



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE FARMACIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CELIA CHOQUENAIRA QUISPE

**A DOXORRUBICINA E O PACLITAXEL, USADOS NA QUIMIOTERAPIA
NEOADJUVANTE PARA CÂNCER DE MAMA, ATIVAM RECEPTORES TOLL-
LIKE E PROTEÍNAS DE SUA SINALIZAÇÃO, PI3K E AKT**

FORTALEZA-CE

2023

CELIA CHOQUENAIRA QUISPE

**A DOXORRUBICINA E O PACLITAXEL, USADOS NA QUIMIOTERAPIA
NEOADJUVANTE PARA CÂNCER DE MAMA, ATIVAM RECEPTORES TOLL-
LIKE E PROTEÍNAS DE SUA SINALIZAÇÃO, PI3K E AKT**

Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Biologia da saúde.

Orientador: Prof. Dr. Roberto César Pereira
Lima Júnior

FORTALEZA-CE

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- Q83d Quispe, Celia.
A doxorubicina e o paclitaxel, usados na quimioterapia neoadjuvante para câncer de mama, ativam receptores toll-like e proteínas de sua sinalização, PI3K e Akt / Celia Quispe. – 2023.
130 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2023.
Orientação: Prof. Dr. Roberto Cesar Pereira Lima Junior.
1. Obesidade. 2. Câncer. 3. Inflamação. 4. Leptina. 5. Quimioterapia neoadjuvante. I. Título.
CDD 615
-

CELIA CHOQUENAIRA QUISPE

**A DOXORRUBICINA E O PACLITAXEL, USADOS NA QUIMIOTERAPIA
NEOADJUVANTE PARA CÂNCER DE MAMA, ATIVAM RECEPTORES TOLL-
LIKE E PROTEÍNAS DE SUA SINALIZAÇÃO, PI3K E AKT**

Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Biologia da saúde.

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Caio Abner Vitorino Gonçalves Leite
Beneficência Portuguesa de São Paulo

Profa. Dra. Katharine Gurgel Dias Florêncio
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Raquel Petrilli Eloy
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

Prof. Dr. Tiago Lima Sampaio
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade de viver e me permitir conhecer pessoas maravilhosas nesses 4 anos.

A meu pai Pedro P. Choquenaira (*in memoriam*) por ser pessoa que confio em mim e sempre tinha as palavras precisas quando eu

A minha mãe Paulina Quispe por ser a fonte da infinita força dentro das minhas fraquezas e por sempre ter palavras de sabedoria em momentos difíceis.

A meus irmãos Abel Choquenaira, Katy Choquenaira e Vianca Choquenaira por sempre me apoiarem incondicionalmente em todas as minhas decisões.

A meu querido Giancarlo C. Gómez pelo carinho, apoio incondicional e por sempre estar presente nos meus dias, independente da distância.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Junior, pela orientação, conselhos, confiança em meu trabalho e por sempre estar disponível para esclarecer qualquer tipo de dúvida. O senhor se tornou uma fonte de inspiração para continuar trabalhando a favor da Ciência.

À Profa. Deysi Tenazoa pelo carinho, disponibilidades e contribuição durante a pesquisa. Aos colegas do LAFICA e as pessoas que formaram parte do projeto PPSUS por todo o companheirismo dentro e fora do laboratório, tornando tudo mais leve e divertido.

A Katharine Gurgel, a Aurilene Cajado, a Gisely Lima, a Lizias Claudia e a Fernanda pela companhia e auxílio nas diversas vezes que precisei. Obrigada

Às colegas e técnicos do Laboratório de Farmacologia Bioquímica (Manuel), pelas várias vezes que liberaram meu acesso ao laboratório e pelo monte de material que sempre levei para autoclavar. Obrigada!

Aos técnicos do Farmagem (Luina e Islay) pelo apoio no fotodocumentador e por me ajudarem sempre que era necessário.

As pessoas de segurança (Vicente e Felipe) e pessoal de limpeza (Dona Ivonete) pelo respeito, carinho e por sempre me receber todos os dias com um “bom dia ... Bom trabalho”.

À Universidade Federal do Ceará pela oportunidade

Ao CNPq, CAPES e FUNCAP pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse estudo.

RESUMO

Introdução: O câncer de mama é o tipo de neoplasia mais prevalente entre as mulheres no mundo. A quimioterapia neoadjuvante (QTneo) baseada em Doxorubicina (DOX)/Ciclofosfamida e Paclitaxel (PTX) objetiva reduzir o tamanho tumoral e melhorar a sobrevida global. O dano celular causado pela DOX libera DNA mitocondrial, um ligante do TLR9. Adicionalmente, o PTX é descrito como um agonista de TLR4. Contudo, não há relatos se a DOX ou o PTX atuam modulando a via TLR/PI3K/AKT. **Objetivo:** Avaliar se a doxorubicina e o paclitaxel, usados na quimioterapia neoadjuvante para câncer de mama, ativam receptores toll-like e proteínas de sua sinalização, PI3K e AKT. **Metodologia:** Peças cirúrgicas de pacientes com câncer de mama pós QTneo foram avaliadas quanto à expressão de TLR4 e TLR9. *In vitro*, células tumorais MCF-7 e MDA-MB-231 foram divididas em controle (DMEN) e grupos tratados por 24h com lipopolissacarídeo (LPS 10µg/ml em MDA-MB-231; 20µg/ml em MCF-7); CpG-oligodeoxynucleotídeos (CpG-ODN 10µg/ml), DOX (0,3µM/MDA-MB-231; 0,1µM/MCF-7) ou PTX (5nM/MDA-MB-231; 5µM/MCF-7). Foram quantificadas a expressão de *Il-33*, *Il-18*, *Il-1β* e *Il-6* (qPCR) e TLR4, TLR9, PIK3δ, PI3Kγ e p-AKT por citometria de fluxo (CF) e imunofluorescência (IF). Os adipócitos (HAd) foram divididos em controle (DMEN), HAd/DOX (DOX:0,1µM ou 0,3µM) e HAd/PTX (PTX:5µM ou 5nM). O sobrenadante foi utilizado para o tratamento das células tumorais e para a dosagem de adipocitocinas. As células MCF-7 silenciadas (siRNA-TLR4) foram tratadas com os quimioterápicos e a expressão de TLR4, AKT e pAKT foi avaliada por Western Blotting (WB). **Resultados:** Tumores de pacientes expressaram TLR4. Nas células MDA-MB-231 observou-se a expressão de **TLR4**:25%(LPS), 67%(DOX) e 40%(PTX); **TLR9**:34%(CpG-ODN), 58%(DOX) e 31%(PTX). Adicionalmente, LPS, CpG-ODN, DOX e PTX aumentaram a expressão de **PIK3δ**:24%,27%,57% e 66%, **PI3Kγ**:33%, 36%,100% e 52%; e **p-AKT**:37%,45%,176% e 93% respectivamente. De igual forma, nas células MCF-7 observou-se a expressão de **TLR4**:66%(LPS), 109%(DOX) e 62%(PTX); **TLR9**:15%(CpG-ODN), 53%(DOX) e 47%(PTX); **PIK3δ**:40%,29%,67% e 79%; **PI3Kγ**:31%,19%,113% e 136%; e **p-AKT**:53%,49%,123% e 170% respectivamente. Além do mais, observou-se a expressão de citocinas em MCF-7 (PTX: *Il-6*, *Il-33*, *Il-18* e *Il-1β*; DOX: *Il-18*) e MDA-MB-231 (PTX: *Il-6* e *Il-33*; DOX: *Il-6*). No HAd estimulado com os quimioterápicos, observou-se o aumento de leptina. As células MDA-MB-231 tratadas com o sobrenadante de HAd/DOX ou HAd/PTX aumentaram respectivamente a expressão de **TLR4**:89%, 3%; **TLR9**:75%, 7%; de **PIK3δ**:90% e 0%, **PI3Kγ**: 68% e 58%; e **p-AKT**: 90% e 25%. De igual forma, células MCF-7 tratadas com

HAd/DOX ou HAd/PTX aumentou respectivamente a expressão de **TLR4**:30% e 34%; **TLR9**:69% e 81%; **PIK3 δ** :53% e 33%; **PI3K γ** :94% e 72%; e **p-AKT**:83% e 35%. MCF-7 silenciadas e tratadas com os quimioterápicos observou-se uma expressão diminuída de TLR4. **Conclusão:** A DOX e o PTX aumentaram a expressão de TLR4, TLR9, PI3K δ , PI3K γ , pAKT, *Il-33*, *Il-18*, *Il-1 β* e *Il-6* nas células. O sobrenadante de HAd/DOX e HAd/PTX aumentaram a expressão de TLR4, TLR9, PI3K δ , PI3K γ e p-AKT. Tal ação, provavelmente, foi mediada pela leptina liberada pelos adipócitos.

Palavras-chave: Obesidade, Câncer, Inflamação, leptina, quimioterapia neoadjuvante.

ABSTRACT

Introduction: Breast cancer is the most prevalent type of cancer among women worldwide. Neoadjuvant chemotherapy (QTneo) based on Doxorubicin (DOX)/Cyclophosphamide and Paclitaxel (PTX) aims to reduce tumor size and improve overall survival. The cell damage caused by DOX releases mitochondrial DNA, a TLR9 ligand. PTX has also been described as a TLR4 agonist. However, whether DOX or PTX act by modulating the TLR/PI3K/AKT pathway. **Objective:** To evaluate whether doxorubicin and paclitaxel, used in neoadjuvant chemotherapy for breast cancer, activate toll-like receptors and their signaling proteins, PI3K and AKT. **Methodology:** Surgical specimens from patients with breast cancer after QTneo were evaluated for the expression of TLR4 and TLR9. *In vitro*, MCF-7 and MDA-MB-231 tumor cells were divided into control (DMEN) and groups treated for 24h with lipopolysaccharide (LPS 10µg/ml in MDA-MB-231; 20µg/ml in MCF-7); CpG-oligodeoxynucleotides (CpG-ODN 10µg/ml), DOX (0.3µM/MDA-MB-231; 0.1µM/MCF-7) or PTX (5nM/MDA-MB-231; 5µM/MCF-7). The expression of *Il-33*, *Il-18*, *Il-1β* and *Il-6* (qPCR) and TLR4, TLR9, PIK3δ, PI3Kγ and p-AKT were quantified by flow cytometry (FC) and immunofluorescence (IF). The adipocytes (HAd) were divided into control (DMEN), HAd/DOX (DOX:0.1µM or 0.3µM) and HAd/PTX (PTX:5µM or 5nM). The supernatant was used to treat the tumor cells and to measure adipocytokines. Silenced MCF-7 cells (siRNA-TLR4) were treated with the chemotherapeutic agents and the expression of TLR4, AKT and pAKT was evaluated by Western Blotting (WB). **Results:** Tumors from patients expressed TLR4. In MDA-MB-231 cells, we observed the expression of TLR4:25%(LPS), 67%(DOX) and 40%(PTX); TLR9:34%(CpG-ODN), 58%(DOX) and 31%(PTX). Additionally, LPS, CpG-ODN, DOX and PTX increased the expression of PIK3δ:24%,27%,57% and 66%, PI3Kγ:33%, 36%,100% and 52%; and p-AKT:37%,45%,176% and 93% respectively. Similarly, MCF-7 cells showed expression of TLR4:66%(LPS), 109%(DOX) and 62%(PTX); TLR9:15%(CpG-ODN), 53%(DOX) and 47%(PTX); PIK3δ:40%,29%,67% and 79%; PI3Kγ:31%,19%,113% and 136%; and p-AKT:53%,49%,123% and 170% respectively. Furthermore, cytokine expression was observed in MCF-7 (PTX: *Il-6*, *Il-33*, *Il-18* and *Il-1β*; DOX: *Il-18*) and MDA-MB-231 (PTX: *Il-6* and *Il-33*; DOX: *Il-6*). In HAd stimulated with the chemotherapy drugs, an increase in leptin was observed. MDA-MB-231 cells treated with the HAd/DOX or HAd/PTX supernatant respectively increased the expression of TLR4:89%, 3%; TLR9:75%, 7%; of PIK3δ:90% and 0%, PI3Kγ: 68% and 58%; and p-AKT: 90% and 25%. Similarly, MCF-7 cells treated with HAd/DOX or HAd/PTX respectively increased the

expression of **TLR4**:30% and 34%; **TLR9**:69% and 81%; **PIK3 δ** :53% and 33%; **PI3K γ** :94% and 72%; and **p-AKT**:83% and 35%. MCF-7 silenced and treated with the chemotherapy drugs showed a decreased expression of TLR4. **Conclusion:** DOX and PTX increased the expression of TLR4, TLR9, PI3K δ , PI3K γ , pAKT, Il-33, Il-18, Il-1 β and Il-6 in cells. The HAd/DOX and HAd/PTX supernatant increased the expression of TLR4, TLR9, PI3K δ , PI3K γ and p-AKT. This action was probably mediated by the leptin released by the adipocytes.

