormônio-independentes, o perfil mutacional das linhagens é diferente. A utilização de múltiplos modelos experimentais é uma abordagem reconhecida para obter uma compreensão mais abrangente dos fenômenos relacionados ao câncer, possibilitando estender os resultados para além de condições específicas.

Em ambos os modelos de carcinogênese, a dieta *high fat* foi capaz de promover um maior crescimento tumoral. Esses dados vão de acordo com os achados de Evangelista e colaboradores, onde animais Balb-c alimentados com uma dieta composta por 35% de gordura, obtiveram um maior crescimento de tumores de carcinoma mamário 4T1 (EVANGELISTA et al., 2019). A elaboração de um protocolo de obesidade induzida por dieta, seguido pelo desenvolvimento do tumor sólido de Ehrlich foi uma novidade no nosso estudo. A partir desse contexto, observamos um maior crescimento dos TSE, correlacionados positivamente a marcação de Ki67 nos tumores, indicando que o microambiente mamário induzido pela HFD possivelmente promove proliferação celular. Em um modelo utilizando ratos Zucker, o contexto obesogênico gerou uma maior proporção de tumores RE-negativo quando comparado aos ratos normoponderais (HAKKAK et al., 2007).

Dentre os mecanismos correlacionados ao maior desenvolvimento de tumores TNBC em mulheres obesas do que não-obesas, destacam-se o acúmulo de citocinas pro-inflamatórias e o envolvimento de macrófagos no tecido adiposo mamário (TIWARI et al., 2019). De fato, entre nossos achados observamos não só uma hiperplasia/hipertrofia dos adipócitos mamários nos animais Swiss, como também uma maior expressão de F4/80, clássico marcador de macrófagos, em ambas as linhagens de camundongos analisadas. O aumento de volume e número dos adipócitos também acaba favorecendo um ambiente de hipóxia, que já foi identificado como um fator crítico na promoção de células-tronco cancerígenas, e na ativação de vias associadas a migração e metástase (YU et al., 2024).

Apesar de os carcinomas mamários 4T1 e os TSE possuírem baixas concentração de RE do tipo alfa, o papel do estrogênio não pode ser totalmente descartado. Isso por que atualmente sabe-se que mesmo os TNBC não são completamente insensíveis a esse hormônio, seja pelo acoplamento dele a receptores secundário nas células tumorais, ou pela ação do estrogênio em células do microambiente tumoral (TREECK; SCHÜLER-TOPRAK; ORTMANN, 2020; VAN BARELE et al., 2021). Um experimento de crescimento 4T1 em animais ovariectomizados, ou tratados com inibidores da aromatase, e expostos à HFD poderia ajudar a avaliar a contribuição dos estrógenos no modelo triplo-negativo.

O período da puberdade no desenvolvimento da glândula mamária parece ser uma “janela temporal” importante no contexto de maior susceptibilidade ao câncer, quando relacionado a fatores de estilo de vida como alimentação (KRISANITS et al., 2020). De fato, nosso estudo indicou que camundongos alimentados com uma dieta rica em gordura desde a puberdade, apresentaram hiperplasia mamária na idade adulta. Além de uma maior proliferação dos lóbulos mamários, vistos principalmente nos animais Swiss, em ambas as linhagens de camundongos encontramos uma maior bifurcação dos ductos mamários em ramos secundários e terciários que ainda precisam ser quantificados. Estudos em roedores têm explorado o impacto da dieta rica em gordura no desenvolvimento da glândula mamária. No entanto, os resultados desses estudos nem sempre são consistentes, o que pode estar relacionado à linhagem de camundongos utilizada. Animais C57BL/6 alimentados com dieta *high fat* (60% kcal proveniente de gordura) apresentaram uma maior adiposidade da glândula mamária, porém com uma árvore de ductos mais espaçada e com uma menor quantidade de botões alveolares terminais (TEBs) (OLSON et al., 2010). Já camundongos Balb-c alimentados com uma dieta de mesma proporção de gordura (60% kcal de gordura), apresentaram um maior número de ductos e botões terminais, o que vai ao encontro com os nossos achados (ZHU et al., 2017). Essa hiperplasia reflete uma região com maior número de divisões celulares, o que pode facilitar o processo de tumorigênese.

