



Universidade de Brasília - UnB  
Faculdade de Medicina  
Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular

**O potencial efeito antitumoral dos produtos de secreção do tecido adiposo marrom em células de hepatocarcinoma: o papel da proteína adaptadora ASC presente neste tecido**

**Nathalia Soares da Cruz**

Brasília  
Dezembro, 2022

**Nathalia Soares da Cruz**

O potencial efeito antitumoral dos produtos de secreção do tecido adiposo  
marrom em células de hepatocarcinoma: o papel da proteína adaptadora  
ASC presente neste tecido

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-graduação em Patologia Molecular,  
para a obtenção do título de Mestre em  
Patologia Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Kelly Grace Magalhães

Brasília  
Dezembro, 2022

# **Nathalia Soares da Cruz**

O potencial efeito antitumoral dos produtos de secreção do tecido adiposo marrom em células de hepatocarcinoma: o papel da proteína adaptadora ASC presente neste tecido

Data: 01 de dezembro de 2022

## **Banca examinadora**

Prof.<sup>a</sup> Dra. Kelly Grace Magalhães (Presidente)

Universidade de Brasília- UnB

Prof. Dra. Letícia Batista Azevedo Rangel (Membro externo)

Universidade Federal do Espírito Santo- UFES

Prof. Dra. Sônia Nair Bão (Membro)

Universidade de Brasília- UnB

Prof. Dra. Cecília Beatriz Fiuza Favali (Suplente)

Universidade de Brasília- UnB

## Agradecimentos

Agradeço e dedico este trabalho à minha mãe, Fátima, que é a mulher mais forte e guerreira que já conheci. Obrigada por ter me dado a melhor educação que pude receber, por ser compreensível e sempre me incentivar a ir à luta e não desistir dos meus sonhos. A senhora é a minha maior inspiração de força e bondade. Sei o quão difícil foi para que pudesse dar uma vida melhor para mim e minha irmã, mas todo o seu esforço valeu e vale a pena. Te amo muito.

Também dedico este trabalho à minha tia Lusimar que faleceu durante a pandemia da Covid-19. Uma mulher de personalidade forte e ao mesmo amável, com um coração gigante. Boa parte das minhas memórias de infância são ao lado dela. A senhora sempre estará no meu coração, sinto muito a sua falta. Te amo.

Agradeço a minha família, meu pai, Edimilton, e minha irmã, Nayara. Tenho muito orgulho da minha irmã e sempre soube que ela chegaria longe. Ela também é minha inspiração.

Agradeço à minha orientadora Kelly por ter me dado a oportunidade de aprender ciência de qualidade em meio a tantas adversidades. A senhora é um exemplo de mulheres fortes e competentes na ciência e com certeza inspira muitas mulheres como eu. Todos os elogios e críticas dadas, foram e serão pilares em minha construção como indivíduo e como profissional.

Agradeço ao Gabriel, que foi um presente para mim nesses anos no LIMI. Conheci ele no laboratório e nunca pensei que chegaríamos aonde chegamos hoje. Ele é meu melhor amigo e amor. Agradeço por todo suporte, incentivo e por ter estado ao meu lado em todos os momentos. Nesses últimos anos cresci muito profissionalmente e como pessoa ao seu lado! Agradeço também à Duda, mãe do Gabriel, por todo apoio e por ser essa pessoa maravilhosa!

Agradeço a Mari, Enzo, Roma e Elton, por estarem comigo desde a graduação. Vocês são extremamente importantes para mim! Obrigada por todo apoio, conselhos, risadas e por estarem sempre ao meu lado! Amo cada um de vocês. Estendo os meus agradecimentos para minhas amigas Bruna e Julia que estão comigo desde a época da escola e acompanharam meu crescimento pessoal. Obrigada por me escutarem, me apoiarem e por cada momento que passamos juntas, amo muito vocês!

Agradeço aos meus grandes amigos que ganhei no laboratório Pasqua, Marina, Igor e Ribeiro. Obrigada por todo apoio, risadas e trocas científicas. Vocês contribuíram para que meus dias ficassem melhores! Cada um de vocês tem um lugar guardado no meu coração. Saibam que sou muito grata por ter pessoas tão maravilhosas como vocês na minha vida. Amo vocês e desejo sucesso para cada um nas nossas jornadas científicas!

Agradeço aos queridos amigos do LIMI, por toda ajuda científica e momentos de descontração, Sarah, Milena, Heloísa, Sabrina, Julia, Fernanda, Débora, Gabriel, Ramon e Nathalia. Agradeço também aos ex integrantes do LIMI, em especial à Dalila que foi a pessoa que me orientou, juntamente com a Kelly, no início deste trabalho e me ajudou muito! Estendo meus agradecimentos aos colegas do GPRO, do LIA e do LAMP e aos integrantes da microscopia e da Biofísica pelo apoio e por estarem sempre dispostos a ajudar. Também sou muito grata à Amanda por toda ajuda que me deu!

Agradeço a todos os professores que tive na escola, durante a graduação e pós-graduação, a todos os funcionários do Programa de Patologia Molecular, bem como a todos os demais funcionários que permitem com que a Universidade funcione devidamente, à Universidade de Brasília e às agências de fomento CAPES, FAPDF e CNPq pelo suporte financeiro prestado.

## Resumo

### Dissertação de mestrado

O potencial efeito antitumoral dos produtos de secreção do tecido adiposo marrom em células de hepatocarcinoma: o papel da proteína adaptadora ASC presente neste tecido

O hepatocarcinoma (HCC) está entre os cânceres que mais matam no mundo. Doenças metabólicas no fígado e a obesidade estão entre os fatores de risco para o seu desenvolvimento. O tecido adiposo pode atuar como suporte energético para tumores. Este órgão endócrino é dividido em dois tipos principais: o tecido adiposo marrom (*brown adipose tissue* - BAT) e o tecido adiposo branco (*white adipose tissue* - WAT), os quais possuem funções distintas. Adicionalmente, estes tecidos podem mediar inflamação através da secreção de citocinas, liberadas a partir da ativação de inflamassomas. Dentre as proteínas necessárias para a montagem desses inflamassomas, está a proteína adaptadora ASC, cujo papel no tecido adiposo branco e marrom é pouco conhecido. Neste trabalho buscamos investigar se moléculas secretadas por BAT e WAT apresentam efeitos diferenciais sobre o HCC, bem como avaliar o papel da proteína ASC presente nesses tecidos na modulação de parâmetros dessa malignidade. Para isso, estimulamos células de linhagem de HCC (Hepa-1c1c7) com o produto de secreção de BAT e WAT advindos de camundongos selvagens (*Wild-type*, WT) e *knokouts* (KO) para a proteína ASC (ASC<sup>-/-</sup>). Nossos dados mostraram que o produto de secreção de WAT aumentou a viabilidade celular mitocondrial e diminuiu a morte de células Hepa-1c1c7, sendo que a proteína adaptadora ASC deste tecido é importante para a indução de LTB4 e nitrito nessas células neoplásicas. Em contraste, o produto de secreção do BAT diminuiu a proliferação de células neoplásicas, aumentou a biogênese de corpúsculos lipídicos (CLs), os níveis de PPAR $\gamma$ , LTB4, espécies reativas (RS) e induziu morte por apoptose no HCC. Descrevemos também que a proteína adaptadora ASC deste tecido é importante para a proliferação, biogênese de CLs, produção de óxido nítrico e indução de apoptose nessas células. Em adição, nossos achados mostraram que na ausência de ASC, o BAT induziu piroptose por meio da formação de poros na membrana, liberação de lactato desidrogenase (LDH) e ativação de caspase-1 mediadas pelo inflamassoma NLRP3 e por espécies reativas de oxigênio (ROS). Devido às diferenças na ação entre BAT e WAT sobre o HCC, sugerimos que esses tecidos secretam moléculas distintas as quais podem beneficiar, no caso do WAT, ou prejudicar, no caso do BAT, as células neoplásicas. Em suma, concluímos que há um efeito diferencial entre BAT e WAT sobre o HCC, sendo que o produto de secreção do BAT possui ação antitumoral, com participação da proteína adaptadora ASC. Ademais, o BAT induz apoptose no HCC, também influenciada por ASC, a qual ausente associa-se à indução majoritariamente de piroptose nas células Hepa-1c1c7.

Palavras-chaves: HCC; BAT; WAT; proteína ASC; parâmetros carcinogênicos; morte celular.

## Abstract

Master's dissertation

The potential antitumor effect of brown adipose tissue's secretion products on hepatocellular carcinoma: the role of the adaptor protein ASC from this tissue

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most lethal malignancies. Liver metabolic syndromes and obesity are central risk factors for this disease. Adipose tissue acts as an energy support for tumors. This endocrine organ is mainly divided in two types: brown adipose tissue (BAT) and white adipose tissue (WAT), which differ in functions. These tissues can mediate inflammation by secreting inflammatory cytokines through inflammasomes activation. Among the proteins that are necessary for inflammasomes assembly is Apoptosis-associated speck-like *protein* containing a caspase recruitment domain (ASC), which roles in BAT and WAT are poorly understood. In the present work, we aimed to investigate whether molecules secreted by BAT and WAT present differential effects on HCC, and evaluate the role of ASC protein present in these tissues in modulating parameters of this malignancy. For that, we stimulated tumoral lineage cells (Hepa-1c1c7) with BAT and WAT secretion products derived from wild-type (WT) and ASC knockout (ASC<sup>-/-</sup>) mice. Our data showed that WAT secretion products increased cell viability and decreased Hepa-1c1c7 cell death. The ASC protein from WAT is important to induce LTB<sub>4</sub> and nitrite on these neoplastic cells. On the other hand, BAT secretion products decreased cell proliferation, increased lipid droplets (LDs) biogenesis, PPAR $\gamma$ , LTB<sub>4</sub>, reactive species (RS), and induced apoptotic cell death. The ASC protein from BAT is important to the effects on proliferation, LD biogenesis, oxide nitric production and apoptosis induction on these cells. Additionally, our data showed that, in the absence of ASC, BAT induced pyroptosis through membrane pore formation, lactate dehydrogenase (LDH) release and caspase-1 activation mediated by the NLRP3 inflammasome and reactive oxygen species (ROS). Due to the differences between BAT and WAT action on HCC, we suggested that both tissues secrete distinct molecules, which can be pro-tumoral in the case of WAT, or anti-tumoral in the case of BAT. In summary, we conclude that there is a differential effect between BAT and WAT on HCC, and BAT secretion products have antitumor action, with the participation of the adaptor protein ASC. Furthermore, BAT induces apoptosis in HCC, also influenced by ASC, and in its absence, this tissue mainly induces pyroptosis in Hepa-1c1c7 cells.

Key words: HCC; BAT; WAT; ASC protein; carcinogenic parameters; cell death.

## Lista de Figuras

<b>Figura 1. Progressão da Doença Gordurosa não Alcoólica (sigla em inglês NAFLD) para o hepatocarcinoma (HCC).</b> .....	20
<b>Figura 2. Tipos de adipócitos</b> .....	22
<b>Figura 3. Plasticidade dos adipócitos e a influência dos diferentes tipos de adipócitos sobre células neoplásicas.</b> .....	24
<b>Figura 4. Via canônica do inflamassoma NLRP3</b> .....	27
<b>Figura 5. Tipos de morte celular</b> .....	29
<b>Figura 6. Exemplos de mortes celulares</b> .....	30
<b>Figura 7. Via da piroptose mediada pelos inflamassomas</b> .....	31
<b>Figura 8. Poro formado pela oligomerização da gasdermina</b> .....	32
<b>Figura 9. Piroptose e a imunidade antitumoral</b> .....	33
<b>Figura 10. O papel diferencial dos tecidos adiposos branco (WAT) e marrom (BAT) sobre células de hepatocarcinoma (HCC) e o papel da proteína adaptadora ASC presente nesses tecidos na modulação do HCC</b> .....	34
<b>Figura 11. Esquema das etapas metodológicas</b> .....	36
<b>Figura 12. Efeito do estímulo por 24 horas com os produtos de secreção dos tecidos adiposos sobre a viabilidade mitocondrial de células de linhagem tumoral (Hepa-1c1c7) e não tumoral (AML-12)</b> .....	47
<b>Figura 13. Impacto do estímulo por 48 horas com os produtos de secreção dos tecidos adiposos sobre a viabilidade mitocondrial de células de linhagem tumoral (Hepa-1c1c7) e não tumoral (AML-12)</b> .....	49
<b>Figura 14. Influência dos produtos de secreção dos tecidos adiposos sobre a proliferação de células de linhagem tumoral (Hepa-1c1c7)</b> .....	51
<b>Figura 15. Efeito do estímulo por 48 horas com os produtos de secreção dos tecidos adiposos sobre o ciclo celular de células neoplásicas (Hepa-1c1c7)</b> .....	53
<b>Figura 16. Impacto dos produtos de secreção dos tecidos adiposos sobre a biogênese de corpúsculos lipídicos em células de linhagem tumoral (Hepa-1c1c7) por citometria</b> .....	55



<b>Figura 17. Influência dos produtos de secreção dos tecidos adiposos sobre a biogênese de corpúsculos lipídicos em células de linhagem tumoral (Hepa-1c1c7) por espectrofotometria .....</b>	<b>57</b>
<b>Figura 18. Impacto dos produtos de secreção dos tecidos adiposos sobre a biogênese de corpúsculos lipídicos em células de linhagem tumoral (Hepa-1c1c7) por microscopia de luz .....</b>	<b>59</b>
<b>Figura 19. Efeito dos produtos de secreção dos tecidos adiposos sobre os níveis de PPAR<math>\gamma</math> em células de linhagem tumoral (Hepa-1c1c7).....</b>	<b>61</b>
<b>Figura 20. Influência dos produtos de secreção dos tecidos adiposos sobre a liberação de LTB<math>_4</math> em células de linhagem tumoral (Hepa-1c1c7). .....</b>	<b>63</b>
<b>Figura 21. Impacto dos produtos de secreção dos tecidos adiposos sobre a produção de espécies reativas em células de linhagem tumoral (Hepa-1c1c7) .....</b>	<b>65</b>
<b>Figura 22. Efeito dos produtos de secreção dos tecidos adiposos sobre a produção de nitro em células de linhagem tumoral (Hepa-1c1c7). .....</b>	<b>67</b>
<b>Figura 23. Influência dos produtos de secreção dos tecidos adiposos sobre a secreção de IL-6 de células Hepa-1c1c7 .....</b>	<b>69</b>
<b>Figura 24. Impacto do estímulo por 24 horas com os produtos de secreção dos tecidos adiposos sobre o perfil de morte da linhagem tumoral Hepa-1c1c7. ....</b>	<b>71</b>
<b>Figura 25. Efeito do estímulo por 24 horas com os produtos de secreção dos tecidos adiposos sobre o perfil de morte da linhagem não tumoral AML-12.....</b>	<b>73</b>
<b>Figura 26. Influência do estímulo por 48 horas com os produtos de secreção dos tecidos adiposos sobre o perfil de morte na linhagem tumoral (Hepa-1c1c7) e na linhagem não-tumoral (AML-12).....</b>	<b>75</b>
<b>Figura 27. Efeito do estímulo por 48 horas com os produtos de secreção dos tecidos adiposos sobre a fragmentação do DNA na linhagem tumoral (Hepa-1c1c7). .....</b>	<b>77</b>
<b>Figura 28. Impacto do estímulo por 8 horas com os produtos de secreção dos tecidos adiposos sobre a formação de poros na membrana plasmática das células Hepa-1c1c7.....</b>	<b>79</b>
<b>Figura 29. Influência do estímulo por 24 horas com os produtos de secreção dos tecidos adiposos sobre a liberação de LDH na linhagem tumoral (Hepa-1c1c7)....</b>	<b>81</b>
<b>Figura 30. Efeito dos produtos de secreção dos tecidos adiposos sobre a secreção de IL-1<math>\beta</math> de células Hepa-1c1c7. ....</b>	<b>83</b>
<b>Figura 31. Impacto do estímulo por 24 horas com os produtos de secreção dos tecidos adiposos sobre a ativação de caspase-1 na linhagem tumoral (Hepa-1c1c7). .....</b>	<b>85</b>

<b>Figura 32. Influência da inibição do inflamassoma NLRP3 sob a liberação de LDH após estímulo por 24 horas com os produtos de secreção dos tecidos adiposos na linhagem tumoral (Hepa-1c1c7) .....</b>	<b>87</b>
<b>Figura 33. Efeito da inibição de ROS sob a liberação de LDH após estímulo por 24 horas com os produtos de secreção dos tecidos adiposos na linhagem tumoral (Hepa-1c1c7). .....</b>	<b>89</b>
<b>Figura 34. O efeito diferencial entre os produtos de secreção do WAT e BAT sobre células de HCC: o papel da proteína ASC desses tecidos sobre a modulação nas células neoplásicas. ....</b>	<b>99</b>
<b>Figura 35. Os produtos de secreção do BAT induzem apoptose, com participação da proteína adaptadora ASC .....</b>	<b>100</b>

## Lista de abreviações e siglas

AFP	Alpha-fetoproteína
AIM2	Ausente no melanoma 2
AML-12	Hepatócito murino não tumoral
ASC	Proteína adaptadora de inflamassomas
ATP	Adenosina Trifosfato
BAT	Tecido adiposo marrom
BAX	Proteína X associada a BCL2
BSA	Albumina sérica bovina
Bcl-2	Linfoma 2 de células B
CLs	Corpúsculos lip
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
DAMP	Padrão Molecular associado a dano
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenilindol (Fluoróforo)
DCFDA	Diacetato de 2',7'-diclorohidrofluoresceína
DCP	Des-gama-carboxi-protrombina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ERK	quinase regulada pela sinalização extracelular
FGF21	Fator de crescimento de fibroblastos 21
GSDMD	Gasdermina D
H	Hora
H <sub>2</sub> O	Água
HBV	Hepatite B Viral
HCC	Hepatocarcinoma
HCV	Hepatite C viral
HMGB1	High Mobility Group Box1
Hepa-1c1c7	Hepatócito murino tumoral
ICIs	Inibidores de <i>checkpoint</i> imunológico
IFN	Interferon
IL-10	Interleucina-10

IL-18	Interleucina-18
IL-1 $\beta$	interleucina-1 beta
IL-6	Interleucina-6
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LDH	Lactato desidrogenase
LDL	Low-density Lipoprotein
LIN	Local Interconnect Network
LPS	Lipopolissacarídeo
MCC90	inibidor seletivo de NLRP3
MEM	Meio de cultura (Minimum essential medium)
MFI	Média de intensidade de fluorescência
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl) -2,5difeniltetrazolio brometo
MYC	Proto-oncogene protein
NAC	Acetilcisteína (N-Acetil-L-cisteína)
NF $\kappa$ B	Fator nuclear $\kappa$ B
NK	Célula natural killer
NLRP	Receptor do tipo NOD que contém domínio pirina
NO	Óxido nítrico
PBS	Solução tampão fosfato-salina
PDF	Portable Document Format
PDL1	Programmed death-ligand 1
PEG	Polietilenoglicol
PFA	Paraformaldeído
PGC1- $\alpha$	Coativador-1 alfa do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma
gama	
PI	Iodeto de propídio
PLTP	Proteína de transferência de fosfolipídios
PRDM16	Domínio PR contendo proteína 16
PTEN	Fosfatase homóloga à tensina
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPM	Rotações por minuto
RS	Espécies reativas
STAT3	Proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição 3

TCD4	Linfócito T auxiliares CD4+
TCD8	Células T citotóxicas CD8
TGF- $\beta$	Fator de transformação do crescimento beta
TLR	Receptores do tipo Toll
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral $\alpha$
Treg	Célula T reguladora
UCP-1	Proteína desacopladora 1
UNS	Não estimulado
WAT	Tecido adiposo branco
WHO	World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)
WT	Wild type (selvagem)
mTOR	Mammalian target of rapamycin
°C	Graus Célsius
$\mu$ L	Microlitros
$\mu$ M	Micromolar
nm	Nanômetros

## Sumário

1. Introdução.....	17
1.1 Câncer .....	17
1.2 Hepatocarcinoma .....	19
1.3 Tecidos adiposos.....	21
1.4 O tecido adiposo, hepatocarcinoma e a inflamação.....	24
1.5 O inflamassoma e a proteína adaptadora ASC .....	25
1.6 Morte celular.....	29
1.6.1 Piroptose.....	30
2. Justificativa.....	34
3. Objetivos .....	35
3.1 Objetivo geral .....	35
3.2 Objetivos específicos .....	35
4. Metodologia .....	36
4.1 Delineamento experimental .....	36
4.2 Linhagens Celulares.....	36
4.3 Camundongos utilizados.....	37
4.4 Coletas do BAT e WAT.....	37
4.5 Interações entre os produtos de secreção dos tecidos adiposos e as células....	38
4.6 Ensaio de viabilidade celular mitocondrial.....	38
4.7 Proliferação celular .....	38
4.8 Ciclo celular e fragmentação do DNA.....	39
4.9 Biogênese de corpúsculos lipídicos .....	39
4.10 Expressão de PPAR $\gamma$ .....	41
4.11 Secreção de LTB $_4$ .....	41
4.12 Produção de espécies reativas .....	42

4.13	Secreção de nitrito .....	42
4.14	Dosagens de citocinas .....	42
4.15	Perfil de morte celular .....	43
4.16	Formação de poros na membrana plasmática .....	43
4.17	Liberção de Lactato Desidrogenase (LDH).....	44
4.18	Ativação de caspase-1 .....	45
4.19	Análises estatísticas.....	45
4.20	Abreviações.....	45
5.	Resultados .....	46
5.1	Os produtos de secreção do tecido adiposo branco aumentam a viabilidade celular mitocondrial de células Hepa-1c1c7.....	46
5.2	Os produtos de secreção do tecido adiposo marrom diminuem a proliferação de células Hepa-1c1c7 com participação da ASC.....	50
5.3	Os produtos de secreção dos tecidos adiposos não modulam o ciclo celular de células Hepa-1c1c7.....	52
5.4	Os produtos de secreção do tecido adiposo marrom aumentam a biogênese de corpúsculos lipídicos de células Hepa-1c1c7 com participação da ASC .....	54
5.5	Os produtos de secreção do tecido adiposo marrom aumentam os níveis de PPAR $\gamma$ em células Hepa-1c1c7 com participação da ASC .....	60
5.6	Os produtos de secreção do tecido adiposo marrom aumentam a liberaçã de LTB $_4$ em células Hepa-1c1c7.....	62
5.7	Os produtos de secreção do tecido adiposo marrom aumentam a produçã de espécies reativas em células Hepa-1c1c7 .....	64
5.8	A proteína adaptadora ASC dos tecidos adiposos branco e marrom participa da indução de nitrito em células Hepa-1c1c7.....	66
5.9	Influência dos produtos de secreção dos tecidos adiposos sobre a secreção de IL-6 de células Hepa-1c1c7.....	68
5.10	Os produtos de secreção do tecido adiposo marrom induzem morte por apoptose nas células Hepa-1c1c7 com participação da ASC .....	70

5.11	Os produtos de secreção do tecido adiposo marrom aumentam a fragmentação do DNA em células Hepa-1c1c7 com participação da ASC .....	76
5.12	A ausência da proteína ASC no tecido adiposo marrom induz formação de poros na membrana plasmática de células Hepa-1c1c7 .....	78
5.13	Os produtos de secreção do tecido adiposo marrom aumentam a liberação de LDH em células Hepa-1c1c7.....	80
5.14	O efeito dos produtos de secreção dos tecidos adiposos sobre a secreção de IL-1 $\beta$ de células Hepa-1c1c7.....	82
5.15	A ausência da proteína ASC no tecido adiposo marrom induz ativação de caspase-1 em células Hepa-1c1c7 .....	84
5.16	O estímulo ASC <sup>-/-</sup> BAT induz liberação de LDH via NLRP3.....	86
5.17	O estímulo ASC <sup>-/-</sup> BAT induz liberação de LDH via segundo sinal pelo ROS	88
6.	Discussão.....	90
7.	Conclusão.....	97
8.	Perspectivas.....	100
	Referências .....	102
	Anexos.....	119



## **1. Introdução**

### **1.1 Câncer**

O câncer, também chamado de neoplasia maligna, está entre as doenças que mais matam no mundo. Segundo a Organização Mundial da Saúde (do inglês World Health Organization – WHO), no ano de 2020, cerca de 10 milhões de pessoas perderam a vida para essa enfermidade, o que representa uma em cada seis mortes. Como consequência da alta incidência, o câncer também impacta a economia mundial de maneira direta. Só no ano de 2010, houve a mobilização de cerca de um trilhão de dólares gastos com diagnósticos e tratamentos para a doença (WHO, 2018).

O câncer pode ocorrer após sucessivas mutações em proto-oncogenes ou genes supressores de tumores das células. Essas mutações são capazes de alterar a função inicial dessas células, driblar mecanismos de ciclo e morte celular, aumentar a proliferação celular e possibilitar que essas células migrem para outros tecidos, mecanismo conhecido como metástase (Huysentruyt, 2013). Como exemplo, o câncer que se inicia em tecidos epiteliais, como mucosas ou pele, é denominado carcinoma. Já o que se origina no tecido conjuntivo como osso, músculo, ou cartilagem, é denominado sarcoma (Instituto Nacional de Câncer, INCA). Outro conceito importante é o de câncer primário e secundário. O primário é definido por ocasião em que o sítio de origem da doença se inicia no próprio tecido ou órgão afetado. Já o secundário ocorre quando o câncer primário sofre metástase e atinge outros órgãos (INCA).

A transformação de uma célula saudável para uma célula neoplásica está relacionada, muitas vezes, às mutações nos proto-oncogenes e nos genes supressores de tumor. Os proto-oncogenes são responsáveis pela divisão e crescimento celular sob condições normais. Quando ocorre uma mutação nesses genes eles se tornam oncogenes, os quais produzirão altas taxas de fatores de crescimento (Weinstein e Joe, 2006). Por outro lado, os genes supressores de tumor participam do controle do ciclo e da morte celular. Dessa forma, podem interromper a proliferação celular e induzir a apoptose em células defeituosas. Caso haja uma modificação nos genes supressores de tumor, a célula defeituosa não é induzida à morte celular e continua a se proliferar (Anderson et al., 1992).

As descobertas no campo do câncer tornam-se cada vez mais ricas, apesar da complexidade da doença. Há 22 anos, Hanahan e Weinberg sugeriram as seis marcas

(*hallmarks*) da maioria dos cânceres, as quais são: autossuficiência em sinais de crescimento, insensibilidade a sinais de anti-crescimento, metástase, potencial ilimitado de replicação, manutenção da angiogênese e por fim, a evasão à apoptose (Hanahan e Weinberg, 2000). Onze anos após essa publicação, os mesmos autores introduziram mais quatro marcas: a desregulação energética, a instabilidade genômica, a fuga ao sistema imunológico e a promoção à inflamação (Hanahan e Weinberg, 2011). Esses dois últimos parâmetros abarcam o campo da imunologia tumoral, que tem recebido grande interesse entre cientistas no mundo todo (Hanahan, 2022).

A neoplasia maligna conta com algumas estratégias para fugir do sistema imunológico, como a baixa expressão de antígenos associados ao tumor, a produção de imunossupressores como o fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ ), Interleucina 10 (IL-10) e a indução de células T reguladoras (Tregs), as quais podem suprimir células T citotóxicas CD8<sup>+</sup> (TCD8<sup>+</sup>), importantes por terem ação antitumoral (Drake; Jaffee; Pardoll, 2006). Por sua vez, a inflamação possui efeito paradoxal no contexto do câncer, isto é, pode prejudicar ou beneficiar o tumor. A inflamação aguda pode ativar uma resposta imune anticâncer (Liu et al., 2021). Por outro lado, a inflamação crônica pode induzir a produção de fatores de crescimento celular e fatores pró-angiogênicos, além de modificações na matriz extracelular, que facilitam a metástase. Ainda, a inflamação crônica pode danificar o DNA, contribuindo assim, para um aumento de células com alterações genéticas (Greten e Grivennikov, 2019). A importância do sistema imune no cenário do câncer é indiscutível e, com a aplicação desses conhecimentos, as imunoterapias revolucionaram as terapias anticâncer nas últimas décadas.

Atualmente, as abordagens terapêuticas são variadas e contam com tratamentos quimioterápicos, radioterápicos, imunoterápicos, cirurgias ou a combinação deles. Entretanto, esses tratamentos muitas vezes são ineficientes e possuem grande citotoxicidade resultando em efeitos colaterais que prejudicam o bem-estar dos pacientes (Luo et al., 2019). Uma outra preocupação tem sido a resistência dos tumores às terapias convencionais e a reincidência do câncer por células-tronco tumorais resistentes (Zhou et al., 2021). Dessa forma, existe a necessidade de buscar por novas terapias que sejam mais eficazes e que diminuam ou aliviem os efeitos colaterais.

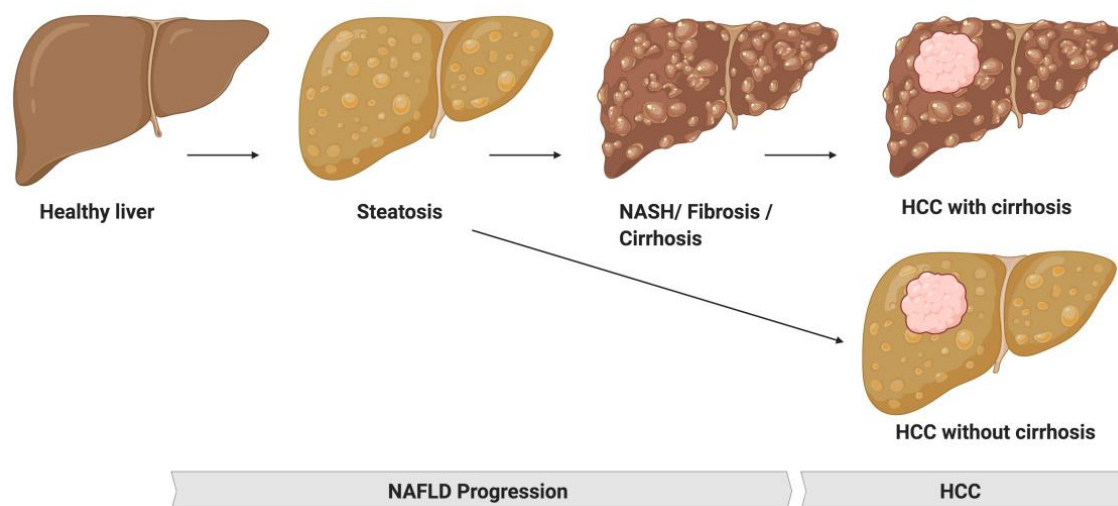
## 1.2 Hepatocarcinoma

O fígado é um órgão fundamental para a homeostase e o metabolismo do organismo. Ele é responsável por funções como processar nutrientes, formar e secretar o suco biliar, metabolizar fármacos e toxinas, armazenar vitamina A e controlar o fluxo de lipídeos do tecido adiposo (Sasse et al., 1992). Sua composição é constituída por quatro principais tipos de células. As células estreladas armazenam vitamina A e sob condições patológicas estão diretamente relacionadas à formação da fibrose; as endoteliais sinusoidais formam a parede dos vasos sanguíneos do fígado; as células de *kupffer* são macrófagos residentes desse órgão, e representam a maior população de macrófagos nos mamíferos; e por fim, os hepatócitos são as células mais abundantes deste órgão e desempenham diversas funções como estocar glicogênio, desintoxicar substâncias endógenas e exógenas, transportar lipídeos a partir de lipoproteínas e secretar o suco biliar (Kmiec et al., 2001). Outro elemento fundamental para o funcionamento do fígado é a veia porta-hepática. Essa veia é responsável por fazer a ligação direta entre os órgãos digestivos e o fígado, por isso, é o primeiro órgão a ter acesso aos nutrientes. Devido a essa veia, o fígado é exposto constantemente a antígenos dos alimentos e a produtos da microbiota intestinal, sendo, por tanto, um órgão mais imuno tolerante comparado a outros (Yang et al., 2020).

Em 2019, o câncer de fígado foi o oitavo tipo de câncer que mais tirou vidas no mundo (Roser e Ritchie, 2019). Dentre as neoplasias iniciadas no fígado, o hepatocarcinoma (HCC) é o câncer primário mais comum e abrange mais de 80% dos casos (INCA). O HCC atinge os hepatócitos e é agressivo. Seu diagnóstico pode ser feito através de imagens por ressonância magnética ou ultrassonografia, e também por testes sorológicos, como a identificação de biomarcadores como a alpha-fetoproteína (AFP), o des-gama-carboxi-protrombina (DCP) (Galle et al., 2018) e mais recentemente os micro RNAs, como o miR-25 (Shen et al., 2016). A biópsia também é outra opção, porém é evitada por ser um método muito invasivo (Galle et al., 2018). Os sintomas mais comuns do HCC são dor abdominal, febre, perda de peso e amarelamento dos olhos e da pele (INCA). Entretanto, muitos pacientes são assintomáticos e, conseqüentemente, o diagnóstico é feito tardiamente quando a doença já está avançada (Balogh et al., 2016).

Os principais fatores de risco para o HCC são as infecções pelos vírus da Hepatite B (HBV) e Hepatite C (HCV); o sexo masculino, os motivos ainda não estão claros, porém estudos apontam para fatores como as diferenças hormonais entre homens e

mulheres e os níveis da citocina IL-6 entre ambos os sexos (Naugler et al., 2007; Manieri et al., 2019); o abuso de álcool; a obesidade e a doença hepática gordurosa não alcoólica (sigla em inglês NAFLD) (Marrero et al., 2018). A NAFLD corresponde a um espectro de doenças no fígado que vão desde a esteatose, passando pela esteato-hepatite não alcoólica (sigla em inglês NASH), até a cirrose (Pouwels et al., 2022). A esteatose é o acúmulo de gordura nos hepatócitos. O NASH, por sua vez, é a progressão da esteatose, é caracterizado pelo acúmulo de lipídeos e inflamação no fígado (Bertot e Adams, 2016). Por fim, a cirrose é resultado do acúmulo de fibrose, a qual pode culminar no HCC, como mostrado na Figura 1. Os mecanismos do desenvolvimento da NAFLD até o HCC ainda não estão completamente elucidados, porém estudos indicam fatores como a resistência à insulina, o NASH e a inflamação do tecido adiposo abdominal (Vanni e Bugianesi, 2014).



**Figura 1. Progressão da Doença Gordurosa não Alcoólica (sigla em inglês NAFLD) para o hepatocarcinoma (HCC).** A NAFLD corresponde a um espectro de doenças no fígado que vão desde a esteatose, passa pela esteato-hepatite não alcoólica (sigla em inglês NASH), resultando na cirrose. Por fim, a cirrose pode progredir para o HCC. Fonte: Geh, D. *et al.*, NAFLD-Associated HCC: Progress and Opportunities. Journal of hepatocellular carcinoma, 2021.

O HCC, assim como outros cânceres, é heterogêneo entre os pacientes devido à diversidade genética, epigenética e ao microambiente tumoral (Ramón y cajal et al., 2017). Devido a essa heterogeneidade, esse câncer pode ser dividido em subclasses de acordo com a resposta imune: imuno-ativo, imuno-exausto e imuno-excluído (Llovet et al., 2021). O HCC imuno-ativo, presente em 20% dos casos, é rico em células T helper (CD4<sup>+</sup>) e CD8<sup>+</sup> ativas e responde bem ao tratamento com inibidores de *checkpoint*

imunológico (ICIs). O imuno-exausto é abundante em células TCD8<sup>+</sup> que secretam TGFβ, que são células com um *status* exausto. Por sua vez, o imuno-excluído é rico em células Tregs, possui um pior prognóstico e não responde às terapias com ICIs (Llovet et al., 2021).

O tratamento para o HCC depende do estágio em que a doença está. Em estágios iniciais, é recomendado cirurgia ou radiofrequência. No estágio intermediário é sugerido a quimioembolização transarterial. Já nos estágios mais avançados são utilizados inibidores de tirosina quinases, como o sorafenib, ICIs, como o atezolizumab (anti-PDL1) e anticorpos monoclonais, como o bevacizumab, que é um anti-fator de crescimento endotelial (anti-VEGF) (Llovet et al., 2021). A combinação de duas ou mais drogas pode aumentar a eficácia da terapia. Apesar dos avanços, os tratamentos muitas vezes não são capazes de remover o tumor por completo, principalmente nos estágios mais avançados da doença (Lurje et al., 2019). Dessa forma, a prevenção é tão importante quanto o tratamento, e pode ser feita a partir da administração de vacinas contra as hepatites, abstenção do abuso de álcool e adoção de um estilo de vida saudável.

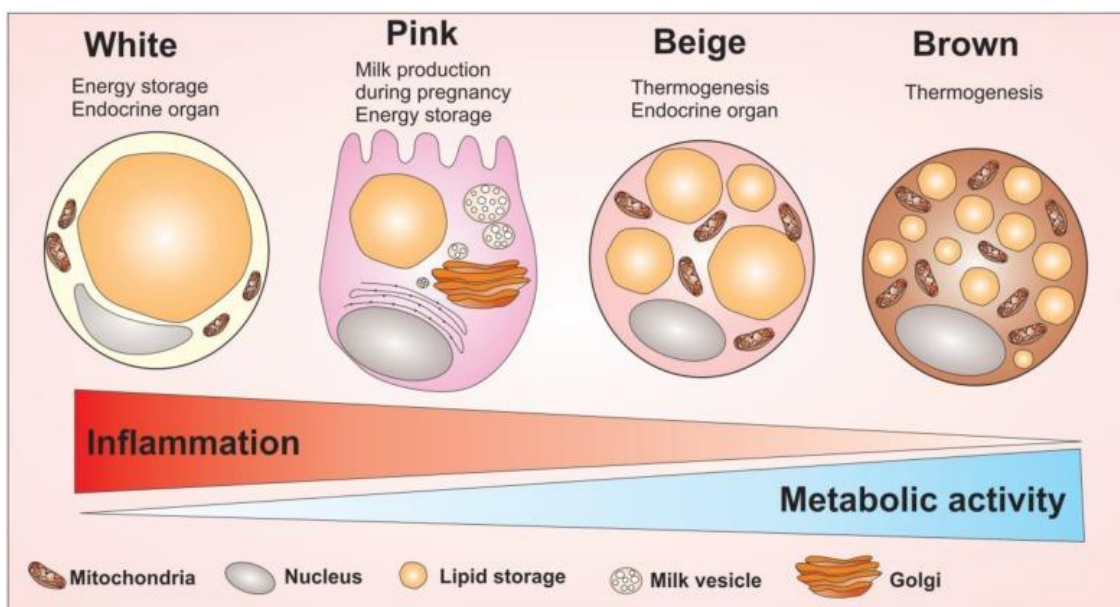
A obesidade é um dos fatores de risco para o estabelecimento do HCC. Nesse contexto, o tecido adiposo pode secretar hormônios e citocinas capazes de promover a sobrevivência e proliferação das células neoplásicas, regular a expressão de genes associado à morte celular e à invasão, além de fornecer energia para o tumor (Dumas e Brisson, 2021).

### **1.3 Tecidos adiposos**

O tecido adiposo é um órgão endócrino composto por diferentes populações de células como os adipócitos, células imunológicas, fibroblastos, além de vasos sanguíneos (Kislev et al., 2021). Esse órgão é capaz de secretar uma variedade de moléculas, que engloba lipídeos, miRNAs, exossomos, hormônios, citocinas e quimiocinas, que podem influenciar na resposta metabólica local e/ou sistêmica (Richard et al., 2020). Alterações na homeostase do tecido adiposo estão relacionadas com doenças como a obesidade, o diabetes e o câncer.

Até o momento, foram descritos na literatura quatro tipos principais de adipócitos: branco, marrom, bege e rosa (Figura 2). Cada um deles está localizado em diferentes partes do corpo e possui funções distintas. Os adipócitos brancos são os mais abundantes, contêm uma grande gotícula de lipídeo no citoplasma, um pequeno número de

mitocôndrias e fazem parte do tecido adiposo branco, do inglês *white adipose tissue* (WAT). O principal papel do WAT é estocar triglicerídeos durante o consumo de energia e liberar ácidos graxos, quando o gasto de energia é maior que o ganho (Scheja et al., 2016). A localização anatômica do WAT abdominal tem um impacto direto no fígado, de modo que as moléculas liberadas pelos adipócitos locais possuem uma relação metabólica especial com as células do fígado (Tchernof e Després, 2013).



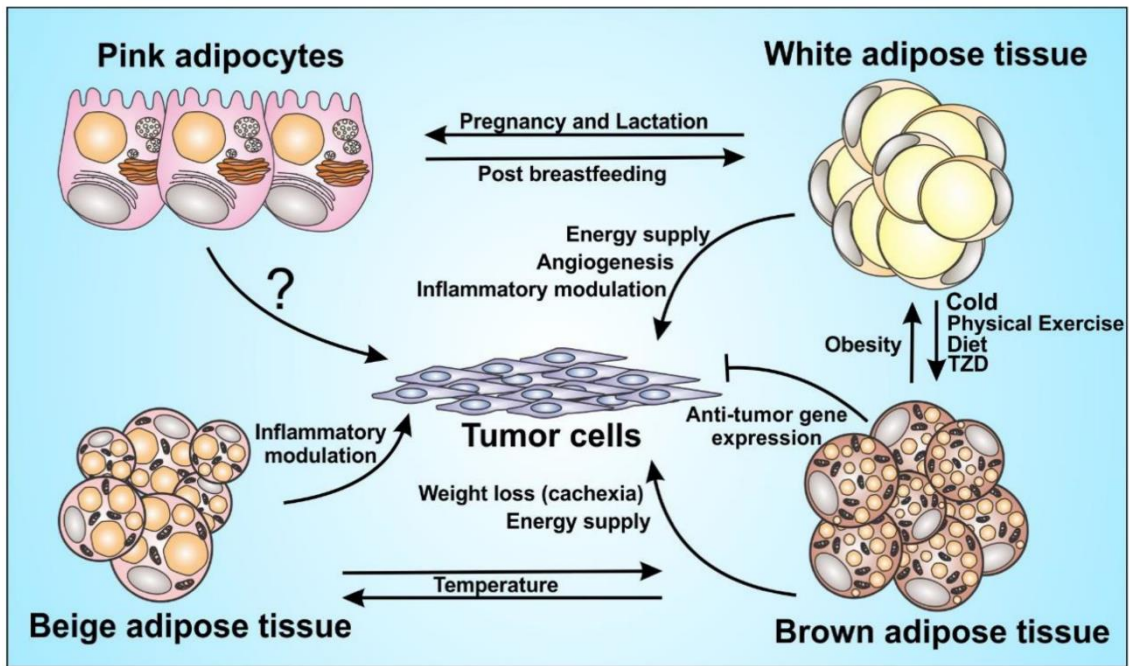
**Figura 2. Tipos de adipócitos.** Atualmente há descrito na literatura quatro tipos principais de adipócitos: branco, rosa, bege e marrom. Cada um deles possuem características e funções diferentes. Fonte: Corrêa, L. *et al.*, The Impact of the Adipose Organ Plasticity on Inflammation and Cancer Progression. *Cells*, 2019.

Os adipócitos marrons são ricos em mitocôndrias, apresentam pequenas gotículas lipídicas dispersas no citoplasma e fazem parte do tecido adiposo marrom, do inglês *brown adipose tissue* (BAT). Sua principal função é a de termogênese, que é feita pela proteína desacopladora UCP-1 (Cannon e Nedergaard, 2004). O calor é gerado pela oxidação dos ácidos graxos dos adipócitos marrons e também dos ácidos graxos e glicose do sangue (Townsend e Tseng, 2014).

O BAT foi descoberto em adultos há pouco tempo (Nedergaard et al., 2007). Antes acreditava-se que esse tecido era encontrado apenas em bebês e que o tecido regredia com o passar do tempo, até desaparecer (Lean, 1989). A capacidade que esse tecido tem em consumir ácidos graxos e dispersar energia na forma de calor, aliado à descoberta de significativas quantidades em adultos, aumentou o interesse em estudá-lo como um alvo terapêutico, principalmente no contexto da obesidade (Lee et al., 2014). Em ratos e

camundongos, o maior depósito é na região interescapular (Bukowiecki et al., 1986), enquanto que em seres humanos, os depósitos estão localizados na região do pescoço, na região supraclavicular e regiões mediastinais (Cypess et al., 2013). Por sua vez, os adipócitos bege são um intermediário entre os adipócitos brancos e marrons, ou seja, podem participar do estoque de energia e da termogênese (Corrêa et al., 2019). Por fim, os adipócitos rosa participam da lactação em mulheres durante a gravidez e no período de amamentação (Cinti, 2018).