Keywords: Obesity, Cancer, Inflammation, leptin, neoadjuvant chemotherapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Número estimado de casos de câncer atribuídos ao incremento do índice de massa corporal.	19
Figura 2 - Estrutura Química da Doxorubicina.....	23
Figura 3 – Estrutura química do paclitaxel.	24
Figura 4 – Classificação de receptores Toll Like (TLRs)	28
Figura 5 – Representação esquemática da classificação das subunidades PI3K de classe I.	30
Figura 6 – Inibidores de PI3K para o tratamento de pacientes com câncer	32
Figura 7. Esquema experimental geral do estudo.....	36
Figura 8 – Plano de tratamento Neo adjuvante das pacientes.	38
Figura 9 – Células MCF-7 e MDA-MB-231.....	39
Figura 10 – Diferenciação de Pre-adipócitos (HPAd) para adipócitos (HAD).....	41
Figura 11 – Protocolo 2.....	42
Figura 12 – Protocolo 3.....	43
Figura 13 – Protocolo 4.....	44
Figura 14 – Estratégia de <i>gates</i> para citometria de fluxo.	48
Figura 15 – Identificação de TLR4 em biopsia de câncer de mama em pacientes após QTneo	53
Figura 16– Identificação de TLR9 em biopsia de câncer de mama em pacientes após QTneo.	54
Figura 17 – Classificação das pacientes segundo o Índice de Massa Corpórea (IMC) e Expressão de TLR4.....	55
Figura 18 – Cálculo dos valores de IC50.	56
Figura 19 – Avaliação da sobrevivência de células tumorais <i>in vitro</i> por meio do ensaio clonogênico.	57
Figura 20 – Quantificação, por citometria de fluxo, da expressão de TLR4 em células MCF-7 tratadas com LPS, DOX ou PTX.....	59
Figura 21 – Expressão de TLR4 em células MCF-7 tratadas com LPS, DOX ou PTX.....	60
Figura 22 – Quantificação, por citometria de fluxo, da expressão de TLR9 em células MCF-7 tratadas com CpG-ODN, DOX ou PTX.	61
Figura 23 – Expressão de TLR9 em células MCF-7 tratados com CpG-ODN, DOX ou PTX.....	62
Figura 24 – Quantificação, por citometria de fluxo, da expressão de PI3K δ em células MCF-7 tratadas com LPS, CpG-ODN, DOX ou PTX.	63
Figura 25 – Expressão de PI3K δ em células MCF-7 tratadas com LPS, CpG-ODN, DOX ou PTX. ..	63
Figura 26 – Quantificação, por citometria de fluxo, da expressão de PI3K γ em células MCF-7 tratadas com LPS, CpG-ODN, DOX ou PTX.	65

Figura 27 – Expressão de PI3K γ em células MCF-7 tratadas com LPS, CpG-ODN, DOX ou PTX....	66
Figura 28 – Quantificação, por citometria de fluxo, da expressão de pAKT em células MCF-7 tratadas com LPS, CpG-ODN, DOX ou PTX.	67
Figura 29 – Expressão de pAKT em células MCF-7 tratadas com LPS, CpG-ODN, DOX ou PTX....	68
Figura 30 – Quantificação, por citometria de fluxo, da expressão de TLR4 em células MDA-MB-231 tratadas com LPS, DOX ou PTX.	69
Figura 31 – Expressão de TLR4 em células MDA-MB-231 tratadas com LPS, DOX ou PTX.	70
Figura 32 – Quantificação, por citometria de fluxo, da expressão de TLR9 em células MDA-MB-231 tratadas com CpG-ODN, DOX ou PTX.....	71
Figura 33 – Expressão de TLR9 em células MDA-MB-231 tratados com CpG-ODN, DOX ou PTX.	72
Figura 34 – Quantificação, por citometria de fluxo, da expressão de PI3K δ em células MDA-MB-231 tratadas com LPS, CpG-ODN, DOX ou PTX.	73
Figura 35 – Expressão de PI3K δ em células MDA-MB-231 tratadas com LPS, CpG-ODN, DOX ou PTX.	74
Figura 36 – Quantificação, por citometria de fluxo, da expressão de PI3K γ em células MDA-MB-231 tratadas com LPS, CpG-ODN, DOX ou PTX.	75
Figura 37 – Expressão de PI3K γ em células MDA-MB-231 tratadas com LPS, CpG-ODN, DOX ou PTX.	76
Figura 38 – Quantificação, por citometria de fluxo, da expressão de pAKT em células MDA-MB-231 tratadas com LPS, CpG-ODN, DOX ou PTX.	77
Figura 39 – Expressão de pAKT em células MDA-MB-231 tratadas com LPS, CpG-ODN, DOX ou PTX.	78
Figura 40 – Expressão gênica de Il6, Il33, Il18 e Il1 β nas células MCF-7 tratadas com DOX ou PTX.	79
Figura 41 – Expressão gênica de Il6, Il33, Il18 e Il1 β nas células MDA-MB-231 tratadas com DOX ou PTX.	80
Figura 42 – Leptina em Adipócitos (HAd) tratados com DOX ou PTX (IC50 DE MCF7).	82
Figura 43 – Leptina em Adipócitos (HAd) tratados com DOX e PTX (IC50 DE MDA-MB-231).	83
Figura 44 – Quantificação, por citometria de fluxo, da expressão de TLR4 em células MCF-7 tratadas com o sobrenadante de adipócitos (HAd) estimulados com DOX ou PTX.	84
Figura 45 – Expressão de TLR4 em células MCF-7 tratadas com o sobrenadante de adipócitos (HAd) estimulados com DOX ou PTX.....	85
Figura 46 – Quantificação, por citometria de fluxo, da expressão de TLR9 em células MCF-7 tratadas com o sobrenadante de adipócitos (HAd) estimulados com DOX ou PTX.	86

Figura 47 – Expressão de TLR9 em células MCF-7 tratadas com o sobrenadante de adipócitos (HAd) estimulados com DOX ou PTX.....	87
Figura 48 – Quantificação, por citometria de fluxo, da expressão de PI3K δ em células MCF-7 tratadas com o sobrenadante de adipócitos (HAd) estimulados com DOX ou PTX.	88
Figura 49 – Expressão de PI3K δ em células MCF-7 tratadas com o sobrenadante de adipócitos (HAd) estimulados com DOX ou PTX.....	89
Figura 50 – Quantificação, por citometria de fluxo, da expressão de PI3K γ em células MCF-7 tratadas com o sobrenadante de adipócitos (HAd) estimulados com DOX ou PTX.	90
Figura 51 – Expressão de PI3K γ em células MCF-7 tratadas com o sobrenadante de adipócitos (HAd) estimulados com DOX ou PTX.....	91
Figura 52 – Quantificação, por citometria de fluxo, da expressão de pAKT em células MCF-7 tratadas com o sobrenadante de adipócitos (HAd) estimulados com DOX ou PTX.	92
Figura 53 – Expressão de pAKT em células MCF-7 tratadas com o sobrenadante de adipócitos (HAd) estimulados com DOX ou PTX.....	93
Figura 54 – Quantificação, por citometria de fluxo, da expressão de TLR4 em células MDA-MB-231 tratadas com o sobrenadante de adipócitos (HAd) estimulados com DOX ou PTX.	94
Figura 55 – Expressão de TLR4 em células MDA-MB-231 tratadas com o sobrenadante de adipócitos (HAd) estimulados com DOX ou PTX.	95
Figura 56 – Quantificação, por citometria de fluxo, da expressão de TLR9 em células MDA-MB-231 tratadas com o sobrenadante de adipócitos (HAd) estimulados com DOX ou PTX.....	96
Figura 57 – Expressão de TLR9 em células MDA-MB-231 tratadas com o sobrenadante de adipócitos (HAd) estimulados com DOX ou PTX.	97
Figura 58 – Quantificação, por citometria de fluxo, da expressão de PI3K δ em células MDA-MB-231 tratadas com o sobrenadante de adipócitos (HAd) estimulados com DOX ou PTX.....	98
Figura 59 – Expressão de PI3K δ em células MDA-MB-231 tratadas com o sobrenadante de adipócitos (HAd) estimulados com DOX ou PTX.	99
Figura 60 – Quantificação, por citometria de fluxo, da expressão de PI3K γ em células MDA-MB-231 tratadas com o sobrenadante de adipócitos (HAd) estimulados com DOX ou PTX.....	99
Figura 61 – Expressão de PI3K γ em células MDA-MB-231 tratadas com o sobrenadante de adipócitos (HAd) estimulados com DOX ou PTX.	101
Figura 62 – Quantificação, por citometria de fluxo, da expressão de pAKT em células MDA-MB-231 tratadas com o sobrenadante de adipócitos (HAd) estimulados com DOX ou PTX.....	102
Figura 63 – Expressão de pAKT em células MDA-MB-231 tratadas com o sobrenadante de adipócitos (HAd) estimulados com DOX ou PTX.	103
Figura 64 – Expressão de TLR4 em células MCF-7 silenciadas (TLR4 siRNA) tratadas com DOX ou PTX.	105

Figura 65 – Expressão de AKT e pAKT em células MCF-7 silenciadas (TLR4 siRNA) tratadas com DOX ou PTX.....	106
Figura 66 – Resumo gráfico.....	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação dos subtipos moleculares e correlação com a expressão dos biomarcadores na imuno-histoquímica.....	21
Tabela 2 – Identificação dos alvos usados na expressão gênica por qPCR.....	52
Tabela 3. Integração dos resultados das células MCF-7 e MDA-MB-231 tratados com DOX ou PTX.....	81
Tabela 4 – Integração dos resultados das células MCF-7 e MDA-MB-231 estimuladas com o sobrenadante de adipócitos (HAd) tratados previamente com DOX ou PTX.....	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DOX	Doxorrubicina
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimático
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-18	Interleucina 18
IL-33	Interleucina 33
IL-6	Interleucina 6
LAFICA	Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer
NF-K β	Fator de transcrição nuclear kappa B
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Tampão salina fosfato
PI3K δ	Fosfatidilinositol 3 kinase delta
PI3K γ	Fosfatidilinositol 3 kinase gamma
PI3K α	Fosfatidilinositol 3 kinase alfa
PTX	Paclitaxel
QTneo	Quimioterapia Neoadjuvante
RNA	Ácido ribonucléico
TLR4	Receptor tipo toll 4
TLR9	Receptor tipo toll 9
UFC	Universidade Federal do Ceará
WHO	World Health Organization

