



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

GABRIEL PASQUARELLI DO NASCIMENTO

**EFEITO DO JEJUM INTERMITENTE E DA DIETA DE  
CAFETERIA SOBRE O EIXO TECIDO  
ADIPOSO-MICROBIOTA INTESTINAL NO MODELO DE  
CÂNCER DE MAMA MURINO**

TESE DE DOUTORADO

Brasília  
2023

GABRIEL PASQUARELLI DO NASCIMENTO

**EFEITO DO JEJUM INTERMITENTE E DA DIETA DE  
CAFETERIA SOBRE O EIXO TECIDO  
ADIPOSO-MICROBIOTA INTESTINAL NO MODELO DE  
CÂNCER DE MAMA MURINO**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação  
em Patologia Molecular, como parte dos  
requisitos necessários à obtenção do título de  
Doutor.

Orientador: Kelly Grace Magalhães

Brasília  
2023

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

dD676e do Nascimento, Gabriel Pasquarelli  
Efeito do jejum intermitente e da dieta de cafeteria  
sobre o eixo tecido adiposo-microbiota intestinal no modelo  
de câncer de mama murino. / Gabriel Pasquarelli do  
Nascimento; orientador Kelly Grace Magalhães. -- Brasília,  
2023.  
123 p.

Tese(Doutorado em Patologia Molecular) -- Universidade de  
Brasília, 2023.

1. Câncer de mama triplo-negativo. 2. Jejum intermitente.  
3. Dieta de cafeteria. 4. Tecido adiposo. 5. Microbiota  
intestinal. I. Magalhães, Kelly Grace, orient. II. Título.

# UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

## PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR/FM

**Ata Nº: 26/2023**

Aos **onze** dias do mês de **dezembro** do ano de dois mil e vinte e três, instalou-se a banca examinadora de Tese de Doutorado do aluno **GABRIEL PASQUARELLI DO NASCIMENTO**, matrícula **190137053**. A banca examinadora foi composta pelos professores **Dra. ANGELICA AMORIM AMATO, Membro Externo ao programa, UnB, Dr. MARCELO ALVES DA SILVA MORI, Membro Externo à Instituição, UNICAMP, Dra. PATRICIA BORGES BOTELHO GAMBA, Membro Externo à instituição, UNICAMP, Dra. DORALINA DO AMARAL RABELLO RAMOS, Membro interno, UnB (Suplente) e Dra. KELLY GRACE MAGALHAES, orientadora, presidente, UnB**. O discente apresentou o trabalho intitulado: “Efeito do jejum intermitente e da dieta de cafeteria sobre o eixo tecido adiposo-microbiota intestinal no modelo de câncer de mama murino”.

Concluída a exposição, procedeu-se a arguição do candidato, e após as considerações dos examinadores o resultado da avaliação do trabalho foi:

( X ) Pela aprovação do trabalho;

( ) Pela aprovação do trabalho, com revisão de forma, indicando o prazo de até 30 dias para apresentação definitiva do trabalho revisado;

( ) Pela reformulação do trabalho, indicando o prazo de (Nº DE MESES) para nova versão;

( ) Pela reprovação do trabalho, conforme as normas vigentes na Universidade de Brasília.

Conforme os Artigos 34, 39 e 40 da Resolução 0080/2021 - CEPE, o(a) candidato(a) não terá o título se não cumprir as exigências acima.

**Dra. KELLY GRACE MAGALHAES, UnB**

Orientadora/ Presidente

**Drª. ANGELICA AMORIM AMATO, UnB**

Membro Externo ao programa

**Dr. MARCELO ALVES DA SILVA MORI, UNICAMP**

Membro Externo à Instituição

**Dra. PATRICIA BORGES BOTELHO GAMBA, UNICAMP**

Membro Externo à instituição

**Dra. DORALINA DO AMARAL RABELLO RAMOS, UnB**

Membro interno - suplente

**GABRIEL PASQUARELLI DO NASCIMENTO**



Documento assinado eletronicamente por **Kelly Grace Magalhaes, Professor(a) de Magistério Superior da Faculdade de Medicina**, em 21/12/2023, às 15:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento na Instrução da Reitoria 0003/2016 da Universidade de Brasília.



Documento assinado eletronicamente por **Patrícia Borges Botelho, Usuário Externo**, em 21/12/2023, às 21:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento na Instrução da Reitoria 0003/2016 da Universidade de Brasília.



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Alves da Silva Mori, Usuário Externo**, em 22/12/2023, às 08:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento na Instrução da Reitoria 0003/2016 da Universidade de Brasília.



Documento assinado eletronicamente por **Angélica Amorim Amato, Professor(a) de Magistério Superior da Faculdade de Ciências da Saúde**, em 22/12/2023, às 10:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento na Instrução da Reitoria 0003/2016 da Universidade de Brasília.



Documento assinado eletronicamente por **Gabriel Pasquarelli do Nascimento, Usuário Externo**, em 22/12/2023, às 12:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento na Instrução da Reitoria 0003/2016 da Universidade de Brasília.



Documento assinado eletronicamente por **Guilherme Martins Santos, Coordenador(a) do Programa em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina**, em 22/12/2023, às 14:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento na Instrução da Reitoria 0003/2016 da Universidade de Brasília.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [http://sei.unb.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.unb.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **10728309** e o código CRC **DDEC1574**.

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus! Sem suas bênçãos eu certamente não conseguiria superar todos os desafios impostos a mim durante esses quatro anos de doutorado. Agradeço aos meus pais, que sempre me apoiam na busca por fazer o que amo: ciência. Agradeço a vocês, meus pais amados, pois mesmo nos momentos de estresse, vocês estão do meu lado. Sei que posso contar com vocês sempre!

Agradeço ao meu namorado Kaio, que desde o início do meu doutorado, vem caminhando junto comigo para realizar meus objetivos. Você é muito importante para mim, amor. Graças a você, sei que posso conquistar tudo que eu desejar.

Agradeço aos meus irmãos Henrique e João Luís, que, ao crescerem comigo, me ajudaram a ser uma boa pessoa e continuam a me ensinar a cada dia. É uma honra tê-los como meus irmãos. Agradeço à minha cunhada Lívia, sua filha Giovanna e meu sobrinho Bernardo. Agradeço à vó Judith (vozica), tia Wany, o Sérgio, meu tio Luiz Ivo Jr., meu tio Enauro, minha tia Hélia, Luciano, vó Geralda, vô João. Dedico essa tese ao meu falecido vô Luiz. O tumor que o acometeu e o levou de nós me estimulou a estudar o câncer.

Agradeço imensamente à professora Kelly por me permitir ter a honra de ser seu aluno desde 2015 e me ensinar a cada dia que os seres vivos são magníficos e inspiradores. Te agradeço também, Profa, por ser minha amiga e por todas as conversas e conselhos em momentos difíceis. E por ser paciente e confiar em mim sempre. Eu te agradeço imensamente por tudo isso. Você é muito querida por mim e por minha família. Obrigado!

Agradeço a todos colegas e amigos do Laboratório de Imunologia e Inflamação (LIMI) da UnB Milena, Calixto, Clarissa, Fernanda, Heloísa, Mickaella, Nathalia, Júlia, Ramon, Sabrina, Sarah e Jáder. Vocês são parte da minha família e é um prazer conviver com você. Agradeço aos integrantes passados do LIMI Rafael, Igor, Gabriel R. Raquel, Lívia, Gabriel H. e Nathalia. Agradeço aos amigos do laboratório GPRO Felipe, Marina, Daniel, Juan e ao professor Marcelo Hermes. Agradeço também aos colegas do LIA e da Biofísica.

Agradeço aos colaboradores desse trabalho no LIMI (Heloísa, Sabrina, Nathalia, Clarissa e ex-integrante Raquel) no departamento de Genética e Morfologia – GEM (Gabriel R, Dr. Willie e Dra Laíse). Agradeço ao técnico André Luiz Rezende, que preparou as lâminas de HE de todos os tecidos investigados, ao Dr Fábio, que me auxiliou na utilização do Aperio Scanner e à Dra. Doralina, que permitiu que eu utilizasse o equipamento.

Agradeço ao meu orientador do período sanduíche do meu doutorado Rafael Rezende por ter permitido que eu tivesse a honra de estudar na Universidade de Harvard e por todos os ensinamentos durante esses 6 meses em Boston. Depois de nossas conversas, minha visão de ciência é outra. Agradeço aos colaboradores do trabalho que contribuíram durante meu período sanduíche Dr Howard Weiner, Dra. Laura Cox, Dra. Thaís Moreira, PhD, Dra. Marília Garcia, Millicent Ekwudo, Felipe Rong e Maria Júlia Dalton que me ajudaram na teoria e na prática a

desenvolver meus objetivos do período sanduíche e por todos os momentos felizes que dividimos juntos na maravilhosa Boston.

Agradeço à UnB, minha segunda casa que amo muito. Ao Programa de Pós Graduação em Patologia Molecular, ao CNPq pelo suporte financeiro durante o meu doutorado, à CAPES, que possibilitou que eu conduzisse parte do meu doutorado em um laboratório de excelência (Weiner Lab) via o programa CAPESPRINT. À FAPDF, pelo fomento de diversos projetos do nosso lab. À PEW, que possibilitou a montagem do LIMI como um laboratório de qualidade, o que me possibilitou desenvolver esse trabalho. E agradeço aos membros da banca por aceitarem participar da minha defesa. Sei que será uma oportunidade muito enriquecedora de discutir minha tese e um momento de imenso crescimento.

## Resumo

O câncer de mama é a neoplasia mais prevalente entre mulheres e apresenta efeito devastador na população feminina. Tumores do subtipo triplo-negativo se mostram mais agressivos que outras neoplasias mamárias e tendem a apresentar eventos metastáticos letais. A evolução de neoplasias mamárias é influenciada pelo estilo de vida, incluindo a dieta. O crescente consumo de itens de cafeteria associa-se às estatísticas alarmantes de sobrepeso e obesidade mundiais, um fenótipo caracterizado por processos inflamatórios sistêmicos e do tecido adiposo. Já o jejum intermitente, eficiente terapia para a obesidade, correlaciona com diminuição de respostas inflamatórias no indivíduo praticante, favorecendo ativação da termogênese sem tiritação e redução de marcadores de inflamação do tecido adiposo. Ademais, estudos sugerem que esses padrões alimentares podem influenciar a composição e diversidade do microbioma intestinal. Considerando o papel central da dieta sobre a manutenção da saúde e promoção de doenças, o objetivo desse trabalho foi avaliar a influência do jejum intermitente e da dieta de cafeteria na progressão do câncer de mama triplo-negativo e caracterizar a modulação dos tecidos adiposos e da microbiota intestinal nesse contexto. Utilizamos camundongos BALB/c fêmeas para avaliação dos efeitos de dietas (padrão, jejum intermitente, cafeteria) na presença ou ausência de tumor mamário mediado por 4T1. Verificamos que, enquanto camundongos em dieta de cafeteria apresentaram tumores mamários com maior massa, volume, potencial proliferativo e capacidade metastática, roedores em jejum intermitente se associaram a tumores com potencial proliferativo e capacidade metastática reduzidos. Considerando que depósitos adiposos são órgãos metabólicos, imunológicos e endócrinos altamente plásticos que podem ser influenciados pela dieta, buscamos investigar o papel do tecido adiposo influenciado pelas dietas no contexto do câncer de mama estimulando células de câncer de mama triplo-negativo 4T1 com produtos de secreção de diversos depósitos. Detectamos que, enquanto as moléculas secretadas por depósitos adiposos de animais em dieta de cafeteria se associaram à menor ocorrência de morte apoptótica e maior secreção de IL-6 por essas células de câncer, o jejum intermitente correlacionou com alterações nos produtos de secreção dos tecidos adiposos que favoreceram aumento da porcentagem de células 4T1 em processo de apoptose e redução da secreção de IL-6 por essas células. Levando em consideração que a microbiota intestinal é uma comunidade extremamente fluida que pode ser afetada pelo padrão alimentar do indivíduo e que possui papel central sobre a homeostase do organismo hospedeiro, nós buscamos analisar os efeitos das dietas e do câncer triplo-negativo sobre a composição e diversidade do microbioma intestinal. Detectamos que, enquanto o jejum intermitente associou-se a maior diversidade metabólica e aumento de táxons com potencial ação imunorregulatória e antitumoral, a dieta de cafeteria favoreceu a redução da diversidade metabólica e aumento de táxons que potencialmente impactam negativamente sobre o estado inflamatório do organismo. Verificamos também que dependendo do táxon avaliado o efeito foi dependente ou independente da malignidade mamária. Portanto, sugerimos que o tecido adiposo

e a microbiota intestinal podem ser mediadores dos efeitos do jejum intermitente e da dieta de cafeteria sobre o câncer de mama triplo-negativo em camundongos BALB/c fêmeas.

Palavras-chave: Câncer de mama triplo-negativo, jejum intermitente, dieta de cafeteria, tecido adiposo, microbiota intestinal

## Abstract

Breast cancer is the most prevalence malignancy among women and present devastating effects in female population. Triple-negative tumors are more aggressive than other mammary neoplasm and tend to show lethal metastatic events. The evolution of mammary malignancies is influenced by the lifestyle, including diet. The increasing consumption of cafeteria items associate with the alarming global statistics regarding overweight and obesity, a phenotype characterized by systemic and adipose tissue inflammatory processes. Intermittent fasting, efficient obesity therapy, correlates with diminishing inflammatory responses in the individual, favoring non-shivering thermogenesis and decreased tissue inflammatory markers. In addition, studies indicate that these dietary regimens can influence the composition and diversity of the intestinal microbiome. Considering the central role of diet on health maintenance and disease promotion, the objective of this work was to evaluate the influence of intermittent fasting and cafeteria diet on triple-negative breast cancer progression and characterize the modulation of adipose tissue and intestinal microbiome in this context. We used female BALB/c mice to analyse the effects of diet (standard diet (SD), intermittent fasting (IF) and cafeteria diet (CAF)) in the presence and absence of 4T1-mediated breast tumor. We verified that, while mice in cafeteria diet present breast tumors with increased mass, volume, proliferative potential and metastatic capacity, rodents in intermittent fasting associate with tumors with reduced proliferative potential and metastatic capacity. Considering that adipose depots are highly plastic metabolic, immune, and endocrine organs that can be influenced by the diet, we sought to investigate the role of adipose tissue influenced by the dietary regimens in the context of breast cancer stimulating the triple-negative breast cancer cells 4T1 with secretion products of several adipose depots. We detected that, whereas the molecules secreted by adipose depots of animals in cafeteria diet associated with decreased apoptotic cell death in 4T1 cells and reduced IL-6 secretion by these cells, intermittent fasting correlated with alterations in the adipose tissue secretion products that favored augmented 4T1 apoptosis and diminished IL-6 secretion by these cells. Taking into consideration that the intestinal microbiota is an extremely fluid community that can also be affected by the diet that pose central roles on the host organism homeostasis, we sought to analyze the effects of the diets and the breast cancer on the composition and diversity of the intestinal microbiome. We verified that. While intermittent fasting associated with increased microbiome metabolic diversity and increased abundance of taxa with potential immunoregulatory and antitumoral activities, cafeteria diet favored the reduction of metabolic diversity and augmented levels of taxa that potentially present negative impact on host inflammatory status.

**Key words:** Triple-negative breast cancer, intermittent fasting, cafeteria diet, adipose tissue, intestinal microbiota

## Lista de ilustrações

Figura 1 – O impacto global do câncer de mama. . . . .	20
Figura 2 – Classificação dos carcinomas mamários. . . . .	21
Figura 3 – <b>Características dos diferentes tumores de mama.</b> . . . .	22
Figura 4 – <b>Etapas do processo de metástase.</b> . . . .	23
Figura 5 – <b>Nutrientes da dieta de cafeteria e seus efeitos sobre inflamação e doença metabólica.</b> . . . .	25
Figura 6 – <b>Efeitos do jejum intermitente sobre diversos órgãos e tecidos.</b> . . . .	27
Figura 7 – <b>Efeito do jejum intermitente sobre a ativação de vias intracelulares que favorecem a sobrevivência, biogênese mitocondrial e resposta antioxidante.</b> . . . .	29
Figura 8 – <b>Tipos de adipócitos e suas características morfológicas e funcionais.</b> . .	30
Figura 9 – <b>Disfunção de adipócitos e deposição ectópica de lipídeos.</b> . . . .	31
Figura 10 – <b>Mecanismos moleculares que se associam ao amarronzamento do tecido adiposo branco e estímulos que induzem esse processo.</b> . . . .	33
Figura 11 – <b>Distribuição da microbiota intestinal e seus papéis centrais no funcionamento de diversos órgãos.</b> . . . .	34
Figura 12 – <b>Metabólitos da microbiota intestinal.</b> . . . .	36
Figura 13 – <b>A relevância do eixo intestino mama no contexto de terapias antitumorais.</b>	38
Figura 14 – <b>Desenho experimental do experimento <i>in vivo</i>.</b> . . . .	42
Figura 15 – <b>Informações nutricionais dos itens de cafeteria utilizados</b> . . . . .	43
Figura 16 – <b>Informações nutricionais dos itens de cafeteria utilizados</b> . . . . .	43
Figura 17 – Impacto das dietas e do Câncer sobre o peso dos animais. . . . .	52
Figura 18 – Efeito das dietas e do câncer sobre as massas de diferentes depósitos de tecido adiposo branco dos animais. . . . .	53
Figura 19 – Influência das dietas e do câncer sobre as características morfológicas do tecido adiposo branco inguinal dos animais. . . . .	54
Figura 20 – Influência das dietas e do câncer sobre a ocorrência de esteatose no fígado dos animais . . . . .	55
Figura 21 – Impacto das dietas e do câncer sobre os níveis plasmáticos de colesterol nos camundongos. . . . .	56
Figura 22 – Influência das dietas sobre a massa e o volume do tumor primário. . . . .	57
Figura 23 – Impacto das dietas sobre a ocorrência de metástase hepática nos roedores. .	59
Figura 24 – Influência das dietas e do câncer sobre as características de células imunológicas circulantes dos animais. . . . .	61
Figura 25 – Influência das dietas e do câncer sobre as características de células imunológicas circulantes dos animais. . . . .	63
Figura 26 – Impacto das dietas e do câncer sobre a massa esplênica dos animais. . . .	64

Figura 27 – Impacto das dietas e do câncer sobre o perfil de citocinas do tecido adiposo marrom. . . . .	66
Figura 28 – Impacto das dietas e do câncer sobre a morfologia do tecido adiposo marrom. . . . .	68
Figura 29 – Efeito do câncer sobre indicativos de inflamação do tecido adiposo branco inguinal. . . . .	69
Figura 30 – Influência de moléculas secretadas por tecidos adiposos modulados pelas diferentes dietas sobre a proliferação das células 4T1. . . . .	71
Figura 31 – Efeito de moléculas secretadas por tecidos adiposos modulados pelas diferentes dietas sobre a ocorrência de morte lítica das células 4T1. . . . .	73
Figura 32 – Efeito de moléculas secretadas por tecidos adiposos modulados pelas diferentes dietas sobre ocorrência de morte apoptótica das células 4T1. . . . .	74
Figura 33 – Impacto de moléculas secretadas por tecidos adiposos modulados pelas diferentes dietas sobre a biogênese de corpúsculo lipídico pelas células 4T1. . . . .	75
Figura 34 – Efeito de moléculas secretadas por tecidos adiposos modulados pelas diferentes dietas sobre a secreção de IL-6 pelas células 4T1. . . . .	77
Figura 35 – Efeito de moléculas secretadas por tecidos adiposos modulados pelas diferentes dietas sobre a secreção de IL-1 $\beta$ pelas células 4T1. . . . .	78
Figura 36 – Efeito de moléculas secretadas por tecidos adiposos modulados pelas diferentes dietas sobre a secreção de TNF- $\alpha$ pelas células 4T1. . . . .	79
Figura 37 – Efeito de moléculas secretadas por tecidos adiposos modulados pelas diferentes dietas sobre a secreção de IL-10 pelas células 4T1. . . . .	80
Figura 38 – Efeito de moléculas secretadas por tecidos adiposos modulados pelas diferentes dietas sobre a secreção de TGF- $\beta$ pelas células 4T1. . . . .	81
Figura 39 – Impacto das dietas e do câncer de mama triplo-negativo sobre a abundância relativa de <i>Enterococcus</i> spp. . . . .	83
Figura 40 – Impacto das dietas e do câncer de mama triplo-negativo sobre a abundância relativa de <i>Enterococcus</i> spp. . . . .	84
Figura 41 – Impacto das dietas e do câncer de mama triplo-negativo sobre a abundância relativa de <i>Enterococcus</i> spp. . . . .	85
Figura 42 – Impacto das dietas e do câncer de mama triplo-negativo sobre a abundância relativa de <i>Lactobacillus</i> spp. . . . .	86
Figura 43 – Impacto das dietas e do câncer de mama triplo-negativo sobre a abundância relativa de <i>Roseburia</i> spp. . . . .	87
Figura 44 – Impacto das dietas e do câncer de mama triplo-negativo sobre a abundância relativa de <i>Bacteroidetes</i> . . . . .	88
Figura 45 – Impacto das dietas e do câncer de mama triplo-negativo sobre a abundância relativa de <i>Alistipes</i> spp. . . . .	89
Figura 46 – Impacto das dietas e do câncer de mama triplo-negativo sobre a abundância relativa de <i>Bacteroides</i> spp. . . . .	90

Figura 47 – Impacto das dietas e do câncer de mama triplo-negativo sobre a abundância relativa de <i>Desulfovibrio</i> spp. . . . .	91
Figura 48 – Impacto das dietas e do câncer de mama triplo-negativo sobre a diversidade metabólica do microbioma intestinal (grupo 1 de vias metabólicas). . . . .	92
Figura 49 – Impacto das dietas e do câncer de mama triplo-negativo sobre a diversidade metabólica do microbioma intestinal (grupo 2 de vias metabólicas). . . . .	94

## Lista de tabelas

Tabela 1 – Composição da Ração AIN-93 empregada . . . . .	42
Tabela 2 – Receita do Bolinho de Salsicha . . . . .	44
Tabela 3 – Receita do Bolinho de Mortadela . . . . .	44

## Lista de abreviaturas e siglas

AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
AIM2	Ausente no melanoma 2
AMP	Adenosina monofosfato
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
ANOVA	Análise de Variância
AST	aspartato aminotransferas
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Trifosfato de Adenosina
Acetil-CoA	Acetilcoenzima A
BAT	Tecido adiposo marrom
BD	Becton Dickinson
BD FACS™	Citometria de fluxo
BODIPY	Boro-dipirrometano
BSA	Albumina de soro bovino
CA	Câncer
CAF	Charities Aid Foundation
CAF CA+	Dieta de cafeteria sem câncer
CAF CA-	Dieta de Cafeteria sem câncer
CD4	Linfócito T helper com receptor CD4
CD8	Linfócito T citotóxico com receptor CD8
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FOXOs	forkhead box Os
H <sub>2</sub> S	Gás Sulfídrico
HE	Hematoxilina-Eosina
HER2	Fator de crescimento epidérmico humano do tipo 2
IF CA+	Jejum intermitente com câncer
IF CA-	Jejum intermitente sem câncer
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina 12
IL-18	Interleucina-18
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 $\beta$
IL-6	Interleucina-6
ILC	Células linfoides inatas
IM	Intramuscular
IMC	Índice de Massa Corporal
IgWAT	Tecido adiposo branco inguinal
LDL	Low-density Lipoprotein (Lipoproteína de baixa densidade)
LPS	Lipopolissacarídeo
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (forma reduzida)
NRF2	Nuclear factor erythroid 2–related factor 2
PBS	Solução tampão fosfato-salina
PCR	Polymerase Chain Reaction/ Reação em cadeia da polimerase
PGC-1 $\alpha$	Peroxisome proliferator–activated receptor $\gamma$ coactivator 1 $\alpha$
PRDM16	Domínio PR contendo proteína 16
RPMI	Meio de cultura Roswell Park Memorial Institute

SD CA+	Dieta padrão com câncer
SD CA-	Dieta padrão sem câncer
ScWAT	Tecido adiposo branco subcutâneo
TGF- $\beta$	Fator de crescimento e transformação
TLR4	Toll Like Receptor Tipo 4
TMA	Trimetilamina
TMAO	Trimetilamina N-óxido
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral
UCP1	Uncoupling protein 1 (proteína desacopladora 1)
UNS	Não estimulado
gWAT	Tecido adiposo branco gonadal
iNKT	Células T matadoras naturais invariantes
igWAT	Tecido adiposo branco inguinal
°C	Graus Celsius

## Sumário

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>20</b>
<b>1.1</b>	<b>Câncer de mama e metástase</b>	<b>20</b>
<b>1.2</b>	<b>Dietas ocidentais, sobrepeso e obesidade</b>	<b>23</b>
<b>1.3</b>	<b>Jejum intermitente</b>	<b>26</b>
<b>1.4</b>	<b>Dietas como moduladores dos fenótipos dos tecidos adiposos</b>	<b>29</b>
<b>1.5</b>	<b>Dietas como moduladores da composição e diversidade do microbioma intestinal</b>	<b>33</b>
<b>2</b>	<b>Justificativa</b>	<b>39</b>
<b>3</b>	<b>Objetivos</b>	<b>40</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral</b>	<b>40</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos</b>	<b>40</b>
<b>4</b>	<b>Metodologia</b>	<b>41</b>
<b>4.1</b>	<b>Linhagem de células neoplásicas</b>	<b>41</b>
<b>4.2</b>	<b>Acondicionamento e manejo dos animais</b>	<b>41</b>
<b>4.3</b>	<b>Experimentação <i>in vivo</i></b>	<b>41</b>
4.3.1	<b>Delineamento experimental</b>	<b>41</b>
4.3.2	<b>Pesagem dos animais</b>	<b>44</b>
4.3.3	<b>Aferição de massa dos tecidos e do tumor</b>	<b>44</b>
4.3.4	<b>Análise hematológica</b>	<b>44</b>
4.3.5	<b>Análise bioquímica</b>	<b>45</b>
4.3.6	<b>Análises histopatológicas</b>	<b>45</b>
4.3.7	<b>Análise do perfil de citocinas dos tecidos adiposos</b>	<b>45</b>
<b>4.4</b>	<b>Experimentação <i>ex vivo</i></b>	<b>46</b>
4.4.1	<b>Delineamento experimental</b>	<b>46</b>
4.4.2	<b>Obtenção dos produtos de secreção para estímulo e tempo de tratamento das células</b>	<b>46</b>
4.4.3	<b>Proliferação celular</b>	<b>46</b>
4.4.4	<b>Perfil de morte celular</b>	<b>47</b>
4.4.5	<b>Biogênese de Corpúsculo lipídico</b>	<b>47</b>
4.4.6	<b>Análise de secreção de citocinas</b>	<b>48</b>
4.4.7	<b>Análise estatística e confecção de gráficos</b>	<b>48</b>
<b>4.5</b>	<b>Análises da microbiota intestinal</b>	<b>48</b>
4.5.1	<b>Coleta, acondicionamento e envio das amostras de fezes</b>	<b>48</b>

4.5.2	<b>Montagem do arquivo da biblioteca CL-03, extração e quantificação de DNA total . . . . .</b>	<b>49</b>
4.5.3	<b>Amplificação do gene do RNA ribossomal 16S . . . . .</b>	<b>49</b>
4.5.4	<b>Quantificação dos produtos de PCR . . . . .</b>	<b>49</b>
4.5.5	<b>Geração e limpeza dos conjuntos e envio para sequenciamento . . . . .</b>	<b>50</b>
4.5.6	<b>Análise dos dados <i>in silico</i> . . . . .</b>	<b>50</b>
<b>5</b>	<b>Resultados . . . . .</b>	<b>51</b>
<b>5.1</b>	<b>Experimentação <i>in vivo</i> . . . . .</b>	<b>51</b>
5.1.1	<b>Análise de parâmetros metabólicos dos camundongos . . . . .</b>	<b>51</b>
5.1.1.1	<b>Impacto das dietas e do câncer sobre o peso dos animais . . . . .</b>	<b>51</b>
5.1.1.2	<b>Efeito das dietas e do câncer sobre as massas de diferentes depósitos de tecido adiposo branco dos animais . . . . .</b>	<b>52</b>
5.1.1.3	<b>Efeito das dietas e do câncer sobre características morfológicas do tecido adiposo branco inguinal dos roedores . . . . .</b>	<b>53</b>
5.1.1.4	<b>Impacto das dietas e do câncer sobre a ocorrência de esteatose hepática nos camundongos . . . . .</b>	<b>54</b>
5.1.1.5	<b>Efeito das dietas e do câncer sobre os níveis circulantes de colesterol nos roedores . . . . .</b>	<b>55</b>
5.1.2	<b>Análise de parâmetros do tumor primário dos animais . . . . .</b>	<b>56</b>
5.1.2.1	<b>Influência das dietas sobre o volume do tumor . . . . .</b>	<b>56</b>
5.1.2.2	<b>Impacto das dietas sobre a massa do tumor . . . . .</b>	<b>57</b>
5.1.2.3	<b>Efeito das dietas sobre o potencial proliferativo do tumor . . . . .</b>	<b>57</b>
5.1.3	<b>Análise da ocorrência de metástase hepática nos animais . . . . .</b>	<b>57</b>
5.1.3.1	<b>Influência das dietas sobre a contagem de focos metastáticos hepáticos . . . . .</b>	<b>57</b>
5.1.3.2	<b>Impacto das dietas sobre o volume dos focos metastáticos hepáticos . . . . .</b>	<b>58</b>
5.1.3.3	<b>Vascularização hepática como um potencial contribuinte para invasão hepática . . . . .</b>	<b>58</b>
5.1.3.4	<b>Impacto do câncer no contexto das três dietas sobre a massa do fígado . . . . .</b>	<b>58</b>
5.1.4	<b>Avaliação de parâmetros inflamatórios dos camundongos . . . . .</b>	<b>59</b>
5.1.4.1	<b>Efeito das dietas e do câncer sobre a contagem de células imunológicas circulantes dos animais . . . . .</b>	<b>59</b>
5.1.4.2	<b>Efeito das dietas e do câncer sobre as características de plaquetas circulantes nos animais . . . . .</b>	<b>61</b>
5.1.4.3	<b>Impacto das dietas e do câncer sobre a massa esplênica dos animais . . . . .</b>	<b>63</b>
5.1.4.4	<b>Impacto das dietas e do câncer sobre o perfil de citocinas do tecido adiposo marrom . . . . .</b>	<b>64</b>
5.1.4.5	<b>Efeito das dietas e do câncer sobre as características morfológicas do tecido adiposo marrom . . . . .</b>	<b>66</b>

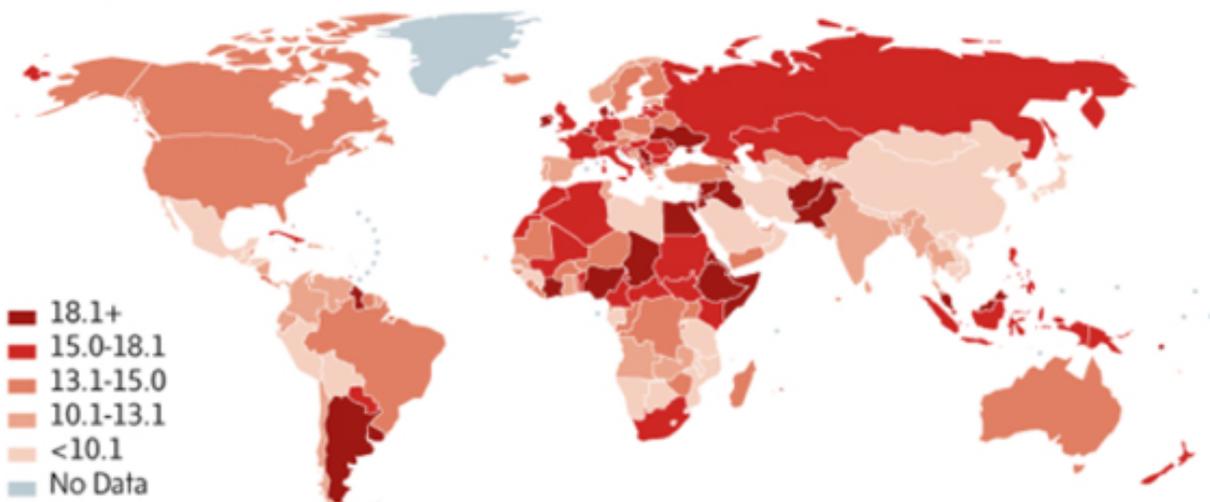
5.1.4.6	Efeito das dietas e do câncer sobre as características morfológicas indicativas de inflamação do tecido adiposo branco inguinal . . . . .	68
5.2	Análises <i>ex vivo</i> . . . . .	69
5.2.1	Influência de moléculas secretadas por tecidos adiposos modulados pelas diferentes dietas sobre a proliferação das células 4T1 . . . . .	69
5.2.2	Efeito dos produtos de secreção dos tecidos adiposos modulados pelas diferentes dietas sobre o perfil de morte das células 4T1 . . . . .	72
5.2.3	Impacto de moléculas secretadas por tecidos adiposos modulados pelas diferentes dietas sobre a biogênese de corpúsculo lipídico pelas células 4T1	74
5.2.4	Efeito de moléculas secretadas por tecidos adiposos modulados pelas diferentes dietas sobre secreção de citocinas pelas células 4T1 . . . . .	76
5.3	Análise da microbiota intestinal a partir de amostras fecais dos camundongos . . . . .	82
5.3.1	Avaliação dos efeitos do jejum intermitente, da dieta de cafeteria e do câncer de mama triplo-negativo sobre a diversidade beta do microbioma intestinal . . . . .	82
5.3.2	Análise dos efeitos do jejum intermitente, da dieta de cafeteria e do câncer de mama triplo-negativo sobre a composição do microbioma intestinal .	83
5.3.3	Análise dos efeitos do jejum intermitente, da dieta de cafeteria e do câncer de mama triplo-negativo sobre a diversidade metabólica do microbioma intestinal . . . . .	91
6	Discussão . . . . .	95
7	Conclusão . . . . .	105
8	Referências bibliográficas . . . . .	106
9	Anexos . . . . .	114
9.1	Certificado de aprovação do projeto de pesquisa pela Comissão de Ética de Uso Animal da Universidade de Brasília . . . . .	114
9.2	Produções aceitas para publicação . . . . .	114
9.3	Produção submetida para publicação . . . . .	123

## 1 Introdução

### 1.1 Câncer de mama e metástase

O câncer de mama é a malignidade mais prevalente entre mulheres, apresentando efeito devastador mundialmente. Em 2020, 2,3 milhões de pacientes foram diagnosticadas com câncer de mama e 685 mil mortes foram causadas por esses tumores (Organização Mundial da Saúde, 2021) (figura 1). Quase um terço dos tumores femininos são enquadrados como câncer de mama, a taxa de mortalidade-incidência desses tumores é de 15% e os números relacionados à incidência de câncer de mama em locais diferentes do globo (27 em 100 000 na África e leste asiático e 97 em 100 000 na América do Norte) ressaltam que fatores de estilo de vida aumentam o risco de desenvolvimento dessas neoplasias (Bray et al., 2018). Um estudo prospectivo informou que mais de um terço dos tumores de mama que acometem mulheres de países desenvolvidos são influenciados por fatores associados ao estilo de vida, como abuso de álcool, uso de tabaco, histórico reprodutivo, terapia hormonal menopausal e obesidade (Nur et al., 2019).

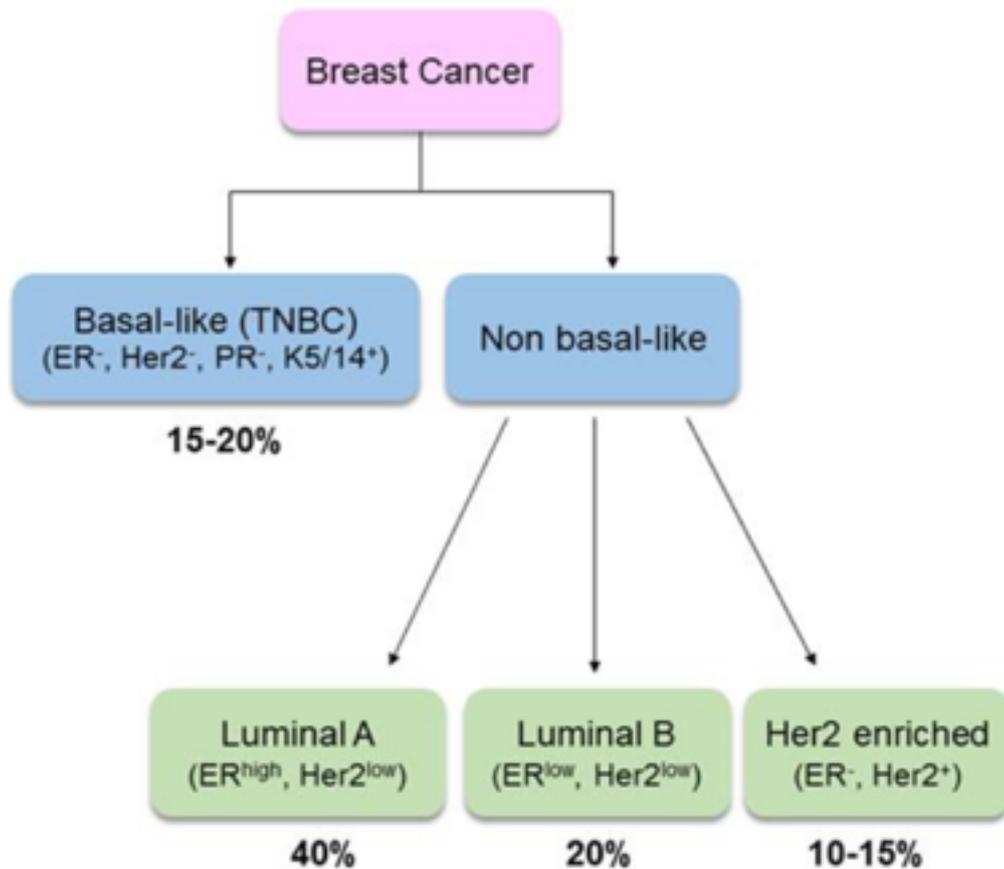
*Mortality rate per 100,000, female*



**Figura 1 – O impacto global do câncer de mama.**

O câncer de mama é uma doença heterogênea que é clinicamente subdividida em três subtipos baseado na expressão de receptores de hormônios sexuais (estrógeno e progesterona) e o estado de HER2: tumores luminal A, luminal B, enriquecidos para HER2 e triplo-negativos (Denkert et al., 2017) (figura 2). A neoplasia de mama triplo-negativa caracteriza-se por não apresentar níveis detectáveis dos receptores de estrógeno, progesterona e de HER2 (*human epidermal growth factor receptor 2*) (Bianchini et al., 2016). Entre 2012 e 2016, os tumores de mama triplo-negativos representaram 12% dos diagnósticos de câncer de mama nos Estados Unidos (Bianchini et al., 2016). Indivíduos afetados por esse tumor tendem a apresentar pior

prognóstico quando comparado com outros tipos de neoplasias mamárias (Malorni et al., 2012), mostrando diminuição relevante da sobrevida de 5 anos (8 a 16%) quando comparado com tumores que possuem receptores dos hormônios sexuais (Centers for Disease Control and Prevention, 2021) (figura 3). A abordagem quimioterapêutica, sendo altamente tóxica e inespecífica, vem sendo empregada como primeira linha farmacológica visando a regressão desse tumor mamário (Bianchini et al., 2016).



**Figura 2 – Classificação dos carcinomas mamários.**

Nutrition and Breast Cancer: A Literature Review on Prevention, Treatment and Recurrence. Paola De Cicco, Maria Valeria Catani, Valeria Gasperi, Matteo Sibilano, Maria Quaglietta e Isabella Savini. 2019.

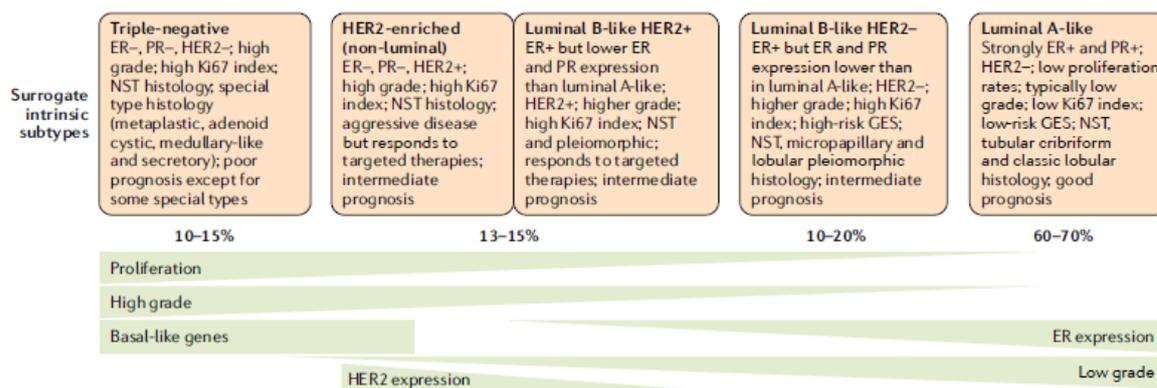
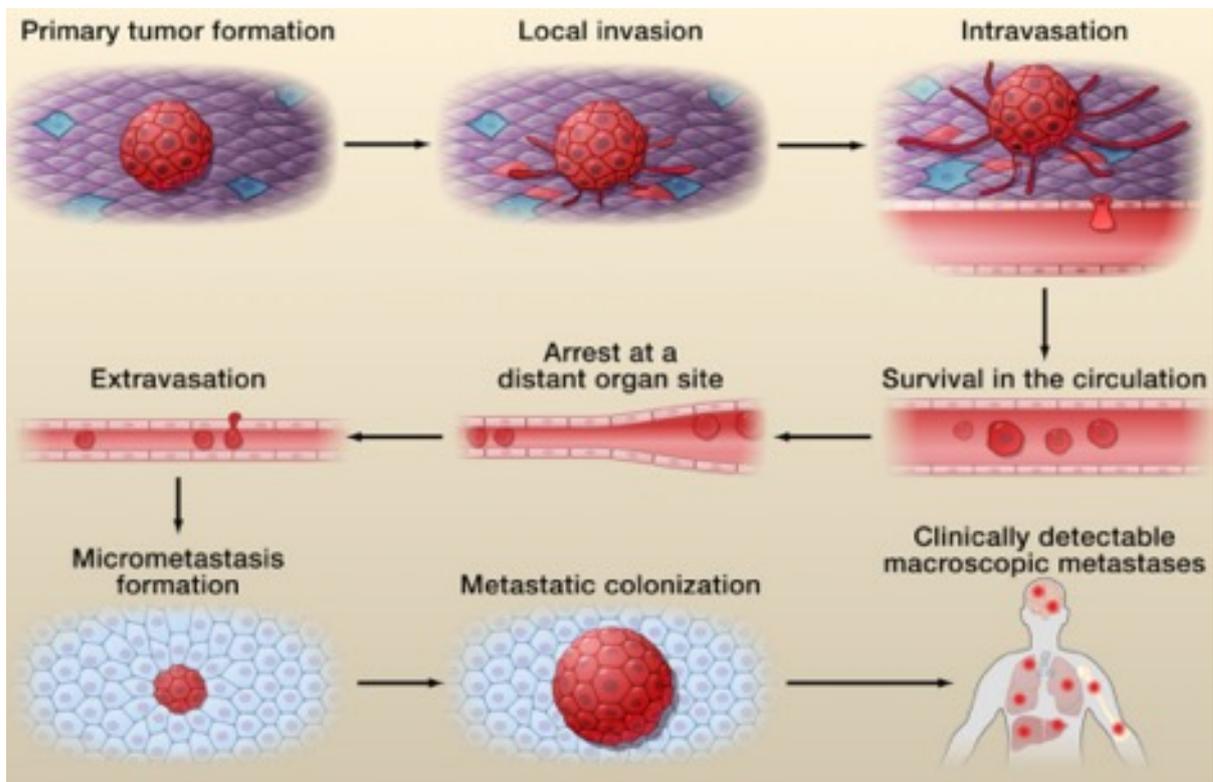


Figura 3 – Características dos diferentes tumores de mama.