Os adipócitos possuem uma alta plasticidade, ou seja, podem aumentar de número (hiperplasia) e tamanho (hipertrofia), além de serem capazes de adquirirem características fenotípicas de outros adipócitos. A exposição ao frio, a prática de exercícios, moléculas como a curcumina e agonistas de receptores  $\beta_3$  adrenérgicos podem provocar o amarronzamento (termo em inglês *browning*) do WAT, no qual ocorre a transformação de adipócitos brancos em adipócitos beges (Wang et al., 2019). O amarronzamento é caracterizado pelo aumento na expressão de alguns marcadores como a UCP-1, PGC1- $\alpha$  e PRDM16 nesses adipócitos. Estudos sugerem que o processo de *browning* do WAT aumenta o gasto de energia, diminui o ganho de peso e, assim, ajuda no combate à obesidade (Lagouge et al., 2006);(Andrade et al., 2014). Por outro lado, fatores como altas temperaturas e a obesidade podem ocasionar o embranquecimento (termo em inglês *whitening*) do BAT (Shimizu et al., 2015). O *whitening* pode causar morte de adipócitos marrons, dano mitocondrial e inflamação do tecido adiposo (Kotzbeck et al., 2018). Por fim, uma outra característica importante dos tecidos adiposos é que eles podem influenciar células neoplásicas de modos distintos, por meio das suas ações endócrinas, como evidenciado na Figura 3.



**Figura 3. Plasticidade dos adipócitos e a influência dos diferentes tipos de adipócitos sobre células neoplásicas.** Os adipócitos podem sofrer alteração dos seus fenótipos a partir de fatores externos. Além disso, os diferentes tipos de tecidos adiposos são capazes de influenciar células neoplásicas de maneira diferencial. Fonte: Corrêa, L. *et al.*, The Impact of the Adipose Organ Plasticity on Inflammation and Cancer Progression. *Cells*, 2019.

#### 1.4 O tecido adiposo, hepatocarcinoma e a inflamação

O tecido adiposo pode mediar a inflamação através da secreção de citocinas e quimiocinas, além de atuar como um suporte energético para várias doenças metabólicas, incluindo o HCC (Scheja e Heeren, 2016). Além disso, hormônios secretadas pelo WAT, como a leptina e a adiponectina também podem modular o câncer de fígado (Jiang et al., 2014). A leptina é capaz de induzir proliferação celular, angiogênese e metástase do HCC (Saxena et al., 2007), enquanto que a adiponectina pode suprimir o crescimento tumoral e a metástase do câncer de fígado (Man et al., 2010).

Estudos recentes fornecem evidências de que o BAT pode regular o metabolismo de lipídeos e de glicose do fígado e que, possivelmente, pode ser um futuro alvo terapêutico em doenças hepáticas, como no caso da NALFD (Friedman et al., 2018; Sponton et al., 2020). Além disso, o BAT secreta moléculas endócrinas que possuem ação sistêmica, chamadas batoquinas (Yang e stanford, 2022). A batoquina FGF21, por exemplo, possui um efeito protetor contra o NASH (Zarei et al., 2020). Já a PLTP pode atenuar a obesidade e diminuir a intolerância à glicose (Sponton et al., 2020). Dessa forma, nota-se que o BAT não é apenas um órgão relacionado à termogênese, mas



também um órgão endócrino com influência sistêmica sob condições homeostáticas ou patológicas.

Assim como os tecidos adiposos estão fortemente envolvidos com o metabolismo de lipídeos, eles também estão envolvidos com a resposta inflamatória sistêmica. O papel da inflamação é importante para o entendimento do câncer (Coussens e Werb, 2002). Existe um *crosstalk* entre células imunológicas, adiposas e tumorais. Essa interação impacta diretamente o estabelecimento do tumor, seja pela indução do crescimento do tumor, devido a um ambiente imunossuprimido, ou pelo encolhimento desse tumor, caso haja uma imunomodulação que impeça o seu desenvolvimento (Colotta et al., 2009). Os mecanismos pelos quais os tecidos adiposos modulam o microambiente tumorais ainda não são totalmente compreendidos.

Em pacientes com HCC, o aumento dos níveis da citocina IL-6 está relacionado a um pior prognóstico (Porta et al., 2008). Nesse contexto inflamatório, os mediadores lipídicos presentes em células imunes ou nos hepatócitos, conhecidos como eicosanoides, possuem um papel chave na inflamação. Esses mediadores podem, entre outras funções, recrutar células imunológicas para a região tumoral. As enzimas que sintetizam os eicosanoides são encontradas em organelas chamadas corpúsculos lipídicos (CLs). Os CLs armazenam lipídeos neutros e estão relacionados com o metabolismo lipídico, sinalização celular, construção de membranas, inflamação e o desenvolvimento de alguns tipos de cânceres, uma vez que essa organela pode fornecer energia para o tumor (Wang et al., 2021). A depender do estágio de desenvolvimento do câncer, um ambiente inflamado pode levar a um estresse oxidativo/nitrosativo e à consequente produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO), que podem induzir mutações e, assim, contribuir para a progressão da carcinogênese (Bartsch e Nair, 2006). Entretanto, a inflamação pode ser benéfica em um ambiente tumoral imuno excluído, visto que o recrutamento de células imunológicas pode favorecer a eliminação do tumor. A inflamação pode ser iniciada através de um complexo de proteínas chamado inflamassoma.

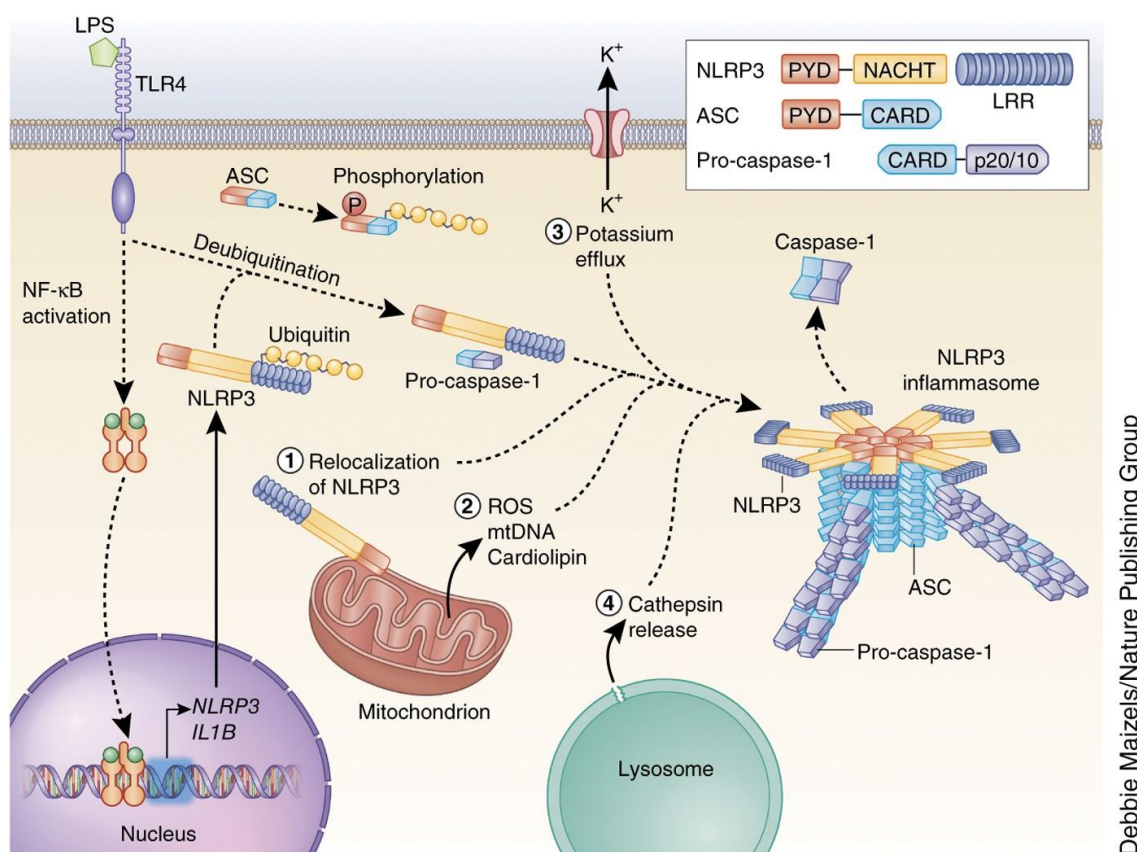
### **1.5 O inflamassoma e a proteína adaptadora ASC**

O inflamassoma é um complexo multiproteico intracelular responsável pela ativação da proteína caspase-1 e pela secreção de citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-18 (Li et al., 1995; Martinon et al., 2002). Atualmente, estão descritos alguns inflamassomas como o NLRP3, NLRP1, NLRC4, NLRP6, NLRP12 e o AIM2. O

inflamassoma NLRP3 é um dos mais bem descritos e é composto pelas proteínas NLRP3, caspase-1 e pela proteína adaptadora ASC (proteína *speck*-like associada à apoptose com domínio de recrutamento de caspase). A montagem desse complexo resulta na clivagem das citocinas pró-IL-1 $\beta$  e pró-IL-18 nas suas formas ativas IL-1 $\beta$  e IL-18, respectivamente (Dostert et al., 2008). No fígado, a IL-1 $\beta$  leva, entre outros desdobramentos, à liberação de IL-6 e TNF- $\alpha$  (Sims e Smith, 2010). Já a IL-18 pode influenciar no recrutamento de células T e NK (Nakanishi et al., 2001). Ambas citocinas influenciam na progressão do HCC (da Cruz et al., 2022).

Na via canônica de ativação do inflamassoma NLRP3, a qual é dependente da caspase-1, a montagem do complexo se inicia por meio de dois sinais. O primeiro sinal ocorre através da ativação de receptores de reconhecimento de padrões (RRPs). Existem algumas classes de RRP, como os receptores do tipo Toll (TLRs) que são transmembranares, o ausente no melanoma 2 (AIM2) que reconhece DNA citosólico e os receptores do tipo NOD (NLRs), que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) no citoplasma (Akira et al., 2006). O estímulo do TLR resulta na ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, que transcreve os genes envolvidos com a tradução das proteínas pró-IL-1 $\beta$ , pró-IL-18 e NLRP3 (Guo et al., 2015). O segundo sinal se dá por meio de alguns fatores como o ROS mitocondrial, liberação de catepsina pelo lisossomo e o efluxo de potássio, como mostra a Figura 4. Após esse segundo sinal, é formado o complexo com as proteínas NLRP3, ASC e pró-caspase-1. Então, a pró-caspase-1 se autocliva na sua forma ativa, caspase-1, que em sequência cliva e ativa as citocinas IL-1 $\beta$  e IL-18.

Por sua vez, a via não canônica se dá por meio da ligação direta do LPS com a caspase-11 (em camundongos) ou caspase-4/5 (em humanos), sem o intermédio de TLRs (Kayagaki et al., 2011). Após essa ligação e ativação da caspase-11, ela cliva e libera as citocinas IL-1 $\beta$  e IL-18. Além de clivar essas citocinas importantes, as caspases-1/11 também estão envolvidas com a morte celular chamada piroptose.



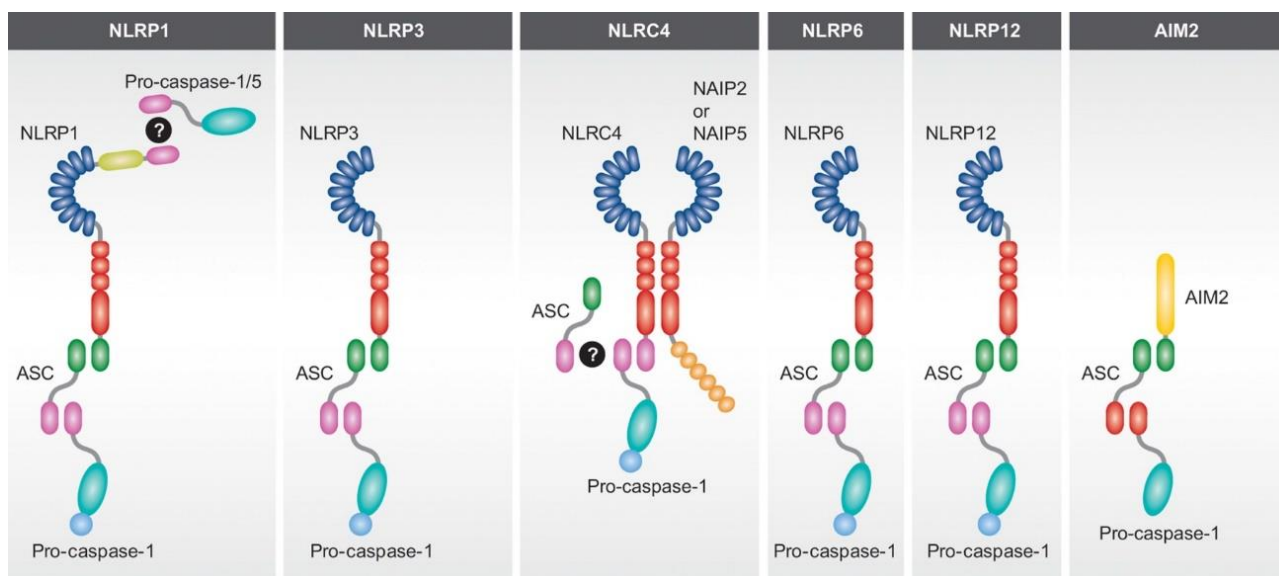
Debbie Maizels/Nature Publishing Group

**Figura 4. Via canônica do inflamassoma NLRP3.** A montagem desse inflamassoma requer dois sinais: o primeiro é feito por meio da ativação de receptores do tipo Toll (TLRs) e o segundo sinal é feito por meio de alguns fatores como espécies reativas de oxigênio (ROS) mitocondrial, liberação de catepsina e o efluxo de potássio. Após esses dois sinais, a pró-caspase-1 se autocliva na sua forma ativa caspase-1, que em sequência cliva e ativa as citocinas IL-1 $\beta$  e IL-18. Fonte: Guo, H. *et al.*, Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat. Med.*, 2015.

A proteína adaptadora ASC, foi inicialmente descoberta como uma proteína que participa da via de indução à apoptose. Sua forma monomérica é capaz de interagir diretamente com a proteína BAX, levá-la para a mitocôndria e, assim, induzir a liberação do citocromo c, o que resulta na ativação das caspases efetoras da apoptose (Ohtsuka et al., 2004). Após um tempo, estudos mostraram que a ASC seria extremamente importante para a montagem e resposta de alguns inflamassomas, como os demonstrados na Figura 4 (Compan et al., 2015). Essa proteína é formada pelo domínio PYD na porção N-terminal e pelo domínio CARD na região C-terminal. No inflamassoma NLRP3, por exemplo, essas porções fazem a conexão entre as proteínas NLRP3 e caspase-1, sendo chamada de proteína adaptadora por essa razão (Compan et al., 2015).

Adicionalmente, foi descoberto que a proteína ASC é capaz de se oligomerizar na forma de ASC *specks* e de ser secretada para o espaço extracelular podendo, dessa forma, maturar citocinas (Fernandes-Alnemri et al., 2007). Além disso, ela também pode ser

internalizada por outras células e amplificar o sinal de ativação dos inflamassomas (Franklin et al., 2018). Em 2010, Bryan *et al.* mostrou que existem mais três isoformas, além da ASC, geradas por splicing alternativo: ASC-b, ASC-c e ASC-d. Apenas as isoformas ASC e ASC-b participam ativamente do inflamassoma NLRP3. A isoforma ASC-b é mais lenta e ativa o inflamassoma em menor grau (Diaz-Parga e De Alba, 2022). Em contrapartida, ASC-c desempenha um papel inibitório. Quanto à ASC-d, ainda não se sabe a sua função (Bryan et al., 2010).



**Figura 5. Inflamassomas e a proteína adaptadora ASC.** A figura representa alguns dos inflamassomas que precisam da proteína adaptadora ASC para a montagem do complexo proteico. Esses complexos são formados por proteínas intracelulares e possuem a função de ativar a proteína caspase-1 e, conseqüentemente ativar citocinas pró-IL-1 $\beta$  e pró-IL-18 em IL-1 $\beta$  e IL-18. Fonte: Franklin BS *et al.*, The intra- and extracellular functions of ASC specks. Immunol. Ver., 2018.

A princípio, os inflamassomas foram relacionados à defesa do organismo contra patógenos, uma vez que a IL-1 $\beta$  e IL-18 podem combater a infecção. Contudo, estudos demonstraram que o inflamassomas são importantes em doenças metabólicas como a obesidade (Vandanmagsar et al., 2011), diabetes mellitus tipo 2 (Henao-Mejia et al., 2014), NAFLD (Henao-Mejia et al., 2014) e o HCC (Wei, et al., 2013). De modo geral e sucinto, os Padrões Moleculares Associados a Danos (DAMPs) liberados nas desordens metabólicas, como o ácido úrico, excesso de ATP, ceramidas, colesterol e LDL (lipoproteína de baixa densidade) oxidado, podem ativar os RRP e iniciar uma resposta pró-inflamatória a partir da ativação de inflamassomas (Wani et al., 2021).

Recentemente, estudos em humanos demonstram que o inflamassoma NLRP3 no tecido adiposo é super regulado na obesidade e contribui, assim, para um estado crônico de inflamação e para a resistência à insulina (Wu et al., 2020). Enquanto isso, a depleção

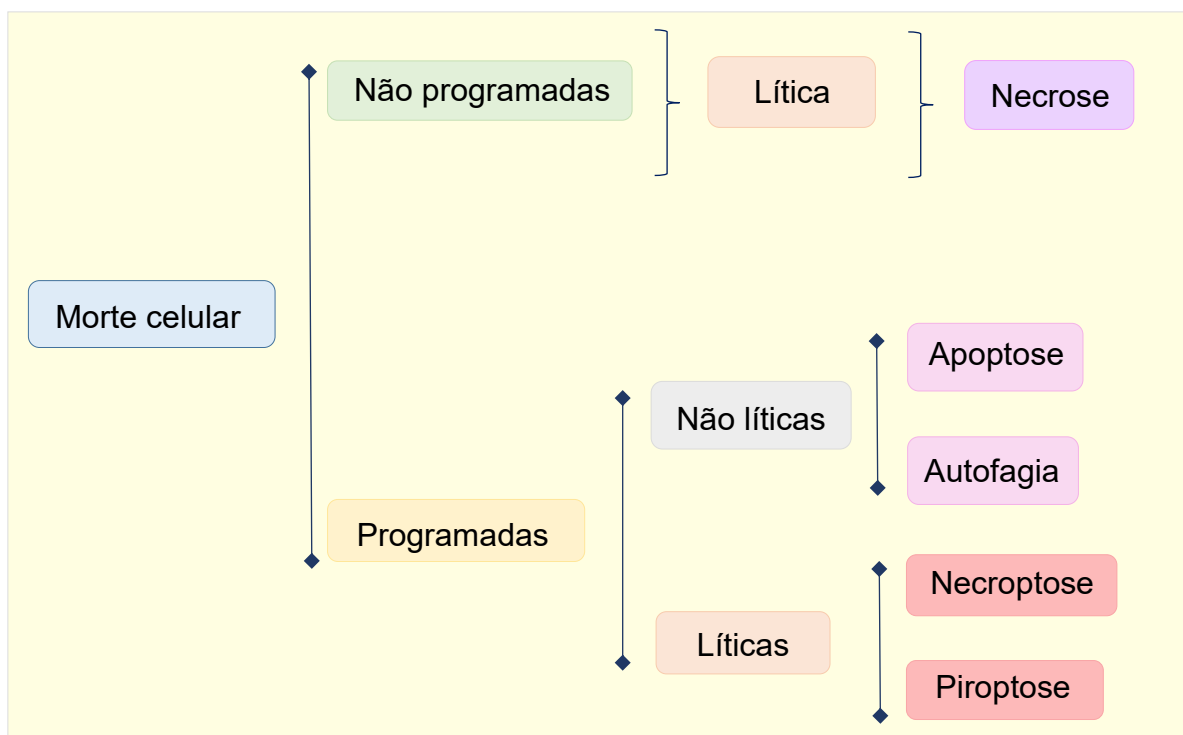
da proteína ASC foi capaz de melhorar a ação da insulina (Youm et al., 2011) e atenuar a obesidade em camundongos (Stienstra et al., 2011). Diante da grande importância que os inflamassomas apresentam, ainda existem lacunas sobre o papel da proteína ASC, tanto em sua forma monomérica quanto oligomerizada, sobre os tecidos adiposos. Ademais, os inflamassomas também podem estar envolvidos em vias de morte celular.

## **1.6 Morte celular**

Células neoplásicas são capazes de ativar vias de sobrevivência celular e inibir vias de morte celular, para se manterem vivas. O desbalanço entre a proliferação e a morte celular contribui para um ambiente pró-tumorigênico, observada na hepato carcinogênese em humanos (Fabregat, 2009). Nesse contexto, as mortes celulares podem ser divididas em duas classes, de acordo com seu mecanismo e sua morfologia: acidentais e programadas.

A morte celular acidental, chamada necrose, ocorre de maneira imprevista e pode ser induzida por estresse químico, físico ou mecânico. Nesse tipo de morte é observada a perda da estrutura celular e o extravasamento do conteúdo interno na forma de DAMPs (Radi et al., 2018). Em contrapartida, a morte celular programada ocorre por meio de uma maquinaria de proteínas regulada que culmina na morte da célula (Galluzzi et al., 2018). Existem diferentes tipos de mortes celulares programadas que vão desde as mais clássicas, como apoptose e autofagia, até as mais recentemente descobertas, como piroptose, necroptose, ferroptose, parthanatos e pironecrose (Fuchslocher et al., 2017). Essas mortes programadas podem, ainda, ser divididas em não líticas e líticas, como mostra a Figura 6. Nas não líticas, a membrana plasmática é preservada. Já nas líticas, ocorre a ruptura da membrana plasmática e a liberação de DAMPs.

A apoptose é uma morte não lítica, que não induz inflamação, sendo, por isso, chamada de tolerogênica. Essa morte é caracterizada pelo encolhimento da célula, formação dos corpos apoptóticos e fragmentação do DNA. Essa morte pode ser acionada pela via extrínseca, mediada por ligantes extracelulares, ou pela via intrínseca, mediada pela mitocôndria. Ambas as vias resultam na ativação das caspases-3/6/7 (Tang et al., 2019). Por outro lado, as mortes imunogênicas, assim chamadas por serem líticas, são capazes de ativar o sistema imune por meio da liberação de DAMPs. A piroptose e a necroptose são exemplos de mortes imunogênicas.

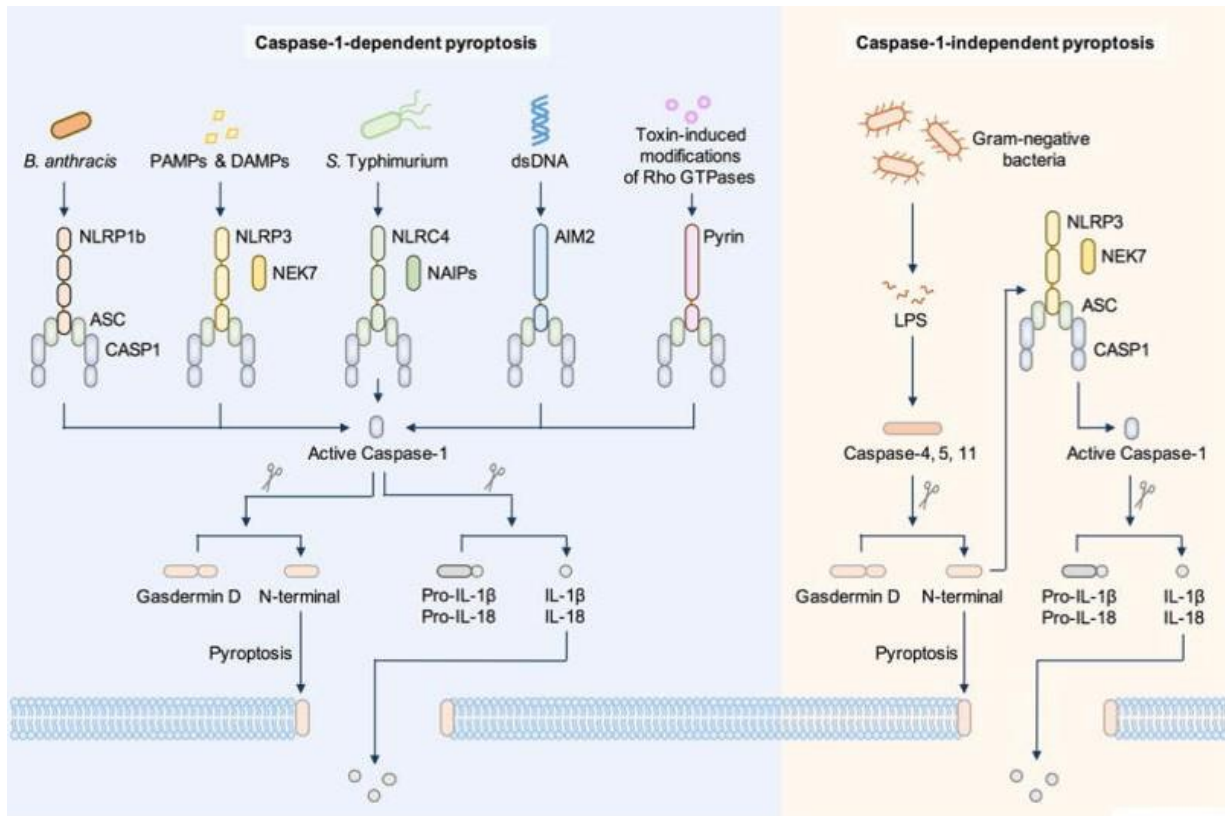


**Figura 6. Exemplos de mortes celulares.** Os diferentes tipos de morte celular podem ser divididos de acordo com seu mecanismo e sua morfologia. Fonte: Figura criada no PowerPoint pela autora deste trabalho.

Diferentes tipos de morte celular podem coexistir em doenças no fígado (Aizawa et al., 2020). Essas mortes podem ocorrer em células parênquimais ou não parênquimais do fígado, bem como em células imunes, com consequências patológicas (Aizawa et al., 2020). No caso do câncer, as células cancerosas conseguem driblar os mecanismos de morte celular. Desse modo, a indução à morte de células malignas é um mecanismo estratégico para a regressão do tumor.

### 1.6.1 Piroptose

A piroptose é uma morte celular programada caracterizada pela formação de poros, inchaço celular e a ruptura da membrana plasmática (Bergsbaken et al., 2009). A via dessa morte pode estar relacionada com os inflamassomas. Após a ativação dos inflamassomas, ocorre a ativação das caspase-1/11/4/5 que, então clivam a gasdermina D (GSDMD). Esta é a proteína efetora da piroptose (Figura 7). Após ser clivada, a porção N-terminal da GSDMD se oligomeriza e forma os poros característicos na membrana celular (Ding et al., 2016). Até o momento, há descrito algumas gasderminas, denominadas A, B, C, D e E, sendo que a GSDMD é a mais estudada (Kovacs e Miao, 2017).



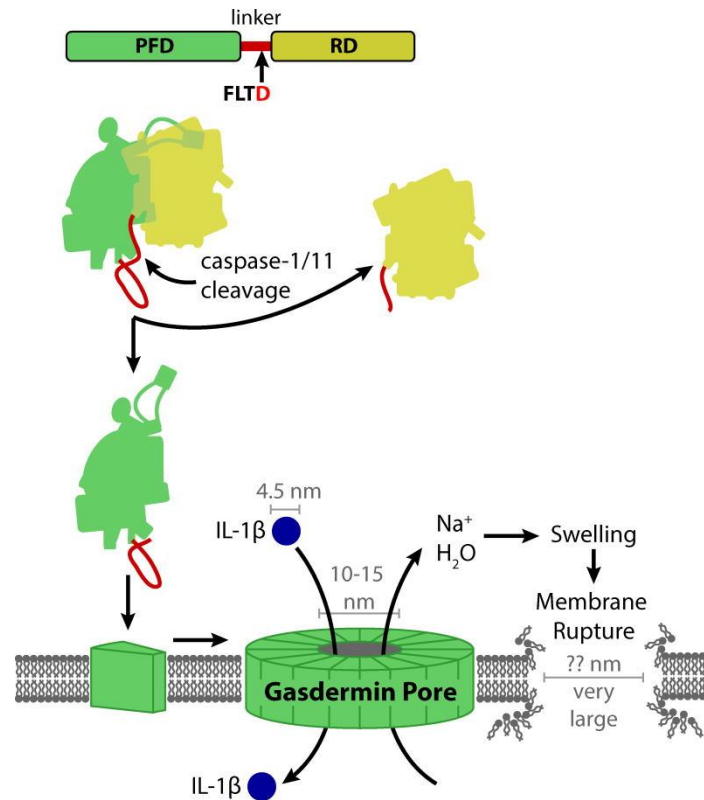
**Figura 7. Via da piroptose mediada pelos inflamassomas.** A via dessa morte pode estar relacionada com os inflamassomas. Após a ativação da caspase-1/11/4/5, a gasdermina D (GSDMD) é clivada. A porção N-terminal da GSDMD se oligomeriza e forma os poros característicos da piroptose. Fonte: Man SM *et al.*, Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases. Immunol. Ver., 2017.

A GSDMD é composta pela porção N-terminal (PFD), um *linker* de aminoácidos e a porção C-terminal (RD), como mostrado na Figura 8. A caspase-1/11 cliva e separa a porção C-terminal, que é inibitória, da porção N-terminal. Esta, por sua vez, se oligomeriza e interage com fosfolipídios da membrana plasmática, fosfatidilinosítídeos e cardiolipinas, formando os poros com diâmetro entre 10 a 15 nm (Kovacs e Miao, 2017). Desse modo, moléculas menores que esse diâmetro, conseguem atravessar o poro. Dentre as moléculas que saem pelo poro estão a IL-1 $\beta$  e IL-18. Enquanto isso, moléculas de água (H<sub>2</sub>O) e íons Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> entram pelo poro e causam o inchaço celular característico desse tipo de morte.

A princípio, acreditava-se que a ruptura da membrana plasmática ocorria devido às diferenças de concentração osmótica entre o espaço intra e extracelular formadas pelos poros (Fink e Cookson, 2006). Porém, em 2021, Kayagaki e colegas demonstraram que o processo de ruptura da membrana plasmática é mediada e dependente de uma proteína chamada NINJ1 (Kayagaki *et al.*, 2021). Após a lise da membrana, moléculas como



lactato desidrogenase (LDH), ATP e HMGB1 são liberadas e atuam como DAMPs e consequentemente amplificam o processo inflamatório (Larock e Cookson, 2013).



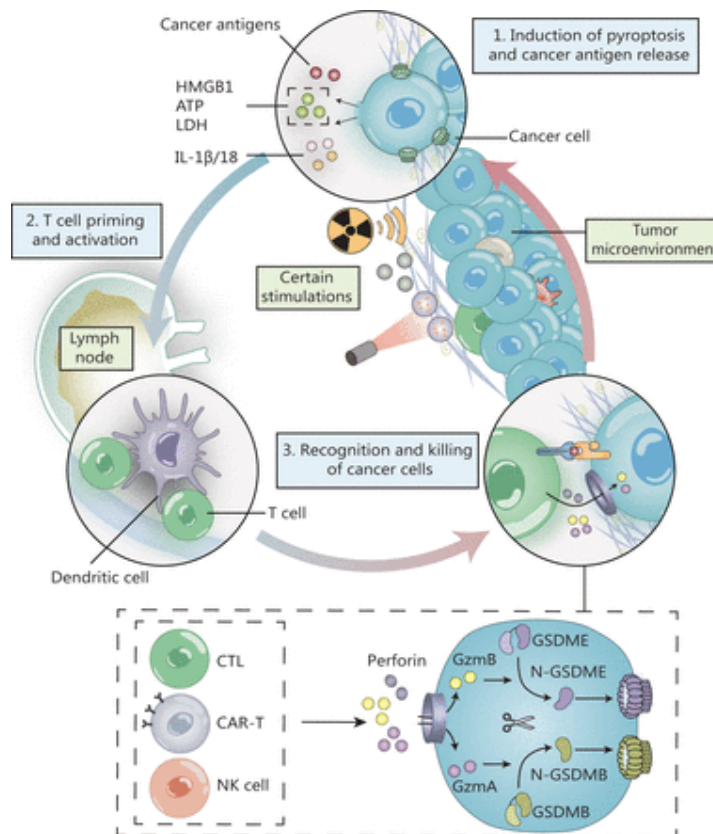
**Figura 8. Poro formado pela oligomerização da gasdermina.** A gasdermina é composta pela porção N-terminal (PFD), um linker de aminoácidos e a porção C-terminal (RD). A caspase-1/11 cliva a gasdermina, separando a porção inibitória (C-terminal) da porção efetora (N-terminal). Após a clivagem, a porção N-terminal se oligomeriza e forma os poros de 10-15 nm na membrana celular, de onde são secretadas as citocinas IL-1 $\beta$  e IL-18. Fonte: Kovacs SB e Miao EA, Gasdermins: Effectors of Pyroptosis. Trends Cell Biol., 2017.

Sabe-se também que os inflamassomas não são os únicos capazes de induzir a clivagem de gasderminas: a caspase-3 é capaz de clivar a GSDME; a caspase-8 pode clivar as GSDMC e D; por fim, as granzimas secretadas pelas células T CD8<sup>+</sup> e NK, podem clivar as GSDMB e E (Yu et al., 2021).

O efeito da piroptose pode ser dual no contexto do câncer e varia de acordo com os diferentes tecidos (Xia et al., 2019). Essa morte pode atuar na imunidade antitumoral, mas também pode promover uma inflamação capaz de beneficiar esse tumor. De modo geral, os DAMPs (LDH, HMGB1, ATP etc.) e citocinas (IL-1 $\beta$  e IL-18) liberados na piroptose podem ativar uma resposta imune inata que, então, induz uma resposta imune adaptativa para o microambiente em questão, resultando no aumento de células T CD8<sup>+</sup> e NK e diminuição de células Treg (Du et al., 2021).



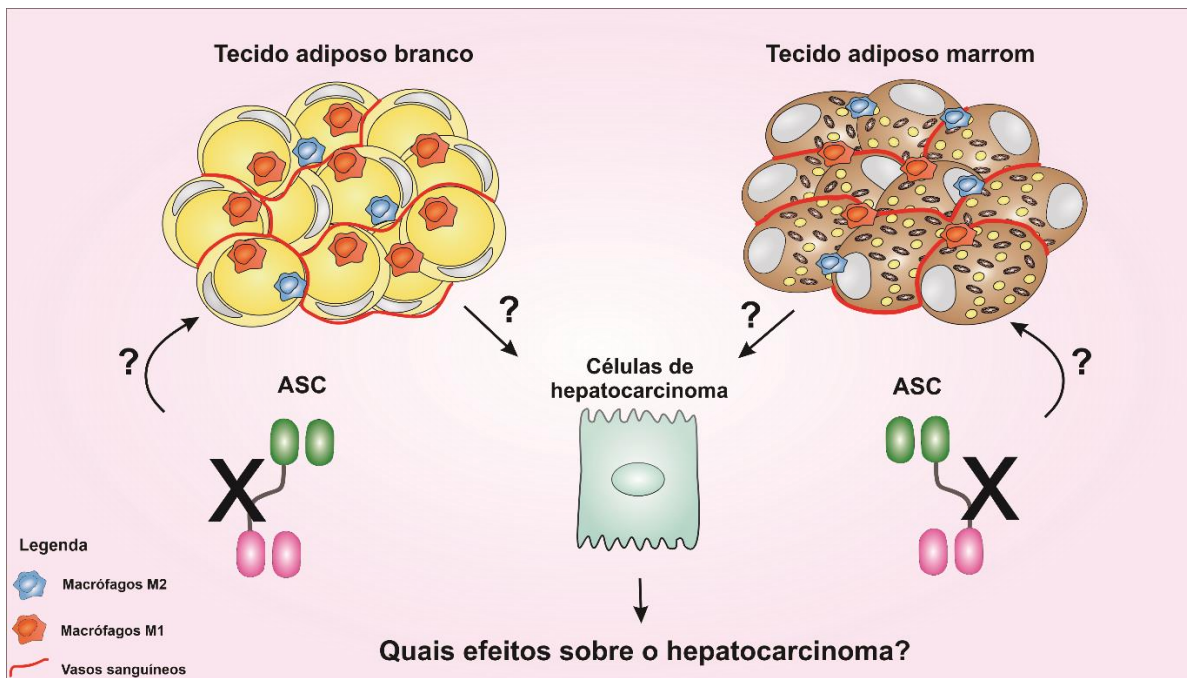
Como mostrado na Figura 9, antígenos do câncer liberados na piroptose são apresentados pelas células dendríticas para as células T, o que desencadeia a ativação de células NK e T citotóxicas (CD8<sup>+</sup>). Por sua vez, essas células NK e CD8<sup>+</sup> ativas, secretam granzimas A e B que podem clivar GSDME e B, resultando na morte de mais células neoplásicas. Gera-se, assim, um *feedback* positivo da piroptose mediado por uma imunidade antitumoral (Wang et al., 2022).



**Figura 9. Piroptose e a imunidade antitumoral.** Antígenos do câncer liberados na piroptose (1) são apresentados (2) pelas células dendríticas para as células T, desencadeando a ativação de células NK e T citotóxicas (CD8<sup>+</sup>). Por sua vez, essas células NK e CD8<sup>+</sup> ativas, (3) secretam granzimas A e B que podem clivar GSDME e B, resultando na piroptose de mais células. Gera-se, assim, um *loop* de *feedback* positivo da piroptose mediado por uma imunidade antitumoral. Fonte: Wang S. *et al.*, Methods for monitoring cancer cell pyroptosis. Cancer Biology & Medicine, 2022.

## 2. Justificativa

O HCC é um tumor maligno com altas taxas de mortalidade, resistente às quimioterapias convencionais e com limitadas opções de tratamentos (Ringelhan et al., 2018). Por tanto, são necessárias novas alternativas para o tratamento dessa doença. Apesar da íntima relação entre tecidos adiposos e o metabolismo hepático, ainda não há descrito na literatura o papel diferencial do BAT e WAT sobre o HCC. O interesse em estudar o BAT como alvo terapêutico, principalmente na obesidade, tem aumentado nos últimos anos e apenas um número limitado de estudos investiga diretamente como o BAT pode influenciar o ambiente hepático (Scheja e Heeren, 2016). Adicionalmente, a curiosidade científica sobre os inflamassomas é crescente (Guo et al., 2015). Todavia, ainda não se sabe qual é o papel da proteína ASC presente nos tecidos adiposos e como a ausência dessa proteína nestes tecidos pode modular a capacidade desses tecidos de secretar moléculas com impacto na modulação sobre o HCC. Este trabalho visou, portanto, investigar se há um papel diferencial do BAT e WAT sobre o HCC, bem como explorar a influência da ASC nos tecidos adiposos sobre o efeito desses tecidos no HCC, como esquematizado na Figura 10.



**Figura 10.** O papel diferencial dos tecidos adiposos branco (WAT) e marrom (BAT) sobre células de hepatocarcinoma (HCC) e o papel da proteína adaptadora ASC presente nesses tecidos na modulação do HCC. Fonte: Figura feita no CorelDraw pela autora deste trabalho.

### 3. Objetivos

#### 3.1 Objetivo geral

Caracterizar o efeito diferencial dos produtos de secreção de BAT e WAT sobre células de HCC, bem como avaliar o papel da proteína ASC presente nesses tecidos na modulação do HCC.

#### 3.2 Objetivos específicos

Esse trabalho foi dividido em dois blocos. No primeiro bloco são avaliados parâmetros carcinogênicos no HCC após o estímulo com os produtos de secreção do BAT e do WAT. No segundo bloco são avaliadas vias de morte celular no HCC após o estímulo com os produtos de secreção do BAT e do WAT.

#### BLOCO I

##### Parâmetros carcinogênicos

Caracterizar o efeito dos tecidos adiposos no HCC, pela avaliação de:

- 5.1) A viabilidade celular mitocondrial;
- 5.2) A proliferação celular;
- 5.3) O ciclo celular;
- 5.4) A biogênese de corpúsculos lipídicos;
- 5.5) Os níveis de PPAR $\gamma$ ;
- 5.6) A secreção de LTB $_4$ ;
- 5.7) A produção de RS;
- 5.8) A produção de nitrito;
- 5.9) A secreção de IL-6.

#### BLOCO II

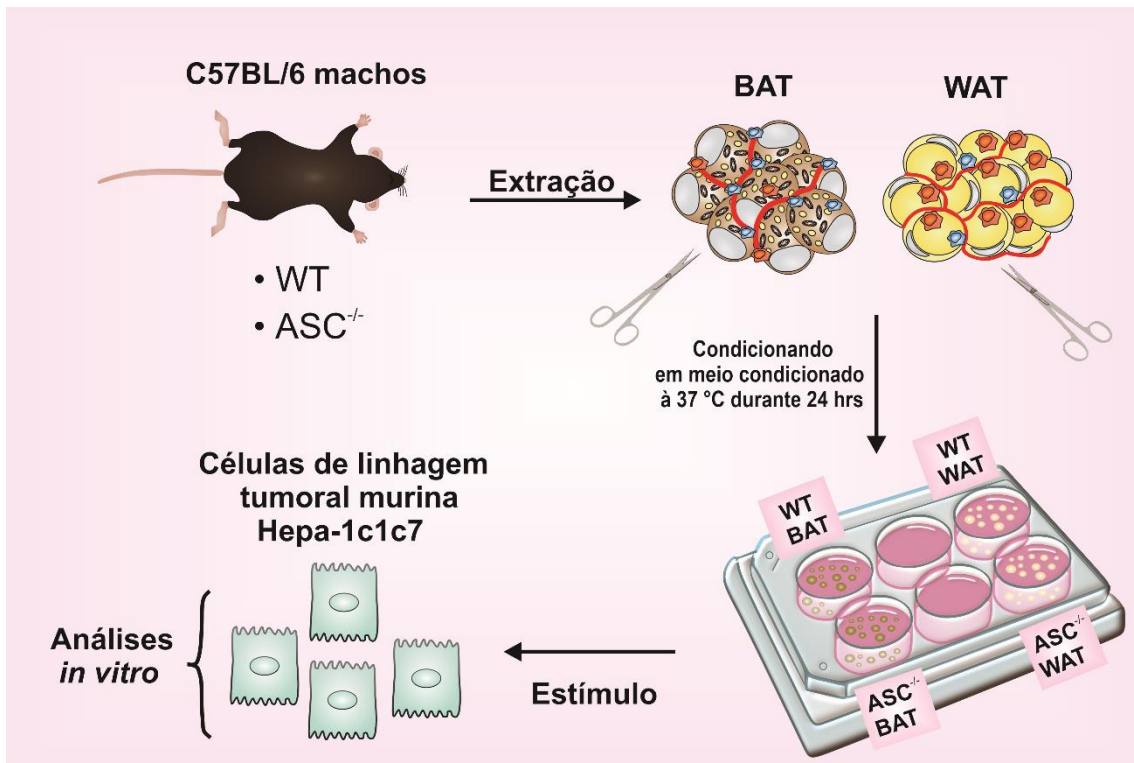
##### Análises de vias de morte celular

Caracterizar o efeito dos tecidos adiposos no HCC, pela avaliação de:

- 5.10) O perfil de morte celular;
- 5.11) A fragmentação do DNA;
- 5.12) A formação de poros na membrana plasmática;
- 5.13) A liberação de LDH;
- 5.14) A secreção de IL-1 $\beta$ ;
- 5.15) A ativação de caspase-1;
- 5.16) O papel do NLRP3 na liberação de LDH;
- 5.17) O papel do ROS na liberação de LDH.

## 4. Metodologia

### 4.1 Delineamento experimental



**Figura 11. Esquema das etapas metodológicas.** Camundongos C57BL/6 machos WT e *knockouts* para a proteína adaptadora ASC ( $ASC^{-/-}$ ) foram selecionados aleatoriamente e sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub>. O BAT foi retirado da região supra escapular, já o WAT foi retirado da região gonadal. Os tecidos foram então dissociados e acondicionados em uma estufa à 37°C em meio condicionado por 24 horas. Após o período de 24 hrs, os produtos de secreção dos tecidos adiposos foram coletados do meio e utilizados para estimular células neoplásicas murinas Hepa-1c1c7. Após o estímulo, foram realizados os experimentos *in vitro*. WT: *Wild type* (selvagem); WT BAT: produto de secreção do tecido adiposo marrom de animais WT; WT WAT: produto de secreção do tecido adiposo branco de animais WT;  $ASC^{-/-}$  BAT: produto de secreção do tecido adiposo marrom de animais *knockout* para a proteína ASC;  $ASC^{-/-}$  WAT: produto de secreção do tecido adiposo branco de animais *knockout* para a proteína ASC. Fonte: Figura feita no CorelDraw pela autora deste trabalho.

### 4.2 Linhagens Celulares

Hepa-1c1c7: linhagem de célula derivada de HCC murino, ATCC® CRL-2026™, foi utilizada para ensaios *in vitro* em contato com os produtos de secreção de tecidos adiposos. A linhagem foi cultivada em meio de cultura MEM  $\alpha$  (Sigma-Aldrich),

suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 1% de penicilina e estreptomicina e mantida à 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>.