LISTA DE SÍMBOLOS

δ	Delta
γ	gama
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
g	Grama
kg	Quilograma
M	Molar
mg	Miligrama
ml	Mililitro
μl	Microlitro
pH	Potencial hidrogeniônico
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	19
1.1.	Câncer de mama	20
1.2.	Quimioterapia neoadjuvante (QTneo)	22
1.3.	Obesidade e câncer	25
1.4.	Receptores Toll-Like (TLRs)	27
1.5.	Fosfatidilinositol 3 kinase (PI3K)	29
2.	JUSTIFICATIVA	34
3.	OBJETIVOS	35
3.1.	General	35
3.2.	Específicos	35
4.	MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1.	Estudo clínico	36
4.1.1.	Amostras clínicas e área de atuação demográfica	36
4.1.3.	Plano de coleta das biópsias	37
4.1.4.	Imunohistoquímica (IHQ)	38
4.2.	Estudo <i>in vitro</i>	39
4.2.1.	Células	39
4.2.2.	Test Oil Red O	40
4.2.3.	Drogas	41
4.2.4.	Planejamentos experimentais	41
4.2.4.1.	Protocolo 1: Ensaio da sulforodamina B e ensaio clonogênico	41
4.2.4.2.	Protocolo 2: Avaliação da expressão de TLR4, TLR9, PI3K δ , PI3K γ e pAKT	42
4.2.4.3.	Protocolo 3: Avaliação da expressão de TLR4, TLR9, PI3K δ , PI3K γ e pAKT nas células tumorais MCF-7 e MDA-MB-231 tratadas com o sobrenadante de HAd estimulados com DOX e PTX	42
4.2.4.4.	Protocolo 4: Silenciamento gênico do TLR4 utilizando siRNA	43
4.2.5.	Avaliação da IC50 das células tumorais tratadas com DOX e PTX	44
4.2.6.	Avaliação da expressão de TLR4, TLR9, PI3K δ , PI3K γ e pAKT pelas linhagens tumorais MCF-7 e MDA-MB-231	46
4.2.6.3.	Silenciamento genético dos receptores TLR4 nas células tumorais MCF-7	49
4.2.7.	Dosagem de adipocitocinas	51
4.2.8.	Expressão gênica de <i>Il-33</i> , <i>Il-18</i> , <i>Il-1β</i> e <i>Il-6</i> por qPCR	51
5.	RESULTADOS	53
5.1.	Resultados da etapa clínica	53

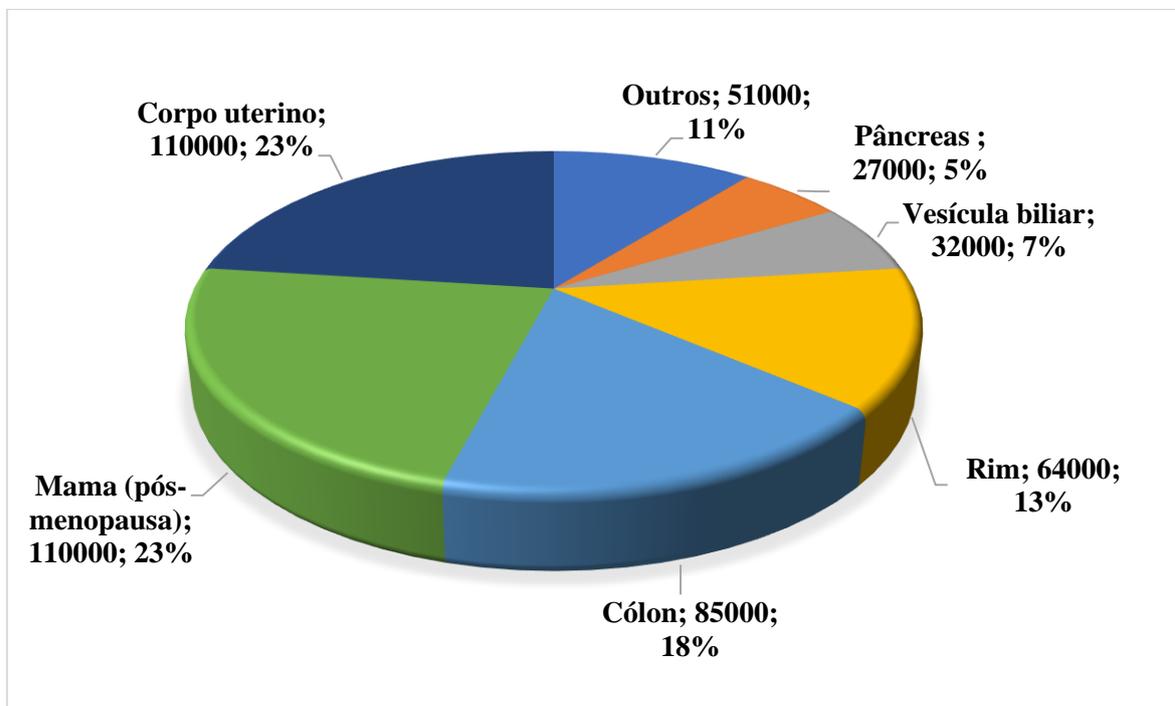
5.2.	Cálculo do IC50 da DOX e o PTX em células tumorais MCF-7 e MDA-MB-231.....	56
5.2.1.	Ensaio da sulforhodamina B	56
5.2.2.	Avaliação da sobrevivência através do ensaio clonogênico	57
5.3.	Efeito da DOX ou do PTX sobre a expressão de TLR4, TLR9, PI3Kδ, PI3Kγ e pAKT em linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231.....	58
5.3.1.	Expressão de TLR4, TLR9, PI3Kδ, PI3Kγ e pAKT por Citometria de fluxo e Imunofluorescência em células MCF-7.....	58
5.3.2.	Expressão de TLR4, TLR9, PI3Kδ, PI3Kγ e pAKT por Citometria de fluxo e Imunofluorescência em células MDA-MB-231.....	69
5.3.3.	Expressão gênica de <i>Il6</i>, <i>Il33</i>, <i>Il18</i> e <i>Il1β</i> nas células MCF-7 tratadas com DOX ou PTX.	79
5.3.4.	Expressão gênica de <i>Il6</i>, <i>Il33</i>, <i>Il18</i> e <i>Il1β</i> nas células MDA-MB-231 tratadas com DOX ou PTX.	80
5.4.	Efeito da DOX e PTX na produção de adipocitocinas a partir de adipócitos (HAd).....	82
5.5.	Resultados das células tumorais MCF-7 e MDA-MB-231 tratadas com o sobrenadante dos adipócitos (HAd) previamente estimulados com DOX ou PTX.	83
5.5.1.	Expressão de TLR4, TLR9, PI3Kδ, PI3Kγ e pAKT por Citometria de fluxo e Imunofluorescência em células MCF-7 tratadas com o sobrenadante de HAd.....	83
5.5.2.	Expressão de TLR4, TLR9, PI3Kδ, PI3Kγ e pAKT por Citometria de fluxo e Imunofluorescência em células MDA-MB-231 tratadas com o sobrenadante de HAd	93
6.	DISCUSSÃO.....	107
7.	CONCLUSÃO	114
8.	ANEXOS	115
9.	REFERÊNCIAS	117

1. INTRODUÇÃO

O câncer é um problema de saúde pública e é uma das principais causas de morte em todo o mundo (SIEGEL *et al.*, 2023). Dentro dos principais tipos de câncer (mama, próstata, pulmão e cólon), o câncer de mama é a neoplasia mais prevalente entre as mulheres (30,3% no ano de 2020). O Observatório Global do Câncer estima que haverá 2,6 milhões de novos casos de câncer de mama e 828.050 mortes anualmente até 2025 (GLOBOCAN, 2022).

A Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), em seu terceiro relatório para o Fundo Mundial de Pesquisa sobre o Câncer (WCRF/IARC), apresentou evidências convincentes de que o excesso de peso estaria associado ao aumento do risco de pelo menos 13 tipos de câncer, incluindo a câncer de mama (COLDITZ; LINDSAY, 2018). De acordo com o relatório, o excesso de índice de massa corporal aumentaria o risco de desenvolvimento de câncer de mama em Europa e nas Américas em um 36% (COLDITZ; LINDSAY, 2018), afirmando ainda, que a obesidade seria um fator agravante de morbidade.

Figura 1 - Número estimado de casos de câncer atribuídos ao incremento do índice de massa corporal.



Fonte: Adaptado de World Health Organization; Global cancer observatory, international agency for research on cancer, 2023.

A quimioterapia neoadjuvante (QTneo) é uma estratégia terapêutica padrão em cânceres de mama localmente avançados (WANG; MAO, 2020). As antraciclinas (doxorrubicina, epirubicina) e os taxanos (paclitaxel, docetaxel) são os medicamentos mais utilizados nos regimes de QTneo em pacientes com câncer de mama (VON MINCKWITZ, 2007). No entanto, é sabido que o paclitaxel (PTX) é descrito como um agonista de receptores toll-like tipo 4 (TLR4) (WAGNER SOUZA WANDERLEY, 2018) e há relatos de que o dano celular (células tumorais e/ou adipócitos) causado pela doxorrubicina (DOX) libera padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) que agem como ligantes de receptores Toll tipo 9 (TLR9) (KRYSKO *et al.*, 2011). Portanto, é provável acreditar que a DOX e o PTX possam paradoxalmente contribuir para a ativação da via TLR/PI3K/AKT/ NFκB /Interleucinas em favor de eventos proliferativos, de angiogênese e de metástase das células tumorais em contextos de resistência ao tratamento antineoplásico.

Finalmente, vale destacar que a obesidade pode ainda estar associada ao desenvolvimento de resistência a medicamentos anticâncer em pacientes com câncer de mama, aumentando a morbidade (CAO, 2019; TREVELLIN *et al.*, 2023). Por outro lado, se a obesidade pode levar ao desenvolvimento da resistência à quimioterapia do câncer, é uma questão que ainda não foi respondida. Consequentemente, os mecanismos que explicariam a relação entre obesidade e câncer ainda precisam ser explorados.

1.1. Câncer de mama

O câncer de mama é uma doença heterogênea com a segunda maior taxa de mortalidade, caracterizada histologicamente como carcinomas do tipo não especial, lobulares infiltrantes, dentre outros (LI *et al.*, 2022; SIEGEL *et al.*, 2021), que abrange vários tipos histológicos e comportamentos clínicos. Assim, os sistemas atuais de classificação histopatológica (carcinoma *in situ* e carcinoma invasivo) baseiam-se em entidades descritivas com significado prognóstico (CORREA GEYER; REIS-FILHO, 2009).

A classificação em subtipos moleculares permitiu discriminar os diferentes tipos de tumores, personalizar o tratamento e correlacionar o subtipo molecular ao prognóstico. Deste modo, a técnica mais usada para verificar a expressão de marcadores em biópsias tumorais é a imuno-histoquímica (IHC) que oferece alta especificidade e sensibilidade (mais de 90%) (SELVES *et al.*, 2018). Uma vantagem da IHQ é a avaliação semiquantitativa do número e a intensidade das células coradas (RUSSNES *et al.*, 2017).

A estratificação molecular baseada no perfil de expressão molecular de receptores de estrógeno, progesterona e fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2) permitiu a classificação dos cânceres de mama em subtipos intrínsecos (RUSSNES *et al.*, 2017), cujas características estão apresentadas na **Tabela 1**. O subtipo molecular é o principal método usado para determinar o tratamento clínico do câncer de mama (SØRLIE *et al.*, 2001; SOTIRIOU *et al.*, 2006) que varia de acordo com o nível de expressão de vários antígenos celulares, incluindo o HER2, ER, PR e o índice de proliferação Ki67 (CORREA GEYER; REIS-FILHO, 2009; WIRAPATI *et al.*, 2008)

Tabela 1 – Classificação dos subtipos moleculares e correlação com a expressão dos biomarcadores na imuno-histoquímica.

Subtipo Molecular	Estrogen Receptor (ER)	Progesterone Receptor (PR)	HER2
Luminal A	Positivo e/ou	Positivo	Negativo
Luminal B	Positivo e/ou	Positivo ou Negativo ^a	Negativo
Luminal B / HER2	Positivo e/ou	Positivo ou Negativo ^b	Positivo
HER2-enriquecido	Negativo	Negativo	Positivo
Triplo negativo	Negativo	Negativo	Negativo

^a PR <20% e Ki-67 >14%; ^b qualquer valor de PR e Ki-67

Fonte: Adaptado de Fragomeni et al. (FRAGOMENI; SCIALLIS; JERUSS, 2018)

Mais de 75% dos cânceres de mama expressam o receptor de estrogênio (ER) e/ou o receptor de progesterona (PR), assim, esses marcadores têm valor preditivo e prognóstico (EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP (EBCTCG), 2005; FISHER; REDMOND; FISHER, 2008). Por outro lado, cerca de 10% a 15% dos cânceres de mama também expressam a proteína receptora HER2/erbB2/neu, um receptor tirosina quinase que está envolvido na regulação do crescimento celular. A superexpressão de HER2, identificado de acordo com as diretrizes internacionais usando uma combinação de IHC e

técnicas de hibridização de DNA *in situ* (RUSSNES *et al.*, 2017; WOLFF *et al.*, 2013), ocorre em 15% a 20% das pacientes com cânceres de mama em estágio inicial (EBCs). Sem a terapia direcionada ao HER2, 30% a 50% das pacientes apresentam recidiva em 10 anos, muitas desenvolvendo doença metastática incurável (O'SHAUGHNESSY *et al.*, 2023). Deste modo, o HER2 também é considerado um fator prognóstico e preditivo (LOIBL; GIANNI, 2017).