Breast cancer. Nadia Harbeck, Frédérique Penault- Llorca, Javier Cortes, Michael Gnant, Nehmat Houssami, Philip Poortmans, Kathryn Ruddy, Janice Tsang e Fatima Cardoso. 2019.

A heterogeneidade dos tumores de mama triplo-negativos é ilustrada pelas diferentes formas de classificação desses tumores, incluindo as baseadas em análises histológicas, moleculares, de expressão gênica e de metabolismo. Histologicamente, a maioria dos tumores de mama triplo-negativos são agrupados como carcinomas mamários invasivos (Weigelt & Reis-Filho, 2009). Agrupamentos baseados em análises moleculares dividem os tumores triplo-negativos em *basal-like*, *HER2-enriched*, *luminal A* e *B* e *normal-like* (Eroles et al., 2012). Já a classificação realizada por Lehmann e colaboradores, baseada na avaliação do perfil de expressão gênica, sugeriu a existência de seis subtipos desse tumor: dois subgrupos *basal-like-related* (*basal-like 1* (BL1) e 2 (BL2)), dois subgrupos *mesenchymal-related* (*mesenchymal* (M) e *mesenchymal stem-like* (MSL)), um subgrupo imunomodulador (IM) e um grupo *luminal androgen receptor* (LAR) (Lehmann et al., 2011). Uma outra subdivisão do câncer triplo-negativo é a indicada com base em vias metabólicas dos tumores: um subtipo lipogênico (MPS1), um tipo glicolítico (MPS2) e um subtipo com características metabólicas mistas (MPS3) (Gong et al., 2021). A célula de linhagem de câncer de mama triplo-negativo murino 4T1 foi enquadrada como pertencente ao subgrupo glicolítico (MSP2), sugerindo que essas células apresentam preferência metabólica pelo consumo de glicose.

As células 4T1 são atualmente amplamente utilizadas no estudo de tumores primários de mama (Pulaski, 2000). Ademais, o emprego dessas células tem se mostrado como um relevante modelo do processo metastático (Yang et al., 2020). A metástase é definida como a disseminação de células neoplásicas de um órgão para outro distante (Irani, 2019) (figura 4). 90% das mortes causadas por câncer são associadas à ocorrência de metástase. Enquanto que a sobrevivência de 5 anos de indivíduos com câncer de mama ausente de metástase é de 80% (Allemani et al., 2018), pacientes com tumor mamário metastático apresenta 25% de chances de sobreviver por 5 anos após o diagnóstico (Valastyan & Weinberg, 2011). O aumento de casos de pacientes com neoplasias mamárias metastáticas reforça a alta relevância de se investigar mecanismos associados a esse processo em tumores (Koboldt et al., 2012).



**Figura 4 – Etapas do processo de metástase.**

Metastatic and triple-negative breast cancer: challenges and treatment options. Sumayah Al-Mahmood, Justin Sapiezynski, Olga B. Garbuzenko e Tamara Minko. 2018.

Maligñidades de mama apresentam maior tropismo por osso, pulmões, fígado e cérebro e essa heterogeneidade metastática é associada a diferentes efeitos sobre o câncer em termos de resposta ao tratamento e prognóstico dos pacientes (Liang et al., 2020). Stephen Paget foi o primeiro a formular hipóteses sobre esse tão letal processo, e sugeriu que o potencial metastático está relacionado às características do tumor primário e à compatibilidade do microambiente de destino (Paget, 1889). Após Paget, a formulação dos modelos de progressão linear e de progressão paralela apresentam hipóteses divergentes quanto ao processo metastático (Craig et al., 2013) (Navin & Hicks, 2010). Apesar disso, hoje é sabido que o processo de metástase relaciona-se a diversas etapas sequenciais, incluindo invasão de tecidos adjacentes, intravasão, sobrevivência à circulação, extravasão e colonização de tecido distante (Nguyen et al., 2009)(Chaffer & Weinberg, 2011)(Mohme et al., 2017)(Pantel & Speicher, 2016).

## 1.2 Dietas ocidentais, sobrepeso e obesidade

Sabe-se que o câncer de mama tende a ser mais agressivo em indivíduos com obesidade. Abe e colaboradores informaram que o fenótipo obeso associa-se a tumores primários maiores, elevada taxa de invasão linfática e menor sobrevivência comparando-se com indivíduos com

peso normal (Abe et al., 1976). Ademais, mulheres impactadas pela obesidade apresentam um decréscimo de mais de 10% na sobrevivência, independentemente do estado menopausal do indivíduo (Protani et al., 2010). Núñez-Ruiz e colaboradores demonstraram em um modelo murino de câncer de mama que o fenótipo obeso associa-se a perfis anti-inflamatórios em células imunológicas presentes no microambiente tumoral, conectando a obesidade com reduzida capacidade de eliminação de tumores (Núñez-Ruiz *et al.*, 2022). Ademais, diversos estudos apontam que o sistema imunológico de indivíduos e roedores com obesidade apresentam alterações deletérias na imunidade antitumoral ao nível sistêmico (Dyck and Lynch, 2023).

O sobrepeso e a obesidade, sendo atualmente definidos por valores de índice de massa corpórea (IMC) (sobrepeso IMC superior a 25 kg/m<sup>2</sup> e obesidade IMC maior que 30 kg/m<sup>2</sup>), apresentam números alarmantes. Em 2017, quatro milhões de pessoas morreram como consequência do sobrepeso e da obesidade. As taxas de sobrepeso e obesidade continuam crescendo, como ilustrado pelo fato de que a prevalência dessas doenças em crianças e adolescentes de 1975 a 2016 aumentou em quatro vezes (Organização Mundial da Saúde, 2021). O sobrepeso e a obesidade relacionam-se a diversos fatores, incluindo genética, níveis hormonais e o estilo de vida adotado, incluindo a dieta (Spalding et al., 2008).

A industrialização, a urbanização e a progressiva utilização de tecnologias no cotidiano correlaciona com o aumento do consumo de dietas ocidentais contendo itens de cafeteria, incluindo alimentos ricos em açúcares refinados, sal, carnes processadas, farinha branca e aditivos alimentícios, como conservantes e flavorizantes. Essas dietas também são reconhecidas como pobres em fibras, minerais e vitaminas (Mozaffarian, 2016). Sabe-se que a elevação do consumo desses itens também vem ocorrendo em países menos desenvolvidos (Imamura et al., 2015) (Monteiro et al., 2013), fato que se associa ao impacto global devastador da obesidade. O consumo a longo prazo de itens de cafeteria influenciam a saúde do indivíduo por promover rápido ganho de peso, alterações no metabolismo energético e ativação do sistema imunológicos (Christ et al., 2019) (figura 5). Diversos estudos informam que padrões alimentares ocidentais levam ao aumento de marcadores inflamatórios séricos, evidenciando o impacto desses alimentos sobre as células imunológicas do indivíduo (Hosseini et al., 2016)(Lopez-Garcia et al., 2004).

**Table 1. Nutrients in Inflammation and Metabolic Disease**

Component	Effect on Metabolic Disease	Pro- or Anti-inflammatory	Dietary Inflammatory Index <sup>1</sup>	Effect	Additional References (PMID)
<b>Nutrients</b>					
SFAs	Pro	Pro	0.373	Increases LDL, endotoxemia, inducers of cellular stress	N/A
MUFA	None	None	-0.0009	Prevents SFA-induced cellular stress	N/A
Omega-3 FAs	Anti	Anti	-0.436	Inhibits inflammatory signaling, regulates food intake, substrates for synthesis of pro-resolving lipid mediators	N/A
Cholesterol	Pro	Pro	0.11	LDL-C is the causative agent for atherosclerosis, a cellular stressor; when crystallized activate NLRP3 inflammasome	N/A
Sugars, refined grains	Pro	Pro	0.097 <sup>2</sup>	Promotes weight gain, dysbiosis	Sen et al., 2017
Fiber	Anti	Pro and Anti	-0.663	Slows down and/or impedes nutrient uptake, shapes gut microbiome	N/A
<b>Other Dietary Metabolites</b>					
Purines	Pro	Pro	n.d.	Conversion to uric acid, the causative agent of gout	Choi et al., 2004; Li et al., 2018b
Dietary carnitine	Pro	n.d.	n.d.	Conversion into TMAO, promotes atherosclerosis, limits reverse cholesterol transport	N/A
Dietary histidine	Pro	n.d.	n.d.	Conversion into propionyl imidazole, decreases insulin sensitivity	N/A
Polyphenols	Anti	Anti	Diverse <sup>3</sup>	Alterations in lipid metabolism, antioxidant, lowers blood pressure, immunomodulatory	Taubert et al., 2007; Andriantsitohaina et al., 2012; Yahfoufi et al., 2018
SFCA	Anti	Pro and Anti	n.d.	Immunomodulatory, signals to CNS	N/A
Celastrol	Anti	n.d.	n.d.	Increases leptin sensitivity	N/A

**Figura 5 – Nutrientes da dieta de cafeteria e seus efeitos sobre inflamação e doença metabólica.**

Western Diet and the Immune System: An Inflammatory Connection. Anette Christ, Mario Lauterbach e Eicke Latz. 2019

Modelo de obesidade para roedores, a dieta de cafeteria consiste na administração de componentes alimentares obesogênicos consumidos por humanos (como biscoitos recheados e salgadinhos artificiais), portanto estimulando melhor os padrões alimentares associados à progressão do estado obeso do que outros modelos de obesidade (Zeeni *et al.*, 2015). Atualmente, sabe-se que a dieta de cafeteria é um modelo de obesidade para roedores mais eficiente que a dieta hiperlipídica (*High-fat diet- HFD*) por induzir inflamação em órgãos metabólicos, como depósitos adiposos e o fígado, disfunção vascular, além de favorecer o desenvolvimento de hiperinsulinemia, hiperglicemia e resistência à insulina (Sampey *et al.*, 2011) (Lang *et al.*, 2019). Ademais, o consumo da dieta de cafeteria se associa a alterações comportamentais, como o hábito de petiscar alimentos e como a redução do valor hedônico de outras recompensas alimentares (Lalanza and Snoeren, 2021). Kendig e outros demonstraram utilizando modelo de roedor que a dieta de cafeteria composta por itens sólidos levam a maiores alterações metabólicas nesses animais, quando comparado à sacarose líquida, amplamente utilizada para a indução da obesidade (Kendig *et al.*, 2022).

O elevado consumo de açúcares e gordura trans está relacionado ao aumento de oxidação de moléculas, incluindo o colesterol LDL (*low density lipoprotein* – lipoproteína de baixa

densidade). Estudos com camundongos verificaram que a fagocitose de cristais de colesterol por células, especialmente macrófagos, pode levar ao dano lisossomal, fenômeno que induz ativação do inflamassoma NLRP3 e consequente secreção da citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$  (Rajamaki et al., 2010). A ativação deste complexo multiproteico pode levar à piroptose, processo associado à perda da integridade de membrana plasmática e à liberação do conteúdo intracelular, incluindo alarminas e ATP (Wagner, 2014) (Rockenfeller et al., 2010) (di Virgilio et al., 2017), situação que exacerba ainda mais os processos inflamatórios sistêmicos (Yu et al., 2021).

A hiperglicemia, favorecida pelo consumo persistente de itens com alto índice glicêmico, associa-se à ativação do inflamassoma AIM2 (Piperi et al., 2012) (Kang et al., 2016), sensor citoplasmático que também favorece aumento dos níveis do mediador inflamatório IL-1 $\beta$  e da ocorrência de piroptose (Kumari et al., 2020). Ademais, estudos com modelos de roedores mostram que a hiperglicemia persistente modula a função imunológica intestinal e a microbiota (Mori et al., 2015), alterações que favorecem a diminuição da diversidade desses microorganismos e o aumento da permeabilidade intestinal. Esses fenômenos associam-se à elevação dos níveis de metabólitos tóxicos circulantes, como o lipopolissacarídeo (LPS), que leva à endotoxemia metabólica, que contribui para a ocorrência de respostas inflamatórias sistêmicas (Lancaster et al., 2018).

Outros componentes dietéticos que se apresentam em abundância na dieta de cafeteria são os ácidos graxos saturados, como os ácidos palmítico e esteárico. Investigações com modelos murinos revelam que elevadas concentrações dessas biomoléculas apresentam efeitos citotóxicos por induzir o estresse do retículo endoplasmático (Erby et al., 2009) e levar à ativação do inflamassoma NLRP3 (Wen et al., 2011), favorecendo um estado inflamatório.

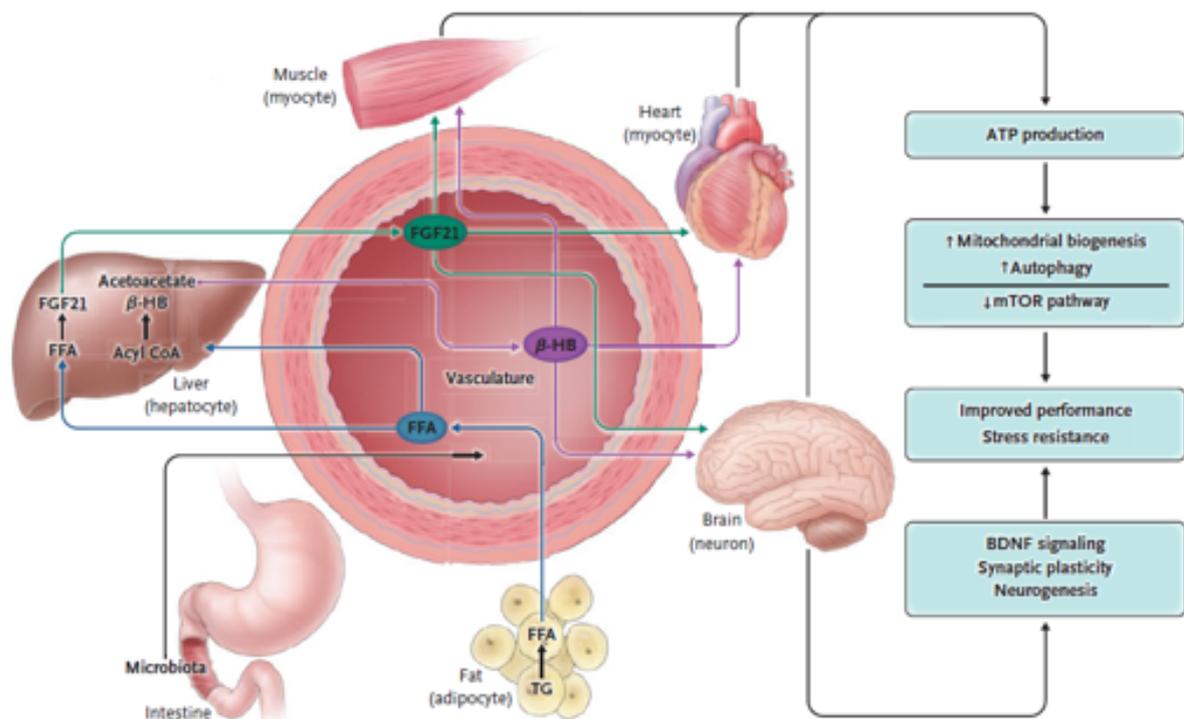
### 1.3 Jejum intermitente

Devido a todos os seus benefícios, atualmente a prática do jejum intermitente é utilizada na terapêutica do sobrepeso e da obesidade (Rynders et al., 2019). Em 1997, Weindruch e Sohal afirmaram que a diminuição do consumo de alimentos a longo prazo (restrição calórica) influencia a qualidade e a duração da vida do indivíduo (Weindruch & Sohal, 1997). Hoje sabe-se que a magnitude dos benefícios trazidos por padrões alimentares similares a esse, como o jejum intermitente, varia conforme o sexo, fatores genéticos e dieta do indivíduo (de Cabo & Mattson, 2019). Esses benefícios incluem regulação da pressão sanguínea (Anson et al., 2003), da glicemia e perda de gordura abdominal (Harvie et al., 2013).

As principais estratégias de jejum intermitente aplicadas para humanos são o jejum noturno estendido, o jejum em dias alternados, a dieta 5:2 (5 dias se alimentando normalmente e 2 dias com período de jejum), a dieta 4:3 (4 dias se alimentando normalmente e 3 dias com período de jejum) (Varady *et al.*, 2021). Já modelos de murinos de jejum intermitente incluem o jejum diário, em dias alternados, o jejum praticado de 24 a 72 horas e a dieta 5:2 (5 dias se alimentando normalmente e 2 dias com período de jejum) (Cignarella *et al.*, 2018) (Li *et al.*,

2017) (Li *et al.*, 2020) (Zhang *et al.*, 2021). Assim como em humanos, o jejum intermitente também melhora parâmetros metabólicos e inflamatórios de camundongos com obesidade (Li *et al.*, 2023). No entanto, sabe-se que o jejum intermitente também apresenta ações benéficas na saúde e sobrevivência de camundongos que não apresentam o estado obeso (Mitchell *et al.*, 2019).

Estudos informam que períodos prolongados de jejum associam-se à mobilização e catabolismo de triglicerídeos armazenados nos tecidos adiposos e a diminuição do consumo de glicose. O fígado converte os ácidos graxos desesterificados em corpos cetônicos (Patel *et al.*, 2019) (de Cabo & Mattson, 2019), moléculas que servem de fonte de energia em situações de privação alimentar (Anton *et al.*, 2018), especialmente para o cérebro, e que atuam como importantes sinalizadores, influenciando função celular e dos tecidos (Newman & Verdin, 2017). Os corpos cetônicos regulam a expressão e a atividade de várias moléculas associadas à manutenção da homeostase do organismo (figura 6). Luda e colaboradores informaram que a oxidação de corpos cetônicos se associa à função efetora de linfócitos T CD8+ por afetar a acetilação de histonas, mecanismos epigenéticos que podem conectar jejum intermitente com a modulação de crescimento de tumores (Luda *et al.*, 2023).



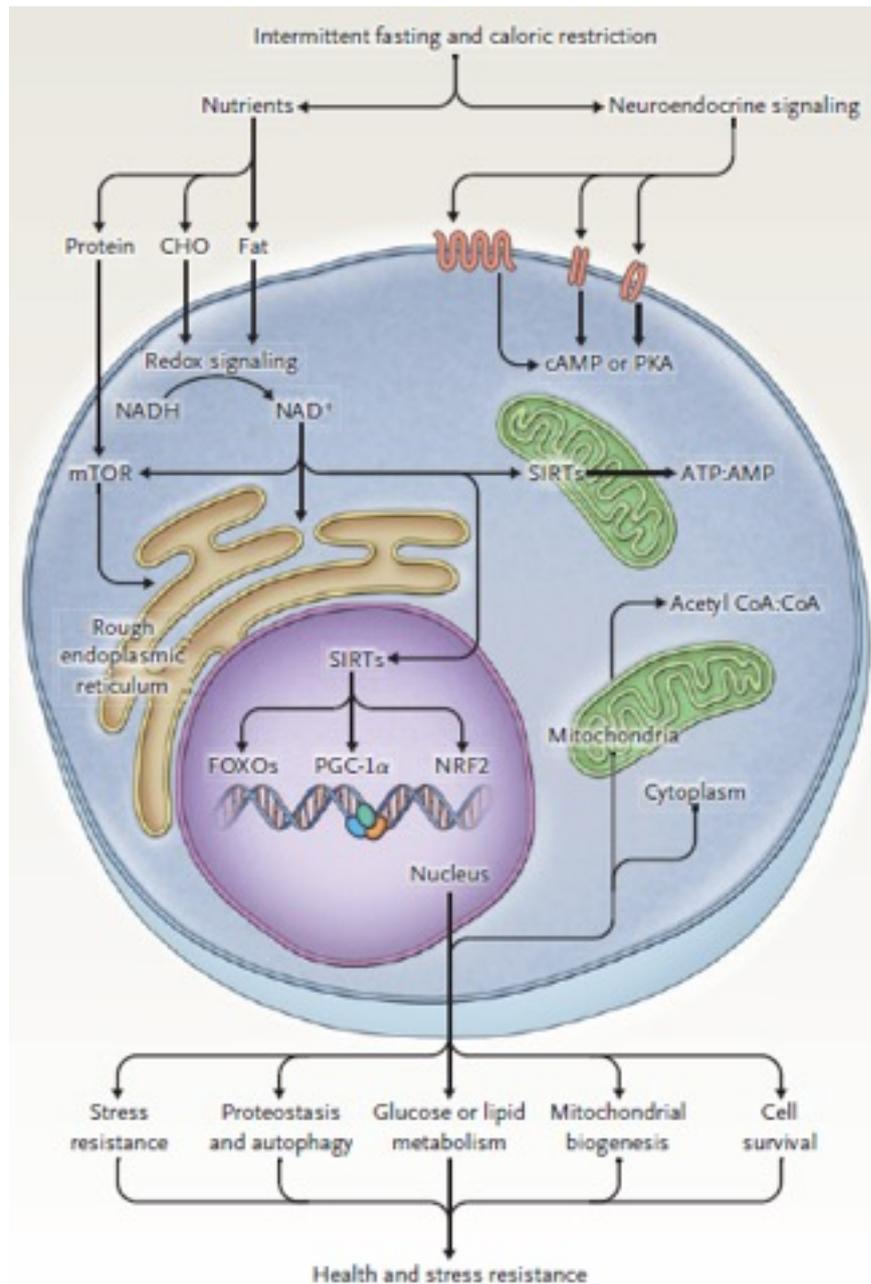
**Figura 6 – Efeitos do jejum intermitente sobre diversos órgãos e tecidos.**

Effects of Intermittent Fasting on Health, Aging, and Disease. Rafael de Cabo e Mark P. Mattson. 2019.

Os efeitos do jejum intermitente favorecem com que os organismos praticantes resistam melhor a estresses e restabeleçam mais prontamente a homeostase sistêmica (de Cabo & Mattson,

2019). Estudos sugerem que essa prática associa-se ao aumento da ativação de vias relacionadas ao reparo do DNA, a sistemas de qualidade de proteínas e organelas, à respostas antioxidantes e à diminuição de processos inflamatórios (Mindikoglu et al., 2020). Essas respostas adaptativas são fortemente conservadas (Mattison et al., 2017) e conferem ao organismo resistência aumentada a estresses proteotóxico, traumático, oxidativo, iônico e metabólico (Mattson & Arumugam, 2018) (de Cabo & Mattson, 2019).

Durante períodos prolongados de jejum, os níveis dos sensores bioenergéticos dinucleótido de nicotinamida e adenina em forma reduzida (NADH), adenosina trifosfato (ATP) e acetil coenzima A (acetil CoA) diminuem e a quantidade de NAD<sup>+</sup>, AMP, CoA aumentam. Esses equivalentes de energia atuam como modificadores epigenéticos e favorecem a ativação de proteínas associadas à resistência ao estresse, como FOXOs (*forkhead box Os*), PGC-1 $\alpha$  (*peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$* ), as desacetilases sirtuínas (SIRTs), o NRF2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) e a quinase AMPK (*AMP-activated protein kinase*). Essas alterações moleculares fazem com que o organismo induza sistemas de reparo e manutenção, reciclagem de moléculas, renovação mitocondrial e sobrevivência celular (de Cabo & Mattson, 2019) (figura 7).



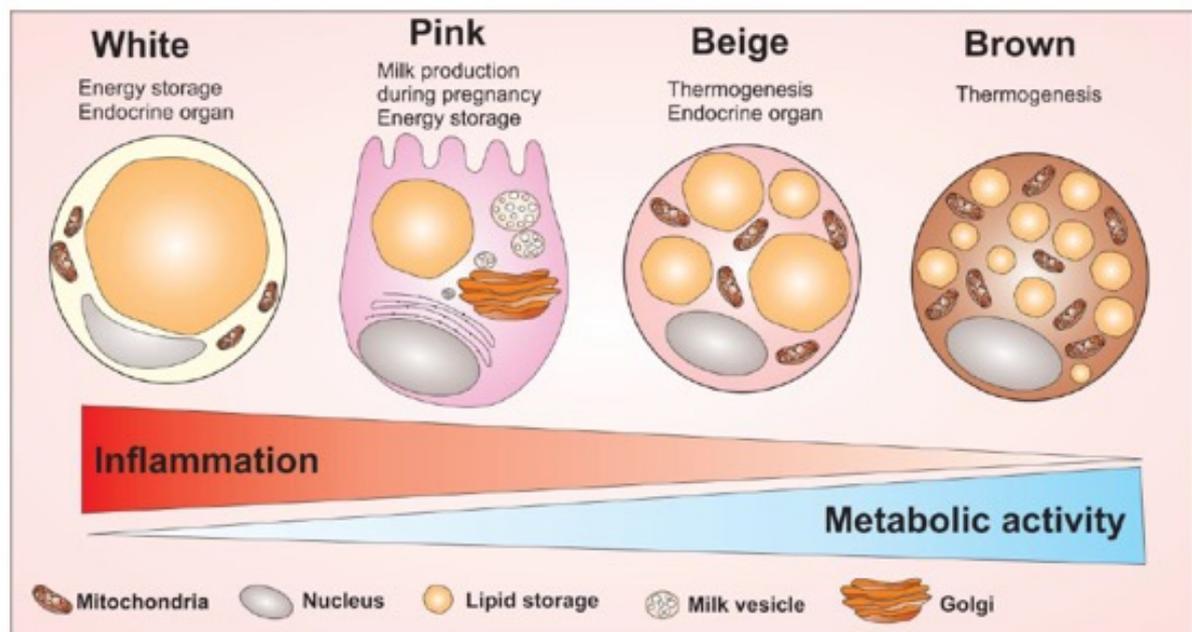
**Figura 7 – Efeito do jejum intermitente sobre a ativação de vias intracelulares que favorecem a sobrevivência, biogênese mitocondrial e resposta antioxidante.**

Effects of Intermittent Fasting on Health, Aging, and Disease. Rafael de Cabo e Mark P. Mattson. 2019.

#### 1.4 Dietas como moduladores dos fenótipos dos tecidos adiposos

Sabe-se que a dieta é uma importante moduladora das características do tecido adiposo, o qual é atualmente reconhecido como extremamente plástico. Originalmente classificado como um órgão que apenas armazena energia, o termo tecido adiposo hoje engloba tecidos complexos que regulam o metabolismo energético e respostas imunológicas sistêmicas (Chait & den Hartigh,

2020). O funcionamento adequado do tecido adiposo é crucial para a homeostase do organismo, pois este órgão não regula apenas a disponibilização de energia em situações de necessidade, mas também impacta na termorregulação do organismo e nos níveis de mediadores que regulam diversos processos biológicos, como o metabolismo de glicose e lipídeos e a secreção de insulina (Cinti, 2012). Esses tecidos são classificados pela sua morfologia, pela distribuição e pelas características das suas principais células, os adipócitos, em três tipos constitutivos: branco, marrom e bege (Chait & den Hartigh, 2020). Ademais, durante a gravidez, lactação e pós-lactação, adipócitos rosa também são detectados (Cinti, 2018) (figura 8).



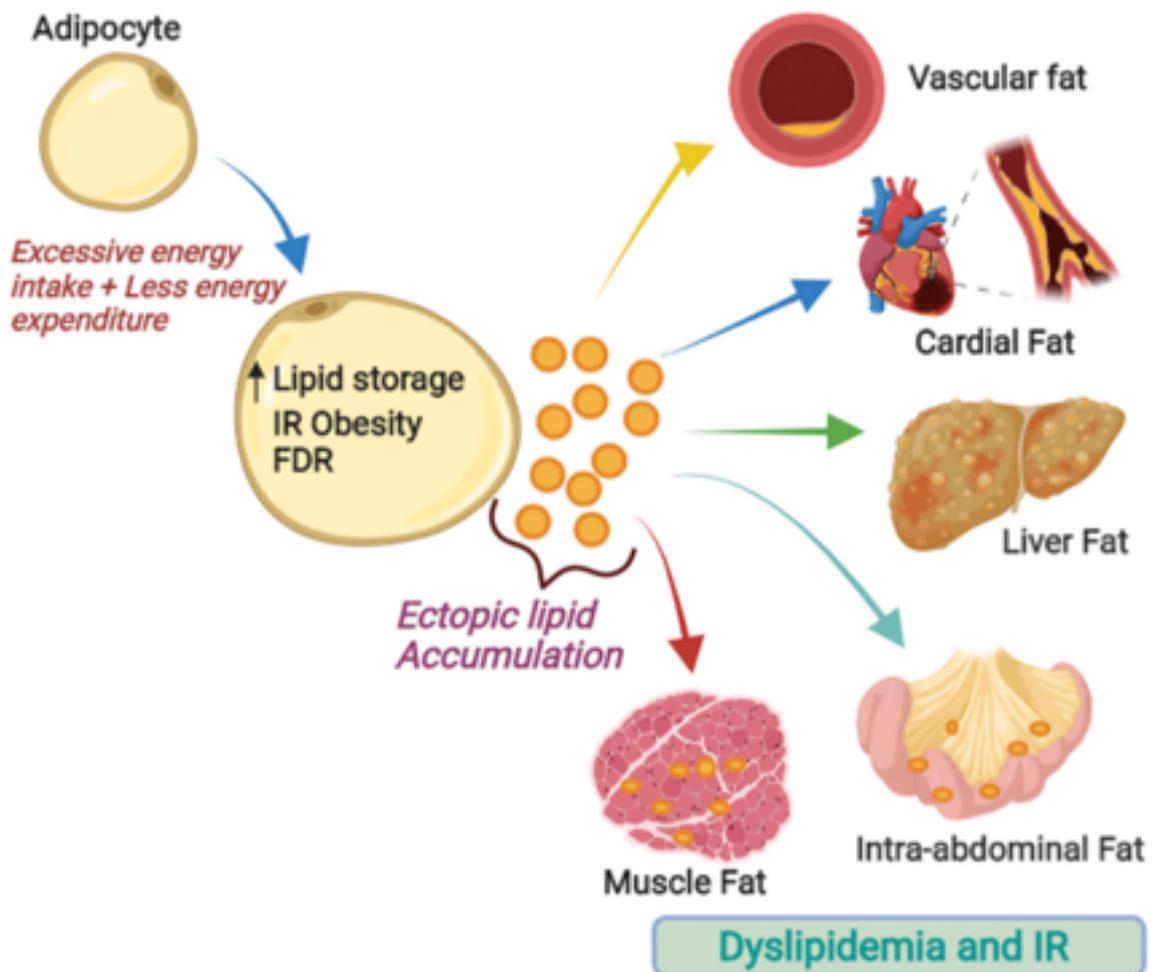
**Figura 8 – Tipos de adipócitos e suas características morfológicas e funcionais.**

The Impact of the Adipose Organ Plasticity on Inflammation and Cancer Progression. Luís Henrique Corrêa, Gabriella Simões Heyn e Kelly Grace Magalhães. 2019.

Os adipócitos brancos apresentam escassez de mitocôndrias no citoplasma, compartimento majoritariamente ocupado por um grande corpúsculo lipídico unilocular, levando a uma coloração mais clara. Após estímulos específicos, os adipócitos liberam moléculas lipídicas para o organismo como moeda de troca para a produção de adenosina tri-fosfato (ATP) (Stolarczyk, 2017). Os adipócitos marrons caracterizam-se por uma quantidade elevada de mitocôndrias, numerosos corpúsculos lipídicos e alta expressão da proteína desacopladora 1 (UCP1), molécula que dissocia a cadeia transportadora de elétrons da produção de ATP para a ocorrência de termogênese sem tiritação (Harms & Seale, 2013). Também associado a elevados níveis de UCP1, os adipócitos bege apresentam características celulares intermediárias entre esses dois (K. Ikeda et al., 2018). Os adipócitos podem ser encontrados em nichos discretos no organismo (Sanchez-Gurmaches & Guertin, 2014), mas normalmente são encontrados constituindo majoritariamente os tecidos

adiposos com outras células (fibroblastos, células endoteliais, células estromais, pré-adipócitos e células imunes).

Durante o sobrepeso e a obesidade induzidos por dieta, o maior depósito de tecido adiposo branco, que se encontra na região subcutânea (Tchkonina et al., 2013), sofre processos de hipertrofia e hiperplasia (M. Longo et al., 2019a), alterações que levam à deposição ectópica de gordura, como nos depósitos adiposos viscerais, fígado, pâncreas e coração (S. M. Kim et al., 2014) (Guillermier et al., 2017). Os efeitos tóxicos e pró-inflamatórios gerados por esses depósitos leva a desregulação no funcionamento destes órgãos, favorecendo a ocorrência de resistência à insulina, dislipidemia, disglucemia, doenças hepáticas gordurosas não-alcoólicas, respostas inflamatórias locais e sistêmicas e doenças do coração (Engin, 2017) (figura 9).



**Figura 9 – Disfunção de adipócitos e deposição ectópica de lipídeos.**

Role of Inflammatory Cytokines, Growth Factors and Adipokines in Adipogenesis and Insulin Resistance. Layla Al-Mansoori, Hend Al-Jaber, Mohammad Shoaib Prince e Mohamed A. Elrayess. 2022.

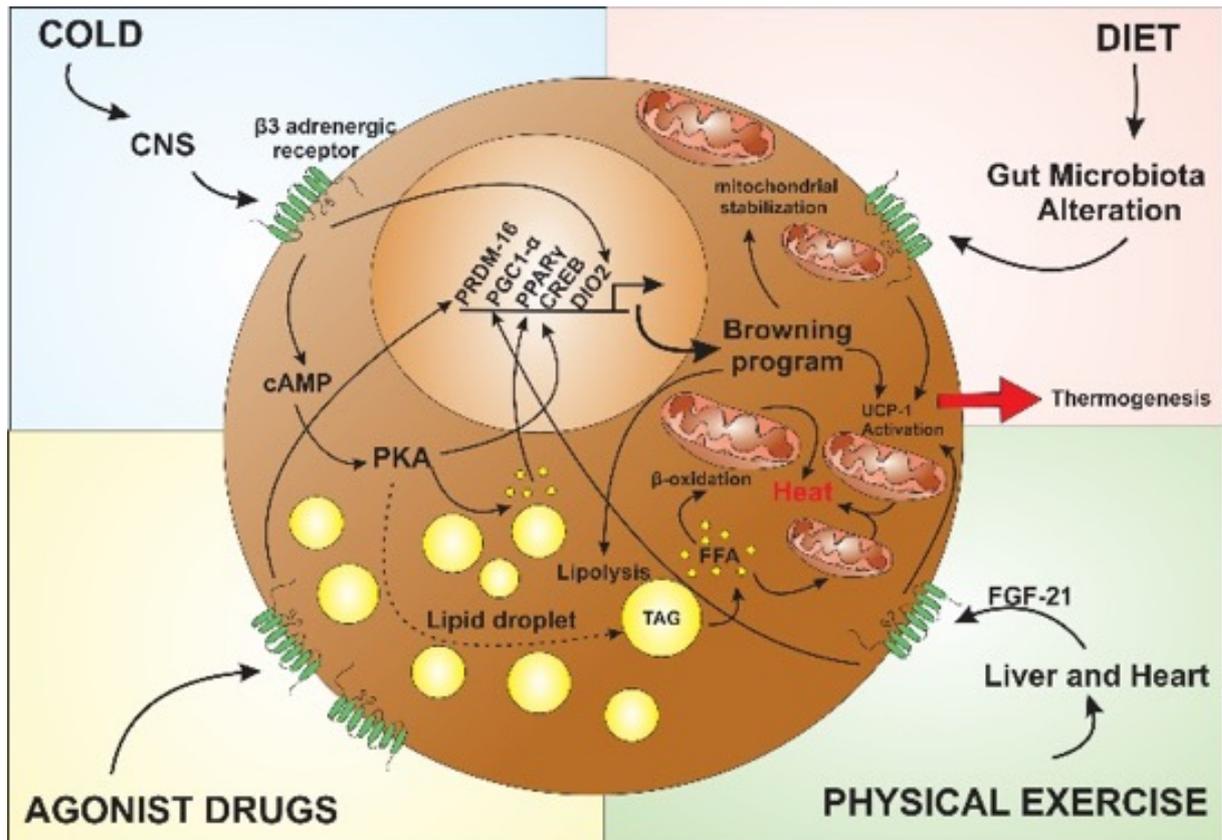
O tecido adiposo branco obeso tende a apresentar intensa infiltração de células imunológicas em polarização pró-inflamatória, morte de adipócitos e diminuição da

sensibilidade à insulina (Liu & Nikolajczyk, 2019). A ocorrência da inflamação tecidual, evidenciada pelo fato de que 59% das vias diferencialmente reguladas no tecido adiposo de animais obesos são associadas à inflamação (Xu et al., 2003), leva à disfunção do tecido, exacerbando o aumento do volume deste (Goossens & Blaak, 2015).

A deposição ectópica de lipídeos na região visceral associa-se a altos níveis de citocinas pró-inflamatórias circulantes, especialmente o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), e, conseqüentemente, à progressão da resistência à insulina tecidual e sistêmica (Cartier et al., 2010). Esse microambiente inflamatório favorece com que células com caráter anti-inflamatório, como células T regulatórias, células linfoides inatas 2 (ILC2), iNKT, linfócitos B regulatórios e células T  $\delta\gamma$ , diminuam em comparação às células com perfil inflamatório, intensificando ainda mais o processo inflamatório tecidual (Lynch et al., 2012)(Costanzo et al., 2015)(Molofsky et al., 2013) (Nishimura et al., 2013).

Além de apresentar inflamação em depósitos de tecido adiposo branco, o fenótipo obeso também correlaciona com inflamação e diminuição de função do tecido adiposo marrom (Peterson et al., 2017). Estudos associam processos inflamatórios nesse tecido, encontrado na região suprascapular de camundongos (Zhang et al., 2018), com diminuição da expressão de diversos marcadores de função, incluindo a UCP1 (Pan et al., 2021). Ensaaios com animais deficientes para UCP1 mostram que a ausência desta proteína leva à maior inflamação e resistência insulínica no tecido adiposo marrom, aumentando o processo inflamatório já existente (Bond et al., 2018). Portanto, o estado pró-inflamatório do tecido adiposo contribui para a diminuição das funções termorregulatórias e endócrinas deste (M. W. Lee et al., 2019) (Pan et al., 2021).

Já a prática do jejum intermitente apresenta efeitos positivos sobre o remodelamento do tecido adiposo que ocorre na disfunção metabólica induzida pela dieta. Estudos com modelos murinos de obesidade mostram que o emprego do jejum intermitente nos animais favorece aumento da tolerância à glicose, redução da hipertrofia de adipócitos e de marcadores de inflamação do tecido (B. Liu, Page, Hatzinikolas, et al., 2019a). Em camundongos, esse padrão alimentar associa-se à redução de massa do tecido adiposo branco, ao aumento da expressão de UCP1 e da capacidade termogênica desses tecidos de animais obesos (B. Liu, Page, Hutchison, et al., 2019)(Marinho et al., 2020), fenômenos associados ao amarronzamento do tecido adiposo branco (figura 10). Estudos informam que o processo de amarronzamento associa-se a um aumento do recrutamento de precursores de adipócitos bege, os quais são diferentes de pré-adipócitos brancos, para os depósitos de tecido adiposo branco, especialmente em depósitos subcutâneos (Shinoda et al., 2015) (Xue et al., 2015)(Zuriaga et al., 2017).



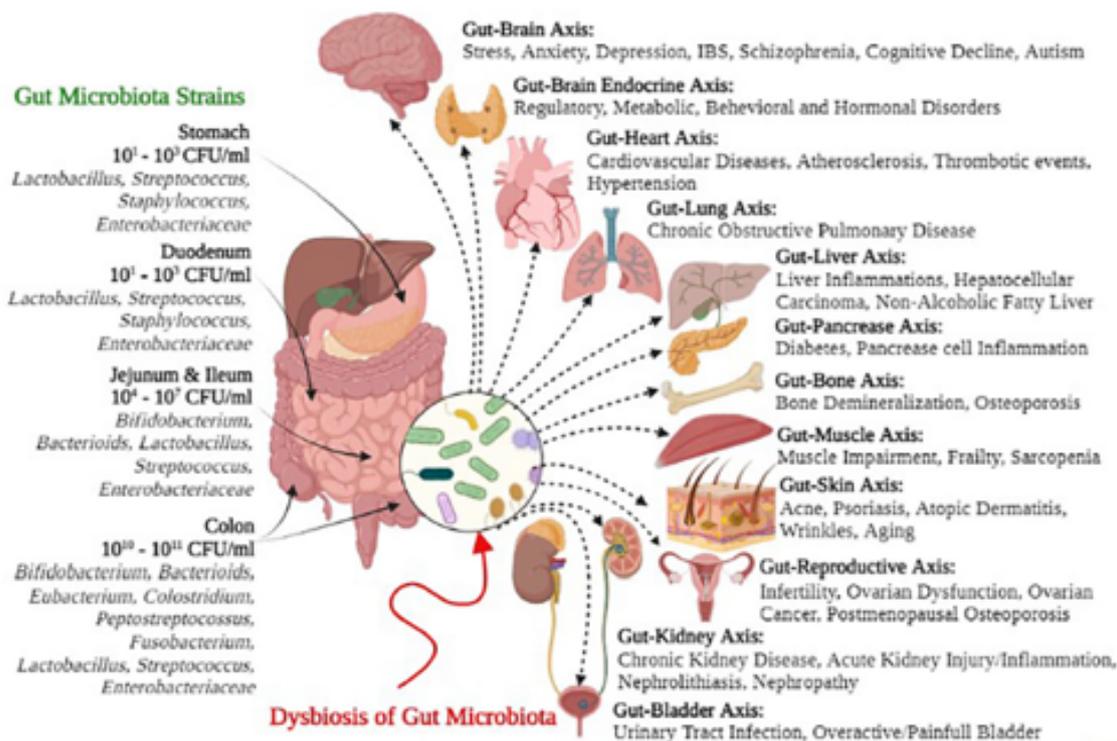
**Figura 10 – Mecanismos moleculares que se associam ao amarronzamento do tecido adiposo branco e estímulos que induzem esse processo.**

The Impact of the Adipose Organ Plasticity on Inflammation and Cancer Progression. Luís Henrique Corrêa, Gabriella Simões Heyn e Kelly Grace Magalhães. 2019.

## 1.5 Dietas como moduladores da composição e diversidade do microbioma intestinal

Desde meados do século XIX, sabe-se que os intestinos dos humanos são povoados por diversos microorganismos (Farré-Maduell and Casals-Pascual, 2019). Estudos futuros demonstraram que esses seres vivem não apenas na mucosa intestinal, mas também em diversos outros sítios, como a cavidade oral, os pulmões e a mama de humanos (Urbaniak *et al.*, 2016) (Li *et al.*, 2022)(Hilty *et al.*, 2010). Postulado em 1988 por Whipps e colaboradores, o termo microbioma se refere a comunidades microbianas e suas redes de atividades (Whipps *et al.*, 1988). Mais tarde, o ganhador do prêmio Nobel Joshua Lederberg sugeriu a utilização do termo para as comunidades de microorganismos presentes no organismo humano (Lederberg and McCray, 2001) (Hooper and Gordon, 2001), sendo amplamente empregado no estudo da relação entre esses microorganismos e o hospedeiro humano nos diversos sítios. Atualmente sabe-se que esses microbiomas desenvolveram uma relação de simbiose com os humanos e influenciam o funcionamento do organismo hospedeiro (Wiesmann *et al.*, 2022). Sendo o primeiro a ser descrito, o microbioma intestinal é o mais abundante, complexo e diverso taxonomicamente.

Esse ecossistema associa-se não apenas com a manutenção da saúde do hospedeiro, mas também com processos associados a diversas doenças, incluindo doenças cardiovasculares, síndrome metabólica e malignidades (Devoy, Flores Bueso and Tangney, 2022) (Witkowski, Weeks and Hazen, 2020)(Sun, Chen and Wu, 2023) (Zheng, Liwinski and Elinav, 2020) (Fan and Pedersen, 2021). Portanto, a microbiota intestinal possui papel central no funcionamento do organismo humano (figura 11).