AML-12: linhagem não tumoral de hepatócitos murino, ATCC® CRL-2254™, foi utilizada para ensaios *in vitro* em contato com os produtos de secreção de tecidos adiposos. A linhagem foi cultivada em meio de cultura DMEN+F12 (Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 10 µg/ml de insulina, 5.5 µg/ml de transferrina, 5 ng/ml de selênio, 40 ng/ml de dexametasona, 1% de penicilina e estreptomicina e mantida à 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>.

### **4.3 Camundongos utilizados**

Para a compreensão do papel diferencial do BAT e WAT sobre o HCC, foram utilizados os tecidos adiposos de camundongos machos da linhagem C57BL/6 selvagens (*Wild type*, WT) e *knockouts* para a proteína adaptadora ASC (ASC<sup>-/-</sup>). Todos os animais foram acondicionados no biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, em ambiente livre de patógenos, em micros isoladores ventilados, com água e alimentação *ad libitum*, com ciclo artificial claro/escuro de 12 horas. Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (SEI n. 23106.068588/2022-30).

### **4.4 Coletas do BAT e WAT**

Foram utilizados os tecidos adiposos de camundongos machos, uma vez que a taxa de prevalência do HCC é no sexo masculino. O WAT utilizado foi o gonadal, visto que o WAT subcutâneo é menos abundante e anatomicamente menos relevante no contexto do HCC. O WAT visceral não foi utilizado pois, devido à sua localização nas vísceras, é mais propenso a contaminações.

Para extração do BAT e WAT, animais dos dois genótipos, WT e ASC<sup>-/-</sup>, foram selecionados aleatoriamente e sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub>. O BAT foi retirado da região supra escapular e o WAT da região gonodal. Os tecidos foram então dissociados e acondicionados em uma estufa à 37°C em meio condicionado por 24 horas. O meio condicionado é constituído de MEM  $\alpha$ , 1% de penicilina e estreptomicina, 1% BSA, 40 µg/mL de gentamicina, 0,25 mg/mL de anfotericina B e 10 µg/mL de cloranfenicol.

Para manter padronização, para cada 0,05 g de tecido retirado foi adicionado 1 mL de meio condicionado.

Após o período de 24 hrs, os tecidos adiposos haviam secretado seu conteúdo no meio condicionado. Esse meio foi, então, centrifugado a 300g (1800 RPM) por 5 minutos e utilizado para estimular células Hepa-1c1c7 e AML-12.

#### **4.5 Interações entre os produtos de secreção dos tecidos adiposos e as células**

Células Hepa-1c1c7 e AML-12 foram estimuladas com os produtos de secreção dos tecidos adiposos na proporção de 2:1 (duas partes de produto de secreção para uma parte de meio de cultura). Após o estímulo, as células foram encubadas na estufa a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub> durante os períodos de 24 e 48 horas. Em seguida, foram realizados os experimentos *in vitro*.

#### **4.6 Ensaio de viabilidade celular mitocondrial**

Com o propósito de verificar o efeito diferencial do BAT e WAT sobre a viabilidade celular mitocondrial de células de linhagem tumoral e não tumoral, foi realizado o ensaio de MTT. Essa análise baseia-se no fato de que o MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio brometo), quando reduzido por enzimas mitocondriais, apresenta-se com coloração roxeada na forma de cristais de formazan. Em placa de 96 poços, 5x10<sup>3</sup> células de ambas linhagens foram plaqueadas por poço e incubadas *overnight*. No dia seguinte, o sobrenadante do BAT e WAT dos animais WT e ASC<sup>-/-</sup> foram colocados em interação com as células por 24 e 48 horas. O controle experimental foi obtido expondo as células ao agente citotóxico DMSO. Cada tratamento foi feito em triplicata. Após o tempo de estímulo, o sobrenadante foi descartado e cada poço foi exposto a 100 µL de solução de MTT 5mg/ml (Life Technologies). A placa foi incubada a 37 °C por 2 horas. Após esse período, a solução foi descartada da placa e foi aplicado 50 µL de DMSO por 5 minutos em cada poço, para que os cristais de formazan fossem dissolvidos. Feito isso, a absorbância foi medida no espectrofotômetro Spectramax M3 a 570 nm e as análises feitas pelo software GraphPad Prism 7, considerando a média do valor de absorbância do não-estimulado como 100% de viabilidade.

#### **4.7 Proliferação celular**

Com o objetivo de analisar o efeito dos tecidos adiposos sobre a proliferação de células Hepa-1c1c7, foi realizado um ensaio utilizando a sonda fluorescente CFSE. Essa sonda é permeável à membrana e é capaz de se ligar a aminas citoplasmáticas. Uma vez que a célula realiza o processo de divisão celular, as moléculas de CFSE são igualmente divididas entre as células filhas, diluindo assim a fluorescência presente em cada célula

gerada. Em placa de 24 poços,  $2 \times 10^5$  células foram plaqueadas por poço e incubadas *overnight*. Após completa adesão, as células foram lavadas uma vez com PBS 1 X e expostas à 5  $\mu$ M de CFSE (eBioscience) diluído em PBS 1 X, por 15 minutos e à temperatura ambiente. Após incubação com o agente fluorescente, a fim de se eliminar o CFSE extracelular, as células foram expostas a soro fetal bovino a 4 °C e então lavadas uma vez com PBS 1 X. Feito isso, as células foram estimuladas por 24 e 48 horas com os produtos de secreção dos tecidos adiposos. Após esse período, as células foram lavadas uma vez com PBS 1 X em centrifugação a 300g e fixadas em 400  $\mu$ L de paraformaldeído 1 X. A análise foi feita em citômetro de fluxo (FACS VERSE, BD Biosciences) no canal FL-1 em escala exponencial, os dados foram analisados utilizando o software FlowJo V10 e os gráficos foram gerados usando o GraphPad Prism 7.

#### **4.8 Ciclo celular e fragmentação do DNA**

O efeito dos tecidos adiposos sobre o ciclo celular e a fragmentação do DNA em células de HCC foi investigado utilizando o agente fluorescente Iodeto de propídeo, que é um agente intercalante de nucleotídeos. Desse modo, a intensidade de fluorescência do Iodeto de propídeo é diretamente proporcional à quantidade de DNA no interior da célula. Em placa de 48 poços,  $5 \times 10^4$  células Hepa-1c1c7 foram semeadas por poço e estimuladas com os produtos de secreção dos tecidos adiposos por 48 horas. Após o tempo de estímulo, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1 X e fixadas com etanol 70 % por 2 horas a 4 °C. Feito isso, as células foram lavadas uma vez com PBS 1 X, centrifugadas a 1000 g por 5 minutos e lavadas novamente. Em seguida, foram expostas à solução de Iodeto de propídeo (20  $\mu$ g/mL de Iodeto de propídeo, 20  $\mu$ g/mL de RNase, 0,1 % Triton) por 10 minutos a 37 °C. Após o tempo de incubação, foi adicionado 1 mL de PBS 1 X nas células, que foram então centrifugadas a 1000 g por 10 minutos. As células foram então ressuspensas em 200  $\mu$ L de PBS 1 X e analisadas em citômetro de fluxo (FACS CALIBUR, BD Biosciences) em canal FL-2 em escala linear. Os picos relativos às células foram associados às fases G1 e G2/M e o platô associado à fase S. Eventos que apresentaram fluorescência inferior a encontrada nas células em G1 foram considerados casos de fragmentação nuclear. Os dados foram analisados utilizando o *software* ModFit LT™ e os gráficos foram gerados usando o GraphPad Prism 7.

#### **4.9 Biogênese de corpúsculos lipídicos**

Com o intuito de analisar se os produtos de secreção dos tecidos adiposos afetam a biogênese de corpúsculos lipídicos do HCC, foi feita análise por citometria, microscopia

de fluorescência, microscopia de luz e espectrofotometria. Na citometria e microscopia de fluorescência foi utilizada a sonda fluorescente lipofílica Bodipy 493/503 (Life technologies), a qual interage com lipídeos neutros, presentes no interior de corpúsculos lipídicos. Já na microscopia de luz e espectrofotometria foi utilizado o corante vermelho Oil Red O, o qual é lipofílico e cora os corpúsculos lipídicos.

Citometria de fluxo:  $10^5$  células foram semeadas, por poço, em placa de 48 poços *overnight*. No dia seguinte as células foram estimuladas com os produtos de secreção do BAT e WAT advindos de camundongos WT e ASC<sup>-/-</sup> por 24 e 48 horas. Após esse período, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1 X e incubadas numa solução de Bodipy/PBS em uma proporção de 1/5000 a 4 °C ao abrigo de luz. Em seguida as células foram lavadas duas vezes com PBS 1 X e ressuspensas para fixação em 400 µL de paraformaldeído 1 X. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (FACS VERSE, BD Biosciences) utilizando o canal FL-1 em escala exponencial. Os dados foram analisados no *software* FlowJo V10.

Microscopia de Luz:  $10^5$  células foram plaqueadas, por poço, em placa de 24 poços contendo lamínulas. Depois de estarem aderidas nas lamínulas, as células foram tratadas com os produtos de secreção dos tecidos adiposos por 24 horas. Após esse período, as células foram fixadas utilizando formalina 3,7 % por 10 minutos. A seguir as células foram lavadas três vezes com água destilada e expostas por 2 minutos a PEG 100 %. No passo seguinte, o excesso de PEG 100 % foi retirado e as células foram incubadas com Oil Red O 0,5 % por 15 minutos. As células foram novamente lavadas três vezes com água destilada e então marcadas com hematoxilina por 3 segundos. Após novas lavagens, as lamínulas foram montadas em lâminas com o auxílio de esmalte transparente e as imagens foram adquiridas utilizando microscópio de luz (ZEISS) e o software Zen.

Espectrofotometria:  $10^4$  células foram plaqueadas, por poço, em placa de 96 poços *overnight*. No dia seguinte, as células foram estimuladas com os produtos de secreção do BAT e WAT advindos de camundongos WT e ASC<sup>-/-</sup> por 24 horas. Após esse período, as células foram lavadas uma vez com PBS 1 X e fixadas com paraformaldeído 4% por 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida, o paraformaldeído foi removido e as células foram lavadas uma vez com PBS 1 X, seguido da adição de 50 µL de solução de trabalho Oil red O. Para fazer a solução de trabalho são seguidos os seguintes passos: primeiramente, é feita uma solução estoque contendo 0,2 g de Oil red em 40 mL de 2-isopropanol (0,5 % w/v). Em seguida, é preparada uma solução de trabalho fresca de 2:3



com água destilada (duas partes para a solução estoque em três partes para água destilada). As células foram incubadas por 40 minutos na solução de trabalho, lavadas cinco vezes com água destilada e em seguida os poços foram eluídos em 2-isopropanol 100 %. Após isso, a placa foi incubada por 10 minutos em temperatura ambiente, em agitação leve orbital. A leitura foi realizada no espectrofotômetro Spectramax M3 a 510 nm e as análises feitas no software GraphPad Prism 7.

#### **4.10 Expressão de PPAR $\gamma$**

A fim de verificar se os produtos de secreção dos tecidos adiposos modulam a expressão de PPAR $\gamma$  no HCC, foi realizado experimento com o anticorpo anti-PPAR $\gamma$  (sc-7196). Em placa de 48 poços, 10<sup>5</sup> células foram semeadas por poço. Após aderirem na placa, as células foram estimuladas por 24 horas com os produtos de secreção dos tecidos adiposos. No dia seguinte, as células foram lavadas, centrifugadas a 300g por 5 minutos, bloqueadas com o agente bloqueador por 10 minutos e fixadas com etanol 70 % por 2 horas a 4 °C. Após esse tempo, as células foram então lavadas uma vez com PBS 1 X, centrifugadas a 500 g por 5 minutos e lavadas novamente com PBS 1 X. O *pellet* foi suspenso, então, em uma solução tampão de permeabilização gelada e incubado por 5 minutos em temperatura ambiente. As células foram lavadas, centrifugadas a 300g por 5 minutos e então marcadas com anticorpo anti-PPAR $\gamma$  por 30 minutos em gelo. As células em seguida foram lavadas com PBS 1 X e centrifugadas a 300g. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspenso em 500  $\mu$ L de paraformaldeído 1 %. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (FACS VERSE, BD Biosciences) utilizando escala exponencial. Os dados foram analisados utilizando o *software* FlowJo V10.

#### **4.11 Secreção de LTB<sub>4</sub>**

Com o objetivo de analisar o efeito dos tecidos adiposos sobre a secreção de LTB<sub>4</sub> pelas células Hepa-1c1c7, foi realizado um ensaio de detecção de LTB<sub>4</sub> com o kit *Cayman Chemical* de acordo com as especificações do fabricante. Em placa de 96 poços, 10<sup>4</sup> células foram semeadas por poço. Após aderirem na placa, as células foram estimuladas por 24 horas com os produtos de secreção dos tecidos adiposos. No dia seguinte, o sobrenadante foi coletado para a dosagem do eicosanoide, de acordo com as especificações do fabricante. Os níveis de LTB<sub>4</sub> foram demonstrados em valores absolutos (pg/mL) a partir de leitura em 410 nm no aparelho espectrofotômetro SpectraMax M3, os dados foram analisados de acordo com o protocolo do fabricante e os gráficos plotados no *software* GraphPad Prism 7.

#### **4.12 Produção de espécies reativas**

A fim de verificar se os produtos de secreção dos tecidos adiposos modulam a produção de espécies reativas no HCC, foi realizado experimento com a sonda DCF-DA. O DCF-DA é convertido em um composto não-fluorescente no interior da célula. Esse composto quando oxidado por espécies reativas gera um composto fluorescente (DCF). Em placa de 24 poços,  $10^5$  células foram semeadas por poço. Após aderirem na placa, as células foram estimuladas durante 24 horas com os produtos de secreção dos tecidos adiposos. Após o tempo de estímulo, as células foram expostas a  $20 \mu\text{M}$  de DCF-DA por 30 minutos, a  $37^\circ\text{C}$  e ao abrigo da luz. Depois da marcação, as células foram coletadas, lavadas três vezes com PBS 1 X e ressuspensas em  $400 \mu\text{L}$  de PBS 1 X. As amostras foram imediatamente analisadas em citômetro de fluxo (FACS VERSE, BD Biosciences) utilizando o canal FL-1 em escala exponencial. Os dados foram analisados utilizando o *software* FlowJo V10 e os gráficos plotados no *software* GraphPad Prism 7.

#### **4.13 Secreção de nitrito**

A fim de se analisar se os produtos de secreção dos tecidos adiposos alteram a secreção de óxido nítrico pelas células de HCC, foi feita dosagem de óxido nítrico utilizando o reagente de Griess. Esse ensaio possibilita a quantificação de nitrito, um subproduto do instável óxido nítrico. Em placa de 24 poços,  $10^5$  células foram semeadas por poço e, quando aderidas, estimuladas com os produtos de secreção do BAT e WAT dos camundongos WT e  $\text{ASC}^{-/-}$  por 24 horas. Após o tempo de estímulo, os sobrenadantes de cultura foram coletados, transferidos para placa de cultura e expostos à solução de Griess (Sulfanilamida  $14,5 \text{ M}$ , N-1-naftiletilenediamina  $9,64 \text{ M}$  e ácido fosfórico  $0,0125 \%$  em água destilada). A curva padrão foi composta por crescentes concentrações de nitrito de sódio diluído em meio de cultura RPMI 1640 expostas ao reagente de Griess. Após incubação por 10 minutos a temperatura ambiente, os valores de absorvância das amostras foram obtidos a  $540 \text{ nm}$  utilizando o espectrofotômetro Spectramax M3 e os dados foram analisados no *software* GraphPad Prism 7.

#### **4.14 Dosagens de citocinas**

Com o objetivo analisar o efeito dos produtos de secreção dos tecidos adiposos sobre a secreção de citocinas no HCC, foi realizado um ensaio de ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*). Em placa de 96 poços,  $10^4$  células foram semeadas por poço e, quando aderidas, estimuladas com os produtos de secreção do BAT e WAT dos camundongos WT e  $\text{ASC}^{-/-}$  por 24 horas. No dia seguinte, o sobrenadante advindo da

interação das células com os produtos de secreção dos tecidos adiposos foi coletado. Após essa coleta, os poços foram lavados com PBS 1 X e preenchidos com MEM  $\alpha$ . Após 24 horas, o sobrenadante do que foi secretado pelas células foi coletado. Essa segunda coleta foi feita para entender se as citocinas dosadas são provenientes das células ou dos produtos de secreção dos tecidos adiposos. Além disso, as citocinas dos produtos de secreção dos tecidos adiposos foram dosadas. O ensaio foi realizado de acordo com as especificações do fabricante. Os níveis de citocinas foram demonstrados em valores absolutos (pg/mL) a partir de leitura em 450 nm no aparelho espectrofotômetro SpectraMax M3 e os dados foram analisados no *software* GraphPad Prism 7.

#### **4.15 Perfil de morte celular**

A fim de se caracterizar o tipo de morte celular promovida pelo BAT e WAT nas células Hepa-1c1c7 e AML-12, foi realizado um ensaio com Anexina V-PI. A Anexina V interage com a fosfatidilserina, que é exposta no lado externo da membrana de células no processo apoptótico. Já o Iodeto de propídeo (PI) interage com ácidos nucleicos de células mortas em vias não-apoptóticas, e é impermeável à célula com membranas plasmáticas íntegras. Em placa de 48 poços,  $10^5$  células de ambas linhagens foram plaqueadas por poço e, após adesão, foram estimuladas durante 24 e 48 horas com os produtos de secreção do BAT e WAT dos animais WT e ASC<sup>-/-</sup>. Após esse período, as células foram lavadas com PBS 1 X, centrifugadas a 300g por 5 minutos e ressuspensas com 100  $\mu$ L da solução Anexina-PI (kit BD) durante 15 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Após essa etapa, as células foram lavadas uma vez com PBS 1 X, centrifugadas a 300g por 5 minutos e o *pellet* foi ressuspensado em 400  $\mu$ L de *binding buffer* 1 X. Em seguida, foi feita a análise no citômetro de fluxo (FACS VERSE, BD Biosciences) utilizando os canais FL-1 e FL-3, ambos em escala exponencial. Os dados obtidos foram analisados utilizando o *software* FlowJo V10 e os gráficos plotados no *software* GraphPad Prism 7.

#### **4.16 Formação de poros na membrana plasmática**

A investigação do efeito dos tecidos adiposos sobre a formação de poros na membrana plasmática das células Hepa-1c1c7 foi realizada por meio de um ensaio de poros. Este ensaio consiste na análise de emissão de fluorescência de forma cinética pelo Iodeto de propídeo, um composto que fluoresce quando interage fisicamente com ácidos nucleicos e é impermeável à membrana. Em placa de 96 poços de parede escura,  $3 \times 10^4$  células foram plaqueadas por poço. Após aderência, as células foram expostas ao Iodeto

de propídeo 3 µg/mL e aos meios condicionados dos tecidos adiposos em RPMI sem vermelho de fenol. Logo após o estabelecimento do estímulo, os valores de fluorescência do iodeto de propídeo foram detectados em espectrofotômetro Spectramax durante 8 horas em intervalos de 5 minutos entre as leituras, em comprimentos onda de excitação de 538 nm e de emissão de 617 nm. Os dados obtidos foram analisados utilizando o *software* GraphPad Prism 7.

#### **4.17 Liberação de Lactato Desidrogenase (LDH)**

Com o objetivo de verificar o efeito dos produtos de secreção dos tecidos adiposos sobre a liberação de LDH pelas células Hepa-1c1c7, foi realizado um ensaio utilizando um kit específico fluorescente CytoTox-ONE (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. O ensaio consiste na mudança colorimétrica em decorrência da formação do produto final fluorescente Resofurina de modo proporcional às concentrações presentes de LDH. Em placa de 96 poços,  $5 \times 10^4$  células foram semeadas em placa por poço. Após as células aderirem, elas foram estimuladas com os produtos de secreção dos tecidos adiposos por 24 horas. Após o tempo de estímulo, o sobrenadante foi coletado e exposto ao substrato *mix* por 30 minutos a 37 °C, protegido da luz. Por fim, foi adicionada uma solução para parar a reação. A leitura foi feita em absorbâncias de 490 nm e 680 nm utilizando o espectrofotômetro Spectramax M3. A análise dos dados foi feita utilizando o percentual de citotoxicidade recomendado pelo fabricante. O controle experimental foi obtido expondo as células ao *Lysis buffer* do mesmo Kit. Para entender se o LDH quantificado era proveniente da célula ou do secretado dos tecidos adiposos, também foi feito dosagem dessa enzima proveniente apenas dos produtos de secreção dos tecidos adiposos.

Com esse ensaio, também foi analisado se as células Hepa-1c1c7, após estímulo com os produtos de secreção dos tecidos adiposos, liberam LDH por meio da via do NLRP3 e se o ROS seria o segundo sinal de ativação desse inflamassoma. Para isso, foi utilizado o inibidor de NLRP3, MCC950 (PZ0280, Sigma-Aldrich), na concentração de 10 µM e o inibidor de ROS, NAC, na concentração de 5 mM. Ambos inibidores foram incubados nas células durante 1 hora. Após esse período, as células foram estimuladas com os produtos de secreção dos tecidos adiposos durante 24 horas. Posteriormente, o LDH foi dosado seguindo os passos explicados acima.

#### **4.18 Ativação de caspase-1**

Para investigar se ocorre ativação de caspase-1 em células Hepa-1c1c7 em resposta ao tratamento com os produtos de secreção dos tecidos adiposos, foi realizado ensaio com o kit de FLICA FAM-YVAD-FMK (Immunochemistry), conforme as instruções do fabricante. Essa análise baseia-se no fato de que esse fluoróforo se liga aos quatro resíduos de aminoácidos expostos na caspase-1 ativa (YVAD) e fluoresce durante essa interação. Em placa de 96 poços,  $10^4$  células foram semeadas por poço e estimuladas por 24 horas. Após o tempo de estímulo com os produtos de secreção dos tecidos adiposos, as células foram coletadas, lavadas duas vezes em PBS 1 X, submetidas a incubação com o fluoróforo e analisadas em citômetro de fluxo (FACS CALIBUR, BD Biosciences). Os dados obtidos foram analisados utilizando o *software* FlowJo V10 (Tree Star Inc) e os gráficos plotados no *software* GraphPad Prism 7.

#### **4.19 Análises estatísticas**

A fim de se determinar se os dados seguem distribuição normal, foi utilizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Os dados que se apresentaram com distribuição normal (paramétricos) foram analisados utilizando o teste ANOVA e o pós-teste de Tukey. Já os dados que não seguiram distribuição normal (não-paramétricos) foram analisados utilizando o teste de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn. Valores de  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos. Os gráficos foram confeccionados utilizando GraphPad Prism 7.

Para as análises com os inibidores de NLRP3 e ROS, foi realizado Test T, uma vez que a pergunta foi feita entre dois grupos, par-a-par.

#### **4.20 Abreviações**

Para melhor compreensão deste trabalho, os estímulos foram abreviados da seguinte forma: UNS: células não estimuladas; WT BAT: estímulo com os produtos de secreção do tecido adiposo marrom de camundongos selvagens; WT WAT: estímulo com os produtos de secreção do tecido adiposo branco de camundongos selvagens; ASC<sup>-/-</sup> BAT: estímulo com os produtos de secreção do tecido adiposo marrom de camundongos *knockouts* para ASC; ASC<sup>-/-</sup> WAT: estímulo com os produtos de secreção do tecido adiposo branco de camundongos *knockouts* para ASC.

## 5. Resultados

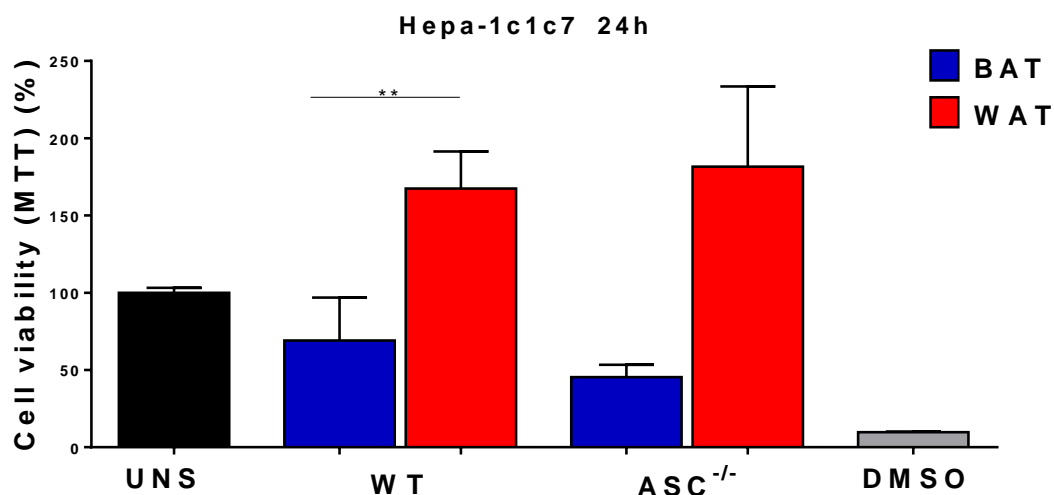
### 5.1 Os produtos de secreção do tecido adiposo branco aumentam a viabilidade celular mitocondrial de células Hepa-1c1c7

Neste primeiro bloco de resultados deste trabalho foi investigada a influência dos produtos de secreção dos tecidos adiposos sobre parâmetros carcinogênicos do HCC.

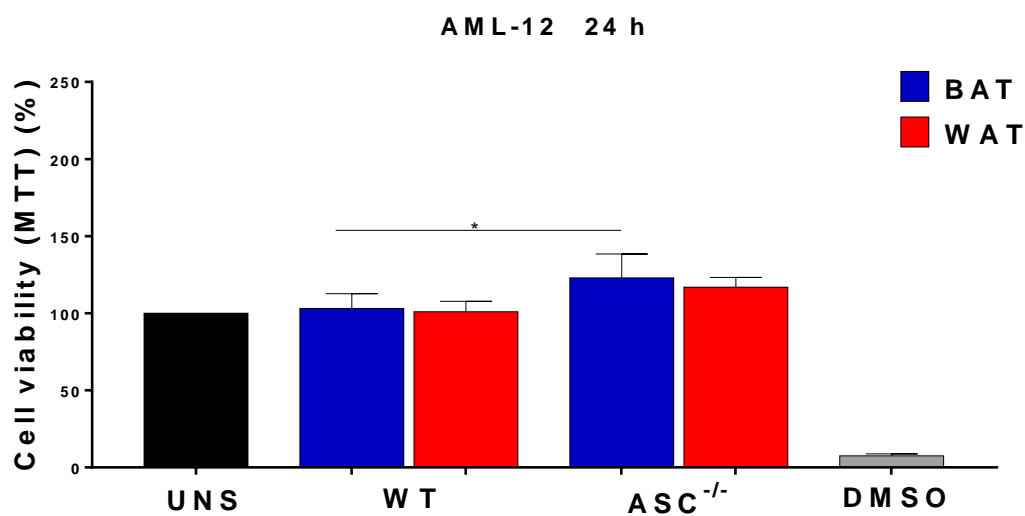
Inicialmente, buscou-se identificar se esses estímulos alterariam a viabilidade celular mitocondrial de células Hepa-1c1c7 e AML-12. Os resultados obtidos com as células de linhagem tumoral (Hepa-1c1c7) mostraram que o estímulo com WT WAT, por 24 horas, aumentou a viabilidade celular mitocondrial comparado com WT BAT (**Figura 12 A**). Além disso, a proteína adaptadora ASC desses tecidos parece não participar desse fenômeno.

Em relação às células não tumorais (AML-12), não há diferenças na viabilidade celular mitocondrial após o estímulo com WT BAT e WT WAT. O estímulo com ASC<sup>-/-</sup> BAT, aumentou a viabilidade celular mitocondrial comparado com WT BAT (**Figura 12 B**).

A)



B)



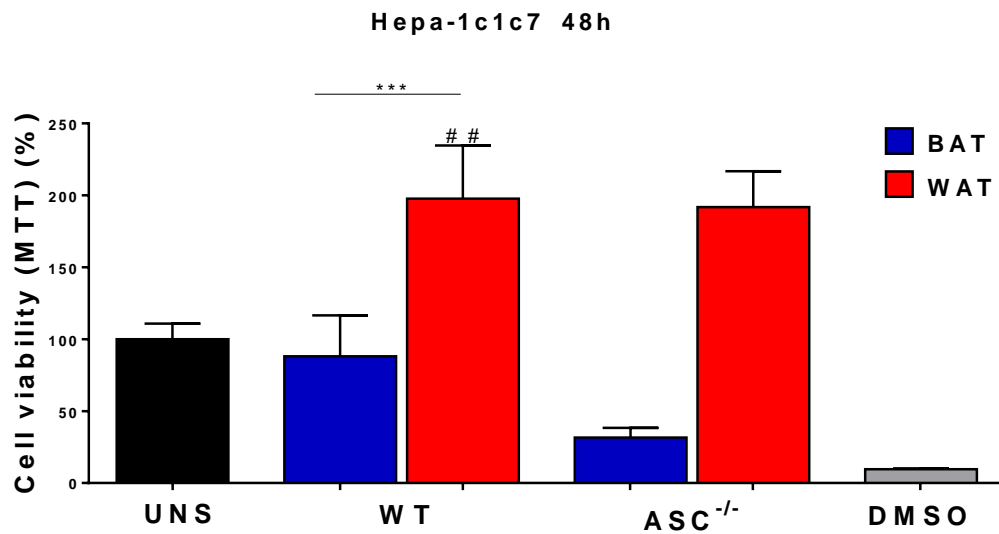
**Figura 12. Efeito do estímulo por 24 horas com os produtos de secreção dos tecidos adiposos sobre a viabilidade celular mitocondrial de células de linhagem tumoral (Hepa-1c1c7) e não tumoral (AML-12).** (A) Células neoplásicas Hepa-1c1c7 estimuladas por 24 horas com os produtos de secreção de WT BAT, WT WAT, ASC<sup>-/-</sup> BAT e ASC<sup>-/-</sup> WAT. (B) Células não tumorais AML-12 estimuladas por 24 horas com os produtos de secreção de WT BAT, WT WAT, ASC<sup>-/-</sup> BAT e ASC<sup>-/-</sup> WAT. DMSO: controle experimental. (\*) diferenças estatísticas entre os grupos estimulados com produtos de secreção dos tecidos adiposos. p<0,05 (um símbolo), p<0,01 (dois símbolos).

Para verificar se o fenômeno se mantinha, decidimos observar a viabilidade celular mitocondrial das duas linhagens após estímulo por 48 horas com os produtos de secreção dos tecidos adiposos (**Figura 13 A**).

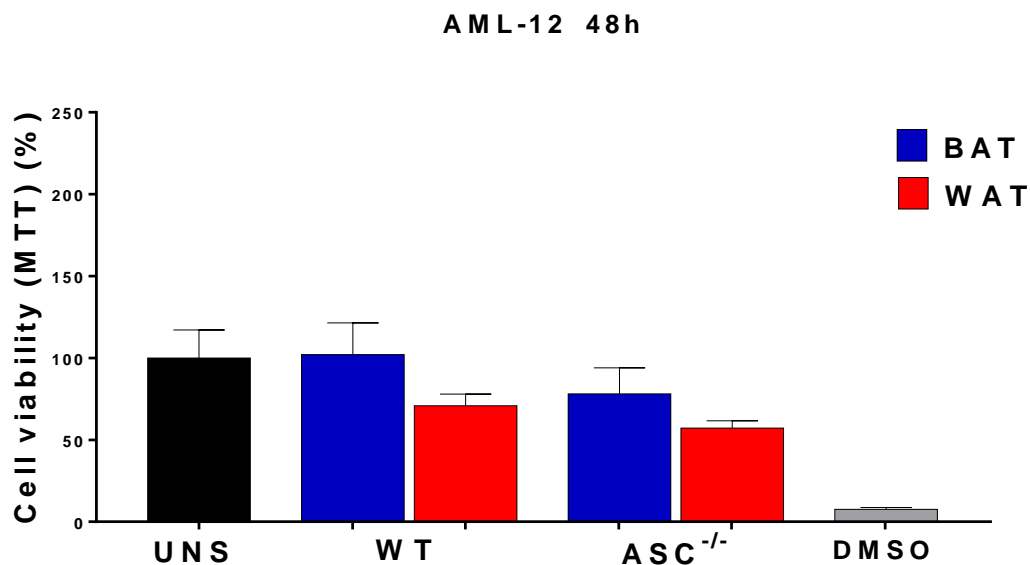
Para as células de linhagem tumoral (Hepa-1c1c7) observamos que o estímulo WT WAT aumentou a viabilidade celular mitocondrial comparado com WT BAT e o UNS. Além disso, a proteína adaptadora ASC desses tecidos parece não participar desse fenômeno. Já para as células não tumorais (AML-12) não houve diferenças significativas entre os estímulos (**Figura 13 B**).



A)



B)



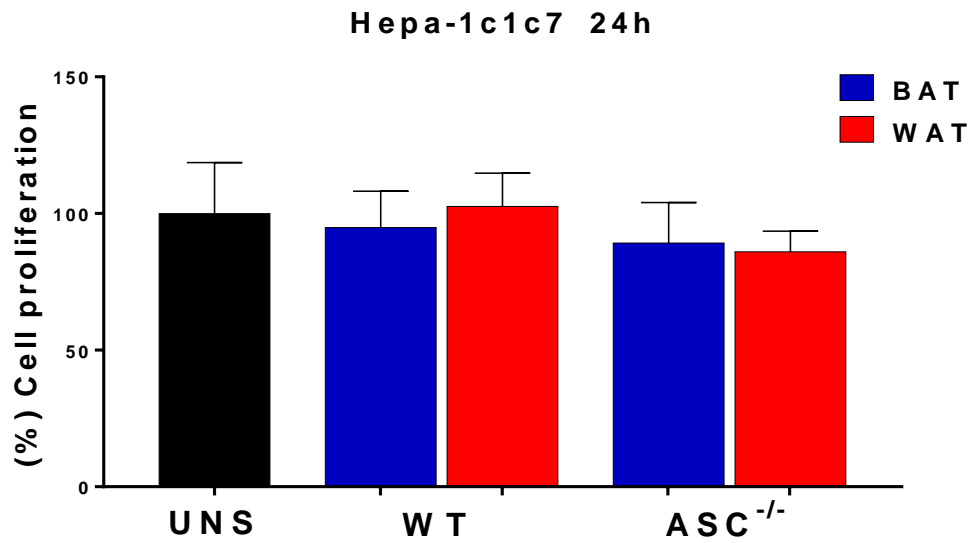
**Figura 13. Impacto do estímulo por 48 horas com os produtos de secreção dos tecidos adiposos sobre a viabilidade celular mitocondrial de células de linhagem tumoral (Hepa-1c1c7) e não tumoral (AML-12).** (A) Células neoplásicas Hepa-1c1c7 estimuladas por 48 horas com os produtos de secreção de WT BAT, WT WAT, ASC<sup>-/-</sup> BAT e ASC<sup>-/-</sup> WAT. (B) Células não tumorais AML-12 estimuladas por 48 horas com os produtos de secreção de WT BAT, WT WAT, ASC<sup>-/-</sup> BAT e ASC<sup>-/-</sup> WAT (B). DMSO: controle experimental. (\*) diferenças estatísticas entre os grupos estimulados com produto de secreção dos tecidos adiposos. (#) diferenças estatísticas entre o UNS e os grupos estimulados com produto de secreção dos tecidos adiposos. p<0,01 (dois símbolos) e p<0,001 (três símbolos).

## **5.2 Os produtos de secreção do tecido adiposo marrom diminuem a proliferação de células Hepa-1c1c7 com participação da ASC**

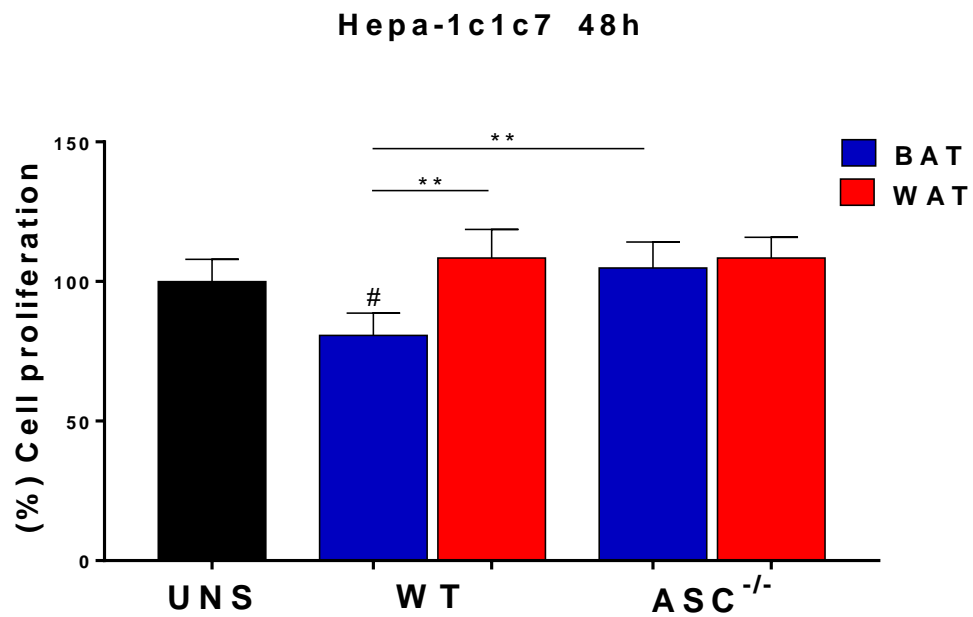
Tendo em vista que houve diferenças na viabilidade celular mitocondrial entre as células neoplásicas estimuladas com BAT e WAT, nós nos questionamos se os produtos de secreção desses tecidos adiposos possuem efeito diferencial sobre a proliferação dessas células neoplásicas.

Após estímulo por 24 horas, nota-se que não houve diferenças entre os grupos (**Figura 14 A**). Já quando o tempo de estímulo foi aumentado para 48 horas, foi visto que o WT BAT diminuiu a proliferação celular comparado com os estímulos WT WAT e UNS. Foi observado também que a ausência da proteína ASC no BAT aumentou a proliferação comparado com o selvagem (WT BAT) (**Figura 14 B**). Desse modo, a proteína adaptadora ASC desse tecido parece ser importante para diminuir a proliferação do HCC.

A)



B)

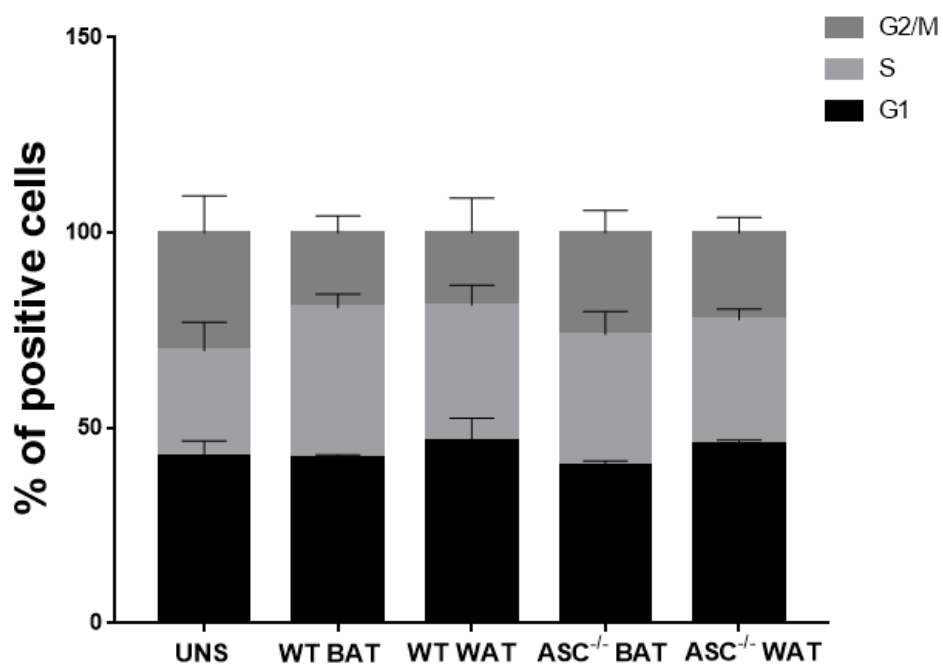


**Figura 14. Influência dos produtos de secreção dos tecidos adiposos sobre a proliferação de células de linhagem tumoral (Hepa-1c1c7).** (A) Células neoplásicas Hepa-1c1c7 estimuladas por 24 horas com os produtos de secreção de WT BAT, WT WAT, ASC<sup>-/-</sup> BAT e ASC<sup>-/-</sup> WAT. (B) Células neoplásicas Hepa-1c1c7 estimuladas por 48 horas com os produtos de secreção de WT BAT, WT WAT, ASC<sup>-/-</sup> BAT e ASC<sup>-/-</sup> WAT (B). (\*) diferenças estatísticas entre os grupos estimulados com produto de secreção dos tecidos adiposos. (#) diferenças estatísticas entre o UNS e os grupos estimulados com produto de secreção dos tecidos adiposos. p<0,05 (um símbolo), p<0,01 (dois símbolos).

### **5.3 Os produtos de secreção dos tecidos adiposos não modulam o ciclo celular de células Hepa-1c1c7**

Visto que o estímulo WT BAT, após 48 horas, foi capaz de alterar a proliferação da Hepa-1c1c7, resolvemos analisar se os produtos de secreção dos tecidos adiposos são capazes de alterar a progressão do ciclo celular nessas células (**Figura 15**). Os resultados obtidos mostraram que, após o estímulo por 48 horas, não houve diferenças significativas nas fases G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>/M do ciclo celular dessas células neoplásicas.

## Hepa-1c1c7 48h



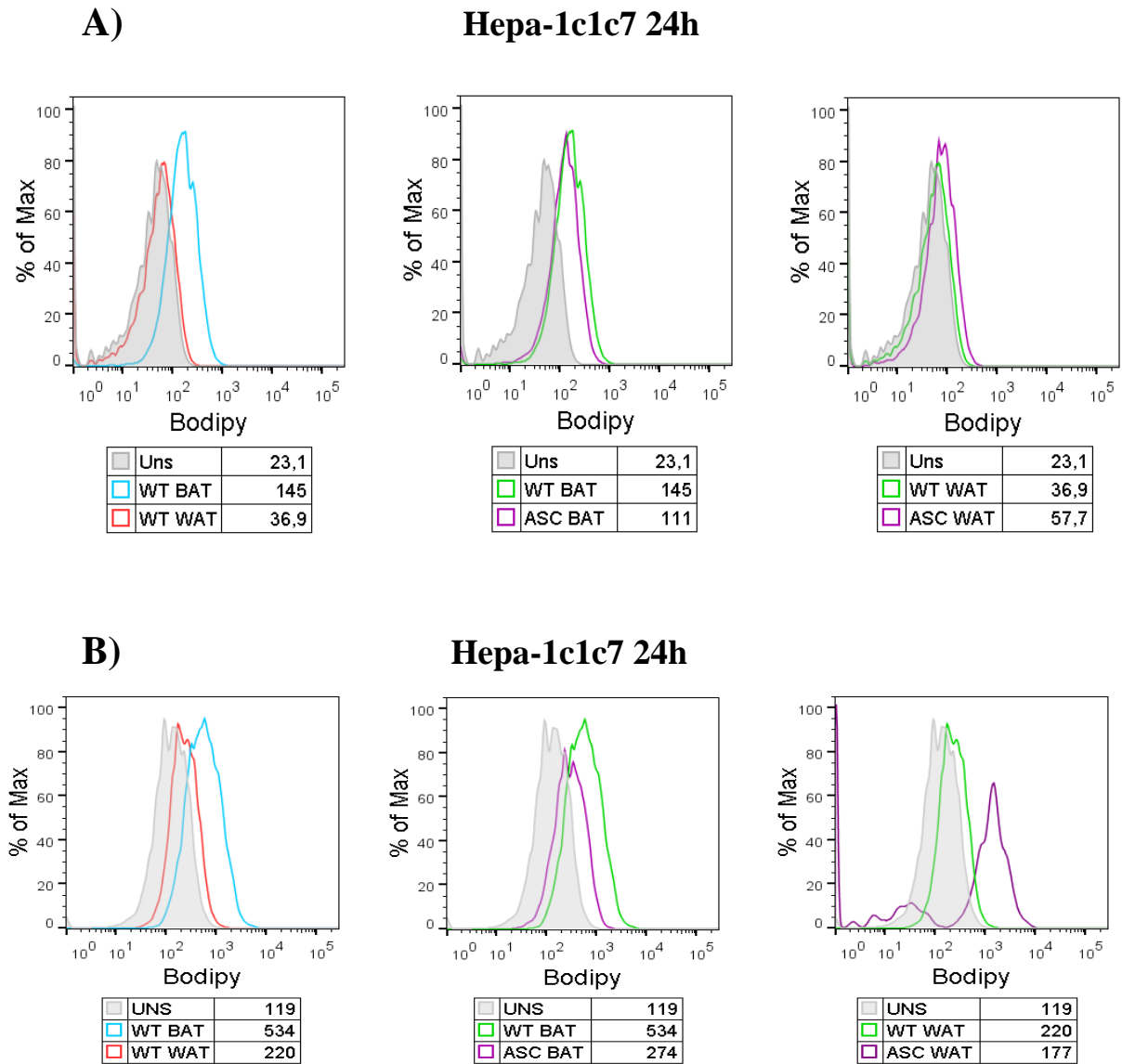
**Figura 15.** Efeito do estímulo por 48 horas com os produtos de secreção dos tecidos adiposos sobre o ciclo celular de células neoplásicas (Hepa-1c1c7). Células neoplásicas Hepa-1c1c7 estimuladas por 48 horas com os produtos de secreção de WT BAT e WT WAT. Não houve diferenças significativas entre os grupos.