Experimentalmente, tem-se estudado a patogenicidade do câncer de mama por meio de linhagens celulares como MCF-7 e MDA-MB-231. A linhagem MCF-7 é derivada do derrame pleural de uma mulher de 69 anos que sofria de adenocarcinoma de mama. A linhagem celular MCF-7 é uma das poucas que expressam o receptor de estrogênio alfa (ER- α), receptores de androgênio, progesterona e glicocorticoides, o que a torna ferramenta valiosas para a pesquisa médica ("Cell line profile MCF7", 2023; "MCF7 - HTB-22 | ATCC", 2023).

A linha celular epitelial de câncer de mama humano MDA-MB-231 foi estabelecida a partir de um derrame pleural de uma mulher caucasiana de 51 anos com adenocarcinoma mamário metastático. A MDA-MB-231 é uma linhagem celular de câncer de mama triplo-negativo (TNBC) altamente agressiva, invasiva e pouco diferenciada, pois não possui expressão de receptor de estrogênio (ER), receptor de progesterona (PR) nem amplificação de HER2 (receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano) ("Cell line profile MDA-MB-231", 2023; "MDA-MB-231 - HTB-26 | ATCC", 2023).

O uso destas e outras linhagens de câncer de mama tem permitido a previsão de respostas a fármacos a partir de perfis unicelulares (GAMBARDELLA *et al.*, 2022). Tal abordagem fornece condições para determinar como cada componente no microambiente do tumor (células tumorais ou não tumorais) pode contribuir em termos patogênicos para o sucesso da doença ou do tratamento.

1.2. Quimioterapia neoadjuvante (QTneo)

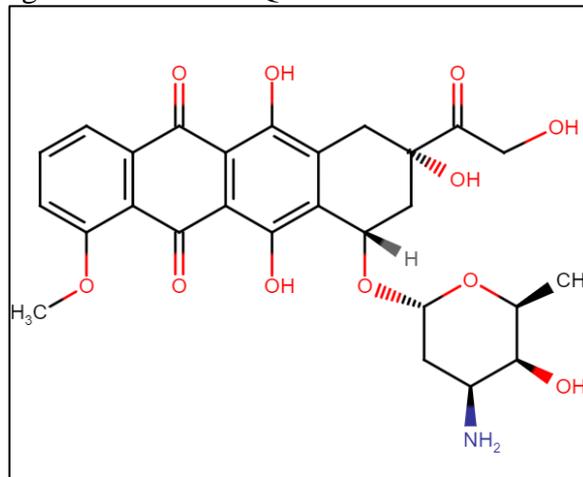
O tratamento neoadjuvante, também chamado de "terapia primária" ou "terapia pré-operatória", no câncer de mama tem quatro objetivos: diminuir o volume do tumor para operar o que antes era inoperável, aumentar o número de cirurgias conservadoras, avaliar a quimiossensibilidade *in vivo* e analisar o gerenciamento de micrometástases. A QTneo é amplamente utilizada para o manejo clínico do câncer de mama, especialmente para reduzir o estágio do tumor primário na mama e do linfonodo axilar metastático. A QTneo pode converter um tumor de mama anterior localmente avançado e inoperável em um tumor operável (CHARFARE; LIMONGELLI; PURUSHOTHAM, 2005; DAN COSTA *et al.*, 2010) e, em

tumores amplamente operáveis, o resultado é um pequeno aumento (7% a 12%) nas taxas de conservação da mama (BUCHHOLZ; MITTENDORF; HUNT, 2015; SCHOTT; HAYES, 2012; WANG; MAO, 2020).

A eficácia da QTneo depende dos regimes utilizados. As antraciclina e os taxanos são os grupos farmacológicos mais utilizados nos regimes de quimioterapia em pacientes com câncer de mama (VON MINCKWITZ, 2007). As antraciclina envolvem moléculas como a doxorrubicina (**Figura 2**) e a epirrubicina. Por outro lado, os taxanos mais utilizados são docetaxel ou PTX (**Figura 3**). Além disso, esses fármacos são geralmente administrados em combinação com outros com mecanismos de ação diferentes, como fluorouracil, um antimetabólito, e ciclofosfamida, um agente alquilante (PATHAK *et al.*, 2018).

As antraciclina são moléculas extraídas de bactérias *Streptomyces spp.* e estão aprovadas para tratar vários tipos de cânceres como leucemia linfocítica aguda, leucemia mielogênica aguda, linfoma de Hodgkin, linfoma não Hodgkin, câncer de bexiga, câncer de mama e outros cânceres metastáticos, apresentando grande eficácia clínica (RAYNER; CUTTS, 2023).

Figura 2 - Estrutura Química da Doxorrubicina.



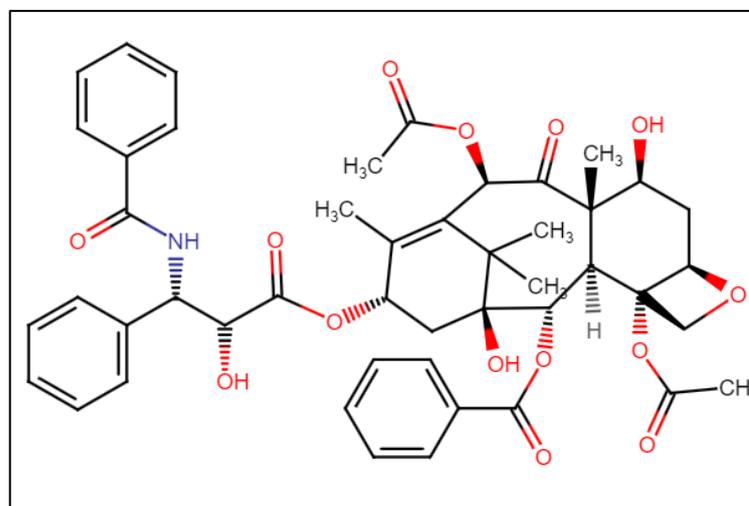
Fonte: Estrutura desenhada em ChemDaw

As ações citostáticas e citotóxicas das antraciclina apontam para vários mecanismos diferentes como: a interação com a topoisomerase II, promovendo a parada do crescimento e a morte celular apoptótica; intercalação entre os pares de bases adjacentes de DNA inibindo a síntese de DNA e RNA (bloqueio da divisão celular); além da geração de espécies reativas de

oxigênio (ROS) resultando em estresse oxidativo, danos ao DNA e peroxidação lipídica, desencadeando a apoptose celular (CHEN *et al.*, 2019) (39).

Em relação aos taxanos ou taxoides, estes são um grupo de agentes antineoplásicos intimamente relacionados que têm um mecanismo de ação bem definido como inibidores da mitose e que são amplamente utilizados na terapia de cânceres de ovário, mama, pulmão, esôfago, próstata, bexiga e cabeça e pescoço (NATIONAL INSTITUTE OF DIABETES AND DIGESTIVE AND KIDNEY DISEASES, 2020).

Figura 3 – Estrutura química do paclitaxel.



Fonte: Estrutura desenhada em ChemDaw

Em termos de mecanismo de ação, os taxanos estabilizam os microtúbulos formados, impedindo sua quebra normal. Isto faz com que as células tumorais parem de se dividir durante a mitose, resultando em um bloqueio na metáfase, contribuindo para uma atividade citotóxica, a antiangiogênica em sua ação antitumoral (SWAMY; PULLAIAH; CHEN, 2021).

Os quimioterápicos são um tratamento eficaz contra tumores. No entanto, a eficácia do tratamento pode ser impedida pela resistência a múltiplas drogas (MDR), um fenômeno que consiste no desenvolvimento de resistência ao tratamento pelo tumor. Xu e colaboradores sugeriram mecanismos envolvidos nesse processo de resistência. Um deles é a ativação curta e transitória do NF- κ B. Outro mecanismo é a indução relativamente prolongada do receptor X de pregnano (PXR). Em relação à DOX e PTX, esses pesquisadores demonstraram que tais moléculas têm a capacidade de induzir MDR mediada pela Glicoproteína-P (P-gp) no câncer de mama e que a resistência adquirida à DOX foi parcialmente via ativação do NF- κ B de forma

independente de TLR4, enquanto o PTX induziu a resistência via a sinalização TLR4/NF- κ B (XU *et al.*, 2014).

Em outro estudo propôs que os fragmentos de DNA liberados a partir de células tumorais mortas por doxorrubicina ativam células tumorais sobreviventes por meio de receptores TLR9 e catepsina aumentando a expressão de mRNA de metaloproteinases MMP-2, MMP-9 e MMP-13 envolvidas na ocorrência, no desenvolvimento, na invasão e metástase de carcinoma de mama (SONG *et al.*, 2021; TUOMELA *et al.*, 2013). O estudo sugere ainda que, além de facilitar a ativação do TLR9 por ácidos nucleicos, as catepsinas também podem mediar os efeitos posteriores da ativação do TLR9. Por conseguinte, a invasão de células tumorais mediadas pela ativação de TLR9 por fragmentos de DNA poderiam representar um novo mecanismo de resistência ao tratamento. Consequentemente, a expressão de TLR9 no tumor pode afetar as respostas ao tratamento quimioterápico (TUOMELA *et al.*, 2013).

Alinhado a esse raciocínio, outro estudo demonstrou que a liberação de HMGB1 induzida pela doxorrubicina ativa a sinalização de TLR2 em células tumorais, levando a um fenótipo resistente à quimioterapia, sugerindo que inibidores de TLR2 *in vivo* reduz o crescimento tumoral e potencializa a eficácia da doxorrubicina sem impacto negativo no sistema imunológico do hospedeiro (DI LORENZO *et al.*, 2022).

Vários fatores podem, adicionalmente, contribuir para o desenvolvimento de resistência ao tratamento oncológico, o que inclui fatores ambientais (KHODABANDEH *et al.*, 2022), inflamatórios (ELGOHARY; EL TAYEBI, 2023; PAVITRA *et al.*, 2023), epigenéticos (GARCIA-MARTINEZ *et al.*, 2021) e obesidade (SAVVA *et al.*, 2023).

1.3. Obesidade e câncer

A obesidade é considerada um fator de risco independente para vários tipos de câncer, incluindo o de mama (BHASKARAN *et al.*, 2014). Segundo a organização Mundial da Saúde, o sobrepeso e a obesidade são definidos como o acúmulo anormal ou excessivo de gordura que apresenta risco à saúde. A classificação da obesidade está definida pelo índice de massa corporal (IMC). Assim, uma pessoa com IMC acima de 25 kg/m² é considerada em sobrepeso, enquanto é classificada como obesa quando apresenta um IMC acima de ≥ 30 kg/m² (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2023).

Nas últimas décadas houve um crescimento mundial da incidência de obesidade (53). Assim, o aumento da mortalidade por câncer de mama em todo o mundo pode refletir, em parte, o aumento da prevalência da obesidade (WANG; SIMPSON; BROWN, 2015). No entanto,

embora as pesquisas tenham identificado a obesidade e o diabetes como fatores de risco para o câncer de mama, esses resultados ressaltam que o risco de comorbidade é complexo e pode diferir de acordo com o subtipo molecular de câncer de mama (HOSSAIN *et al.*, 2022). Finalmente, dado o rápido aumento da obesidade, seu impacto no câncer de mama e outros tipos de câncer não está totalmente compreendido.

Qureshi e colaboradores demonstraram que em contraste com as ações anti-inflamatórias do 17 β -estradiol, a estrona, predominante após a menopausa e produzida pelos adipócitos, tem características pró-inflamatórias e promove o crescimento de câncer de mama. Os autores mostraram que a interação adipócito-célula tumoral estimula a regulação positiva de citocinas pró-inflamatórias dependentes de estrona e NF κ B, demonstrando que, em adipócitos mamários humanos, a expressão de citocinas aumenta com a obesidade, menopausa e câncer. Finalmente, os autores contextualizam que a obesidade produz uma resposta inflamatória sistêmica que libera várias citocinas e ativa vias de sinalização que promovem a iniciação, sobrevivência e escape imune do tumor (QURESHI *et al.*, 2020).