Em nosso estudo, demonstramos que animais Swiss alimentados com dieta rica em gordura apresentam áreas hiperplásicas na glândula mamária. Como forma de analisar os efeitos do microambiente tumoral sobre o desenvolvimento mamário, analisamos as glândulas mamárias em contato com o tumor de Ehrlich (GMT). Em relação a árvores de ductos, as análises qualitativas das glândulas mamárias GMC e GMT dos camundongos obesos se mostraram semelhantes, assim como a

porcentagem de células mieloides analisadas por citometria de fluxo. No entanto, ao mensurar os linfonodos mamários, foi possível encontrar um aumento significativo dessas estruturas nas glândulas GMT dos animais alimentados com dieta *high fat*. Feitosa e colaboradores compilaram estudos sobre a resposta imunológica durante a carcinogênese dos tumores de Ehrlich. Os achados indicam uma maior expressão de células CD4, CD8 e neutrófilos (FEITOSA et al., 2021). Ademais, sabe-se que a obesidade é capaz de promover o acúmulo de macrófagos CCR7+ e células dendríticas no tecido adiposo próximo aos gânglios linfáticos (HELLMANN et al., 2016). Pela capacidade dos linfonodos em geral de drenar células imunes, hipotetizamos que seja possível uma maior concentração dessas células nessa região, o que se reflete no aumento da estrutura. Durante o processo de metastização, os tecidos para os quais as células tumorais se disseminam, primeiramente, são os linfonodos que drenam a glândula mamária (TO; ISAAC; ANDRECHEK, 2020). Logo, a dieta *high fat* pode ter induzido uma migração de células tumorais para esta estrutura. No entanto, mais análises precisam ser realizadas, principalmente dos linfonodos mamários individualmente, para que a população de células dessa estrutura seja de fato caracterizada.

O presente estudo apresenta limitações importantes de serem pontuadas. Os modelos de implantes de células tumorais malignas não contemplam todas as etapas da carcinogênese (sem iniciação). Isso torna as células mais autônomas e de difícil estimulação. Além disso, tumores implantados não formam um estroma tão complexo como outros modelos de carcinogênese (GÓMEZ-CUADRADO et al., 2017; MORTON; HOUGHTON, 2007). Para melhor caracterizar o tecido mamário, temos como perspectivas analisar marcadores de proliferação na mama, assim como a avaliar citocinas inflamatórias, que auxiliaria a compreender o perfil inflamatório do tecido mamário.

7. CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou que a dieta com alto teor de gordura (35% proveniente de banha) foi capaz de promover o fenótipo tipo-obeso nos camundongos Balb-c e Swiss, caracterizado principalmente pelo acúmulo de gordura visceral e quadro de esteatose hepática. A obesidade induzida pela dieta também favoreceu a tumorigênese mamária, promovendo um maior crescimento dos tumores de mama 4T1 e tumores sólidos de Ehrlich. Em ambas as linhagens de camundongos analisadas, a dieta HFD também promoveu um acúmulo de tecido adiposo nas glândulas mamárias, bem como uma maior proliferação celular, visualizada principalmente em lóbulos mamários hiperplásicos. Uma maior expressão do marcador F4/80 foi observado na mama dos camundongos alimentados com dieta HFD, embora sem uma aparente expansão das populações mioeloides no tecido mamário dos animais Swiss. Os dados deste estudo sugerem que o modelo de tumores sólidos de Ehrlich em camundongos Swiss é um modelo eficiente para o estudo da obesidade e do câncer de mama, demonstrando que a dieta HFD promoveu alterações sobre o infiltrado imune das glândulas mamárias que precisam ser melhor elucidados.

REFERÊNCIAS

ALCALÁ, M. et al. Increased inflammation, oxidative stress and mitochondrial respiration in brown adipose tissue from obese mice. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 16082, 22 nov. 2017.