#### **5.4 Os produtos de secreção do tecido adiposo marrom aumentam a biogênese de corpúsculos lipídicos de células Hepa-1c1c7 com participação da ASC**

Os corpúsculos lipídicos (CLs) estão relacionados, entre outras coisas, com o metabolismo de energia, estresse celular, bem como também serve como um marcador de ativação inflamatória (Cruz et al., 2020). Decidimos marcar essas organelas nas células de HCC após o estímulo com os produtos de secreção dos tecidos adiposos.

Na marcação por bodipy e leitura no citômetro de fluxo, foi observado no período de 24 horas de estímulo (**Figura 16 A**), que o WT BAT induziu maior biogênese de CLs comparado com o WT WAT. Em relação a ausência da proteína ASC nesses tecidos, notou-se que o ASC<sup>-/-</sup> BAT reduziu a biogênese de CLs comparado com o selvagem (WT BAT). Já o ASC<sup>-/-</sup> WAT, aumentou a biogênese de CLs comparado com o selvagem (WT WAT). Desse modo, a proteína adaptadora ASC desses tecidos parece participar desse fenômeno.

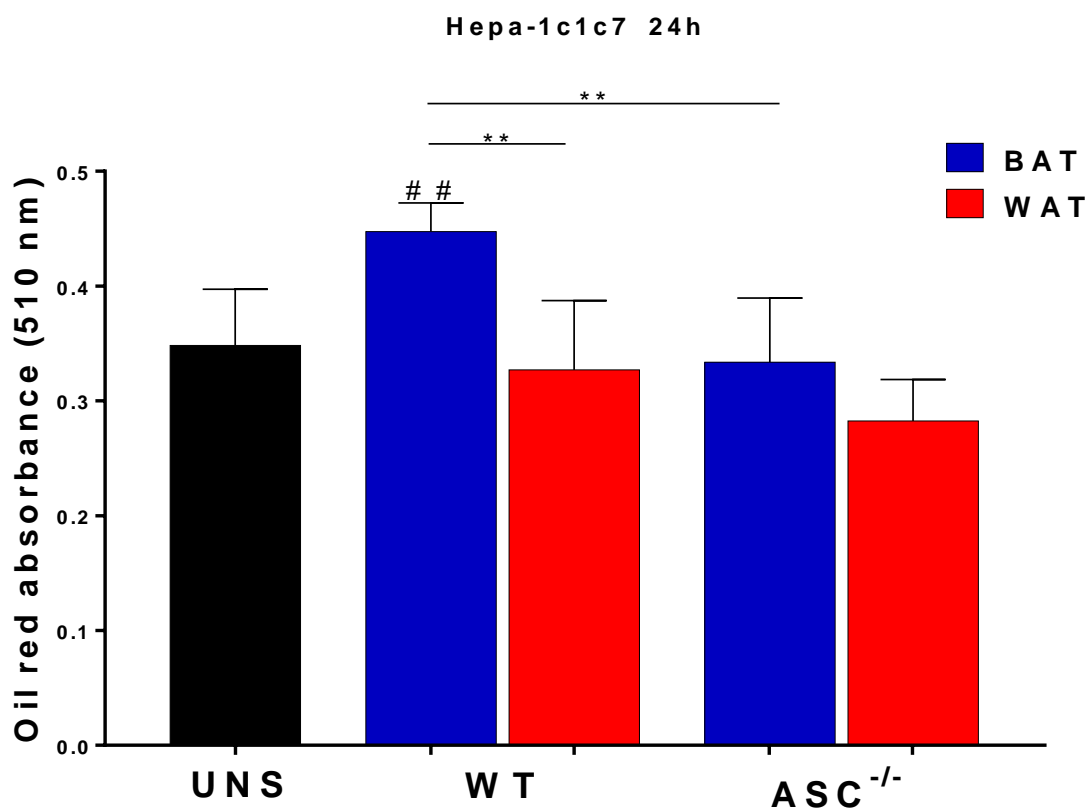
Em relação ao estímulo por 48 horas (**Figura 16 B**), foi visto que o fenômeno se mantém. O estímulo WT BAT induziu maior biogênese de CLs comparado com WT WAT. Foi observado também que ASC<sup>-/-</sup> BAT reduziu a biogênese de CLs comparado com WT BAT. Entretanto, nesse tempo de estímulo notou-se que o ASC<sup>-/-</sup> WAT reduziu a biogênese de CLs comparado com WT WAT. Portanto, em ambos os tecidos, a proteína adaptadora ASC parece participar da biogênese de CLs.



**Figura 16. Impacto dos produtos de secreção dos tecidos adiposos sobre a biogênese de corpúsculos lipídicos em células de linhagem tumoral (Hepa-1c1c7) por citometria.** (A) Células neoplásicas Hepa-1c1c7 estimuladas por 24 horas com os produtos de secreção de WT BAT, WT WAT, ASC<sup>-/-</sup> BAT e ASC<sup>-/-</sup> WAT. (B) Células neoplásicas Hepa-1c1c7 estimuladas por 48 horas com os produtos de secreção de WT BAT, WT WAT, ASC<sup>-/-</sup> BAT e ASC<sup>-/-</sup> WAT (B). As células neoplásicas foram submetidas as mesmas condições e foram marcadas com a sonda lipofílica Bodipy (FL-1) e adquirida em citômetro FACS Verse. Os valores são referentes às médias de intensidade de fluorescência (MFI).

Com o objetivo de avaliar se o fenômeno visto por citometria de fluxo se mantinha, foi realizada marcação dos CLs com o corante Oil red O e leitura por espectrofotômetro por tempo de estímulo de 24 horas (**Figura 17**). Observamos que o WT BAT induziu maior biogênese de CLs comparado com o WT WAT e UNS. Além disso, o estímulo ASC<sup>-/-</sup> BAT diminuiu a biogênese de CLs comparado com o WT BAT. Isso indica, mais uma vez, que a proteína adaptadora ASC desse tecido parece participar desse processo.

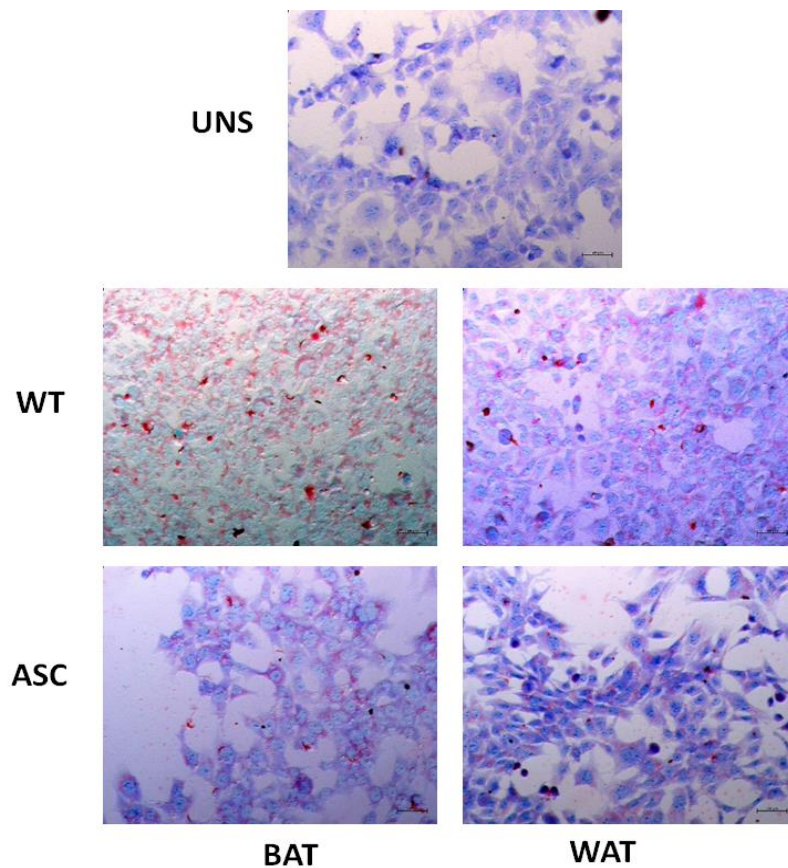




**Figura 17. Influência dos produtos de secreção dos tecidos adiposos sobre a biogênese de corpúsculos lipídicos em células de linhagem tumoral (Hepa-1c1c7) por espectrofotometria.** As células neoplásicas Hepa-1c1c7 foram estimuladas por 24 horas com os produtos de secreção de WT BAT, WT WAT, ASC<sup>-/-</sup> BAT e ASC<sup>-/-</sup> WAT. Os corpúsculos lipídicos foram marcados com o corante Oil red O e leitura feita por espectrofotômetro a 510 nm. (\*) diferenças estatísticas entre os grupos estimulados com produto de secreção dos tecidos adiposos. (#) diferenças estatísticas entre o UNS e os grupos estimulados com produto de secreção dos tecidos adiposos. p<0,05 (um símbolo), p<0,01 (dois símbolos).

Para confirmar os achados de que o WT BAT induziria mais CLs que o WT WAT, o fenômeno foi avaliado por microscopia de luz (**Figura 18**) nos tempos de estímulo por 24 horas. Na microscopia de luz, observa-se que o corante Oil red O, em vermelho, estava presente em maior quantidade no estímulo WT BAT comparado com WT WAT, ou seja, esse estímulo induziu maior biogênese de CLs. Além disso nota-se que o estímulo ASC<sup>-/-</sup> BAT diminuiu a biogênese de CLs comparado com WT BAT.

### Hepa-1c1c7 24h

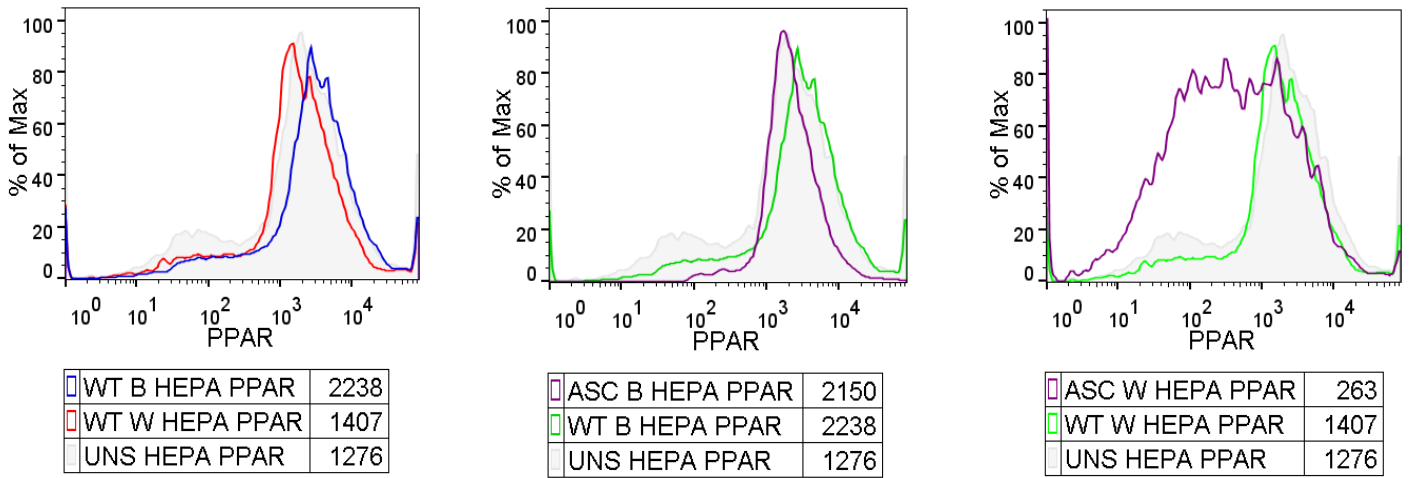


**Figura 18. Impacto dos produtos de secreção dos tecidos adiposos sobre a biogênese de corpúsculos lipídicos em células de linhagem tumoral (Hepa-1c1c7) por microscopia de luz.** Células neoplásicas Hepa-1c1c7 estimuladas por 24 horas com os produtos de secreção de WT BAT, WT WAT, ASC<sup>-/-</sup> BAT e ASC<sup>-/-</sup> WAT, marcadas com Oil red O (em vermelho) e analisadas em microscopia de luz. Os corpúsculos lipídicos estão marcados em vermelho.

### **5.5 Os produtos de secreção do tecido adiposo marrom aumentam os níveis de PPAR $\gamma$ em células Hepa-1c1c7 com participação da ASC**

Para concluir se o estímulo WT BAT estaria induzindo maior biogênese de CLs, foram avaliados os níveis de PPAR $\gamma$ , que é um fator de transcrição relacionado com o acúmulo de lipídeos nos hepatócitos (Lee et al., 2018). Observa-se que, após o estímulo por 24 horas com os produtos de secreção dos tecidos adiposos, as células neoplásicas estimuladas com WT BAT produziram maiores níveis de PPAR $\gamma$  comparado com o WT WAT e UNS. O estímulo ASC<sup>-/-</sup> BAT diminuiu os níveis de PPAR $\gamma$  comparado com o selvagem (WT BAT), bem como o estímulo ASC<sup>-/-</sup> WAT também diminuiu os níveis desse fator de transcrição comparado com o selvagem (WT WAT). Desse modo, os dados obtidos corroboram a hipótese de que a proteína adaptadora ASC desses tecidos participa do acúmulo de lipídeos nessas células neoplásicas. (**Figura 19**).

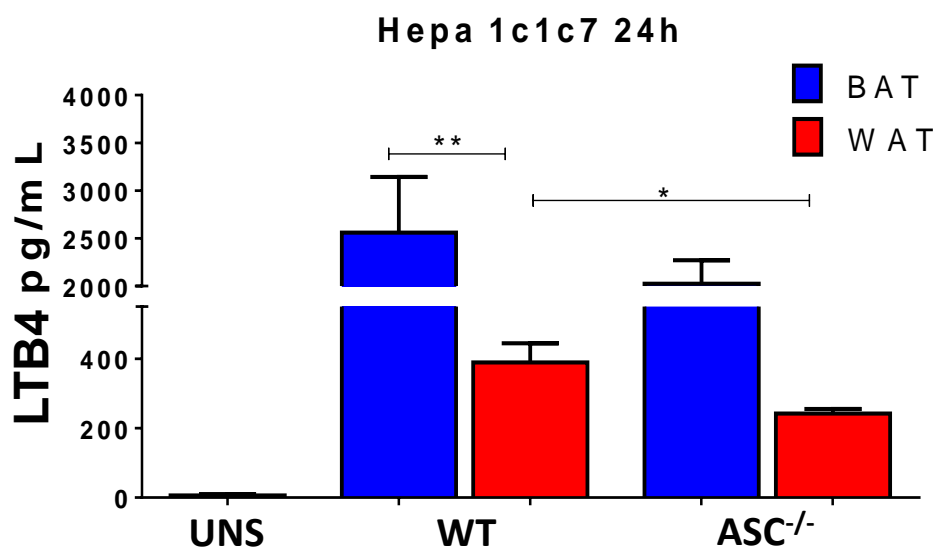
## Hepa-1c1c7 24h



**Figura 19. Efeito dos produtos de secreção dos tecidos adiposos sobre os níveis de PPAR $\gamma$  em células de linhagem tumoral (Hepa-1c1c7).** Células neoplásicas Hepa-1c1c7 estimuladas por 24 horas com os produtos de secreção de WT BAT, WT WAT, ASC<sup>-/-</sup> BAT e ASC<sup>-/-</sup> WAT. As células neoplásicas foram submetidas as mesmas condições e foram marcadas com o anticorpo anti-PPAR $\gamma$  e adquirida em citômetro FACS Verse. Os valores são referentes às médias de intensidade de fluorescência (MFI).

### **5.6 Os produtos de secreção do tecido adiposo marrom aumentam a liberação de LTB<sub>4</sub> em células Hepa-1c1c7**

Uma vez que a síntese de mediadores inflamatórios como prostaglandinas e leucotrienos é feita por enzimas presentes nos corpúsculos lipídicos, decidimos fazer a dosagem de um importante leucotrieno, o LTB<sub>4</sub>. Esse eicosanoide foi dosado nas células neoplásicas após o estímulo por 24 horas com os produtos de secreção dos tecidos adiposos. Como resultado, foi notado que o estímulo WT BAT induziu uma maior liberação de LTB<sub>4</sub> nessas células neoplásicas comparado com WT WAT e UNS. Além disso, vemos que o estímulo ASC<sup>-/-</sup> WAT reduziu a liberação de LTB<sub>4</sub> nessas células comparado com o WT WAT (**Figura 20**).

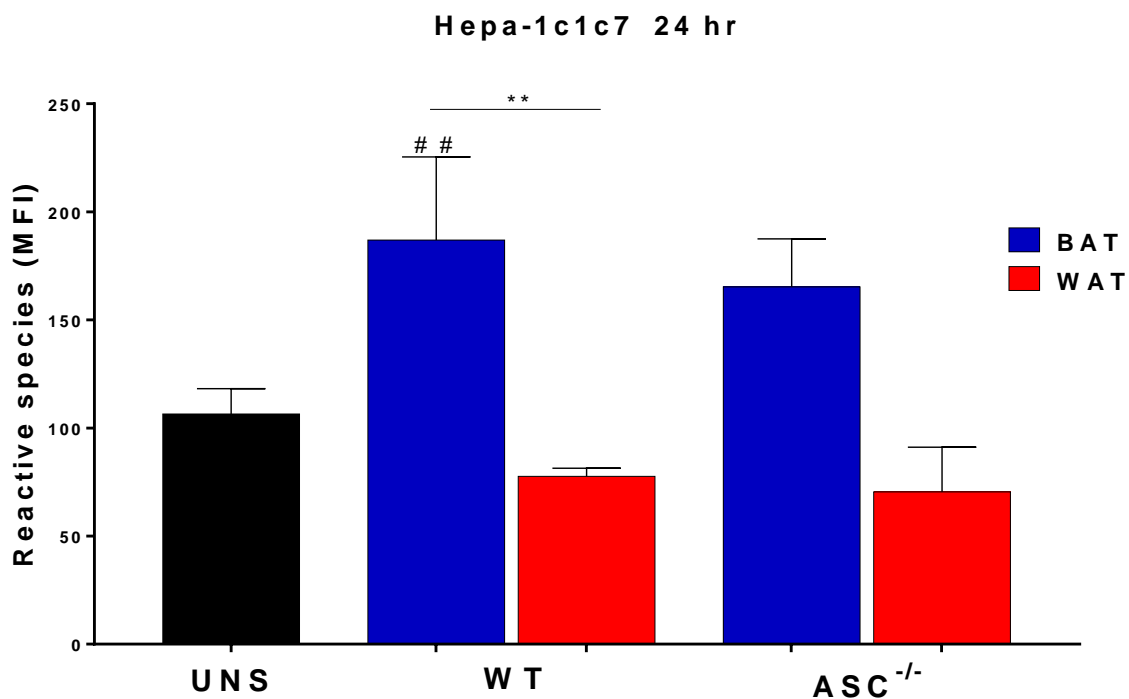


**Figura 20. Influência dos produtos de secreção dos tecidos adiposos sobre a liberação de LTB4 em células de linhagem tumoral (Hepa-1c1c7).** Células neoplásicas Hepa-1c1c7 estimuladas por 24 horas com os produtos de secreção de WT BAT, WT WAT, ASC<sup>-/-</sup> BAT e ASC<sup>-/-</sup> WAT. (\*) diferenças estatísticas entre os grupos estimulados com produto de secreção dos tecidos adiposos.  $p < 0,05$  (um símbolo) e  $p < 0,01$  (dois símbolos).

### **5.7 Os produtos de secreção do tecido adiposo marrom aumentam a produção de espécies reativas em células Hepa-1c1c7**

Visto que os corpúsculos lipídicos podem estar relacionados com o estresse celular (Lee et al., 2013), e dessa forma, com a formação de espécies reativas (RS), foi medido a produção de RS das células neoplásicas após o estímulo por 24 horas com os produtos de secreção dos tecidos adiposos (**Figura 21**). O estímulo WT BAT induziu maior produção de RS comparado com o UNS e WT WAT. A ausência da proteína ASC nesses tecidos não modulou as RS no HCC.

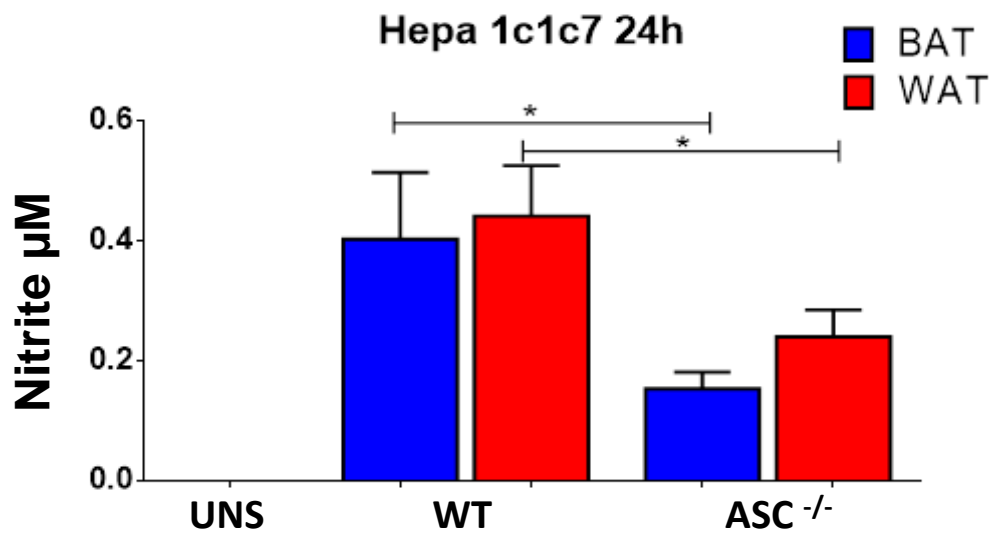




**Figura 21. Impacto dos produtos de secreção dos tecidos adiposos sobre a produção de espécies reativas em células de linhagem tumoral (Hepa-1c1c7).** Células neoplásicas Hepa-1c1c7 estimuladas por 24 horas com os produtos de secreção de WT BAT, WT WAT, ASC<sup>-/-</sup> BAT e ASC<sup>-/-</sup> WAT. (\*) diferenças estatísticas entre os grupos estimulados com produto de secreção dos tecidos adiposos. (#) diferenças estatísticas entre o UNS e os grupos estimulados com produto de secreção dos tecidos adiposos.  $p < 0,05$  (um símbolo),  $p < 0,01$  (dois símbolos).

### **5.8 A proteína adaptadora ASC dos tecidos adiposos branco e marrom participa da indução de nitrito em células Hepa-1c1c7**

Em células neoplásicas, o óxido nítrico (NO) está relacionado, entre outras coisas, com o crescimento tumoral, angiogênese, invasão e dano ao DNA (Lala e Chakraborty, 2001). Desse modo, afim de se entender se os produtos de secreção dos tecidos adiposos poderiam modular NO nessas células neoplásicas, o subproduto do NO, nitrito, foi dosado após 24 horas de estímulo (**Figura 22**). Foi observado que não houve diferenças significativas entre os estímulos WT BAT e WT WAT na produção de nitrito. Entretanto, a ausência da proteína adaptadora ASC em ambos tecidos reduziram a secreção de nitrito dessas células neoplásicas. Portanto, a proteína ASC desses tecidos parece fazer parte desse fenômeno.



**Figura 22. Efeito dos produtos de secreção dos tecidos adiposos sobre a produção de nitrito em células de linhagem tumoral (Hepa-1c1c7).** Células neoplásicas Hepa-1c1c7 estimuladas por 24 horas com os produtos de secreção de WT BAT, WT WAT, ASC<sup>-/-</sup> BAT e ASC<sup>-/-</sup> WAT. (\*) diferenças estatísticas entre os grupos estimulados com produto de secreção dos tecidos adiposos.  $p < 0,05$  (um símbolo).

### **5.9 Influência dos produtos de secreção dos tecidos adiposos sobre a secreção de IL-6 de células Hepa-1c1c7**

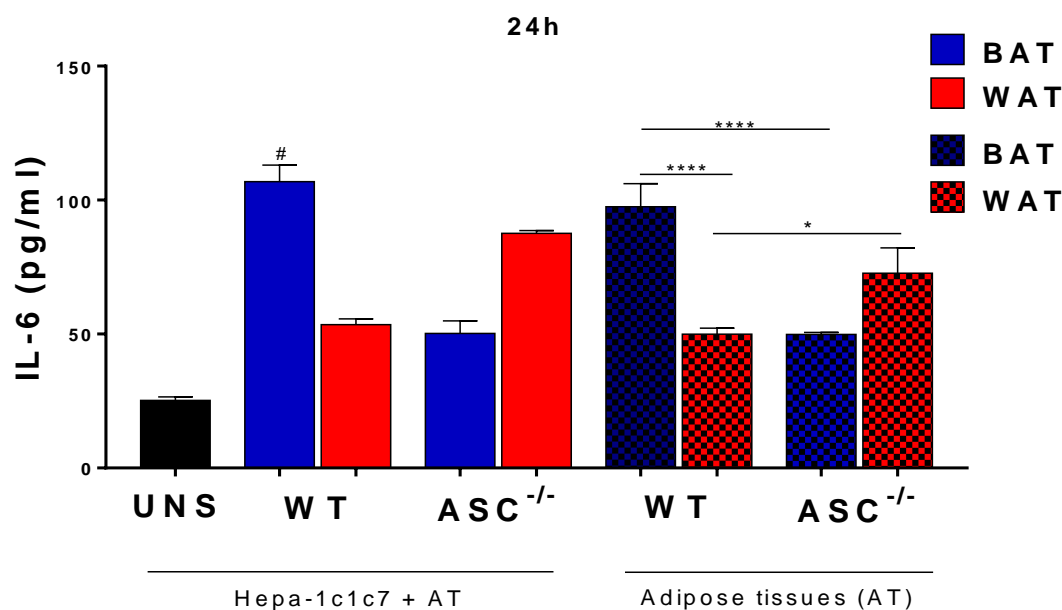
Dado que a IL-6 é uma citocina pleiotrópica com efeitos no fígado e tecidos adiposos (Mauer et al., 2015), resolvemos dosá-la. Foi analisada a IL-6 advinda da interação das células Hepa-1c1c7 com os produtos de secreção dos tecidos adiposos (**Figura 23 A**), dos produtos de secreção dos tecidos adiposos (sem células) (**Figura 23 A**) e do que foi secretado pelas células após o estímulo (**Figura 23 B**). Isso foi feito para entendermos se as citocinas dosadas são provenientes da célula ou dos produtos de secreção dos tecidos adiposos.

Na interação das células com os produtos de secreção dos tecidos adiposos, o estímulo WT BAT induziu maior liberação de IL-6, comparado com o UNS (**Figura 23 A**). Os valores do que é secretado apenas pelos tecidos adiposos são similares e seguem a mesma tendência do obtido pela interação entre a Hepa-1c1c7 com o secretado dos tecidos adiposos. Logo, parece que o que foi dosado é, majoritariamente, a IL-6 dos tecidos adiposos e não o que é secretado pelas células neoplásicas.

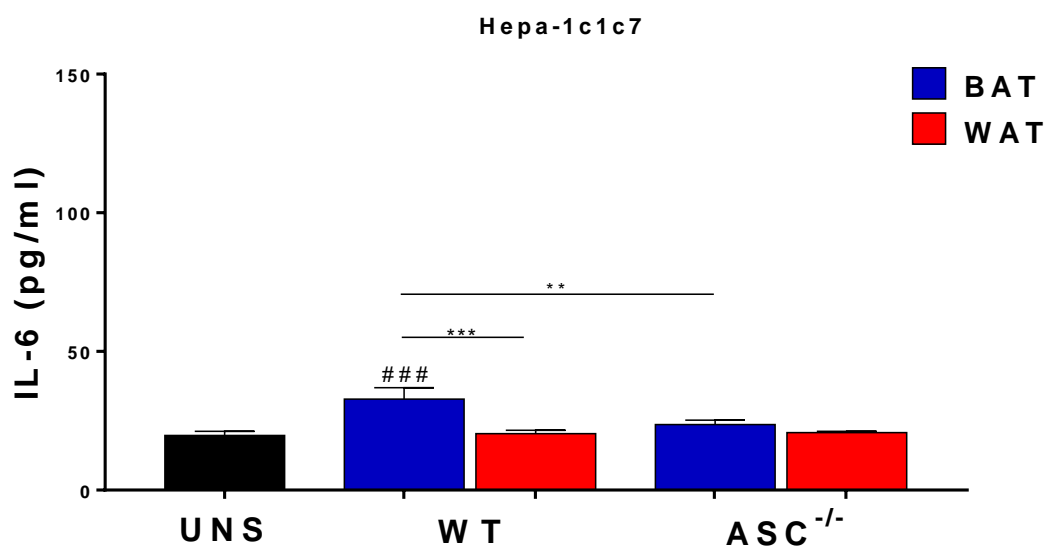
Em relação à IL-6 dos produtos de secreção dos tecidos adiposos (sem células) (**Figura 23 A**), o WT BAT é o tecido que liberou maiores níveis dessa citocina, comparado com o WT WAT. Além disso, a proteína ASC do BAT parece ser importante para a liberação de IL-6. Uma vez que, na ausência de ASC, ocorre diminuição da IL-6.

Após a coleta do sobrenadante da interação da Hepa-1c1c7 com os produtos de secreção dos tecidos adiposos, os poços foram lavados com PBS 1X e preenchidos com MEM  $\alpha$  (**Figura 23 B**). Depois de 24 horas, o sobrenadante do que foi secretado pela Hepa-1c1c7 foi coletado. As células que foram estimuladas anteriormente com o WT BAT foram as que mais secretaram IL-6 comparado com as que foram estimuladas previamente com WT WAT, ASC<sup>-/-</sup> BAT e o UNS.

A)



B)



**Figura 23. Influência dos produtos de secreção dos tecidos adiposos sobre a secreção de IL-6 de células Hepa-1c1c7.** (A) Células neoplásicas Hepa-1c1c7 estimuladas por 24 horas com os produtos de secreção de WT BAT, WT WAT, ASC<sup>-/-</sup> BAT e ASC<sup>-/-</sup> WAT. A IL-6 dos produtos de secreção dos tecidos adiposos (sem células) também foi dosada. (B) Após a coleta do sobrenadante da interação da Hepa-1c1c7 com os produtos de secreção dos tecidos adiposos, os poços foram lavados com PBS 1X e preenchidos com o meio de cultura dessas células. Depois de 24 horas, o sobrenadante do que foi secretado pela Hepa-1c1c7 foi coletado. (\*) diferenças estatísticas entre os grupos estimulados com produto de secreção dos tecidos adiposos. (#) diferenças estatísticas entre o UNS e os grupos estimulados com produto de secreção dos tecidos adiposos. p<0,05 (um símbolo), p<0,01 (dois símbolos), p<0,001 (três símbolos), p<0,0001 (quatro símbolos).

### **5.10 Os produtos de secreção do tecido adiposo marrom induzem morte por apoptose nas células Hepa-1c1c7 com participação da ASC**

A partir daqui, iniciaremos o segundo bloco deste trabalho, no qual buscamos investigar vias de morte celular do HCC, induzidas pelos produtos de secreção dos tecidos adiposos.

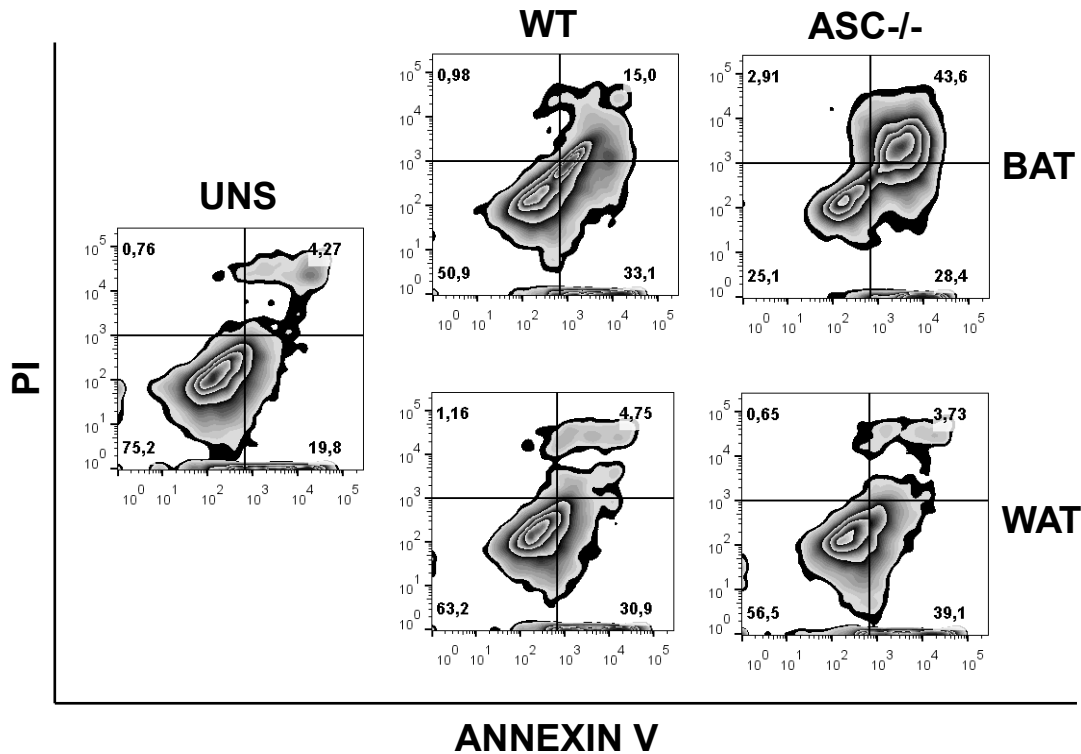
Tendo em vista que os experimentos apresentados até agora deram indícios de que o BAT possivelmente atua de modo antitumoral, e que a proteína ASC nesse tecido desempenha um papel importante, decidimos analisar o perfil de morte celular de células Hepa-1c1c7 e AML-12 após o estímulo com os produtos de secreção dos tecidos adiposos.

Na célula tumoral (Hepa-1c1c7) no período de 24 horas de estímulo, observamos que WT BAT induziu 49,08% de morte, sendo que desse total, 33,1% foi por apoptose. Ao comparar esse resultado com o estímulo WT WAT, esse tecido reduziu o número de morte para 36,81%, sendo que desse total, 30,9% foi morte por apoptose. Em relação à ausência da proteína ASC nos tecidos adiposos, vemos que o estímulo ASC<sup>-/-</sup> BAT induziu 74,91% de morte nessas células neoplásicas, sendo que desse total, 43,6% foi morte lítica. Já o estímulo ASC<sup>-/-</sup> WAT induziu 43,48% de morte, sendo que desse total, 39,1% foi morte por apoptose (**Figura 24 A**).

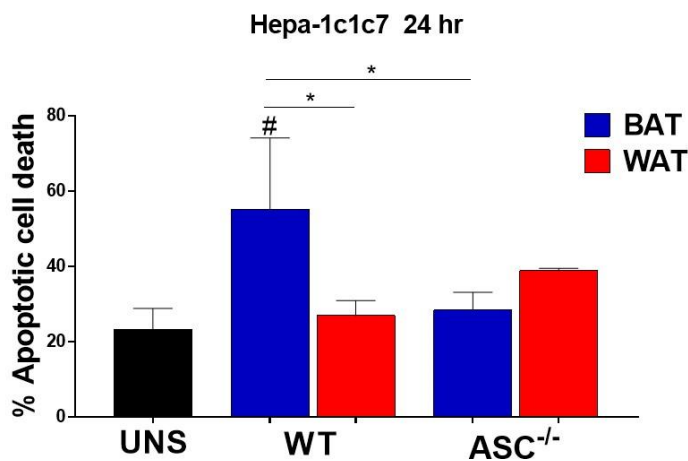
Ao fazer a análise estatística, n=3, observamos que o estímulo WT BAT induziu maior porcentagem de apoptose na Hepa-1c1c7, comparado com o UNS, WT WAT e ASC<sup>-/-</sup> BAT (**Figura 24 B**). Em relação à porcentagem de morte lítica (**Figura 24 C**), o estímulo WT BAT induziu maior morte lítica comparado com o UNS. Nota-se também que o estímulo ASC<sup>-/-</sup> BAT parece ter induzido aumento de morte lítica nas células neoplásicas comparado com o selvagem. Entretanto, não foi possível observar diferença estatística devido ao desvio padrão.

A)

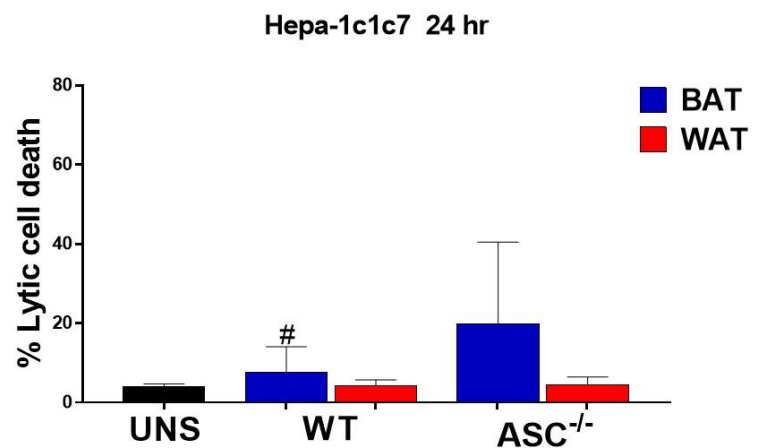
Hepa-1c1c7 24h



B)



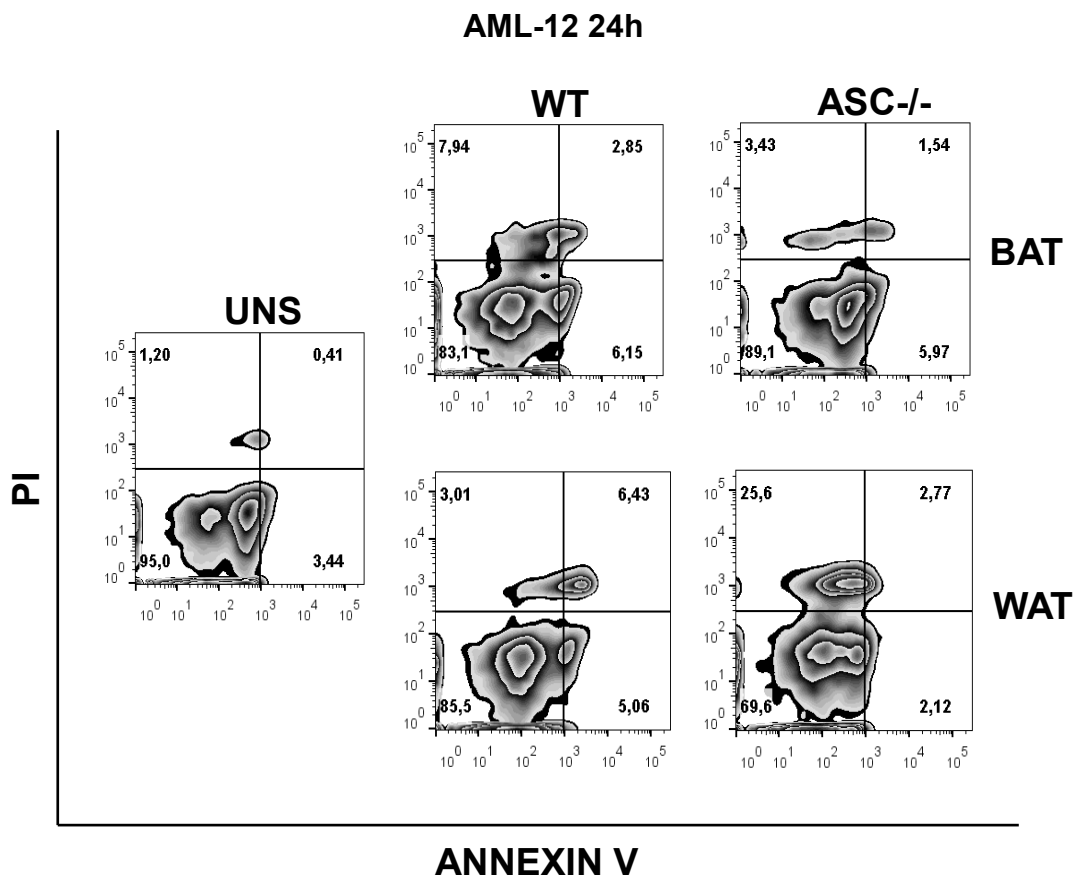
C)



**Figura 24. Impacto do estímulo por 24 horas com os produtos de secreção dos tecidos adiposos sobre o perfil de morte da linhagem tumoral Hepa-1c1c7.** (A) Células neoplásicas Hepa-1c1c7 estimuladas por 24 horas com os produtos de secreção de WT BAT, WT WAT, ASC<sup>-/-</sup> BAT e ASC<sup>-/-</sup> WAT. Após estímulo, as células foram marcadas com Anexina V e Iodeto de Propídeo. (B) Análise estatística, n=3, de morte por apoptose em células Hepa-1c1c7 sob estímulo com os produtos de secreção de WT BAT, WT WAT, ASC<sup>-/-</sup> BAT e ASC<sup>-/-</sup> WAT. (C) Análise estatística, n=3, de morte lítica em células Hepa-1c1c7 sob estímulo com os produtos de secreção de WT BAT, WT WAT, ASC<sup>-/-</sup> BAT e ASC<sup>-/-</sup> WAT. (\*) diferenças estatísticas entre os grupos estimulados com produto de secreção dos tecidos adiposos. (#) diferenças estatísticas entre o UNS e os grupos estimulados com produto de secreção dos tecidos adiposos. p<0,05 (um símbolo).

Em relação às células não tumorais (AML-12), no período de 24 horas de estímulo, vemos que WT BAT induziu apenas 16,94% de morte nessas células, sendo que, desse total, 6,15% foi por apoptose. Enquanto isso, WT WAT induziu 14,5% de morte, sendo que desse total, 5,06% foi por apoptose. Quanto à ausência da proteína ASC nos tecidos adiposos, o estímulo ASC<sup>-/-</sup> BAT induziu 10,94% de morte, sendo que, desse total, 6,43% foi morte lítica. Já o estímulo ASC<sup>-/-</sup> WAT induziu 30,49% de morte, sendo que desse total, 25,6% foi por necrose (**Figura 25**).