Foi demonstrado que os ácidos graxos nutricionais (palmitato e oleato), cujos níveis circulantes estão frequentemente aumentados na obesidade, ativam a sinalização de TLR4 em adipócitos e macrófagos. De forma complementar, a capacidade desses ácidos graxos de induzir a sinalização inflamatória em células ou tecidos adiposos e macrófagos é atenuada na ausência de TLR4 (SHI *et al.*, 2006). Adicionalmente, macrófagos RAW264.7 tratados com vários ácidos graxos saturados, insaturados e trans mostraram que embora os ácidos graxos trans, o ácido araquidônico e o ácido oleico induzam um ligeiro aumento na expressão do mRNA da IL-6, os ácidos graxos saturados são mais potentes na estimulação do mRNA da IL-6 (SHI *et al.*, 2006). Em conjunto, esses dados sugerem que os ácidos graxos livres são capazes de utilizar a sinalização TLR4 para induzir uma resposta inflamatória em macrófagos e que o TLR4 é um elo molecular entre nutrição, lipídios e inflamação.

Em um contexto de obesidade, um hormônio polipeptídico produzido pelos adipócitos em proporção ao seu conteúdo de triglicérides é a leptina, uma adipocitocina que tem papel de se ligar e ativar o receptor LEPR-B no cérebro, diminuindo a ingestão de alimentos e aumentando o gasto de energia (PICÓ *et al.*, 2022). Há relatos de que a ativação de receptores toll-like (TLR) é mediada por ácidos graxos e sua expressão pode ser regulada por leptina e adiponectina em condições inflamatórias e que tal expressão é ativada pela via JAK2-STAT3 (JIANG *et al.*, 2021). Outros marcadores podem afetar a resposta terapêutica em pacientes com câncer de mama, dentre os quais, tem-se a família de proteínas quinases denominada fosfoinositol 3-quinase (PI3K) classe I (YANG; POLLEY; LIPKOWITZ, 2016), cuja ativação

pode ocorrer via TLRs. A ativação da PI3K, via TLR4 e 9, é um reconhecido fator indutor de proliferação nos tumores (ZHANG *et al.*, 2023). É possível que tal sinalização seja um elo importante entre a resistência ao tratamento QT-NEO em contextos de obesidade em pacientes com câncer de mama.

1.4. Receptores Toll-Like (TLRs)

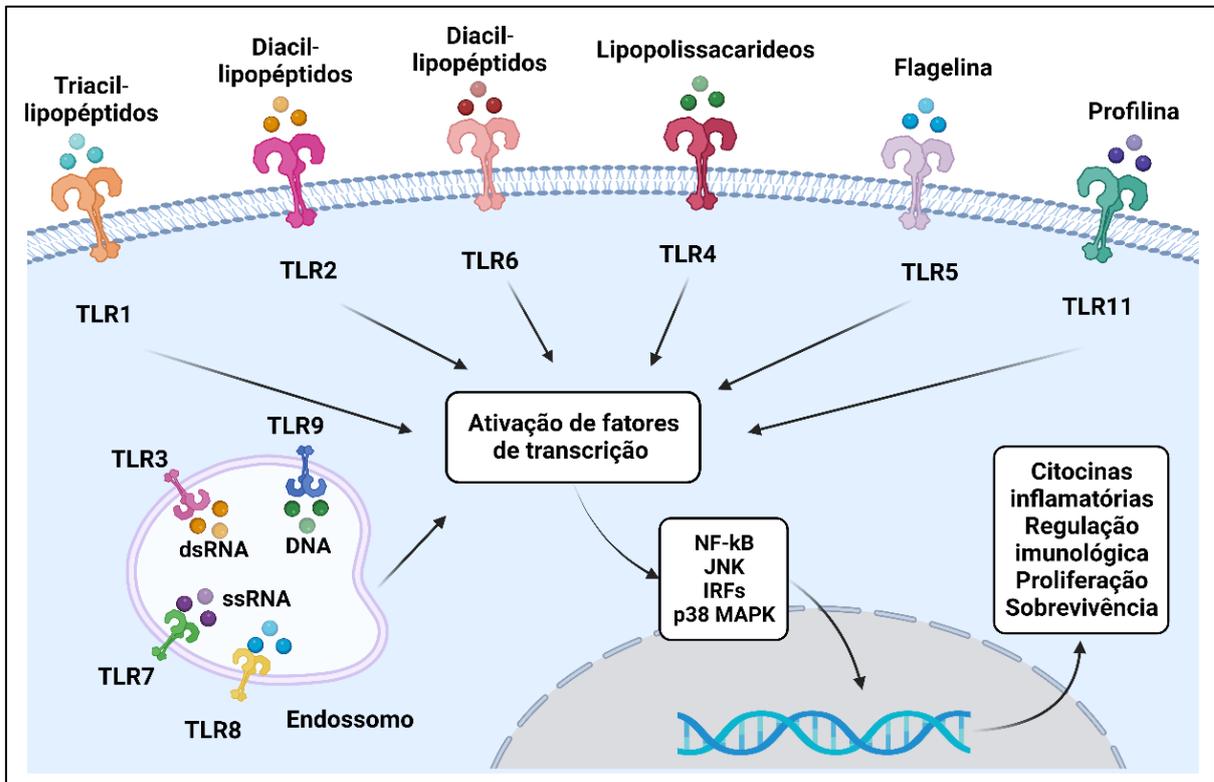
Os Receptores Toll-Like (TLRs) receberam essa denominação devido à sua semelhança com o receptor *toll* descoberto em 1985 em *Drosophila melanogaster* (mosca de fruta comum) (VIJAY, 2018). Eles desempenham um papel fundamental no sistema imunológico inato e, por meio de várias vias de sinalização, fornecem uma ligação importante para a imunidade adaptativa (GREEN *et al.*, 2014).

Os TLRs humanos, são sensores importantes de componentes microbianos estranhos, bem como produtos de tecidos próprios danificados ou inflamados. Esses receptores têm a capacidade de responder a um agonista específico e ativar uma cascata de sinalização levando à produção de citocinas, quimiocinas e outros mediadores inflamatórios (LI; JIANG; TAPPING, 2010). Os TLRs também regulam a proliferação e a sobrevivência celular, o que serve para expandir as células imunológicas úteis e integrar as respostas inflamatórias e os processos de reparo tecidual (LI; JIANG; TAPPING, 2010; LITAK *et al.*, 2020). Sabe-se que os mamíferos (camundongos e humanos) expressam 13 TLRs diferentes que são expressos na membrana celular externa ou intracelularmente, e que reconhecem diferentes padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), padrões moleculares associados a micróbios (MAMPs) e padrões moleculares associados à morte/danos (DAMPs) para iniciar a resposta imunológica protetora (KUMAR; BARRETT, 2022).

Os TLRs 1, 2, 4, 5 e 6 são expressos na superfície celular, enquanto os TLRs 3, 7, 8 e 9 são encontrados intracelularmente (**Figura 4**). Os TLRs da superfície celular normalmente respondem a antígenos bacterianos ou fúngicos, e os TLRs citoplasmáticos geralmente respondem a ácidos nucleicos virais ou microbianos (BARTON, 2008; LI; JIANG; TAPPING, 2010). Em 1997, o TLR homólogo humano foi reportado e o receptor foi denominado Toll-like receptor 4 (TLR4). O TLR4 reconhece o lipopolissacarídeo (LPS) das bactérias Gram-negativas como um PAMP. Assim, a identificação de TLR4 em humanos trouxe respostas para as perguntas existentes no campo da infecção e imunidade, abordando o mistério em torno do reconhecimento de patógenos/micróbios estranhos pelo sistema imunológico. No entanto, a

desregulação de TLR4 gera respostas imunes pró-inflamatórias prolongadas, responsáveis por diferentes doenças inflamatórias e imunomediadas (KUMAR; BARRETT, 2022).

Figura 4 – Classificação de receptores Toll Like (TLRs)



Fonte: Adaptado de Trejo-de la O. et al. (TREJO-DE LA O; HERNÁNDEZ-SANCÉN; MALDONADO-BERNAL, 2014).

O TLR4 atua como receptor de lipopolissacarídeo (LPS) e é ativado por uma ampla variedade de componentes de organismos infecciosos, como a manana fúngica e as glicoproteínas virais. Portanto, esse receptor tem uma função essencial na regulação das respostas imunológicas à infecção. Especial atenção merece o HMGB1 que é considerado um DAMP endógeno ativador do TLR4 e um componente essencial da morte celular imunogênica (ADAMS *et al.*, 2017).

O TLR9, localizado predominantemente nos endossomos, foi um dos primeiros sensores a desempenhar um papel no desencadeamento da sinalização imune inata em resposta ao DNA estranho em células imunes inatas apresentadoras profissionais, como células dendríticas e macrófagos. O TLR9 reconhece DNA 2'-desoxirribo (citidina-fosfato-guanosina) (CpG) não metilado de bactérias e vírus (MATZ; GUZMAN; GOODMAN, 2019).

Além dos já conhecidos ativadores de TLR4 e TLR9, como o LPS e o CpG-ODN respectivamente, há estudos *in vitro* e *in vivo* que apontam a que alguns fármacos utilizados na quimioterapia antineoplásica tem capacidade de ativar TLRs de forma direta ou indireta. Krysko e colaboradores demonstram que as células apoptóticas mortas *in situ* pela doxorrubicina são uma fonte potencial de DAMPs que podem estimular o TLR2 e o TLR9 e induzir a inflamação aguda. Além do mais, foi mostrado que a resposta inflamatória foi significativamente reduzida em camundongos com deficiência no gene 88 de resposta primária à diferenciação mieloide (MyD88), TLR2 ou TLR9. Da mesma forma, demonstrou-se que o uso de um antagonista de TLR-9 (ODN2088) reduz o recrutamento de neutrófilos induzido pela doxorrubicina. Dessa forma, demonstrou-se que as vias de sinalização TLR2/TLR-9-MyD88 tem um papel central no início da resposta inflamatória aguda contra as células apoptóticas induzidas pela administração de doxorrubicina (TREJO-DE LA O; HERNÁNDEZ-SANCÉN; MALDONADO-BERNAL, 2014).

A superexpressão de TLR4 em tumores humanos geralmente está relacionada à quimiorresistência e à metástase. Rajput e colaboradores, observaram que o TLR4 se encontra superexpresso na maioria das amostras clínicas de câncer de mama e em 68% das linhagens de câncer de mama examinadas (MDA-MB-231, MDA-MB-435, MCF-7, SUM149, HCC1419, T47D, BT-20, etc) (69). Tal estudo mostrou que o TLR4 promove a sobrevivência das células tumorais MDA-MB-231 tratadas com PTX por meio da ativação da via NF- κ B, q qual é conhecida por transcrever genes pró-sobrevivência. Também foi demonstrado que a depleção do TLR4 em células MDA-MB-231 reduz a regulação dos genes pró-sobrevivência, concomitantemente com uma redução em 50 a 70% na IC50 do PTX *in vitro* e uma redução na taxa de crescimento tumoral *in vivo*. Coletivamente, esses resultados demonstram que o PTX não apenas mata as células tumorais, mas também, paradoxalmente, aumenta a sobrevivência destas por meio da ativação da via TLR4, sugerindo que a modulação da via do TLR4 poderia melhorar significativamente a resposta à terapia com PTX (RAJPUT; VOLK-DRAPER; RAN, 2013).