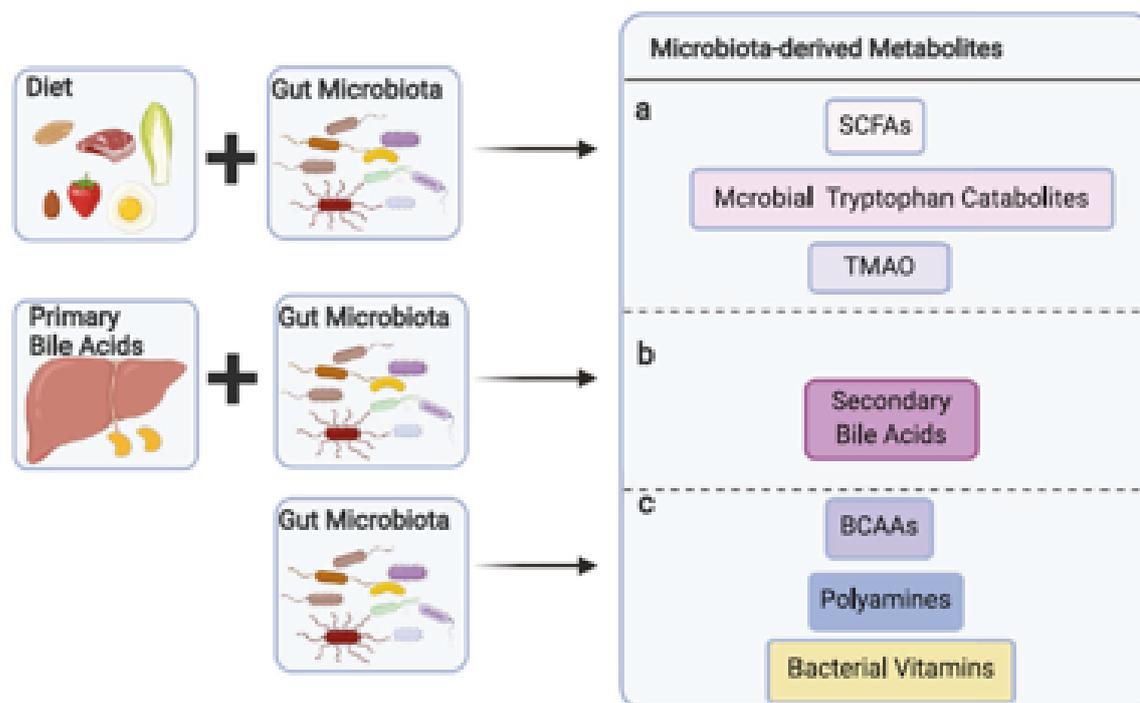
**Figura 11 – Distribuição da microbiota intestinal e seus papéis centrais no funcionamento de diversos órgãos.**

Human gut microbiota in health and disease: Unveiling the relationship. Muhammad Afzaal, Farhan Saeed, Yasir Abbas Shah, Muzzamal Hussain, Roshina Rabail, Claudia Terezia Socol, Abdo Hassoun, Mirian Pateiro, José M. Lorenzo, Alexandru Vasile Rusu e Rana Muhammad Aadil. 2022.

Essas comunidades microbianas podem ser compostas por bactérias, fungos, vírus, arquea e protozoário (Vemuri *et al.*, 2020) (Hou *et al.*, 2022) (Dubik, Pilecki and Moeller, 2022), sendo a maioria desses microorganismos pertencentes ao grupo das bactérias. Estudos indicam que o microbioma intestinal de indivíduos adultos contém em média  $10^{13}$  bactérias (Sender, Fuchs and Milo, 2016) pertencentes a grupos de 300 a 1000 espécies bacterianas, devido a variações entre indivíduos. Essa comunidade inclui mais de dois milhões de genes envolvidos em diversas funções, como síntese de vitaminas, digestão de carboidratos, metabolismo de drogas e modulação do sistema imunológico (Turnbaugh *et al.*, 2007) (Eisenstein, 2020) (Zoetendal, Rajilić-Stojanović and De Vos, 2008). Em um estudo envolvendo dados de genótipo e de

microbioma intestinal de mais de mil indivíduos, Rothschild e colaboradores demonstraram que o ambiente é dominante sobre a genética na modulação do microbioma intestinal em humanos (Rothschild *et al.*, 2018). Dentre os fatores ambientais, o padrão alimentar é o que mais influencia a microbiota intestinal, por ser um comportamento diário com efeitos diretos sobre a fisiologia e ecologia dos microorganismos e sobre o sistema imunológico e o estado metabólico do hospedeiro (Bourdeau-Julien *et al.*, 2023) (Zheng, Liwinski and Elinav, 2020) (Fan and Pedersen, 2021).

A íntima interação entre a dieta e a microbiota intestinal é favorecida pelo fato de que as bactérias que vivem na mucosa do intestino utilizam os nutrientes consumidos pelo hospedeiro para a produção de metabólitos, incluindo ácidos biliares secundários (Collins *et al.*, 2023), ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (Deleu *et al.*, 2021), poliaminas (Bui *et al.*, 2023), produtos de fermentação de proteínas, como os derivados de triptofano (Rodríguez-Romero *et al.*, 2022), e a precursora de trimetilamina N-óxido (TMAO) trimetilamina (TMA) (Rath *et al.*, 2017) (figura 12). Essas moléculas influenciam diretamente o sistema imunológico e o metabolismo e, modulam a fisiologia do organismo hospedeiro (Liu *et al.*, 2022) (Gasaly, de Vos and Hermoso, 2021). Componentes da parede celular das bactérias, como o LPS, presente em Gram-negativas (Guo *et al.*, 2013) (Gauthier, Rotjan and Kagan, 2022) (Anhê *et al.*, 2021) e glicoconjugados, oriundos de Gram-positivas, também afetam diferentemente o metabolismo e a imunidade do indivíduo (Jordan *et al.*, 2023) (Wheeler *et al.*, 2014) (Wheeler *et al.*, 2014). No entanto, a microbiota intestinal não apenas influencia imunidade e metabolismo do hospedeiro, mas também é moldada por estes (Ruff, Greiling and Kriegel, 2020) (Maslowski, 2019). Portanto, a interação entre microbiota intestinal, sistema imunológico e metabolismo correlaciona com saúde e doença do indivíduo.



**Figura 12 – Metabólitos da microbiota intestinal.**

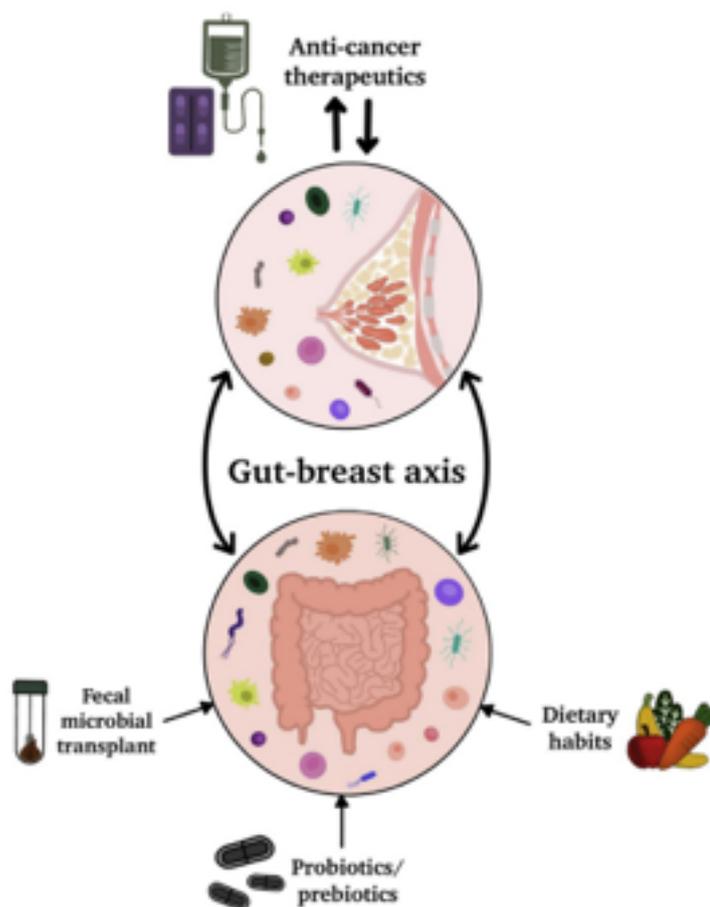
Gut microbiota-derived metabolites in the regulation of host immune responses and immune-related inflammatory diseases. Wenjing Yang e Yingzi Cong. 2021

Estudos anteriores demonstraram que o jejum intermitente e dietas obesogênicas apresentam efeitos distintos sobre a composição e diversidade do microbioma intestinal de humanos e roedores. A avaliação de indivíduos com obesidade indicam que o fenótipo obeso se associa a alterações no microbioma intestinal, comumente incluindo modulações na permeabilidade intestinal, nos níveis circulantes de endotoxinas e na sensibilidade à insulina (Crovesy, Masterson and Rosado, 2020) (Cornejo-Pareja *et al.*, 2019) (Fan and Pedersen, 2021) (Lee, Sears and Maruthur, 2020). Dietas obesogênicas também correlacionam com alterações na microbiota intestinal em roedores. Amplamente utilizada como uma dieta aplicada para indução de obesidade nesses animais, a dieta hiperlipídica (*high-fat diet* - HFD) associa-se a diversas alterações no microbioma intestinal, desde ao nível de filo até o nível de gêneros e espécies (Velázquez *et al.*, 2019) (Jiao *et al.*, 2018) (Shin, Whon and Bae, 2015) (Kim *et al.*, 2012). Diferentemente da HFD, a dieta de cafeteria mimetiza eficientemente as dietas ocidentais consumidas por humanos, as quais possuem papel direto nas taxas alarmantes de obesidade (Kopp, 2019).

Explorada no contexto da microbiota intestinal majoritariamente em ratos, a dieta de cafeteria também leva a alterações estruturais dessa comunidade microbiana, influenciando diretamente os estados metabólico e inflamatório desses animais (Zeeni *et al.*, 2015) (de la Garza *et al.*, 2023) (Kendig *et al.*, 2022) (Sampey *et al.*, 2011). Avaliando os efeitos da dieta de cafeteria em outro roedor, os camundongos, Hussain e colaboradores também detectaram alterações no microbioma intestinal (Hossain *et al.*, 2021). O jejum intermitente, considerado uma eficiente intervenção

contra a obesidade, também influencia a microbiota intestinal. Estudos avaliando indivíduos com síndrome metabólica que praticaram o jejum, apresentam alterações do microbioma intestinal que correlacionaram com melhora no perfil cardiometabólico desses dos pacientes (Maifeld *et al.*, 2021) (Forslund, 2023) (Guo *et al.*, 2021). Em modelos murinos, análises indicam que diferentes abordagens do jejum intermitente, incluindo o jejum diário, 2 dias em jejum e 5 em alimentação *ad libitum* e em dias alternados, também modulam o microbioma intestinal desses animais, se associando a efeitos positivos (Li *et al.*, 2020)(Zhang *et al.*, 2021) (Zhang *et al.*, 2020) (Cignarella *et al.*, 2018) (Li *et al.*, 2017). Portanto, esses estudos sugerem que a microbiota intestinal é um ator central na manutenção da saúde e promoção da doença no hospedeiro nos contextos da obesidade e do jejum intermitente.

Atualmente, sabe-se que bactérias intestinais influenciam a progressão de neoplasmas, incluindo de mama (figura 14). Esses microorganismos impactam o crescimento desses tumores por afetarem o metabolismo e o sistema imunológico, os estados inflamatórios local e sistêmico, a ativação de vias de proliferação, sobrevivência e morte celular, a instabilidade genômica por influenciarem o estado redox, o metabolismo de moléculas endógenas e exógenas, a produção de vitaminas e a ocorrência de alterações epigenéticas (Álvarez-Mercado *et al.*, 2023) (Devoy, Flores Bueso and Tangney, 2022). Ademais, autores demonstram que a microbiota intestinal influencia a eficácia de tratamentos antitumorais, como quimioterapia, imunoterapia e radioterapia (Bawaneh *et al.*, 2022) (Vernaci *et al.*, 2023) (Vitorino *et al.*, 2022) (Zhang, Liu and Xia, 2023) (Shiao *et al.*, 2021). Portanto, a microbiota intestinal possui papel central nos efeitos sistêmicos mediados por dietas e na progressão de câncer.



**Figura 13 – A relevância do eixo intestino mama no contexto de terapias antitumorais.**

Exploring the Potential of Breast Microbiota as Biomarker for Breast Cancer and Therapeutic Response. Sabine Dieleman, Romy Aarnoutse, Janine Ziemons, Loes Kooreman, Annemarie Boleij, e Marjolein Smidt. 2021.

## 2 Justificativa

O câncer de mama triplo-negativo é uma malignidade com impacto devastador em pacientes em todo globo. Apresenta pior prognóstico quando comparado com outros tipos de neoplasias mamárias por associar-se à maior proliferação, agressividade e invasividade. Ademais, devido à ausência de expressão de HER2 e dos receptores para estrógeno, progesterona, esses tumores são de difícil tratamento (Huang *et al.*, 2022). A progressão de tumores de mama triplo-negativos são influenciados pela plasticidade do tecido adiposo (Corrêa, Heyn and Magalhaes, 2019) (Oshi *et al.*, 2021). Os depósitos adiposos são atualmente considerados órgãos endócrinos, metabólicos e imunológicos que são extremamente plásticos, cujas funções e morfologia são influenciadas pela dieta (Musi and Guardado-Mendoza, 2014)(Sakers *et al.*, 2022).

A progressão de malignidades mamárias triplo-negativas também é modulada pela composição e diversidade do microbioma intestinal (Nandi, Parida and Sharma, 2023). A microbiota intestinal é extremamente fluida e possui papéis centrais sobre o metabolismo e o sistema imunológico do hospedeiro, apresentando ação endócrina via a produção de metabólicos e componentes de parede celular (Zheng, Liwinski and Elinav, 2020)(Ruff, Greiling and Kriegel, 2020)(Koh and Bäckhed, 2020) (Martin *et al.*, 2019). Essa comunidade microbiana também é modulada pela dieta adotada pelo indivíduo (Zhang, 2022).

Considerando o papel central da dieta sobre a manutenção da saúde e promoção de doenças, estudos explorando o papel das dietas jejum intermitente e dieta de cafeteria em contextos como a modulação da composição e diversidade do microbioma intestinal, a progressão do câncer de mama e modificações das funções de depósitos adiposos são necessários para se compreender como essas distintas dietas influenciam o funcionamento do organismo. Ademais, há escassez de informações sobre como depósitos adiposos influenciados pelo jejum intermitente e pela dieta de cafeteria afetam o câncer de mama, temática cuja exploração tende a contribuir no entendimento de como as dietas afetam a progressão de neoplasias mamárias.

### **3 Objetivos**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar a influência do jejum intermitente e da dieta de cafeteria na progressão do câncer de mama triplo-negativo e caracterizar a modulação dos tecidos adiposos e da microbiota intestinal nesse contexto.

#### **3.2 Objetivos específicos**

**3.2.1)** Avaliar a influência do jejum intermitente e da dieta de cafeteria no estabelecimento e desenvolvimento do câncer de mama, analisando:

- Parâmetros metabólicos;
- Parâmetros do tumor primário;
- Ocorrência de metástase hepática;
- Parâmetros inflamatórios

**3.2.2)** Investigar o efeito do jejum intermitente e da dieta de cafeteria sobre a capacidade de modulação dos parâmetros carcinogênicos de células de câncer de mama 4T1 por tecidos adiposos, verificando:

- A proliferação das células 4T1;
- O perfil de morte das células 4T1;
- A biogênese de corpúsculo lipídico pelas células 4T1;
- A secreção de citocinas pelas células 4T1

**3.2.3)** Analisar o impacto do jejum intermitente, da dieta de cafeteria e do câncer de mama triplo-negativo sobre a microbiota intestinal, investigando:

- A diversidade do microbioma intestinal;
- A composição do microbioma intestinal;
- Vias metabólicas associadas aos táxons detectados

## 4 Metodologia

### 4.1 Linhagem de células neoplásicas

Células de câncer de mama triplo-negativo murino 4T1 (número da ATCC: CRL-2539) foram cultivadas em meio RPMI (GIBCO) suplementado com 5 % de Soro Fetal Bovino (GIBCO) e 1 % Penicilina/Estreptomicina (GIBCO) e mantidas em estufa úmida a 37 °C e 5 % de CO<sub>2</sub>.

### 4.2 Acondicionamento e manejo dos animais

Camundongos fêmeas BALB/c selvagens, fornecidos pelo biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, foram mantidos a 23 ± 1 ° C em ciclo de luz/escuro de 12 horas, com livre acesso à comida, salvo os grupos experimentais submetidos ao jejum, em seus respectivos dias de administração. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (SEI n. 23106.033635/2021-43).

### 4.3 Experimentação *in vivo*

#### 4.3.1 Delineamento experimental

Camundongos BALB/c fêmeas selvagens de 24 semanas foram segregados em três maiores grupos de acordo com a dieta ao qual foram submetidos durante o experimento: animais alimentados com ração AIN-93 *ad libitum* diariamente (“*Standard diet*” – SD), animais alimentados com ração AIN-93 *ad libitum* por 24 horas e mantidos em jejum nas 24 horas seguintes (“*Intermittent Fasting*” – IF), e animais alimentados dieta de cafeteria (“*Cafeteria diet*” – CAF) (N=16). Após 24 dias, metade dos animais de cada grande grupo (SD, IF e CAF) foi submetida à anestesia geral (quetamina e xilasina) e exposta à 10<sup>5</sup> células 4T1 via injeção na quinta mama direita (animais agrupados como CA+) conforme padronizado por Sousa e outros (Cesar Romero et al., 2019). A outra metade dos camundongos não recebeu células 4T1, sendo esses animais enquadrados em condições sem câncer (CA-). Após 28 dias de progressão tumoral, os animais foram eutanasiados para coleta de amostras para posteriores análises. Todos os grupos experimentais continham oito camundongos (N=8) cada.

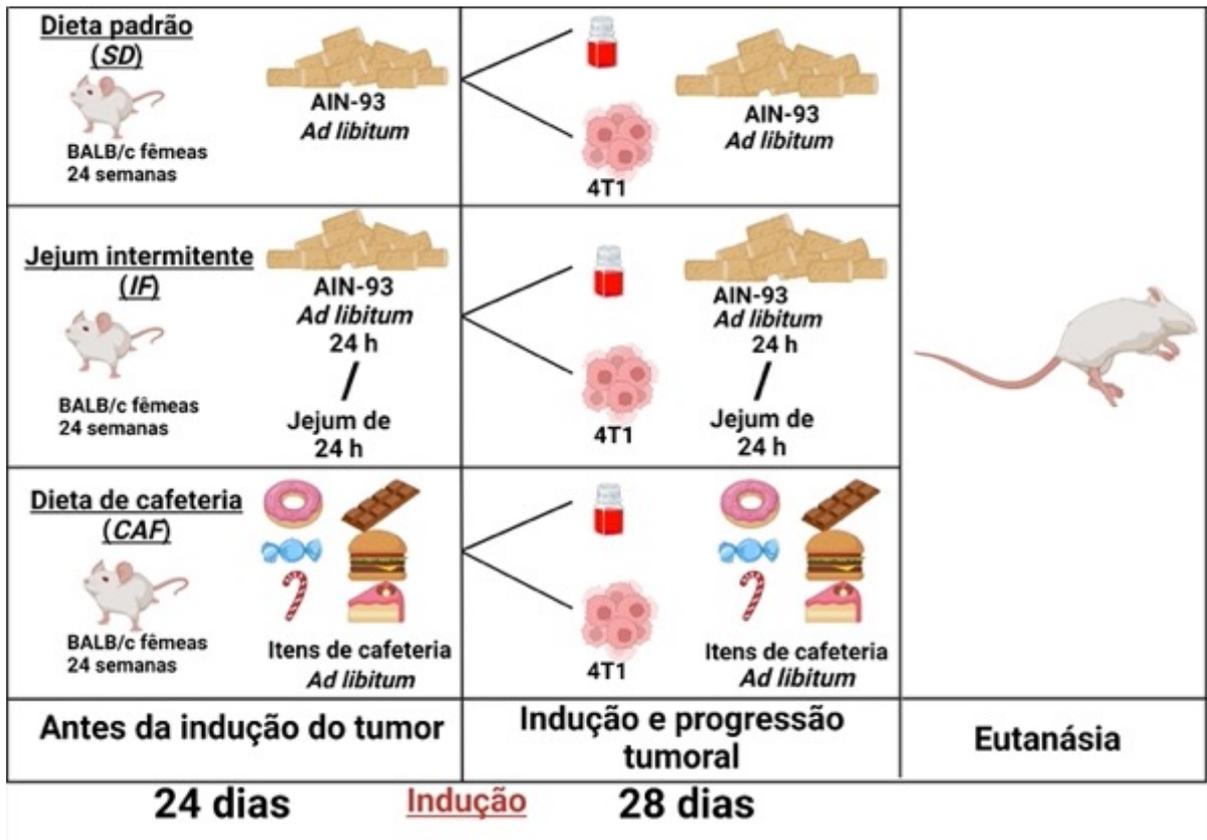


Figura 14 – Desenho experimental do experimento *in vivo*.

Confeccionado utilizando BioRender pelo autor.

Tabela 1 – Composição da Ração AIN-93 empregada

Ingredientes	g/kg de ração
Hidroquinona	0,014
Bitartarato de colina	2,5
L-cistina	3,0
Mistura vitamínica	10,0
Mistura Mineral	35,0
Celulose	50,0

Ingredientes	g/kg de ração
Óleo de soja	70,0
Sacarose	100,0
Amido de milho dextrinizado	132,0
Caseína	200,0
Amido de milho	397,486
Água	275

Item	Farinha de trigo (fina)	Margarina	Salsicha (Copacol)	Mortadela (Perdigão)	Salgadinho (Micio)
Porção	Meia xícara de chá (50 g)	1 colher de sopa (10 g)	1 unidade (50 g)	3 fatias e meia (40 g)	2 xícaras e meia de chá (25 g)
Valor energético por porção	172 kcal	54 kcal	105 kcal	113 kcal	116 kcal
Carboidratos	37 g	0	2,1 g	2,4 g	13 g
Proteínas	4,8 g	0	6,2 g	4,8 g	1,5 g
Gorduras totais	0,8 g	6 g	7,9 g	9,4 g	5,6 g
Gorduras saturadas	0,7 g	1,8 g	3,1 g	3,2 g	1,6 g
Gordura trans	0	0	0	0	0
Fibras alimentares	1,3 g	0	0	0	0
Sódio	0	59 mg	385 mg	540 mg	186 mg
Ferro	2,1 mg	0	0	0	0
Ácido fólico	75 mcg	0	0	0	0
Vitamina A	90 mcg	0	0	0	0
Vitamina B1	0,18 mg	0	0	0	0
Vitamina B2	0,2 mg	0	0	0	0
Vitamina B3	0	0	0	0	0
Vitamina B6	0,2 mg	0	0	0	0
Vitamina PP	2,4 mg	0	0	0	0
Zinco	1,05 mg	0	0	0	0

Figura 15 – Informações nutricionais dos itens de cafeteria utilizados

Item	Biscoito de chocolate (Plugados)	Biscoito de morango (Plugados)	Wafer de chocolate branco (Atrevidos)	Wafer de morango (Itamaraty)
Porção	Três unidades (30 g)	Três unidades (30 g)	Três unidades (30 g)	Três unidades (30 g)
Valor energético por porção	141 kcal	138 kcal	143 kcal	148 kcal
Carboidratos	20 g	20 g	22 g	21 g
Proteínas	1,9 g	1,8 g	1,4 g	1,2 g
Gorduras totais	5,9 g	5,6 g	5,6 g	6,39 g
Gorduras saturadas	2,9 g	2,8 g	1,9 g	1,8 g
Gordura trans	0	0	0	0
Fibras alimentares	0	0	0,6 g	0
Sódio	63 mg	58 mg	38 mg	30 mg
Ferro	2,5 mg	2,5 mg	0,7 mg	0,7 mg
Ácido fólico	0	0	Não descrito	0
Vitamina A	0	0	0	0
Vitamina B1	0,22 mg	0,22 mg	0	0
Vitamina B2	0,28 mg	0,28 mg	0	0
Vitamina B3	3,6 mg	3,6 mg	0	0
Vitamina B6	0,29 mg	0,29 mg	0	0
Vitamina PP	0	0	0	0
Zinco	1,5 mg	1,5 mg	0	0

Figura 16 – Informações nutricionais dos itens de cafeteria utilizados

**Tabela 2 – Receita do Bolinho de Salsicha**

Salsicha	52,2 g
Farinha de trigo	40,93 g
Margarina	10 g
Água quente	7 mL
Massa total	103,13 g

**Tabela 3 – Receita do Bolinho de Mortadela**

Mortadela	55,6 g
Farinha de trigo	47,85 g
Margarina	10,35 g
Água quente	7 mL
Massa total	113,8 g

#### 4.3.2 Pesagem dos animais

Visando avaliar o impacto das diferentes condições experimentais sobre o peso dos camundongos, todos os animais foram pesados em dias alternados utilizando balança comum.

#### 4.3.3 Aferição de massa dos tecidos e do tumor

Visando analisar o impacto das diferentes condições experimentais sobre a massa dos tecidos e do tumor, estes e aqueles tiveram suas massas aferidas por meio da utilização de balança de alta precisão (Ahimadzu do Brasil Comércio LTDA), logo após coleta. Os valores de massa foram registrados até a quarta casa decimal para posterior confecção dos gráficos.

#### 4.3.4 Análise hematológica

Buscando-se investigar se há alterações hematológicas relacionadas às condições experimentais avaliadas, a contagem total e diferencial de leucócitos e plaquetas foi conduzida conforme Longo e colaboradores (J. P. F. Longo et al., 2016). Amostras de sangue total dos camundongos foram obtidas por meio do canal ocular após devida anestesia dos animais. As amostras foram acondicionadas em microtubos com EDTA 10% (m/v) e os exames foram realizadas no Analisador Automático de Hematologia Sysmex pocH-100i™ (Curitiba/ Paraná, Brasil) calibrado para camundongos.

#### 4.3.5 Análise bioquímica

Para avaliar as funções hepática e o perfil lipídico dos camundongos nas diferentes condições experimentais, amostras de sangue foram coletadas via canal ocular e acondicionadas em tubo com gel separador para a obtenção do soro. A avaliação foi realizada em um analisador bioquímico automático Chemwell-t (Labtest, Brasil), conforme orientações do fabricante. Foram realizados os seguintes exames: Aspartato aminotransferase (AST) para avaliação da função hepática, creatinina K e ureia para investigação renal e colesterol total e triglicérides para análise do perfil lipídico.

#### 4.3.6 Análises histopatológicas

Buscando-se analisar o impacto das diferentes condições experimentais sobre características histológicas dos diferentes tecidos saudáveis e tumorais, estes foram fixados em formalina 3,7% (v/v) logo após coleta e incubados em parafina em solidificação. Após completa solidificação, as peças foram cortadas, transferidas para lâminas e coloridas com Hematoxilina-eosina (HE) ou com anticorpo específico para a proteína Ki-67 (Roche). As lâminas foram escaneadas utilizando o equipamento Aperio (Leica BIOSYSTEMS) e as figuras dos tecidos foram geradas utilizando o programa Aperio *ImageScope* empregando o aumento de 10 e 20 vezes.

#### 4.3.7 Análise do perfil de citocinas dos tecidos adiposos

A fim de se verificar se as diferentes condições experimentais influenciaram o perfil de citocinas secretadas pelo tecido adiposo marrom, foram extraídas proteínas totais desse tecido utilizando tampão de lise contendo inibidor de protease e macerador de vidro. Buscando se garantir a integridade das proteínas contidas no lisado, este foi mantido em gelo e intensamente homogeneizado para total lise das células. Ao fim do processo de extração de proteínas totais, as amostras foram submetidas à centrifugação à 14000 rpm por 10 minutos em um processo de clarificação. O sobrenadante resultante da centrifugação foi coletado e distribuído em dois tubos de microcentrífuga por condição experimental para estocagem de curto prazo em freezer -20 °C. O lisado do tecido adiposo marrom foi então utilizado para dosagens de IL-6, IL-10, IL-12, TGF- $\beta$  e TNF- $\alpha$  utilizando-se kits comerciais (R&D). As instruções do fabricante foram seguidas e os níveis de citocinas foram apresentados em níveis absolutos (pg/mL).

## 4.4 Experimentação *ex vivo*

### 4.4.1 Delineamento experimental

Camundongos BALB/c fêmeas selvagens de 24 semanas foram segregados em três grupos de acordo com a dieta ao qual foram submetidos durante o experimento: animais alimentados com ração AIN-93 *ad libitum* diariamente (“*Standard diet*” – SD), animais alimentados com ração AIN-93 *ad libitum* por 24 horas e mantidos em jejum nas 24 horas seguintes (“*Intermittent Fasting*” – IF), e animais em dieta de cafeteria (“*Cafeteria diet*” – CAF). Os camundongos foram expostos a essas dietas por 24 dias, após os quais foram eutanasiados para obtenção de tecidos.

### 4.4.2 Obtenção dos produtos de secreção para estímulo e tempo de tratamento das células

Como primeiro passo para se investigar os efeitos de moléculas secretadas por diferentes depósitos de tecido adiposo provenientes de animais submetidos à dieta padrão, ao jejum intermitente e à dieta de cafeteria sobre células 4T1, os tecidos adiposos brancos inguinal (*Inguinal white adipose tissue* - IgWAT), subcutâneo (*subcutaneous white adipose tissue* – scWAT) e gonadal (*gonadal white adipose tissue* – gWAT) e o tecido adiposo marrom (*brown adipose tissue* – BAT) foram cirurgicamente retirados em condições estéreis. Em seguida, os tecidos foram mecanicamente dissociados dentro de tubos de microcentrífuga estéreis contendo meio RPMI base (Albumina bovina sérica (1% (m/v)), anfotericina (0,25 µg/mL), cloranfenicol (2 µg/mL), gentamicina (40 µg/mL), penicilina/streptomicina (1% (v/v) e soro fetal bovino (10 % (v/v)) seguindo a proporção de 1 mL de meio para cada 0,05 g de tecido pesado em balança de alta precisão.

Os tecidos dissociados em meio RPMI base foram então transferidos para garrafas de cultura celular médias e grandes e incubados por 24 h em estufa à 37 °C contendo 5% CO<sub>2</sub>. A seguir, os sobrenadantes de interação foram coletados em ambiente estéril e acondicionados em freezer -80 °C. Os sobrenadantes de interação foram utilizados diluídos em 50 % para estimular células 4T1 por 24 h. Após tempo de estímulo, as células foram analisadas quanto à viabilidade mitocondrial, perfil de morte celular, detecção de Bax, proliferação celular, biogênese de corpúsculo lipídico e secreção de citocinas. Os termos “moléculas secretadas por tecido adiposo”, “produtos de secreção de tecido adiposo” e “produtos secretados por tecido adiposo” foram empregados como sinônimos para se referir ao material obtido após dissociação do tecido adiposo em meio suplementado com BSA, antibióticos e antifúngico (meio RPMI base).

### 4.4.3 Proliferação celular

Tendo-se como objetivo analisar o efeito dos produtos de secreção dos tecidos adiposos sobre a proliferação de células 4T1, foi realizado um ensaio utilizando o CFSE. Esse composto fluorescente e permeável à membrana caracteriza-se por interagir com 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.  $10^5$  células foram introduzidas em placas de 24 poços, após completa adesão foram lavadas uma vez com PBS 1 X e expostas à  $5 \mu\text{M}$  de CFSE (eBioscience) diluído em PBS 1 X por 15 minutos à temperatura ambiente. Após incubação com o agente fluorescente, as células foram expostas a Soro Fetal Bovino à  $4^\circ\text{C}$  a fim de se eliminar o CFSE extracelular, lavadas uma vez com PBS 1X e estimuladas por 24 horas. As células foram então coletadas, lavadas uma vez com PBS 1 X em centrifugação à 1800 rpm e fixadas em  $400 \mu\text{L}$  de paraformaldeído 1 X. As células foram analisadas em citômetro de fluxo (FACS VERSE, BD Biosciences) em canal FL-1 em escala exponencial e os dados foram analisados utilizando o software *FlowJo V10* (Tree Star Inc).

#### 4.4.4 Perfil de morte celular

A análise do perfil de morte celular das células 4T1 estimuladas com os produtos de secreção dos tecidos adiposos foi realizada por citometria de fluxo utilizando os agentes fluorescentes Anexina V-FITC e Iodeto de propídeo e baseou-se nos fatos de que Anexina V interage com o fosfolípídeo fosfatidilserina, o qual é exposto na face externa da membrana de células apoptóticas, e que Iodeto de propídeo, impermeável à membrana celular, fluoresce após interação com ácidos nucleicos, indicando perda de integridade de membrana plasmática e ocorrência de morte lítica.  $10^5$  células foram semeadas em placas de 24 poços e, após adesão, foram estimuladas por 24 h. Após tratamento, as células foram coletadas e lavadas duas vezes com PBS 1X em centrifugação à 1800 rpm. As células foram então ressuspensas em  $100 \mu\text{L}$  de tampão de ligação 1 X ( $10 \text{ mM}$  de HEPES/NaOH pH 7,4  $140 \text{ mM}$  de NaCl e  $2,5 \text{ mM}$  de  $\text{CaCl}_2$ ),  $2 \mu\text{L}$  de Anexina V-FITC (quatroG) e  $2 \mu\text{L}$  de iodeto de propídeo (quatroG) e incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente ao abrigo de luz. Após essa etapa, as células foram lavadas uma vez com PBS 1 X, ressuspensas em  $400 \mu\text{L}$  de tampão de ligação 1 X e imediatamente analisadas em 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* (Tree Star Inc). Como controle experimental foram usadas células aquecidas à  $100^\circ\text{C}$  por 10 minutos.

#### 4.4.5 Biogênese de Corpúsculo lipídico

A fim de se analisar se o tratamento com os sobrenadantes de interação dos tecidos adiposos afeta a biogênese de corpúsculo lipídico em células de 4T1, utilizou-se a sonda fluorescente lipofílica BODIPY 493/503 (Life technologies), a qual interage com lipídeos neutros, abundantes no interior de corpúsculo lipídico.  $10^5$  células foram semeadas em placas de 24 poços e estimuladas por 24 horas. Após tempo de estímulo, as células foram coletadas, lavadas duas vezes com PBS 1X e incubadas em solução de Bodipy/PBS na proporção de 1/5000 a  $4^\circ\text{C}$  ao abrigo de luz. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1 X e ressuspensas

para fixação em 400  $\mu$ L 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 utilizando o software *FlowJo V10* (Tree Star Inc).

#### 4.4.6 Análise de secreção de citocinas

A fim de se verificar se o estímulo de 4T1 com os produtos secretados pelos tecidos adiposos alterava o perfil de citocinas secretadas por essas células neoplásicas, foram realizadas dosagens de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12, TGF- $\beta$  e TNF- $\alpha$  a partir dos sobrenadantes resultantes de cultura pelo método de ELISA, utilizando-se kits comerciais (R&D). As instruções do fabricante foram seguidas e os níveis de citocinas foram apresentados em níveis absolutos (pg/mL). Os produtos de secreção dos tecidos adiposos (“*Sup.*”) também foram quantificados e usados como parâmetros para se determinar os níveis de citocinas liberadas pelos depósitos de tecido adiposo e concluir os mediadores secretados exclusivamente pelas células 4T1.

#### 4.4.7 Análise estatística e confecção de gráficos

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.

Os gráficos foram confeccionados utilizando *GraphPad Prism* 8.0. Dados paramétricos foram apresentados em gráficos de coluna enquanto dados não-paramétricos foram mostrados em *box plot*.

### 4.5 Análises da microbiota intestinal

#### 4.5.1 Coleta, acondicionamento e envio das amostras de fezes

A fim de se avaliar a composição e a diversidade do microbioma intestinal dos camundongos submetidos às diferentes dietas, afetados ou não pelo câncer de mama triplo-negativo, analisamos amostras de fezes desses animais que foram coletadas antes do início do experimento (tempo inicial – 0T) e antes da eutanásia do camundongos (tempo final – FT). A coleta das amostras fecais ocorreu no período da manhã do respectivo tempo de coleta utilizando pinça higienizada com hipoclorito de sódio (10% v/v). Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em freezer -80 °C até o momento de envio destas para os Estados Unidos, país onde foram realizados os experimentos de análise de microbioma intestinal. As amostras foram enviadas ao décimo andar do *Brigham and Women’s Hospital (Weiner Lab)*, localizado em Boston (Massachusetts, Estados Unidos) por meio da empresa *World Courier*. Durante o

transporte, as amostras foram mantidas em um isopor repleto de gelo seco com monitoramento de temperatura com um termômetro cedido pela empresa.

#### 4.5.2 Montagem do arquivo da biblioteca CL-03, extração e quantificação de DNA total

Antes do início dos experimentos, os dados das amostras foram organizados em um arquivo de mapeamento em formato Excel e a biblioteca foi nomeada CL-03. Descongelamos dois *pellets* de fezes por amostra (aproximadamente 20 mg de material) para realizar a extração de DNA total. A extração de DNA total foi conduzida em uma bancada previamente higienizada com hipoclorito de sódio (10 % v/v) e utilizando o kit *Dneasy PowerLyzer PowerSoil* (QIAGEN), seguindo as recomendações do fabricante. Após a extração de DNA total, as amostras foram avaliadas quanto a concentração do DNA total e a qualidade do material utilizando nanodrop (analisando as razões 260/280 nm e 260/230 nm) e foram transferidas para tubos de PCR para acondicionamento em freezer -20 °C até a próxima etapa.

#### 4.5.3 Amplificação do gene do RNA ribossomal 16S

A fim de se amplificar o gene do RNA ribossomal (RNAr) 16S das amostras de DNA total obtidas das fezes, conduzimos a reação da cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – *PCR*) com as amostras. Para realizar esse ensaio, utilizamos um fluxo laminar limpo com solução de hipoclorito de sódio (10% v/v) e esterilizado com luz ultravioleta e usamos ponteiras com filtro visando evitar a contaminação do material a ser amplificado. A reação foi montada utilizando, em volumes referentes a cada poço, 24 µL de água Milli-Q, 20 µL de *master mix* (5 *Prime Hot MM*), 2 µL de *primer* reverso (926R, 5 µM), 2 µL do *barcode* (515F-indexed, 5 µM) e 2 µL do DNA fecal extraído. Os 50 µL de reação foram divididos em duas placas de PCR de 96 poços (25 µL por poço em cada placa). Após a montagem das reações, as placas foram transferidas para um termociclador (BioRad) para indução da reação de amplificação seguindo o seguinte protocolo: 98 °C por 10 segundos, 50 °C por 5 segundos, 68 °C por 5 segundos, repetição dos passos por 34 vezes, 68 °C por 5 segundos e 4 °C por 4 horas. Após a retirada das placas dos termocicladores, estas foram mantidas no freezer -20 °C até a próxima etapa.

#### 4.5.4 Quantificação dos produtos de PCR

Visando quantificar os amplicons gerados, foi utilizado o reagente de quantificação *PicoGreen*. A solução de *PicoGreen* foi confeccionada utilizando 19 mL de água de irrigação, 1 mL de tampão TE 20X (diluição 1:20) e 100 µL do corante picogreen (1:200) e mantida em abrigo de luz até ser utilizada. Nós transferimos 2 µL de DNA e 198 µL da solução de *picogreen* a uma placa de laterais pretas e homogeneizamos as soluções utilizando uma pipeta com ponteira com filtro. Incluímos também uma curva padrão na placa preta com branco (apenas água Milli-Q) e as concentrações 1 ng/mL e 5, 10, 25 e 50 µg/mL de DNA a fim de se determinar com precisão

a concentração de DNA das amostras investigadas. A seguir, realizamos a aquisição dos valores de fluorescência utilizando a leitora de placa *GloMax Explorer* (Promega) e os valores obtidos foram transferidos para arquivo excel para quantificação das amostras.

#### 4.5.5 Geração e limpeza dos conjuntos e envio para sequenciamento

Após a quantificação dos amplicons, nós coletamos o volume referente a 200 ng de produto de PCR de cada amostra e juntamos em um único tubo de microcentrífuga estéril, buscando transferir no máximo 15  $\mu$ L de cada amostra para o tubo. Após a junção das amostras, nós conduzimos a limpeza de 100  $\mu$ L desse conjuntos de amplicons utilizando o produto *QIAquick column*, seguindo as recomendações do fabricante. Na próxima etapa, quantificamos o conjunto de amostras (produtos de PCR das amostras pipetadas no mesmo tubo) que foram limpas com *QIAquick column* utilizando o kit *Qubit dsDNA HS Assay*, também seguindo as recomendações do fabricante. Considerando os valores de quantificação, diluímos a nossa biblioteca a 50 nM e juntamos com a biblioteca montada por dois colegas do laboratório do Dr. Weiner. Após a junção das duas bibliotecas, enviamos o tubo de microcentrífuga contendo o material para a empresa *Wyzer Courier* para sequenciamento. O sequenciamento das amostras de DNA foi realizado utilizando o Illumina V4.

#### 4.5.6 Análise dos dados *in silico*

Após a finalização do sequenciamento da região V4 das amostras do gene do RNAr 16S, os dados foram enviados à Dra. Laura Cox (pesquisadora responsável pelas bibliotecas de metagenômica do laboratório do Dr. Weiner). O Dr. Toby Lanser, bioinformata do laboratório do Dr. Weiner, processou as sequências, transformou e normalizou os dados e realizou as análises estatísticas dos dados de alfa e beta diversidades. Realizamos a normalização dos dados de abundância relativa subtraindo os valores de porcentagem final do inicial. As análises estatísticas dos dados de abundância relativa foram conduzidas utilizando o software *GraphPad Prism 8.0*. O sistema QIIME 2 foi empregado para a montagem dos gráficos de diversidade e do *heatmap* de vias metabólicas.

## 5 Resultados

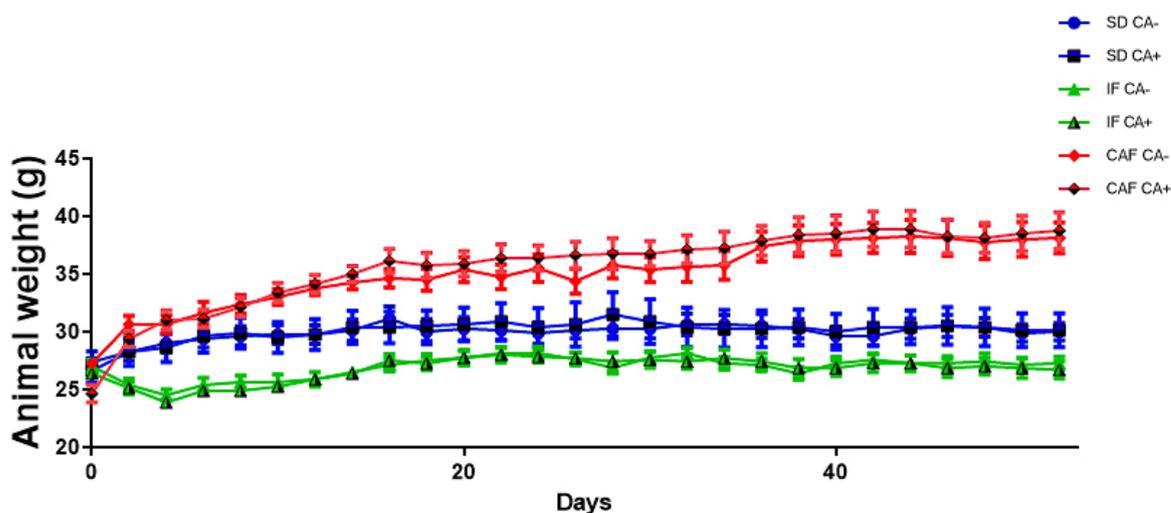
### 5.1 Experimentação *in vivo*

#### 5.1.1 Análise de parâmetros metabólicos dos camundongos

##### 5.1.1.1 Impacto das dietas e do câncer sobre o peso dos animais

Os valores de peso dos animais submetidos às diferentes dietas na presença ou ausência do câncer de mama triplo-negativo foram registrados durante toda a duração do experimento visando determinar se as condições experimentais influenciaram o peso dos camundongos. Como apresentado na figura 17, avaliando primeiramente os animais sem câncer, camundongos em dieta padrão sem câncer (SD CA-) apresentaram como média de peso de 30,125 g, o grupo submetido ao jejum intermitente (IF CA-) mostrou peso médio de 26,71 g e os animais alimentados com dieta de cafeteria (CAF CA-) possuíram 38,75 g como valor de média do peso. Com base nos nossos achados, sugerimos que camundongos em dieta padrão sem câncer não apresentaram alteração de peso quando comparado aos animais submetidos à dieta padrão com câncer (SD CA+), que apresentaram média de peso de 30,125 g. O mesmo padrão é observado quando se contrasta o peso dos animais em jejum ausentes de tumor com os animais com neoplasia (IF CA+, média de peso de 27,28 g) e quando se avalia camundongos em dieta de cafeteria sem e com tumor (CAF CA+), sendo que esse último grupo apresentou média de peso de 38,75 g. Esses achados indicam que o tumor de mama não influenciou o peso dos animais.