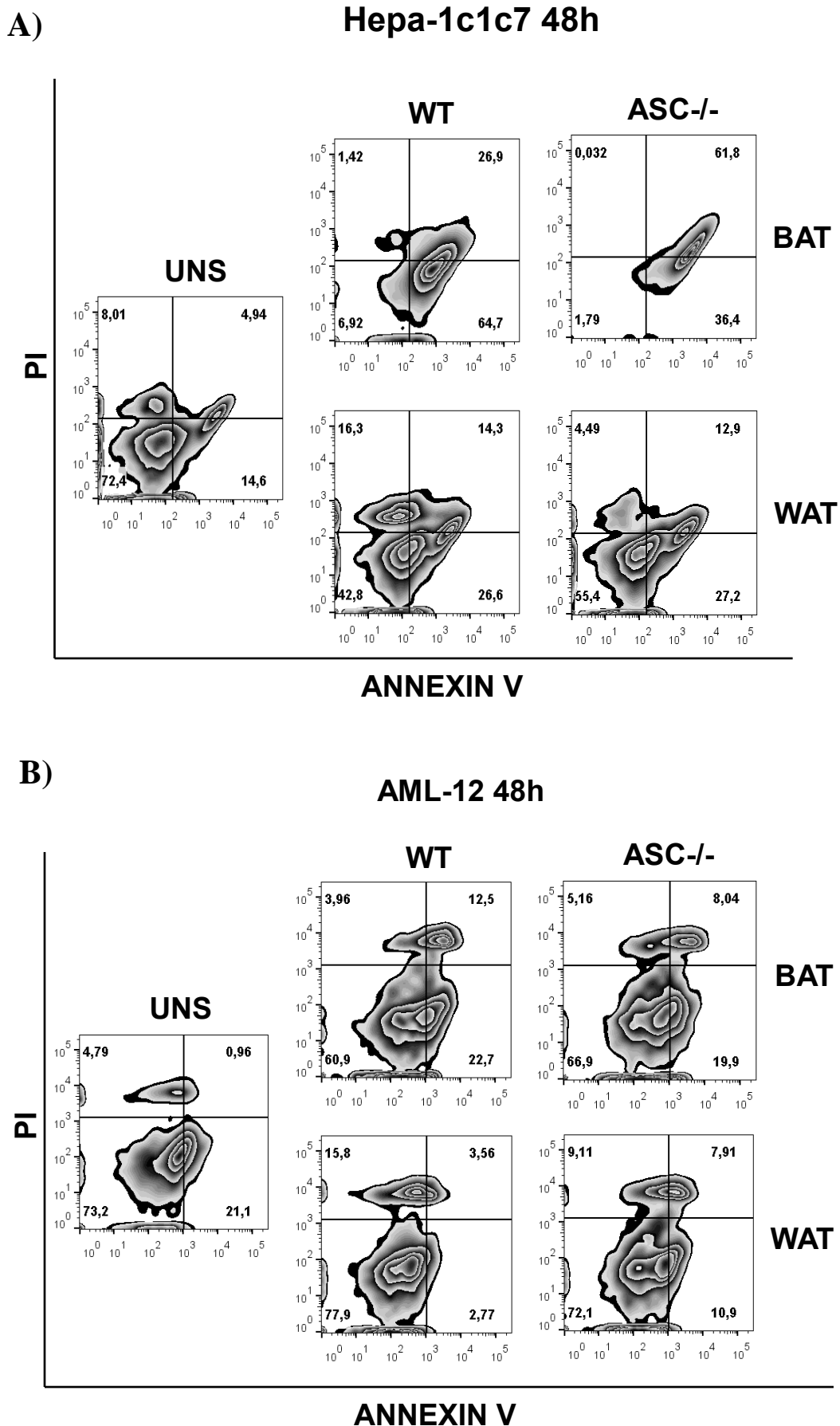




**Figura 25.** Efeito do estímulo por 24 horas com os produtos de secreção dos tecidos adiposos sobre o perfil de morte da linhagem não tumoral AML-12. Células não tumorais AML-12 estimuladas por 24 horas com os produtos de secreção de WT BAT, WT WAT, ASC<sup>-/-</sup> BAT e ASC<sup>-/-</sup> WAT. Após estímulo, as células foram marcadas com Anexina V e Iodeto de Propídeo.

Foi verificado o perfil de morte das células neoplásicas (Hepa-1c1c7) após 48 horas de estímulo com os produtos de secreção dos tecidos adiposos (**Figura 26 A**). O estímulo WT BAT induziu 93,02% de morte nessas células neoplásicas, sendo que desse total 64,7% foi por apoptose. Em relação ao WT WAT, esse estímulo induziu 57,2% de morte, sendo que, desse total, 26,6% foi por apoptose. Quanto à ausência da proteína ASC nos tecidos adiposos, vemos que o estímulo ASC<sup>-/-</sup> BAT por 48 horas induziu 98,2% de morte no HCC, sendo que desse total 61,8% foi morte lítica. Já o estímulo ASC<sup>-/-</sup> WAT induziu 44,59% de morte, sendo que, desse total 27,2% foi morte por apoptose.

Tendo em vista que no período de 48 horas as porcentagens de morte celular em células neoplásicas foram altas, induzidas principalmente pelos estímulos do BAT, nos questionamos se esse fenômeno também seria observado em células não tumorais (**Figura 26 B**). Desse modo, notamos que o estímulo WT BAT induziu 39,16% de morte celular, sendo que, desse total 22,7% foi por apoptose. O estímulo WT WAT induziu 22,13% de morte, sendo que, desse total 15,8 % foi por necrose. Em relação à ausência da proteína ASC nestes tecidos, o estímulo ASC<sup>-/-</sup> BAT induziu 35,1% de morte, sendo que, 19,9% foi por apoptose. Por fim, o estímulo ASC<sup>-/-</sup> WAT induziu 27,92% de morte, sendo que, desse total 10,9% foi por apoptose.

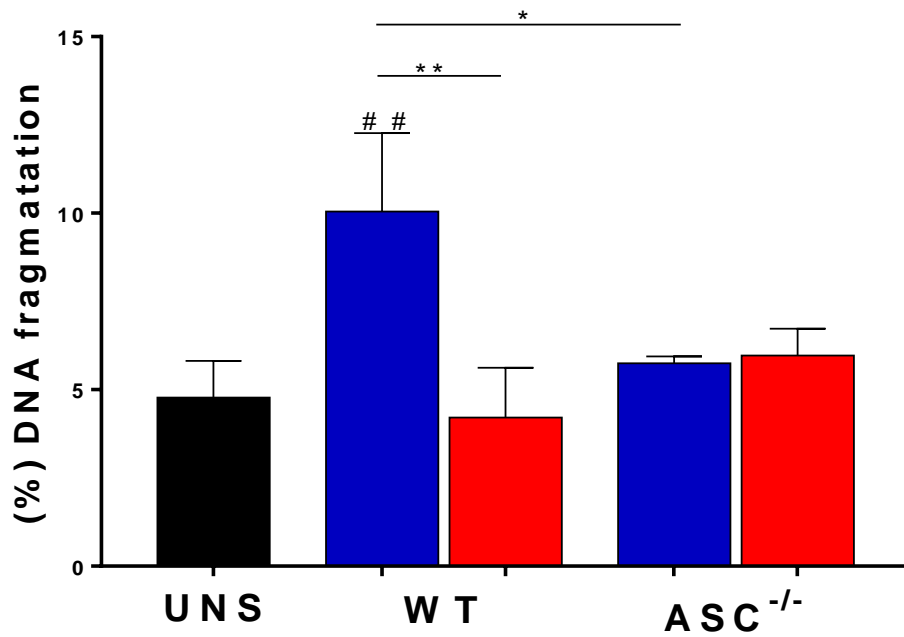


**Figura 26.** Influência do estímulo por 48 horas com os produtos de secreção dos tecidos adiposos sobre o perfil de morte na linhagem tumoral (Hepa-1c1c7) e na linhagem não-tumoral (AML-12). (A) Células neoplásicas Hepa-1c1c7 estimuladas por 24 horas com os produtos de secreção de WT BAT, WT WAT, ASC BAT e ASC WAT. (B) Células não tumorais AML-12 estimuladas por 24 horas com os produtos de secreção de WT BAT, WT WAT, ASC<sup>-/-</sup> BAT e ASC<sup>-/-</sup> WAT. Após estímulo, as células foram marcadas com Anexina V e Iodeto de Propídeo

### **5.11 Os produtos de secreção do tecido adiposo marrom aumentam a fragmentação do DNA em células Hepa-1c1c7 com participação da ASC**

Tendo em vista que o estímulo WT BAT induz maior porcentagem de apoptose nas células neoplásicas, a fragmentação do DNA dessas células foi analisada, uma vez que esse fenômeno é uma característica da apoptose (Bortner et al., 1995). Após o estímulo por 48 horas com os produtos de secreção dos tecidos adiposos, observamos que o estímulo WT BAT induziu maior fragmentação do DNA comparado com o UNS, WT WAT e ASC<sup>-/-</sup> BAT (**Figura 27**).

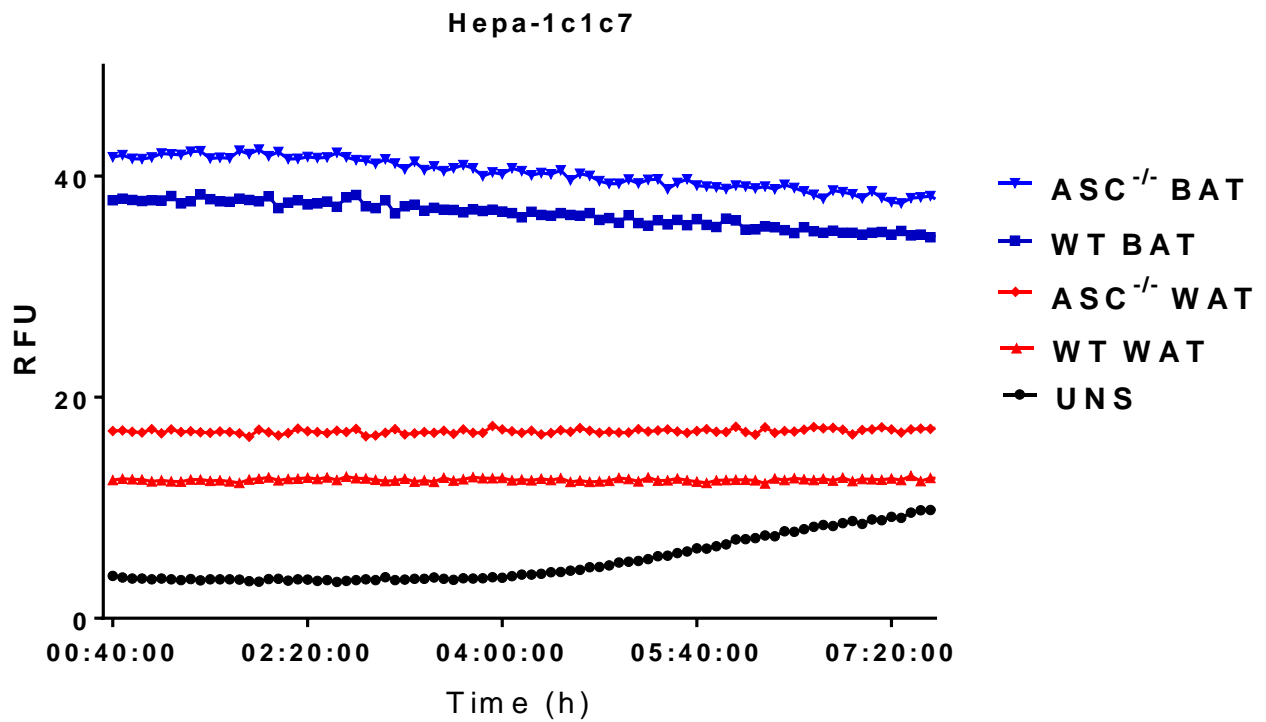
### Hepa-1c1c7 48h



**Figura 27.** Efeito do estímulo por 48 horas com os produtos de secreção dos tecidos adiposos sobre a fragmentação do DNA na linhagem tumoral (Hepa-1c1c7). Células neoplásicas Hepa-1c1c7 estimuladas por 48 horas com os produtos de secreção de WT BAT, WT WAT, ASC<sup>-/-</sup> BAT e ASC<sup>-/-</sup> WAT. (\*) diferenças estatísticas entre os grupos estimulados com produto de secreção dos tecidos adiposos. (#) diferenças estatísticas entre o UNS e os grupos estimulados com produto de secreção dos tecidos adiposos. p<0,05 (um símbolo), p<0,01 (dois símbolos).

### **5.12 A ausência da proteína ASC no tecido adiposo marrom induz formação de poros na membrana plasmática de células Hepa-1c1c7**

Enquanto que o estímulo WT BAT induz maior morte por apoptose na Hepa-1c1c7, a ausência da proteína ASC neste tecido (estímulo ASC<sup>-/-</sup> BAT) aumenta a morte lítica, como mostrado nos resultados anteriores. Dessa forma, buscamos investigar o efeito dos produtos de secreção dos tecidos adiposos sobre a integridade de membrana em tempos precoces de estímulo, uma vez que a formação de poros é um dos *hallmarks* de morte programada lítica. Como mostrado na **Figura 28**, o estímulo ASC<sup>-/-</sup> BAT induziu maior formação de poros na membrana da Hepa-1c1c7, seguido do estímulo WT BAT, ASC<sup>-/-</sup> WAT, WT WAT e UNS, nessa ordem.



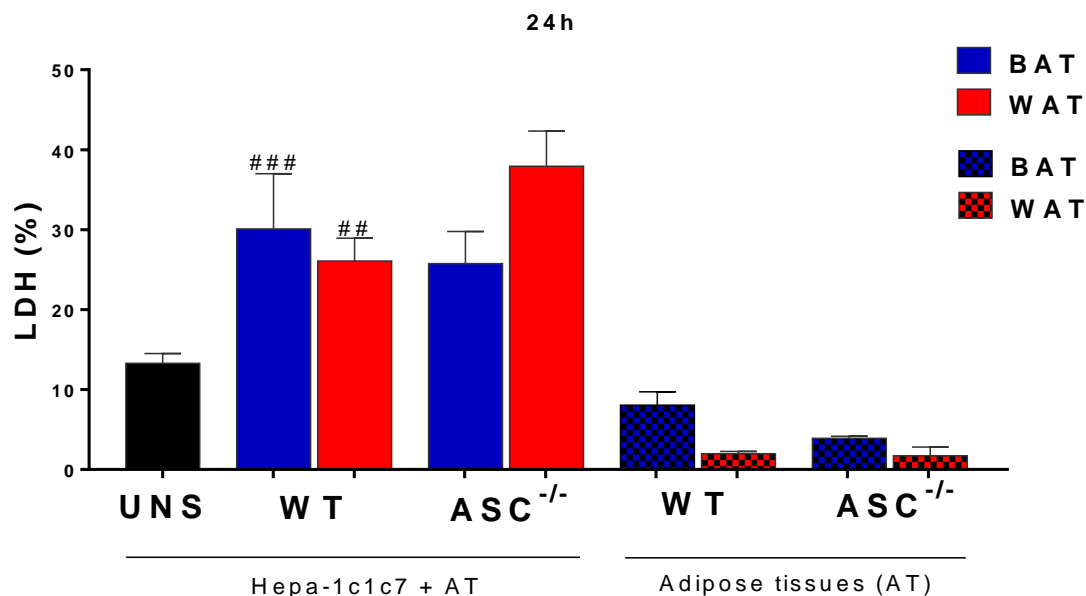
**Figura 28.** Impacto do estímulo por 8 horas com os produtos de secreção dos tecidos adiposos sobre a formação de poros na membrana plasmática das células Hepa-1c1c7. Células neoplásicas Hepa-1c1c7 estimuladas com os produtos de secreção de WT BAT, WT WAT, ASC<sup>-/-</sup> BAT e ASC<sup>-/-</sup> WAT e expostas a Iodeto de Propídeo por até 8 horas.

### **5.13 Os produtos de secreção do tecido adiposo marrom aumentam a liberação de LDH em células Hepa-1c1c7**

A liberação de LDH no meio extracelular é um indicativo de citotoxicidade e é um dos *hallmarks* da piroptose. Desse modo, decidimos dosar a secreção de LDH pelas células Hepa-1c1c7 após o estímulo por 24 horas. Foi observado aumento na secreção de LDH comparado com o UNS, porém não houve diferenças significativas entre tratamentos (**Figura 29**).

Para entendermos se o LDH quantificado era proveniente da célula ou dos tecidos adiposos, também dosamos o LDH secretado pelos produtos de secreção dos tecidos adiposos. Foi verificado que o LDH dosado foi secretado pelas células, já que o valor do LDH dos produtos de secreção dos tecidos adiposos é baixo (**Figura 29**).





**Figura 29. Influência do estímulo por 24 horas com os produtos de secreção dos tecidos adiposos sobre a liberação de LDH na linhagem tumoral (Hepa-1c1c7).** Células neoplásicas Hepa-1c1c7 estimuladas por 24 horas com os produtos de secreção de WT BAT, WT WAT, ASC<sup>-/-</sup> BAT e ASC<sup>-/-</sup> WAT. A fim de se verificar se o LDH dosado era da célula ou dos produtos de secreção dos tecidos adiposos, também foi dosado o LDH dos produtos de secreção dos tecidos adiposos. (#) diferenças estatísticas entre o UNS e os grupos estimulados com produto de secreção dos tecidos adiposos.  $p < 0,01$  (dois símbolos) e  $p < 0,001$  (três símbolos).

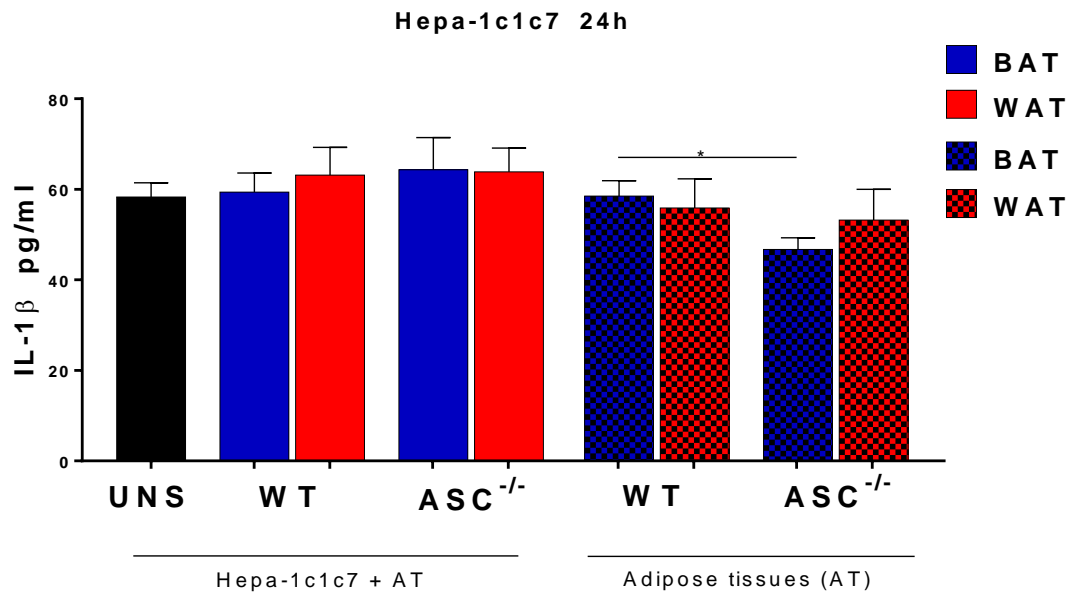
#### **5.14 O efeito dos produtos de secreção dos tecidos adiposos sobre a secreção de IL-1 $\beta$ de células Hepa-1c1c7**

Tendo em vista que a IL-1 $\beta$  é secretada durante a piroptose, nos questionamos se os produtos de secreção dos tecidos adiposos estariam induzindo a liberação dessa citocina no HCC. Foi dosada a IL-1 $\beta$  advinda da interação das células Hepa-1c1c7 com os produtos de secreção dos tecidos adiposos (**Figura 30 A**), dos produtos de secreção dos tecidos adiposos (sem células) (**Figura 30 A**) e do que foi secretado pelas células após o estímulo (**Figura 30 B**). Isso foi feito para entendermos se a citocina secretada era proveniente da célula ou dos produtos de secreção dos tecidos adiposos.

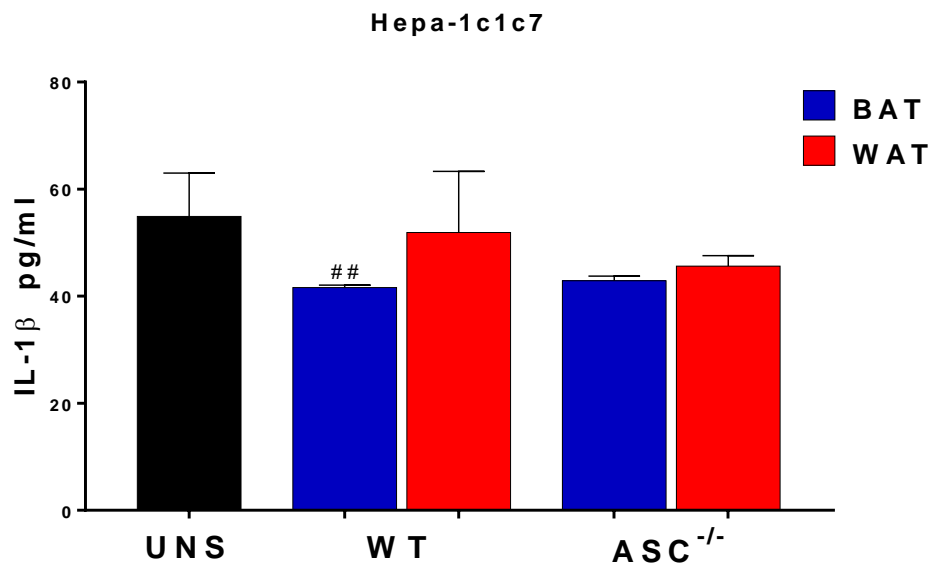
Na interação das células com os produtos de secreção dos tecidos adiposos, não foi observada diferenças na liberação de IL-1 $\beta$  entre os grupos (**Figura 30 A**). Em relação ao resultado do que é secretado apenas pelos tecidos adiposos, nota-se que a ausência da ASC no BAT diminuiu os níveis de IL-1 $\beta$  deste tecido.

Após a coleta do sobrenadante da interação da Hepa-1c1c7 com os produtos de secreção dos tecidos adiposos, os poços foram lavados com PBS 1X e preenchidos com MEM  $\alpha$  (**Figura 30 B**). Depois de 24 horas, o sobrenadante do que foi secretado pela Hepa-1c1c7 foi coletado. As células que foram estimuladas anteriormente com o WT BAT foram as que menos secretaram IL-1 $\beta$ , comparado com o UNS.

A)



B)

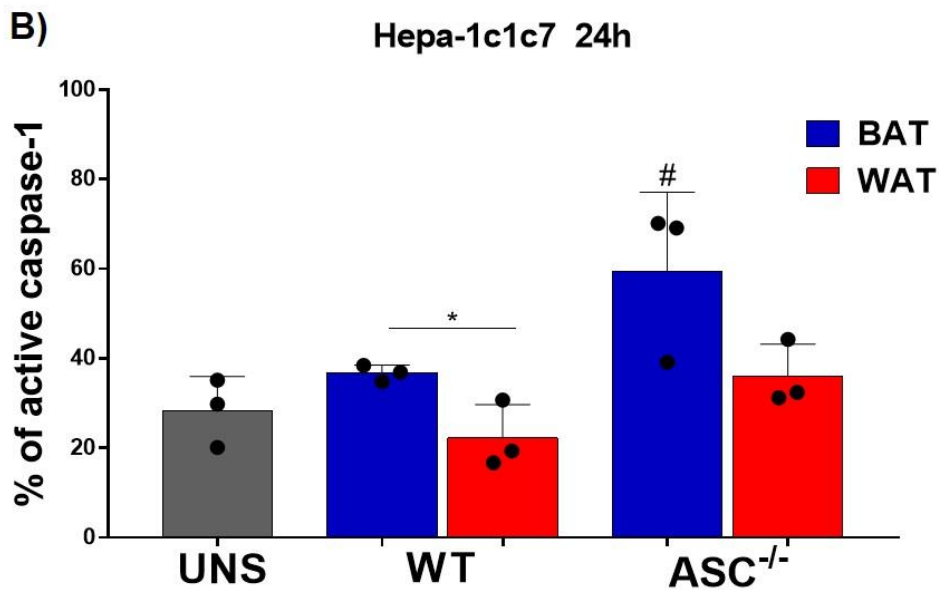
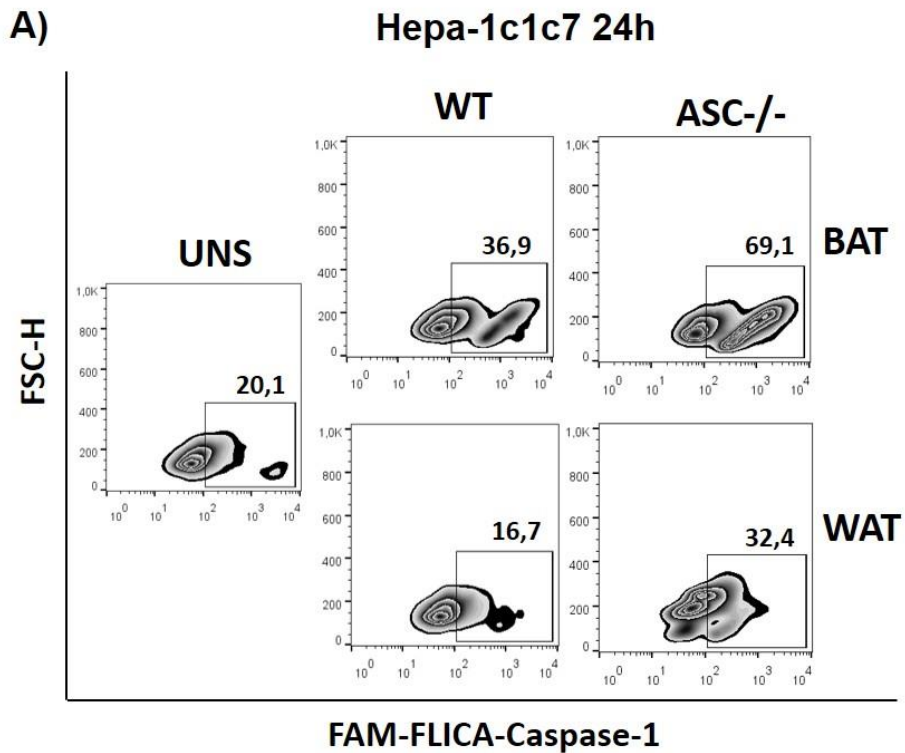


**Figura 30. Efeito dos produtos de secreção dos tecidos adiposos sobre a secreção de IL-1 $\beta$  de células Hepa-1c1c7.** (A) Células neoplásicas Hepa-1c1c7 estimuladas por 24 horas com os produtos de secreção de WT BAT, WT WAT, ASC<sup>-/-</sup> BAT e ASC<sup>-/-</sup> WAT. A IL-6 dos produtos de secreção dos tecidos adiposos (sem células) também foi dosada. (B) Após a coleta do sobrenadante da interação da Hepa-1c1c7 com os produtos de secreção dos tecidos adiposos, os poços foram lavados com PBS 1X e preenchidos com o meio de cultura dessas células. Depois de 24 horas, o sobrenadante do que foi secretado pela Hepa-1c1c7 foi coletado. (\*) diferenças estatísticas entre os grupos estimulados com produto de secreção dos tecidos adiposos. (#) diferenças estatísticas entre o UNS e os grupos estimulados com produto de secreção dos tecidos adiposos. p<0,05 (um símbolo), p<0,01 (dois símbolos).

### **5.15 A ausência da proteína ASC no tecido adiposo marrom induz ativação de caspase-1 em células Hepa-1c1c7**

Uma vez que a caspase-1 ativa está relacionada, entre outras coisas, com a clivagem da GSDMD e a via da piroptose, decidimos analisar o efeito dos produtos de secreção dos tecidos adiposos sob a ativação de caspase-1, após 24 horas de estímulo. Como mostrado na **Figura 31 A**, o estímulo ASC<sup>-/-</sup> BAT induziu maior porcentagem de caspase-1 ativa, 69,1%, seguido do estímulo WT BAT com 36,9%, ASC<sup>-/-</sup> WAT com 32,4%, UNS com 20,1%, e WT WAT com 16,7%.

Após análise estatística, n=3, foi observado que o estímulo ASC<sup>-/-</sup> BAT induziu maior porcentagem de células ativas para caspase-1 comparado com o UNS (**Figura 31 B**). Não houve diferenças significativas entre ASC<sup>-/-</sup> BAT e WT BAT, provavelmente por conta do desvio padrão.

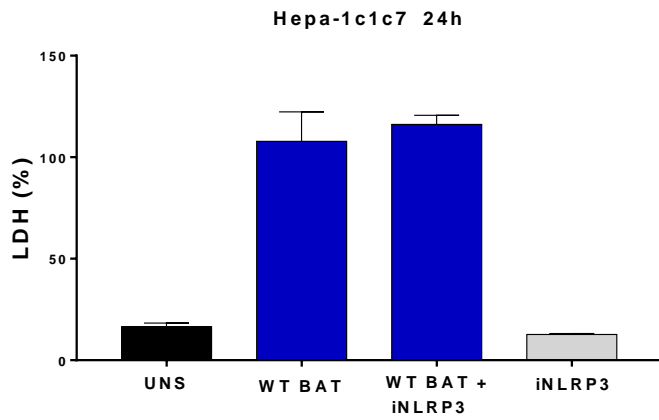


**Figura 31. Impacto do estímulo por 24 horas com os produtos de secreção dos tecidos adiposos sobre a ativação de caspase-1 na linhagem tumoral (Hepa-1c1c7).** (A) Células neoplásicas Hepa-1c1c7 estimuladas por 24 horas com os produtos de secreção de WT BAT, WT WAT, ASC<sup>-/-</sup> BAT e ASC<sup>-/-</sup> WAT. (B) Análise estatística, n=3, de caspase-1 ativa em células Hepa-1c1c7 sob estímulo com os produtos de secreção de WT BAT, WT WAT, ASC<sup>-/-</sup> BAT e ASC<sup>-/-</sup> WAT. (#) diferenças estatísticas entre o UNS e os grupos estimulados com produto de secreção dos tecidos adiposos. (\*) diferenças estatísticas entre os grupos estimulados com produto de secreção dos tecidos adiposos. p<0,05 (um símbolo).

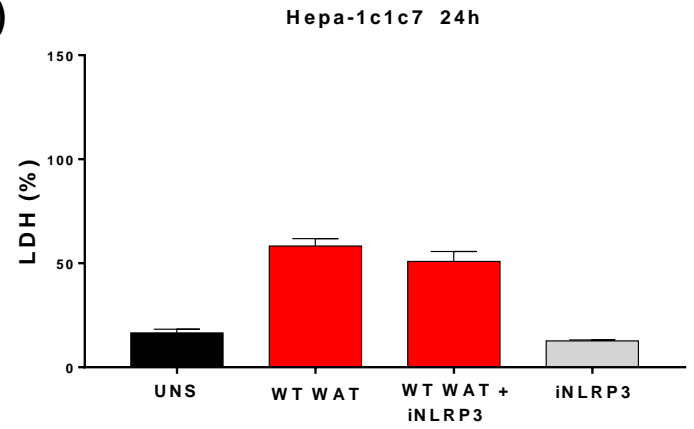
### **5.16 O estímulo ASC<sup>-/-</sup> BAT induz liberação de LDH via NLRP3**

Uma vez que o LDH é liberado no meio extracelular durante a piroptose, decidimos investigar se os produtos de secreção dos tecidos adiposos induzem liberação de LDH via inflamassoma NLRP3. Para isso, este inflamassoma foi inibido. Após 24 horas de estímulo, foi possível observar que WT BAT e WT WAT não induzem liberação de LDH via NLRP3 (**Figura 32 A, B**). Em relação ao estímulo ASC<sup>-/-</sup> BAT, ao inibir o inflamassoma NLRP3, a liberação de LDH diminui (**Figura 32 C**). Quanto ao ASC<sup>-/-</sup> WAT, não houve diferença significativa (**Figura 32 D**).

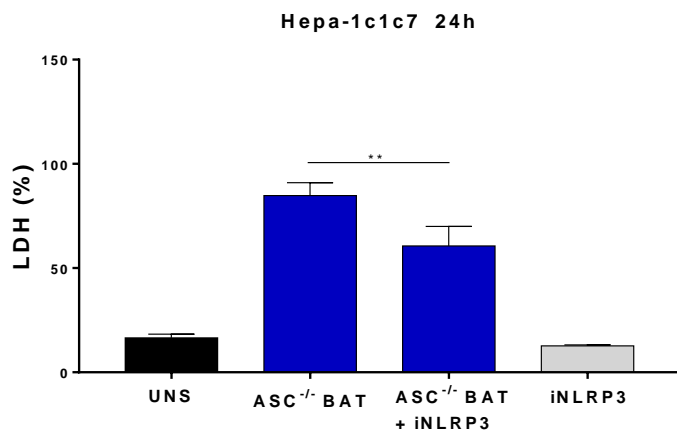
A)



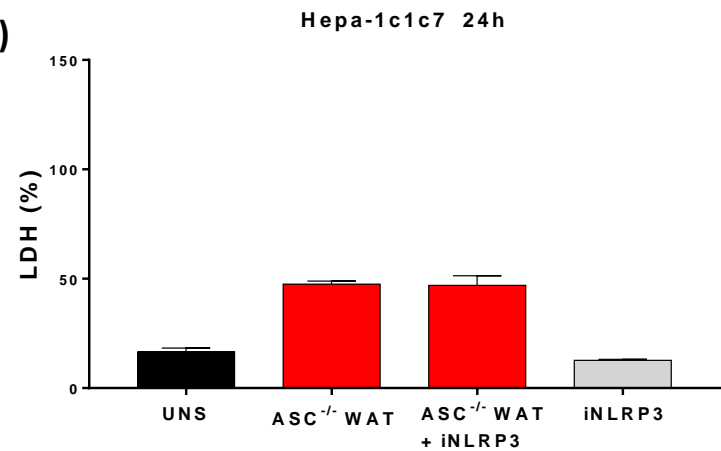
B)



C)



D)

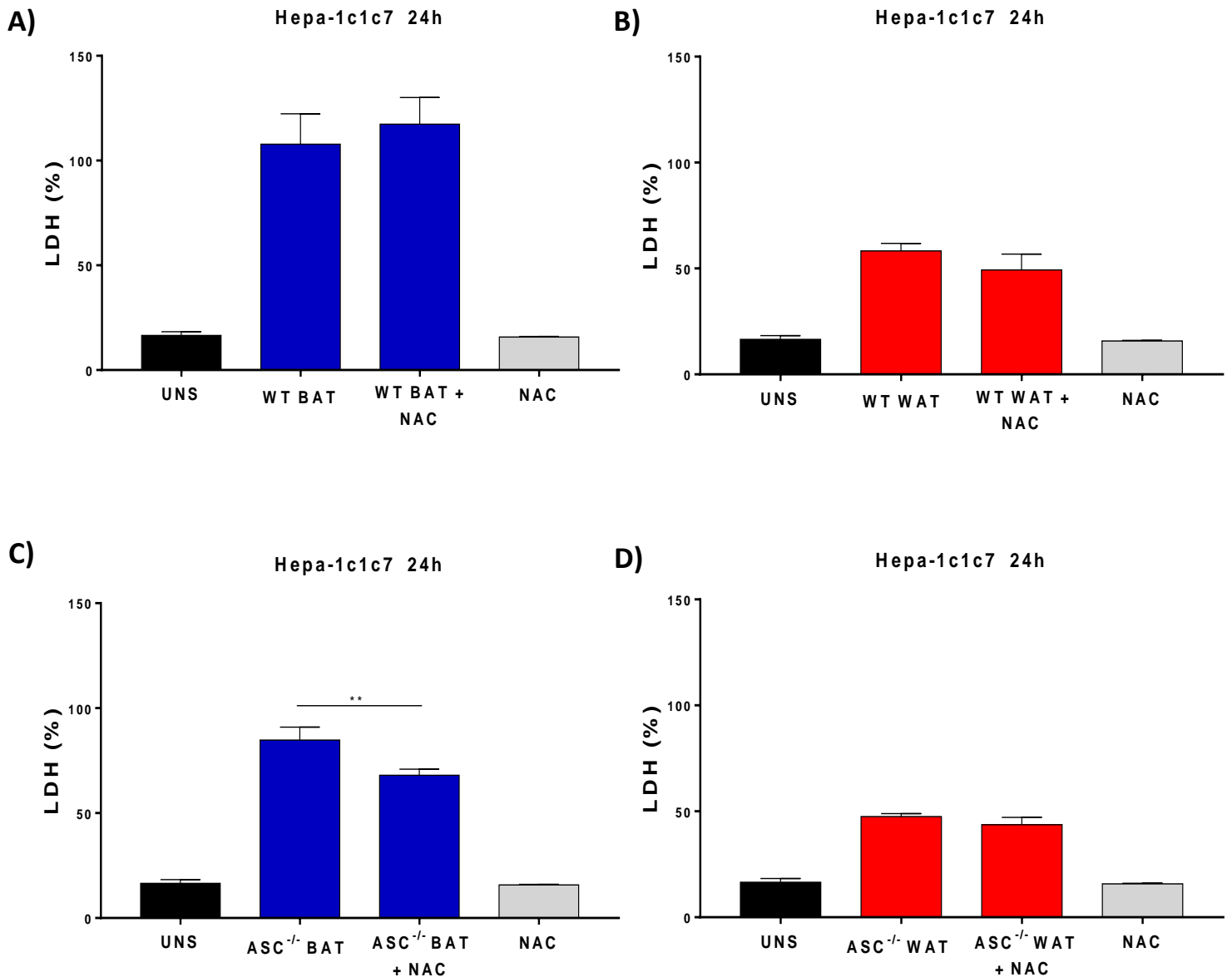


**Figura 32. Influência da inibição do inflamassoma NLRP3 sob a liberação de LDH após estímulo por 24 horas com os produtos de secreção dos tecidos adiposos na linhagem tumoral (Hepa-1c1c7).** (A) Células neoplásicas Hepa-1c1c7 estimuladas por 24 horas com os produtos de secreção de WT BAT e com o inibidor de NLRP3. (B) Células neoplásicas Hepa-1c1c7 estimuladas por 24 horas com os produtos de secreção de WT WAT e com o inibidor de NLRP3. (C) Células neoplásicas Hepa-1c1c7 estimuladas por 24 horas com os produtos de secreção de ASC<sup>-/-</sup> BAT e com o inibidor de NLRP3. (D) Células neoplásicas Hepa-1c1c7 estimuladas por 24 horas com os produtos de secreção de ASC<sup>-/-</sup> WAT e com o inibidor de NLRP3. (\*) diferenças estatísticas entre os grupos estimulados com produto de secreção dos tecidos adiposos.  $p < 0,01$  (dois símbolos).

### **5.17 O estímulo ASC<sup>-/-</sup> BAT induz liberação de LDH via segundo sinal pelo ROS**

Considerando que o ROS é um segundo sinal para a montagem do inflamassoma NLRP3, nos questionamos se os produtos de secreção dos tecidos adiposos induzem a liberação de LDH via segundo sinal pelo ROS. Para isso, o ROS foi inibido com NAC. Após 24 horas de estímulo, foi possível observar que WT BAT e WT WAT não induzem liberação de LDH via segundo sinal pelo ROS (**Figura 33 A, B**). Em relação ao estímulo ASC<sup>-/-</sup> BAT, ao inibir essa espécie reativa, a liberação de LDH diminui (**Figura 33 C**). Quanto ao ASC<sup>-/-</sup> WAT, não houve diferença significativa (**Figura 33 D**).





**Figura 33. Efeito da inibição de ROS sob a liberação de LDH após estímulo por 24 horas com os produtos de secreção dos tecidos adiposos na linhagem tumoral (Hepa-1c1c7).** (A) Células neoplásicas Hepa-1c1c7 estimuladas por 24 horas com os produtos de secreção de WT BAT e com o inibidor de ROS (NAC). (B) Células neoplásicas Hepa-1c1c7 estimuladas por 24 horas com os produtos de secreção de WT WAT e com o inibidor de ROS. (C) Células neoplásicas Hepa-1c1c7 estimuladas por 24 horas com os produtos de secreção de ASC<sup>-/-</sup> BAT e com o inibidor de ROS. (D) Células neoplásicas Hepa-1c1c7 estimuladas por 24 horas com os produtos de secreção de ASC<sup>-/-</sup> WAT e com o inibidor de ROS. (\*) diferenças estatísticas entre os grupos estimulados com produto de secreção dos tecidos adiposos.  $p < 0,01$  (dois símbolos).

## 6. Discussão

O presente trabalho investigou o efeito diferencial dos produtos de secreção do BAT e WAT sobre o HCC. Foram analisados parâmetros carcinogênicos e vias de morte celular, bem como o papel da proteína ASC presente nesses tecidos adiposos sobre a modulação no HCC.

O HCC está entre os cânceres que mais matam no mundo (Llovet et al., 2021). Entre os fatores de risco estão o NASH e a obesidade (Marrero et al., 2018). O tecido adiposo é o principal órgão relacionado ao acúmulo de gordura e ao desenvolvimento de síndromes metabólicas, uma vez que secreta uma variedade de moléculas como adipocinas e citocinas capazes de modular parâmetros de crescimento e sobrevivência de tumores (Álvarez-Artime et al., 2021). Ainda, o BAT e o WAT, podem mediar a inflamação através da secreção de citocinas formadas a partir da ativação dos inflamassomas.

Os inflamassomas são complexos multiproteicos relacionados, entre outras coisas, com a proteção do hospedeiro contra patógenos (Martinon et al., 2002) e com doenças metabólicas (Henao-Mejia et al., 2012). Trabalhos do nosso grupo mostraram que os componentes dos inflamassomas são importantes para a homeostase metabólica (Pimentel et al., 2020). Dentre esses componentes, o papel da proteína ASC é controverso. Estudos mostraram que a ausência dessa proteína foi capaz de mitigar a resistência insulínica, esteatose e a hipertrofia do WAT (Stienstra et al., 2011), ao passo que, nosso grupo demonstrou que a falta da ASC em camundongos obesos exacerbou o ganho de peso, a esteatose hepática e o branqueamento dos tecidos adiposos (Ribeiro et al, dado não publicado).

A fim de se avaliar se o BAT e WAT seriam danosos para hepatócitos normais, células AML-12 foram estimuladas com os produtos de secreção desses tecidos adiposos. Não foi observado diferenças significativas, após estímulo por 24 e 48 horas, sobre a viabilidade celular mitocondrial. Portanto, o secretado desses tecidos parece não ter efeitos significativos na viabilidade de células normais. Dessa forma, seguimos com análises do efeito do que é secretado por esses tecidos em células neoplásicas.

A princípio foi explorado o efeito diferencial do BAT e WAT, sobre parâmetros carcinogênicos das células Hepa-1c1c7, além do papel da ASC nesses tecidos. Os

produtos de secreção do WT WAT foram capazes de aumentar a viabilidade celular mitocondrial das células Hepa-1c1c7 em comparação com o WT BAT. O efeito do secretado do WAT se demonstrou similar às células não estimuladas sobre parâmetros de proliferação celular, ciclo celular, biogênese de corpúsculos lipídicos e formação de espécies reativas no HCC. A proteína ASC desse tecido parece não ser importante no *crosstalk* entre o WAT e o HCC, nos parâmetros citados. Porém, parece ser relevante na indução de óxido nítrico e liberação de LTB4 pelo HCC.

As principais adipocinas secretadas pelo WAT são a adiponectina e a leptina. Maiores níveis circulantes desses hormônios estão relacionados ao alto risco de desenvolvimento de cânceres e ao pior prognóstico (Zhang et al., 2020). Na literatura, já foi demonstrado que a leptina induz proliferação e progressão do ciclo celular no câncer de ovário, por meio da fosforilação de MAPKs e ativação da ciclina D1 (Chen et al., 2013). Entretanto, no presente trabalho não houve modulações no ciclo celular e na proliferação após o estímulo com WAT. Nós levantamos a hipótese de que os efeitos similares do estímulo WAT com células não estimuladas se deve ao fato de que esse tecido é proveniente de camundongos magros e que os efeitos pró-carcinogênicos seriam exacerbados sob condições hipercalóricas, uma vez que o WAT é um tecido chave para a iniciação e progressão de cânceres durante a obesidade (Ernst Lengyel, et al., 2018).

O interesse científico sobre o BAT tem aumentado após descobertas de quantidades relevantes desse tecido em adultos (Nedergaard et al, 2007). Diante da sua função em dissipar energia na forma de calor, a partir da glicose e/ou ácidos graxo, esse tecido tem sido reportado como um possível alvo terapêutico no tratamento da diabetes (Skarulis et al., 2010) e da obesidade (Lowell e Flier, 1997; Shankar et al., 2019). Recentemente, foi publicado que a exposição de camundongos ao frio, e consequente ativação do BAT, diminuiu o crescimento de tumores sólidos (Seki et al., 2022). O consumo de glicose é essencial para a proliferação tumoral. Uma vez que o BAT é ativado, seus adipócitos capturam a glicose circulante, diminuindo a disponibilidade de glicose para o metabolismo e crescimento de células neoplásicas (Seki et al., 2022).

A atividade termogênica do BAT pode ser induzida a partir da exposição ao frio, como dito anteriormente, atividades físicas e agonistas dos receptores  $\beta$  adrenérgicos (Virtanen, 2019). O efeito benéfico do que é secretado por esse tecido, também tem sido explorado, porém ainda há lacunas sobre o efeito dessas moléculas secretadas e quais são elas

(Villarroya et al., 2019). Portanto, existe a necessidade de saber o impacto sistêmico do que é secretado pelo BAT.

No presente trabalho, os produtos de secreção do BAT tiveram ação antitumoral sobre o HCC. Esse estímulo foi capaz de diminuir a viabilidade celular mitocondrial, em relação ao WAT, e diminuir a proliferação celular, em relação às células não estimuladas e ao WAT, após 48 horas de estímulo. A proteína adaptadora ASC do BAT parece ser importante para reduzir a proliferação da Hepa-1c1c7.

Em 2019, um estudo transplantou uma linhagem de HCC, denominada H22, em camundongos, e após retirar o BAT desses animais, foi observado o crescimento tumoral *in vivo* (Liu et al., 2019). No mesmo trabalho, foram isolados adipócitos marrons e feito o co-cultivo desses adipócitos com a linhagem H22. Após 48 horas, foi observado diminuição no número de células H22 viáveis (Liu et al., 2019). Esse estudo corrobora com nossos dados, porém não aprofunda em outros parâmetros carcinogênicos e vias de morte celular, além de não demonstrar como esses adipócitos diminuem a viabilidade das células neoplásicas. É possível sugerir que o efeito antitumoral do BAT pode ser proveniente tanto dos adipócitos isolados, quanto do órgão. Em condições fisiológicas, o metabolismo é influenciado pela ação endócrina desse órgão como um todo, por isso a relevância de se estudar o que é secretado pelo tecido e não apenas pelos adipócitos.