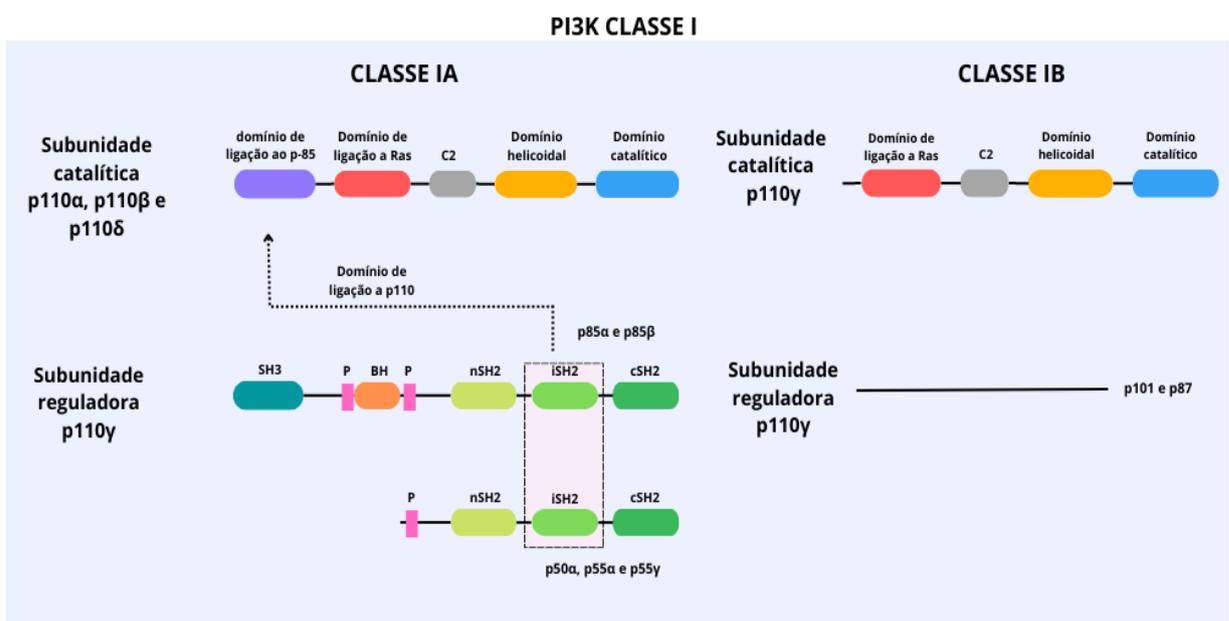
Como mencionado anteriormente, a cascata de sinalização intracelular de TLRs envolve a ativação da via PI3K/AKT/mTOR/MAPK. Contudo, não está claro se tal mecanismo atua no favorecimento de resistência ao tratamento baseado em QTneo em contextos de obesidade. Tampouco se conhece quais isoformas de PI3K estariam envolvidas nessa sinalização.

1.5. Fosfatidilinositol 3 kinase (PI3K)

Enzimas fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) são quinases lipídicas que fosforilam os lipídios de inositol para regular a sinalização e o tráfego vesicular intracelular. Os eucariotos superiores têm oito isoformas de PI3K regulando a transdução de sinal celular (BILANGES; POSOR; VANHAESEBROECK, 2019). No final da década de 1990, a equipe de Domin e Waterfield propuseram o agrupamento das PI3Ks em três classes cujas funções abrangentes foram descobertas desde então. Em geral, as PI3Ks de classe I atuam na sinalização dos receptores ligados à membrana plasmática e das pequenas GTPases, enquanto as PI3Ks de classe II e III controlam principalmente o tráfego da membrana ao longo da rota endocítica, na reciclagem endossômica e na autofagia, com um efeito muitas vezes indireto na sinalização celular (DOMIN; WATERFIELD, 1997).

As PI3K tem sido amplamente estudada por suas importantes funções na fisiologia e em doenças. Em particular, a PI3K de classe I é um subtipo bem estudado e foi confirmada sua associação com a ocorrência e o desenvolvimento do câncer (VANHAESEBROECK *et al.*, 2021). As PI3Ks de classe I (**Figura 5**) consistem em uma subunidade catalítica p110 (p110 α , p110 β , p110 γ ou p110 δ) codificada por PIK3CA, PIK3CB, PIK3CG e PIK3CD, respectivamente, e uma subunidade reguladora p85 (p85 α , p85 β e p85 γ) codificada por PIK3R1, PIK3R2 e PIK3R3, respectivamente (ZHU *et al.*, 2022).

Figura 5 – Representação esquemática da classificação das subunidades PI3K de classe I.



Fonte: própria autora

Um elemento para explicar as funções fisiológicas específicas das isoformas das PI3Ks de classe I são seus níveis de expressão relativa em diferentes tecidos. p110 α e p110 β apresentam uma ampla distribuição tecidual, enquanto p110 γ e p110 δ são altamente expressos em glóbulos brancos, mas também são encontrados em alguns outros tecidos em níveis mais baixos do que nos leucócitos (p110 γ em cardiomiócitos). p110 δ também é encontrado em neurônios (EICKHOLT *et al.*, 2007; LAW *et al.*, 2012) e células semelhantes a fibroblastos (BARTOK; HAMMAKER; FIRESTEIN, 2014; WHITEHEAD *et al.*, 2012), onde funciona na regeneração axonal (EICKHOLT *et al.*, 2007) e em respostas inflamatórias (BARTOK; HAMMAKER; FIRESTEIN, 2014). O p110 δ também pode se tornar altamente expresso em alguns tipos de tumores sólidos, como tumores de mama (GOULIELMAKI *et al.*, 2018; SAWYER *et al.*, 2003) e fígado (KO *et al.*, 2018) com evidências emergentes de que a PI3K δ poderia ser um alvo terapêutico nesses cânceres.

A cascata de sinalização intracelular da ativação da PI3K envolve a via AKT/mTOR/MAPK, que desempenha uma função essencial em vários processos que incluem a regulação da tradução gênica, o metabolismo e a adesão celular, bem como a apoptose e a autofagia. Quando ativadas, as quinases de classe I têm uma ação antiautofágica (GOZZELINO *et al.*, 2020).

A via da PI3K é uma via de sinalização intracelular crucial que sofre mutação ou esta amplificada no desenvolvimento de uma grande variedade de cânceres, tendo papel importante na sobrevivência das células tumorais, na angiogênese e na metástase, características tornam as PI3Ks alvos terapêuticos promissores no tratamento do câncer (MISHRA *et al.*, 2021). De fato, alguns estudos mostram resultados favoráveis da utilização de inibidores de PI3K em ensaios *in vivo* e *in vitro*.

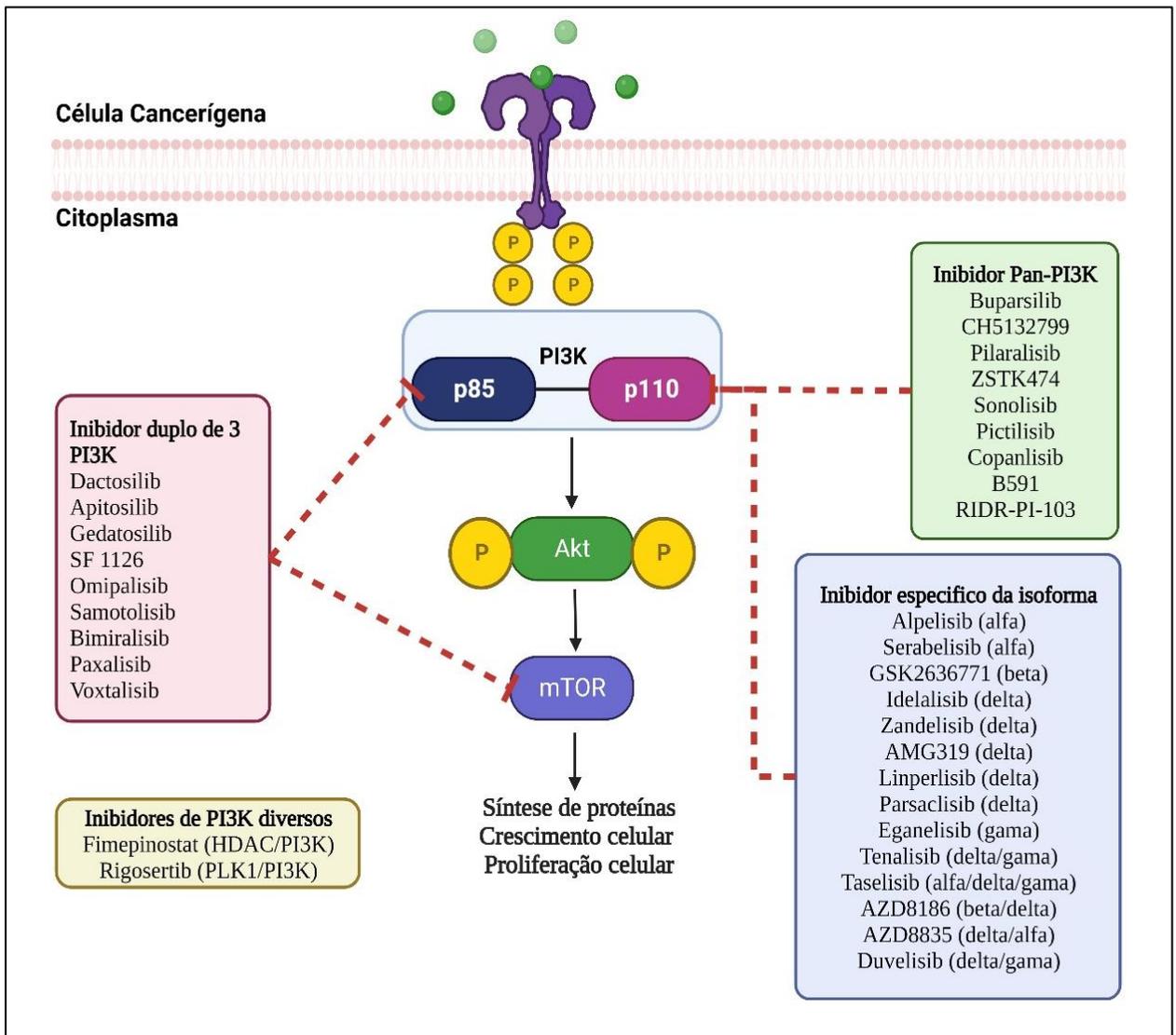
Goulielmaki e colaboradores demonstraram que a inativação farmacológica de p110 δ em camundongos impede a formação de tumores e o recrutamento de macrófagos para os sítios tumorais e afeta fortemente a sobrevivência, proliferação e apoptose de células tumorais. Adicionalmente, a inativação farmacológica de p110 δ em camundongos com macrófagos defeituosos ou em camundongos com macrófagos normais, mas enxertados com tumores sem p110 δ , suprimiu apenas parcialmente o crescimento do tumor, indicando um papel necessário de p110 δ em macrófagos e células tumorais na progressão do tumor (GOULIELMAKI *et al.*, 2018). Esses dados corroboram o uso de inibidores de p110 δ para o tratamento do câncer de mama.

Atualmente, há vários estudos clínicos em andamento e concluídos envolvendo inibidores de PI3K (pan inibidores, inibidores específicos de isoformas, ou inibidores duais de

PI3K/mTOR) (MISHRA *et al.*, 2021; ZHU *et al.*, 2022), com o objetivo de superar a resistência às terapias atuais. Vários inibidores de PI3K são mostrados na **Figura 6**.

Os pan inibidores de PI3K têm como alvo todas as quatro isoformas (α , β , δ e γ) da PI3K de classe I e são inibidores competitivos de ATP. De todos os inibidores pan-PI3K listados na **Figura 6**, apenas o Copanlisib foi aprovado pela FDA (MISHRA *et al.*, 2021).

Figura 6 – Inibidores de PI3K para o tratamento de pacientes com câncer



Fonte: adaptado de Mishra *et al.*, 2021.

Até o momento, dos inibidores específicos da isoformas, o alpelisibe é o único inibidor de PI3K aprovado pelo FDA para o tratamento do câncer de mama (MISHRA *et al.*, 2021). Contudo, Mayer e colaboradores tentaram usar o alpelisibe para o tratamento neoadjuvante do câncer de mama, mas os resultados do estudo de fase II NEO-ORB mostraram que o alpelisibe

combinado com letrozol para câncer de mama ER+/HER2- e em estágio inicial não teve nenhum benefício clínico adicional (MAYER *et al.*, 2019). Estudos recentes indicam que os inibidores de PI3K/mTOR combinados com PTX podem aumentar a resposta do tumor aos imunossupressores e podem proporcionar um tratamento viável para o câncer de mama metastático (CLINICALTRIALS.GOV, ; YAN *et al.*, 2021) .Portanto, é provável que os inibidores de alvo duplo em combinação com a imunoterapia também serão o foco de pesquisas futuras.

Contudo, ainda não está claro qual seria a contribuição das isoformas PI3K γ e δ no contexto da patogênese do câncer de mama e na resistência ao tratamento neoadjuvante, sendo está a proposta da presente pesquisa.