Comparando o peso médio dos animais com tumor alimentados nas diferentes dietas, detectamos o mesmo padrão que foi observado para os grupos sem câncer, indicando que o tumor não afeta o ganho ou perda de peso apresentado pelos animais. Portanto, a prática do jejum intermitente diminui o peso dos animais e o consumo de itens de cafeteria aumenta o peso dos camundongos, independentemente da ocorrência do câncer de mama.

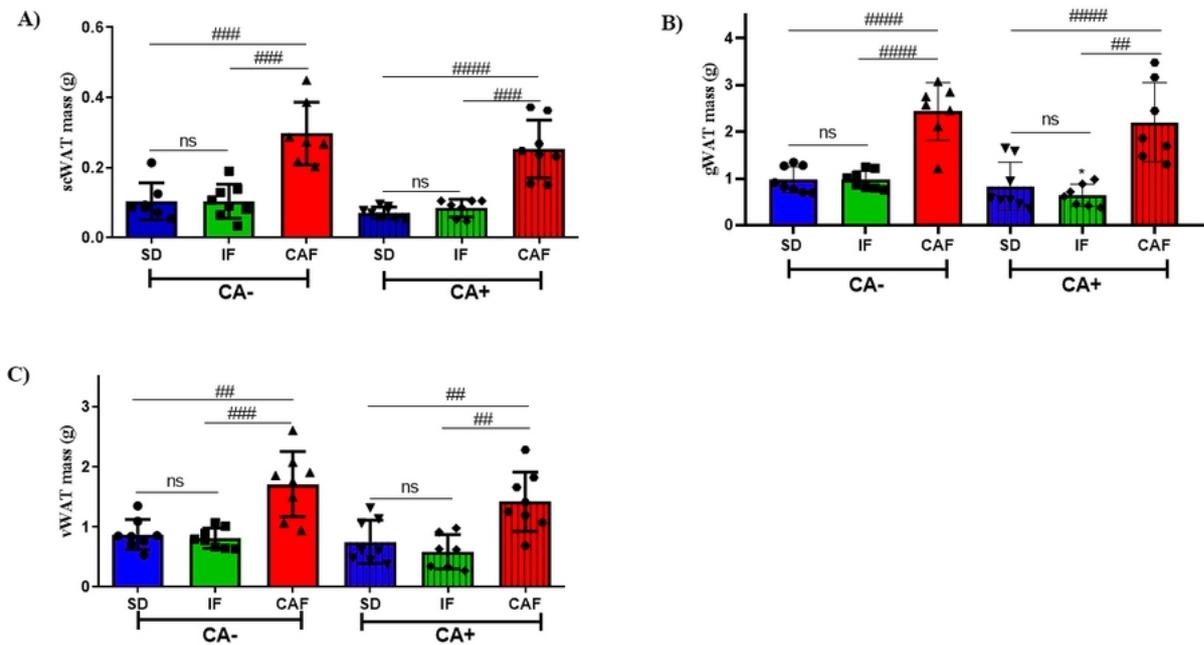


**Figura 17 – Impacto das dietas e do Câncer sobre o peso dos animais.**

Animais alimentados com diferentes dietas ou não com o tumor tiveram seu peso avaliado a cada 48h durante todo o experimento. Cada grupo experimental possui oito animais (N=8). Resultados referentes a uma réplica biológica.

#### 5.1.1.2 Efeito das dietas e do câncer sobre as massas de diferentes depósitos de tecido adiposo branco dos animais

A fim de se determinar o impacto das diferentes dietas e do câncer de mama triplo-negativo sobre os depósitos de tecido adiposo branco dos camundongos, foi realizada a aferição da massa destes tecidos. Como apresentado pela figura 18A, animais alimentados com itens de cafeteria sem tumor apresentaram aumento da massa do tecido adiposo branco subcutâneo (*scWAT*) comparando-se com camundongos em dieta padrão e em jejum intermitente, também sem câncer. É possível também se sugerir que camundongos em dieta de cafeteria com tumor de mama mostraram aumento da massa desse depósito adiposo quando comparado aos outros dois grupos com câncer (SD CA+ e IF CA+). Não foi detectada diferença na massa dos depósitos de *scWAT* dos animais em dieta padrão comparado com o grupo em jejum intermitente, na presença ou ausência do câncer de mama. O mesmo padrão foi observado quando os valores de massa dos depósitos de tecido adiposo branco gonadal (*gWAT*) (figura 18B) e visceral (*vWAT*) (figura 18C) analisados. Portanto, a dieta de cafeteria favorece aumento da massa de todos os depósitos adiposos brancos avaliados e o câncer de mama não influenciou nesse acúmulo.

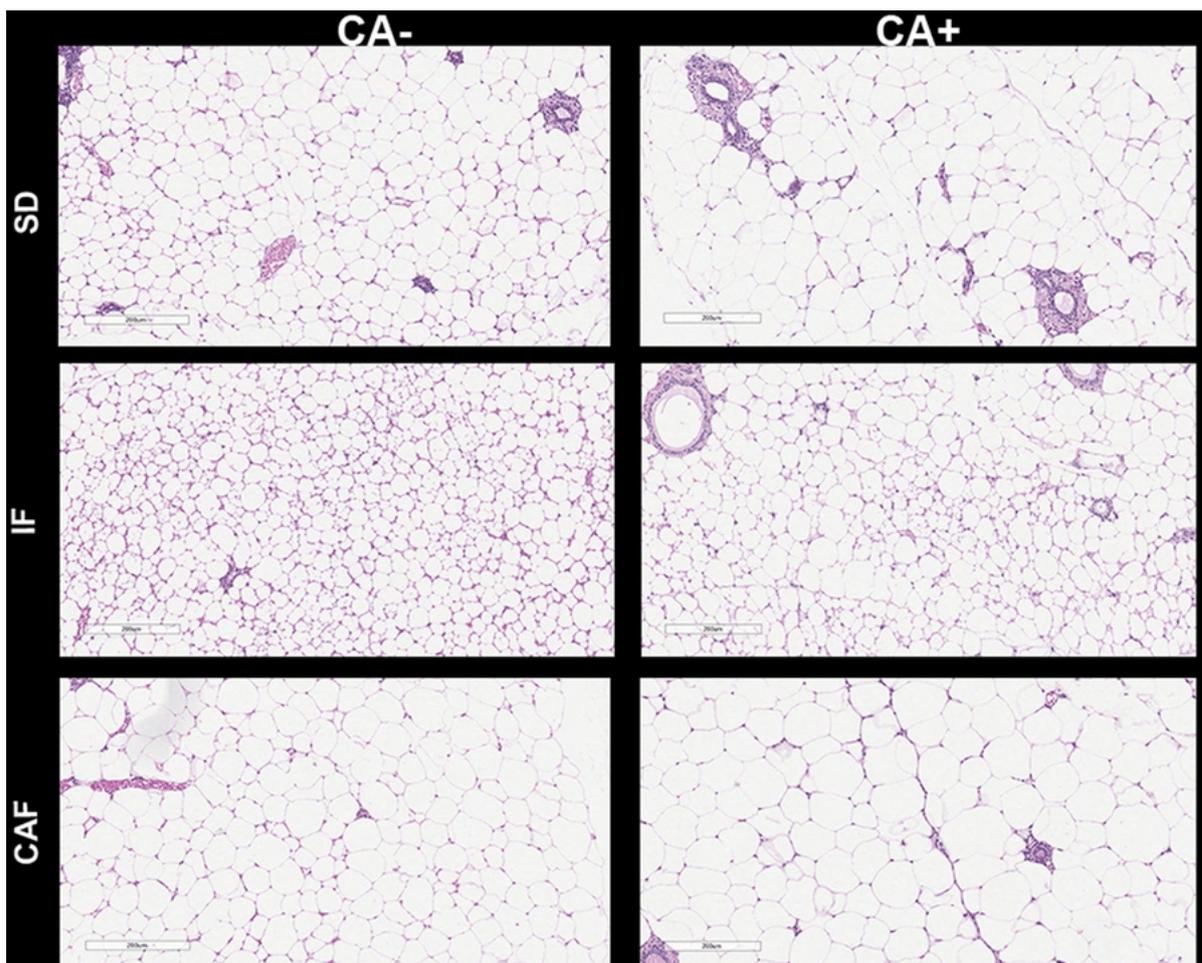


**Figura 18 – Efeito das dietas e do câncer sobre as massas de diferentes depósitos de tecido adiposo branco dos animais.**

Animais alimentados com diferentes dietas acometidos pelo câncer foram analisados quanto à massa do (A) tecido adiposo branco gonadal (gWAT), (B) tecido adiposo branco subcutâneo (scWAT) e (C) tecido adiposo branco visceral. Cada grupo experimental possuía oito (N=8). Resultados referentes a uma réplica biológica. As estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi apresentada com asteriscos (\*) e as diferenças entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra:  $p < 0,05$  (um símbolo),  $p < 0,01$  (dois símbolos) e  $p < 0,001$  (três símbolos).

### 5.1.1.3 Efeito das dietas e do câncer sobre características morfológicas do tecido adiposo branco inguinal dos roedores

Considerando que a dieta de cafeteria favoreceu o aumento da massa de depósitos adiposos brancos dos camundongos, analisamos as características morfológicas do tecido adiposo inguinal dos animais. Como ilustrado pela figura 19, o consumo de itens de cafeteria favoreceu o aumento da área dos adipócitos brancos, sugerindo progressão do processo de branqueamento desse tecido. Em contraste, camundongos submetidos ao jejum intermitente apresentaram aumento da multilocularização de adipócitos no depósito adiposo branco inguinal dos roedores, fenótipo indicativo do processo de amarronzamento de tecido adiposo branco. O câncer de mama triplo-negativo induziu aumento da área dos adipócitos em todas as condições experimentais avaliadas, fenômeno que também conecta a progressão dessa neoplasia com o branqueamento do tecido adiposo branco inguinal.



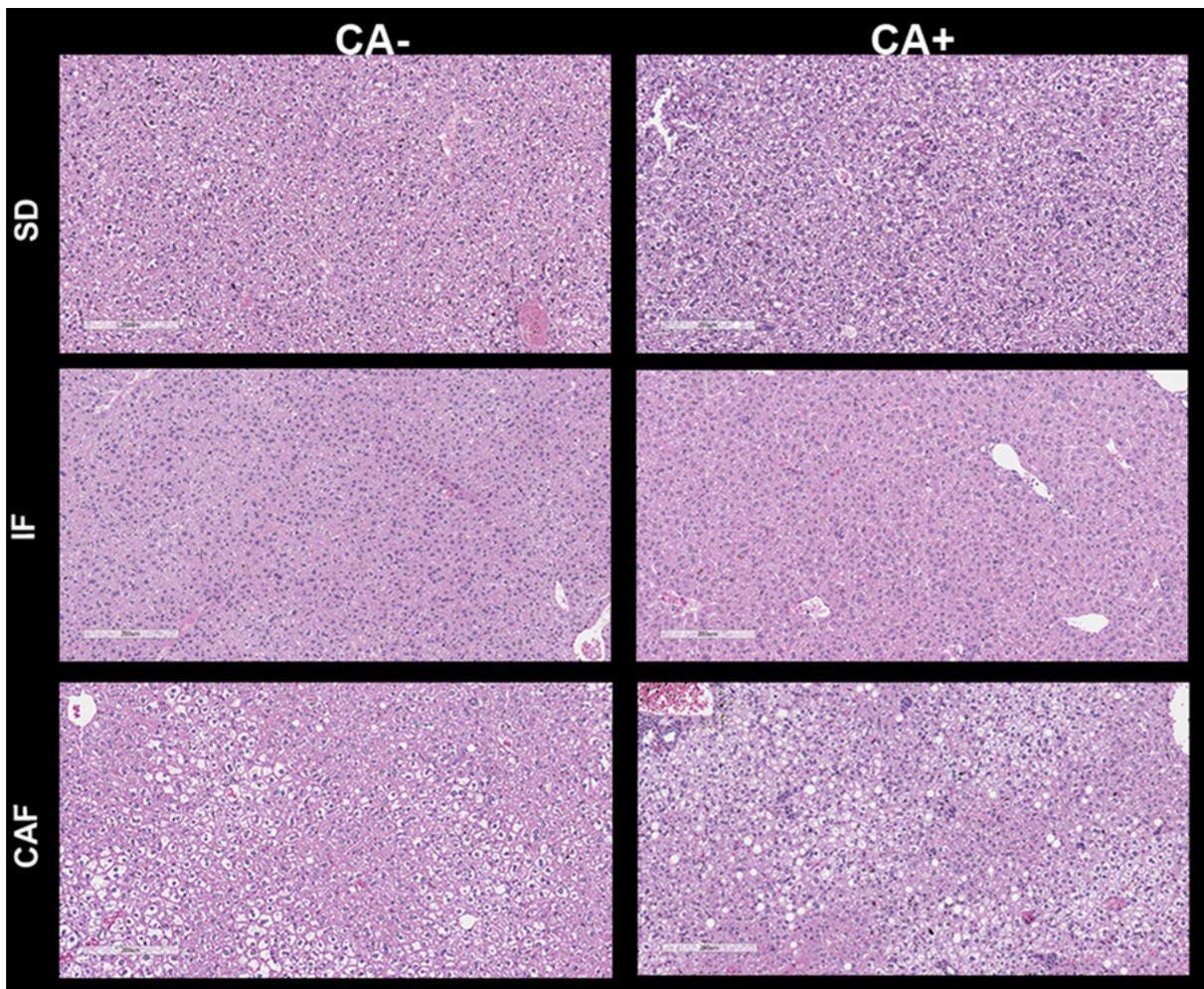
**Figura 19 – Influência das dietas e do câncer sobre as características morfológicas do tecido adiposo branco inguinal dos animais.**

Animais alimentados com diferentes dietas acometidos ou não pelo câncer foram avaliados quanto às características morfológicas do tecido adiposo branco inguinal. Cada grupo experimental possuía oito animais (N=8). Resultados referentes a uma réplica biológica. As lâminas histológicas do tecido adiposo branco inguinal foram registradas em aumento de 10X.

#### 5.1.1.4 Impacto das dietas e do câncer sobre a ocorrência de esteatose hepática nos camundongos

Considerando que as dietas e o tumor de mama influenciaram a morfologia de depósitos adiposos brancos dos camundongos, investigamos se o fígado, outro importante órgão endócrino, também foi modificado. Como descrito pela figura 20, a dieta de cafeteria se associou à ocorrência de esteatose hepática nos animais e o jejum intermitente levou à redução do acúmulo de lipídeos nesse tecido quando comparados aos animais alimentados com a dieta padrão sem o tumor. Quando avaliamos o impacto do tumor nos animais submetidos às três diferentes dietas, detectamos que a malignidade de mama favoreceu com que camundongos em dieta padrão e dieta de cafeteria apresentassem aumento da esteatose hepática quando comparado aos seus respectivos controles. Já quando analisamos os grupos submetidos ao jejum intermitente, verificamos que o câncer de

mama não se associou à ocorrência de esteatose hepática nesses animais, comparando-se com o respectivo controle sem o tumor.



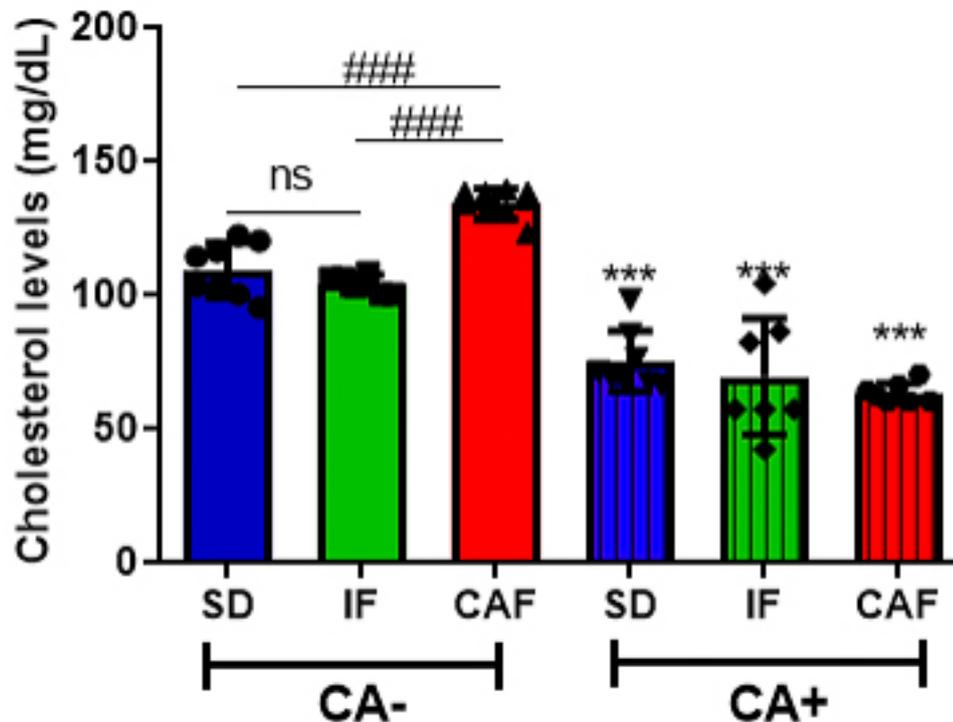
**Figura 20 – Influência das dietas e do câncer sobre a ocorrência de esteatose no fígado dos animais**

Animais alimentados com diferentes dietas acometidos ou não pelo câncer foram avaliados quanto à ocorrência de esteatose hepática. Cada grupo experimental possuía oito animais (N=8). Resultados referentes a uma réplica biológica. As lâminas histológicas de fígado foram registradas em aumento de 10X.

#### 5.1.1.5 Efeito das dietas e do câncer sobre os níveis circulantes de colesterol nos roedores

Considerando que os padrões alimentados investigados e o tumor mamário influenciaram a ocorrência de esteatose hepática nos camundongos, e tendo em mente o papel central do fígado no metabolismo lipídico sistêmico, investigamos a influência das diferentes condições experimentais sobre os níveis circulantes de colesterol. Como ilustrado pela figura 21, os camundongos em dieta de cafeteria ausentes de tumor apresentaram aumento nos níveis de colesterol total no plasma quando comparados aos animais em dieta padrão e em jejum intermitente, também sem câncer. Todos os animais com câncer de mama triplo-negativo apresentaram níveis diminuídos

de colesterol total quando comparados aos seus respectivos controles ausentes de tumor. Pode-se sugerir também que o câncer não modulou os níveis de colesterol diferencialmente conforme a dieta.



**Figura 21 – Impacto das dietas e do câncer sobre os níveis plasmáticos de colesterol nos camundongos.**

Animais alimentados com diferentes dietas afetados ou não pelo câncer foram investigados quanto aos níveis de Cada grupo experimental possuía oito animais (N=8). Resultados referentes a uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi representada com asteriscos (\*) e as diferenças entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra:  $p < 0,05$  (um símbolo),  $p < 0,01$  (dois símbolos) e  $p < 0,001$  (três símbolos).

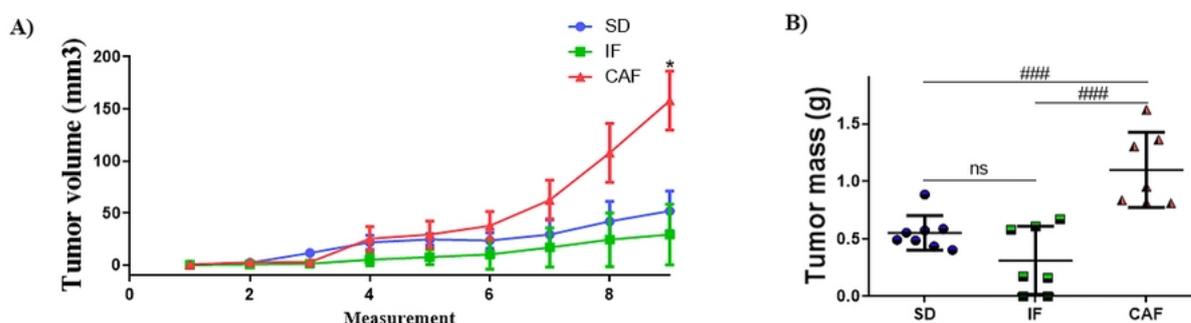
## 5.1.2 Análise de parâmetros do tumor primário dos animais

### 5.1.2.1 Influência das dietas sobre o volume do tumor

Tendo em mente que o jejum intermitente e a dieta de cafeteria influenciaram diferencialmente o perfil metabólicos dos camundongos, avaliamos qual foi o impacto dessas dietas sobre a progressão do câncer de mama. Como ilustrado pela figura 22A, os tumores de mama dos animais em dieta de cafeteria foram maiores quando comparados aos camundongos submetidos à dieta padrão e ao jejum intermitente. Comparando-se o volume tumoral dos animais em dieta padrão e jejum intermitente, não observamos diferenças.

### 5.1.2.2 Impacto das dietas sobre a massa do tumor

Uma vez que a dieta de cafeteria favoreceu o aumento do volume do tumor de mama desenvolvido nos roedores, buscamos investigar o impacto das diferentes dietas sobre a massa tumoral. Como descrito pela figura 22B, a massa dos tumores de mama dos camundongos alimentados com itens de cafeteria também foi maior quando comparando aos outros dois grupos. A exemplo dos achados de volume tumoral, também verificamos que este não foi modulado pela prática do jejum intermitente em dias alternados.



**Figura 22 – Influência das dietas sobre a massa e o volume do tumor primário.**

Animais alimentados com diferentes dietas impactados pelo câncer tiveram seus tumores avaliados quanto ao (A) volume e (B) massa. Cada grupo experimental possuiu oito animais (N=8). Resultados referentes a uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego do símbolo seguiu a seguinte regra:  $p < 0,05$  (um símbolo),  $p < 0,01$  (dois símbolos) e  $p < 0,001$  (três símbolos).

### 5.1.2.3 Efeito das dietas sobre o potencial proliferativo do tumor

A fim de avaliar o potencial proliferativo dos tumores, utilizamos o marcador Ki-67 (marcação em marrom). Sugerimos que animais em dieta de cafeteria se associaram a tumores mamários com maior potencial proliferativo quando comparado aos outros dois grupos e camundongos submetidos ao jejum intermitente apresentaram tumores com menor potencial proliferativo quando comparado aos outros dois grupos experimentais (figura 25).

## 5.1.3 Análise da ocorrência de metástase hepática nos animais

### 5.1.3.1 Influência das dietas sobre a contagem de focos metastáticos hepáticos

Considerando que o jejum intermitente e a dieta de cafeteria influenciaram diferencialmente parâmetros do tumor primário de mama, analisamos o impacto dessas dietas sobre a ocorrência de metástase hepática. Como apresentando pela figura 23A, camundongos alimentados com itens de cafeteria apresentaram aumento do número de focos metastáticos no

fígado quando comparado aos outros dois grupos experimentais analisados. Já animais submetidos ao jejum intermitente se associaram à redução da contagem de focos de metástase no tecido hepático quando contrastado com os outros dois grupos.

#### **5.1.3.2 Impacto das dietas sobre o volume dos focos metastáticos hepáticos**

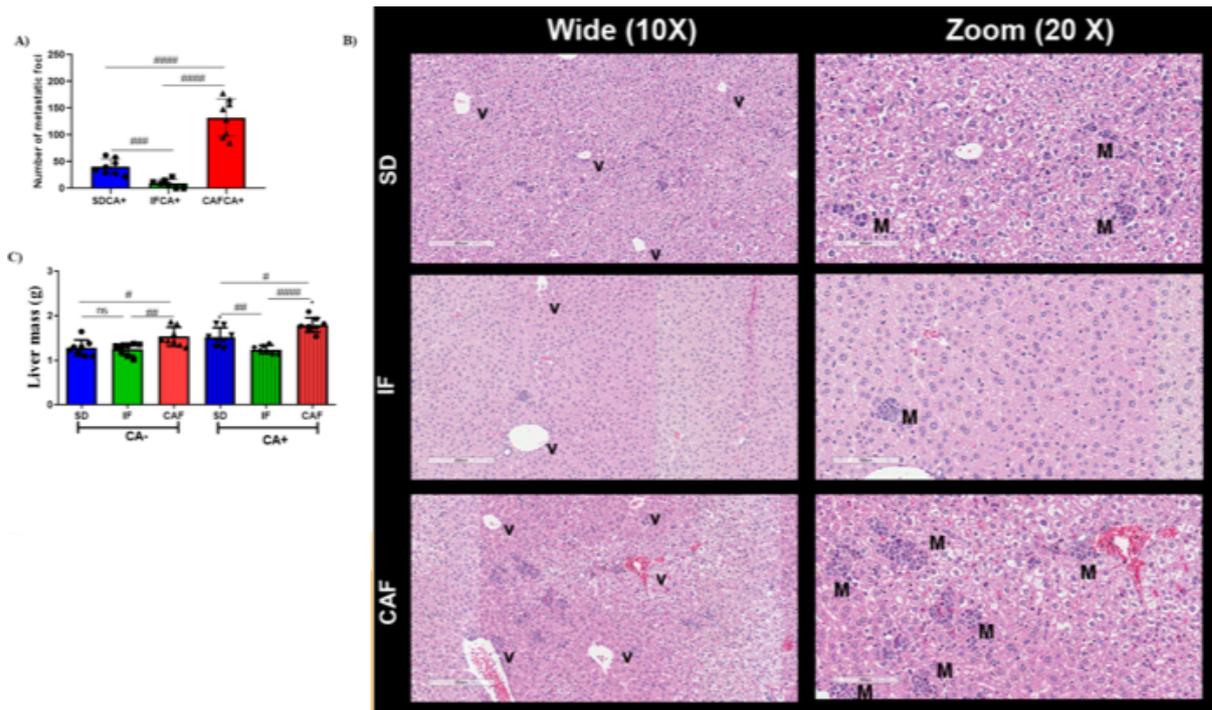
Uma vez que as dietas investigadas influenciaram o número de focos metastáticos no fígado dos camundongos, investigamos o volume desses focos e verificamos que a dieta de cafeteria favoreceu a formação de focos de metástase com volume elevado quando comparado aos outros dois grupos investigados (figura 23B).

#### **5.1.3.3 Vascularização hepática como um potencial contribuinte para invasão hepática**

Considerando que o processo de metástase ocorre via circulação sanguínea, investigamos a vascularização do tecido hepático dos camundongos e sugerimos que roedores submetidos à dieta de cafeteria apresentaram aumento da vascularização hepática quando comparado aos outros dois grupos investigados (figura 23B).

#### **5.1.3.4 Impacto do câncer no contexto das três dietas sobre a massa do fígado**

Considerando que as dietas influenciaram o número e o volume de focos metastáticos hepáticos nos camundongos analisados, investigamos a massa do fígado desses animais. Como descrito na figura 23C, a massa do fígado dos camundongos em dieta padrão e dieta de cafeteria acometidos pelo câncer de mama aumentou quando comparado com seus respectivos controles sem o tumor. Diferentemente, roedores submetidos ao jejum intermitente afetados pelo tumor de mama não apresentaram aumento da massa hepática quando comparado ao seu respectivo controle sem câncer.



**Figura 23 – Impacto das dietas sobre a ocorrência de metástase hepática nos roedores.**

Animais alimentados com diferentes dietas impactados pelo câncer foram avaliados quanto ao (A) número de focos metastáticos, (B) volume dos focos metastáticos e vascularização hepática e (C) massa do fígado. Cada grupo experimental possuiu oito animais (N=8). Resultados referentes a uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego do símbolo seguiu a seguinte regra:  $p < 0,05$  (um símbolo),  $p < 0,01$  (dois símbolos) e  $p < 0,001$  (três símbolos).

#### 5.1.4 Avaliação de parâmetros inflamatórios dos camundongos

##### 5.1.4.1 Efeito das dietas e do câncer sobre a contagem de células imunológicas circulantes dos animais

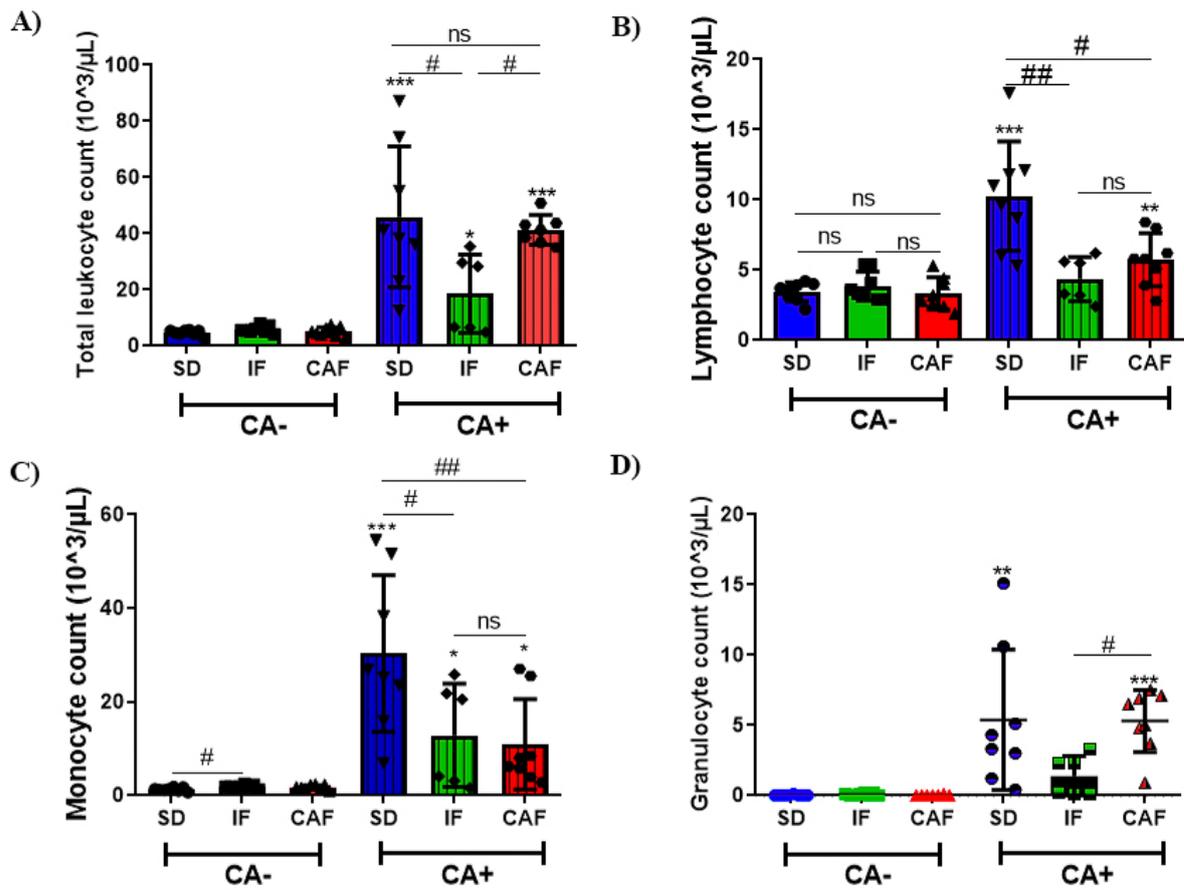
Como primeiro passo para se avaliar os impactos das dietas e do câncer sobre parâmetros sistêmicos dos animais, foi conduzida a contagem de leucócitos totais circulantes dos camundongos. Como sugerido pela figura 24A, as diferentes dietas não impactaram sobre o número de leucócitos totais dos animais ausentes de tumor. Já quando comparamos as condições sem e com câncer de mama, verificamos que a neoplasia leva a um aumento no número dessas células. Avaliando o número de leucócitos totais nos grupos com câncer detectamos que os níveis dessas células é reduzido após a prática crônica do jejum intermitente. Esse achado sugere que o câncer de mama triplo-negativo induz aumento na produção de leucócitos totais pelos camundongos, mas o jejum intermitente favorece elevação menos intensa dessas células.

Investigando populações específicas de leucócitos circulantes dos animais submetidos às diferentes dietas com e sem tumor de mama, detectamos que as diferentes dietas não influenciaram

a contagem de linfócitos dos animais na ausência do câncer. O tumor de mama levou a um aumento na contagem dessas células imunológicas nos animais em dieta padrão e nos alimentados com itens de cafeteria, mas não influenciou a contagem dessas células em animais submetidos ao jejum intermitente. A partir da figura 24B, pode-se também sugerir que o número de linfócitos é maior em animais em dieta padrão com câncer quando comparado com os outros dois grupos afetados pelo tumor (IF CA+ e CAF CA+)

O mesmo efeito foi detectado quando avaliamos outra população de leucócitos: os monócitos. Os animais afetados pelo câncer apresentaram aumento no número dessas células e os camundongos submetidos ao jejum intermitente (IF CA+) e os alimentados com itens de cafeteria (CAF CA+) apresentaram diminuição no número dessas células no sangue quando comparado à condição em dieta padrão (SD CA+). Diferentemente do encontrado na análise de linfócitos, o sangue de animais em jejum intermitente sem câncer mostrou aumento de contagem dessas células quando comparado ao grupo em dieta padrão ausente de tumor (SD CA-) (figura 24C).

Analisando-se a contagem de outra população leucocitária circulante, os granulócitos, é possível se afirmar que, em animais sem tumor de mama, as diferentes dietas não impactaram no número dessas células. Sugere-se também que animais em dieta padrão e em dieta de cafeteria afetados pelo tumor apresentaram aumento no número dessas células, enquanto que o número de granulócitos totais não foi influenciado pelo câncer em animais submetidos ao jejum intermitente. A figura 24D também informa que a contagem de granulócitos do sangue de animais com câncer em jejum intermitente é menor quando comparado a camundongos em dieta de cafeteria e com tumor. Portanto, camundongos em dieta de cafeteria com tumor de mama apresentam quantidades similares de monócitos e linfócitos, mas apresentam aumento da contagem de granulócitos em resposta ao tumor quando comparado a animais em jejum intermitente.



**Figura 24 – Influência das dietas e do câncer sobre as características de células imunológicas circulantes dos animais.**

Animais alimentados com diferentes dietas afetados pelo câncer tiveram amostras de sangue total avaliada para o número de (A) leucócitos totais, (B) linfócitos, (C) monócitos e (D) granulócitos. Cada grupo experimental possuía oito animais (N=8). Resultados referentes a uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi representada com asteriscos (\*) e as diferenças entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra:  $p < 0,05$  (um símbolo),  $p < 0,01$  (dois símbolos) e  $p < 0,001$  (três símbolos).

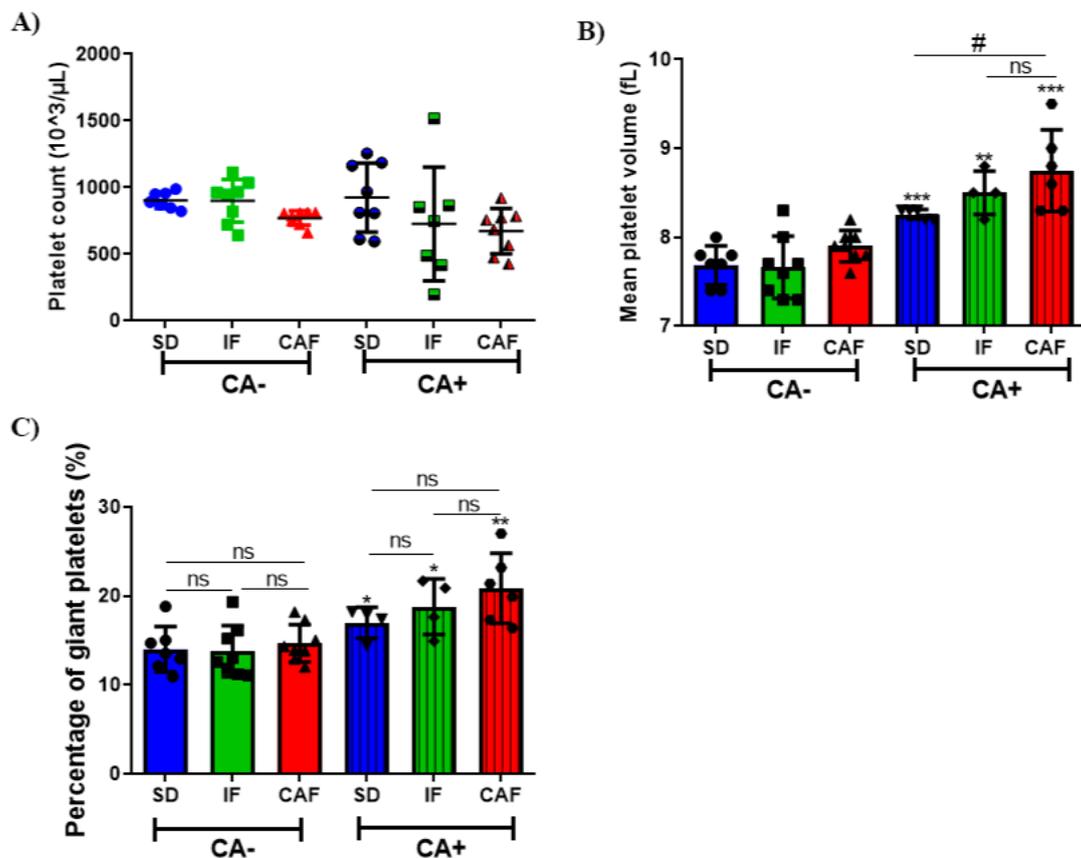
#### 5.1.4.2 Efeito das dietas e do câncer sobre as características de plaquetas circulantes nos animais

O número de plaquetas também foi investigado no contexto das diferentes dietas na presença ou ausência do câncer. Como apresentado pela figura 25A, nenhuma das condições experimentais influenciou o número de plaquetas do sangue dos animais.

No entanto, quando analisamos o volume médio das plaquetas, detectamos que, diferentemente dos animais que não receberam células 4T1 (dietas não influenciaram volume médio desses elementos), todas as condições com câncer de mama (SD CA+, IF CA+ e CAF CA+) apresentaram aumento do volume médio dessas estruturas quando comparados aos

respectivos controles. Descobrimos também que o volume médio das plaquetas derivadas de animais em dieta de cafeteria com tumor de mama é maior quando comparado aos em dieta padrão também afetados pelo câncer, e que os diferentes padrões alimentares não influenciaram no volume desses elementos sanguíneos dos animais (figura 25B).

Considerando os efeitos do tumor de mama triplo-negativo sobre os volume das plaquetas dos camundongos, investigamos a percentagem de plaquetas gigantes no plasma dos animais. Como ilustrado pela figura 25C, as distintas dietas não impactaram na percentagem de plaquetas gigantes no sangue dos animais. No entanto, os camundongos com câncer apresentaram aumento na percentagem de plaquetas gigantes quando comparados aos respectivos controles. Portanto, apesar de o número de plaquetas plasmáticas dos animais não ter sido influenciado pela ocorrência do tumor, animais afetados pelo câncer apresentaram aumento do volume médio desses elementos e elevação na percentagem de plaquetas gigantes, especialmente os animais alimentados com dieta de cafeteria, quando comparados aos animais sem câncer.

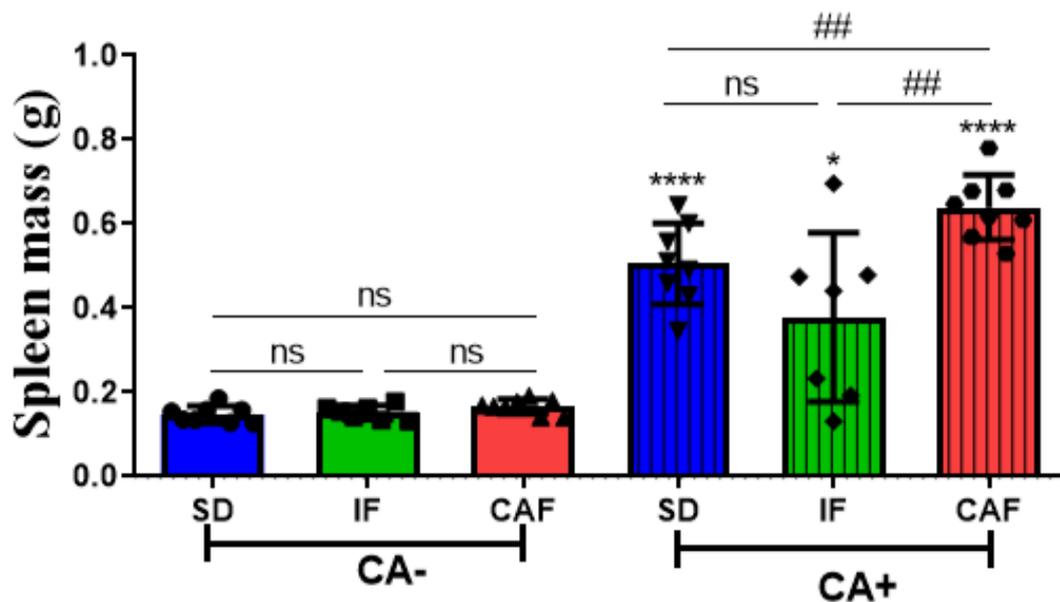


**Figura 25 – Influência das dietas e do câncer sobre as características de células imunológicas circulantes dos animais.**

Animais alimentados com diferentes dietas afetados pelo câncer tiveram amostras de sangue total avaliadas para o número de (A) leucócitos totais, (B) linfócitos, (C) monócitos e (D) granulócitos. Cada grupo experimental possuía oito animais (N=8). Resultados referentes à uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi representada com asteriscos (\*) e as diferenças entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra:  $p < 0,05$  (um símbolo),  $p < 0,01$  (dois símbolos) e  $p < 0,001$  (três símbolos).

#### 5.1.4.3 Impacto das dietas e do câncer sobre a massa esplênica dos animais

Buscando se avaliar o impacto das dietas e do tumor sobre a massa do baço, um importante órgão imune, verificamos que os animais alimentados com as diferentes dietas não apresentaram alteração da massa desse órgão. No entanto, todas as condições com câncer de mama (SD CA+, IF CA+ e CAF CA+) apresentaram aumento da massa do baço e os animais expostos às células de câncer de mama 4T1 submetidos ao jejum intermitente mostraram diminuição da massa esplênica quando comparado aos animais alimentados com dieta de cafeteria também com câncer (figura 26).



**Figura 26 – Impacto das dietas e do câncer sobre a massa esplênica dos animais.**

Animais alimentados com diferentes dietas afetados pelo câncer foram analisados quanto à massa do baço. Cada grupo experimental possuía oito animais (N=8). Resultados referentes a uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi representada com asteriscos (\*) e as diferenças entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra:  $p < 0,05$  (um símbolo),  $p < 0,01$  (dois símbolos) e  $p < 0,001$  (três símbolos).