Apesar dos produtos de secreção do WT BAT diminuir a proliferação celular, não foi observada modulação no ciclo celular da Hepa-1c1c7. Esperávamos que houvesse modulação, uma vez que no modelo de câncer de mama, o BAT foi relacionado com a expressão de genes antitumorais, como o PTEN (Ortega-Molina et al., 2012). Esse gene é capaz de controlar a proliferação e o crescimento tumoral através do controle do ciclo celular (Ortega-Molina e Serrano, 2013). Deste modo, é necessário repetir este experimento.

Com o intuito de explorar outros parâmetros carcinogênicos, foi feita análise da biogênese de CLs no HCC após o estímulo com os produtos de secreção dos tecidos adiposos. Os CLs são organelas preenchidas por lipídeos neutros. Eles participam do metabolismo lipídico da célula, fornecendo energia para a célula como um todo ou para organelas específicas, como a mitocôndria (Olzmann e Carvalho, 2019). Além disso, fazem parte da produção de mediadores inflamatórios, os eicosanoides (Bozza et al., 2011). Ainda há lacunas sobre o papel dos CLs na carcinogênese. Em certos tipos de

câncer, como no câncer de mama, a biogênese dessas organelas está relacionada à agressividade tumoral e ao pior prognóstico (Abramczyk et al., 2015).

O presente trabalho observou o aumento de CLs no HCC após estímulo com os produtos de secreção do WT BAT. A proteína ASC presente no BAT parece ser importante para a biogênese dessas organelas, uma vez que na ausência dela, ocorre uma diminuição na formação de CLs. De acordo com a literatura, o acúmulo de lipídeos pode ser observado devido ao efeito pró-aterogênico da atividade do BAT (Dong et al., 2013). No contexto tumoral, já foi reportado que o aumento de CLs é um evento antecedente à apoptose (Cruz et al., 2020), uma vez que, a ativação da p53 e a inibição de mTOR e MYC levam a um acúmulo de lipídios devido a inibição da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos livres e o redirecionamento destes para a de novo lipogênese nessa morte (Boren e Brindle, 2012).

Junto com o aumento de CLs, o estímulo WT BAT também aumentou os níveis do fator de transcrição PPAR $\gamma$ , que é responsável pelo acúmulo de lipídeos em hepatócitos (Lee et al., 2018). Além disso, já foi demonstrado *in vivo* e *in vitro* que o PPAR $\gamma$  é capaz de inibir a metástase do HCC através da supressão de genes relacionados à migração, adesão celular e à ativação de genes supressores de tumor (Shen et al., 2012).

O LTB<sub>4</sub> é um mediador lipídico produzido nos CLs responsável pela migração de leucócitos, principalmente os neutrófilos. Essas células imunológicas podem ter efeito citotóxico através do contato físico com células neoplásicas mediado pela interação Fas/FasL ou por anticorpos (Sun et al., 2018). Aqui, mostramos que o estímulo WT BAT aumentou a liberação de LTB<sub>4</sub> pelas células neoplásicas, e que esse fenômeno parece ser independente da proteína ASC presente no BAT. Ademais, o estímulo WT BAT também aumentou a formação de espécies reativas (RS) no HCC. Esse aumento pode estar relacionado a um maior estresse na Hepa-1c1c7, que é corroborado pela formação de CLs (Lee et al., 2013).

Os estímulos WT BAT e WT WAT aumentaram a formação de nitrito, um subproduto do instável NO, pelo HCC, em relação às células não estimuladas. Além disso, a formação de nitrito parece ser dependente da proteína ASC destes tecidos. O NO está associado, entre outras coisas, com a angiogênese, lesão ao DNA e crescimento tumoral (Lala e Chakraborty, 2001). O seu efeito depende da localização, concentração, sensibilidade da célula e isoforma do NO (Fukumura et al., 2006). Sendo assim, é necessário que mais

experimentos sejam feitos para desvendar os efeitos dessa espécie reativa nessa linhagem de células neoplásicas.

A expressão de IL-6 é baixa em células humanas normais e sua concentração sérica é aumentada em pacientes com câncer de fígado (Yang, 2017). A via de sinalização da IL-6 ocorre juntamente com a STAT3, as quais participam de processos fisiológicos como o crescimento celular, diferenciação e regulação imune (Xu et al., 2021). Na tumorigênese, a ativação de IL-6/STAT3 promove a proliferação celular e a expressão de proteínas anti-apoptóticas, como a Bcl-2 (Kim e Park, 2018). Nossos dados mostraram que o estímulo WT BAT induziu maior liberação de IL-6. Dado este intrigante, uma vez que, esse estímulo reduziu a proliferação de células neoplásicas, bem como também induziu apoptose.

Em contraste, dados da literatura indicam que a IL-6 pode ter ação benéfica no ambiente hepático. A ausência dessa interleucina em camundongos obesos aumentou a inflamação hepática e resistência insulínica (Matthews et al., 2010) e o bloqueio de receptores de IL-6 está associado ao risco de desenvolvimento da NAFLD (Li, Chen e LV, 2022), um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento do HCC. Portanto, para entendermos o papel da IL-6 no nosso modelo experimental será necessário analisar a expressão de STAT3 e do receptor de IL-6 (IL-6R) para entendermos se está ocorrendo ativação na via de sinalização IL-6/STAT3, a qual está relacionada à sobrevivência de células neoplásicas.

A proteína ASC está relacionada com a ativação de alguns genes, dentre eles, o gene da IL-6 (Hasegawa et al., 2009). Nossos dados mostraram que o BAT é o tecido que secreta maiores níveis de IL-6, sendo que a proteína ASC deste tecido é importante para a liberação dessa citocina. Já é sabido que a IL-6 é secretada pelo BAT em resposta ao frio e à noradrenalina (Burýšek e Houšťek, 1997). Essa citocina, na verdade, tem sido considerada uma batoquina (Villarroya et al., 2019). Um estudo mostrou que o transplante do BAT para a cavidade visceral trouxe benefícios metabólicos, enquanto que a melhora metabólica foi perdida ao transplantar o BAT derivado de camundongos *knockouts* para IL-6 (Stanford et al., 2013). Além disso, a IL-6 proveniente do BAT parece induzir a mudança de macrófagos de perfil M1 (pró-inflamatórios) para M2 (anti-inflamatórios) (Mauer et al., 2014). De modo interessante, apesar desta ser uma citocina relacionada à pró-tumorigênese, sua secreção pelo BAT parece ser benéfica.

Os resultados apresentados deram indícios de que o BAT teria ação antitumoral, com participação da proteína ASC, e que o acúmulo de CLs está, possivelmente, relacionado a um estresse celular seguido da morte por apoptose. Com isso, foi investigado o tipo de morte celular que os produtos de secreção do BAT e WAT induzem no HCC e se a proteína adaptadora ASC destes tecidos participa desse fenômeno. É importante ressaltar que mais de um tipo de morte celular pode ocorrer de maneira simultânea (Pereira et al., 2018).

Foi observado que o WT BAT induziu maior apoptose nas células Hepa-1c1c7 e aumentou a fragmentação do DNA, que é uma das características desse tipo de morte, comparado com os estímulos WT WAT, ASC<sup>-/-</sup> BAT, ASC<sup>-/-</sup>WAT e UNS (Zhang e Xu, 2000). Além disso, a proteína ASC presente neste tecido parece ser importante para induzir apoptose e fragmentação do material genético, uma vez que no estímulo ASC<sup>-/-</sup> BAT houve mudança para um perfil de morte lítica.

É necessário enfatizar que os produtos de secreção dos tecidos adiposos também induziram morte em hepatócitos normais, porém em porcentagens significativamente menores, comparado com as células neoplásicas.

Foi investigado se os produtos de secreção do BAT e WAT seriam capazes de induzir formação de poros na membrana das células Hepa-1c1c7, a fim de correlacionar os poros com morte lítica por rompimento de membrana. O estímulo ASC<sup>-/-</sup> BAT induziu maior formação de poros na membrana dessas células, de forma precoce.

A IL-1 $\beta$  é uma citocina pró-inflamatória formada a partir da ativação dos inflamassomas e é secretada através de microvesículas, exossomos ou durante a piroptose (Lopez-Castejon e Brough, 2011). Dependendo do estágio do HCC e do microambiente, essa citocina pode desencadear proliferação das células neoplásicas, inflamação no microambiente (da Cruz et al., 2022), além de promover a expressão de uma oncoproteína relacionada ao desenvolvimento e a metástase do HCC (Su et al., 2015). Na interação entre Hepa-1c1c7 com os produtos de secreção dos tecidos adiposos não houve modulação na liberação dessa citocina pela Hepa-1c1c7. Este resultado é curioso, pois esperava-se que os tecidos que induzem maior morte lítica também estariam induzindo liberação de IL-1 $\beta$  através dos poros formados na membrana das células. Todavia, a piroptose não depende do processamento da IL-1 $\beta$  para acontecer (Miao et al., 2010).

Para sanarmos a dúvida de que está ocorrendo ou não a liberação da IL-1 $\beta$ , essa citocina será dosada em tempos precoces, uma vez que, o tempo de meia-vida da IL-1 $\beta$  é de 2.5 horas (Hazuda et al., 1988) e que a formação de poros na Hepa-1c1c7 ocorre em tempos prematuros após estímulo com os produtos de secreção dos tecidos adiposos. Em relação às células lavadas com PBS 1X e colocadas em seu meio de cultura, as que receberam anteriormente estímulo WT BAT diminuíram a liberação de IL-1 $\beta$ . Dessa forma, apesar do estímulo WT BAT induzir liberação de LDH, não foi observado aumento da liberação de IL-1 $\beta$  no HCC.

Em relação ao que foi secretado apenas pelos tecidos, o ASC<sup>-/-</sup> BAT liberou menos IL-1 $\beta$ , comparado ao WT BAT. Esse resultado mostra que a ASC é importante para o processamento e liberação dessa citocina neste tecido. Porém, o tecido ASC<sup>-/-</sup> WAT não diminuiu a liberação de IL-1 $\beta$ , demonstrando que esse tecido possui perfil inflamatório.

Dando continuidade às análises de vias de morte lítica, foi verificado se os produtos de secreção dos tecidos adiposos ativam caspase-1 nas células Hepa-1c1c7, a fim de correlacionar esse evento com a piroptose. Essa enzima ativa é responsável por clivar a GSDMD. Corroborando com os dados de formação de poros e anexina-PI, o estímulo ASC<sup>-/-</sup> BAT induziu maior ativação de caspase-1. Nossos dados também mostraram que o NLRP3 é um dos inflamassomas relacionados com a liberação do LDH no estímulo ASC<sup>-/-</sup> BAT e que o ROS é um dos segundos sinais de ativação desse inflamassoma. Com base nesses resultados, sugere-se que o estímulo ASC<sup>-/-</sup> BAT induz morte por piroptose nas células neoplásicas. Apesar de não termos marcado GSDMD, alguns artigos publicados apontam o evento da piroptose apenas pela análise de caspase-1 ativa, liberação de LDH e ativação do NLRP3 (Chen et al., 2018; Wei et al., 2019).

De acordo com os dados apresentados, este trabalho apresenta evidências que corroboram a hipótese de que o BAT e o WAT secretam moléculas distintas que podem prejudicar ou beneficiar, respectivamente, o HCC. Em 2019, Deshmukh e colegas, identificaram, a partir de proteômica, 101 moléculas que são exclusivamente secretadas pelo BAT e 262 moléculas secretadas em comum por ambos tecidos. Dentre as moléculas secretadas apenas pelo BAT, estão as batoquinas, as quais podem ser secretadas e agirem de maneira sistêmica. Recentemente, o potencial efeito protetivo das batoquinas, como a Nrg4 e a FGF21, tem sido demonstrado em síndromes metabólicas e na obesidade (Hondares et al., 2011; Wang et al., 2014). Outras moléculas que também podem estar



sendo secretadas, são os miRNAs, que têm sido reportados como mediadores da sinalização endócrina entre o BAT e o fígado (Li et al., 2020).

Com base em trabalhos do nosso grupo, a ausência da caspase-1/11 e do NLRP3 é capaz de modular a composição lipídica do BAT e WAT, em camundongos sob condições de homeostase nutricional (Corrêa et al., dado não publicado). Aqui, também é sugerido que a ausência da proteína adaptadora ASC nestes tecidos possa modular a composição lipídica e/ou de metabólitos destes tecidos adiposos. Justificando, assim, o efeito diferencial entre WT BAT e ASC<sup>-/-</sup> BAT em alguns parâmetros. Para descobrirmos quais moléculas esses tecidos estão secretando, as análises “ômicas”, lipidômica e metabolômica, estão em andamento.

A mudança no perfil de morte celular provocada entre os estímulos WT BAT e ASC<sup>-/-</sup> BAT pode ser devido às diferenças entre o secretado por esses dois tecidos, como explicado anteriormente. Sabe-se que lipídeos como o ácido palmítico e diversas adipocinas, podem ativar o inflamassoma NLRP3 (Wani et al., 2021). Dessa forma, sugerimos que o aumento de moléculas como essas no ASC<sup>-/-</sup> BAT ativam o inflamassoma NLRP3 e, assim, induzem piroptose na Hepa-1c1c7.

Ambas as mortes celulares aqui descritas são importantes ferramentas antitumorais. A indução da apoptose é positiva em um contexto no qual o câncer se beneficia com a inflamação. Dado que essa morte é silenciosa, não haverá inflamação nesse microambiente que possa favorecer o tumor. Por outro lado, a piroptose é importante em um ambiente tumoral imunossuprimido, visto que, a partir dessa morte, são liberados DAMPs capazes de acionar e recrutar células imunológicas para o local. Wang e colegas, 2020, demonstraram *in vivo* que a indução de piroptose em menos de 15% das células neoplásicas foi suficiente para limpar o enxerto de tumor de 4T1.

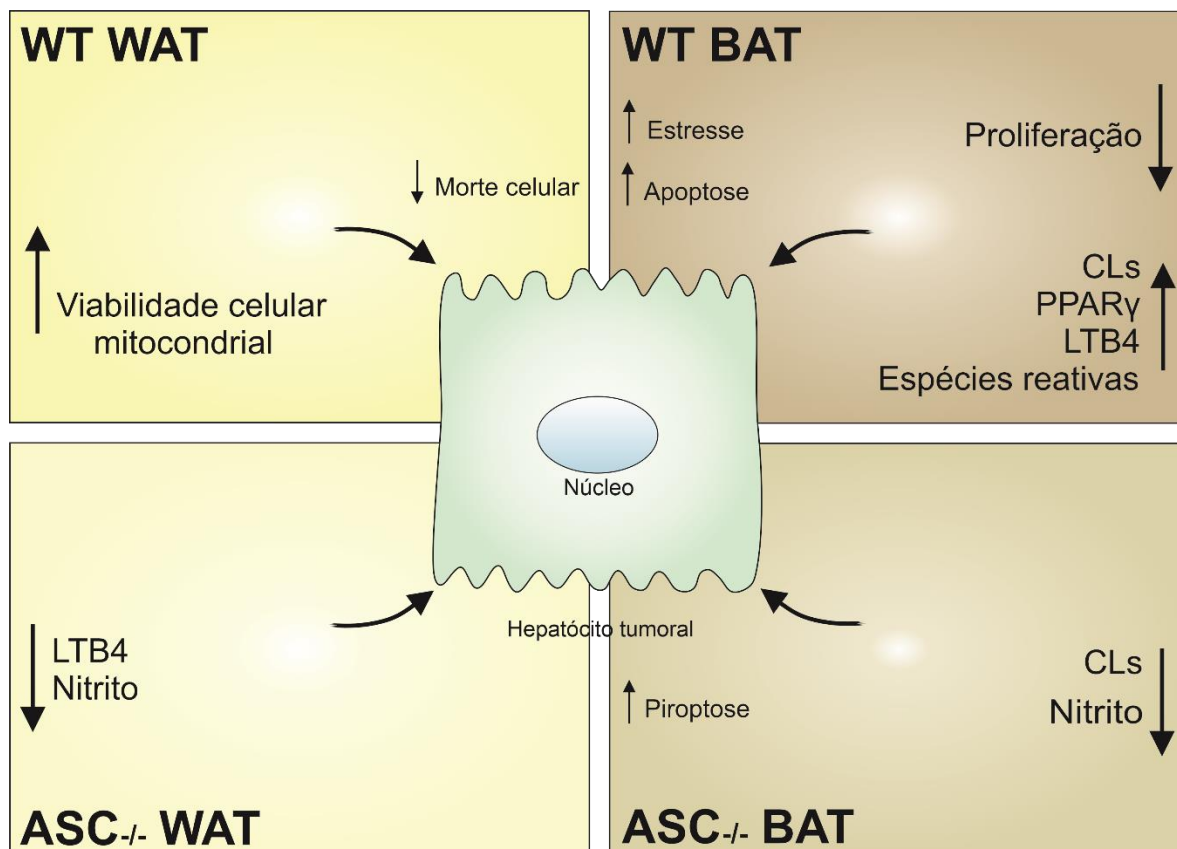
## 7. Conclusão

O presente trabalho demonstrou que há um efeito diferencial entre BAT e WAT sobre o HCC, sendo que os produtos de secreção do BAT possuem ação antitumoral, com participação da proteína adaptadora ASC (**Figura 34**).

Foi descrito pela primeira vez que o secretado do BAT induz apoptose no HCC, com participação da proteína ASC. Em contrapartida, na ausência de ASC, esse tecido induz majoritariamente morte lítica por piroptose nas células Hepa-1c1c7 (**Figura 35**).

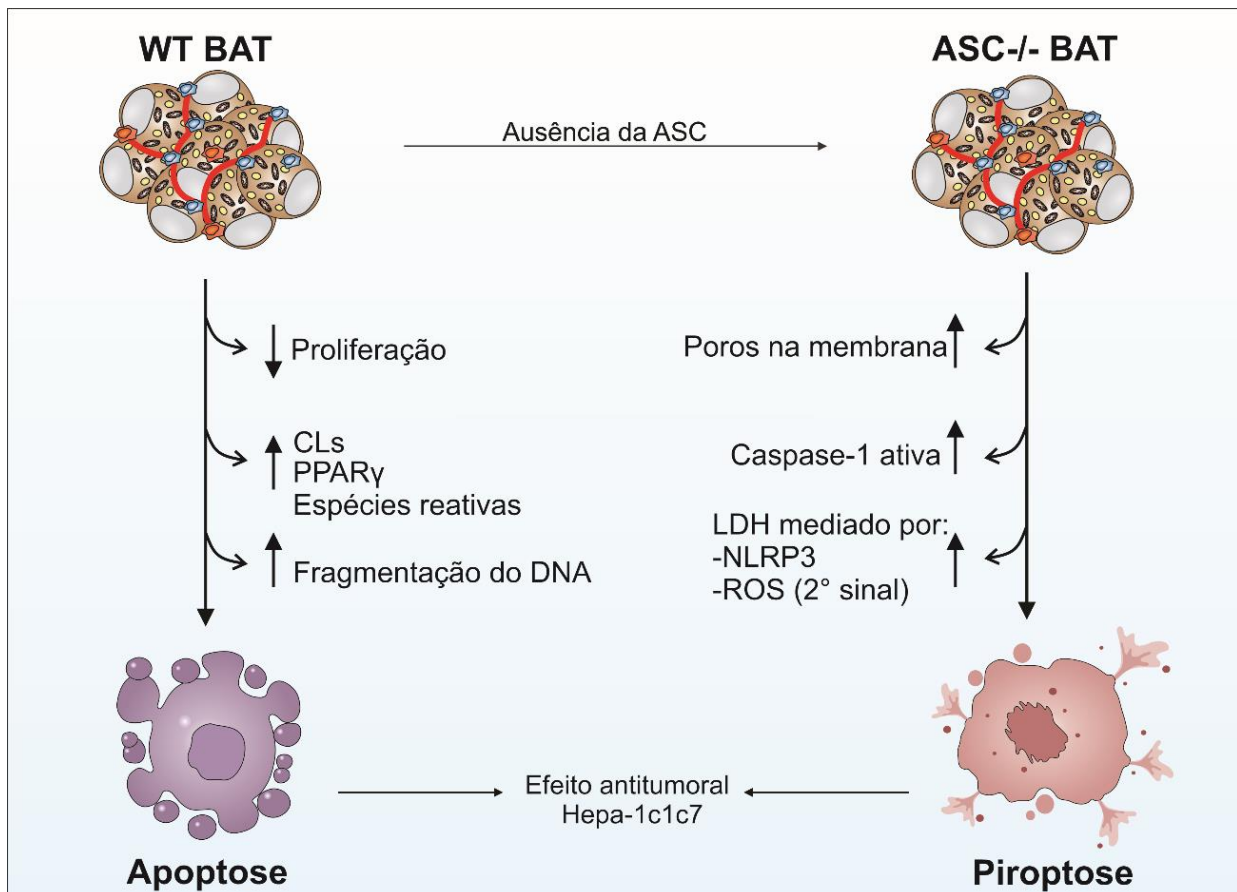
De modo mais específico, o trabalho mostrou que:

- Os produtos de secreção do WAT aumentam a viabilidade celular mitocondrial e diminuem a morte celular do HCC, comparado com BAT;
- Os produtos de secreção do BAT diminuem a proliferação de células Hepa-1c1c7, sendo que a proteína ASC deste tecido é importante para essa ação;
- A proteína adaptadora ASC de ambos tecidos é importante para induzir nitrito no HCC, e no WAT é essencial para induzir LTB4 nessas células neoplásicas;
- A proteína ASC presente no BAT é importante para a biogênese de CLs e para os níveis de PPAR $\gamma$  no HCC;
- Os produtos de secreção do BAT induzem estresse, aumento de CLs e de PPAR $\gamma$ , os quais podem ser relacionados como um evento que antecede a morte por apoptose;
- O produto de secreção do BAT induz liberação de IL-6 na Hepa-1c1c7;
- O BAT libera a citocina IL-6, com participação da proteína ASC;
- Os produtos de secreção de BAT induzem apoptose e aumento da fragmentação do DNA no HCC, com participação da proteína ASC;
- A ausência de ASC no BAT induz mudança no perfil de morte na Hepa-1c1c7 para a piroptose, por meio do aumento da formação de poros, caspase-1 ativa e liberação de LDH;
- O estímulo ASC<sup>-/-</sup> BAT medeia a piroptose por meio do inflamassoma NLRP3, sendo que ROS é um dos segundos sinais da montagem deste inflamassoma.



**Figura 34. O efeito diferencial entre os produtos de secreção do WAT e BAT sobre células de HCC: o papel da proteína ASC desses tecidos sobre a modulação nas células neoplásicas.**

Os produtos de secreção do WT WAT induzem aumento na viabilidade celular mitocondrial e diminuição de morte celular no HCC. A proteína adaptadora ASC no WAT é importante para induzir LTB4 e óxido nítrico nas células neoplásicas, uma vez que na ausência dela, ocorre diminuição desses produtos. Em contraste, os produtos de secreção do WT BAT diminuem a proliferação de células neoplásicas, aumenta a biogênese de corpúsculos lipídicos (CLs), os níveis de PPAR $\gamma$ , LTB4 e espécies reativas (RS). Esses parâmetros são indicativos do aumento do estresse celular, seguido da morte por apoptose. Adicionalmente, a proteína ASC do BAT é importante para a diminuição da proliferação, para a biogênese de CLs, produção de nitrito e indução da apoptose nessas células, tendo em visto que, na ausência dessa proteína ocorre aumento da proliferação, diminuição de CLs, diminuição de óxido nítrico e aumento da piroptose. WT: *Wild type* (selvagem); WT BAT: produto de secreção do tecido adiposo marrom de animais WT; WT WAT: produto de secreção do tecido adiposo branco de animais WT; ASC<sup>-/-</sup> BAT: produto de secreção do tecido adiposo marrom de animais *knockout* para a proteína ASC; ASC<sup>-/-</sup> WAT: produto de secreção do tecido adiposo branco de animais *knockout* para a proteína ASC. Fonte: Figura feita no CorelDraw pela autora deste trabalho.



**Figura 35. Os produtos de secreção do BAT induzem apoptose, com participação da proteína adaptadora ASC.** O estímulo com o WT BAT (tecido adiposo marrom selvagem) leva à diminuição da proliferação, aumento de corpúsculos lipídicos (CLs), PPAR $\gamma$ , espécies reativas e fragmentação do DNA, eventos relacionados à apoptose. Por outro lado, na ausência de ASC neste tecido (ASC<sup>-/-</sup> BAT), ocorre aumento de poros na membrana, caspase-1 ativa e liberação de LDH mediada pelo inflamassoma NLRP3 e espécies reativas de oxigênio (ROS), caracterizando, assim, a piroptose. Fonte: Figura feita no CorelDraw pela autora deste trabalho.

## 8. Perspectivas

Este trabalho permitiu entender como o BAT e WAT podem atuar de formas distintas no câncer e qual é a relevância da proteína adaptadora ASC na ação destes tecidos sobre o HCC. Ficou evidenciado que há necessidade de identificar as moléculas específicas que esses tecidos secretam. Portanto, análises “ômicas” destes tecidos estão em andamento, para que, assim, seja possível identificar moléculas com uma possível ação terapêutica no tratamento do HCC.

Os resultados aqui mostrados foram relevantes para entender os efeitos dos tecidos adiposos sob condições fisiológicas normais, em homeostase, em células neoplásicas.

Dessa forma, existe a perspectiva de analisar o efeito do BAT e WAT sob condições hipercalóricas no HCC.

Por fim, dado que o fígado abriga a maior população de macrófagos, as células de *Kupffer*, e que elas são fundamentais na resposta imune tumoral, é de extrema importância avaliar qual é o efeito do produto de secreção do BAT e WAT sobre essas células.

## Referências

ABRAMCZYK, Halina; SURMACKI, Jakub; KOPEĆ, Monika; OLEJNIK, Alicja Klaudia; LUBECKA-PIETRUSZEWSKA, Katarzyna; FABIANOWSKA-MAJEWSKA, Krystyna. The role of lipid droplets and adipocytes in cancer. Raman imaging of cell cultures: MCF10A, MCF7, and MDA-MB-231 compared to adipocytes in cancerous human breast tissue. **Analyst**, [S. l.], v. 140, n. 7, p. 2224–2235, 2015. DOI: 10.1039/c4an01875c.

AIZAWA, Satoka; BRAR, Gurmehr; TSUKAMOTO, Hidekazu. Cell death and liver disease. **Gut and Liver**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 20–29, 2020. DOI: 10.5009/GNL18486.

AKIRA, Shizuo; UEMATSU, Satoshi; TAKEUCHI, Osamu. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, [S. l.], v. 124, n. 4, p. 783–801, 2006. DOI: 10.1016/j.cell.2006.02.015.

ÁLVAREZ-ARTIME, Alejandro; GARCÍA-SOLER, Belén; SAINZ, Rosa María; MAYO, Juan Carlos. Emerging roles for browning of white adipose tissue in prostate cancer malignant behaviour. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 22, n. 11, 2021. DOI: 10.3390/ijms22115560.

ANDERSON, M. W.; REYNOLDS, S. H.; YOU, M.; MARONPOT, R. M. Role of Proto-oncogene activation in carcinogenesis. **Environmental Health Perspectives**, [S. l.], v. 98, n. 9, p. 13–24, 1992. DOI: 10.1289/ehp.929813.

ANDRADE, João Marcus Oliveira; FRADE, Alessandra Caroline Montes; GUIMARÃES, Juliana Bohnen; FREITAS, Kátia Michelle; LOPES, Miriam Teresa Paz; GUIMARÃES, André Luiz Sena; DE PAULA, Alfredo Maurício Batista; COIMBRA, Cândido Celso; SANTOS, Sérgio Henrique Sousa. Resveratrol increases brown adipose tissue thermogenesis markers by increasing SIRT1 and energy expenditure and decreasing fat accumulation in adipose tissue of mice fed a standard diet. **European Journal of Nutrition**, [S. l.], v. 53, n. 7, p. 1503–1510, 2014. DOI: 10.1007/s00394-014-0655-6.

BALOGH, Julius; III, David Victor; GORDON, Sherilyn; LI, Xian; GHOBRIAL, R. Mark; JR, Howard P. Monsour. Hepatocellular carcinoma: a review. **Journal of Hepatocellular Carcinoma**, [S. l.], v. Volume 3, p. 41–53, 2016. Disponível em: <https://www.dovepress.com/hepatocellular-carcinoma-a-review-peer-reviewed-article->

JHC.

BARTSCH, Helmut; NAIR, Jagadeesan. Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer: Role of lipid peroxidation, DNA damage, and repair. **Langenbeck's Archives of Surgery**, [S. l.], v. 391, n. 5, p. 499–510, 2006. DOI: 10.1007/s00423-006-0073-1.

BERGSBAKEN, Tessa; FINK, Susan L.; COOKSON, Brad T. Pyroptosis: Host cell death and inflammation. **Nature Reviews Microbiology**, [S. l.], v. 7, n. 2, p. 99–109, 2009. DOI: 10.1038/nrmicro2070.

BERTOT, Luis Calzadilla; ADAMS, Leon Anton. The Natural Course of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. [S. l.], 2016. DOI: 10.3390/ijms17050774.

BOREN, J.; BRINDLE, K. M. Apoptosis-induced mitochondrial dysfunction causes cytoplasmic lipid droplet formation. **Cell Death and Differentiation**, [S. l.], v. 19, n. 9, p. 1561–1570, 2012. DOI: 10.1038/cdd.2012.34. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2012.34>.

BORTNER, Carl D.; OLDENBURG, Nicklas B. E.; CIDLOWSKI, John A. The role of DNA fragmentation in apoptosis. **Trends in Cell Biology**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 21–26, 1995. DOI: 10.1016/S0962-8924(00)88932-1.

BOZZA, Patricia T.; BAKKER-ABREU, Ilka; NAVARRO-XAVIER, Roberta A.; BANDEIRA-MELO, Christianne. Lipid body function in eicosanoid synthesis: An update. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, [S. l.], v. 85, n. 5, p. 205–213, 2011. DOI: 10.1016/j.plefa.2011.04.020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plefa.2011.04.020>.

BRYAN, Nicole B.; DORFLEUTNER, Andrea; KRAMER, Sara J.; YUN, Chawon; ROJANASAKUL, Yon; STEHLIK, Christian. Differential splicing of the apoptosis-associated speck like protein containing a caspase recruitment domain (ASC) regulates inflammasomes. **Journal of Inflammation**, [S. l.], v. 7, p. 1–13, 2010. DOI: 10.1186/1476-9255-7-23.

BUKOWIECKI, L. J.; GELOEN, A.; COLLET, A. J. Proliferation and differentiation of brown adipocytes from interstitial cells during cold acclimation. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, [S. l.], v. 250, n. 6, 1986. DOI: 10.1152/ajpcell.1986.250.6.c880.

BURÝŠEK, Ladislav; HOUŠTĚK, Josef.  $\beta$ -Adrenergic stimulation of interleukin-1 $\alpha$  and interleukin-6 expression in mouse brown adipocytes. **FEBS Letters**, [S. l.], v. 411, n. 1, p. 83–86, 1997. DOI: 10.1016/S0014-5793(97)00671-6.

CANNON, Barbara; NEDERGAARD, Jan. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. **Physiological Reviews**, [S. l.], v. 84, n. 1, p. 277–359, 2004. DOI: 10.1152/physrev.00015.2003.

CHEN, Chiachen; CHANG, Yuan Ching; LAN, Michael S.; BRESLIN, Mary. Leptin stimulates ovarian cancer cell growth and inhibits apoptosis by increasing cyclin D1 and Mcl-1 expression via the activation of the MEK/ERK1/2 and PI3K/Akt signaling pathways. **International Journal of Oncology**, [S. l.], v. 42, n. 3, p. 1113–1119, 2013. DOI: 10.3892/ijo.2013.1789.

CHEN, Y. F.; QI, H. Y.; WU, F. L. Euxanthone exhibits anti-proliferative and anti-invasive activities in hepatocellular carcinoma by inducing pyroptosis: Preliminary results. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, [S. l.], v. 22, n. 23, p. 8186–8196, 2018.

CINTI, Saverio. Pink Adipocytes. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, [S. l.], v. 29, n. 9, p. 651–666, 2018. DOI: 10.1016/j.tem.2018.05.007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2018.05.007>.

COLOTTA, Francesco; ALLAVENA, Paola; SICA, Antonio; GARLANDA, Cecilia; MANTOVANI, Alberto. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: Links to genetic instability. **Carcinogenesis**, [S. l.], v. 30, n. 7, p. 1073–1081, 2009. DOI: 10.1093/carcin/bgp127.

COMPAN, Vincent; MARTÍN-SÁNCHEZ, Fátima; BAROJA-MAZO, Alberto; LÓPEZ-CASTEJÓN, Gloria; GOMEZ, Ana I.; VERKHRATSKY, Alexei; BROUGH, David; PELEGRÍN, Pablo. Apoptosis-Associated Speck-like Protein Containing a CARD Forms Specks but Does Not Activate Caspase-1 in the Absence of NLRP3 during Macrophage Swelling. **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 194, n. 3, p. 1261–1273, 2015. DOI: 10.4049/jimmunol.1301676.

CORRÊA; HEYN; MAGALHAES. The Impact of the Adipose Organ Plasticity on Inflammation and Cancer Progression. **Cells**, [S. l.], v. 8, n. 7, p. 662, 2019. DOI: 10.3390/cells8070662.



COUSSENS, Lisa M.; WERB, Zena. Inflammation and cancer. **Nature**, [S. l.], v. 420, n. 6917, p. 860–867, 2002. DOI: 10.1038/nature01322.

CRUZ, André L. S.; BARRETO, Ester De A.; BOZZA, Patricia T. Lipid droplets : platforms with multiple functions in cancer hallmarks. **Cell Death and Disease**, [S. l.], 2020. DOI: 10.1038/s41419-020-2297-3. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41419-020-2297-3>.

CYPESS, Aaron M. et al. Anatomical localization, gene expression profiling and functional characterization of adult human neck brown fat. **Nature Medicine**, [S. l.], v. 19, n. 5, p. 635–639, 2013. DOI: 10.1038/nm.3112. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.3112>.

D SASSE, U M SPORNITZ, I. P. Maly. **Liver architecture**. **Architectural Record**, 1992.

DA CRUZ, N.S.; PASQUARELLI-DO-NASCIMENTO, G.; E OLIVEIRA, A.C.P.; MAGALHÃES, K. .. Inflammasome-Mediated Cytokines : A Key Connection Cancer Progression. **Biomedicines**, [S. l.], 2022.

DIAZ-PARGA, Pedro; DE ALBA, Eva. Inflammasome regulation by adaptor isoforms, ASC and ASCb, via differential self-assembly. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 298, n. 3, p. 101566, 2022. DOI: 10.1016/j.jbc.2022.101566. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101566>.

DING, Jingjin; WANG, Kun; LIU, Wang; SHE, Yang; SUN, Qi; SHI, Jianjin; SUN, Hanzi; WANG, Da Cheng; SHAO, Feng. Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family. **Nature**, [S. l.], v. 535, n. 7610, p. 111–116, 2016. DOI: 10.1038/nature18590.

DONG, Mei et al. Cold exposure promotes atherosclerotic plaque growth and instability via UCP1-dependent lipolysis. **Cell Metabolism**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 118–129, 2013. DOI: 10.1016/j.cmet.2013.06.003.

DOSTERT, Catherine; PÉTRILLI, Virginie; BRUGGEN, Robin Van; STEELE, Chad; BROOKE, T. Innate Immune Activation Through Nalp3 Inflammasome Sensing of Asbestos and Silica. [S. l.], v. 320, n. 5876, p. 674–677, 2008.

DOUGLAS HANAHAN AND ROBERT A. WEINBERG. The Hallmarks of Cancer.

**Cell**, [S. l.], v. 100, p. 57–70, 2000.

DRAKE, Charles G.; JAFFEE, Elizabeth; PARDOLL, Drew M. Mechanisms of Immune Evasion by Tumors. **Advances in Immunology**, [S. l.], v. 90, n. 1, p. 51–81, 2006. DOI: 10.1016/S0065-2776(06)90002-9.

DU, Tiantian et al. Pyroptosis , metabolism , and tumor immune microenvironment Pyroptosis , metabolism , and tumor immune microenvironment. **Clin. Transl. Med.**, [S. l.], n. June, 2021. DOI: 10.1002/ctm2.492.

DUMAS, Jean François; BRISSON, Lucie. Interaction between adipose tissue and cancer cells: role for cancer progression. **Cancer and Metastasis Reviews**, [S. l.], v. 40, n. 1, p. 31–46, 2021. DOI: 10.1007/s10555-020-09934-2.

ERNST LENGYEL, LIZA MAKOWSKI, JOHN DIGIOVANNI, And Mikhail G. Kolonin. Cancer as a matter of fat: The crosstalk between adipose tissue and tumors. **Physiology & behavior**, [S. l.], v. 176, n. 3, p. 139–148, 2018. DOI: 10.1016/j.trecan.2018.03.004.Cancer.

FABREGAT, Isabel. Dysregulation of apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. **World Journal of Gastroenterology**, [S. l.], v. 15, n. 5, p. 513–520, 2009. DOI: 10.3748/wjg.15.513.

FERNANDES-ALNEMRI, T.; WU, J.; YU, J. W.; DATTA, P.; MILLER, B.; JANKOWSKI, W.; ROSENBERG, S.; ZHANG, J.; ALNEMRI, E. S. The pyroptosome: A supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. **Cell Death and Differentiation**, [S. l.], v. 14, n. 9, p. 1590–1604, 2007. DOI: 10.1038/sj.cdd.4402194.

FINK, Susan L.; COOKSON, Brad T. Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. **Journal of Immunology**, [S. l.], v. 202, n. 7, p. 1913–1926, 2006. DOI: 10.1111/J.1462-5822.2006.00751.x.

FRANKLIN, Bernardo S.; LATZ, Eicke; SCHMIDT, Florian Ingo. The intra-and extracellular functions of ASC specks. **Immunological Reviews**, [S. l.], v. 281, n. 1, p. 74–87, 2018. DOI: 10.1111/imr.12611.

FRIEDMAN, Scott L.; NEUSCHWANDER-TETRI, Brent A.; RINELLA, Mary; SANYAL, Arun J. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies.

**Nature Medicine**, [S. l.], v. 24, n. 7, p. 908–922, 2018. DOI: 10.1038/s41591-018-0104-9. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41591-018-0104-9>.

FUCHSLOCHER CHICO J, SAGGAU C, Adam D. **Proteolytic control of regulated necrosis**. [s.l.] : Elsevier B.V., 2017. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2017.05.025. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.05.025>.

FUKUMURA, Dai; KASHIWAGI, Satoshi; JAIN, Rakesh K. The role of nitric oxide in tumour progression. **Nature Reviews Cancer**, [S. l.], v. 6, n. 7, p. 521–534, 2006. DOI: 10.1038/nrc1910.

GALLE, Peter R.; FORNER, Alejandro; LLOVET, Josep M.; MAZZAFERRO, Vincenzo; PISCAGLIA, Fabio; RAOUL, Jean Luc; SCHIRMACHER, Peter; VILGRAIN, Valérie. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. **Journal of Hepatology**, [S. l.], v. 69, n. 1, p. 182–236, 2018. DOI: 10.1016/j.jhep.2018.03.019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.03.019>.

GALLUZZI, Lorenzo; VITALE, Ilio. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death & Differentiation**, [S. l.], p. 486–541, 2018. DOI: 10.1038/s41418-017-0012-4.

GRETEN, Florian R.; GRIVENNIKOV, Sergei I. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. **Immunity**, [S. l.], v. 51, n. 1, p. 27–41, 2019. DOI: 10.1016/j.immuni.2019.06.025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.06.025>.

GUO, Haitao; CALLAWAY, Justin B.; TING, Jenny P-y. Inflammasomes : mechanism of action , role in disease , and therapeutics. [S. l.], v. 21, n. 7, p. 677–687, 2015. DOI: 10.1038/nm.3893.

HANAHAN, Douglas. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 31–46, 2022. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, [S. l.], v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.

HASEGAWA, Mizuho; IMAMURA, Ryu; MOTANI, Kou; NISHIUCHI, Takumi; MATSUMOTO, Norihiko; KINOSHITA, Takeshi; SUDA, Takashi. Mechanism and

Repertoire of ASC-Mediated Gene Expression. **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 182, n. 12, p. 7655–7662, 2009. DOI: 10.4049/jimmunol.0800448.

HAZUDA, D. J.; LEE, J. C.; YOUNG, P. R. The kinetics of interleukin 1 secretion from activated monocytes. Differences between interleukin 1 $\alpha$  and interleukin 1 $\beta$ . **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 263, n. 17, p. 8473–8479, 1988. DOI: 10.1016/s0021-9258(18)68502-3.

HENAO-MEJIA, Jorge et al. Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. **Nature**, [S. l.], v. 482, n. 7384, p. 179–185, 2012. DOI: 10.1038/nature10809. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nature10809>.

HENAO-MEJIA, Jorge; ELINAV, Eran; THAISS, Christoph A.; FLAVELL, Richard A. Inflammasomes and Metabolic Disease. **Annual Review of Physiology**, [S. l.], v. 76, n. 1, p. 57–78, 2014. DOI: 10.1146/annurev-physiol-021113-170324.

HONDARES, Elayne; IGLESIAS, Roser; GIRALT, Albert; GONZALEZ, Frank J.; GIRALT, Marta; MAMPEL, Teresa; VILLARROYA, Francesc. Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 286, n. 15, p. 12983–12990, 2011. DOI: 10.1074/jbc.M110.215889. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.215889>.

HUYSENTRUYT, Thomas N. Seyfried and Leanne C. On the origin of cancer foci. **Crit Rev Oncog.**, [S. l.], v. 5, n. 3, p. 43–73, 2013. DOI: 10.1002/1097-0142(195205)5:3<581::AID-CNCR2820050319>3.0.CO;2-Q.

KAYAGAKI, Nobuhiko et al. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. **Nature**, [S. l.], v. 479, n. 7371, p. 117–121, 2011. DOI: 10.1038/nature10558.

KAYAGAKI, Nobuhiko et al. NINJ1 mediates plasma membrane rupture during lytic cell death. **Nature**, [S. l.], v. 591, n. 7848, p. 131–136, 2021. DOI: 10.1038/s41586-021-03218-7. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-021-03218-7>.

KIM, Buyun; PARK, Byoungduck. Saffron carotenoids inhibit STAT3 activation and promote apoptotic progression in IL-6-stimulated liver cancer cells. **Oncology Reports**, [S. l.], v. 39, n. 4, p. 1883–1891, 2018. DOI: 10.3892/or.2018.6232.

KISLEV, Nadav; IZGILOV, Roza; ADLER, Raizel; BENAYAHU, Dafna. Exploring the cell stemness and the complexity of the adipose tissue niche. **Biomolecules**, [S. l.], v. 11,

n. 12, 2021. DOI: 10.3390/biom11121906.

KMIEC, Z. et Al. **Cooperation of Liver Cells in Health and Disease**. [s.l: s.n.]. DOI: 10.1007/978-3-642-56553-3.

KOTZBECK, Petra et al. Brown adipose tissue whitening leads to brown adipocyte death and adipose tissue inflammation. **Journal of Lipid Research**, [S. l.], v. 59, n. 5, p. 784–794, 2018. DOI: 10.1194/jlr.M079665.

KOVACS, Stephen B.; MIAO, Edward A. Gasdermins : Effectors of Pyroptosis. **Trends in Cell Biology**, [S. l.], p. 1–12, 2017. DOI: 10.1016/j.tcb.2017.05.005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2017.05.005>.

KRISTY L. TOWNSEND, Yu-Hua Tseng. Brown Fat Fuel Utilization and Thermogenesis Kristy. **Trends Endocrinol Metab.**, [S. l.], v. 25, n. 4, p. 168–177, 2014. DOI: 10.1016/j.tem.2013.12.004.Brown.

LAGOUGE, Marie et al. Resveratrol Improves Mitochondrial Function and Protects against Metabolic Disease by Activating SIRT1 and PGC-1 $\alpha$ . **Cell**, [S. l.], v. 127, n. 6, p. 1109–1122, 2006. DOI: 10.1016/j.cell.2006.11.013.

LALA, Peeyush K.; CHAKRABORTY, Chandan. Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression. **Lancet Oncology**, [S. l.], v. 2, n. 3, p. 149–156, 2001. DOI: 10.1016/S1470-2045(00)00256-4.

LAROCK, Christopher N.; COOKSON, Brad T. Burning Down the House : Cellular Actions during Pyroptosis. **PLOS Pathogens**, [S. l.], v. 9, n. 12, p. 1–4, 2013. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003793.

LEE, Seon Jin; ZHANG, Jinglan; CHOI, Augustine M. K.; KIM, Hong Pyo. Mitochondrial dysfunction induces formation of lipid droplets as a generalized response to stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [S. l.], v. 2013, 2013. DOI: 10.1155/2013/327167.