2. JUSTIFICATIVA

A obesidade é um fator de risco para diferentes tipos de câncer, como o de mama, por aumentar a morbidade associada ao tratamento, à recorrência tumoral e à mortalidade. Apesar de o binômio obesidade/câncer ser bastante estudado, os mecanismos pelos quais a obesidade incrementa a morbimortalidade por câncer ainda não são totalmente entendidos. Como primeira modalidade de tratamento de um tumor primário maligno, a QTneo objetiva reduzir o tamanho tumoral e melhorar a sobrevida global. O regime neoadjuvante AC-T é baseado principalmente na utilização da doxorubicina (DOX), ciclofosfamida e paclitaxel (PTX).

Por uma parte, há relatos de que o dano celular causado pela DOX liberaria padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), como o DNA mitocondrial (DNAMit), um ligante do receptores toll-like tipo 9 (TLR9). Adicionalmente, o PTX é descrito como um agonista de receptores toll-like tipo 4 (TLR4). Por outro lado, em um contexto de obesidade, a ativação do TLR é mediada por ácidos graxos e sua expressão pode ser regulada por algumas adipocitocinas como a leptina e adiponectina em condições inflamatórias. Adicionalmente, a leptina pode favorecer a expressão de TLR4, induzida através da via JAK2-STAT3. Notavelmente, a mutação e ativação constitutiva da PI3K-alfa, é um reconhecido fator indutor de proliferação nos tumores de mama, sendo que um dos mecanismos de ativação dessa via envolve TLR4 e 9.

Contudo, se a quimioterapia neoadjuvante (DOX ou PTX) exerce um papel na ativação ou modulação da via TLR/PI3K/AKT/Interleucinas ou outros membros da família das PI3K de classe I em um contexto de obesidade no câncer de mama, ainda não está claro. Este, por tanto, é o objetivo principal desse estudo.

3. OBJETIVOS

3.1. General

Avaliar se a doxorrubicina e o paclitaxel, usados na quimioterapia neoadjuvante para câncer de mama, ativam receptores toll-like e proteínas de sua sinalização, PI3K e AKT.

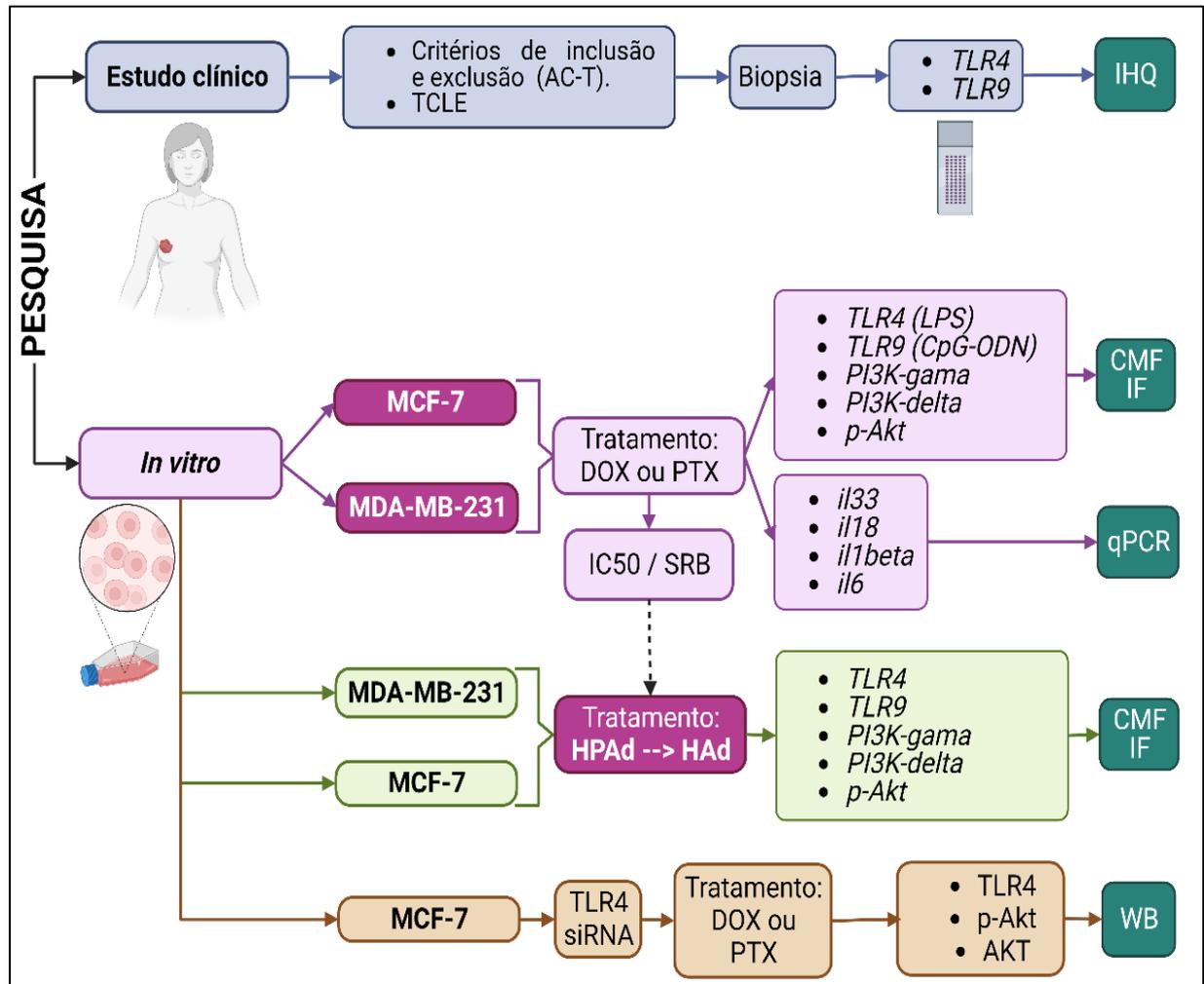
3.2. Específicos

- Avaliar o padrão de expressão de TLR4 e TLR9 em tecido mamário de pacientes com câncer de mama pós-quimioterapia neoadjuvante.
- Investigar a ativação da expressão de TLR4, TLR9, PI3K δ , PI3K γ , pAKT e Interleucinas em linhagens celulares de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231 tratadas com Doxorrubicina e o Paclitaxel.
- Investigar a liberação de adipocitocinas (leptina, resistina e adiponectina) nas células adiposas (HAd) tratados com doxorrubicina ou paclitaxel.
- Analisar a expressão de TLR4, TLR9, PI3K δ , PI3K γ , pAKT e Interleucinas em linhagens de câncer de mama tratados com sobrenadante dos adipócitos (HAd) previamente estimulados com doxorrubicina ou paclitaxel.
- Avaliar o papel da doxorrubicina ou o paclitaxel na ativação de PI3K por uma via dependente de TLR4.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi feito em amostras de pacientes e em cultivo de células como mostrado no **Figura 7**.

Figura 7. Esquema experimental geral do estudo.



Fonte: Própria autora

4.1. Estudo clínico

4.1.1. Amostras clínicas e área de atuação demográfica

Pacientes diagnosticadas com câncer de mama do Hospital Universitário Walter Cantídio da Universidade Federal do Ceará (HUWC/UFC) foram entrevistadas e avaliadas durante o período de outubro de 2021 até outubro de 2022.

As pacientes foram incluídas no estudo baseando-se em amostra de conveniência segundo os critérios de inclusão e exclusão. O **ANEXO 1** apresenta o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) lido e assinado pelas pacientes.

O estudo recebeu o seguinte **número de parecer de aprovação** (COMPEPE/UFC): **4.470.803**.

4.1.2. Critérios de inclusão e exclusão

Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo pacientes do 1) sexo feminino, 2) com idade maior que 18 anos até 80 anos, 3) com diagnóstico de câncer primário de mama, 4) com resultados de exame imunohistoquímico para os biomarcadores convencionais: receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PR), receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2) e marcador de proliferação celular (Ki-67); 5) indicadas para serem submetidas à QTneo baseada em doxorubicina/ciclofosfamida seguido de paclitaxel (Protocolo AC-T, 4 ciclos de doxorubicina + ciclofosfamida seguido de 2 ciclos de paclitaxel); 6) sem uso de fármacos imunossupressores.

Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão foram pacientes com 1) tratamento prévio para câncer de mama; 2) outra malignidade prévia; 3) identificação de amostras patológicas sem material suficiente e fixadas de modo inadequado; 4) pacientes que não tenham concordado em participar do estudo.

4.1.3. Plano de coleta das biópsias

As amostras de tecidos foram obtidas através de biópsias de fragmento guiadas por ultrassom com agulhas de calibre 12 gauge. O material coletado foi processado de forma habitual para o exame histológico e imunohistoquímico (IHQ) de rotina (ER, PR, Ki-67, HER-2). Posteriormente, as amostras foram processadas novamente para a análise dos marcadores de interesse (TLR4 eTLR9) por IHQ.

Figura 8 – Plano de tratamento Neo adjuvante das pacientes.



Fonte: Própria autora

4.1.4. Imunohistoquímica (IHQ)

Para a realização da imuno-histoquímica, os cortes das biópsias (tissue microarray, TMA) foram desparafinizadas na estufa a 60°C por 1h seguidos de 2 banhos com Xilol. Os tecidos foram então reidratados em soluções alcoólicas (99,8°; 95° e 70°) e a recuperação antigênica foi realizada com tampão citrato de sódio 10mM (pH 6,0) em banho maria a 95°C por 15 minutos. O bloqueio das peroxidases foi feito com peróxido de hidrogênio 3% e o bloqueio das ligações inespecíficas foi feito com BSA 5% por 20 minutos a temperatura ambiente. Os tecidos foram incubados por 12 horas a 4°C com os anticorpos primários mouse anti-TLR4 (sc-293072, Santa Cruz Biotechnology, INC.) ou anti-TLR9 (sc-47723, Santa Cruz Biotechnology, INC.) na diluição 1:50. As lâminas foram lavadas com PBS 1X para retirar o excesso de anticorpo primário, em seguida, as lâminas foram incubadas com 300µl de anticorpo secundário - polímero HRP (Dako EnVision®+ Dual Link System-HRP (DAB+) por 30 minutos a temperatura ambiente. Finalizada o tempo de incubação, adicionou-se solução de Substrato-Cromógeno (DAB/DAKO). As lâminas foram contracoradas com Hematoxilina de Harris concentrada por 30 segundos seguidas de banhos de água destilada. Finalmente, as lâminas foram desidratadas com soluções alcoólicas (95° e 99,8°) e xilol para depois ser montadas utilizando Entellan Microscopy. Os scores da IHQ foram 0 (Ausência ou <1%), 1 (Marcação discreta na maioria > 50%), 2 (Marcação moderada na maioria >50% ou marcando intensa na minoria <50%) e 3(Marcação intensa na maioria >50%).

4.2. Estudo *in vitro*

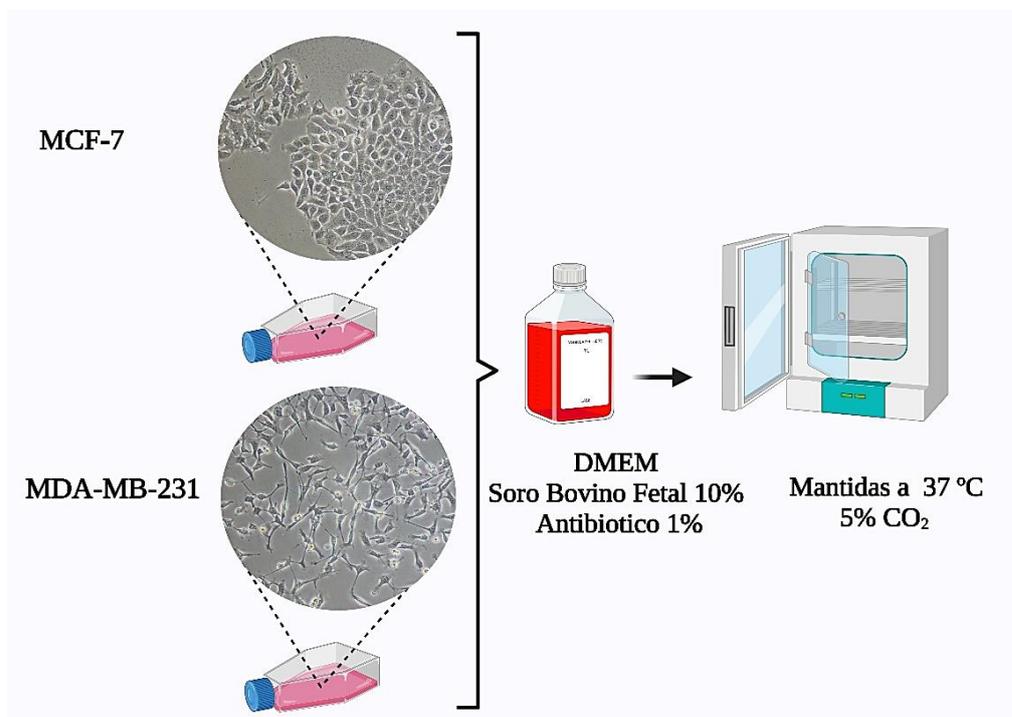
4.2.1. Células

Foram utilizadas três linhagens celulares:

- a) A célula tumoral de adenocarcinoma de mama MCF-7 (Sigma-Aldrich, 86012803): a linhagem expressa tanto os receptores de estrogênio bem como o receptor de progesterona.
- b) A célula tumoral de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231 (Sigma-Aldrich, 92020424): a linhagem não expressa receptor de estrogênio (ER), receptor de progesterona (PR) nem amplificação de HER2.