- ALI, A. H. et al. A Model Incorporating Serum Alkaline Phosphatase for Prediction of Liver Fibrosis in Adults with Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 15, p. 3311, jan. 2021.
- ANDERSON, K. N.; SCHWAB, R. B.; MARTINEZ, M. E. Reproductive Risk Factors and Breast Cancer Subtypes: A Review of the Literature. **Breast cancer research and treatment**, v. 144, n. 1, p. 1–10, fev. 2014.
- AYDINER, A. et al. Combined effects of epirubicin and tamoxifen on the cell-cycle phases in estrogen-receptor-negative Ehrlich ascites tumor cells. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 123, n. 2, p. 113–117, 1997.
- BASU, A. DNA Damage, Mutagenesis and Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 4, p. 970, 23 mar. 2018.
- BENEDÉ-UBIETO, R. et al. Guidelines and Considerations for Metabolic Tolerance Tests in Mice. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v. 13, p. 439–450, 18 fev. 2020.
- BISWAS, S. K. et al. The Mammary Gland: Basic Structure and Molecular Signaling during Development. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 7, p. 3883, 31 mar. 2022.
- 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 Research and Treatment**, v. 149, n. 1, p. 49–57, jan. 2015.
- BRUST, V.; SCHINDLER, P. M.; LEWEJOHANN, L. Lifetime development of behavioural phenotype in the house mouse (*Mus musculus*). **Frontiers in Zoology**, v. 12, n. 1, p. S17, 24 ago. 2015.
- CASTOLDI, A. et al. The Macrophage Switch in Obesity Development. **Frontiers in Immunology**, v. 6, p. 637, 2015.
- CERHAN, J. R. et al. A Pooled Analysis of Waist Circumference and Mortality in 650,000 Adults. **Mayo Clinic proceedings**, v. 89, n. 3, p. 335–345, mar. 2014.
- COLLELUORI, G. et al. Mammary gland adipocytes in lactation cycle, obesity and breast cancer. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 22, n. 2, p. 241–255, 1 jun. 2021.
- CRUZ-BERMÚDEZ, A. et al. The Role of Metabolism in Tumor Immune Evasion: Novel Approaches to Improve Immunotherapy. **Biomedicines**, v. 9, n. 4, p. 361, 31 mar. 2021.
- DAI, X. et al. Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. **Journal of Cancer**, v. 7, n. 10, p. 1281–1294, 2016.
- DANAEI, G. et al. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. **Lancet (London, England)**, v. 366, n. 9499, p. 1784–1793, 19 nov. 2005.

- DAVIS, A. A.; KAKLAMANI, V. G. Metabolic Syndrome and Triple-Negative Breast Cancer: A New Paradigm. **International Journal of Breast Cancer**, v. 2012, p. e809291, 15 out. 2011.
- DONTU, G.; INCE, T. A. Of Mice and Women: A Comparative Tissue Biology Perspective of Breast Stem Cells and Differentiation. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 20, n. 1–2, p. 51–62, 2015.
- ESTIVALETI, J. M. et al. Time trends and projected obesity epidemic in Brazilian adults between 2006 and 2030. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 12699, 26 jul. 2022.
- EVANGELISTA, G. C. M. et al. 4T1 Mammary Carcinoma Colonization of Metastatic Niches Is Accelerated by Obesity. **Frontiers in Oncology**, v. 9, p. 685, 20 set. 2019.
- FEITOSA, I. B. et al. What are the immune responses during the growth of Ehrlich's tumor in ascitic and solid form? **Life Sciences**, v. 264, p. 118578, 1 jan. 2021.
- FENG, Y. et al. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. **Genes & Diseases**, v. 5, n. 2, p. 77, jun. 2018.
- FLURKEY, K.; MCURRER, J.; HARRISON, D. Mouse Models in Aging Research. Em: **The Mouse in Biomedical Research**. [s.l.] Elsevier, 2007. v. IIIp. 637–672.
- FREDIANI BRANT, N. M. et al. Cardiovascular protective effects of *Casearia sylvestris* Swartz in Swiss and C57BL/6 LDLr-null mice undergoing high fat diet. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 154, n. 2, p. 419–427, 11 jun. 2014.
- FUCHS, T. et al. Animal models in metabolic syndrome. **Revista Do Colegio Brasileiro De Cirurgioes**, v. 45, n. 5, p. e1975, 29 out. 2018.
- FUSTER, J. J. et al. Obesity-induced Changes in Adipose Tissue Microenvironment and Their Impact on Cardiovascular Disease. **Circulation research**, v. 118, n. 11, p. 1786–1807, 27 maio 2016.
- GÓMEZ-CUADRADO, L. et al. Mouse models of metastasis: progress and prospects. **Disease Models & Mechanisms**, v. 10, n. 9, p. 1061–1074, 1 set. 2017.
- GONÇALVES, R. M. et al. COX-2 promotes mammary adipose tissue inflammation, local estrogen biosynthesis, and carcinogenesis in high-sugar/fat diet treated mice. **Cancer Letters**, v. 502, p. 44–57, 1 abr. 2021.
- GONZÁLEZ-MUNIESA, P. et al. Obesity. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 1, p. 1–18, 15 jun. 2017.
- GOURGUE, F. et al. Obesity and triple-negative-breast-cancer: Is apelin a new key target? **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 24, n. 17, p. 10233–10244, set. 2020.
- GUZIK, T. J. et al. The role of infiltrating immune cells in dysfunctional adipose tissue. **Cardiovascular Research**, v. 113, n. 9, p. 1009–1023, jul. 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, 2007.