LEE, Yoon Kwang; PARK, Jung Eun; LEE, Mikang; HARDWICK, James P. Hepatic lipid homeostasis by peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2. **Liver Research**, [S. l.], v. 2, n. 4, p. 209–215, 2018. DOI: 10.1016/j.livres.2018.12.001. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.livres.2018.12.001>.

LEE, Yun-hee; JUNG, Young-suk; CHOI, Dalwoong. Recent advance in brown adipose

physiology and its therapeutic potential. *[S. l.]*, v. 46, n. 2, p. e78-7, 2014. DOI: 10.1038/emm.2013.163. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/emm.2013.163>.

LI, Ping et al. Mice Deficient in IL-1p-Converting Enzyme Are Defective in Production of Mature IL-1p and Resistant to Endotoxic Shock. *[S. l.]*, v. 80, p. 401–411, 1995.

LI, Ping et al. Transplantation of brown adipose tissue up-regulates miR-99a to ameliorate liver metabolic disorders in diabetic mice by targeting NOX4. **Adipocyte**, *[S. l.]*, v. 9, n. 1, p. 57–67, 2020. DOI: 10.1080/21623945.2020.1721970. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21623945.2020.1721970>.

LI, Shuxuan; CHEN, Lanlan; LV, Guoyue. Interleukin-6 Receptor Blockade can Increase the Risk of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Indications From Mendelian Randomization. **Frontiers in Pharmacology**, *[S. l.]*, v. 13, n. June, p. 1–7, 2022. DOI: 10.3389/fphar.2022.905936.

LIU, Dong; LI, Yi; SHANG, Yue; WANG, Wendie; CHEN, Shu Zhen. Effect of brown adipose tissue/cells on the growth of mouse hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. **Oncology Letters**, *[S. l.]*, v. 17, n. 3, p. 3203–3210, 2019. DOI: 10.3892/ol.2019.9977.

LIU, Xinghan; YIN, Lijie; SHEN, Sunan; HOU, Yayi. Inflammation and cancer: paradoxical roles in tumorigenesis and implications in immunotherapies. **Genes and Diseases**, *[S. l.]*, n. xxxx, 2021. DOI: 10.1016/j.gendis.2021.09.006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2021.09.006>.

LLOVET, Josep M. et al. Hepatocellular carcinoma. **Nature Reviews Disease Primers**, *[S. l.]*, v. 7, n. 1, 2021. DOI: 10.1038/s41572-020-00240-3. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41572-020-00240-3>.

LOPEZ-CASTEJON, Gloria; BROUGH, David. Understanding the mechanism of IL-1 $\beta$  secretion. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, *[S. l.]*, v. 22, n. 4, p. 189–195, 2011. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2011.10.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.10.001>.

LOWELL, B. B.; FLIER, J. S. Brown adipose tissue,  $\beta$ 3-adrenergic receptors, and obesity. **Annual Review of Medicine**, *[S. l.]*, v. 48, p. 307–316, 1997. DOI: 10.1146/annurev.med.48.1.307.

LUO, Qiuhua; ZHANG, Ling; LUO, Cong; JIANG, Mingyan. Emerging strategies in

cancer therapy combining chemotherapy with immunotherapy. **Cancer Letters**, [S. l.], v. 454, p. 191–203, 2019. DOI: 10.1016/j.canlet.2019.04.017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.04.017>.

LURJE, Isabella; CZIGANY, Zoltan; BEDNARSCH, Jan; RODERBURG, Christoph; ISFORT, Peter; NEUMANN, Ulf Peter; LURJE, Georg. Treatment strategies for hepatocellular carcinoma—A multidisciplinary approach. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 20, n. 6, p. 1–27, 2019. DOI: 10.3390/ijms20061465.

M. E. J. LEAN. Brown adipose tissue in humans. **Proceedings of the Nutrition Society**, [S. l.], p. 243–256, 1989.

MAN, Kwan et al. Suppression of Liver Tumor Growth and Metastasis by Adiponectin in Nude Mice through Inhibition of Tumor Angiogenesis and Downregulation of Rho Kinase / IFN- Inducible Protein 10 / Matrix Metalloproteinase 9 Signaling. [S. l.], n. 8, p. 967–978, 2010. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1487.

MANIERI, Elisa et al. Adiponectin accounts for gender differences in hepatocellular carcinoma incidence. **Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], v. 216, n. 5, p. 1108–1119, 2019. DOI: 10.1084/jem.20181288.

MARRERO, Jorge A.; KULIK, Laura M.; SIRLIN, Claude; ZHU, Andrew X.; FINN, Richard S.; ABECASSIS, Michael M.; ROBERTS, Lewis R.; HB, C.; HEIMBACH, Julie K. Diagnosis , Staging and Management of Hepatocellular Carcinoma : 2018 Practice Guidance by the American Association for the Study of Liver Diseases. [S. l.], 2018. DOI: 10.1002/hep.

MARTINON, Fabio; BURNS, Kimberly; TSCHOPP, Jürg. The Inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- $\beta$ . **Molecular Cell**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. 417–426, 2002. DOI: 10.1016/S1097-2765(02)00599-3.

MATTHEWS, V. B. et al. Interleukin-6-deficient mice develop hepatic inflammation and systemic insulin resistance. **Diabetologia**, [S. l.], v. 53, n. 11, p. 2431–2441, 2010. DOI: 10.1007/s00125-010-1865-y.

MAUER, Jan et al. Signaling by IL-6 promotes alternative activation of macrophages to limit endotoxemia and obesity-associated resistance to insulin. **Nature Immunology**, [S. l.], v. 15, n. 5, p. 423–430, 2014. DOI: 10.1038/ni.2865.

MAUER, Jan; DENSON, Jesse L.; BRÜNING, Jens C. Versatile functions for IL-6 in metabolism and cancer. **Trends in Immunology**, [*S. l.*], v. 36, n. 2, p. 92–101, 2015. DOI: 10.1016/j.it.2014.12.008.

MIAO, Edward A.; LEAF, Irina A.; TREUTING, Piper M.; MAO, Dat P.; DORS, Monica; SARKAR, Anasuya; WARREN, Sarah E.; WEWERS, Mark D.; ADEREM, Alan. Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. **Nature Immunology**, [*S. l.*], v. 11, n. 12, p. 1136–1142, 2010. DOI: 10.1038/ni.1960.

NAKANISHI, Kenji; YOSHIMOTO, Tomohiro; TSUTSUI, Hiroko; OKAMURA, Haruki. Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. [*S. l.*], v. 12, p. 53–72, 2001.

NAUGLER, Willscott E.; SAKURAI, Toshiharu; KIM, Sunhwa; MAEDA, Shin; KIM, Kyoung Hyun; ELSHARKAWY, Ahmed M.; KARIN, Michael. Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. **Science**, [*S. l.*], v. 317, n. 5834, p. 121–124, 2007. DOI: 10.1126/science.1140485.

NEDERGAARD, Jan; BENGTSSON, Tore; CANNON, Barbara. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. **J Physiol Endocrinol Metab**, [*S. l.*], p. 444–452, 2007. DOI: 10.1152/ajpendo.00691.2006.

OHTSUKA, Takao; RYU, Hoon; MINAMISHIMA, Yohji A.; MACIP, Salvador; SAGARA, Junji; NAKAYAMA, Keiichi I.; AARONSON, Stuart A.; LEE, Sam W. ASC is a Bax adaptor and regulates the p53-Bax mitochondrial apoptosis pathway. **Nature Cell Biology**, [*S. l.*], v. 6, n. 2, p. 121–128, 2004. DOI: 10.1038/ncb1087.

OLZMANN, James A.; CARVALHO, Pedro. Dynamics and functions of lipid droplets. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [*S. l.*], v. 20, n. 3, p. 137–155, 2019. DOI: 10.1038/s41580-018-0085-z. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41580-018-0085-z>.

ORTEGA-MOLINA, Ana et al. Pten positively regulates brown adipose function, energy expenditure, and longevity. **Cell Metabolism**, [*S. l.*], v. 15, n. 3, p. 382–394, 2012. DOI: 10.1016/j.cmet.2012.02.001.

ORTEGA-MOLINA, Ana; SERRANO, Manuel. PTEN in cancer, metabolism, and aging. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, [*S. l.*], v. 24, n. 4, p. 184–189, 2013.



DOI: 10.1016/j.tem.2012.11.002. Disponível em:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2012.11.002>.

PEREIRA, Felipe V et al. Metformin exerts antitumor activity via induction of multiple death pathways in tumor cells and activation of a protective immune response. **Oncotarget**, [S. l.], v. 9, n. 40, p. 25808–25825, 2018. Disponível em: [www.oncotarget.com](http://www.oncotarget.com).

PIMENTEL, Lívia; RIBEIRO, Dalila Juliana S.; MARIA, Aline; MARTINS, Araújo; NEVES, Fábio; CORRÊA, Rafael; ALMEIDA, Neves. Absence of the Caspases 1 / 11 Modulates Liver Global Lipid Profile and Gut Microbiota in High-Fat-Diet-Induced Obese Mice. **Front. Immunol.**, [S. l.], v. 10, n. January, p. 1–13, 2020. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02926.

PORTA, C.; DE AMICI, M.; QUAGLINI, S.; PAGLINO, C.; TAGLIANI, F.; BONCIMINO, A.; MORATTI, R.; CORAZZA, G. R. Circulating interleukin-6 as a tumor marker for hepatocellular carcinoma. **Annals of Oncology**, [S. l.], v. 19, n. 2, p. 353–358, 2008. DOI: 10.1093/annonc/mdm448. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdm448>.

POUWELS, Sjaak; SAKRAN, Nasser; GRAHAM, Yitka; LEAL, Angela; PINTAR, Tadeja; YANG, Wah; KASSIR, Radwan. Non-alcoholic fatty liver disease ( NAFLD ): a review of pathophysiology , clinical management and effects of weight loss. **BMC Endocrine Disorders**, [S. l.], p. 1–9, 2022. DOI: 10.1186/s12902-022-00980-1. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12902-022-00980-1>.

RADI, Zaher A.; STEWART, Zachary S.; NEIL, Shawn P. O. Accidental and Programmed Cell Death in Investigative and Toxicologic Pathology. **Current Protocols in Toxicology**, [S. l.], v. 76, p. 1–14, 2018. DOI: 10.1002/cptx.51.

RAMÓN Y CAJAL, Santiago et al. Cancer as an ecomolecular disease and a neoplastic consortium. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, [S. l.], v. 1868, n. 2, p. 484–499, 2017. DOI: 10.1016/j.bbcan.2017.09.004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2017.09.004>.

RINGELHAN, Marc; PFISTER, Dominik; CONNOR, Tracy O.; PIKARSKY, Eli; HEIKENWALDER, Mathias. The immunology of hepatocellular carcinoma. **Nature Immunology**, [S. l.], v. 19, n. March, 2018. DOI: 10.1038/s41590-018-0044-z.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41590-018-0044-z>.

SAXENA, Neeraj K.; SHARMA, Dipali; DING, Xiaokun; LIN, Songbai; MARRA, Fabio; MERLIN, Didier; ANANIA, Frank A. Concomitant activation of the JAK/STAT, PI3K/AKT, and ERK signaling is involved in leptin-mediated promotion of invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells. **Cancer Research**, [S. l.], v. 67, n. 6, p. 2497–2507, 2007. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3075.

SCHEJA, Ludger; HEEREN, Joerg. Metabolic interplay between white, beige, brown adipocytes and the liver. **Journal of Hepatology**, [S. l.], v. 64, n. 5, p. 1176–1186, 2016. DOI: 10.1016/j.jhep.2016.01.025. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2016.01.025>.

SEKI, Takahiro et al. Brown-fat-mediated tumour suppression by cold-altered global metabolism. **Nature**, [S. l.], v. 608, n. August, 2022. DOI: 10.1038/s41586-022-05030-3.

SHANKAR, Kripa; KUMAR, Durgesh; GUPTA, Sanchita; VARSHNEY, Salil; RAJAN, Sujith. Role of brown adipose tissue in modulating adipose tissue inflammation and insulin resistance in high-fat diet fed mice. **European Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 854, n. August 2018, p. 354–364, 2019. DOI: 10.1016/j.ejphar.2019.02.044. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.02.044>.

SHEN, B. et al. PPARgamma inhibits hepatocellular carcinoma metastases in vitro and in mice. **British Journal of Cancer**, [S. l.], v. 106, n. 9, p. 1486–1494, 2012. DOI: 10.1038/bjc.2012.130.

SHEN, Sijia; LIN, Yuxin; YUAN, Xuye; SHEN, Li; CHEN, Jiajia; CHEN, Luonan; QIN, Lei; SHEN, Bairong. Biomarker MicroRNAs for Diagnosis, Prognosis and Treatment of Hepatocellular Carcinoma: A Functional Survey and Comparison. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 6, n. December, p. 1–21, 2016. DOI: 10.1038/srep38311. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/srep38311>.

SHIMIZU, Ippei; WALSH, Kenneth. The Whitening of Brown Fat and Its Implications for Weight Management in Obesity. **Current obesity reports**, [S. l.], v. 4, n. 2, p. 224–229, 2015. DOI: 10.1007/s13679-015-0157-8.

SIMS, John E.; SMITH, Dirk E. The IL - 1 family : regulators of immunity. **Nature Reviews Immunology**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. 89–102, 2010. DOI: 10.1038/nri2691.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nri2691>.

SKARULIS, Monica C. et al. Thyroid hormone induced brown adipose tissue and amelioration of diabetes in a patient with extreme insulin resistance. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, [S. l.], v. 95, n. 1, p. 256–262, 2010. DOI: 10.1210/jc.2009-0543.

SPONTON, Carlos H. et al. The regulation of glucose and lipid homeostasis via PLTP as a mediator of BAT –liver communication . **EMBO reports**, [S. l.], v. 21, n. 9, p. 1–17, 2020. DOI: 10.15252/embr.201949828.

STANFORD, Kristin I. et al. Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. **Journal of Clinical Investigation**, [S. l.], v. 123, n. 1, p. 215–223, 2013. DOI: 10.1172/JCI62308.

STIENSTRA, Rinke et al. Inflammasome is a central player in the induction of obesity and insulin resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 108, n. 37, p. 15324–15329, 2011. a. DOI: 10.1073/pnas.1100255108.

STIENSTRA, Rinke et al. Inflammasome is a central player in the induction of obesity and insulin resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 108, n. 37, p. 15324–15329, 2011. b. DOI: 10.1073/pnas.1100255108.

SU, Bo et al. Interleukin-1 $\beta$ /interleukin-1 receptor-associated kinase 1 inflammatory signaling contributes to persistent Gankyrin activation during hepatocarcinogenesis. **Hepatology**, [S. l.], v. 61, n. 2, p. 585–597, 2015. DOI: 10.1002/hep.27551.

SUN, Bingwei; QIN, Weiting; SONG, Mingming; LIU, Lu; YU, Yao; QI, Xinxin; SUN, Hui. Neutrophil suppresses tumor cell proliferation via fas /fas ligand pathway mediated cell cycle arrested. **International Journal of Biological Sciences**, [S. l.], v. 14, n. 14, p. 2103–2113, 2018. DOI: 10.7150/ijbs.29297.

TANG, Daolin; KANG, Rui; BERGHE, Tom Vanden; VANDENABEELE, Peter. The molecular machinery of regulated cell death. **Cell Research**, [S. l.], n. March, 2019. DOI: 10.1038/s41422-019-0164-5. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41422-019-0164-5>.

TCHERNOF, André; DESPRÉS, Jean Pierre. Pathophysiology of human visceral obesity: An update. **Physiological Reviews**, [S. l.], v. 93, n. 1, p. 359–404, 2013. DOI: 10.1152/physrev.00033.2011.

VANDANMAGSAR, Bolormaa; YOUM, Yun-hee; RAVUSSIN, Anthony; GALGANI, Jose E.; STADLER, Krisztian; MYNATT, Randall L.; RAVUSSIN, Eric; STEPHENS, Jacqueline M.; DIXIT, Vishwa Deep. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. **Nature Medicine**, [S. l.], v. 17, n. 2, p. 179–188, 2011. DOI: 10.1038/nm.2279. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2279>.

VANNI, Ester; BUGIANESI, Elisabetta. Obesity and liver cancer. **Clinics in Liver Disease**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 191–203, 2014. DOI: 10.1016/j.cld.2013.09.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cld.2013.09.001>.

VILLARROYA, Joan; CEREIJO, Rub n.; GAVALD -NAVARRO, Aleix; PEYROU, Marion; GIRALT, Marta; VILLARROYA, Francesc. New insights into the secretory functions of brown adipose tissue. **Journal of Endocrinology**, [S. l.], v. 243, n. 2, p. R19–R27, 2019. DOI: 10.1530/JOE-19-0295.

VIRTANEN, Kirsi A. Activation of human brown adipose tissue (BAT): Focus on nutrition and eating. **Handbook of Experimental Pharmacology**, [S. l.], v. 251, p. 349–357, 2019. DOI: 10.1007/164\_2018\_136.

WANG, Guo Xiao et al. The brown fat-enriched secreted factor Nrg4 preserves metabolic homeostasis through attenuation of hepatic lipogenesis. **Nature Medicine**, [S. l.], v. 20, n. 12, p. 1436–1443, 2014. DOI: 10.1038/nm.3713.

WANG, Ling; LIU, Jiaye; MIAO, Zhijiang; PAN, Qiuwei; CAO, Wanlu. Lipid droplets and their interactions with other organelles in liver diseases. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, [S. l.], v. 133, n. December 2020, p. 105937, 2021. DOI: 10.1016/j.biocel.2021.105937. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2021.105937>.

WANG, Shuo; LIU, Yuantong; ZHANG, Lu; SUN, Zhijun. Methods for monitoring cancer cell pyroptosis. [S. l.], 2022. DOI: 10.20892/j.issn.2095-3941.2021.0504.

WANG, Siyu; PAN, Min-hsiung; HUNG, Wei-lun; TUNG, Yen-chen; HO, Chi-tang. From white to beige adipocytes: therapeutic potential of dietary molecules against obesity and their molecular mechanisms. **Food & Function**, [S. l.], p. 1263–1279, 2019. DOI:

10.1039/c8fo02154f.

WANI, Kaiser; ALHARTHI, Hind; ALGHAMDI, Amani; SABICO, Shaun; AL-DAGHRI, Nasser M. Role of NLRP3 inflammasome activation in obesity-mediated metabolic disorders. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [S. l.], v. 18, n. 2, p. 1–21, 2021. DOI: 10.3390/ijerph18020511.

WEI, Qing et al. Deregulation of the NLRP3 inflammasome in hepatic parenchymal cells during liver cancer progression. **Laboratory Investigation**, [S. l.], v. 94, n. 1, p. 52–62, 2014. DOI: 10.1038/labinvest.2013.126. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/labinvest.2013.126>.

WEI, Qing; ZHU, Rui; ZHU, Junying; ZHAO, Rongping; LI, Min. E2-induced activation of the NLRP3 inflammasome triggers pyroptosis and inhibits autophagy in HCC cells. **Oncology Research**, [S. l.], v. 27, n. 7, p. 827–834, 2019. DOI: 10.3727/096504018X15462920753012.

WEINSTEIN, I. Bernard; JOE, Andrew K. Mechanisms of Disease: Oncogene addiction - A rationale for molecular targeting in cancer therapy. **Nature Clinical Practice Oncology**, [S. l.], v. 3, n. 8, p. 448–457, 2006. DOI: 10.1038/ncponc0558.

WU, Kelvin Ka Lok; CHEUNG, Samson Wing Ming; CHENG, Kenneth King Yip. NLRP3 inflammasome activation in adipose tissues and its implications on metabolic diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 21, n. 11, p. 1–22, 2020. DOI: 10.3390/ijms21114184.

XIA X, WANG X, CHENG Z, QIN W, LEI L, JIANG J, Hu J. The role of pyroptosis in cancer : pro-cancer or pro- “ host ”? **Cell Death and Disease**, [S. l.], 2019. DOI: 10.1038/s41419-019-1883-8. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41419-019-1883-8>.

XU, Junnv; LIN, Haifeng; WU, Gang; ZHU, Mingyue; LI, Mengsen. IL-6 / STAT3 Is a Promising Therapeutic Target for Hepatocellular Carcinoma. **Frontiers in Oncology**, [S. l.], v. 11, n. December, p. 1–14, 2021. DOI: 10.3389/fonc.2021.760971.

YANG, DH. The Biological Effects of Interleukin-6 and Their Clinical Applications in Autoimmune Diseases and Cancers. **Rheumatica Acta: Open Access**, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 006–016, 2017. DOI: 10.17352/raoa.000003.

YANG, Felix T.; STANFORD, Kristin I. Batokines : Mediators of Inter - Tissue Communication ( a Mini - Review ). **Current Obesity Reports**, [S. l.], p. 1–9, 2022. DOI: 10.1007/s13679-021-00465-7. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13679-021-00465-7>.

YANG, Xinyu; LU, Di; ZHUO, Jianyong; LIN, Zuyuan; YANG, Modan; XU, Xiao. The Gut-liver Axis in Immune Remodeling : New insight into Liver Diseases. [S. l.], v. 16, 2020. DOI: 10.7150/ijbs.46405.

YOUM, Yun Hee; ADIJIANG, Ayinuer; VANDANMAGSAR, Bolormaa; BURK, David; RAVUSSIN, Anthony; DIXIT, Vishwa Deep. Elimination of the NLRP3-ASC inflammasome protects against chronic obesity-induced pancreatic damage. **Endocrinology**, [S. l.], v. 152, n. 11, p. 4039–4045, 2011. DOI: 10.1210/en.2011-1326.

YU, Pian; ZHANG, Xu; LIU, Nian; TANG, Ling; PENG, Cong; CHEN, Xiang. Pyroptosis: mechanisms and diseases. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, [S. l.], v. 6, n. 1, 2021. DOI: 10.1038/s41392-021-00507-5. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41392-021-00507-5>.

ZAREI, Mohammad; PIZARRO-DELGADO, Javier; BARROSO, Emma; PALOMER, Xavier. Targeting FGF21 for the Treatment of Nonalcoholic Steatohepatitis. **Trends in Pharmacological Sciences**, [S. l.], p. 1–10, 2020. DOI: 10.1016/j.tips.2019.12.005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tips.2019.12.005>.

ZHANG, Jian Hua; XU, Ming. DNA fragmentation in apoptosis. **Cell Research**, [S. l.], v. 10, n. 3, p. 205–211, 2000. DOI: 10.1038/sj.cr.7290049.

ZHANG, Lilong; YUAN, Qihang; LI, Man; CHAI, Dongqi; DENG, Wenhong; WANG, Weixing. The association of leptin and adiponectin with hepatocellular carcinoma risk and prognosis : a combination of traditional , survival , and dose-response meta-analysis. [S. l.], p. 1–20, 2020.

ZHOU, He Ming; ZHANG, Ji Gang; ZHANG, Xue; LI, Qin. Targeting cancer stem cells for reversing therapy resistance: mechanism, signaling, and prospective agents. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, [S. l.], v. 6, n. 1, 2021. DOI: 10.1038/s41392-020-00430-1. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41392-020-00430-1>.

## **Anexos**



Review

# Inflammasome-Mediated Cytokines: A Key Connection between Obesity-Associated NASH and Liver Cancer Progression

Nathalia Soares da Cruz , Gabriel Pasquarelli-do-Nascimento, Augusto César Polveiro e Oliveira and Kelly Grace Magalhães \*

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

\* Correspondence: kellymagalhaes@unb.br

**Abstract:** Liver cancer is one of the most lethal malignancies and is commonly diagnosed as hepatocellular carcinoma (HCC), a tumor type that affects about 90% of patients. Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and obesity are both risk factors for this disease. HCC initiation and progression are deeply linked with changes in the hepatic microenvironment, with cytokines playing key roles. The understanding of the pathogenic pathways that connect these disorders to liver cancer remains poor. However, the inflammasome-mediated cytokines associated with both diseases are central actors in liver cancer progression. The release of the pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and IL-18 during inflammasome activation leads to several detrimental effects on the liver microenvironment. Considering the critical crosstalk between obesity, NASH, and HCC, this review will present the connections of IL-1 $\beta$  and IL-18 from obesity-associated NASH with HCC and will discuss approaches to using these cytokines as therapeutic targets against HCC.



**Citation:** da Cruz, N.S.; Pasquarelli-do-Nascimento, G.; Oliveira, A.C.P.; Magalhães, K.G. Inflammasome-Mediated Cytokines: A Key Connection between Obesity-Associated NASH and Liver Cancer Progression. *Biomedicines* **2022**, *10*, 2344. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10102344>

Academic Editor: Nadège Kindt

Received: 6 September 2022

Accepted: 18 September 2022

Published: 21 September 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Keywords:** HCC; NASH; obesity; inflammation; inflammasomes

## 1. Introduction

According to data from the Global Burden of Disease (GBD), in 2019 liver cancer was the eighth death-related type of cancer in the world. Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common primary liver cancer and covers about 80–90% of cases [1]. This cancer is aggressive and impacts liver hepatocytes. Its diagnosis can be made through magnetic resonance imaging, ultrasound, and serological tests that identify biomarkers such as alpha-fetoprotein (AFP), des-gamma-carboxy-prothrombin (DCP) [2], and, more recently, micro RNAs, such as miR-25 [3]. Biopsy is another option, but it is avoided due to its invasiveness [2].

HCC impacts patients' quality of life, and the most common symptoms are abdominal pain, weight loss, fever, and the worsening of hepatic synthetic function [4]. However, many patients are asymptomatic, and the diagnosis is made late when the disease is already advanced [5]. In addition, HCC, as with other cancers, is highly heterogeneous among patients due to genetic and epigenetic diversity and the tumor microenvironment [6], which makes treatment difficult. This heterogeneity is also reflected in the HCC immune response, which can be divided into some sub-classes, including "active immune", "exhausted immune", and "immune excluded" [7]. The "active immune" subtype associates with active T helper cells (CD4<sup>+</sup>) and CD8<sup>+</sup> enrichment and responds well to treatment with immune checkpoint inhibitors (ICIs). The "exhausted immune" subtype is characterized by abundant TGF $\beta$ -secreting T lymphocytes, which are cells that show an exhausted status, and by the presence of immunosuppressive macrophages. In turn, the "immune excluded" subtype copes with increased an Treg cell number, has a worse prognosis, and does not respond to ICI therapies [1].



The main risk factors for HCC are infections by hepatitis B (HBV) and hepatitis C (HCV) viruses, alcohol abuse, obesity, and non-alcoholic steatohepatitis (NASH) [8]. NASH is part of a spectrum of liver disorders called non-alcoholic fatty liver diseases (NAFLD), which range from steatosis (NAFL), characterized by fat accumulation in liver tissue, to NASH, described as a pathological fat storage process associated with inflammation, liver injury, and fibrosis [9,10]. A “two-hit” model was proposed to explain NASH establishment [11]. The “first hit” is related to a dysregulated accumulation of lipids within liver tissue, generating hepatic steatosis, and the “second hit” triggers hepatocellular injury and inflammation due to liver oxidative stress and lipid peroxidation [11]. However, several studies have shown alternative mechanisms involving multiple pathways and metabolic hits that result in an unhealthy liver.

Within the NAFLD spectrum, only NASH, in association with fibrosis, can progress to cirrhosis and HCC [12,13]. Obesity is often present in patients with NASH, and this may increase the risk of developing HCC [14]. Additionally, studies have demonstrated that the gut microbiota plays crucial roles in nutrient harvest and fat storage, important processes for obesity progression [15], and deeply impacts NASH development, once patients show dysbiosis that favors alcohol-producing microbes and the occurrence of systemic inflammatory responses [16–18]. The connection between obesity-associated NASH pathways and HCC remains poorly understood. However, cumulative factors, such as inflammasome-mediated cytokines from obesity-associated NASH, are a possible link between these diseases with HCC development.

Obesity is characterized by a low-grade chronic inflammation [19] with dysregulation in the adipose tissues (ATs), among them white AT (WAT) and brown AT (BAT), endocrine organs that can modulate the inflammatory status through the secretion of several mediators, such as chemokines and cytokines [20]. The latter includes the pro-inflammatory molecules interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and IL-18, which are matured by the action of assembled inflammasomes, multiprotein complexes that can also induce immunogenic pyroptotic cell death [21]. The inflammasomes are crucial for inflammatory homeostasis, directly influencing both obesity and NASH as well as liver cancer [22]. Although inflammasomes were first related to the organism’s defense against pathogens, studies have linked these molecules to many metabolic diseases, such as obesity [22], type 2 diabetes mellitus [16], NAFLD [16,23], and HCC [24]. In this review article, we will present the possible links between inflammasome-mediated cytokines, obesity-associated NASH, and HCC development, and we will also discuss approaches to using IL-1 $\beta$  and IL-18 as therapeutic targets in the context of HCC.

## 2. Inflammasomes as a Mediator of Pro-Inflammatory Cytokines

Inflammation is a mechanism of the immune system to protect the host against pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and danger-associated molecular patterns (DAMPs). Innate immunity recognizes PAMPs and DAMPs by germline-encoded pattern-recognition receptors (PRRs). Ligand recognition or cellular disorder is a trigger to activate downstream signaling pathways followed by the production of pro-inflammatory cytokines and chemokines [25].

There are some classes of PRRs, among them the Toll-like receptor (TLR), a trans-membrane protein situated on the cell surface, absent in melanoma 2 (AIM2), a sensor for cytosolic DNA [26], and NOD-like receptor (NLR), which recognizes PAMPs in the cytoplasm [27,28]. In humans, there are 22 members in the NLR family, categorized into 4 subfamilies based on N-terminal domains: NLRA, with a domain formed by acidic transactivation; NLRB, accompanied by a baculoviral inhibitory repeat (BIR) domain; NLRC, containing a caspase-recruitment and activation domain (CARD); and NLRP, a pyrin-containing domain (PYD). In addition to that, NLRs have an intermediary NACHT, NOD, or NBS domain and a C-terminal leucine-rich repeat (LRR) domain [29,30].

Currently, the NLR family members, including NLRP1, NLRP3, and NLRC4, are best described as assembled inflammasome components, as well as AIM2 and pyrin [30]. In 2002,

Martinon and colleagues showed that the inflammasomes are responsible for activating the protease caspase-1 [31]. Once activated, this protein cleaves zymogen forms of IL-1 $\beta$  and IL-18 into their active form [32]. In addition to activating these potent pro-inflammatory cytokines, caspase-1 is also capable of inducing pyroptotic cell death [33]. The connection between NLRs and caspase-1 occurs through the adaptor protein ASC (apoptosis-associated speck-like protein, containing a CARD), which contains an N-terminal PYD domain and a C-terminal CARD domain [34]. Studies have demonstrated that the absence of ASC in mice alters the maturation and release of IL-1 $\beta$  and IL-18 [35–37]. Therefore, ASC has an important role in the inflammasome function [37].

The canonical pathway of NLRP3 inflammasome activation and the consequent release of IL-1 $\beta$  and IL-18 is a process tightly controlled by two signals. The first involves TLR stimulation, which results in the transcriptional upregulation of genes encoding the inflammasome components, pro-IL-1 $\beta$  and pro-IL-18, via nuclear factor kappa B (NF $\kappa$ B) activity. The second signal, needed for activating caspase-1, is provided by microparticles, such as ATP, via the P2X7 receptor, reactive oxygen species, K<sup>+</sup> efflux through ion channels, and cathepsin B activation [38,39].

In turn, the non-canonical pathway occurs through direct binding of LPS with caspase-11 (in mice) and caspase-4/5 (in humans), without TLR activation [40]. Then, active caspase-11 will cleave the IL-1 $\beta$  and IL-18 cytokines. Caspase-11 is also involved in the pyroptotic cell death [41].

The inflammasome-mediated cytokines can lead to an inflammatory microenvironment in obesity that contributes to NASH establishment and may support liver cancer development.

### 3. IL-1 $\beta$ and IL-18 in Liver Cancer Progression

Inflammation has a dual effect in the cancer context, which can harm or benefit the tumor. Acute inflammation can trigger an anti-cancer immune response [42]. Chronic inflammation, on the other hand, can cope with augmented levels of cell growth and pro-angiogenic factors and with changes in the extracellular matrix that facilitate metastasis and DNA damage, thus contributing to an increase in cells with genetic alterations [43]. In the liver, IL-1 $\beta$  leads to, among other consequences, the release of IL-6 and TNF- $\alpha$  [44]. The increase in IL-6 levels is related to a worse prognosis in HCC patients [45]. In turn, IL-18 may influence the recruitment of T and NK cells [46].

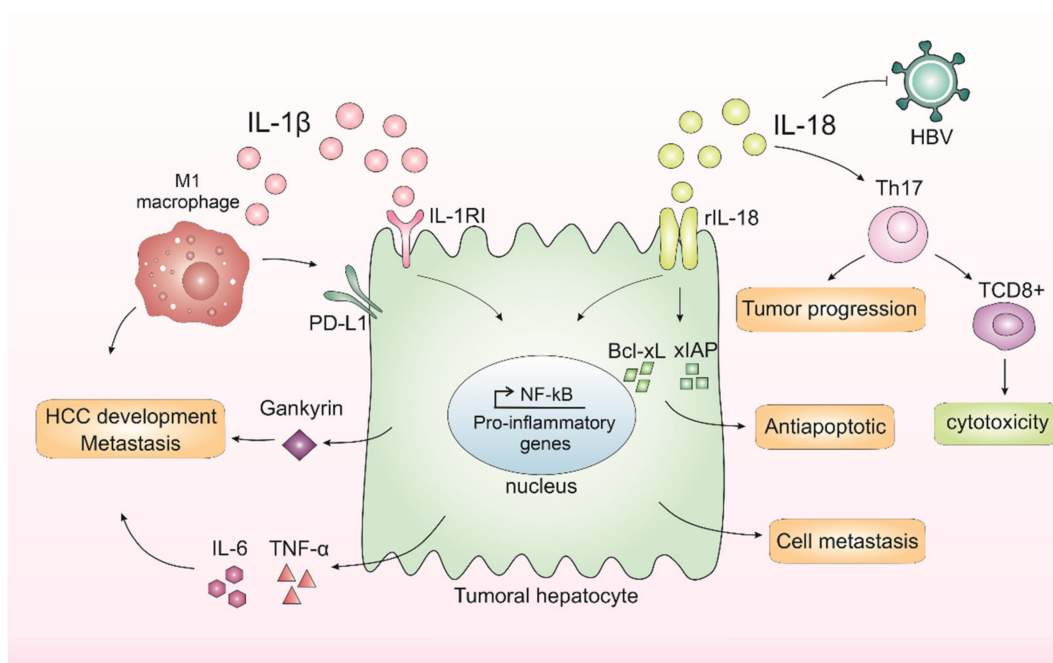
There is a dysregulation in the NLRP3 inflammasome components in HCC depending on the stage of hepatocarcinogenesis [24]. Wei and others showed that during the development of HCC, the NLRP3 components are dysregulated depending on the disease stage, while in the inflammatory hepatic setting it copes with IL-1 $\beta$  and NLRP3 upregulation, and malignantly transformed liver cancer is downregulated [24]. IL-1 $\beta$  binds to interleukin-1 receptor type I (IL-1RI) and, after a series of cascades, activates NF- $\kappa$ B, which in turn is related to proliferation [47] and inflammation [48]. IL-1 $\beta$  can also promote the expression of the oncoprotein Gankyrin, which plays a critical role in HCC development and metastasis [49].

In 2019, Zong and colleagues demonstrated that M1 macrophages induced the expression of the programmed death ligand 1 (PD-L1) in HCC cells through IL-1 $\beta$ , supporting the pro-tumor role of M1 macrophages and IL-1 $\beta$  [50]. Corroborating with this study, another group recently showed that IL-1 $\beta$  induced PD-L1 expression in HCC, a phenomenon that contributes to tumor immune resistance in HCC [51]. Polymorphisms in the IL-1 family genes were described in HCC patients, which suggests that IL-1 $\beta$  contributes to HCC susceptibility and plays an important role in the progression of this neoplasm [52].

Another inflammasome-mediated cytokine, IL-18, is also involved in liver cancer occurrence. This cytokine is upregulated in HCV patients, an important risk factor for HCC. The studies showed that the IL-18 receptor (rhIL-18) is expressed in both HCC patients and cell lines [53]. The activation of this receptor was capable of increasing NF- $\kappa$ B activation and anti-apoptotic molecule expression, including Bcl-xL and XIAP [53]. Therefore, the

expression of rhIL-18 and an antiapoptotic mechanism involving NF- $\kappa$ B activation in HCC cells may be related to poor prognosis in HCC patients [53]. Corroborating with these findings, a 2020 study indicated that IL-18 single nucleotide gene polymorphism could be a marker for HCC in patients with HCV-related cirrhosis [54], and IL-18 gene polymorphisms could be used as a potential non-invasive diagnostic tool for HCC patients at early stages [55], which is supported by recent findings that IL-18 high levels are found in HCC patients with poor prognosis [56].

In contrast, studies have also demonstrated a dual function of IL-18 in tumor progression. IL-18 can regulate Th17 cells in vitro and in vivo in the HCC model [57]. Th17 cells can both worsen prognosis [58,59] and affect antitumor cytotoxicity by CD8<sup>+</sup> T-cells [59,60]. In human hepatocytes, it was demonstrated in vitro that IL-18 inhibited HBV replication but also promoted HepG2 cell metastasis and migration [59]. Taking these results, the IL-1 $\beta$  and IL-18 effects on HCC are demonstrated in Figure 1.



**Figure 1. Inflammasomes-mediated cytokines IL-1 $\beta$  and IL-18 in liver cancer progression.** In the liver, IL-1 $\beta$  leads to the release of IL-6 and TNF- $\alpha$ , cytokines related to a worse prognosis in hepatocellular carcinoma (HCC). IL-1 $\beta$  binds to interleukin-1 receptor type I (IL-1RI) and, after a series of cascades, activates nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B), which in turn is related to proliferation and inflammation. IL-1 $\beta$  is also capable of promoting the expression of an oncoprotein, Gankyrin, which plays a critical role in HCC development and metastasis. M1 macrophages induce the expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) in HCC cells through IL-1 $\beta$ , supporting the pro-tumor role of M1 macrophages and IL-1 $\beta$ . IL-18 receptor (rIL-18) is capable of increasing NF- $\kappa$ B activation and anti-apoptotic molecule expression, including Bcl-xL and xIAP. IL-18 can also regulate Th17 cells, which can both worsen prognosis or affect antitumor cytotoxicity by CD8<sup>+</sup> T-cells. Finally, IL-18 could inhibit HBV replication but could also promote hepatocyte cell metastasis and migration.

#### 4. Obesity Chronic Inflammation as a Key in Liver Disorder

Obesity prevalence has been peaking at alarming rates [61], affecting more than 600 million adults worldwide [62]. The definition and classification of obesity are controversial; individuals presenting a body mass index (BMI) as 30 kg/m<sup>2</sup> or higher are considered obese [63]. The occurrence of obesity epidemics is associated with an environment that promotes excessive food intake and insufficient levels of physical activity [64]. Social, economic, and behavioral aspects also contribute to the establishment and perpetuation of the obese phenotype [65]. As a consequence of the peaking rates related to the

obesity-associated metabolic syndrome, liver disorders caused by this derangement show climbing statistics [66].

During obesity, liver fat accumulation occurs as a consequence of imbalanced fatty acid (FA) uptake and disposal. Insulin resistance (IR) in AT increases lipolysis and the release of these lipids, which are stored in the hepatic tissue [67]. This process is related to the establishment of NAFLD and its progressed inflammatory form called NASH, currently known as the most common chronic liver disorder [68]. Therefore, NAFLD has been referred to as the metabolic syndrome manifestation in the liver, with IR being an important trigger for the development of these conditions [69,70].

Inflammasome component dysregulation can be related to both obesity [71,72] and NASH [23,73], which in turn may be associated with liver cancer progression. Released DAMPs and PAMPs from these metabolic disorders, such as uric acid, cholesterol, and LDL (low-density lipoprotein), can activate RRP and initiate an inflammatory response from the trigger of the assembly of inflammasomes, resulting in the production of IL-1 $\beta$  and IL-18 [71]. This low-grade chronic inflammation contributes to NASH and HCC progression. It was already reported that, in response to AT inflammation, adipocytes upregulate IL-1 $\beta$  expression and that IL-1 $\beta$  may mediate IR in liver-derived cells [74]. Nov and colleagues showed that high-fat-fed (HFF) mice had an increase in IL-1 $\beta$  specifically in portal veins compared to systemic blood [75]. They also demonstrated that the absence of IL-1 $\beta$  in HFF mice exhibited no increase in the adipose expression of the pro-inflammatory genes (including macrophage M1 markers), while in wild-type HFF mice the expression of these genes was increased [75]. IL-1 $\beta$  supports ectopic fat accumulation in hepatocytes and AT macrophages, contributing to impaired fat–liver crosstalk in nutritional obesity [75]. IL-18 has also been associated with obesity, and it may contribute to the liver disease development associated with IR [76].

Free fatty acids (FFAs) secreted by hypertrophic adipocytes influence the polarization status of the macrophages. The activation of these immune cells interferes in the progression of metabolic dysfunction in obese individuals. AT macrophages respond to obesity and dietary stimuli by inducing inflammatory processes that are associated with disease progression locally and in the liver. In addition, Kupffer cells are known to play roles in lipid metabolism and macrophage activation [77]. Furthermore, other immune cells are influenced by the obese phenotype. Bijnen and colleagues showed that visceral adipose tissue obtained from obese mice displayed enhanced expression of neutrophil chemotaxis genes. In addition, they presented that neutrophil marker genes were elevated in the hepatic tissue derived from these animals. This elegant study pictured the neutrophils as possible players in the progression of the hepatic pathologies associated with obesity [78]. In a murine model-based study, Grohmann and others showed that obesity induces hepatic STAT-1 signaling and that this signal transduction is key to T cell infiltration within hepatic tissue [79]. It has also been shown that aggregates of these lymphoid cells impact the progression of NASH by the successive induction of hepatic inflammation, triggering a tissue damage and repair cycle [66]. All these immune cell recruitment processes contribute to a chronic inflammatory state and liver disorder.

## 5. Obesity-Associated NASH IL-1 $\beta$ and IL-18 in Liver Cancer Progression

NASH is a damaging condition associated with advanced liver disease [80]; it is associated with necroinflammation and hepatocyte injury in the steatotic liver [68]. This hepatic pathology displays histological characteristics similar to alcoholic hepatitis, with exacerbated fat deposition and storage in the liver parenchymal cells, features that promote inflammation and necrosis in the liver tissue [81]. These features place NASH as a predisposing condition for developing end-stage liver disease and cardiovascular disorders [67]. NASH patients are known to have increased saturated fat intake and low polyunsaturated fat consumption [68].

Dysbiotic gut signals and deranged visceral AT impact tissue and system inflammatory status [82] trigger disruptions that lead to organ fibrosis. Liver fibrosis is generated by



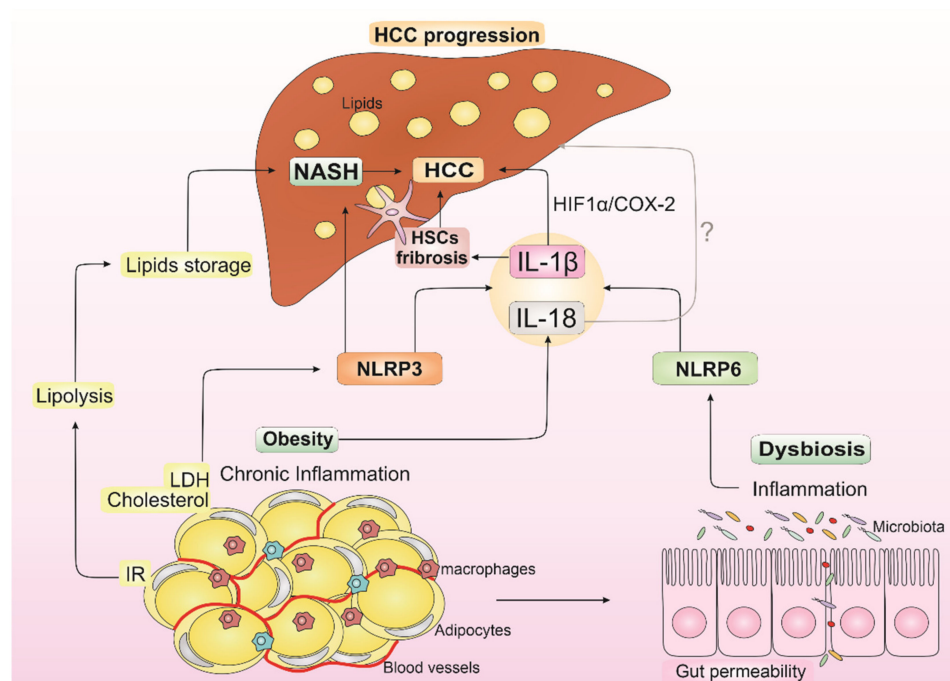
the deposition of an extracellular matrix by hepatic stellate cells (HSCs), hepatocytes, and immune cells [83,84], influenced by alterations in miRNAs, systemic cytokines and adipokines, and microenvironmental interactions in the liver [83,85–89]. As fibrotic lesions progress within a hepatocellular damage scenario, the regenerating cells become trapped in dense bands of scar tissue, leading to the formation of hepatic nodules [90]. The common consequences of liver fibrosis occurrence are cirrhosis and HCC.