#### 5.1.4.4 Impacto das dietas e do câncer sobre o perfil de citocinas do tecido adiposo marrom

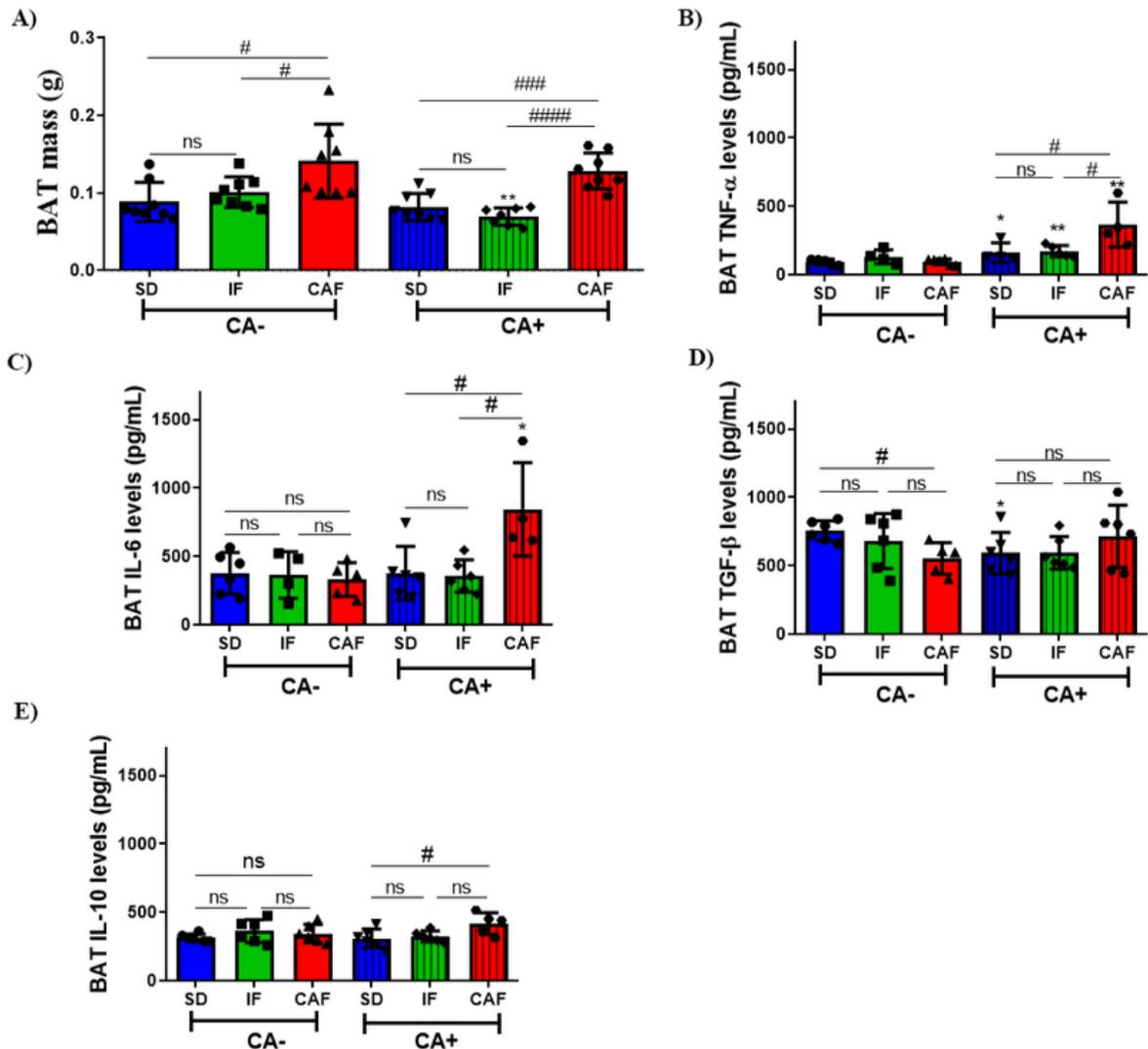
Como primeiro passo na investigação dos efeitos das dietas e do câncer sobre características do tecido adiposo marrom, realizamos a aferição da massa do tecido e verificamos que, a exemplo dos outros depósitos de tecido adiposo aqui avaliados, este apresentou aumento de massa em todos os camundongos alimentados com a dieta de cafeteria (CAF CA- e CAF CA+) (figura 27A). Buscando investigar a influência das dietas e do câncer de mama triplo-negativo sobre a ocorrência de processos inflamatórios no tecido adiposo marrom dos animais, as citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, TGF- $\beta$  e IL-10 foram quantificadas nesse tecido.

Explorando a figura 26B é possível se sugerir que as diferentes dietas não impactaram nos níveis de TNF- $\alpha$  no tecido adiposo de animais sem câncer. No entanto, todos os animais com câncer (SD CA+, IF CA+ e CAF CA+) apresentaram aumento nos níveis dessa citocina pró-inflamatória no tecido adiposo marrom, quando comparado aos seus respectivos controles sem tumor. Nossos dados também indicam que o tecido adiposo marrom de animais em dieta

de cafeteria com câncer possuem níveis aumentados quando comparado aos outros dois grupos afetados pelo câncer.

Padrão similar foi observado após quantificação da citocina pró-caquética e tumoral IL-6 no tecido adiposo marrom: as diferentes dietas não impactaram nos níveis desse mediador na ausência do tumor; no entanto, o desenvolvimento do câncer de mama em animais em dieta de cafeteria levou a um aumento de IL-6 no tecido adiposo marrom comparando-se aos animais em dieta padrão e jejum intermitente, também impactados pelo câncer (SD CA+ e IF CA+) (figura 27C).

Investigando-se a quantidade da citocina anti-inflamatória TGF- $\beta$  no tecido adiposo marrom dos camundongos nas diferentes dietas, com ou sem tumor de mama, é possível se sugerir que o nível dessa citocina decresce no tecido de animais em dieta de cafeteria sem câncer quando comparado aos camundongos em dieta padrão, também ausentes de tumor. Animais em dieta padrão com câncer apresentam quantidades diminuídas dessa citocina no tecido adiposo marrom. A figura 27D também informa que os níveis de TGF- $\beta$  não são modulados de acordo a dieta em camundongos afetados pelo câncer de mama. Já quando avaliamos a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 pelo tecido adiposo marrom dos animais, verificamos um aumento no tecido adiposo marrom de animais em dieta de cafeteria com câncer de mama comparado aos camundongos em dieta padrão, também impactados pelo tumor de mama (figura 27E).



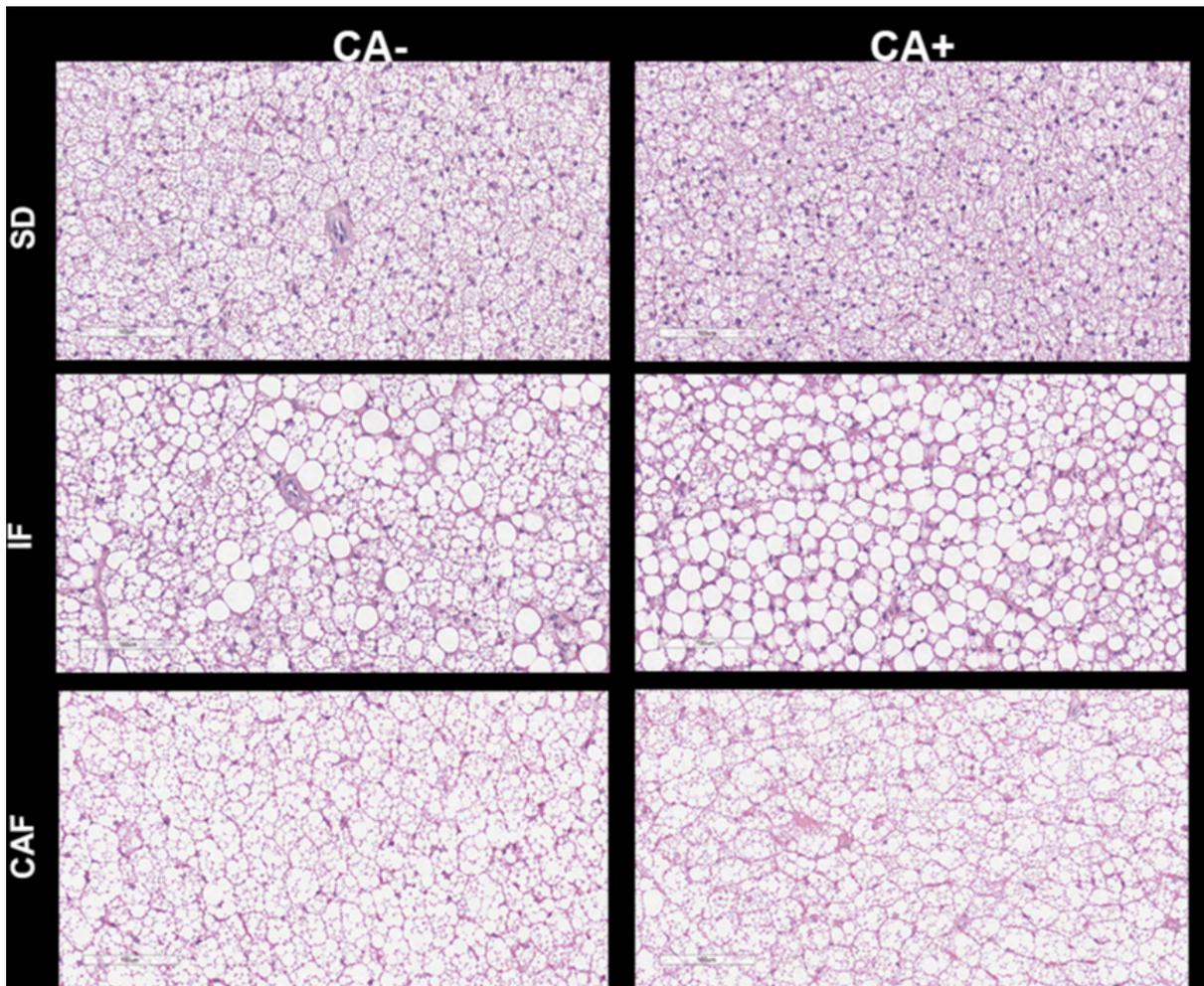
**Figura 27 – Impacto das dietas e do câncer sobre o perfil de citocinas do tecido adiposo marrom.**

Animais alimentados com diferentes dietas acometidos ou não pelo câncer foram investigados quanto (A) à massa de tecido adiposo marrom, níveis no tecido de (B) TNF $\alpha$ , (C) IL-6, (D) TGF- $\beta$  e (E) IL-10. Cada grupo experimental possuía oito animais (N=8). Resultados referentes à uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi representada com asteriscos (\*) e as diferenças entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra: p<0,05 (um símbolo), p<0,01 (dois símbolos) e p<0,001 (três símbolos)

#### 5.1.4.5 Efeito das dietas e do câncer sobre as características morfológicas do tecido adiposo marrom

Considerando essas alterações no microambiente inflamatório do tecido adiposo marrom dos animais nas diferentes dietas com ou sem tumor de mama, investigamos as características morfológicas do tecido adiposo marrom dos animais. Como ilustrado na figura 26, as dietas influenciaram as características do tecido adiposo marrom dos animais. Enquanto o tecido

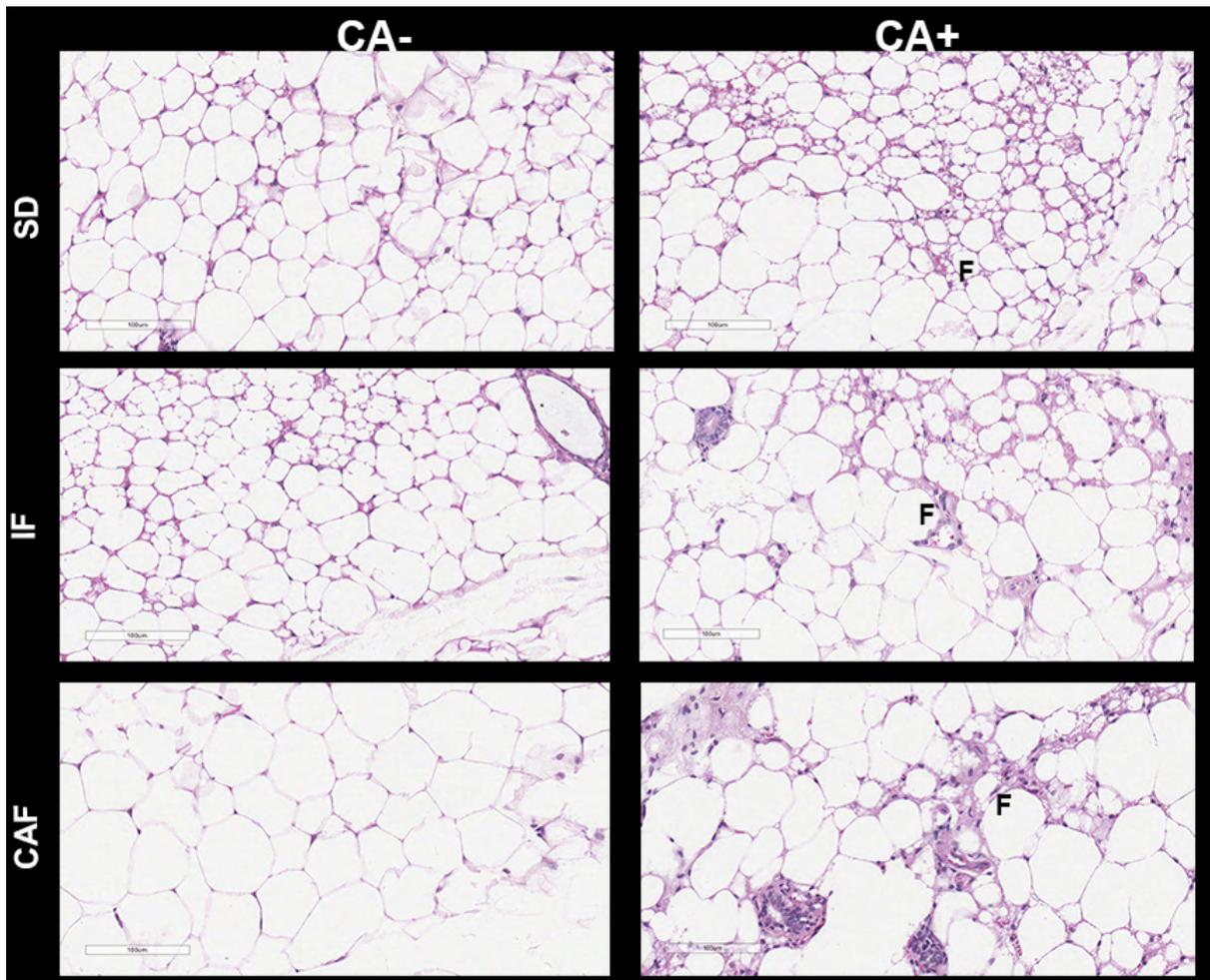
adiposo marrom de animais em dieta padrão apresentou diversos adipócitos contendo gotículas de gordura pequenas, camundongos submetidos ao jejum intermitente apresentaram nesse depósito adiposo aumento do número de adipócitos contendo gotículas de gordura maiores espalhados entre células com gotículas menores. Já o tecido adiposo marrom de animais em dieta de cafeteria apresentaram células com gotículas maiores por todo o tecido. Todas as condições com câncer associaram-se com estruturas que sugerem maior infiltrado de células imunológicas e, aparentemente, com maior lipogênese, especialmente no grupo em dieta de cafeteria afetado pelo câncer, que apresentou a ocorrência estruturas indicativas da ocorrência de fibrose nesse tecido. Portanto, o jejum intermitente e a dieta de cafeteria levam a alterações morfológicas distintas do tecido adiposo marrom. O tumor de mama triplo-negativo mediado pelas células 4T1 também se associou a alterações na morfologia do tecido, incluindo estruturas que sugerem maior infiltrado inflamatório e a ocorrência de fibrose tecidual nos animais submetidos à dieta de cafeteria (figura 28).



**Figura 28 – Impacto das dietas e do câncer sobre a morfologia do tecido adiposo marrom.** Animais alimentados com diferentes dietas acometidos ou não pelo câncer foram investigados quanto à morfologia do tecido adiposo marrom. Cada grupo experimental possuía oito animais (N=8). Resultados referentes a uma réplica biológica. As lâminas histológicas do tecido adiposo marrom foram registradas em aumento de 20X.

#### 5.1.4.6 Efeito das dietas e do câncer sobre as características morfológicas indicativas de inflamação do tecido adiposo branco inguinal

Estruturas que sugerem a ocorrência de fibrose também foram detectadas quando avaliamos o tecido adiposo branco inguinal dos camundongos, especialmente em locais próximos de onde o tumor se desenvolveu (figura 29).



**Figura 29 – Efeito do câncer sobre indicadores de inflamação do tecido adiposo branco inguinal.**

Animais alimentados com diferentes dietas acometidos ou não pelo câncer foram investigados quanto à morfologia do tecido adiposo branco inguinal. Cada grupo experimental possuía oito animais (N=8). Resultados referentes a uma réplica biológica. As lâminas histológicas do tecido adiposo branco inguinal foram registradas em aumento de 20X.

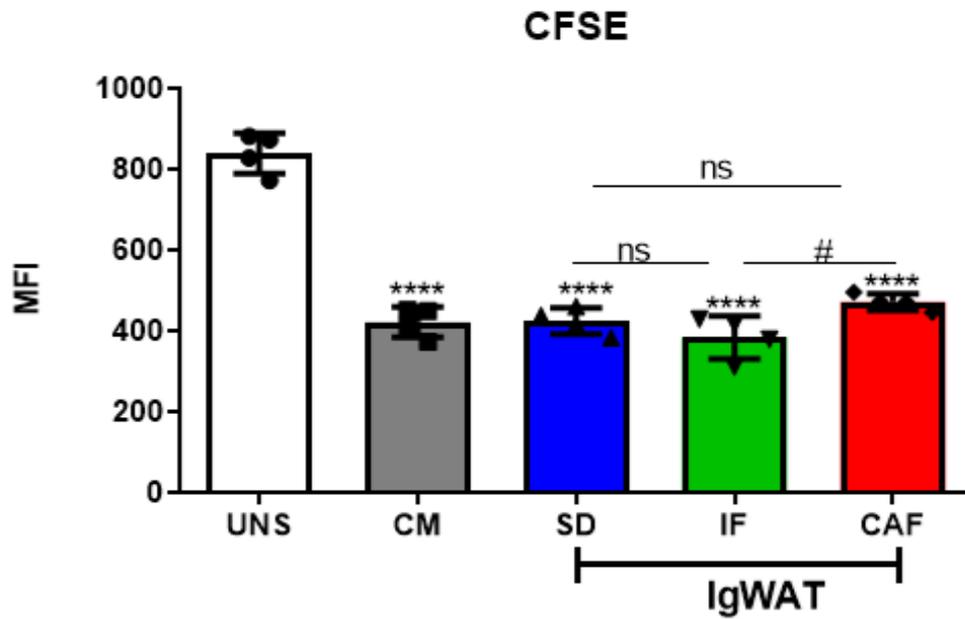
## 5.2 Análises *ex vivo*

### 5.2.1 Influência de moléculas secretadas por tecidos adiposos modulados pelas diferentes dietas sobre a proliferação das células 4T1

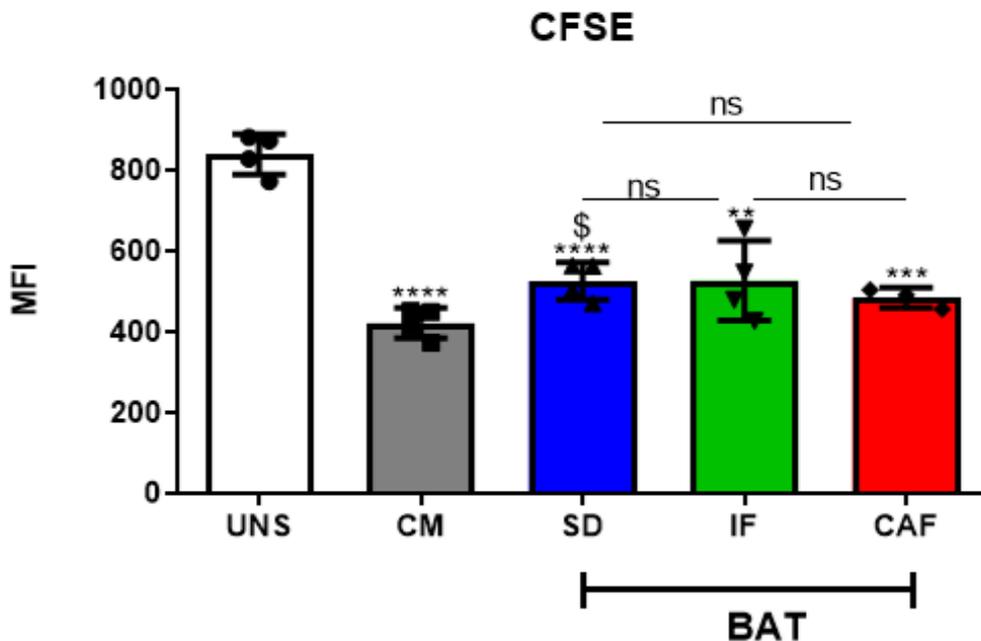
Considerando o relevante caráter endócrino e a alta plasticidade dos tecidos adiposos influenciados pelas dietas, investigamos o impacto de moléculas derivadas desses tecidos sobre parâmetros carcinogênicos de células de câncer de mama triplo-negativo 4T1. Primeiro, analisamos os efeitos das moléculas derivadas desses tecidos sobre proliferação das células de tumor de mama em estudo. Como apresentado pela figura 30, apesar das células 4T1 estimuladas pelos produtos secretados pelos tecidos adiposos terem proliferado mais que as

células não-estimuladas (UNS), as dietas não impactaram diferencialmente no processo de proliferação das células. Portanto, os produtos secretados pelos diferentes depósitos de tecido adiposo influenciados pelas dietas não impactaram sobre o processo de proliferação das células 4T1.

A)



B)



**Figura 30 – Influência de moléculas secretadas por tecidos adiposos modulados pelas diferentes dietas sobre a proliferação das células 4T1.**

Células 4T1 foram avaliadas quanto à proliferação após estímulo com meios condicionados por (A) tecido adiposo branco inguinal e (B) tecido adiposo marrom. Cada grupo experimental possuía oito animais (N=8). Resultados referentes à uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi representada com asteriscos (\*) e as diferenças entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra:  $p < 0,05$  (um símbolo),  $p < 0,01$  (dois símbolos) e  $p < 0,001$  (três símbolos).

### 5.2.2 Efeito dos produtos de secreção dos tecidos adiposos modulados pelas diferentes dietas sobre o perfil de morte das células 4T1

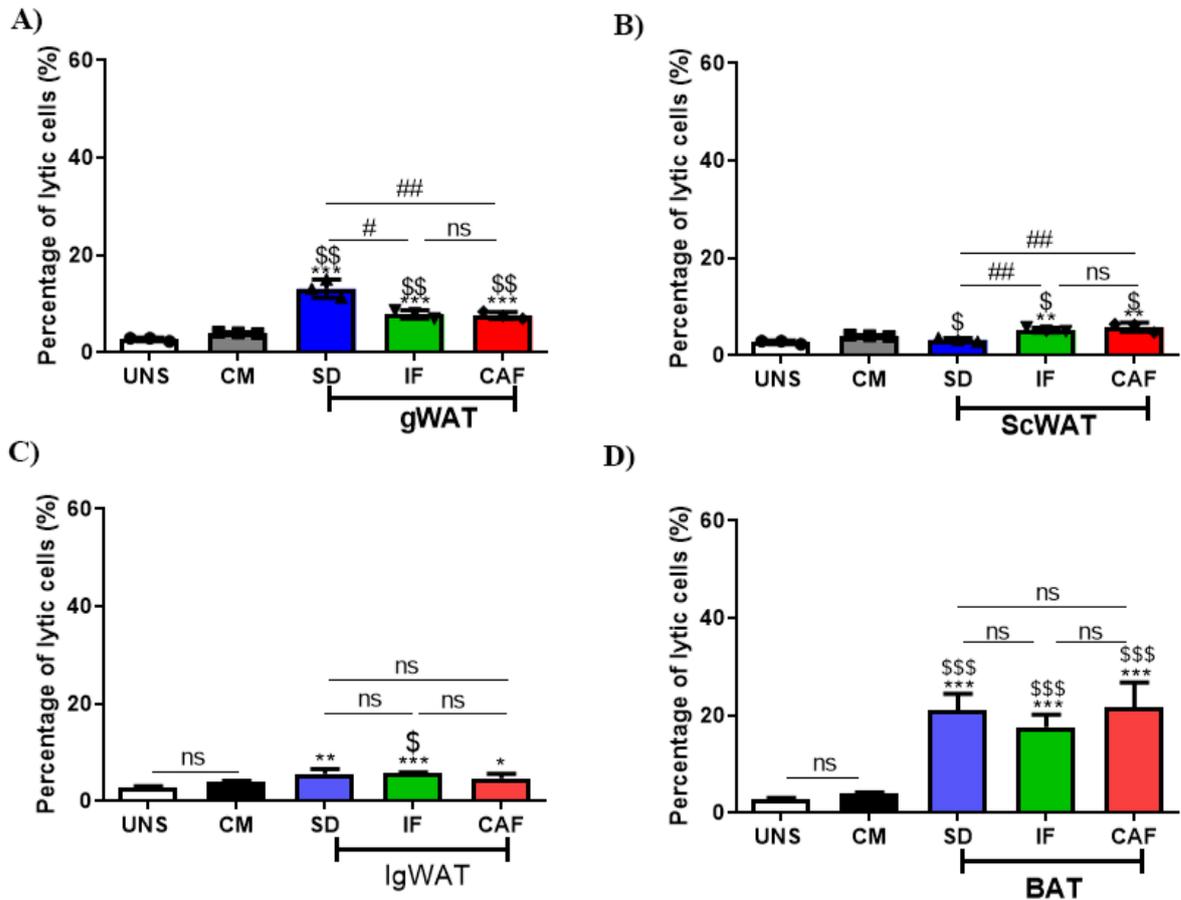
Considerando que as moléculas secretadas pelos tecidos adiposos modulados pelas diferentes dietas não influenciaram a proliferação das células 4T1, avaliamos o perfil de morte das células 4T1 tratadas com os produtos de secreção dos tecidos adiposos influenciados pelos distintos padrões alimentares. Como ilustrado pela figura 31A, os produtos secretados pelo tecido adiposo branco gonadal derivado de animais em dieta padrão (*SD*) induziu maior percentagem de morte lítica das células 4T1 quando comparado às moléculas secretadas pelo *gWAT* de camundongos alimentados por itens de cafeteria (*CAF*) e submetidos ao jejum intermitente (*IF*). Já os produtos secretados pelo tecido adiposo branco subcutâneo de animais submetidos à dieta padrão induziram menor percentagem de morte lítica nas células de câncer de mama quando comparado aos sobrenadantes de interação de *scWAT* de animais em jejum intermitente e em dieta de cafeteria (figura 31B).

É possível se sugerir que nem as moléculas secretadas pelo tecido adiposo branco inguinal dos camundongos (figura 31C) nem os produtos de secreção do tecido adiposo marrom dos animais (figura 31D) induziu morte lítica de células 4T1 de forma diferencial de acordo com a dieta. No entanto, verificamos que o tecido adiposo marrom induziu maior número de mortes líticas quando comparado aos tecidos adiposos brancos avaliados, induzindo aproximadamente 20% de morte lítica em nessas células neoplásicas.

Como descrito na figura 32A, os produtos de secreção do tecido adiposo branco gonadal de animais em dieta padrão induziu maior percentagem de morte apoptótica em células 4T1 quando comparado às moléculas liberadas por *gWAT* de animais submetidos ao jejum intermitente. Já os produtos secretados pelo tecido adiposo branco subcutâneo dos animais enquadrados nas diferentes dietas não modularam diferencialmente a indução de apoptose nas células de câncer de mama investigadas (figura 32B).

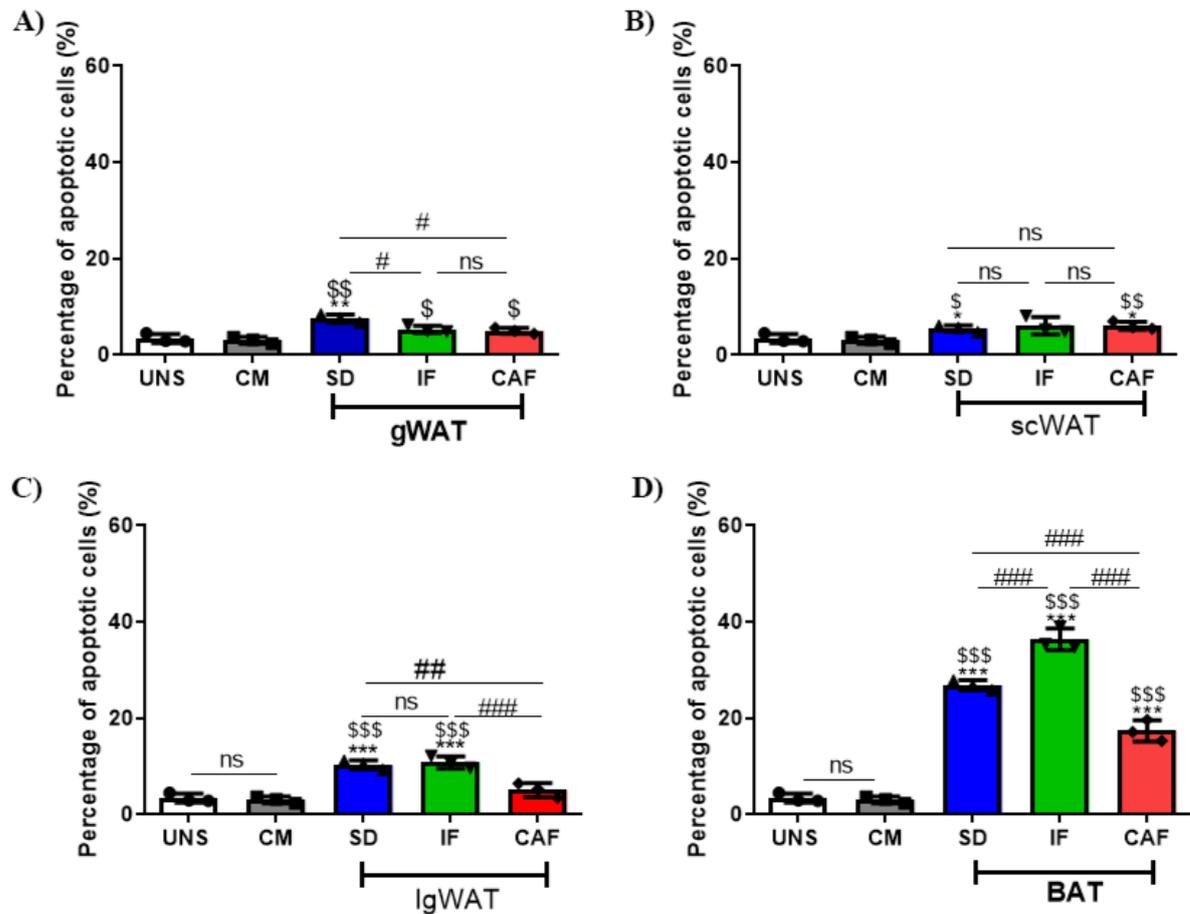
Detectamos também que o produto de secreção do tecido adiposo branco inguinal de animais em dieta de cafeteria induziu menor percentagem de morte por apoptose de células 4T1 quando comparado às moléculas secretadas por *IgWAT* de camundongos em dieta padrão e em jejum intermitente, apresentando valores comparáveis às células não-estimuladas (UNS) (figura 32C). Já os produtos de secreção do tecido adiposo marrom de camundongos submetidos ao jejum intermitente induziram elevada percentagem de morte apoptótica das células 4T1 (mais de 40%), enquanto que o meio condicionado pelo tecido adiposo marrom de animais em dieta padrão apresentou indução apoptótica intermediária e os produtos secretados pelo tecido adiposo marrom de animais em dieta de cafeteria foi o que induziu menos morte apoptótica dessas células (figura 32D). A exemplo dos achados relativos à morte lítica de células 4T1, o tecido adiposo marrom também induziu maior percentagem de apoptose nas células analisadas

quando comparado aos produtos secretados pelos outros depósitos de tecido adiposo (*IgWAT*, *gWAT* e *scWAT*). Portanto, as moléculas secretadas pelo tecido adiposo marrom apresentaram maior efeito citotóxico contra as células 4T1 quando comparado aos tecidos adiposos brancos, um efeito aumentado em animais em jejum intermitente e diminuído em camundongos em dieta de cafeteria. Além disso, as moléculas secretadas pelo tecido adiposo branco inguinal de animais em dieta de cafeteria não induziram apoptose nessas células.



**Figura 31 – Efeito de moléculas secretadas por tecidos adiposos modulados pelas diferentes dietas sobre a ocorrência de morte lítica das células 4T1.**

Células 4T1 estimuladas com produtos de secreção de tecidos adiposos brancos (A) gonadal, (B) subcutâneo, (C) inguinal e (D) tecido adiposo marrom foram investigadas quanto à ocorrência de morte lítica. Cada grupo experimental possuía oito animais (N=8). Resultados referentes a uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi representada com asteriscos (\*), as diferenças entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#) e as diferenças em relação ao controle do meio condicionado (CM) foi representada com o cifrão (\$). O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra: p<0,05 (um símbolo), p<0,01 (dois símbolos) e p<0,001 (três símbolos)



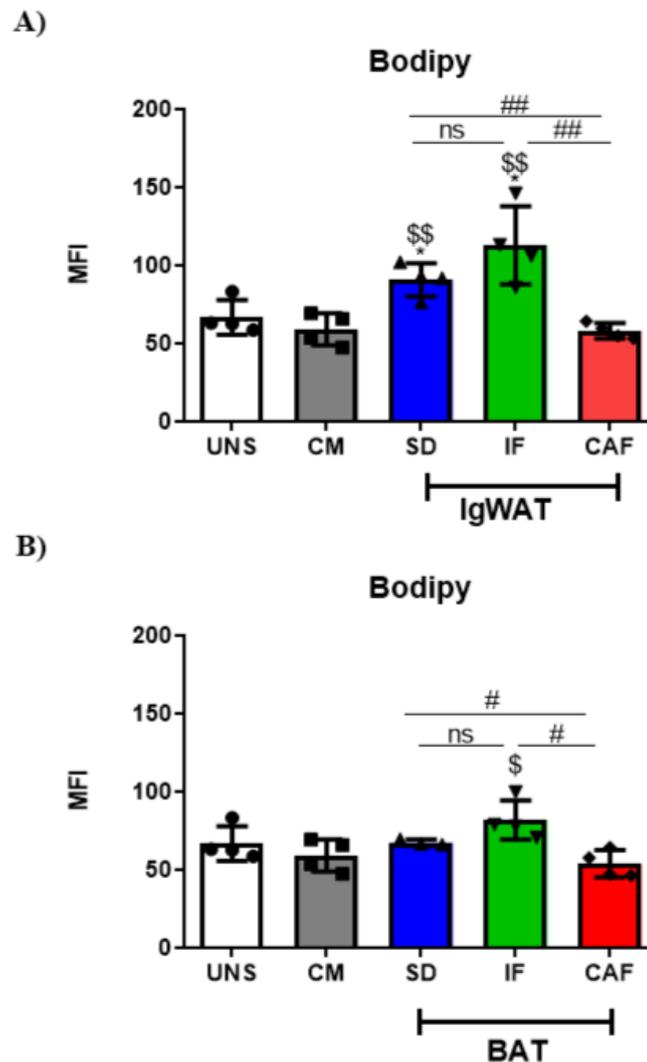
**Figura 32 – Efeito de moléculas secretadas por tecidos adiposos modulados pelas diferentes dietas sobre ocorrência de morte apoptótica das células 4T1.**

Células 4T1 estimuladas com produtos de secreção de tecidos adiposos brancos (A) gonadal, (B) subcutâneo, (C) inguinal e (D) tecido adiposo marrom foram investigadas quanto à ocorrência de morte apoptótica. Cada grupo experimental possuía oito animais (N=8). Resultados referentes a uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi representada com asteriscos (\*), as diferenças entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#) e as diferenças em relação ao controle do meio condicionado (CM) foi representada com o cifrão (\$) O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra:  $p < 0,05$  (um símbolo),  $p < 0,01$  (dois símbolos) e  $p < 0,001$  (três símbolos).

### 5.2.3 Impacto de moléculas secretadas por tecidos adiposos modulados pelas diferentes dietas sobre a biogênese de corpúsculo lipídico pelas células 4T1

Considerando a relevância das organelas corpúsculo lipídico para a fisiologia celular, avaliou-se o processo de biogênese de corpúsculo lipídico das células estimuladas com os produtos de secreção dos depósitos de tecido adiposo branco inguinal e marrom. As moléculas secretadas pelo tecido adiposo branco inguinal de animais em jejum intermitente induziram maior biogênese de CL quando comparado às condições de dieta padrão (indução intermediária) e dieta de cafeteria (ausência de indução, comparável ao não-estimulado (UNS)) (figura 33A).

Os produtos de secreção do tecido adiposo marrom de camundongos em jejum intermitente também induziram maior produção dessas organelas lipídicas contrastando-se com os produtos de secreção do tecido adiposo de animais alimentados com itens de cafeteria (figura 33B). Portanto, a prática do jejum intermitente favoreceu com que os depósitos de tecidos adiposos branco inguinal e marrom induzissem maior biogênese de CL em células 4T1 quando comparado à condição da dieta de cafeteria.



**Figura 33 – Impacto de moléculas secretadas por tecidos adiposos modulados pelas diferentes dietas sobre a biogênese de corpúsculo lipídico pelas células 4T1.**

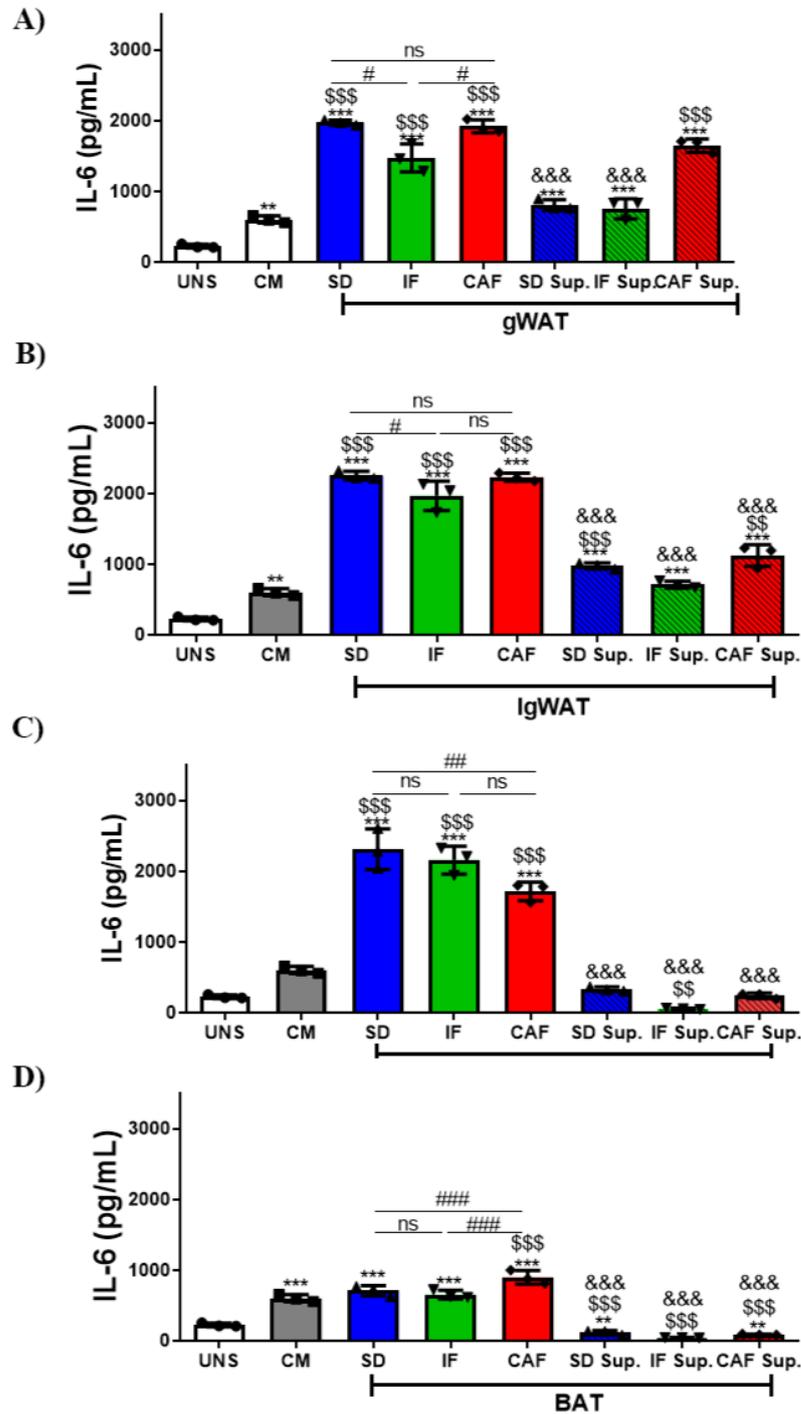
Células 4T1 foram avaliadas quanto à biogênese de corpúsculo lipídico após estímulo com meios condicionados por (A) tecido adiposo branco inguinal e (B) tecido adiposo marrom. Cada grupo experimental possuía oito animais (N=8). Resultados referentes a uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi representada com asteriscos (\*), as diferenças entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#) e as diferenças em relação ao controle do meio condicionado (CM) foi representada com o cifrão (\$). O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra:  $p < 0,05$  (um símbolo),  $p < 0,01$  (dois símbolos) e  $p < 0,001$  (três símbolos).

#### 5.2.4 Efeito de moléculas secretadas por tecidos adiposos modulados pelas diferentes dietas sobre secreção de citocinas pelas células 4T1

Considerando a relevância dos tecidos adiposos na imunidade sistêmica, avaliamos a influência dos produtos de secreção destes sobre os níveis de citocinas liberadas pelas células 4T1. Como descrito na figura 34A, células estimuladas com as moléculas secretadas pelo tecido adiposo branco gonadal de animais em jejum intermitente secretaram menores níveis da citocina pró-tumoral e pró-caquética IL-6 comparado aos produtos de secreção de *gWAT* de camundongos em dieta padrão. O mesmo efeito foi detectado quando tratamos células com os produtos de secreção do tecido adiposo branco inguinal (figura 34B). Células estimuladas com o produto de secreção do tecido adiposo branco subcutâneo derivado de animais em dieta de cafeteria apresentaram menor secreção de IL-6 quando comparado aos produtos secretados por *scWAT* de animais em dieta padrão (figura 34C). Já quando as células 4T1 foram tratadas com moléculas secretadas pelo tecido marrom de camundongos em dieta de cafeteria, houve maior secreção de IL-6 comparando com células estimuladas com o produto de secreção de *BAT* de camundongos em dieta padrão e em jejum intermitente (figura 34D).