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31–46, jan. 2022a.

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31–46, 12 jan. 2022b.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 7 jan. 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 4 mar. 2011.

HARBORG, S. et al. Obesity and Risk of Recurrence in Patients With Breast Cancer Treated With Aromatase Inhibitors. **JAMA Network Open**, v. 6, n. 10, p. e2337780, 13 out. 2023.

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, p. 45–52, jul. 2011.

HARVIE, M.; HOOPER, L.; HOWELL, A. H. Central obesity and breast cancer risk: a systematic review. **Obesity Reviews: An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 4, n. 3, p. 157–173, ago. 2003.

HARVIE, M.; HOWELL, A.; EVANS, D. G. Can diet and lifestyle prevent breast cancer: what is the evidence? **American Society of Clinical Oncology Educational Book. American Society of Clinical Oncology. Annual Meeting**, p. e66-73, 2015.

HELLMANN, J. et al. CCR7 Maintains Nonresolving Lymph Node and Adipose Inflammation in Obesity. **Diabetes**, v. 65, n. 8, p. 2268–2281, ago. 2016.

HERZ, C. T. et al. Active Brown Adipose Tissue is Associated With a Healthier Metabolic Phenotype in Obesity. **Diabetes**, p. db210475, 18 out. 2021.

IYENGAR, N. M. et al. Metabolic Obesity, Adipose Inflammation and Elevated Breast Aromatase in Women with Normal Body Mass Index. **Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)**, v. 10, n. 4, p. 235–243, abr. 2017.

JARDÉ, T. et al. Molecular mechanisms of leptin and adiponectin in breast cancer. **European Journal of Cancer**, v. 47, n. 1, p. 33–43, 1 jan. 2011.

JIRALERSPONG, S.; GOODWIN, P. J. Obesity and Breast Cancer Prognosis: Evidence, Challenges, and Opportunities. **Journal of Clinical Oncology**, v. 34, n. 35, p. 4203–4216, 10 dez. 2016.

KASTAN, M. B.; BARTEK, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 316–323, 18 nov. 2004.

KHALIL, R.; DIAB-ASSAF, M.; LEMAITRE, J.-M. Emerging Therapeutic Approaches to Target the Dark Side of Senescent Cells: New Hopes to Treat Aging as a Disease and to Delay Age-Related Pathologies. **Cells**, v. 12, n. 6, p. 915, jan. 2023.

KOBOLDT, D. C. et al. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 490, n. 7418, p. 61–70, out. 2012.

KOCABAY, G. et al. Alkaline phosphatase: can it be considered as an indicator of liver fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis with type 2 diabetes? **Bratislavske Lekarske Listy**, v. 112, n. 11, p. 626–629, 2011.

KORN, A. R. et al. The 2018 World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research Score and Cancer Risk: A Longitudinal Analysis in the NIH-AARP Diet and Health Study. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 31, n. 10, p. 1983–1992, 4 out. 2022.

KRISANITS, B. et al. Chapter Three - Pubertal mammary development as a “susceptibility window” for breast cancer disparity. Em: FORD, M. E.; ESNAOLA, N. F.; SALLEY, J. D. (Eds.). **Advances in Cancer Research**. Cancer Health Equity Research. [s.l.] Academic Press, 2020. v. 146p. 57–82.

KUSMINSKI, C. M.; BICKEL, P. E.; SCHERER, P. E. Targeting adipose tissue in the treatment of obesity-associated diabetes. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 15, n. 9, p. 639–660, set. 2016.

LEE, C. M.; FANG, S. Fat Biology in Triple-Negative Breast Cancer: Immune Regulation, Fibrosis, and Senescence. **Journal of Obesity & Metabolic Syndrome**, v. 32, n. 4, p. 312–321, 30 dez. 2023.

LEE, J. J. et al. Prediction of android and gynoid body adiposity via a three-dimensional stereovision body imaging system and dual-energy x-ray absorptiometry. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 34, n. 5, p. 367–377, 2015.

LERO, M. W.; SHAW, L. M. Diversity of insulin and IGF signaling in breast cancer: implications for therapy. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 527, p. 111213, 1 maio 2021.

LI, J. et al. High fat diet induced obesity model using four strains of mice: Kunming, C57BL/6, BALB/c and ICR. **Experimental Animals**, v. 69, n. 3, p. 326–335, 5 ago. 2020.