Cytokines, chemokines, and eicosanoids support persistent immune cell infiltration and hepatocellular damage. Chronic inflammatory responses in the hepatic tissue cope with liver structure and function deterioration as this induces hepatocyte cell death [91] and disrupts proper tissue repair. Research has shown that active NLRP3 inflammasome induces inflammation and NASH development [92]. Csak and colleagues demonstrated that palmitic acid stimuli induced apoptosis and danger signals in hepatocytes, which thus stimulate the Kupffer cells' inflammasome [93]. In addition, increasing data indicate that the NLRP3 inflammasome is stimulated by lipotoxicity and contributes to NASH development in mice [22]. Augmented levels of the inflammasome-derived IL-1 $\beta$  are very relevant for the worsening of the inflammatory status during NASH onset, as shown by murine model experiments [94]. IL-1 activates HSCs, resulting in the progression from liver injury to fibrogenesis [95]. In addition, in a hypoxic microenvironment, IL-1 $\beta$  modulates via macrophages and the IL-1 $\beta$ /HIF-1 $\alpha$ /COX2 axis, supporting the transition of the epithelial-mesenchymal transition in HCC cells [96].

Studies with IL-18 are controversial. Yamanishi and colleagues showed that IL-18 knockout mice developed dyslipidemia resulting in NASH [97]. The intravenous administration of IL-18 significantly improved dyslipidemia, inhibited body weight gain, and prevented the onset of NASH in these mice [97]. On the other hand, a recent study demonstrated that IL-18 receptor knockout mice were protected from early liver damage and that IL-18 signaling is pivotal for the initiation of liver injury in murine NASH. In humans, IL-18 was elevated in the serum of NASH patients [98] and in obese children with advanced liver steatosis [99]. However, another study showed an absence of alterations in the circulating IL-18 levels of male subjects with NAFLD [100].

Another important participant in the liver disease progression to NASH that may be involved in liver cancer is the microbiome composition [101,102]. The gut microbiota is a diverse microbial community that dwells in the gastrointestinal tract (GIT). It is composed of bacteria, archaea, viruses, and eukaryotic microbes and can influence mucosal and system immunity through the secretion of immunomodulatory components [103]. The imbalance in the variety of species and metabolites secreted, called dysbiosis, disturbs gastrointestinal homeostasis. The intestine and liver are organs placed close to each other; many gut-associated molecules and gut bacteria factors impact strongly on hepatic disease. Alterations of gut microbiome homeostasis are known to occur in obese individuals, whose diet directly influences the intestinal microbiota by changing the microbiome gene expression profile and altering the relative abundance of specific microbes [104]. Intestinal dysbiosis is expected to influence NASH progression in affected individuals once patients with NASH display enhanced intestinal permeability [105], aberrant overgrowth of intestinal bacteria [106], and higher endotoxin LPS levels in portal blood [107]. NLRP6 inflammasome is found in intestinal epithelial cells and plays an important role in intestinal homeostasis and mucus secretion regulation in the intestinal goblet [23]. Dysregulation in NLRP3 and NLRP6 inflammasomes, and consequently in IL-1 $\beta$  and IL-18, can lead to NASH, which enables gut dysbiosis occurrence and portal circulation homeostasis disruption [16].

All these factors contribute to the occurrence of chronic liver inflammation and injurious stimuli driven by mediators secreted by liver-residing immune cells, such as macrophages and liver-specific Kupffer cells (KCs) [108]. Furthermore, this inflammatory environment supported by obesity, dysbiosis, and NASH promotes an increase in cells with genetic alterations, creating a pro-tumorigenic microenvironment that supports HCC development (Figure 2) [109].



**Figure 2. Impact of IL-1 $\beta$  and IL-18 from obesity, dysbiosis, and non-alcoholic steatohepatitis (NASH) in hepatocellular carcinoma (HCC) progression.** Insulin resistance (IR) from obesity increases lipolysis, which leads to liver lipid storage and contributes to NASH establishment. LDL (low-density lipoprotein) and cholesterol from obesity can activate NLRP3 inflammasome, contributing to NASH development and resulting in IL-1 $\beta$  release. IL-18 is also released in the obesity state. Dysbiosis is known to occur in obese individuals with dysregulation in NLRP6 inflammasome and consequent IL-1 $\beta$  and IL-18 releasing. IL-1 $\beta$  can modulate hepatic stellate cells (HSCs), resulting in the progression from liver injury to fibrogenesis, which contributes to HCC development and supports epithelial-mesenchymal transition in HCC cells through IL-1 $\beta$ /HIF-1 $\alpha$ /COX2 axis in hypoxic conditions. In turn, the role of IL-18 in NASH, and consequently in HCC progression, is controversial in the literature (the symbol “?” indicates the uncertain role of IL-18 in HCC progression). This inflammatory environment supported by IL-1 $\beta$  and IL-18 from obesity, dysbiosis, and NASH promotes an increase in cells with genetic alterations, creating a pro-tumorigenic microenvironment that may induce HCC development.

## 6. Modulating IL-1 $\beta$ and IL-18 as a Therapeutic Target in HCC

Treatment for HCC depends on the disease’s stage. In the early phases, surgery, ablation, or radiofrequency is generally recommended [110]. In the intermediate stage, transarterial chemoembolization (TACE) [111] or locoregional or systemic therapy [112] is suggested. Systemic therapies are also applied for managing advanced disease stages, such as tyrosine kinase inhibitors (ex., sorafenib), ICIs, such as atezolizumab (anti-PDL1), and other monoclonal antibodies, including bevacizumab, which blocks the endothelial growth factor (anti-VEGF) [1]. The combination of two or more drugs can increase the therapy effectiveness. Despite this variety, the treatments rarely completely remove the tumor, especially in later stages of the malignancy [113].

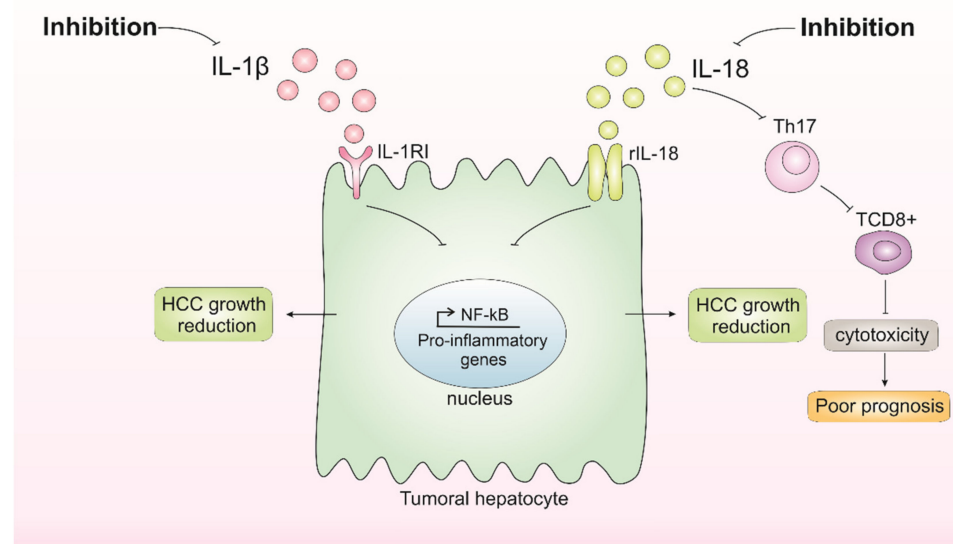
HCC initiation and progression is deeply linked with changes in the hepatic microenvironment, with cytokines playing key roles [114]. Due to high resistance to chemotherapy and the loss of response to the current immunotherapy presented by this cancer, there is a multitude of new immunotherapies in development with varying degrees of success. One particularly important consideration when administering this kind of therapy is the adequate patient selection, as this modality of treatment is often very expensive and has severe potential hazards for the subjects.

Cancer treatments have been interposed by numerous practical issues, such as low intratumoral concentration, high toxicity, and immune checkpoint induction [115]. Another difficulty, specifically with regard to HCC, is its complex microenvironment—which changes not only with disease progression but also with disease background [114], and such differences dictate the success of the therapy [116]. Concerning cytokine therapy in HCC, the only one clinically approved with somewhat frequent use is interferon (IFN) for HCC in patients with a hepatitis background—which is not a standard of care even with this clinical background [116].

Promising cytokine immunotherapies currently under investigation are pegylated INF [117], INF- $\beta$  [118], IL-2 in adenoviral vector [119], IL-6 [120], IL-7 [121], TNF- $\alpha$  [122], and TGF-beta [123]. In addition, intracellular biosignaling pathways related to cytokines are also a promising approach [124].

Pre-clinical evidence suggests that IL-1 $\beta$  induces PD-1L expression in malignant cells [51], which is an immunological escape strategy, and promotes metastization, as well as high levels of serum IL-1 $\beta$ , which correlates with poor patient prognosis. The inhibition of NLRP3 inflammasome both reduces IL-1 $\beta$  and malignant cell growth, migration, and invasion and induces apoptosis [125]. Thereby, inhibiting IL-1 $\beta$  may be investigated as a potential HCC therapy. On the other hand, inhibiting IL-18 seems to be dual. A study showed that the inhibition of IL-18 through TLR2 alleviated mouse HCC progression, whereas deletion of the IL-18 receptor enhanced tumor growth once the IL-18 had tumor-suppressive effects by promoting tumor-infiltration T cells [57].

According to these studies, modulating IL-1 $\beta$  and IL-18 seems promising (Figure 3). Overall, the future of HCC treatment modulating IL-1 $\beta$  and IL-18 should take into account the different backgrounds and a deep understanding of tumor biology and its interplay with the microenvironment integrated in a personalized medicine approach. For this, additional studies exploring different models and backgrounds are necessary. Moreover, further investigating the impact of IL-18 in the HCC context is needed to better understand the role of inflammasome-mediated cytokines in HCC initiation and progression.



**Figure 3. Inhibition of IL-1 $\beta$  and IL-18 and its consequences in hepatocellular carcinoma (HCC) growth.** Inhibition of IL-1 $\beta$  results in the inhibition of pathways affected by this cytokine, such as nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B), which possibly results in the inhibition of tumor growth. Inhibition of IL-18 appears to have dual consequences, either reducing HCC growth or favoring poor prognosis by impairing tumor-infiltration T CD8<sup>+</sup> cells.

## 7. Concluding Remarks

HCC is an aggressive cancer that can be triggered by many different risk factors, including NASH and obesity. The understanding of the connection of these disorders to liver cancer remains poorly understood. However, once inflammasome dysregulation is associated with NASH, obesity, and HCC, the cytokines released by them could be a possible link between obesity-associated NASH and HCC development. IL-1 $\beta$  is capable of influencing many consequences in obesity-associated NASH patients that can lead to HCC development, as shown herein. However, IL-18 can also modulate the liver microenvironment, displaying a dual role in HCC. Considering the importance of IL-1 $\beta$  and IL-18 in obesity-associated NASH and, consequently, in HCC progression, their therapeutic exploration appears to be promising for the management of this lethal cancer.

**Author Contributions:** Conceptualization, N.S.d.C., G.P.-d.-N., A.C.P.e.O. and K.G.M.; investigation, N.S.d.C., G.P.-d.-N., A.C.P.e.O. and K.G.M.; writing—original draft preparation, N.S.d.C.; writing—review and editing, N.S.d.C., G.P.-d.-N. and K.G.M.; figures, N.S.d.C.; supervision, K.G.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** CNPQ—National Council for Scientific and Technological Development (CNPq 313106/2020-7).

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Llovet, J.M.; López, S.A.; Fajes, J.L.H.; Martín, L.C. Hepatocellular carcinoma. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2021**, *7*, 6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* **2018**, *69*, 182–236. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Shen, S.; Lin, Y.; Yuan, X.; Shen, L.; Chen, J.; Chen, L.; Qin, L.; Shen, B. Biomarker MicroRNAs for Diagnosis, Prognosis and Treatment of Hepatocellular Carcinoma: A Functional Survey and Comparison. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 38311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Di Bisceglie, A.M. Epidemiology and Clinical Presentation of Hepatocellular Carcinoma. *J. Vasc. Interv. Radiol.* **2002**, *13*, 169–171. [[CrossRef](#)]
5. Balogh, J.; Balogh, J.; Victor, D., III; Asham, E.H.; Burroughs, S.G.; Boktour, M.; Saharia, A.; Li, X.; Ghobrial, R.M.; Monsour, H.P., Jr. Hepatocellular carcinoma: A review. *J. Hepatocell. Carcinoma* **2016**, *3*, 41–53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Cajal, S.R.Y.; Capdevila, C.; Hernandez-Losa, J.; De Mattos-Arruda, L.; Ghosh, A.; Lorent, J.; Larsson, O.; Aasen, T.; Postovit, L.-M.; Topisirovic, I. Cancer as an ecomolecular disease and a neoplastic consortium. *Biochim. Biophys. Acta-Rev. Cancer* **2017**, *1868*, 484–499. [[CrossRef](#)]
7. Giraud, J.; Chalopin, D.; Blanc, J.; Saleh, M. Hepatocellular Carcinoma Immune Landscape and the Potential of Immunotherapies. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 655697. [[CrossRef](#)]
8. Marrero, J.A.; Kulik, L.M.; Sirlin, C.B.; Zhu, A.X.; Finn, R.S.; Abecassis, M.M.; Roberts, L.R.; Heimbach, J.K. Diagnosis, Staging and Management of Hepatocellular Carcinoma: 2018 Practice Guidance by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* **2018**, *68*, 723–750. [[CrossRef](#)]
9. Brunt, E.M. Non Alcoholic Steatohepatitis (NASH). *Semin. Liver Dis.* **2004**, *24*, 3–20.
10. Friedman, S.L.; Neuschwander-Tetri, B.A.; Rinella, M.; Sanyal, A.J. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat. Med.* **2018**, *24*, 908–922. [[CrossRef](#)]
11. Day, C.P.; James, O.F.W. Steatohepatitis: A tale of two ‘Hits’? *Gastroenterology* **1998**, *114*, 842–845. [[CrossRef](#)]
12. Hashimoto, E.; Taniai, M.; Tokushige, K. Characteristics and diagnosis of NAFLD/NASH. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2013**, *28*, 64–70. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Vernon, G.; Baranova, A.; Younossi, Z.M. Systematic review: The epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2011**, *34*, 274–285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Saitta, C.; Pollicino, T.; Raimondo, G. Obesity and liver cancer. *Ann. Hepatol.* **2019**, *18*, 810–815. [[CrossRef](#)]
15. Rosenbaum, M.; Knight, R.; Leibel, R.L. The gut microbiota in human energy homeostasis and obesity. *Trends Endocrinol. Metab.* **2015**, *26*, 493–501. [[CrossRef](#)]
16. Henao-Mejia, J.; Elinav, E.; Jin, C.; Hao, L.; Mehal, W.Z.; Strowig, T.; Thaiss, C.A.; Kau, A.L.; Eisenbarth, S.C.; Jurczak, M.J.; et al. Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature* **2012**, *482*, 179–185. [[CrossRef](#)]



17. Boursier, J.; Mueller, O.; Barret, M.; Machado, M.; Fizzanne, L.; Araujo-Perez, F.; Guy, C.D.; Seed, P.C.; Rawls, J.F.; David, L.A.; et al. The severity of nonalcoholic fatty liver disease is associated with gut dysbiosis and shift in the metabolic function of the gut microbiota. *Hepatology* **2016**, *63*, 764–775. [[CrossRef](#)]
18. Zhu, L.; Baker, S.S.; Gill, C.; Liu, W.; Alkhoury, R.; Baker, R.D.; Gill, S.R. Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: A connection between endogenous alcohol and NASH. *Hepatology* **2013**, *57*, 601–609. [[CrossRef](#)]
19. Lomonaco, R.; Ortiz-Lopez, C.; Orsak, B.; Webb, A.; Hardies, J.; Darland, C.; Finch, J.; Gastaldelli, A.; Harrison, S.; Tio, F.; et al. Effect of adipose tissue insulin resistance on metabolic parameters and liver histology in obese patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **2012**, *55*, 1389–1397. [[CrossRef](#)]
20. Brestoff, J.R.; Artis, D. Immune regulation of metabolic homeostasis in health and disease. *Cell* **2015**, *161*, 146–160. [[CrossRef](#)]
21. Shi, J.; Zhao, Y.; Wang, K.; Shi, X.; Wang, Y.; Huang, H.; Zhuang, Y.; Cai, T.; Wang, F.; Shao, F. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature* **2015**, *526*, 660–665. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Vandanmagsar, B.; Youm, Y.-H.; Ravussin, A.; Galgani, J.E.; Stadler, K.; Mynatt, R.L.; Ravussin, E.; Stephens, J.M.; Dixit, V.D. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat. Med.* **2011**, *17*, 179–188. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Wlodarska, M.; Thaiss, C.A.; Nowarski, R.; Henao-Mejia, J.; Zhang, J.P.; Brown, E.M.; Frankel, G.; Levy, M.; Katz, M.N.; Philbrick, W.M.; et al. NLRP6 inflammasome orchestrates the colonic host-microbial interface by regulating goblet cell mucus secretion. *Cell* **2014**, *27*, 1045–1059. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Wei, Q.; Mu, K.; Li, T.; Zhang, Y.; Yang, Z.; Jia, X.; Zhao, W.; Huai, W.; Guo, P.; Han, L. Deregulation of the NLRP3 inflammasome in hepatic parenchymal cells during liver cancer progression. *Lab. Investig.* **2014**, *94*, 52–62.
25. Chen, G.Y.; Nuñez, G. Sterile inflammation: Sensing and reacting to damage. *Nat. Rev. Immunol.* **2010**, *10*, 826–837. [[CrossRef](#)]
26. Unterholzner, L.; Keating, S.E.; Baran, M.; Horan, K.A.; Jensen, S.B.; Sharma, S.; Sirois, C.M.; Jin, T.; Latz, E.; Xiao, T.S.; et al. IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nat. Immunol.* **2010**, *11*, 997–1004. [[CrossRef](#)]
27. Akira, S.; Uematsu, S.; Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **2006**, *124*, 783–801. [[CrossRef](#)]
28. Ting, J.P.; Lovering, R.C.; Alnemri, E.S.; Bertin, J.; Boss, J.M.; Davis, B.K.; Flavell, R.A.; Girardin, S.E.; Godzik, A.; Harton, J.A.; et al. The NLR Gene Family: A Standard Nomenclature. *Immunity* **2008**, *28*, 285–287. [[CrossRef](#)]
29. Dagenais, M.; Skeldon, A.; Saleh, M. The inflammasome: In memory of Dr. Jurg Tschopp. *Cell Death Differ.* **2012**, *19*, 5–12. [[CrossRef](#)]
30. Broz, P.; Dixit, V.M. Inflammasomes: Mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **2016**, *16*, 407–420. [[CrossRef](#)]
31. Martinon, F.; Burns, K.; Tschopp, J. The Inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- $\beta$ . *Mol. Cell* **2002**, *10*, 417–426. [[CrossRef](#)]
32. Li, P.; Allen, H.; Banerjee, S.; Franklin, S.; Herzog, L.; Johnston, C.; McDowell, J.; Paskind, M.; Rodman, L.; Salfeld, J.; et al. Mice Deficient in IL-1 beta-Converting Enzyme Are Defective in Production of Mature IL-1p and Resistant to Endotoxic Shock. *Cell* **1995**, *80*, 401–411. [[CrossRef](#)]
33. He, W.-T.; Wan, H.; Hu, L.; Chen, P.; Wang, X.; Huang, Z.; Yang, Z.-H.; Zhong, C.-Q.; Han, J. Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 $\beta$  secretion. *Cell Res.* **2015**, *25*, 1285–1298. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Martinon, F.; Tschopp, J. Inflammatory caspases: Linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell* **2004**, *117*, 561–574. [[CrossRef](#)]
35. Mariathasan, S.; Newton, K.; Monack, D.M.; Vucic, D.; French, D.M.; Lee, W.P.; Roose-Girma, M.; Erickson, S.; Dixit, V.M. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature* **2004**, *430*, 213–218. [[CrossRef](#)]
36. Andersen, K.; Eltrich, N.; Lichtnekert, J.; Anders, H.J.; Vielhauer, V. The NLRP3/ASC inflammasome promotes T-cell-dependent immune complex glomerulonephritis by canonical and noncanonical mechanisms. *Kidney Int.* **2014**, *86*, 965–978. [[CrossRef](#)]
37. Mariathasan, S.; Monack, D.M. Inflammasome adaptors and sensors: Intracellular regulators of infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **2007**, *7*, 31–40. [[CrossRef](#)]
38. Guo, H.; Callaway, J.; Ting, J.Y. Inflammasomes: Mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat. Med.* **2015**, *21*, 677–687. [[CrossRef](#)]
39. Dostert, C.; Pétrilli, V.; Van Bruggen, R.; Steele, C.; Mossman, B.T.; Tschopp, J. Innate Immune Activation Through Nalp3 Inflammasome Sensing of Asbestos and Silica. *Science* **2008**, *320*, 674–677. [[CrossRef](#)]
40. Kayagaki, N.; Warming, S.; Lamkanfi, M.; Walle, L.V.; Louie, S.; Dong, J.; Newton, K.; Qu, Y.; Liu, J.; Heldens, S.; et al. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature* **2011**, *479*, 117–121. [[CrossRef](#)]
41. Zhang, Z.; Shao, X.; Na Jiang, N.; Mou, S.; Gu, L.; Li, S.; Lin, Q.; He, Y.; Zhang, M.; Zhou, W.; et al. Caspase-11-mediated tubular epithelial pyroptosis underlies contrast-induced acute kidney injury. *Cell Death Dis.* **2018**, *9*, 983. [[CrossRef](#)]
42. Liu, X.; Yin, L.; Shen, S.; Hou, Y. Inflammation and cancer: Paradoxical roles in tumorigenesis and implications in immunotherapies. *Genes Dis.* **2021**, 1–14. [[CrossRef](#)]
43. Greten, F.R.; Grivennikov, S.I. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. *Immunity* **2019**, *51*, 27–41. [[PubMed](#)]
44. Sims, J.E.; Smith, D.E. The IL-1 family: Regulators of immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2010**, *10*, 89–102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Porta, C.; DE Amici, M.; Quaglini, S.; Paglino, C.; Tagliani, F.; Boncimino, A.; Moratti, R.; Corazza, G.R. Circulating interleukin-6 as a tumor marker for hepatocellular carcinoma. *Ann. Oncol.* **2008**, *19*, 353–358. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

46. Nakanishi, K.; Yoshimoto, T.; Tsutsui, H.; Okamura, H. Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2001**, *12*, 53–72. [[CrossRef](#)]
47. Lin, A.; Karin, M. NF- $\kappa$ B in cancer: A marked target. *Semin. Cancer Biol.* **2003**, *13*, 107–114. [[CrossRef](#)]
48. Li, Q.; Verma, I.M. NF- $\kappa$ B regulation in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **2002**, *2*, 725–734.
49. Su, B.; Luo, T.; Zhu, J.; Fu, J.; Zhao, X.; Chen, L.; Zhang, H.; Ren, Y.; Yu, L.; Yang, X.; et al. Interleukin-1 $\beta$ /Interleukin-1 receptor-associated kinase 1 inflammatory signaling contributes to persistent Gankyrin activation during hepatocarcinogenesis. *Hepatology* **2015**, *61*, 585–597. [[CrossRef](#)]
50. Zong, Z.; Zou, J.; Mao, R.; Ma, C.; Li, N.; Wang, J.; Wang, X.; Zhou, H.; Zhang, L.; Shi, Y. M1 macrophages induce PD-L1 expression in hepatocellular carcinoma cells through IL-1 $\beta$  signaling. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1643. [[CrossRef](#)]
51. Numata, Y.; Akutsu, N.; Ishigami, K.; Koide, H.; Wagatsuma, K.; Motoya, M.; Sasaki, S.; Nakase, H. Synergistic effect of IFN- $\gamma$  and IL-1 $\beta$  on PD-L1 expression in hepatocellular carcinoma. *Biochem. Biophys. Rep.* **2022**, *30*, 2405–5808. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Tak, K.H.; Yu, G.I.; Lee, M.Y.; Shin, D.H. Association between polymorphisms of interleukin 1 family genes and hepatocellular carcinoma. *Med. Sci. Monit.* **2018**, *24*, 3488–3495. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Asakawa, M.; Kono, H.; Amemiya, H.; Matsuda, M.; Suzuki, T.; Maki, A.; Fujii, H. Role of interleukin-18 and its receptor in hepatocellular carcinoma associated with hepatitis C virus infection. *Int. J. Cancer* **2006**, *118*, 564–570. [[CrossRef](#)]
54. Eldesoky, A.A.; Ahmed, N.A.F.; Zaghoul, H.E.; Aziz, A.A.A. Interleukin-18 polymorphism as a diagnostic tumor marker for hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C-related cirrhosis. *Egypt Liver J.* **2020**, *10*, 51. [[CrossRef](#)]
55. Sharafeldin, H.; Mors, A.; Elghobary, H.; Osman, E.; Rady, N. Association between TNF- $\alpha$ , Interleukin-18 Polymorphisms and Risk of Hepatocellular Carcinoma in Egyptian patients. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2021**, *22*, 887–891. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Yao, Z.; Zhao, M.; Gao, G.; Yang, J.; Wang, Z.; Liu, Y. Prognostic Role of IL-18 in Various Human Cancers and Radiation Injuries: A Meta-Analysis. *Dose-Response* **2020**, *18*, 1–7. [[CrossRef](#)]
57. Markowitz, G.J.; Yang, P.; Fu, J.; Michelotti, G.A.; Chen, R.; Sui, J.; Yang, B.; Qin, W.-H.; Zhang, Z.; Wang, F.-S.; et al. Inflammation-dependent IL18 signaling restricts hepatocellular carcinoma growth by enhancing the accumulation and activity of tumor-infiltrating lymphocytes. *Cancer Res.* **2016**, *76*, 2394–2405. [[CrossRef](#)]
58. Liao, R.; Sun, J.; Wu, H.; Yi, Y.; Wang, J.-X.; He, H.-W.; Cai, X.-Y.; Zhou, J.; Cheng, Y.-F.; Fan, J.; et al. High expression of IL-17 and IL-17RE associate with poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2013**, *32*, 3. [[CrossRef](#)]
59. Zhang, Y.; Li, Y.; Ma, Y.; Liu, S.; She, Y.; Zhao, P.; Jing, M.; Han, T.; Yan, C.; Wu, Z.; et al. Dual effects of interleukin-18: Inhibiting hepatitis B virus replication in Hepg2.2.15 cells and promoting hepatoma cells metastasis. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* **2011**, *301*, 565–573. [[CrossRef](#)]
60. Gu, F.M.; Li, Q.L.; Gao, Q.; Jiang, J.H.; Zhu, K.; Huang, X.Y.; Pan, J.F.; Yan, J.; Hu, J.H.; Wang, Z.; et al. IL-17 induces AKT-dependent IL-6/JAK2/STAT3 activation and tumor progression in hepatocellular carcinoma. *Mol. Cancer* **2011**, *10*, 150. [[CrossRef](#)]
61. Li, P.-L.; Boini, K.M.; Xia, M.; Koka, S.; Gehr, T.W. Sphingolipids in obesity and related complications. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)* **2017**, *22*, 96–116. [[CrossRef](#)]
62. Kellen, C.; Rodrigues, C.; Pereira, R.M.; De Campos, T.D.P. The Role of Physical Exercise to Improve the Browning of White Adipose Tissue via POMC Neurons. *Front. Cell Neurosci.* **2018**, *12*, 88.
63. Brandão, B.B.; Guerra, B.A.; Mori, M.A. Shortcuts to a functional adipose tissue: The role of small non-coding RNAs. *Redox Biol.* **2017**, *12*, 82–102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Huang, H.; Yan, Z.; Chen, Y.; Liu, F. A social contagious model of the obesity epidemic. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 37961. [[CrossRef](#)]
65. Leroux, J.S.; Moore, S.; Dubé, L. Beyond the “I” in the Obesity Epidemic: A Review of Social Relational and Network Interventions on Obesity. *J. Obes.* **2013**, *2013*, 348249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Takakura, K.; Oikawa, T.; Nakano, M.; Saeki, C.; Torisu, Y.; Kajihara, M.; Saruta, M. Recent Insights Into the Multiple Pathways Driving Non-alcoholic Steatohepatitis-Derived Hepatocellular Carcinoma. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 762. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Walle, P.; Takkunen, M.; Männistö, V.; Vaittinen, M.; Lankinen, M.; Kärjä, V.; Käkälä, P.; Ågren, J.; Tiainen, M.; Schwab, U.; et al. Fatty acid metabolism is altered in non-alcoholic steatohepatitis independent of obesity. *Metabolism* **2016**, *65*, 655–666. [[CrossRef](#)]
68. Kanwar, P.; Kowdley, K.V. The Metabolic Syndrome and Its Influence on Nonalcoholic Steatohepatitis. *Clin. Liver Dis.* **2016**, *20*, 225–243. [[CrossRef](#)]
69. Aller, R.; Izaola, O.; Ruiz-Rebollo, L.; Pacheco, D.; de Luis, D.A. Predictive factors of non-alcoholic steatohepatitis: Relationship with metabolic syndrome. *Nutr. Hosp.* **2015**, *31*, 2496–2502.
70. Stienstra, R.; van Diepen, J.A.; Tack, C.J.; Zaki, M.H.; van de Veerdonk, F.L.; Perera, D.; Neale, G.A.; Hooiveld, G.J.; Hijmans, A.; Vroegrijk, I.; et al. Inflammasome is a central player in the induction of obesity and insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 15324–15329. [[CrossRef](#)]
71. Wani, K.; Alharthi, H.; Alghamdi, A.; Sabico, S.; Al-Daghri, N.M. Role of NLRP3 inflammasome activation in obesity-mediated metabolic disorders. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2021**, *18*, 511. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Henao-Mejia, J.; Elinav, E.; Thaiss, C.A.; Flavell, R.A. Inflammasomes and Metabolic Disease. *Annu. Rev. Physiol.* **2014**, *76*, 57–78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Yu, L.; Hong, W.; Lu, S.; Li, Y.; Guan, Y.; Weng, X.; Feng, Z. The NLRP3 Inflammasome in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Steatohepatitis: Therapeutic Targets and Treatment. *Front. Pharmacol.* **2022**, *13*, 682. [[CrossRef](#)]

74. Nov, O.; Kohl, A.; Lewis, E.C.; Bashan, N.; Dvir, I.; Ben-Shlomo, S.; Fishman, S.; Wueest, S.; Konrad, D.; Rudich, A. Interleukin-1 $\beta$  may mediate insulin resistance in liver-derived cells in response to adipocyte inflammation. *Endocrinology* **2010**, *151*, 4247–4256. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Nov, O.; Shapiro, H.; Ovadia, H.; Tarnovskii, T.; Dvir, I.; Shemesh, E.; Kovsan, J.; Shelef, I.; Carmi, Y.; Voronov, E.; et al. Interleukin-1 $\beta$  Regulates Fat-Liver Crosstalk in Obesity by Auto-Paracrine Modulation of Adipose Tissue Inflammation and Expandability. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e53626. [[CrossRef](#)]
76. Lo, A.; Esteve, E.; Casamitjana, R. Potential Role of Interleukin-18 in Liver Disease Associated with Insulin Resistance. *Obes. Res.* **2005**, *13*, 1925–1931.
77. Lefere, S.; Tacke, F. Macrophages in obesity and non-alcoholic fatty liver disease: Crosstalk with metabolism. *JHEP Rep.* **2019**, *1*, 30–43. [[CrossRef](#)]
78. Bijnen, M.; Josefs, T.; Cuijpers, I.; Maalsen, C.J.; Van De Gaar, J.; Vroomen, M.; Wijnands, E.; Rensen, S.S.; Greve, J.W.M.; Hofker, M.H.; et al. Adipose tissue macrophages induce hepatic neutrophil recruitment and macrophage accumulation in mice. *Gut* **2018**, *67*, 1317–1327. [[CrossRef](#)]
79. Grohmann, M.; Wiede, F.; Dodd, G.T.; Gurzov, E.N.; Ooi, G.J.; Butt, T.; Rasmiena, A.A.; Kaur, S.; Gulati, T.; Goh, P.K.; et al. Obesity Drives STAT-1-Dependent NASH and STAT-3-Dependent HCC. *Cell* **2018**, *175*, 1289–1306. [[CrossRef](#)]
80. Yilmaz, Y.; Younossi, Z.M. Obesity-Associated Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin. Liver Dis.* **2014**, *18*, 19–31. [[CrossRef](#)]
81. Charrez, B.; Qiao, L.; Hebbard, L. Hepatocellular carcinoma and non-alcoholic steatohepatitis: The state of play. *World J. Gastroenterol.* **2016**, *22*, 2494–2502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Tilg, H.; Moschen, A.R. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: The multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* **2010**, *52*, 1836–1846. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Magee, N.; Zou, A.; Zhang, Y. Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis: Interactions between Liver Parenchymal and Nonparenchymal Cells. *Biomed. Res. Int.* **2016**, *2016*, 5170402. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Yang, L.; Roh, Y.S.; Song, J.; Zhang, B.; Liu, C.; Loomba, R.; Seki, E. TGF- $\beta$  Signaling in Hepatocytes Participates in Steatohepatitis Through Regulation of Cell Death and Lipid Metabolism. *Hepatology* **2013**, *59*, 483–495. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Sulaiman, S.A.; Muhsin, N.I.A.; Jamal, R. Regulatory non-coding RNAs network in non-alcoholic fatty liver disease. *Front. Physiol.* **2019**, *10*, 279. [[CrossRef](#)]
86. Diehl, A.M.; Li, Z.P.; Lin, H.Z.; Yang, S.Q. Cytokines and the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* **2005**, *54*, 303–306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Braunersreuther, V.; Viviani, G.L.; Mach, F.; Montecucco, F. Role of cytokines and chemokines in non-alcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* **2012**, *18*, 727–735. [[CrossRef](#)]
88. Niederreiter, L.; Tilg, H. Cytokines and fatty liver diseases. *Liver Res.* **2018**, *2*, 14–20. [[CrossRef](#)]
89. Kugelmas, M.; Hill, D.B.; Vivian, B.; Marsano, L.; McClain, C.J. Cytokines and NASH: A pilot study of the effects of lifestyle modification and vitamin E. *Hepatology* **2003**, *38*, 413–419. [[CrossRef](#)]
90. Dhar, D.; Baglieri, J.; Kisseleva, T.; Brenner, D.A. Mechanisms of liver fibrosis and its role in liver cancer. *Exp. Biol. Med.* **2020**, *2*, 96–108. [[CrossRef](#)]
91. Guicciardi, M.E.; Gores, G.J. Apoptosis: A mechanism of acute and chronic liver injury. *Gut* **2005**, *54*, 1024–1033. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Wree, A.; McGeough, M.D.; Peña, C.A.; Schlattjan, M.; Li, H.; Inzaugarat, M.E.; Messer, K.; Canbay, A.; Hoffman, H.M.; Feldstein, A.E. NLRP3 inflammasome activation is required for fibrosis development in NAFLD. *J. Mol. Med.* **2014**, *92*, 1069–1082. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Csak, T.; Ganz, M.; Pespisa, J.; Kodys, K.; Dolganiuc, A.; Szabo, G. Fatty acid and endotoxin activate inflammasomes in mouse hepatocytes that release danger signals to stimulate immune cells. *Hepatology* **2011**, *54*, 133–144. [[CrossRef](#)]
94. Kamari, Y.; Shaish, A.; Vax, E.; Shemesh, S.; Kandel-Kfir, M.; Arbel, Y.; Olteanu, S.; Barshack, I.; Dotan, S.; Voronov, E.; et al. Lack of interleukin-1 $\alpha$  or interleukin-1 $\beta$  inhibits transformation of steatosis to steatohepatitis and liver fibrosis in hypercholesterolemic mice. *J. Hepatol.* **2011**, *55*, 1086–1094. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Gieling, R.G.; Wallace, K.; Han, Y.P. Interleukin-1 participates in the progression from liver injury to fibrosis. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* **2009**, *296*, 1324–1331. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Zhang, J.; Zhang, Q.; Lou, Y.; Fu, Q.; Chen, Q.; Wei, T.; Liang, T. HIF-1 $\alpha$ /IL-1 $\beta$  signaling enhances hepatoma epithelial-mesenchymal transition via macrophages in a hypoxic-inflammatory microenvironment. *Hepatology* **2018**, *67*, 1872–1889. [[CrossRef](#)]
97. Yamanishi, K.; Maeda, S.; Kuwahara-Otani, S.; Watanabe, Y.; Yoshida, M.; Ikubo, K.; Okuzaki, D.; El-Darawish, Y.; Li, W.; Nakasho, K.; et al. Interleukin-18-deficient mice develop dyslipidemia resulting in nonalcoholic fatty liver disease and steatohepatitis. *Transl. Res.* **2016**, *173*, 101–114. [[CrossRef](#)]
98. Cyr, B.; Keane, R.W.; de Rivero Vaccari, J.P. Asc, IL-18 and galectin-3 as biomarkers of non-alcoholic steatohepatitis: A proof of concept study. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 8580. [[CrossRef](#)]
99. Flisiak-Jackiewicz, M.; Bobrus-Chociej, A.; Tarasów, E.; Wojtkowska, M.; Białokoz-Kalinowska, I.; Lebensztejn, D.M. Predictive Role of Interleukin-18 in Liver Steatosis in Obese Children. *Can. J. Gastroenterol. Hepatol.* **2018**, *2018*, 3870454. [[CrossRef](#)]
100. Tapan, S.; Dogru, T.; Kara, M.; Ercin, C.N.; Kilciler, G.; Genc, H.; Sertoglu, E.; Acikel, C.; Kilic, S.; Karlioglu, Y.; et al. Circulating levels of interleukin-18 in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Scand. J. Clin. Lab. Investig.* **2010**, *70*, 399–403. [[CrossRef](#)]



101. Brandl, K.; Schnabl, B. Intestinal microbiota and nonalcoholic steatohepatitis. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **2017**, *33*, 128–133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Yoshimoto, S.; Loo, T.M.; Atarashi, K.; Kanda, H.; Sato, S.; Oyadomari, S.; Iwakura, Y.; Oshima, K.; Morita, H.; Hattori, M.; et al. Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. *Nature* **2013**, *499*, 97–101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Hollister, E.B.; Gao, C.; Versalovic, J. Compositional and functional features of the gastrointestinal microbiome and their effects on human health. *Gastroenterology* **2014**, *146*, 1449–1458. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Turnbaugh, P.J.; Ridaura, V.K.; Faith, J.J.; Rey, F.E.; Knight, R.; Gordon, J.I. The effect of diet on the human gut microbiome: A metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci. Transl. Med.* **2009**, *1*, 6ra14. [[CrossRef](#)]
105. Farhadi, A.; Gundlapalli, S.; Shaikh, M.; Frantzides, C.; Harrell, L.; Kwasny, M.M.; Keshavarzian, A. Susceptibility to gut leakiness: A possible mechanism for endotoxaemia in non-alcoholic steatohepatitis. *Liver Int.* **2008**, *28*, 1026–1033. [[CrossRef](#)]
106. Augustyn, M.; Grys, I.; Kukla, M. Small intestinal bacterial overgrowth and nonalcoholic fatty liver disease. *Clin. Exp. Hepatol.* **2019**, *5*, 1–10. [[CrossRef](#)]
107. Csak, T.; Velayudham, A.; Hritz, I.; Petrasek, J.; Levin, I.; Lippai, D.; Catalano, D.; Mandrekar, P.; Dolganiuc, A.; Kurt-Jones, E.; et al. Deficiency in myeloid differentiation factor-2 and toll-like receptor 4 expression attenuates nonalcoholic steatohepatitis and fibrosis in mice. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* **2011**, *300*, 433–441. [[CrossRef](#)]
108. Schuster, S.; Cabrera, D.; Arrese, M.; Feldstein, A.E. Triggering and resolution of inflammation in NASH. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2018**, *15*, 349–364. [[CrossRef](#)]
109. Marengo, A.; Rosso, C.; Bugianesi, E. Liver cancer: Connections with obesity, fatty liver, and cirrhosis. *Annu. Rev. Med.* **2016**, *67*, 103–117. [[CrossRef](#)]
110. Ye, S.L.; Takayama, T.; Geschwind, J.; Marrero, J.A.; Bronowicki, J.P. Current Approaches to the Treatment of Early Hepatocellular Carcinoma. *The Oncologist* **2010**, *15*, 34–41. [[CrossRef](#)]
111. Llovet, J.M.; Bruix, J. Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival. *Hepatology* **2003**, *37*, 429–442. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Brar, G.; Kesselman, A.; Malhotra, A.; Shah, M.A. Redefining Intermediate-Stage HCC Treatment in the Era of Immune Therapies. *JCO Oncol. Pract.* **2022**, *18*, 35–41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Lurje, I.; Czigan, Z.; Bednarsch, J.; Roderburg, C.; Isfort, P.; Neumann, U.P.; Lurje, G. Treatment strategies for hepatocellular carcinoma—A multidisciplinary approach. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1465. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Montanari, N.R.; Anugwom, C.M.; Boonstra, A.; Debes, J.D. The Role of Cytokines in the Different Stages of Hepatocellular Carcinoma. *Cancers* **2021**, *13*, 4876. [[CrossRef](#)]
115. Liu, Z.; Liu, X.; Liang, J.; Liu, Y.; Hou, X.; Zhang, M.; Li, Y.; Jiang, X. Immunotherapy for Hepatocellular Carcinoma: Current Status and Future Prospects. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 1–14. [[CrossRef](#)]
116. Zhang, W.E.I.; Song, T.Q.; Zhang, T.I.; Wu, Q. Adjuvant interferon for early or late recurrence of hepatocellular carcinoma and mortality from hepatocellular carcinoma following curative treatment: A meta—Analysis with comparison of different types of hepatitis. *Mol. Clin. Oncol.* **2014**, *2*, 1125–1134. [[CrossRef](#)]
117. Wu, J.; Yin, Z.; Cao, L.; Xu, X.; Yan, T.; Liu, C.; Li, D. Adjuvant pegylated interferon therapy improves the survival outcomes in patients with hepatitis-related hepatocellular carcinoma after curative treatment. *Medicine* **2018**, *97*, e11295. [[CrossRef](#)]
118. Sakisaka, M.; Haruta, M.; Komohara, Y.; Umemoto, S.; Matsumura, K.; Ikeda, T.; Takeya, M.; Inomata, Y.; Nishimura, Y.; Senju, S. Therapy of primary and metastatic liver cancer by human iPS cell-derived myeloid cells producing interferon- $\beta$ . *J. Hepatobiliary Pancreat Sci.* **2017**, *24*, 109–119. [[CrossRef](#)]
119. Sun, Y.; Wu, H.; Chen, G.; Huang, X. Genetically engineered recombinant adenovirus expressing interleukin-2 for hepatocellular carcinoma therapy. *Mol. Med. Rep.* **2018**, *17*, 300–306. [[CrossRef](#)]
120. Xu, J.; Lin, H.; Wu, G.; Zhu, M.; Li, M. IL-6/STAT3 Is a Promising Therapeutic Target for Hepatocellular Carcinoma. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 760971. [[CrossRef](#)]
121. Teng, D.; Ding, L.; Cai, B.; Luo, Q.; Wang, H. Cytokine Interleukin-7 enhances anti-tumor activity of CD8 + T cells in patients with hepatocellular carcinoma. *Cytokine* **2018**, *118*, 115–123. [[CrossRef](#)]
122. Tan, W.; Luo, X.; Li, W.; Zhong, J.; Cao, J.; Zhu, S.; Chen, X.; Zhou, R.; Shang, C.; Chen, Y. TNF-  $\alpha$  is a potential therapeutic target to overcome sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma. *EBioMedicine* **2019**, *40*, 446–456. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Gonzalez-Sanchez, E.; Vaquero, J.; Fernández-Barrena, M.G.; Lasarte, J.J.; Avila, M.A.; Sarobe, P.; Reig, M.; Calvo, M.; Fabregat, I. The TGF-  $\beta$  Pathway: A Pharmacological Target in Hepatocellular Carcinoma? *Cancers* **2021**, *13*, 3248.
124. Masuzaki, R.; Kanda, T.; Sasaki, R.; Matsumoto, N.; Nirei, K.; Ogawa, M.; Karp, S.J.; Moriyama, M.; Kogure, H. Suppressors of Cytokine Signaling and Hepatocellular Carcinoma. *Cancers* **2022**, *14*, 2549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. García-Pras, E.; Fernández-Iglesias, A.; Gracia-Sancho, J.; Pérez-Del-Pulgar, S. Cell Death in Hepatocellular Carcinoma: Pathogenesis and Therapeutic Opportunities. *Cancers* **2022**, *14*, 48. [[CrossRef](#)]