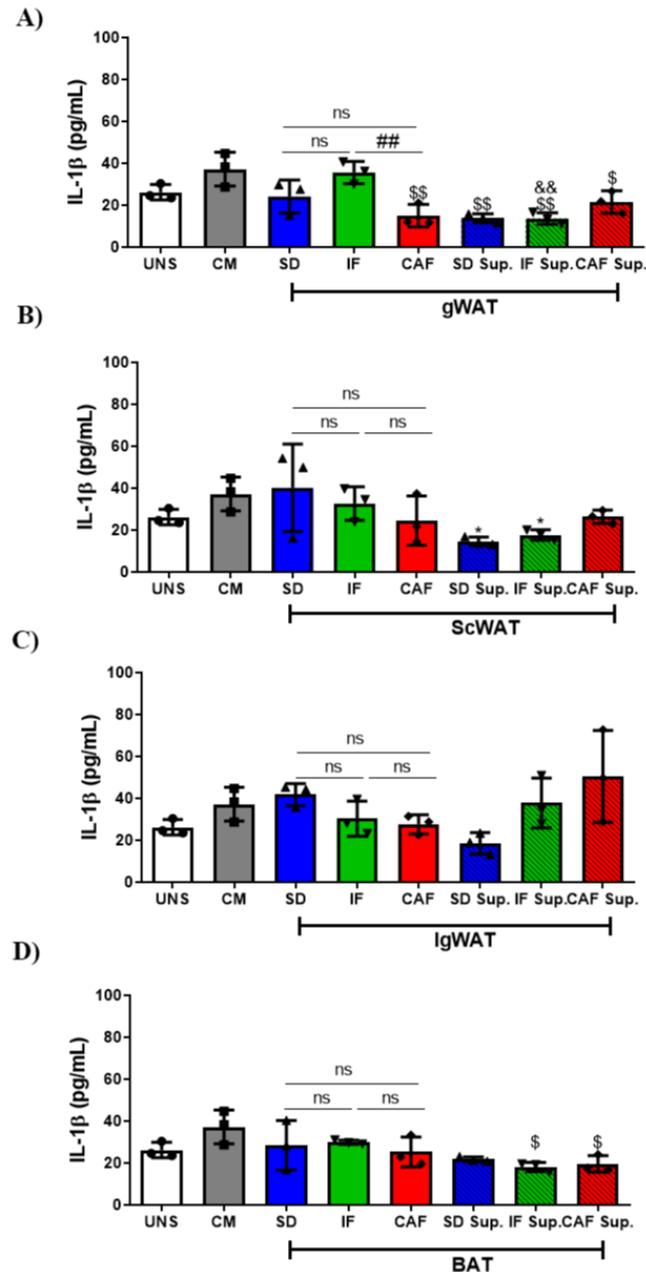
Como mostrado na figura 38A, os produtos secretados pelo tecido adiposo branco gonadal de animais em jejum intermitente induziu maior secreção da citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$  pelas células 4T1 quando comparado ao tratamento com os produtos secretados por *gWAT* de camundongos em dieta de cafeteria. Os sobrenadantes de interação dos tecidos adiposos brancos subcutâneo e inguinal (figuras 35B e C) de animais em jejum intermitente e do tecido adiposo marrom desses camundongos não modularam a secreção de IL-1 $\beta$  pelas células 4T1 (figura 35D). Detectamos também que as moléculas secretadas pelo tecido adiposo branco inguinal de animais alimentados com itens de cafeteria se mostrou mais rico nessa citocina quando comparado ao meio condicionado de *IgWAT* de animais em dieta padrão.

Células 4T1 estimuladas com os produtos de secreção dos tecidos adiposos brancos gonadal, subcutâneo e inguinal e do tecido adiposo marrom não apresentaram modulação diferencial dependente da dieta da secreção das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-10 e TGF- $\beta$  (figuras 36, 37 e 38). Portanto, as moléculas liberadas pelos tecidos adiposos brancos gonadal e inguinal de animais em jejum intermitente diminuem a secreção de IL-6 pelas células 4T1 e os produtos de secreção do tecido adiposo de animais em dieta de cafeteria aumenta a liberação de IL-6 por essas células neoplásicas. Além disso, o tecido adiposo gonadal de animais em jejum intermitente levam a maior secreção de IL-1 $\beta$  pelas células 4T1.



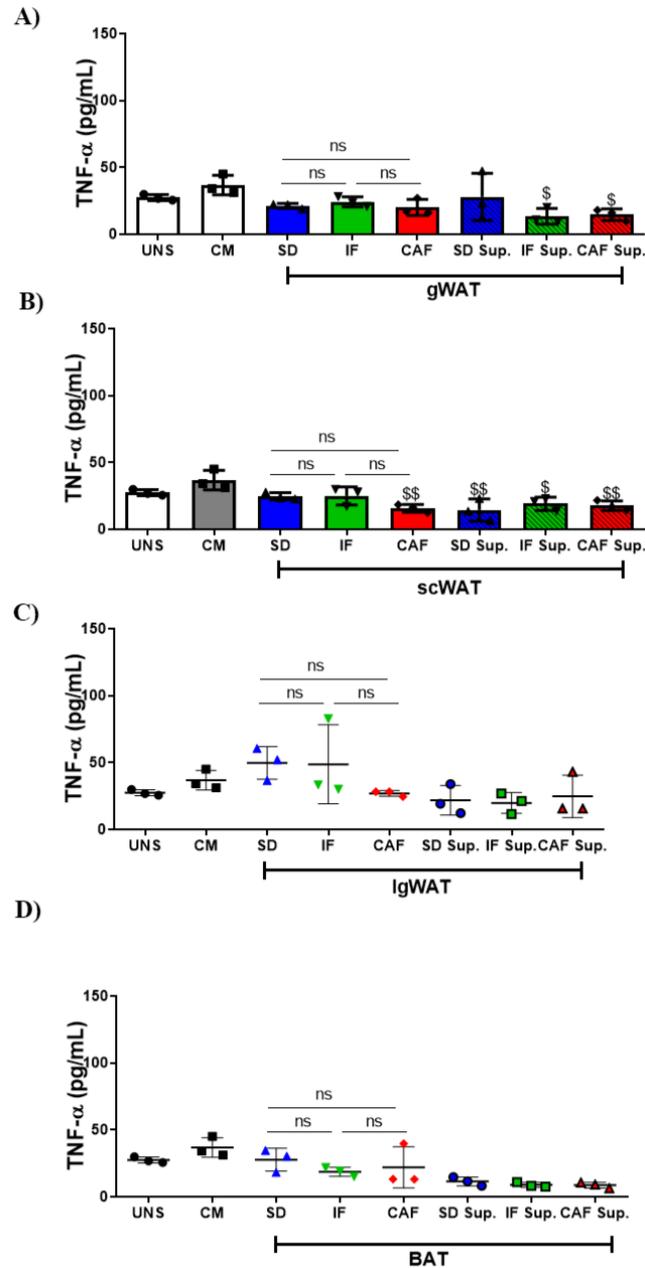
**Figura 34 – Efeito de moléculas secretadas por tecidos adiposos modulados pelas diferentes dietas sobre a secreção de IL-6 pelas células 4T1.**

Células 4T1 estimuladas com produtos de secreção de tecidos adiposos foram investigadas quanto à secreção de IL-6. Cada grupo experimental possuía oito animais (N=8). Resultados referentes à uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi representada com asteriscos (\*), e as diferenças entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#), as diferenças em relação ao controle do meio condicionado (CM) foi representada com o cifrão (\$) e as diferenças entre a dosagem do sobrenadante antes do estímulo da 4T1 (Sup.) e após o tratamento das células foi representado com &. O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra: p<0,05 (um símbolo), p<0,01 (dois símbolos) e p<0,001 (três símbolos).



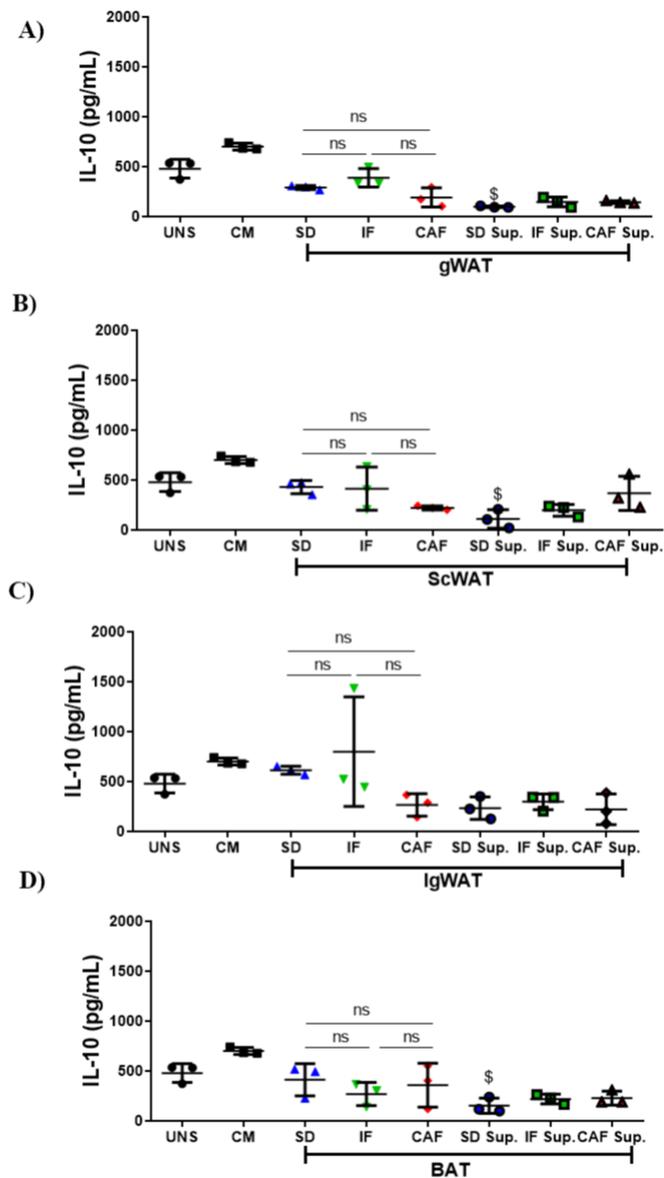
**Figura 35 – Efeito de moléculas secretadas por tecidos adiposos modulados pelas diferentes dietas sobre a secreção de IL-1β pelas células 4T1.**

Células 4T1 estimuladas com produtos de secreção de tecidos adiposos foram investigadas quanto à secreção de IL-1β. Cada grupo experimental possuía oito animais (N=8). Resultados referentes à uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi representada com asteriscos (\*), e as diferenças entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#), as diferenças em relação ao controle do meio condicionado (CM) foi representada com o cifrão (\$) e as diferenças entre a dosagem do sobrenadante antes do estímulo da 4T1 (Sup.) e após o tratamento das células foi representado com &. O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra: p<0,05 (um símbolo), p<0,01 (dois símbolos) e p<0,001 (três símbolos).



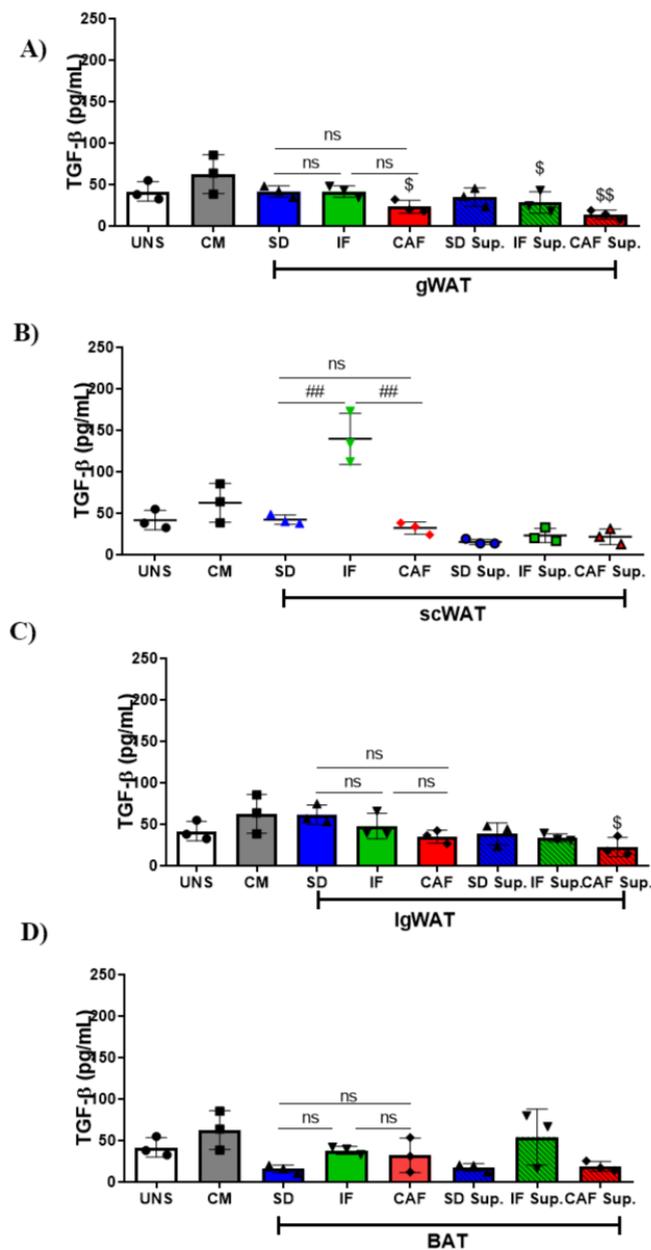
**Figura 36 – Efeito de moléculas secretadas por tecidos adiposos modulados pelas diferentes dietas sobre a secreção de TNF- $\alpha$  pelas células 4T1.**

Células 4T1 estimuladas com produtos de secreção de tecidos adiposos foram investigadas quanto à secreção de TNF- $\alpha$ . Cada grupo experimental possuía oito animais (N=8). Resultados referentes à uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi representada com asteriscos (\*), e as diferenças entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#), as diferenças em relação ao controle do meio condicionado (CM) foi representada com o cifrão (\$) e as diferenças entre a dosagem do sobrenadante antes do estímulo da 4T1 (Sup.) e após o tratamento das células foi representado com &. O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra: p<0,05 (um símbolo), p<0,01 (dois símbolos) e p<0,001 (três símbolos)



**Figura 37 – Efeito de moléculas secretadas por tecidos adiposos modulados pelas diferentes dietas sobre a secreção de IL-10 pelas células 4T1.**

Células 4T1 estimuladas com produtos de secreção de tecidos adiposos foram investigadas quanto à secreção de IL-10. Cada grupo experimental possuía oito animais (N=8). Resultados referentes à uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi representada com asteriscos (\*), e as diferenças entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#), as diferenças em relação ao controle do meio condicionado (CM) foi representada com o cifrão (\$) e as diferenças entre a dosagem do sobrenadante antes do estímulo da 4T1 (Sup.) e após o tratamento das células foi representado com &. O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra: p<0,05 (um símbolo), p<0,01 (dois símbolos) e p<0,001 (três símbolos).



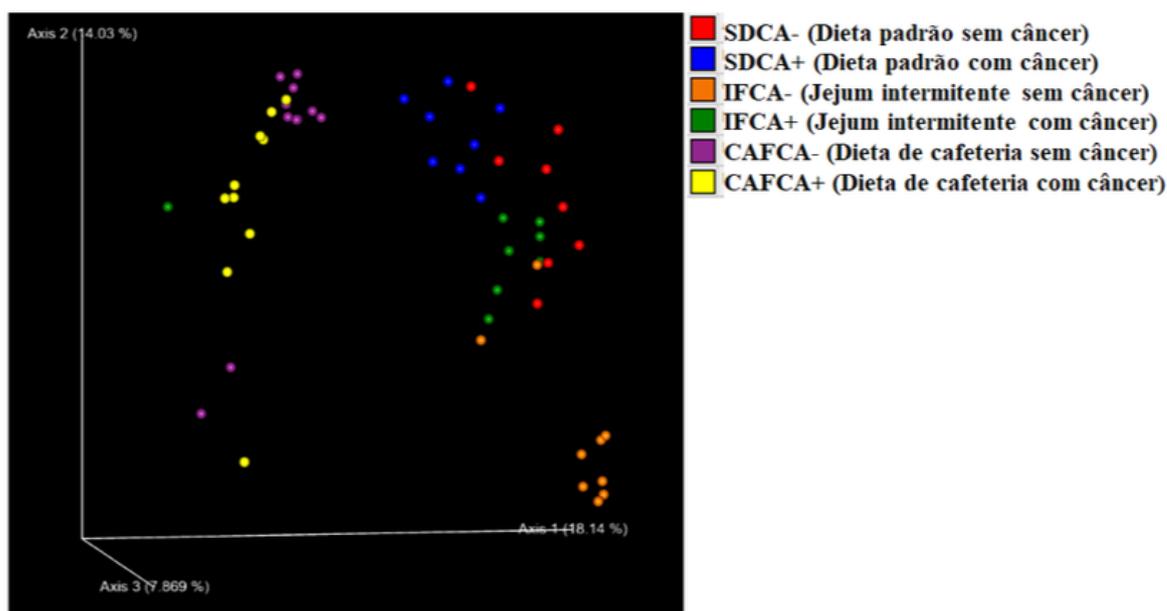
**Figura 38 – Efeito de moléculas secretadas por tecidos adiposos modulados pelas diferentes dietas sobre a secreção de TGF-β pelas células 4T1.**

Células 4T1 estimuladas com produtos de secreção de tecidos adiposos foram investigadas quanto à secreção de TGF-β. Cada grupo experimental possuía oito animais (N=8). Resultados referentes à uma réplica biológica. As diferenças estatísticas entre os grupos e seus respectivos controles foi representada com asteriscos (\*), e as diferenças entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#), as diferenças em relação ao controle do meio condicionado (CM) foi representada com o cifrão (\$) e as diferenças entre a dosagem do sobrenadante antes do estímulo da 4T1 (Sup.) e após o tratamento das células foi representado com &. O emprego dos símbolos seguiu a seguinte regra: p<0,05 (um símbolo), p<0,01 (dois símbolos) e p<0,001 (três símbolos).

### **5.3 Análise da microbiota intestinal a partir de amostras fecais dos camundongos**

#### **5.3.1 Avaliação dos efeitos do jejum intermitente, da dieta de cafeteria e do câncer de mama triplo-negativo sobre a diversidade beta do microbioma intestinal**

A fim de se investigar os efeitos do jejum intermitente, da dieta de cafeteria e do tumor de mama triplo-negativo, nós analisamos a diversidade beta utilizando análise de coordenadas principais (*Principal Coordinate analysis* – PCoA). Como ilustrado pelos três *clusteres* distintos, as três dietas (dieta padrão e de cafeteria e jejum intermitente) na ausência do câncer associam-se à microbiomas intestinais dissimilares quando considera-se a diversidade beta. Quando avalia-se o efeito do câncer sobre a diversidade beta do microbioma intestinal de camundongos BALB/c fêmeas alimentados com dieta padrão (AIN-93) verificamos grande similaridade (SDCA- e SDCA+). Um perfil parecido é verificado quando se investiga esse parâmetro ecológico comparando os grupos alimentados com itens de cafeteria na presença e ausência do câncer de mama triplo-negativo (CAFCA- e CAFCA+). Já quando analisamos os grupos submetidos ao jejum intermitente, afetados ou não pelo câncer de mama (IFCA- e IFCA+), eles são dissimilares, sugerindo que a presença do tumor associa-se a perfis distintos do microbioma intestinal de animais submetidos a esse padrão alimentar. Assim como detectado nas amostras derivadas de animais submetidos às três dietas sem o câncer de mama, a diversidade beta do microbioma intestinal de animais nas três dietas na presença da neoplasia mamária associa-se a três *clusteres* distintos, sugerindo que as dietas são preponderantes ao câncer quando considera-se os dados de diversidade beta obtidos (figura 39).



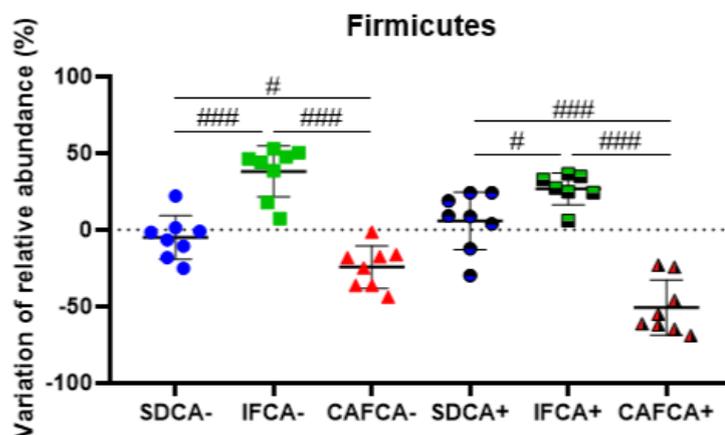
**Figura 39 – Impacto das dietas e do câncer de mama triplo-negativo sobre a diversidade do microbioma intestinal.**

Vermelho: dieta padrão sem câncer. Azul: dieta padrão. Laranja: Jejum intermitente sem câncer. Verde: Jejum intermitente com câncer. Roxo: dieta de cafeteria sem câncer. Amarelo: dieta de cafeteria com câncer. Cada grupo experimental possuiu oito animais (N=8). Resultados referentes a uma réplica biológica

### 5.3.2 Análise dos efeitos do jejum intermitente, da dieta de cafeteria e do câncer de mama triplo-negativo sobre a composição do microbioma intestinal

Visando investigar os impactos do jejum intermitente e da dieta de cafeteria sobre a composição do microbioma intestinal dos camundongos analisados, nós avaliamos a abundância relativa de diversos táxons à nível de filo e gênero. Camundongos submetidos ao jejum intermitente sem a presença do câncer (IFCA-) apresentaram aumento da abundância relativa de bactérias do filo Firmicutes quando comparado aos grupos submetidos às dieta padrão (SDCA-) e de cafeteria (CAFCA-), ambos sem câncer. Camundongos em dieta padrão apresentaram menor diminuição de bactérias do gênero Firmicutes quando comparado a animais CAFCA-. Animais submetidos à dieta padrão afetados pelo câncer (SDCA+) não apresentaram alterações da abundância relativa de bactérias do filo Firmicutes quando comparado ao seu controle respectivo sem câncer (SDCA-). Roedores submetidos ao jejum intermitente com câncer (IFCA+) não se associaram a alterações da abundância relativa de integrantes do filo Firmicutes quando comparado ao seu controle respectivo sem câncer (IFCA-). Camundongos alimentados com dieta de cafeteria acometidos pelo câncer (CAFCA+) também não apresentaram alterações nos níveis de bactérias do filo

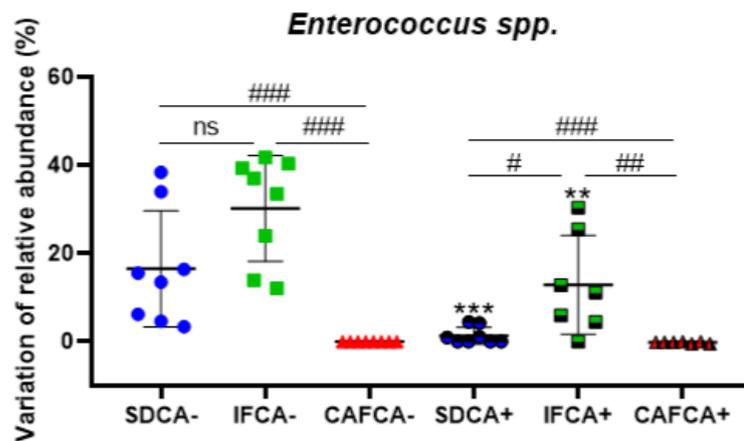
Firmicutes quando comparado ao seu controle respectivo sem câncer (CAFCA-). Animais em jejum intermitente afetados pelo câncer (IFCA+) apresentam aumento de bactérias pertencentes ao filo Firmicutes quando comparado aos grupos submetidos à dieta padrão (SDCA+) e de cafeteria (CAFCA+), ambos com câncer (figura 40).



**Figura 40 – Impacto das dietas e do câncer de mama triplo-negativo sobre a abundância relativa de Firmicutes.**

Avaliação da abundância relativa após normalização (dados de séries temporais) de bactérias do filo Firmicutes. Cada grupo experimental possuiu oito animais (N=8). As diferenças estatísticas entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego do símbolo seguiu a seguinte regra:  $p < 0,05$  (um símbolo),  $p < 0,01$  (dois símbolos) e  $p < 0,001$  (três símbolos). Resultados referentes à uma réplica biológica.

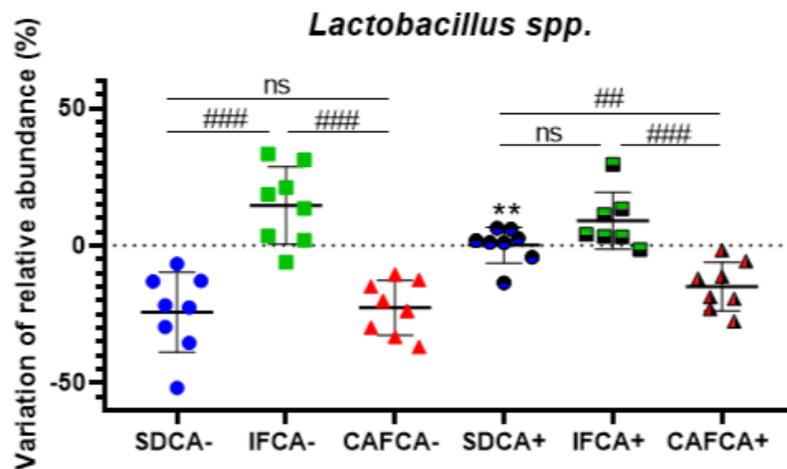
Um dos gêneros pertencentes à Firmicutes modulados pelas condições experimentais foi *Enterococcus*. Animais submetidos à dieta padrão sem câncer (SDCA-) apresentaram diminuição de bactérias do gênero *Enterococcus* quando comparado a animais submetidos ao jejum sem câncer (IFCA-) e apresentaram aumento comparando-se ao grupos dieta de cafeteria sem câncer (CAFCA-). Camundongos em jejum sem câncer (IFCA-) apresentaram aumento de *Enterococcus spp.* quando contrastando com animais em dieta de cafeteria sem a neoplasia (CAFCA-). Camundongos submetidos à dieta padrão com câncer (SDCA+) apresentaram menor aumento de bactérias do gênero *Enterococcus* quando comparado ao seu controle respectivo sem câncer (SDCA-). Animais em jejum intermitente com câncer (IFCA+) também se associaram a menor aumento de componentes do gênero *Enterococcus* quando comparado ao seu controle respectivo sem câncer (IFCA-). Roedores submetidos à dieta de cafeteria na presença do câncer (CAFCA+) não apresentaram alterações da abundância relativa de bactérias do gênero *Enterococcus* quando comparado ao seu controle respectivo sem câncer (CAFCA-). Camundongos em jejum com câncer (IFCA+) apresentaram aumento dos níveis de bactérias do gênero *Enterococcus* quando comparado aos grupos submetidos à dieta padrão (SDCA+) e de cafeteria (CAFCA+), ambos não afetados pelo câncer (figura 41).



**Figura 41 – Impacto das dietas e do câncer de mama triplo-negativo sobre a abundância relativa de *Enterococcus spp.***

Avaliação da abundância relativa após normalização (dados de séries temporais) de bactérias *Enterococcus spp.* Cada grupo experimental possui oito animais (N=8). As diferenças estatísticas entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego do símbolo seguiu a seguinte regra:  $p < 0,05$  (um símbolo),  $p < 0,01$  (dois símbolos) e  $p < 0,001$  (três símbolos). Resultados referentes à uma réplica biológica.

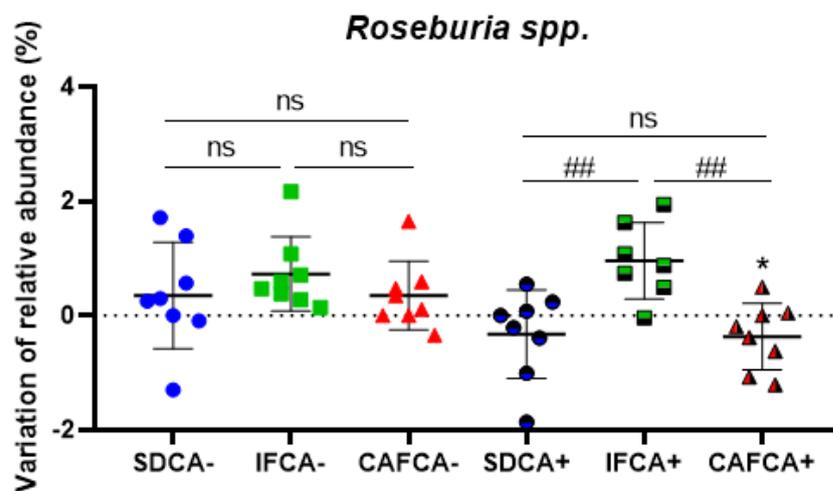
A abundância relativa de *Lactobacillus spp.* também foi influenciada pelas dietas e pelo tumor. Animais submetidos ao jejum intermitente sem a presença do câncer (IFCA-) apresentaram aumento da abundância relativa de bactérias do gênero *Lactobacillus* quando comparado aos grupos submetidos às dieta padrão (SDCA-) e de cafeteria (CAFCA-), ambos sem câncer. Camundongos em dieta padrão na ausência do câncer não apresentaram alterações nos níveis de bactérias do gênero *Lactobacillus* quando comparado a animais CAFCA-. Roedores alimentados com a dieta padrão afetados pelo câncer (SDCA+) apresentaram aumento de bactérias do gênero *Lactobacillus* quando comparado ao seu controle respectivo sem câncer (SDCA-). Animais submetidos ao jejum intermitente acometidos pelo câncer (IFCA+) não apresentaram alterações dos níveis de bactérias *Lactobacillus spp.* quando comparado ao seu controle respectivo sem câncer (IFCA-). Camundongos expostos à dieta de cafeteria não apresentaram alterações da abundância relativa de bactérias do gênero *Lactobacillus* quando comparado ao seu controle respectivo sem câncer (CAFCA-). Animais alimentados com dieta padrão com câncer (SDCA+) não apresentaram alterações nos níveis de componentes do gênero *Lactobacillus* quando comparado a animais submetidos ao jejum com câncer (IFCA+), mas apresentaram quando contrastado com o grupo dieta de cafeteria com câncer (CAFCA+). Camundongos em jejum intermitente afetados pelo câncer (IFCA+) apresentaram aumento de *Lactobacillus spp.* quando compara-se com animais em dieta de cafeteria com a neoplasia (CAFCA+) (figura 42).



**Figura 42 – Impacto das dietas e do câncer de mama triplo-negativo sobre a abundância relativa de *Lactobacillus* spp.**

Avaliação da abundância relativa após normalização (dados de séries temporais) de bactérias *Lactobacillus* spp. Cada grupo experimental possui oito animais (N=8). As diferenças estatísticas entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego do símbolo seguiu a seguinte regra:  $p < 0,05$  (um símbolo),  $p < 0,01$  (dois símbolos) e  $p < 0,001$  (três símbolos). Resultados referentes à uma réplica biológica.

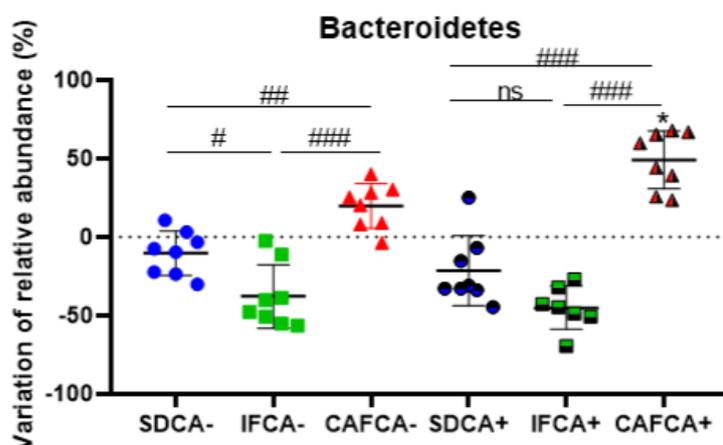
Assim como bactérias dos gêneros *Enterococcus* e *Lactobacillus*, *Roseburia* spp. também pertence ao filo Firmicutes e foi modulada pelas condições experimentais avaliadas. A abundância relativa de bactérias do gênero *Roseburia* não foi modulada comparando as três dietas (dieta padrão, jejum intermitente e dieta de cafeteria) na ausência do câncer de mama triplo-negativo. Animais submetidos à dieta padrão com câncer (SDCA+) não apresentaram alterações dos níveis de bactérias do gênero *Roseburia* quando comparado ao seu controle respectivo sem câncer (SDCA-). Camundongos submetidos ao jejum intermitente com câncer (IFCA+) não apresentaram modulações da abundância relativa de bactérias do gênero *Roseburia* quando comparado ao seu controle respectivo sem câncer (IFCA-). Roedores submetidos à dieta de cafeteria com câncer (CAFCA+) apresentaram aumento de componentes do gênero *Roseburia* quando comparado ao seu controle respectivo sem câncer (CAFCA-). Animais em jejum com câncer (IFCA+) apresentam aumento da abundância relativa de bactérias do gênero *Roseburia* quando comparado aos grupos submetidos à dieta padrão (SDCA+) e de cafeteria (CAFCA+), ambos sem câncer. Camundongos em dieta padrão com câncer (SDCA+) não apresentaram alterações dos níveis desse procarionto quando comparado aos animais em dieta de cafeteria (CAFCA+) (figura 43).



**Figura 43 – Impacto das dietas e do câncer de mama triplo-negativo sobre a abundância relativa de *Roseburia* spp.**

Avaliação da abundância relativa após normalização (dados de séries temporais) de bactérias *Roseburia* spp. Cada grupo experimental possuiu oito animais (N=8). As diferenças estatísticas entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego do símbolo seguiu a seguinte regra:  $p < 0,05$  (um símbolo),  $p < 0,01$  (dois símbolos) e  $p < 0,001$  (três símbolos). Resultados referentes à uma réplica biológica.

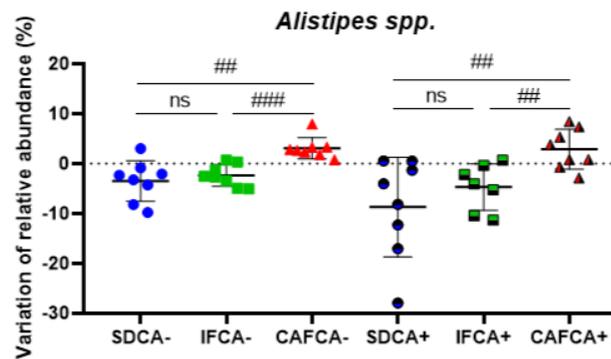
Outro filo extremamente abundante, Bacteroidetes também foi alterado nos diferentes grupos desse trabalho. Animais em dieta de cafeteria sem câncer (CAFCA-) apresentaram aumento de bactérias do filo Bacteroidetes quando comparado aos grupos submetidos à dieta padrão (SDCA-) e ao jejum intermitente (IFCA-), ambos sem câncer. Camundongos em dieta padrão apresentaram menor diminuição de Bacteroidetes quando comparado a animais IFCA-. Roedores alimentados com a dieta padrão afetados pelo câncer (SDCA+) não apresentaram alterações da abundância relativa de bactérias do filo Bacteroidetes quando comparado ao seu controle respectivo sem câncer (SDCA-). Animais submetidos ao jejum intermitente acometidos pelo câncer (IFCA+) não apresentaram alterações dos níveis de bactérias do filo Bacteroidetes quando comparado ao seu controle respectivo sem câncer (IFCA-). Camundongos submetidos à dieta de cafeteria acometidos pelo câncer (CAFCA+) apresentaram aumento de bactérias do filo Bacteroidetes quando comparado ao seu controle respectivo sem câncer (CAFCA-). Animais submetidos à dieta de cafeteria com câncer (CAFCA+) apresentaram aumento de bactérias do filo Bacteroidetes quando comparado aos animais em dieta padrão (SDCA+) e jejum intermitente (IFCA+), ambos grupos com câncer. Camundongos pertencentes ao grupo IFCA+ não apresentaram alteração de Bacteroidetes quando comparado a animais submetidos à dieta padrão com câncer (SDCA+) (figura 44).



**Figura 44 – Impacto das dietas e do câncer de mama triplo-negativo sobre a abundância relativa de Bacteroidetes.**

Avaliação da abundância relativa após normalização (dados de séries temporais) de bactérias do filo Bacteroidetes. Cada grupo experimental possui oito animais (N=8). As diferenças estatísticas entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego do símbolo seguiu a seguinte regra:  $p < 0,05$  (um símbolo),  $p < 0,01$  (dois símbolos) e  $p < 0,001$  (três símbolos). Resultados referentes à uma réplica biológica.

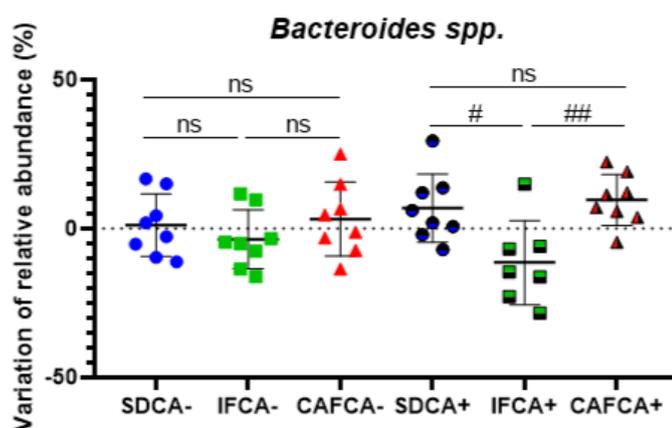
Membro do filo Bacteroidetes, a abundância relativa de *Alistipes spp.* também foi alterada dependendo da dieta e da presença ou ausência do câncer de mama triplo-negativo. Animais submetidos à dieta de cafeteria com câncer (CAFCA+) apresentaram aumento da abundância relativa de bactérias do gênero *Alistipes* quando comparado aos camundongos em dieta padrão (SDCA+) e em jejum intermitente (IFCA+), ambos afetados pela neoplasia. Camundongos do grupo IFCA+ não apresentaram alterações de *Alistipes spp.* quando contrastado a animais submetidos à dieta padrão com câncer (SDCA+). Animais alimentados com dieta padrão com câncer (SDCA+) não apresentaram alterações dos níveis de integrantes do gênero *Alistipes* quando comparado ao seu controle respectivo sem câncer (SDCA-). Roedores submetidos ao jejum intermitente afetados pelo câncer (IFCA+) não apresentaram alterações da abundância relativa de bactérias do gênero *Alistipes* quando comparado ao seu controle respectivo sem câncer (IFCA-). Animais em dieta de cafeteria com câncer (CAFCA+) não apresentaram alterações dos níveis bactérias do gênero *Alistipes* quando comparado ao seu controle respectivo sem câncer (CAFCA-). Roedores submetidos à dieta de cafeteria com câncer (CAFCA+) apresentaram aumento de bactérias do gênero *Alistipes* quando comparado aos animais em dieta padrão (SDCA+) e jejum intermitente (IFCA+), ambos acometidos pelo câncer. Camundongos do grupo IFCA+ não apresentaram alteração de *Alistipes spp.* quando comparado a animais submetidos à dieta padrão com câncer (SDCA+) (figura 45).



**Figura 45 – Impacto das dietas e do câncer de mama triplo-negativo sobre a abundância relativa de *Alistipes* spp.**

Avaliação da abundância relativa após normalização (dados de séries temporais) de bactérias *Alistipes* spp. Cada grupo experimental possui oito animais (N=8). As diferenças estatísticas entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego do símbolo seguiu a seguinte regra:  $p < 0,05$  (um símbolo),  $p < 0,01$  (dois símbolos) e  $p < 0,001$  (três símbolos). Resultados referentes à uma réplica biológica.

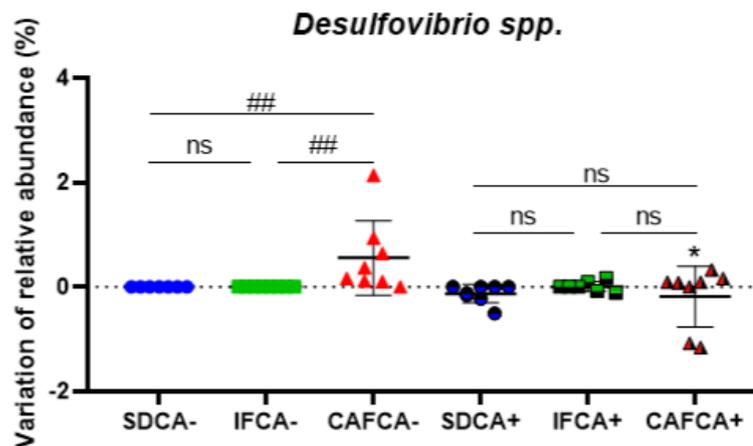
Também pertencente ao filo Bacteroidetes, o gênero *Bacteroides* também foi avaliado no presente estudo. A abundância relativa de bactérias do gênero *Bacteroides* não foi modulada comparando as três dietas (dieta padrão, jejum intermitente e dieta de cafeteria) na ausência do câncer de mama triplo-negativo. Animais submetidos à dieta padrão com câncer (SDCA+) não apresentaram alterações do níveis de bactérias do gênero *Bacteroides* quando comparado ao seu controle respectivo sem câncer (SDCA-). A ausência de modulação da abundância relativa de *Bacteroides* spp. também foi detectada quando se contrasta camundongos submetidos ao jejum intermitente com câncer (IFCA+) ao seu controle respectivo sem câncer (IFCA-) e quando compara-se roedores alimentados com dieta de cafeteria com câncer (CAFCA+) aos animais pertencentes ao grupo CAFCA-. Animais em jejum intermitente afetados pelo câncer (IFCA+) apresentaram diminuição de bactérias do gênero *Bacteroides* quando comparado aos grupos submetidos à dieta padrão (SDCA+) e de cafeteria (CAFCA+), ambos sem câncer. Camundongos em dieta padrão com câncer (SDCA+) não apresentaram alteração de *Bacteroides* spp. quando comparado aos animais em dieta de cafeteria (CAFCA+) (figura 46).



**Figura 46 – Impacto das dietas e do câncer de mama triplo-negativo sobre a abundância relativa de *Bacteroides spp.***

Avaliação da abundância relativa após normalização (dados de séries temporais) de bactérias *Bacteroides spp.* Cada grupo experimental possui oito animais (N=8). As diferenças estatísticas entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego do símbolo seguiu a seguinte regra:  $p < 0,05$  (um símbolo),  $p < 0,01$  (dois símbolos) e  $p < 0,001$  (três símbolos). Resultados referentes à uma réplica biológica.

Já o gênero *Desulfovibrio* é um membro do filo Desulfobacterota. Camundongos alimentados com a dieta de cafeteria na ausência do câncer (CAFCA-) apresentaram aumento da abundância relativa de bactérias do gênero *Desulfovibrio* quando comparado aos grupos submetidos à dieta padrão (SDCA-) e ao jejum intermitente (IFCA-), ambos sem câncer. Camundongos em dieta padrão sem câncer não apresentaram alterações nos níveis de *Desulfovibrio* quando comparado a animais do grupo IFCA-. Animais submetidos à dieta padrão afetados pelo câncer (SDCA+) não apresentaram alterações da abundância relativa de bactérias do gênero *Desulfovibrio* quando comparado ao seu controle respectivo sem câncer (SDCA-). Roedores submetidos ao jejum intermitente com câncer (IFCA+) também não se associaram a modulações dos níveis desses procaríotos quando comparado ao seu controle respectivo sem câncer (IFCA-). Camundongos alimentados com dieta de cafeteria afetados pelo câncer (CAFCA+) apresentaram diminuição da abundância relativa de *Desulfovibrio spp.* quando comparado ao seu controle respectivo com câncer (CAFCA-). Animais alimentados com a dieta padrão afetados pelo câncer de mama triplo-negativo (SDCA+) não apresentaram alterações dos níveis de componentes do gênero *Desulfobacteria* quando comparados a camundongos em dieta de cafeteria com câncer (CAFCA+), bem como quando contrastado com roedores submetidos ao jejum intermitente acometidos pela neoplasia (IFCA+) (figura 47).