LINGOHR, M. K.; BUETTNER, R.; RHODES, C. J. Pancreatic beta-cell growth and survival--a role in obesity-linked type 2 diabetes? **Trends in Molecular Medicine**, v. 8, n. 8, p. 375–384, ago. 2002.

LIU, X. et al. An update on brown adipose tissue and obesity intervention: Function, regulation and therapeutic implications. **Frontiers in Endocrinology**, v. 13, p. 1065263, 2022.

LOHMANN, A. E. et al. Association of Obesity With Breast Cancer Outcome in Relation to Cancer Subtypes: A Meta-Analysis. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 113, n. 11, p. 1465–1475, 1 nov. 2021.

LOURENÇO, B.; QUEIROZ, L. B. Crescimento e desenvolvimento puberal na adolescência. **Revista de Medicina**, v. 89, n. 2, p. 70–75, 19 jun. 2010.

LUTZ, T. A.; WOODS, S. C. Overview of Animal Models of Obesity. **Current protocols in pharmacology / editorial board, S.J. Enna (editor-in-chief) ... [et al.]**, v. CHAPTER, p. Unit5.61, set. 2012.

MAREI, W. F. A. et al. Differential effects of high fat diet-induced obesity on oocyte mitochondrial functions in inbred and outbred mice. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 9806, 17 jun. 2020.

MARTINS, T. et al. Murine Models of Obesity. **Obesities**, v. 2, n. 2, p. 127–147, jun. 2022.

MCTIERNAN, A. et al. Relation of BMI and physical activity to sex hormones in postmenopausal women. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 14, n. 9, p. 1662–1677, set. 2006.

MIZIAK, P. et al. Estrogen Receptor Signaling in Breast Cancer. **Cancers**, v. 15, n. 19, p. 4689, 23 set. 2023.

MOIZÉ, V. L. et al. Nutritional pyramid for post-gastric bypass patients. **Obesity Surgery**, v. 20, n. 8, p. 1133–1141, ago. 2010.

MORTON, C. L.; HOUGHTON, P. J. Establishment of human tumor xenografts in immunodeficient mice. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 247–250, fev. 2007.

MUNSELL, M. F. et al. Body Mass Index and Breast Cancer Risk According to Postmenopausal Estrogen-Progestin Use and Hormone Receptor Status. **Epidemiologic Reviews**, v. 36, n. 1, p. 114–136, 2014.

OKOSUN, I. S.; SEALE, J. P.; LYN, R. Commingling effect of gynoid and android fat patterns on cardiometabolic dysregulation in normal weight American adults. **Nutrition & Diabetes**, v. 5, n. 5, p. e155, maio 2015.

OLSON, L. K. et al. Pubertal Exposure to High Fat Diet Causes Mouse Strain-dependent Alterations in Mammary Gland Development and Estrogen Responsiveness. **International journal of obesity (2005)**, v. 34, n. 9, p. 1415–1426, set. 2010.

OUCHI, N. et al. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nature Reviews. Immunology**, v. 11, n. 2, p. 85–97, fev. 2011.

PAINE, I. S.; LEWIS, M. T. The Terminal End Bud: the Little Engine that Could. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 22, n. 2, p. 93–108, 1 jun. 2017.

PALERMO-NETO, J.; DE OLIVEIRA MASSOCO, C.; ROBESPIERRE DE SOUZA, W. 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, fev. 2003.

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, 10 mar. 2009.

PRAT, A.; PEROU, C. M. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. **Molecular Oncology**, v. 5, n. 1, p. 5–23, fev. 2011.

PULASKI, B. A.; OSTRAND-ROSENBERG, S. Mouse 4T1 breast tumor model. **Current Protocols in Immunology**, v. Chapter 20, p. Unit 20.2, maio 2001.

RAFACHO, A. et al. Dexamethasone-induced insulin resistance is associated with increased connexin 36 mRNA and protein expression in pancreatic rat islets. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 85, n. 5, p. 536–545, maio 2007.

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. 1, p. 7956, 28 maio 2019.

RENDIMENTO, I. C. DE T. E (ED.). **Pesquisa Nacional de Saúde**. Rio de Janeiro, RJ: Ibmge, 2021.

RICHERT, M. et al. An Atlas of Mouse Mammary Gland Development. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v. 5, p. 227–41, 1 maio 2000.

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, 5 dez. 2017.

RODRIGUEZ-NUNEZ, I. et al. Nod2 and Nod2-regulated microbiota protect BALB/c mice from diet-induced obesity and metabolic dysfunction. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 548, 3 abr. 2017.

SAHAKYAN, K. R. et al. Normal Weight Central Obesity: Implications for Total and Cardiovascular Mortality. **Annals of internal medicine**, v. 163, n. 11, p. 827–835, 1 dez. 2015.

SAKERS, A. et al. Adipose-tissue plasticity in health and disease. **Cell**, v. 185, n. 3, p. 419–446, 3 fev. 2022.

SAVOLAINEN-PELTONEN, H. et al. Breast adipose tissue estrogen metabolism in postmenopausal women with or without breast cancer. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 99, n. 12, p. E2661-2667, dez. 2014.

SIKDER, K. et al. Quercetin and beta-sitosterol prevent high fat diet induced dyslipidemia and hepatotoxicity in Swiss albino mice. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 52, n. 1, p. 60–66, jan. 2014.

SIMPSON, E. R.; BROWN, K. A. Obesity and breast cancer: role of inflammation and aromatase. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 51, n. 3, p. T51-59, dez. 2013.

STERNLICHT, M. D. Key stages in mammary gland development: The cues that regulate ductal branching morphogenesis. **Breast Cancer Research**, v. 8, n. 1, p. 201, 5 dez. 2005.

THAKKAR, N.; SHIN, Y. B.; SUNG, H.-K. Nutritional Regulation of Mammary Tumor Microenvironment. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 10, p. 803280, 2 fev. 2022.

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, 3 jun. 2019.

TO, B.; ISAAC, D.; ANDRECHEK, E. R. Studying Lymphatic Metastasis in Breast Cancer: Current Models, Strategies, and Clinical Perspectives. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 25, n. 3, p. 191–203, set. 2020.

TODORČEVIĆ, M. et al. Markers of adipose tissue hypoxia are elevated in subcutaneous adipose tissue of severely obese patients with obesity hypoventilation syndrome but not in the moderately obese. **International Journal of Obesity (2005)**, v. 45, n. 7, p. 1618–1622, jul. 2021.

TREECK, O.; SCHÜLER-TOPRAK, S.; ORTMANN, O. Estrogen Actions in Triple-Negative Breast Cancer. **Cells**, v. 9, n. 11, p. E2358, 26 out. 2020.

VAN BARELE, M. et al. Estrogens and Progestogens in Triple Negative Breast Cancer: Do They Harm? **Cancers**, v. 13, n. 11, p. 2506, 21 maio 2021.

WESTON, A.; HARRIS, C. C. Multistage Carcinogenesis. Em: **Holland-Frei Cancer Medicine. 6th edition**. [s.l.] BC Decker, 2003.

WISEMAN, B. S.; WERB, Z. Stromal Effects on Mammary Gland Development and Breast Cancer. **Science (New York, N.Y.)**, v. 296, n. 5570, p. 1046–1049, 10 maio 2002.

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, 1 nov. 2013.

YU, X. et al. Breast cancer cells and adipocytes in hypoxia: metabolism regulation. **Discover. Oncology**, v. 15, n. 1, p. 11, 18 jan. 2024.

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

ZHU, Y. et al. Pubertally Initiated High-Fat Diet Promotes Mammary Tumorigenesis in Obesity-Prone FVB Mice Similarly to Obesity-Resistant BALB/c Mice. **Translational Oncology**, v. 10, n. 6, p. 928–935, 9 out. 2017.