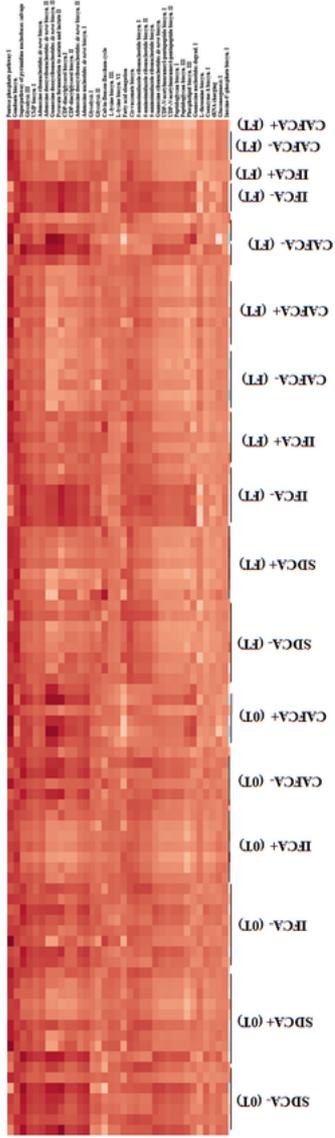


**Figura 47 – Impacto das dietas e do câncer de mama triplo-negativo sobre a abundância relativa de *Desulfovibrio spp.***

Avaliação da abundância relativa após normalização (dados de séries temporais) de bactérias *Desulfovibrio spp.* Cada grupo experimental possui oito animais (N=8). As diferenças estatísticas entre grupos que não são controles respectivos foi representado com jogo da velha (#). O emprego do símbolo seguiu a seguinte regra:  $p < 0,05$  (um símbolo),  $p < 0,01$  (dois símbolos) e  $p < 0,001$  (três símbolos). Resultados referentes à uma réplica biológica.

### 5.3.3 Análise dos efeitos do jejum intermitente, da dieta de cafeteria e do câncer de mama triplo-negativo sobre a diversidade metabólica do microbioma intestinal

A fim de se avaliar o efeito do jejum intermitente e da dieta de cafeteria na presença e ausência da malignidade mamária triplo-negativa sobre a diversidade metabólica do microbioma intestinal dos animais investigados, nós conduzimos uma análise de enriquecimento de vias metabólicas, como ilustrado pelas figuras 48 e 49. Detectamos que camundongos submetidos ao jejum intermitente apresentaram aumento de mais de 40 vias metabólicas associadas à microbiota intestinal quando comparado a todos os outros grupos experimentais, incluindo diversas vias de biossíntese de nucleotídeo, de acetato e lactato, além de vias de biossíntese de peptidoglicana. Verificamos que todas essas vias foram reduzidas nos roedores em jejum intermitente afetados pelo câncer. Todas as 40 vias que estão aumentadas no microbioma intestinal de animais em jejum intermitente se apresentaram reduzidas em amostras de microbioma derivadas de animais em dieta de cafeteria, sugerindo a ocorrência de redução da diversidade metabólica do microbioma intestinal nesse grupo. A presença do câncer de mama triplo-negativo também se associou à redução da diversidade metabólica do microbioma quando se comparou com seus respectivos controles sem o câncer.



**Figura 48 – Impacto das dietas e do câncer de mama triplo-negativo sobre a diversidade metabólica do microbioma intestinal (grupo 1 de vias metabólicas).**

Avaliação da ativação de vias metabólicas do microbioma intestinal. O aumento da ativação das vias foi representado por um degradê de vermelho claro vermelho escuro e a redução de vias foi representada por um degradê de azul claro a azul escuro grupo experimental possuiu oito animais (N=8). Resultados referentes a uma réplica biológica.





## 6 Discussão

No presente estudo, avaliamos a influência do jejum intermitente e da dieta de cafeteria na progressão do câncer de mama triplo-negativo e caracterizamos a modulação dos tecidos adiposos e da microbiota intestinal nesse contexto. Diversos estudos avaliando o efeito de dietas obesogênicas em roedores vêm empregando a dieta hiperlipídica (*High-fat diet - HFD*) (Speakman, 2019). No entanto, a *HFD* não simula precisamente a dieta ocidental por não incluir alguns nutrientes consumidos por humanos e por se associar a uma menor disfunção vascular quando comparado à dieta de cafeteria (Lalanza and Snoeren, 2021). Ademais, Zeeni e colaboradores demonstraram que a dieta de cafeteria leva a um maior ganho de peso e ao aumento da adiposidade abdominal em um período mais curto que a *HFD* (Zeeni et al., 2015).

Sabe-se que a dieta de cafeteria é extremamente inflamatória (Sampey *et al.*, 2011). Estudos com roedores sugerem que a dieta de cafeteria se associa à inflamação no fígado e em depósitos adiposos, leva às disfunções metabólicas (Sampey *et al.*, 2011) e vascular (Lang *et al.*, 2019) e altera o comportamento alimentar desses animais, favorecendo a ocorrência da hiperfagia (Lalanza and Snoeren, 2021).

No presente estudo, mostramos que os animais alimentados com itens de cafeteria, tanto sem câncer como com tumor de mama, apresentaram aumento do peso corpóreo, da massa de depósitos adiposos brancos, da esteatose hepática e dos níveis de colesterol circulantes quando contrasta-se com os outros dois grupos (SD e IF). Ademais, demonstramos que camundongos submetidos à dieta de cafeteria apresentaram alterações morfológicas nos tecidos adiposos branco inguinal e marrom indicativas de branqueamento. Considerando as alterações aqui descritas, as quais comumente se associam ao fenótipo obeso (Reilly & Saltiel, 2017) (Rutkowski et al., 2015) (Chalasanani et al., 2017) (M. Longo et al., 2019b), sugerimos que os animais alimentados com itens de cafeteria no presente trabalho desenvolveram obesidade.

Também demonstramos que os camundongos submetidos ao jejum intermitente em dias alternados apresentaram redução do peso, modificações morfológicas que sugerem a ocorrência de amarronzamento do tecido adiposo branco inguinal e redução do acúmulo de lipídeos no fígado. Análises futuras avaliando marcadores de amarronzamento do tecido adiposo branco (UCP1, PGC-1 $\alpha$ , CIDEA, PRDM16, PPAR $\gamma$ ) e de processos inflamatórios que corroborem com o fenótipo do branqueamento enriquecerão o presente trabalho. Com base nos nossos achados, sugerimos que o modelo de jejum foi ao encontro com outros estudos que empregaram esse padrão alimentar (Li *et al.*, 2017) (I. Ikeda et al., 2014). Ressaltamos que o jejum intermitente também se associou a alterações morfológicas no tecido adiposo marrom dos animais, as quais se assemelharam às detectadas por Fernández e outros em um modelo de rato (Fernández et al., 2021). Análises adicionais de marcadores de função do tecido adiposo marrom e termogênese, incluindo UCP1 serão conduzidas a fim de se determinar o efeito da prática do jejum em dias alternados no tecido adiposo marrom de camundongos BALB/c.

A ocorrência de inflamação correlaciona-se com todos os estágios de desenvolvimento de diversos tipos de câncer, como o câncer de mama, influenciando desde a iniciação até a metástase da neoplasia (Grivennikov et al., 2010) (Crusz & Balkwill, 2015). Ademais, é sabido que o tumor de mama triplo-negativo induzido por 4T1 associa-se ao aumento de processos inflamatórios em animais acometidos com esse câncer (Madera et al., 2015) (duPre' & Hunter, 2007). A célula 4T1 é hoje bem estabelecida como um modelo experimental animal de tumor mamário (Pulaski et al., 2000). No presente estudo, mostramos que a maioria dos animais inoculados com essas células desenvolveram tumores macroscópicos associados à ocorrência de metástase hepática e apresentaram aumento do número de células imunológicas circulantes, elevação do volume plaquetário e da percentagem de plaquetas gigantes, bem como elevação da massa esplênica. Considerando esses achados, sugerimos que estes camundongos apresentaram alterações inflamatórias a nível sistêmico, especialmente os animais em dieta de cafeteria, os quais mostraram aumento do volume médio das plaquetas quando comparado às outras duas condições de dieta em animais acometidos pelo câncer de mama.

duPre' e Hunter demonstraram que a inoculação de células de câncer de mama triplo-negativo 4T1 em camundongos BALB/c fêmeas leva ocorrência de esplenomegalia associada à granulocitose (duPre' & Hunter, 2007). Verificamos no presente trabalho que esses fenômenos são modulados pelas dietas às quais o roedor é submetido: animais submetidos à dieta de cafeteria acometidos pela neoplasia apresentaram maior esplenomegalia e granulocitose quando comparado aos camundongos em jejum intermitente, também afetados pelo tumor. Interessantemente, detectamos que o câncer de mama mediado pela 4T1 não induziu granulocitose nos roedores submetidos ao jejum em dias alternados, indicando que essa dieta pode ter um efeito protetor contra os efeitos inflamatórios característicos do aumento dos níveis de granulócitos na circulação.

Neste trabalho, sugerimos que o câncer de mama triplo-negativo mediado por células 4T1 levou os camundongos com este cancer a apresentarem aumento do volume médio das plaquetas circulantes, especialmente animais alimentados com itens de cafeteria. Tais achados associaram-se com a elevação na percentagem de plaquetas gigantes no plasma desses animais. Sabe-se que as plaquetas possuem função central nos processos de progressão e metástase de tumores (Mezouar et al., 2016). O volume médio das plaquetas, medida comumente empregada para se avaliar o tamanho dos trombócitos, é um indicador de ativação desses elementos (Gasparyan et al., 2011). Alterações no volume médio das plaquetas foi descrito em tumores de estômago, pulmão, ovário e no câncer de mama (Gasparyan et al., 2011). Ademais, o volume plaquetário médio é considerado um importante marcador de inflamação em diversas doenças inflamatórias (Kapsoritakis et al., 2001) (Yazici et al., 2010) (Kisacik et al., 2008). Considerando que os trombócitos interagem com leucócitos e secretam mediadores pro-inflamatórios quando ativados (Margraf & Zarbock, 2019), nós hipotetizamos que o aumento do volume desses elementos pode contribuir para o fenótipo inflamatório dos animais acometidos pelo tumor de mama. Análises do perfil de mediadores do plasma dos animais, como citocinas, eicosanoides e adipocinas, serão conduzidas a fim de avaliar nossa hipótese.

Nós detectamos que os tumores primários formados nos animais em dieta de cafeteria apresentaram maior massa, volume, potencial proliferativo e capacidade metastática quando comparado aos grupos de dieta padrão e em jejum intermitente. Já analisando-se os tumores formados no grupo impactado pelo câncer de mama que foi submetido ao jejum intermitente, verificamos menor massa, volume, potencial proliferativo e capacidade metastática quando contrasta-se com animais em dieta de cafeteria. Além disso, detectamos que dois animais desse grupo, que foram transplantados com células neoplásicas mamárias, não apresentaram formação de tumores macroscópicos, sugerindo que o jejum impactou na iniciação tumoral nesses animais. Esses achados indicam que a dieta de cafeteria e o jejum intermitente se associam a efeitos distintos sobre parâmetros do tumor primário e ocorrência de metástase hepática em camundongos acometidos pelo tumor de mama mediado por 4T1.

Um estudo conduzido por Lee e colaboradores indicou que a prática do jejum intermitente por camundongos por períodos que variaram entre 48 a 60 h associou-se à diminuição da massa de tumores (C. Lee et al., 2012). No presente estudo, não verificamos alteração na massa tumoral dos animais em jejum intermitente quando comparado a camundongos em dieta padrão, mas detectamos que a prática do jejum alterou parâmetros do neoplasma que pode se associar a um melhor prognóstico, como a ocorrência a redução do número de eventos metastáticos para o fígado. Estimulamos análises futuras investigando a relação entre o período de duração do jejum e a intensidade da metástase hepática.

Detectamos também que todas as condições afetadas pelo câncer de mama triplo-negativo apresentaram aumento de esteatose hepática em camundongos em dietas padrão e de cafeteria, intermitente indicando a ocorrência de inflamação no fígado dos animais. Verificamos que não houve aumento de esteatose em animais submetidos ao jejum afetados pelo neoplasia e, por isso, sugerimos que os efeitos do jejum intermitente sobre o metabolismo de lipídeos hepáticos apresenta ação protetora contra a ocorrência de esteatose hepática mediada pela 4T1. Considerando a íntima relação entre processos inflamatórios hepáticos e a ativação de vias de lipogênese, análises futuras incluirão quantificação dos níveis de mediadores inflamatórios dos tecidos hepáticos dos animais investigados, incluindo TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ .

Considerando que as dietas e o câncer de mama associaram-se a diferentes características histológicas hepáticas e que o fígado é um órgão central no metabolismo lipídico, participando de diversos estágios da síntese e transporte lipídico, avaliamos o perfil lipídico plasmático dos animais. Detectamos neste estudo que o tumor de mama leva à diminuição de colesterol total em todos animais. Sugerimos que os níveis alterados de colesterol total no plasma dos camundongos acometidos pelo tumor mamário associa-se ao consumo dessas moléculas por células neoplásicas para geração de oxisterois, metabólitos com ação imunossupressora que impactam na ocorrência de metástase (Huang et al., 2020).

Neste estudo, descrevemos que o tumor de mama triplo-negativo induzido por células 4T1 leva à ocorrência de processos inflamatórios no tecido adiposo marrom de camundongos BALB/c fêmeas, eventos que podem afetar a progressão do tumor de mama. O tecido adiposo

marrom derivado de animais com câncer apresentou elevação dos níveis de TNF- $\alpha$ , mediador clássico da inflamação que impacta diretamente na sensibilidade à insulina tecidual (Akash et al., 2018). Já quando avaliamos IL-6 no tecido adiposo marrom dos animais, mediador classicamente pró-tumoral e pró-caquético (Han et al., 2018), esta se mostrou aumentada apenas no grupo de camundongos em dieta de cafeteria impactados pelo câncer. A análise histológica do tecido adiposo marrom desses animais apresentou alterações morfológicas que podem sugerir a ocorrência de dano tecidual e fibrose nesse tecido, indicativo de atividade inflamatória. Esses achados sugerem que tumores de mama formados por 4T1 levam à disrupção da homeostase de células imunológicas que compoem o tecido adiposo marrom, uma vez que são estas as células que mais contribuem nos níveis de citocinas teciduais (Lu et al., 2019). Analisaremos os níveis de marcadores de lipogênese, lipólise e termogênese nos tecidos adiposos marrons a fim de se confirmar a ocorrência de inflamação e determinar o impacto desta na função do tecidos. Já quando avaliamos o tecido adiposo marrom dos animais com câncer, detectamos maior presença de adipócitos apresentando grandes gotículas de gordura e de células imunológicas comprando-se com seus respectivos controles sem câncer, também indicando a ocorrência de processos inflamatórios neste tecido. A análise dos marcadores citados também será crucial para se entender os efeitos da prática do jejum intermitente sobre o fenótipo do tecido adiposo marrom na presença do câncer de mama triplo-negativo.

O presente trabalho foi o primeiro a descrever que o câncer de mama triplo-negativo mediado por células 4T1 induz processos inflamatórios em depósitos adiposos de camundongos. Encorajamos fortemente que esforços futuros estabeleçam mecanismos pelos quais esse tumor mamário influencia a inflamação de tecidos adiposos. E acreditamos que, a fim de se compreender como o câncer de mama influencia o estado inflamatório dos tecidos adiposos nas diferentes dietas, é necessário buscar entender como esses tecidos, impactados pelas distintas dietas, afetam o tumor. Para isso, avaliamos o impacto de moléculas secretadas por depósitos de tecido adiposo de camundongos fêmeas sobre parâmetros carcinogênicos de células de câncer de mama murino 4T1.

Buscando avaliar se os produtos de secreção dos depósitos adiposos influenciaram parâmetros carcinogênicos das células de câncer de mama triplo-negativo 4T1, analisamos proliferação, perfil de morte celular, biogênese de corpúsculo lipídico e secreção de citocinas por essas células neoplásicas e observamos que esses depósitos adiposos não influenciaram a proliferação dessas células, mas afetou o perfil de morte celular, a biogênese de corpúsculo lipídico e o padrão de secreção de citocinas. Nós mostramos que moléculas derivadas do tecido adiposo marrom induzem maior porcentagem de morte lítica em células 4T1 quando comparado aos depósitos de tecido adiposo branco. A morte celular lítica associa-se a liberação de moléculas, que são reconhecidas por células imunológicas via receptores de reconhecimento de padrões moleculares (Galluzzi et al., 2018)(Garg et al., 2015). Considerando que a inflamação apresenta papel dúbio no contexto do câncer de mama, análises adicionais serão importantes para se determinar o impacto da indução de mortes líticas pelo tecido adiposo marrom.

Moléculas secretadas pelo tecido adiposo marrom também se associaram à maior indução de morte apoptótica de células 4T1 quando comparado com depósitos adiposo brancos, o que sugere que o tecido adiposo marrom pode apresentar maior ação anti-tumoral em camundongos comparando-se aos outros depósitos adiposos. Descrevemos que o jejum intermitente é associado a um perfil mais pró-apoptótico do tecido adiposo marrom e a dieta de cafeteria correlaciona com menor indução de apoptose em células 4T1 quando comparados aos produtos de secreção do tecido oriundo de animais em dieta padrão. Avaliando também os efeitos do produto de secreção do tecido adiposo branco inguinal de animais em dieta de cafeteria sobre células 4T1 verificamos que este não induziu citotoxicidade sobre essas células. Diversos fármacos em investigação que favorecem a ocorrência de regressão tumoral induzem apoptose em células neoplásicas (Carneiro & El-Deiry, 2020). Nós hipotetizamos, com base nos achados referentes à morte celular apoptótica de células 4T1, que moléculas derivadas do tecido adiposo marrom de animais em jejum intermitente podem favorecer regressão tumoral e melhor prognóstico. O presente estudo será enriquecido com ensaios de sobrevivência dos animais nas diferentes dietas acometidos ou não pelo câncer de mama.

Verificamos também que as moléculas secretadas pelos depósitos adiposos impactam diferencialmente sobre a biogênese de CL dessas células. Observamos que estimular células 4T1 com sobrenadante de tecido adiposo marrom de animais em jejum intermitente leva à maior biogênese de CL quando comparado com o tratamento utilizando moléculas derivadas do tecido de camundongos em dieta de cafeteria. Verificamos também que células expostas a produtos de secreção do tecido adiposo branco inguinal de animais em jejum também apresentam produção aumentada dessas organelas lipídicas quando comparado aos outros dois grupos. Considerando os efeitos das moléculas secretadas pelos tecidos adiposos na indução de morte apoptótica e que durante situações de estresse celular ocorre elevação da biogênese de CL (Jarc & Petan, 2019), sugerimos que esse aumento detectado correlaciona com estado de estresse da célula. Análises de função mitocondrial e produção de espécies reativas serão conduzidas a fim de se melhor detalhar os efeitos das moléculas derivadas de tecidos adiposos de animais submetidos ao jejum sobre células de câncer de mama.

Considerando os efeitos induzidos por moléculas derivadas dos tecidos adiposos influenciados pelas dietas sobre as células 4T1, avaliamos o perfil de citocinas secretadas por estas células neoplásicas em cada condição. Verificamos que as células de câncer de mama secretam menos IL-6 quando estimuladas com produtos de secreção de depósitos de tecido adiposo branco gonadal e inguinal de animais submetidos ao jejum intermitente quando comparado aos produtos secretados pelos tecidos de animais em dieta padrão. Observamos também que células tratadas com as moléculas secretadas pelo tecido adiposo marrom de animais submetidos à dieta de cafeteria secretam maiores níveis de IL-6 quando se contrasta com células estimuladas com moléculas derivadas de tecidos de animais em dieta padrão e em jejum intermitente. Presente em níveis elevados em diversos tipos de câncer, inclusive no câncer de mama (Dethlefsen et al., 2013), a citocina IL-6 é associada à inibição de apoptose (Lin et al.,

2001)(Jourdan et al., 2003) e ao favorecimento de angiogênese tumoral (Wei et al., 2003) e de metástase (Oh et al., 2013) (Zou et al., 2016). Hipotetizamos que os efeitos de moléculas derivadas dos diferentes depósitos de tecido adiposo influenciados pelos padrões alimentares afetam as características da neoplasia, já que animais em jejum intermitente apresentaram menor grau de metástase hepática quando comparado a animais em dieta de cafeteria.

Nossos achados mostram o quão impactantes são os padrões alimentares praticados sobre a plasticidade funcional do tecido adiposo. Além disso, ressaltam a necessidade de se utilizar a dieta como possível mecanismo modulador da progressão do câncer de mama triplo-negativo. Outro fator que é sabidamente influenciável pela dieta é a microbiota intestinal. O gene do RNAr 16S, apesar de ser altamente conservado entre as bactérias, apresentam regiões variáveis que podem ser exploradas para se distinguir diferentes espécies. O sequenciamento do gene do RNAr 16S é uma técnica amplamente utilizada para análise metagenômica de amostras de microbiota intestinal por possibilitar a identificação de um número elevado de bactérias, em diferentes níveis taxonômicos (Bukin *et al.*, 2019). Utilizando o sequenciamento do gene do RNAr 16S, nós descrevemos que a prática do jejum intermitente em dias alternados e o consumo de itens de cafeteria modulam a microbiota intestinal de camundongos BALB/c fêmeas afetados pelo câncer de mama triplo-negativo. Mostramos também que essas alterações são ao nível de diversidade e de composição dessa comunidade microbiana.

Foley e colaboradores descreveram que o consumo a curto prazo (dias) de nutrientes ricos em energia e pobres em fibra já é suficiente para modular a microbiota intestinal de camundongos (Foley *et al.*, 2018). Em outro estudo, Siracusa e outros demonstraram que o consumo desses nutrientes, além de modular a microbiota intestinal, induz depressão imune da mucosa intestinal e suprime a imunidade sistêmica dos roedores, favorecendo redução da saúde metabólica de células T CD4+ e da produção de citocinas (Siracusa *et al.*, 2023). Considerando os impactos de dietas na microbiota intestinal e no sistema imunológico, analisaremos se os itens de cafeteria utilizados no presente trabalho também influenciam imunidade de mucosa e sistêmica, avaliando o perfil de ativação de linfócitos intestinais intraepiteliais, da lâmina própria e do soro dos camundongos.

Diversos autores vêm explorando os efeitos do jejum intermitente em modelos murinos de câncer, incluindo de tumores mamários (Anemoulis *et al.*, 2023). Diversos modelos murinos de jejum intermitente demonstram que essa dieta se associa a modulação da composição e diversidade do microbioma intestinal de animais, alterações que podem contribuir para os benefícios fisiológicos oriundos dessa prática (Li *et al.*, 2017) (Li *et al.*, 2020) (Cignarella *et al.*, 2018). Dois trabalhos investigaram o impacto do câncer de mama triplo-negativo em animais alimentados com ração normolipídica *ad libitum* (Ji *et al.*, 2023) (Hinshaw *et al.*, 2022). No entanto, nenhum estudo avaliou a composição e a diversidade do microbioma intestinal de camundongos submetidos ao jejum na presença do câncer de mama triplo-negativo. Ademais, apenas um trabalho investigou modulações no microbioma intestinal de camundongos alimentados com dieta de cafeteria e acometidos pelo câncer de mama triplo-negativo (Hossain *et al.*, 2021), mas o número de amostras analisadas foi pequeno e a dieta empregada não utilizava itens de cafeteria

consumidos por humanos. Portanto, faz-se necessário avaliar o efeito do jejum intermitente e da dieta de cafeteria sobre camundongos afetados pela neoplasia mamária triplo-negativa.

Neste estudo, nós detectamos que às três dietas e o câncer de mama triplo-negativo modulam diferentemente a diversidade do microbioma intestinal. Também verificamos que às condições experimentais investigadas favorecem a modulação da abundância relativa dos microorganismos dessa comunidade a nível de filo. Enquanto os grupos submetidos ao jejum intermitente apresentaram aumento de bactérias pertencentes ao filo Firmicutes, animais em dieta de cafeteria se associaram à redução dos níveis desses procariotos no microbioma intestinal. Detectamos que os efeitos das dietas investigadas sobre os níveis de Firmicutes não foram influenciados pela presença do câncer de mama triplo-negativo. Firmicutes, grupo composto apenas por bactérias Gram-positivas, é um dos filos mais abundantes da microbiota intestinal (Magne *et al.*, 2020) (An, Kwon and Kim, 2023) (Chung *et al.*, 2020). Em camundongos, tanto o jejum intermitente diário como o praticado em dias alternados associa-se ao aumento da abundância relativa de bactérias do filo Firmicutes (Li *et al.*, 2020)(Li *et al.*, 2017), sendo o último modelo o empregado neste estudo. Já quando se avalia dietas obesogênicas e obesidade, estudos com roedores mostram dados controversos, com alguns correlacionando o fenótipo obeso com o aumento de Firmicutes (Velasquez, 2018) (Jiao *et al.*, 2018) e outros detectando a diminuição de bactérias pertencentes a esse filo quando no contexto da obesidade (Gual-Grau *et al.*, 2023)(Del Bas *et al.*, 2018).

Estudos investigando a abundância relativa de integrantes do filo Firmicutes em indivíduos acometidos por neoplasias mamárias triplo-negativas sugerem que a malignidade se associa à diminuição dessas bactérias da microbiota intestinal (An, Kwon and Kim, 2023). Em um elegante estudo, Jordan e colaboradores descreveram que bactérias intestinais do filo Firmicutes controlam a imunidade sistêmica do hospedeiro via a ação de seus glicoconjugados de membrana sobre a produção de IL-34 por macrófagos. Essa citocina medeia mecanismos de tolerância e resistência a agentes infecciosos (Jordan *et al.*, 2023). Análises adicionais serão necessárias para se compreender se essas bactérias possuem ação similar no contexto do câncer de mama triplo-negativo.

Nós descrevemos nesse estudo que animais submetidos ao jejum intermitente em dias alternados, na presença ou ausência do câncer de mama triplo-negativo, apresentam aumento da abundância relativa de bactérias do gênero *Enterococcus*, as quais pertencem ao filo Firmicutes. Esse é o primeiro estudo que descreve alterações da abundância relativa de *Enterococcus spp.* como consequência da prática do jejum intermitente. Procariotos do gênero *Enterococcus* são células esféricas ou ovóides, ocorrem na natureza sozinhas, em pares ou em cadeias, são Gram-positivas e são anaeróbicas obrigatórias (catalase-negativas) (Staley, Dunny and Sadowsky, 2014)(García-Solache and Rice, 2019)(Krawczyk *et al.*, 2021). Atualmente, *E. faecium*, *E. faecalis* e *E. durans* vêm sendo empregadas como probióticos no manejo de doenças respiratórias e gastrointestinais e no favorecimento da resposta imunológica antitumoral (Taban, Dogan Halkman and Halkman, 2014). Sabe-se que essas bactérias conseguem produzir a poliamina

cadaverina, a qual é sintetizada a partir da descarboxilação da lisina (Ma *et al.*, 2017). Utilizando o modelo de câncer triplo-negativo mediado por 4T1 em camundongos BALB/c fêmeas, Kovács e colaboradores mostraram que a cadaverina pode apresentar ação antitumoral por associar-se a tumores com menores grau, massa e metástase quando comparado a roedores não tratados (Kovács *et al.*, 2019). Considerando que os nossos dados sugerem que o jejum intermitente se associa à redução de metástase hepática e a dieta de cafeteria leva ao aumento desse processo de invasão, e considerando que abundância relativa de *Enterococcus spp.* apresentou uma correlação inversa com metástase no modelo investigado no presente trabalho, análises futuras incluirão a dosagem da cadaverina em tecidos oriundos dos animais.

No presente trabalho, nós também investigamos a abundância relativa dos gêneros pertencentes a Firmicutes *Lactobacillus spp.* e *Roseburia spp.* e verificamos que estes foram modulados de acordo com a condição experimental. Procariotos dos gêneros *Lactobacillus spp.* são células em formato de bastão, ocorrem na natureza sozinhas, são Gram-positivas, são anaeróbicas facultativas e são as bactérias mais empregadas como probiótico (Dempsey and Corr, 2022)(Kullar *et al.*, 2023). Diferentemente de *Lactobacillus spp.*, integrantes do gênero *Roseburia* são anaeróbicas obrigatórias, mas também podem ser utilizadas como probiótico (Tamanai-Shacoori *et al.*, 2017). Ambos os gêneros são compostos por produtores de ácidos graxos de cadeia curta, moléculas que são geradas a partir da fermentação de fibras dietéticas (Cronin *et al.*, 2021). Os ácidos graxos de cadeia curta apresentam diversas propriedades, incluindo fornecimento de energia, ativação de receptores acoplado à proteína G, inibição de histona-desacetilases (HDACs), modulação da secreção de IL-18 no epitélio intestinal e favorecimento da formação de linfócitos T regulatórios produtoras de IL-10 (Koh *et al.*, 2016)(Ikeda *et al.*, 2022). Já no contexto do câncer, incluindo em neoplasmas mamários, estudos sugerem que essas moléculas favorecem morte apoptótica, inibe invasão, migração e progressão do ciclo celular e associa-se ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, e, portanto, podem ter ação antitumoral (Son and Cho, 2023).

Nós verificamos que a prática do jejum intermitente em animais não-acometidos com o câncer de mama triplo-negativo se associa ao aumento dos níveis de *Lactobacillus spp.*. Rangan e outros também detectaram que a prática do jejum intermitente leva ao aumento dos níveis de procariotos do gênero *Lactobacillus*, sugerindo que este procarioto pode ter ação benéfica no modelo murino de colite investigado (Rangan *et al.*, 2019). Quando avaliamos a abundância relativa dessa bactéria de camundongos em jejum intermitente acometidos pela malignidade mamária triplo-negativo, não detectamos alterações quando comparado ao grupo de dieta padrão, sugerindo que o tumor possui efeitos sobre os níveis dessa bactéria. Diferentemente, roedores alimentados com a dieta de cafeteria, tanto na presença como na ausência do tumor mamário analisado, apresentaram redução da abundância relativa de *Lactobacillus spp.*, indicando que o baixo consumo de fibras, como no caso de animais desses grupos experimentais, favorece a extinção dessas bactérias produtoras de ácidos graxos de cadeia curta. Sonnenburg e colaboradores mostraram que ocorre extinção de alguns táxons no microbioma intestinal de camundongos

em casos em que os níveis consumidos de carboidratos acessíveis à microbiota são baixos (Sonnenburg *et al.*, 2016), assim como dietas com abundância de fibras modulam o microbioma intestinal, favorecendo o crescimento de bactérias que as utilizam como nutrientes (Cronin *et al.*, 2021). Considerando as propriedades antineoplásicas dos ácidos graxos de cadeia curta e os nossos achados que diferem animais afetados pelo tumor de mama triplo-negativo submetidos ao jejum intermitente de roedores alimentados com a dieta de cafeteria, análises futuras incluirão a quantificação dos ácidos graxos de cadeia curta, principalmente o butirato, em diferentes tecidos dos animais.

Firmicutes e Bacteroidetes representam os filos mais predominantes no microbiota intestinal de indivíduos adultos, sendo Bacteroidetes o maior filo de bactérias Gram-negativas. A interação desses microorganismos com o hospedeiro humano influencia a manutenção da homeostase (Gibiino *et al.*, 2018), por serem conectados com processos de digestão de nutrientes, absorção de energia e imunomodulação. Portanto, no contexto da microbiota intestinal, bactérias do filo Bacteroidetes podem ser consideradas comensais e mutualistas por contribuírem para a manutenção da homeostase do hospedeiro. No entanto, disfunções dessa interação, como nas causada pelo desbalanço da abundância relativa de seus membros, pode associar-se a diversas enfermidades, doenças inflamatórias intestinais, infecções, autoimunidade e câncer. No presente estudo, nós descrevemos que o jejum intermitente em dias alternados se associa à redução da abundância relativa do filo Bacteroidetes, enquanto que a dieta de cafeteria composta por itens consumidos por humanos favorece o aumento dessas bactérias. Essa modulação ocorre de forma similar nos respectivos grupos afetados com câncer de mama triplo-negativo.

Pertencentes ao filo Bacteroidetes, *Alistipes* e *Bacteroides* são gêneros compostos por bactérias em formato de bastão que ocorrem sozinhas na natureza, são Gram-negativas e anaeróbicas obrigatórias (Parker *et al.*, 2020) (Zafar and Saier, 2021). No presente estudo, nós relatamos que a dieta de cafeteria se associa ao aumento da abundância relativa de microorganismos pertencentes ao gênero *Alistipes* na ausência e presença do câncer de mama triplo-negativo. Nós também informamos que, apesar de apresentar níveis aumentados em animais em dieta de cafeteria não-afetados pelo tumor, bactérias do gênero *Bacteroides* foram detectadas como elevadas em camundongos alimentados com itens de cafeteria afetados pela malignidade. Bactérias do gênero *Alistipes* são Gram-negativas (possuem LPS) e quando aumentadas podem influenciar os níveis de LPS circulantes, endotoxemia e bacteremia (Parker *et al.*, 2020). Utilizando modelos *in vitro* e *in vivo*, Guo e colaboradores mostraram que o LPS induz permeabilidade intestinal por afetar as junções de oclusão e favorecer o aumento de TLR-4 e CD14 na superfície de enterócitos (Guo *et al.*, 2013). Considerando as modulações mediadas pelo jejum intermitente e pela dieta de cafeteria, na presença ou ausência da malignidade, sobre a abundância relativa de bactérias dos gêneros *Alistipes* e *Bacteroides*, análises futuras avaliando os níveis de circulantes de LPS e integridade intestinal enriquecerão a busca para relacionar esses dois táxons com os fenótipos observados.

Pertencente ao filo Desulfobacterota, bactérias do gênero *Desulfovibrio* são microorganismos em formato de bastão que ocorrem sozinhas na natureza, são Gram-negativas, anaeróbicas obrigatórias e compoem o grupo de bactérias redutoras de enxofre (Singh, Carroll-Portillo and Lin, 2023). Por também influenciar os níveis de LPS, aumento dos níveis de *Desulfovibrio spp.* é comumente associado à redução da integridade intestinal. Ademais, por produzirem sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) como produto final da via dissimulatória de redução de sulfato, procariotos do gênero *Desulfovibrio* podem possuir papel importante no contexto do câncer. Estudos sugerem que o sulfeto de hidrogênio pode estimular a produção mitocondrial de ATP e favorece a manutenção da organização e do reparo de DNA dessas organelas (Szabo, 2021). Mostramos aqui que a abundância relativa dessas bactérias foi modulada pelo fenótipo obeso.

No presente estudo, nós detectamos que o microbioma intestinal de camundongos em jejum intermitente apresentaram aumento do número de vias metabólicas, dados que sugerem aumento da diversidade de genes associado à prática do jejum intermitente. Essas vias são reduzidas na comunidade microbiana de animais em dieta de cafeteria. Verificamos também que o câncer de mama triplo-negativo se associa à redução do número de vias metabólicas quando comparado aos seus respectivos controles. Nossos dados sugerem que o jejum intermitente e a dieta de cafeteria correlacionam com modulações na diversidade metabólica do microbioma intestinal de roedores de formas distintas. Com base nos nossos achados, nós sugerimos que a prática do jejum intermitente, na presença e ausência do câncer de mama triplo-negativo, favorece aumento da diversidade metabólica e a dieta de cafeteria se associa à redução desse parâmetro em camundongos BALB/c fêmeas.

## 7 Conclusão

No presente estudo, investigamos se o tecido adiposo e a microbiota intestinal podem contribuir para os efeitos do jejum intermitente e da dieta de cafeteria no câncer de mama de camundongos BALB/c fêmeas. Verificamos que essas dietas induziram efeitos divergentes sobre parâmetros metabólicos e inflamatórios desses animais, além de influenciarem diferentemente as características do tumor primário e capacidade metastática. Nossos achados indicam que os produtos de secreção dos depósitos adiposos apresentaram efeitos divergentes sobre células de câncer de mama murino dependendo da dieta à qual o camundongo foi submetido, mediando efeitos principalmente sobre o perfil de morte dessas células e a secreção de IL-6 por estas. Sugerimos que o jejum intermitente e a dieta de cafeteria também se associaram a efeitos divergentes sobre a microbiota intestinal dos roedores, principalmente modulando diferencialmente táxons que podem influenciar o estado inflamatório do hospedeiro e táxons com potencial ação antitumoral e afetando a diversidade metabólica dessa comunidade microbiana. Portanto, sugerimos que o tecido adiposo e a microbiota intestinal podem ser mediadores dos efeitos do jejum intermitente e da dieta de cafeteria sobre o câncer de mama triplo-negativo em camundongos BALB/c fêmeas.

## 8 Referências bibliográficas

Álvarez-Mercado, A. I. *et al.* (2023) 'Gut Microbiota and Breast Cancer: The Dual Role of Microbes', *Cancers*, 15(2). doi: 10.3390/cancers15020443.

An, J., Kwon, H. and Kim, Y. J. (2023) 'The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio as a Risk Factor of Breast Cancer', *Journal of Clinical Medicine*, 12(6). doi: 10.3390/jcm12062216.

Anemoulis, M. *et al.* (2023) 'Intermittent Fasting in Breast Cancer: A Systematic Review and Critical Update of Available Studies', *Nutrients*, 15(3), pp. 1–15. doi: 10.3390/nu15030532.

Anhê, F. F. *et al.* (2021) 'Metabolic endotoxemia is dictated by the type of lipopolysaccharide', *Cell Reports*, 36(11). doi: 10.1016/j.celrep.2021.109691.

Del Bas, J. M. *et al.* (2018) 'Alterations in gut microbiota associated with a cafeteria diet and the physiological consequences in the host', *International Journal of Obesity*, 42(4), pp. 746–754. doi: 10.1038/ijjo.2017.284.

Bawaneh, A. *et al.* (2022) 'Intestinal Microbiota Influence Doxorubicin Responsiveness in Triple-Negative Breast Cancer', *Cancers*, 14(19). doi: 10.3390/cancers14194849.

Bourdeau-Julien, I. *et al.* (2023) 'The diet rapidly and differentially affects the gut microbiota and host lipid mediators in a healthy population', *Microbiome*. BioMed Central, 11(1), pp. 1–16. doi: 10.1186/s40168-023-01469-2.

Bui, T. I. *et al.* (2023) 'Probiotic induced synthesis of microbiota polyamine as a nutraceutical for metabolic syndrome and obesity-related type 2 diabetes', *Frontiers in Endocrinology*, 13(January), pp. 1–10. doi: 10.3389/fendo.2022.1094258.

Bukin, Y. S. *et al.* (2019) 'The effect of 16s rRNA region choice on bacterial community metabarcoding results', *Scientific Data*. The Author(s), 6, pp. 1–14. doi: 10.1038/sdata.2019.7.

Chung, Y. W. *et al.* (2020) 'Functional dynamics of bacterial species in the mouse gut microbiome revealed by metagenomic and metatranscriptomic analyses', *PLoS ONE*, 15(1), pp. 1–19. doi: 10.1371/journal.pone.0227886.

Cignarella, F. *et al.* (2018) 'Intermittent Fasting Confers Protection in CNS Autoimmunity by Altering the Gut Microbiota', *Cell Metabolism*, 27(6), p. 1222–1235.e6. doi: 10.1016/j.cmet.2018.05.006.

Collins, S. L. *et al.* (2023) 'Bile acids and the gut microbiota: metabolic interactions and impacts on disease', *Nature Reviews Microbiology*. Springer US, 21(4), pp. 236–247. doi: 10.1038/s41579-022-00805-x.

Cornejo-Pareja, I. *et al.* (2019) 'Importance of gut microbiota in obesity', *European Journal of Clinical Nutrition*. Springer US, 72, pp. 26–37. doi: 10.1038/s41430-018-0306-8.

Corrêa, L. H., Heyn, G. S. and Magalhaes, K. G. (2019) 'The impact of the adipose organ plasticity on inflammation and cancer progression', *Cells*, 8(7), pp. 1–18. doi: 10.3390/cells8070662.

Cronin, P. *et al.* (2021) 'Dietary fibre modulates the gut microbiota', *Nutrients*, 13(5), pp. 1–22. doi: 10.3390/nu13051655.

Crovesy, L., Masterson, D. and Rosado, E. L. (2020) 'Profile of the gut microbiota of adults with obesity: a systematic review', *European Journal of Clinical Nutrition*. Springer US, 74(9), pp. 1251–1262. doi: 10.1038/s41430-020-0607-6.

Deleu, S. *et al.* (2021) 'Short chain fatty acids and its producing organisms: An overlooked therapy for IBD?', *EBioMedicine*, 66. doi: 10.1016/j.ebiom.2021.103293.

Dempsey, E. and Corr, S. C. (2022) 'Lactobacillus spp. for Gastrointestinal Health: Current and Future Perspectives', *Frontiers in Immunology*, 13(March 2020), pp. 1–15. doi: 10.3389/fimmu.2022.840245.

Devoy, C., Flores Bueso, Y. and Tangney, M. (2022) 'Understanding and harnessing triple-negative breast cancer-related microbiota in oncology', *Frontiers in Oncology*, 12(November), pp. 1–20. doi: 10.3389/fonc.2022.1020121.

Dubik, M., Pilecki, B. and Moeller, J. B. (2022) 'Commensal Intestinal Protozoa—Underestimated Members of the Gut Microbial Community', *Biology*, 11(12), pp. 1–17. doi: 10.3390/biology11121742.

Dyck, L. and Lynch, L. (2023) 'Diverse effects of obesity on antitumor immunity and immunotherapy', *Trends in Molecular Medicine*. Elsevier Ltd, 29(2), pp. 112–123. doi: 10.1016/j.molmed.2022.11.004.

Eisenstein, M. (2020) 'The hunt for a healthy microbiome', *Nature*, 577(7792). doi: 10.1038/d41586-020-00193-3.

Fan, Y. and Pedersen, O. (2021) 'Gut microbiota in human metabolic health and disease', *Nature Reviews Microbiology*. Springer US, 19(1), pp. 55–71. doi: 10.1038/s41579-020-0433-9.

Farré-Maduell, E. and Casals-Pascual, C. (2019) 'The origins of gut microbiome research in Europe: From Escherich to Nissle', *Human Microbiome Journal*, 14. doi: 10.1016/j.humic.2019.100065.

Foley, K. P. *et al.* (2018) 'Long term but not short term exposure to obesity related microbiota promotes host insulin resistance', *Nature Communications*, 9(1), pp. 1–15. doi: 10.1038/s41467-018-07146-5.

Forslund, S. K. (2023) 'Fasting intervention and its clinical effects on the human host and microbiome', *Journal of Internal Medicine*, 293(2), pp. 166–183. doi: 10.1111/joim.13574.

García-Solache, M. and Rice, L. B. (2019) 'The enterococcus: A model of adaptability to its environment', *Clinical Microbiology Reviews*, 32(2), pp. 1–28. doi: 10.1128/CMR.00058-18.

Gasaly, N., de Vos, P. and Hermoso, M. A. (2021) 'Impact of Bacterial Metabolites on Gut Barrier Function and Host Immunity: A Focus on Bacterial Metabolism and Its Relevance for Intestinal Inflammation', *Frontiers in Immunology*, 12(May), pp. 1–16. doi: 10.3389/fimmu.2021.658354.

Gauthier, A. E., Rotjan, R. D. and Kagan, J. C. (2022) 'Lipopolysaccharide detection by the innate immune system may be an uncommon defence strategy used in nature', *Open Biology*, 12(10). doi: 10.1098/rsob.220146.

Gibiino, G. *et al.* (2018) ‘Exploring Bacteroidetes: Metabolic key points and immunological tricks of our gut commensals’, *Digestive and Liver Disease*. Editrice Gastroenterologica Italiana, 50(7), pp. 635–639. doi: 10.1016/j.dld.2018.03.016.

Gual-Grau, A. *et al.* (2023) ‘Physiological, metabolic and microbial responses to obesogenic cafeteria diet in rats: The impact of strain and sex’, *Journal of Nutritional Biochemistry*. Elsevier Inc., 117, p. 109338. doi: 10.1016/j.jnutbio.2023.109338.