ANEXO

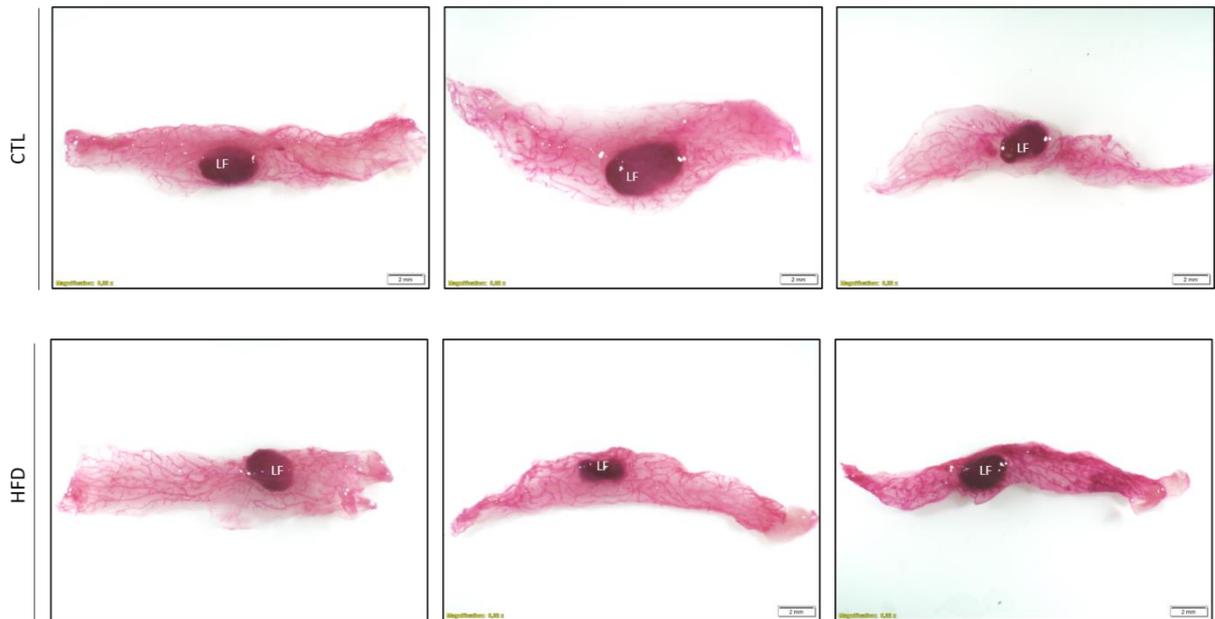


Figura Suplementar 1: Coloração *whole mount* das glândulas mamárias de camundongos Balb-c. (A) Representação histológica das glândulas mamárias dos animais Balb-c do grupo CTL (controle) e HFD (high fat diet). LF = linfonodo. Imagens obtidas através do sistema de capturas de imagens CellSens Dimension 1.12 © acoplado ao Estereoscópio SZX16 © Olympus ©.

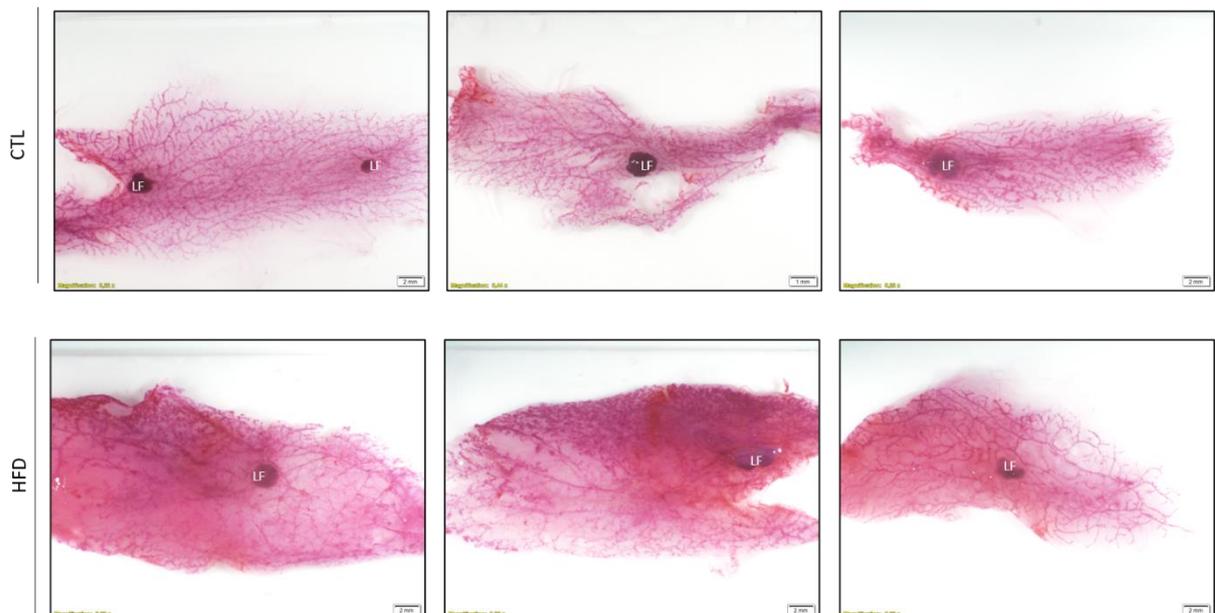


Figura Suplementar 2. Coloração *whole mount* das glândulas mamárias de camundongos Swiss. (A) Representação histológica das glândulas mamárias dos animais Swiss do grupo CTL (controle) e HFD (high fat diet). LF = linfonodo. Imagens obtidas através do sistema de capturas de imagens CellSens Dimension 1.12 © acoplado ao Estereoscópio SZX16 © Olympus ©.