Guo, S. *et al.* (2013) ‘Lipopolysaccharide causes an increase in intestinal tight junction permeability in vitro and in vivo by inducing enterocyte membrane expression and localization of TLR-4 and CD14’, *American Journal of Pathology*. American Society for Investigative Pathology, 182(2), pp. 375–387. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.10.014.

Guo, Y. *et al.* (2021) ‘Intermittent Fasting Improves Cardiometabolic Risk Factors and Alters Gut Microbiota in Metabolic Syndrome Patients’, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 106(1), pp. 64–79. doi: 10.1210/clinem/dgaa644.

Hilty, M. *et al.* (2010) ‘Disordered microbial communities in asthmatic airways’, *PLoS ONE*, 5(1). doi: 10.1371/journal.pone.0008578.

Hinshaw, D. C. *et al.* (2022) ‘Hedgehog blockade remodels the gut microbiota and the intestinal effector CD8+ T cells in a mouse model of mammary carcinoma’, *Laboratory Investigation*. United States & Canadian Academy of Pathology, 102(11), pp. 1236–1244. doi: 10.1038/s41374-022-00828-1.

Hooper, L. V. and Gordon, J. I. (2001) ‘Commensal host-bacterial relationships in the gut’, *Science*, 292(5519), pp. 1115–1118. doi: 10.1126/science.1058709.

Hossain, F. *et al.* (2021) ‘Obesity modulates the gut microbiome in triple-negative breast cancer’, *Nutrients*, 13(10), pp. 1–15. doi: 10.3390/nu13103656.

Hou, K. *et al.* (2022) ‘Microbiota in health and diseases’, *Signal Transduction and Targeted Therapy*. Springer US, 7(1). doi: 10.1038/s41392-022-00974-4.

Huang, M. *et al.* (2022) *Economic and Humanistic Burden of Triple-Negative Breast Cancer: A Systematic Literature Review*, *PharmacoEconomics*. Springer International Publishing. doi: 10.1007/s40273-021-01121-7.

Ikeda, T. *et al.* (2022) ‘Short-chain fatty acid receptors and gut microbiota as therapeutic targets in metabolic, immune, and neurological diseases’, *Pharmacology and Therapeutics*. Elsevier Inc., 239, p. 108273. doi: 10.1016/j.pharmthera.2022.108273.

Ji, X. *et al.* (2023) ‘Construction of model animals to explore intestinal microbiome for detection of breast cancer’, *PLoS ONE*, 18(5 MAY), pp. 1–13. doi: 10.1371/journal.pone.0280971.

Jiao, N. *et al.* (2018) ‘Gut microbiome may contribute to insulin resistance and systemic inflammation in obese rodents: A meta-analysis’, *Physiological Genomics*, 50(4), pp. 244–254. doi: 10.1152/physiolgenomics.00114.2017.

Jordan, C. K. I. *et al.* (2023) ‘Symbiotic Firmicutes establish mutualism with the host via innate tolerance and resistance to control systemic immunity’, *Cell Host and Microbe*. The Author(s), 31(9), p. 1433–1449.e9. doi: 10.1016/j.chom.2023.07.008.

Kendig, M. D. *et al.* (2022) ‘Adolescent exposure to a solid high-fat, high-sugar “cafeteria” diet leads to more pronounced changes in metabolic measures and gut microbiome composition than liquid sugar in female rats’, *Appetite*, 172(November 2021). doi: 10.1016/j.appet.2022.105973.

Kim, K. A. *et al.* (2012) ‘High Fat Diet-Induced Gut Microbiota Exacerbates Inflammation and Obesity in Mice via the TLR4 Signaling Pathway’, *PLoS ONE*, 7(10). doi: 10.1371/journal.pone.0047713.

Koh, A. *et al.* (2016) ‘From dietary fiber to host physiology: Short-chain fatty acids as key bacterial metabolites’, *Cell*, 165(6), pp. 1332–1345. doi: 10.1016/j.cell.2016.05.041.

Koh, A. and Bäckhed, F. (2020) ‘From Association to Causality: the Role of the Gut Microbiota and Its Functional Products on Host Metabolism’, *Molecular Cell*, 78(4), pp. 584–596. doi: 10.1016/j.molcel.2020.03.005.

Kopp, W. (2019) ‘How western diet and lifestyle drive the pandemic of obesity and civilization diseases’, *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity*, 12, pp. 2221–2236. doi: 10.2147/DMSO.S216791.

Kovács, T. *et al.* (2019) ‘Cadaverine, a metabolite of the microbiome, reduces breast cancer aggressiveness through trace amino acid receptors’, *Scientific Reports*, 9(1), pp. 1–14. doi: 10.1038/s41598-018-37664-7.

Krawczyk, B. *et al.* (2021) ‘The many faces of enterococcus spp.—commensal, probiotic and opportunistic pathogen’, *Microorganisms*, 9(9), pp. 1–20. doi: 10.3390/microorganisms9091900.

Kullar, R. *et al.* (2023) ‘Lactobacillus Bacteremia and Probiotics: A Review’, *Microorganisms*, 11(4), pp. 1–14. doi: 10.3390/microorganisms11040896.

de la Garza, A. L. *et al.* (2023) ‘Characterization of the Cafeteria Diet as Simulation of the Human Western Diet and Its Impact on the Lipidomic Profile and Gut Microbiota in Obese Rats’, *Nutrients*, 15(1). doi: 10.3390/nu15010086.

Lalanza, J. F. and Snoeren, E. M. S. (2021) ‘The cafeteria diet: A standardized protocol and its effects on behavior’, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. Elsevier Ltd, 122(November 2020), pp. 92–119. doi: 10.1016/j.neubiorev.2020.11.003.

Lang, P. *et al.* (2019) ‘Effects of different diets used in diet-induced obesity models on insulin resistance and vascular dysfunction in C57BL/6 mice’, *Scientific Reports*, 9(1), pp. 1–14. doi: 10.1038/s41598-019-55987-x.

Lederberg, B. J. and McCray, A. T. (2001) ‘ $\hat{\text{e}}^{\text{TM}}$  Ome Sweet  $\hat{\text{e}}^{\text{TM}}$  Omics— A Genealogical Treasury of Words’, *The Scientist*, 15(7), p. 8.

Lee, C. J., Sears, C. L. and Maruthur, N. (2020) ‘Gut microbiome and its role in obesity and insulin resistance’, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1461(1), pp. 37–52. doi: 10.1111/nyas.14107.

Li, D. *et al.* (2023) 'Intermittent fasting activates macrophage migration inhibitory factor and alleviates high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group UK, 13(1), pp. 1–9. doi: 10.1038/s41598-023-40373-5.

Li, G. *et al.* (2017) 'Intermittent Fasting Promotes White Adipose Browning and Decreases Obesity by Shaping the Gut Microbiota', *Cell Metabolism*. Cell Press, 26(4), p. 672–685.e4. doi: 10.1016/j.cmet.2017.08.019.

Li, L. *et al.* (2020) 'The effects of daily fasting hours on shaping gut microbiota in mice', *BMC Microbiology*. BMC Microbiology, 20(1), pp. 1–8. doi: 10.1186/s12866-020-01754-2.

Li, X. *et al.* (2022) 'The Oral Microbiota: Community Composition, Influencing Factors, Pathogenesis, and Interventions', *Frontiers in Microbiology*, 13(April), pp. 1–19. doi: 10.3389/fmicb.2022.895537.

Liu, J. *et al.* (2022) 'Functions of Gut Microbiota Metabolites, Current Status and Future Perspectives', *Aging and Disease*, 13(4), pp. 1106–1126. doi: 10.14336/AD.2022.0104.

Luda, K. M. *et al.* (2023) 'Ketolysis drives CD8+ T cell effector function through effects on histone acetylation', *Immunity*, 56(9), p. 2021–2035.e8. doi: 10.1016/j.immuni.2023.07.002.

Ma, W. *et al.* (2017) 'Advances in Cadaverine Bacterial Production and Its Applications', *Engineering*. Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company, 3(3), pp. 308–317. doi: 10.1016/J.ENG.2017.03.012.

Magne, F. *et al.* (2020) 'The firmicutes/bacteroidetes ratio: A relevant marker of gut dysbiosis in obese patients?', *Nutrients*, 12(5). doi: 10.3390/nu12051474.

Maifeld, A. *et al.* (2021) 'Fasting alters the gut microbiome reducing blood pressure and body weight in metabolic syndrome patients', *Nature Communications*, 12(1). doi: 10.1038/s41467-021-22097-0.

Martin, A. M. *et al.* (2019) 'The influence of the gut microbiome on host metabolism through the regulation of gut hormone release', *Frontiers in Physiology*, 10(MAR), pp. 1–11. doi: 10.3389/fphys.2019.00428.

Maslowski, K. M. (2019) 'Metabolism at the centre of the host–microbe relationship', *Clinical and Experimental Immunology*, 197(2), pp. 193–204. doi: 10.1111/cei.13329.

Mitchell, S. J. *et al.* (2019) 'Daily Fasting Improves Health and Survival in Male Mice Independent of Diet Composition and Calories', *Cell Metabolism*. Elsevier Inc., 29(1), p. 221–228.e3. doi: 10.1016/j.cmet.2018.08.011.

Musi, N. and Guardado-Mendoza, R. (2014) 'Adipose Tissue as an Endocrine Organ', *Cellular Endocrinology in Health and Disease*, pp. 229–237. doi: 10.1016/B978-0-12-408134-5.00014-7.

Nandi, D., Parida, S. and Sharma, D. (2023) 'The gut microbiota in breast cancer development and treatment: The good, the bad, and the useful!', *Gut Microbes*. Taylor & Francis, 15(1). doi: 10.1080/19490976.2023.2221452.

Núñez-Ruiz, A. *et al.* (2022) ‘Obesity modulates the immune macroenvironment associated with breast cancer development’, *PLoS ONE*, 17(4 April), pp. 1–20. doi: 10.1371/journal.pone.0266827.

Oshi, M. *et al.* (2021) ‘Adipogenesis in triple-negative breast cancer is associated with unfavorable tumor immune microenvironment and with worse survival’, *Scientific Reports*. Nature Publishing Group UK, 11(1), pp. 1–12. doi: 10.1038/s41598-021-91897-7.

Parker, B. J. *et al.* (2020) ‘The Genus *Alistipes*: Gut Bacteria With Emerging Implications to Inflammation, Cancer, and Mental Health’, *Frontiers in Immunology*, 11(June), pp. 1–15. doi: 10.3389/fimmu.2020.00906.

Rangan, P. *et al.* (2019) ‘Fasting-Mimicking Diet Modulates Microbiota and Promotes Intestinal Regeneration to Reduce Inflammatory Bowel Disease Pathology’, *Cell Reports*, 26(10), p. 2704–2719.e6. doi: 10.1016/j.celrep.2019.02.019.

Rath, S. *et al.* (2017) ‘Uncovering the trimethylamine-producing bacteria of the human gut microbiota’, *Microbiome*. Microbiome, 5(1), pp. 1–14. doi: 10.1186/S40168-017-0271-9.

Rodríguez-Romero, J. de J. *et al.* (2022) ‘What we know about protein gut metabolites: Implications and insights for human health and diseases’, *Food Chemistry: X*, 13(November 2021). doi: 10.1016/j.fochx.2021.100195.

Rothschild, D. *et al.* (2018) ‘Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota’, *Nature*. Nature Publishing Group, 555(7695), pp. 210–215. doi: 10.1038/nature25973.

Ruff, W. E., Greiling, T. M. and Kriegel, M. A. (2020) ‘Host–microbiota interactions in immune-mediated diseases’, *Nature Reviews Microbiology*. Springer US, 18(9), pp. 521–538. doi: 10.1038/s41579-020-0367-2.

Sakers, A. *et al.* (2022) ‘Adipose-tissue plasticity in health and disease’, *Cell*. Elsevier Inc., 185(3), pp. 419–446. doi: 10.1016/j.cell.2021.12.016.

Sampey, B. P. *et al.* (2011) ‘Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: Comparison to high-fat diet’, *Obesity*. Nature Publishing Group, 19(6), pp. 1109–1117. doi: 10.1038/oby.2011.18.

Sender, R., Fuchs, S. and Milo, R. (2016) ‘Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans’, *Cell*. Elsevier Inc., 164(3), pp. 337–340. doi: 10.1016/j.cell.2016.01.013.

Shiao, S. L. *et al.* (2021) ‘Commensal bacteria and fungi differentially regulate tumor responses to radiation therapy’, *Cancer Cell*, 39(9), p. 1202–1213.e6. doi: 10.1016/j.ccell.2021.07.002.

Shin, N. R., Whon, T. W. and Bae, J. W. (2015) ‘Proteobacteria: Microbial signature of dysbiosis in gut microbiota’, *Trends in Biotechnology*. Elsevier Ltd, 33(9), pp. 496–503. doi: 10.1016/j.tibtech.2015.06.011.

Singh, S. B., Carroll-Portillo, A. and Lin, H. C. (2023) ‘Desulfovibrio in the Gut: The Enemy within?’, *Microorganisms*, 11(7), pp. 1–21. doi: 10.3390/microorganisms11071772.

Siracusa, F. *et al.* (2023) ‘Short-term dietary changes can result in mucosal and systemic immune depression’, *Nature Immunology*. Springer US, 24(9), pp. 1473–1486. doi: 10.1038/s41590-023-01587-x.

Son, M. Y. and Cho, H. S. (2023) ‘Anticancer Effects of Gut Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids in Cancers’, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(7), pp. 849–856. doi: 10.4014/jmb.2301.01031.

Sonnenburg, E. D. *et al.* (2016) ‘Diet-induced extinctions in the gut microbiota compound over generations’, *Nature*. Nature Publishing Group, 529(7585), pp. 212–215. doi: 10.1038/nature16504.

Speakman, J. R. (2019) ‘Use of high-fat diets to study rodent obesity as a model of human obesity’, *International Journal of Obesity*. Springer US, 43(8), pp. 1491–1492. doi: 10.1038/s41366-019-0363-7.

Staley, C., Dunny, G. M. and Sadowsky, M. J. (2014) *Environmental and Animal-Associated Enterococci*. 1st edn, *Advances in Applied Microbiology*. 1st edn. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-800261-2.00004-9.

Sun, J., Chen, F. and Wu, G. (2023) ‘Potential effects of gut microbiota on host cancers: focus on immunity, DNA damage, cellular pathways, and anticancer therapy’, *ISME Journal*. Springer US, (March). doi: 10.1038/s41396-023-01483-0.

Szabo, C. (2021) ‘Hydrogen sulfide, an endogenous stimulator of mitochondrial function in cancer cells’, *Cells*, 10(2), pp. 1–19. doi: 10.3390/cells10020220.

Taban, B. M., Dogan Halkman, H. B. and Halkman, A. K. (2014) *Microflora of the Intestine: Biology of the Enterococcus spp.* Second Edi, *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*. Second Edi. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-384730-0.00211-1.

Tamanai-Shacoori, Z. *et al.* (2017) ‘Roseburia spp.: A marker of health?’, *Future Microbiology*, 12(2), pp. 157–170. doi: 10.2217/fmb-2016-0130.

Turnbaugh, P. J. *et al.* (2007) ‘The human microbiome project: exploring the microbial part of ourselves in a changing world’, *Nature*, 449(7164), pp. 804–810. doi: 10.1038/nature06244.

Urbaniak, C. *et al.* (2016) ‘The microbiota of breast tissue and its association with breast cancer’, *Applied and Environmental Microbiology*, 82(16), pp. 5039–5048. doi: 10.1128/AEM.01235-16.

Varady, K. A. *et al.* (2021) ‘Cardiometabolic Benefits of Intermittent Fasting’, *Annual Review of Nutrition*, 41, pp. 333–361. doi: 10.1146/annurev-nutr-052020-041327.

Velasquez, M. T. (2018) ‘Altered gut microbiota: A link between diet and the metabolic syndrome’, *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, 16(7), pp. 321–328. doi: 10.1089/met.2017.0163.

Velázquez, K. T. *et al.* (2019) ‘Prolonged high-fat-diet feeding promotes non-alcoholic fatty liver disease and alters gut microbiota in mice’, *World Journal of Hepatology*, 11(8), pp. 619–637. doi: 10.4254/wjh.v11.i8.619.

Vemuri, R. *et al.* (2020) 'Beyond just bacteria: Functional biomes in the gut ecosystem including virome, mycobiome, archaeome and helminths', *Microorganisms*, 8(4). doi: 10.3390/microorganisms8040483.

Vernaci, G. *et al.* (2023) 'Characterization of Gut Microbiome Composition in Patients with Triple-Negative Breast Cancer Treated with Neoadjuvant Chemotherapy', *The oncologist*, 28(9), pp. e703–e711. doi: 10.1093/oncolo/oyad060.

Vitorino, M. *et al.* (2022) 'Human Microbiota and Immunotherapy in Breast Cancer - A Review of Recent Developments', *Frontiers in Oncology*, 11(January), pp. 1–7. doi: 10.3389/fonc.2021.815772.

Wheeler, R. *et al.* (2014) 'The biology of bacterial peptidoglycans and their impact on host immunity and physiology', *Cellular Microbiology*, 16(7), pp. 1014–1023. doi: 10.1111/cmi.12304.

Wiesmann, C. L. *et al.* (2022) 'Origins of symbiosis: shared mechanisms underlying microbial pathogenesis, commensalism and mutualism of plants and animals', *FEMS Microbiology Reviews*, (December), pp. 1–12. doi: 10.1093/femsre/fuac048.

Witkowski, M., Weeks, T. L. and Hazen, S. L. (2020) 'Gut Microbiota and Cardiovascular Disease', *Circulation Research*, 127(4), pp. 553–570. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.120.316242.

Zafar, H. and Saier, M. H. (2021) 'Gut Bacteroides species in health and disease', *Gut Microbes*. Taylor & Francis, 13(1), pp. 1–20. doi: 10.1080/19490976.2020.1848158.

Zeeni, N. *et al.* (2015) 'Cafeteria diet-fed mice is a pertinent model of obesity-induced organ damage: a potential role of inflammation', *Inflammation Research*. Birkhauser Verlag AG, 64(7), pp. 501–512. doi: 10.1007/s00011-015-0831-z.

Zhang, M., Liu, J. and Xia, Q. (2023) 'Role of gut microbiome in cancer immunotherapy: from predictive biomarker to therapeutic target', *Experimental Hematology and Oncology*. BioMed Central, 12(1). doi: 10.1186/s40164-023-00442-x.

Zhang, P. (2022) 'Influence of Foods and Nutrition on the Gut Microbiome and Implications for Intestinal Health', *International Journal of Molecular Sciences*, 23(17). doi: 10.3390/ijms23179588.

Zhang, X. *et al.* (2020) 'Effects of alternate-day fasting, time-restricted fasting and intermittent energy restriction DSS-induced on colitis and behavioral disorders', *Redox Biology*. Elsevier B.V., 32(April), p. 101535. doi: 10.1016/j.redox.2020.101535.

Zhang, Z. *et al.* (2021) 'The effect of calorie intake, fasting, and dietary composition on metabolic health and gut microbiota in mice', *BMC Biology*. BMC Biology, 19(1), pp. 1–14. doi: 10.1186/s12915-021-00987-5.

Zheng, D., Liwinski, T. and Elinav, E. (2020) 'Interaction between microbiota and immunity in health and disease', *Cell Research*. Springer US, 30(6), pp. 492–506. doi: 10.1038/s41422-020-0332-7.

Zoetendal, E. G., Rajilić-Stojanović, M. and De Vos, W. M. (2008) 'High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota', *Gut*, 57(11), pp. 1605–1615. doi: 10.1136/gut.2007.133603.

## 9 Anexos

### 9.1 Certificado de aprovação do projeto de pesquisa pela Comissão de Ética de Uso Animal da Universidade de Brasília

 <b>Universidade de Brasília</b> Comissão de Ética no Uso Animal		
Brasília, 21 de outubro de 2022.		
<b>CERTIFICADO</b>		
<p>Certificamos que o projeto intitulado "INFLUÊNCIA DO JEJUM INTERMITENTE E DA DIETA DE CAFETERIA SOBRE A PLASTICIDADE DO TECIDO ADIPOSEO E DA COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL DURANTE O ESTABELECIMENTO E PROGRESSÃO DO CÂNCER DE MAMA EM CAMUNDONGOS BALB/C", SEI n. 23106.033635/2021-43, sob responsabilidade da professora Kelly Grace Magalhães, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília, na 182ª reunião ordinária, em 11/10/2022. Este projeto foi aprovado para utilização de <i>Mus musculus</i> BALB/c (96 fêmeas), provenientes do biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.</p> <p>O presente certificado é válido pelo período de 21/10/2022 a 1/11/2026.</p>		
	 Dra. Carina da Costa Krewer Coordenadora da CEUA – UnB	
<small>*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.</small>		

### 9.2 Produções aceitas para publicação

OPEN

## Potential neuroprotective and anti-inflammatory effects provided by omega-3 (DHA) against Zika virus infection in human SH-SY5Y cells

Heloísa Antoniella Braz-De-Melo<sup>1</sup>, Gabriel Pasquarelli-do-Nascimento<sup>1</sup>, Rafael Corrêa<sup>1</sup>, Raquel das Neves Almeida<sup>1</sup>, Igor de Oliveira Santos<sup>1</sup>, Paulo Sousa Prado<sup>2</sup>, Victor Picolo<sup>3</sup>, Andreza Fabro de Bem<sup>1</sup>, Nathalia Pizato<sup>4</sup> & Kelly Grace Magalhães<sup>1\*</sup>

Zika virus (ZIKV) has a strong tropism for the nervous system and has been related to post-infection neurological syndromes. Once neuronal cells are infected, the virus is capable of modulating cell metabolism, leading to neurotoxicity and cellular death. The negative effect of ZIKV in neuron cells has been characterized. However, the description of molecules capable of reversing these cytotoxic effects is still under investigation. In this context, it has been largely demonstrated that docosahexaenoic acid (DHA), an omega-3 polyunsaturated fatty acid, is highly neuroprotective. Here, we hypothesized that DHA's neuroprotective properties could have an influence on ZIKV-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells. Our data showed that pre-treatment of SH-SY5Y cells with DHA increased the cell viability and proliferation in ZIKV-infected cells. Moreover, DHA triggered an anti-inflammatory response in those infected cells. Besides, DHA was capable of restoring mitochondria function and number in ZIKV-infected SH-SY5Y cells. In addition, cells pre-treated with DHA prior to ZIKV infection presented a lower viral load at different times of infection. Taking together, these results demonstrated that DHA has a potential anti-inflammatory and neuroprotective effect against ZIKV infection in these neuron-like cells and could be a useful tool in the treatment against this virus.

First discovered in Uganda Forest in 1947, Zika virus (ZIKV) is an arthropod-borne Flavivirus, transmitted by mosquitoes from *Aedes* genus, and, as recently discovered, an arbovirus sexually transmitted<sup>1,2</sup>. ZIKV has been associated with several neuronal alterations and congenital diseases<sup>3</sup>. Indeed, ZIKV is closely related to neurological disorders and presents a main tropism for nervous system, being isolated from animals born with microcephaly and infected adult mice brain<sup>4,5</sup>. Neuronal cells, both progenitors or differentiated ones, suffer a loss of homeostasis when infected with ZIKV and present considerable changes in cell metabolism during infection, due to the presence of specific required metabolites for viral replication<sup>6,7</sup>. ZIKV-induced neuronal alterations can directly impair neuronal homeostasis leading to decreased cellular proliferation and differentiation capacity of those cells, followed by cell death<sup>8</sup>.

It was also reported that negative influence of ZIKV in neuronal cells has a strong relationship with mitochondrial-sequestration of phospho-TBK1, an important factor that once relocated can cause a disruption in mitosis process, creating a critical environment to neuronal survival<sup>9</sup>. In addition, specific ZIKV proteins are capable of inhibiting Akt-mTOR pathway in neuronal stem cells, which plays essential role on neurogenesis process, cell maturation and migration<sup>10,11</sup>. Such mechanisms act synergistically to induce neuronal apoptotic cell death and loss of massive cell population during brain development and it can be accompanied by activation of inflammatory response<sup>7,12,13</sup>.

It is known that inflammation is a key process that orchestrates neuronal damage induced by ZIKV infection<sup>13</sup>. It has been reported that ZIKV intensively induces the generation of pro-inflammatory factors in microglia cells, such as IL-6 and MCP-1, when it infects human fetal brain<sup>14</sup>. In addition, pro-inflammatory response triggered

<sup>1</sup>Laboratory of Immunology and Inflammation, Department of Cell Biology, University of Brasília (UnB), 70910-900, Brasília, Brazil. <sup>2</sup>Central Laboratory of Federal District (LACEN), 70830-010, Brasília, Brazil. <sup>3</sup>Department of Physiological Sciences, University of Brasília (UnB), 70910-900, Brasília, Brazil. <sup>4</sup>Department of Nutrition, University of Brasília (UnB), 70910-900, Brasília, Brazil. \*email: kellymagalhaes@unb.br



# Hypercoagulopathy and Adipose Tissue Exacerbated Inflammation May Explain Higher Mortality in COVID-19 Patients With Obesity

Gabriel Pasquarelli-do-Nascimento<sup>1</sup>, Heloisa Antonielli Braz-de-Melo<sup>1</sup>, Sara Socorro Faria<sup>1</sup>, Igor de Oliveira Santos<sup>1</sup>, Gary P. Kobinger<sup>2,3</sup> and Kelly Grace Magalhães<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Immunology and Inflammation, Department of Cell Biology, University of Brasília, Brasília, Brazil, <sup>2</sup>Département de Microbiologie-Inféctologie et d'Immunologie, Université Laval, Québec City, QC, Canada, <sup>3</sup>Centre de Recherche en Infectologie du CHU de Québec - Université Laval, Québec City, QC, Canada

## OPEN ACCESS

**Edited by:**  
Jeff M. P. Holly,  
University of Bristol, United Kingdom

**Reviewed by:**  
Luca Spezia,  
University of Padova, Italy  
Erik Albert Karlsson,  
Institut Pasteur du  
Cambodge, Cambodia

**\*Correspondence:**  
Kelly Grace Magalhães  
kelymagalhaes@unb.br

**Specialty section:**  
This article was submitted to  
Obesity,  
a section of the journal  
Frontiers in Endocrinology

**Received:** 03 June 2020

**Accepted:** 30 June 2020

**Published:** 28 July 2020

**Citation:**  
Pasquarelli-do-Nascimento G,  
Braz-de-Melo HA, Faria SS,  
Santos IO, Kobinger GP and  
Magalhães KG (2020)  
Hypercoagulopathy and Adipose  
Tissue Exacerbated Inflammation May  
Explain Higher Mortality in COVID-19  
Patients With Obesity.  
*Front. Endocrinol.* 11:530.  
doi: 10.3389/fendo.2020.00530

COVID-19, caused by SARS-CoV-2, is characterized by pneumonia, lymphopenia, exhausted lymphocytes and a cytokine storm. Several reports from around the world have identified obesity and severe obesity as one of the strongest risk factors for COVID-19 hospitalization and mechanical ventilation. Moreover, countries with greater obesity prevalence have a higher morbidity and mortality risk of developing serious outcomes from COVID-19. The understanding of how this increased susceptibility of the people with obesity to develop severe forms of the SARS-CoV-2 infection occurs is crucial for implementing appropriate public health and therapeutic strategies to avoid COVID-19 severe symptoms and complications in people living with obesity. We hypothesize here that increased ACE2 expression in adipose tissue displayed by people with obesity may increase SARS-CoV-2 infection and accessibility to this tissue. Individuals with obesity have increased white adipose tissue, which may act as a reservoir for a more extensive viral spread with increased shedding, immune activation and pro-inflammatory cytokine amplification. Here we discuss how obesity is related to a pro-inflammatory and metabolic dysregulation, increased SARS-CoV-2 host cell entry in adipose tissue and induction of hypercoagulopathy, leading people with obesity to develop severe forms of COVID-19 and also death. Taken together, it may be crucial to better explore the role of visceral adipose tissue in the inflammatory response to SARS-CoV-2 infection and investigate the potential therapeutic effect of using specific target anti-inflammatories (canakinumab or anakinra for IL-1 $\beta$  inhibition; anti-IL-6 antibodies for IL-6 inhibition), anticoagulant or anti-diabetic drugs in COVID-19 treatment of people with obesity. Defining the immunopathological changes in COVID-19 patients with obesity can provide prominent targets for drug discovery and clinical management improvement.

**Keywords:** adipose tissue, COVID-19, Obesity, SARS-CoV-2, hypercoagulopathy, ACE-2

## INTRODUCTION

On December 2019, a series of pneumonia cases without a recognized etiology was reported in Wuhan, a central China city (1). Rapidly spreading throughout the globe, Coronavirus disease (COVID-19) was recently discovered to be caused by Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). The World Health Organization (WHO) declared SARS-CoV-2



# The Use of the Anticoagulant Heparin and Corticosteroid Dexamethasone as Prominent Treatments for COVID-19

*Heloisa Antonielli Braz-de-Melo*<sup>1</sup>, *Sara Socorro Faria*<sup>1</sup>,  
*Gabriel Pasquarelli-do-Nascimento*<sup>1</sup>, *Igor de Oliveira Santos*<sup>1</sup>, *Gary P. Kobinger*<sup>2,3</sup> and  
*Kelly Grace Magalhães*<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Immunology and Inflammation, Department of Cell Biology, University of Brasilia, Brasilia, Brazil, <sup>2</sup>Département de Microbiologie-Inféctiologie et d'Immunologie, Université Laval, Québec City, QC, Canada, <sup>3</sup>Centre de Recherche en Infectiologie du CHU de Québec, Université Laval, Québec City, QC, Canada

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Ana Abrão,  
University of São Paulo, Brazil

### Reviewed by:

Frank M. P. Van Haren,  
Australian National University, Australia  
Naveen Kumar Devanga Ragupathi,  
The University of Sheffield,  
United Kingdom  
Clive P. Page,  
King's College London,  
United Kingdom

### \*Correspondence:

Kelly Grace Magalhães  
kellymagalhaes@unb.br  
orcid.org/0000-0002-7435-5272

### Specialty section:

This article was submitted to  
Infectious Diseases - Surveillance,  
Prevention and Treatment,  
a section of the journal  
Frontiers in Medicine

**Received:** 08 October 2020

**Accepted:** 26 March 2021

**Published:** 23 April 2021

### Citation:

Braz-de-Melo HA, Faria SS,  
Pasquarelli-do-Nascimento G,  
Santos IO, Kobinger GP and  
Magalhães KG (2021) The Use of the  
Anticoagulant Heparin and  
Corticosteroid Dexamethasone as  
Prominent Treatments for COVID-19.  
*Front. Med.* 8:615333.  
doi: 10.3389/fmed.2021.615333

COVID-19 is spreading worldwide at disturbing rates, overwhelming global healthcare. Mounting death cases due to disease complications highlight the necessity of describing efficient drug therapy strategies for severe patients. COVID-19 severity associates with hypercoagulation and exacerbated inflammation, both influenced by ACE2 downregulation and cytokine storm occurrence. In this review, we discuss the applicability of the anticoagulant heparin and the anti-inflammatory corticosteroid dexamethasone for managing severe COVID-19 patients. The upregulated inflammation and blood clotting may be mitigated by administering heparin and its derivatives. Heparin enhances the anticoagulant property of anti-thrombin (AT) and may be useful in conjunction with fibrinolytic drugs for severe COVID-19 patients. Besides, heparin can also modulate immune responses, alleviating TNF- $\alpha$ -mediated inflammation, impairing IL-6 production and secretion, and binding to complement proteins and leukotriene B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>). Moreover, heparin may present anti-SARS-CoV-2 potential once it can impact viral infectivity and alter SARS-CoV-2 Spike protein architecture. Another feasible approach is the administration of the glucocorticoid dexamethasone. Although glucocorticoid's administration for viral infection managing is controversial, there is increasing evidence demonstrating that dexamethasone treatment is capable of drastically diminishing the death rate of patients presenting with Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) that required invasive mechanical ventilation. Importantly, dexamethasone may be detrimental by impairing viral clearance and inducing hyperglycemia and sodium retention, hence possibly being deleterious for diabetics and hypertensive patients, two major COVID-19 risk groups. Therefore, while heparin's multitarget capacity shows to be strongly beneficial for severe COVID-19 patients, dexamethasone should be carefully administered taking into consideration underlying medical conditions and COVID-19 disease severity. Therefore, we suggest that the multitarget impact of heparin as an anti-viral, antithrombotic and anti-inflammatory drug

# scientific reports



OPEN

## Gut microbiota modulation induced by Zika virus infection in immunocompetent mice

Rafael Corrêa<sup>1</sup>, Igor de Oliveira Santos<sup>1</sup>, Heloísa Antoniella Braz-de-Melo<sup>1</sup>, Lívia Pimentel de Sant'Ana<sup>1</sup>, Raquel das Neves Almeida<sup>1</sup>, Gabriel Pasquarelli-do-Nascimento<sup>1</sup>, Paulo Sousa Prado<sup>2</sup>, Gary P. Kobinger<sup>3,4</sup>, Corinne F. Maurice<sup>5</sup> & Kelly Grace Magalhães<sup>1,5</sup>✉

Gut microbiota composition can modulate neuroendocrine function, inflammation, and cellular and immunological responses against different pathogens, including viruses. Zika virus (ZIKV) can infect adult immunocompetent individuals and trigger brain damage and antiviral responses. However, it is not known whether ZIKV infection could impact the gut microbiome from adult immunocompetent mice. Here, we investigated modifications induced by ZIKV infection in the gut microbiome of immunocompetent C57BL/6J mice. Adult C57BL/6J mice were infected with ZIKV and the gut microbiota composition was analyzed by next-generation sequencing of the V4 hypervariable region present in the bacterial 16S rDNA gene. Our data showed that ZIKV infection triggered a significant decrease in the bacteria belonging to Actinobacteria and Firmicutes phyla, and increased Deferribacteres and Spirochaetes phyla components compared to uninfected mice. Interestingly, ZIKV infection triggered a significant increase in the abundance of bacteria from the Spirochaetaceae family in the gut microbiota. Lastly, we demonstrated that modulation of microbiota induced by ZIKV infection may lead to intestinal epithelium damage and intense leukocyte recruitment to the intestinal mucosa. Taken together, our data demonstrate that ZIKV infection can impact the gut microbiota composition and colon tissue homeostasis in adult immunocompetent mice.

Zika Virus (ZIKV) is an Arbovirus member of the Flaviviridae family that is mainly transmitted by the bite of *Aedes* genus mosquitoes<sup>1</sup>. During the 2015 outbreak, ZIKV spread quickly in America, mainly in Brazil<sup>2</sup>. During ZIKV dissemination, non-vector born routes of infection were reported, including sexual transmission<sup>3</sup>. A great concern about ZIKV's impact worldwide was the association of post-infection disorders, such as Guillain-Barré syndrome<sup>4</sup>, and the development of congenital malformations<sup>5</sup>.

As a means of better understanding ZIKV pathogenesis, most of the molecular mechanisms associated with the infection were elucidated with the use of genetically-induced immunodeficient mice models<sup>6</sup>. In those reports, infected mice presented weight loss, high viremia, detectable signs of illness, intensive neuronal loss, immune system activation on neuronal surroundings, and severe testicular inflammation<sup>6–9</sup>. In contrast, the impact of ZIKV on immunocompetent adult mice models showed detectable viral loads in the serum, and effects on different organs or lethality after infection through different routes<sup>9,10</sup>. Despite this, ZIKV induces innate and adaptive immune responses that are essential for protecting the organism against the establishment of disease<sup>11,12</sup>. The immune system activation demonstrates that specific parameters are modulated during ZIKV infection such that, regardless of the milder symptoms, the virus still impacts on the host<sup>13</sup>. These findings lead to new questions regarding if other alterations could be linked to viral activation of the host's immune system and modulation of physiological functions not noticed before.

The gut microbiota has been described as a strong modulator of inflammatory and immune responses, both locally and systemically<sup>14,15</sup>, playing essential roles in triggering host responses against pathogen infections<sup>16</sup>. In recent years, studies have shown that the gut microbiota influences and is influenced by viral infections<sup>17</sup>. This study reports that enteric viruses can lead to substantial disturbances in gut microbiota composition, impacting

<sup>1</sup>Laboratory of Immunology and Inflammation, Department of Cell Biology, University of Brasília, Brasília, DF, Brazil. <sup>2</sup>Central Laboratory of Federal District (LACEN), Brasília, Brazil. <sup>3</sup>Département de Microbiologie-Infectiologie et d'Immunologie, Université Laval, Québec, Canada. <sup>4</sup>Centre de Recherche en Infectiologie du CHU de Québec-Université Laval, Québec, Canada. <sup>5</sup>Department of Microbiology and Immunology, McGill University, Montreal, Canada. ✉email: kellymagalhães@unb.br

*Immunotherapy Advances*, 2022, 2, 1–13  
<https://doi.org/10.1093/immadv/ltac015>  
Advance access publication 24 June 2022

Review

OXFORD

## Obesity and adipose tissue impact on T-cell response and cancer immune checkpoint blockade therapy

Gabriel Pasquarelli-do-Nascimento<sup>‡</sup>, Sabrina Azevedo Machado<sup>‡</sup>,  
Juliana Maria Andrade de Carvalho and Kelly Grace Magalhães<sup>\*,</sup> 

Laboratory of Immunology and Inflammation, Department of Cell Biology, University of Brasilia, DF, Brazil

<sup>‡</sup>These authors contributed equally to this work.

\*Correspondence: Kelly Grace Magalhães, Laboratory of Immunology and Inflammation, Department of Cell Biology, University of Brasilia, DF, Brasilia.

Email: [kellymagalhaes@unb.br](mailto:kellymagalhaes@unb.br)

### Summary

Many different types of cancer are now well known to have increased occurrence or severity in individuals with obesity. The influence of obesity on cancer and the immune cells in the tumor microenvironment has been thought to be a pleiotropic effect. As key endocrine and immune organs, the highly plastic adipose tissues play crucial roles in obesity pathophysiology, as they show alterations according to environmental cues. Adipose tissues of lean subjects present mostly anti-inflammatory cells that are crucial in tissue remodeling, favoring uncoupling protein 1 expression and non-shivering thermogenesis. Oppositely, obese adipose tissues display massive proinflammatory immune cell infiltration, dying adipocytes, and enhanced crown-like structure formation. In this review, we discuss how obesity can lead to derangements and dysfunctions in antitumor CD8<sup>+</sup> T lymphocytes dysfunction. Moreover, we explain how obesity can affect the efficiency of cancer immunotherapy, depicting the mechanisms involved in this process. Cancer immunotherapy management includes monoclonal antibodies targeting the immune checkpoint blockade. Exhausted CD8<sup>+</sup> T lymphocytes show elevated programmed cell death-1 (PD-1) expression and highly glycolytic tumors tend to show a good response to anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy. Although obesity is a risk factor for the development of several neoplasms and is linked with increased tumor growth and aggressiveness, obesity is also related to improved response to cancer immunotherapy, a phenomenon called the obesity paradox. However, patients affected by obesity present higher incidences of adverse events related to this therapy. These limitations highlight the necessity of a deeper investigation of factors that influence the obesity paradox to improve the application of these therapies.

**Keywords:** immunotherapy, obesity, cancer, adipose tissue

## REVIEW

## Open Access



# The ambiguous role of obesity in oncology by promoting cancer but boosting antitumor immunotherapy

José Antônio Fagundes Assumpção<sup>1</sup>, Gabriel Pasquarelli-do-Nascimento<sup>1</sup>, Mariana Saldanha Viegas Duarte<sup>2</sup>, Martín Hernan Bonamino<sup>2,3</sup> and Kelly Grace Magalhães<sup>1\*</sup> 

## Abstract

Obesity is nowadays considered a pandemic which prevalence's has been steadily increasing in western countries. It is a dynamic, complex, and multifactorial disease which propitiates the development of several metabolic and cardiovascular diseases, as well as cancer. Excessive adipose tissue has been causally related to cancer progression and is a preventable risk factor for overall and cancer-specific survival, associated with poor prognosis in cancer patients. The onset of obesity features a state of chronic low-grade inflammation and secretion of a diversity of adipocyte-derived molecules (adipokines, cytokines, hormones), responsible for altering the metabolic, inflammatory, and immune landscape. The crosstalk between adipocytes and tumor cells fuels the tumor microenvironment with pro-inflammatory factors, promoting tissue injury, mutagenesis, invasion, and metastasis. Although classically established as a risk factor for cancer and treatment toxicity, recent evidence suggests mild obesity is related to better outcomes, with obese cancer patients showing better responses to treatment when compared to lean cancer patients. This phenomenon is termed obesity paradox and has been reported in different types and stages of cancer. The mechanisms underlying this paradoxical relationship between obesity and cancer are still not fully described but point to systemic alterations in metabolic fitness and modulation of the tumor microenvironment by obesity-associated molecules. Obesity impacts the response to cancer treatments, such as chemotherapy and immunotherapy, and has been reported as having a positive association with immune checkpoint therapy. In this review, we discuss obesity's association to inflammation and cancer, also highlighting potential physiological and biological mechanisms underlying this association, hoping to clarify the existence and impact of obesity paradox in cancer development and treatment.

**Keywords:** Obesity, Cancer, Immunotherapy, Adipose tissue, Inflammation

## REVIEW

## Open Access



# Browning of the white adipose tissue regulation: new insights into nutritional and metabolic relevance in health and diseases

Sabrina Azevedo Machado<sup>†</sup>, Gabriel Pasquarelli-do-Nascimento<sup>†</sup>, Debora Santos da Silva, Gabriel Ribeiro Farias, Igor de Oliveira Santos, Luana Borges Baptista and Kelly Grace Magalhães\*<sup>†</sup> 

## Abstract

Adipose tissues are dynamic tissues that play crucial physiological roles in maintaining health and homeostasis. Although white adipose tissue and brown adipose tissue are currently considered key endocrine organs, they differ functionally and morphologically. The existence of the beige or brite adipocytes, cells displaying intermediary characteristics between white and brown adipocytes, illustrates the plastic nature of the adipose tissue. These cells are generated through white adipose tissue browning, a process associated with augmented non-shivering thermogenesis and metabolic capacity. This process involves the upregulation of the uncoupling protein 1, a molecule that uncouples the respiratory chain from Adenosine triphosphate synthesis, producing heat.  $\beta$ -3 adrenergic receptor system is one important mediator of white adipose tissue browning, during cold exposure. Surprisingly, hyperthermia may also induce beige activation and white adipose tissue beiging. Physical exercising copes with increased levels of specific molecules, including Beta-Aminoisobutyric acid, irisin, and Fibroblast growth factor 21 (FGF21), which induce adipose tissue browning. FGF21 is a stress-responsive hormone that interacts with beta-klotho. The central roles played by hormones in the browning process highlight the relevance of the individual lifestyle, including circadian rhythm and diet. Circadian rhythm involves the sleep-wake cycle and is regulated by melatonin, a hormone associated with UCP1 level upregulation. In contrast to the pro-inflammatory and adipose tissue disrupting effects of the western diet, specific food items, including capsaicin and n-3 polyunsaturated fatty acids, and dietary interventions such as calorie restriction and intermittent fasting, favor white adipose tissue browning and metabolic efficiency. The intestinal microbiome has also been pictured as a key factor in regulating white tissue browning, as it modulates bile acid levels, important molecules for the thermogenic program activation. During embryogenesis, in which adipose tissue formation is affected by Bone morphogenetic proteins that regulate gene expression, the stimuli herein discussed influence an orchestra of gene expression regulators, including a plethora of transcription factors, and chromatin remodeling enzymes, and non-coding RNAs. Considering the detrimental effects of adipose tissue browning and the disparities between adipose tissue characteristics in mice and humans, further efforts will benefit a better understanding of adipose tissue plasticity biology and its applicability to managing the overwhelming burden of several chronic diseases.

**Keywords:** White adipose tissue, Browning, UCP1, Life-style



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.



check for updates

Citation: da Cruz, N.S.;

Pasquarelli-do-Nascimento, G.;

Oliveira, A.C.P.; Magalhães, K.G.

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