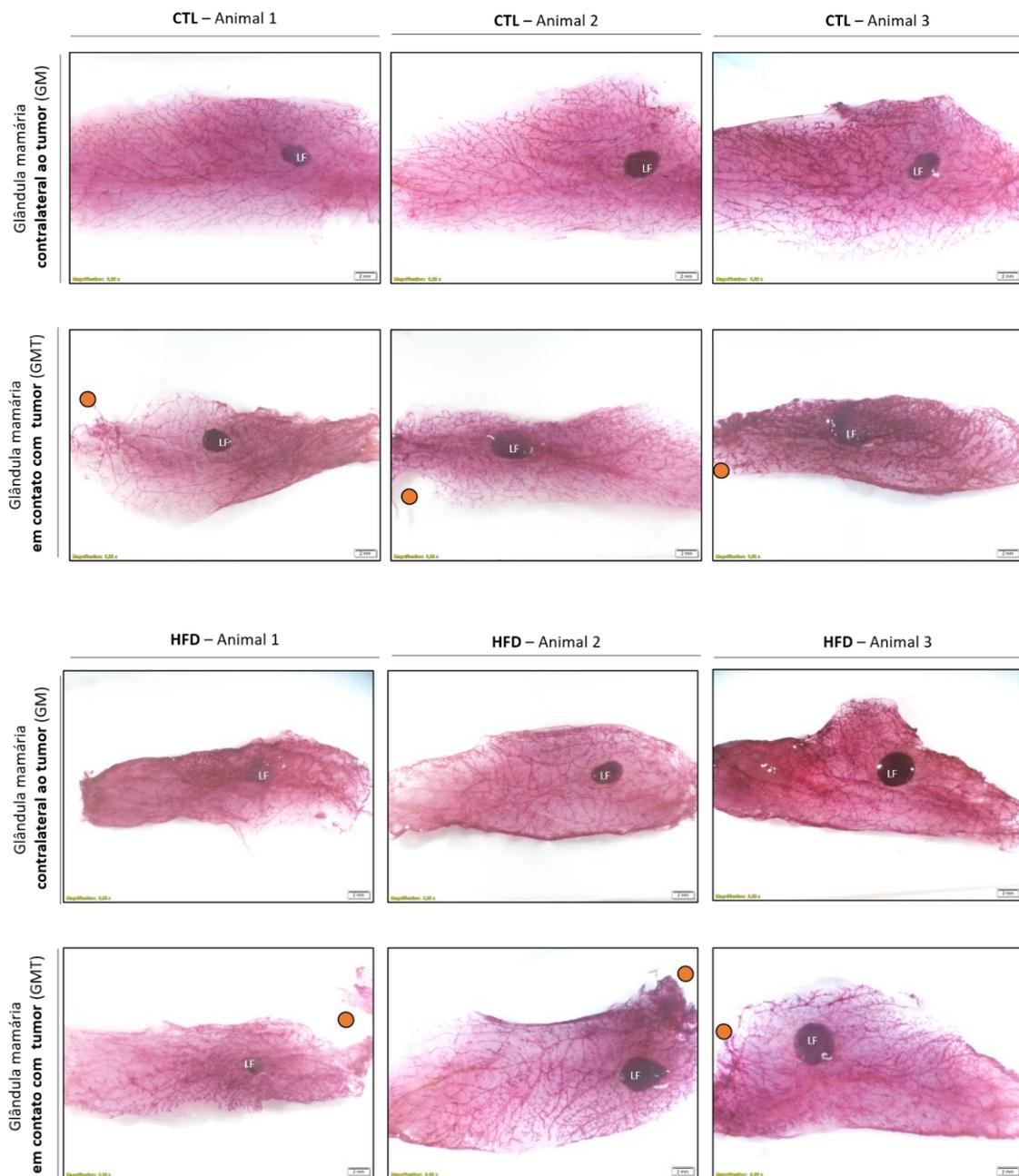


Figura Suplementar 3: Coloração *whole mount* das glândulas mamárias GM e GMT de camundongos Swiss. (A) Representação histológica das glândulas mamárias dos animais Swiss do grupo CTL (controle) e HFD (high fat diet) LF = linfonodo. O círculo laranja representa o local onde estava a massa tumoral. Imagens obtidas através do sistema de capturas de imagens CellSens Dimension 1.12 ® acoplado ao Estereoscópio SZX16 ® Olympus ®.