As células MCF-7 e MDA-MB-231 foram mantidas em meio DMEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific, São Paulo, Brasil) suplementadas com 10% de soro bovino fetal e 1% de antibiótico (100 U/ml penicilina e 100 µg/ml estreptomicina) e mantidas em uma incubadora com 5% de CO₂ a 37°C. Dependendo do tipo de protocolo, as células foram cultivadas em placas de 96, 24, 12 ou 6 poços em uma quantidade de 3x10⁴ células/ml (**Figura 9**).

Figura 9 – Células MCF-7 e MDA-MB-231.



Fonte: Própria autora

- a) A célula Pré-adipócito humana (HPAd) subcutânea foi obtida da Sigma-Aldrich (802S-05A). A HPAd foi mantida em meio de crescimento de pré-adipócitos (811-500, Sigma-Aldrich) em uma incubadora com 5% de CO₂ a 37°C.

Para os testes posteriores, a HPAd precisou ser diferenciada para adipócitos (HAd). Com esse objetivo, o HAd foi cultivado em placas de 12 poços e quando a confluência de 100% foi atingida, a HPAd foi diferenciada para Adipócitos Humanos (HAd) utilizando o meio de diferenciação de adipócito humano (811D-250, Sigma-Aldrich). Ao final de 12 dias, as células foram completamente diferenciadas em HAd. Foi feita o Test com Oil Red O para confirmar a diferenciação (**Figura 10**).

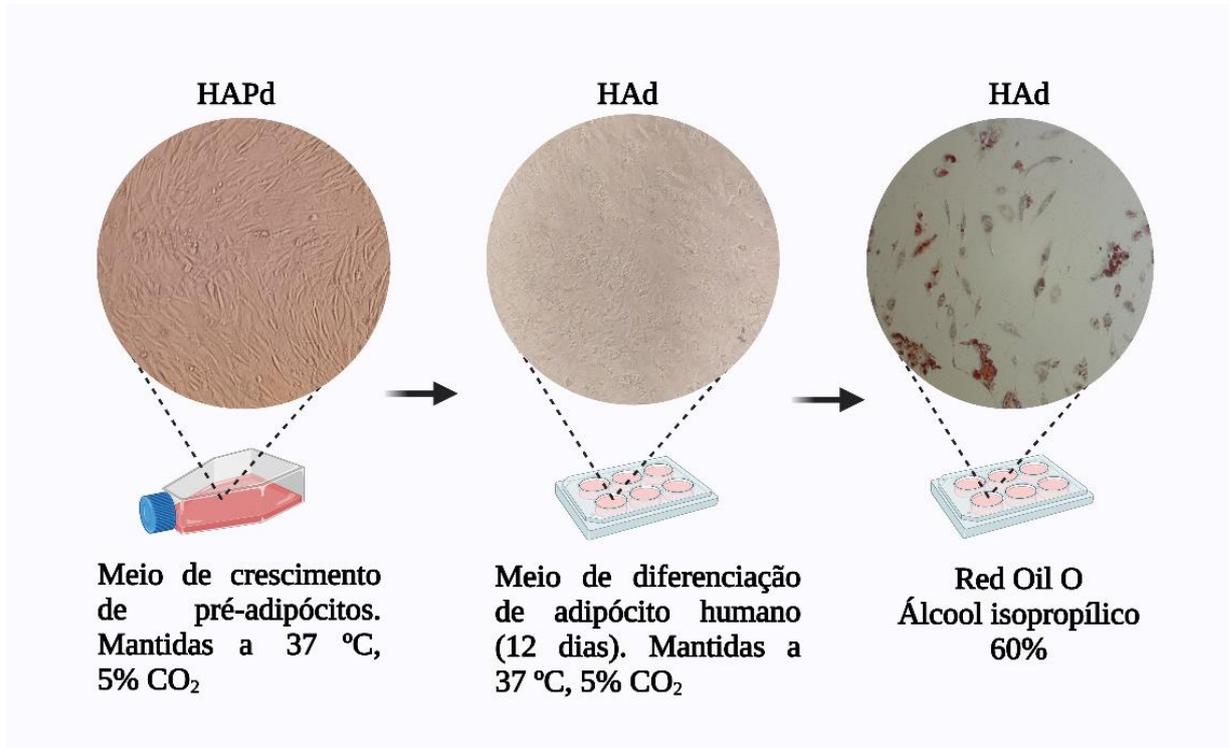
Durante as manutenções das linhagens, para o desprendimento de todas as células aderidas, utilizou-se uma solução de 0,05% de tripsina-EDTA 10X (Gibco, Thermo Fisher Scientific, São Paulo, Brasil). Finalmente, as células foram manuseadas dentro do fluxo laminar (LABCONCO, classe II-A2) e mantidas em incubadoras com atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C (Thermo scientific, SERIES II WATER JACKET) durante todos os experimentos. O crescimento das culturas foi acompanhado diariamente com auxílio de microscópio óptico invertido (NIKON ECLIPSE TS100) e a manutenção para meio de cultura novo foi feito quando necessário.

4.2.2. Test Oil Red O

Após os 12 dias de diferenciação dos pré-adipócitos (HPAd), as placas contendo os adipócitos (HAd) foram lavadas duas vezes com PBS 1X estéril. Em seguida, as células foram fixadas com formaldeído 3% por 20 minutos a temperatura ambiente. As placas foram lavadas duas vezes com PBS 1X e uma vez com álcool isopropílico 60%, posteriormente, as placas foram secas a temperatura ambiente.

Após a secagem, adicionaram-se 1,5 ml de solução de trabalho Oil Red O (Oil Red O 0,05% 6:4 em água destilada e filtrada) e a incubação foi feita a temperatura ambiente por 2h. Os poços foram lavados com água destilada até remover o excesso do corante.

Figura 10 – Diferenciação de Pre-adipócitos (HPAd) para adipócitos (HAd).



Fonte: Própria autora

4.2.3. Drogas

Cloridrato de doxorrubicina (DOX) (D1515, Sigma-Aldrich); Paclitaxel (PTX) (T7402, Sigma-Aldrich); Lipopolissacarídeos de *Escherichia coli* O111:B4 (LPS) (L4391, Sigma-Aldrich); CpG oligodesoxinucleotídeos (CpG-ODN) (NBP2-31134, nobusbio); TLR4 siRNA (SC-40260, Santa Cruz).

4.2.4. Planejamentos experimentais

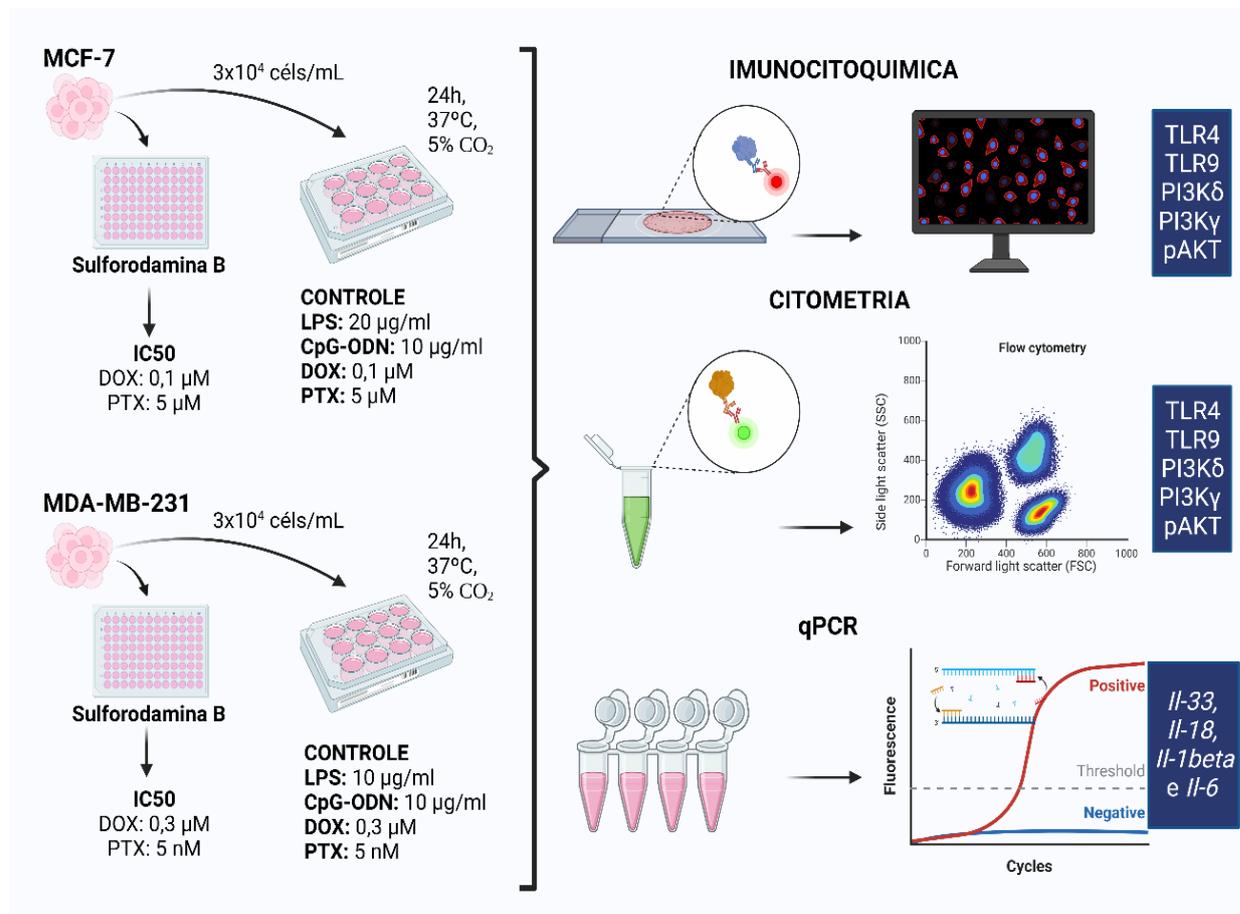
4.2.4.1. Protocolo 1: Ensaio da sulforodamina B e ensaio clonogênico

Numa primeira etapa, utilizou-se o ensaio da sulforodamina B com o objetivo de conhecer a concentração inibitória média (IC₅₀) da DOX e o PTX sobre as células MCF-7 e MDA-MB-231. Em seguida, com a finalidade de avaliar as capacidades de proliferação e de formar colônias, após tratamento com DOX ou PTX, foi feito o teste de sobrevivência através do ensaio clonogênico.

4.2.4.2. Protocolo 2: Avaliação da expressão de TLR4, TLR9, PI3K δ , PI3K γ e pAKT

A avaliação da expressão de TLR4, TLR9, PI3K δ , PI3K γ e pAKT nas células tumorais MCF-7 e MDA-MB-231 foi realizada por citometria de fluxo (quantitativo) e Imunofluorescência (qualitativo). A quantificação de citocinas (*Il-33*, *Il-18*, *Il-1 β* e *Il-6*) foram realizadas por qPCR (Figura 11).

Figura 11 – Protocolo 2



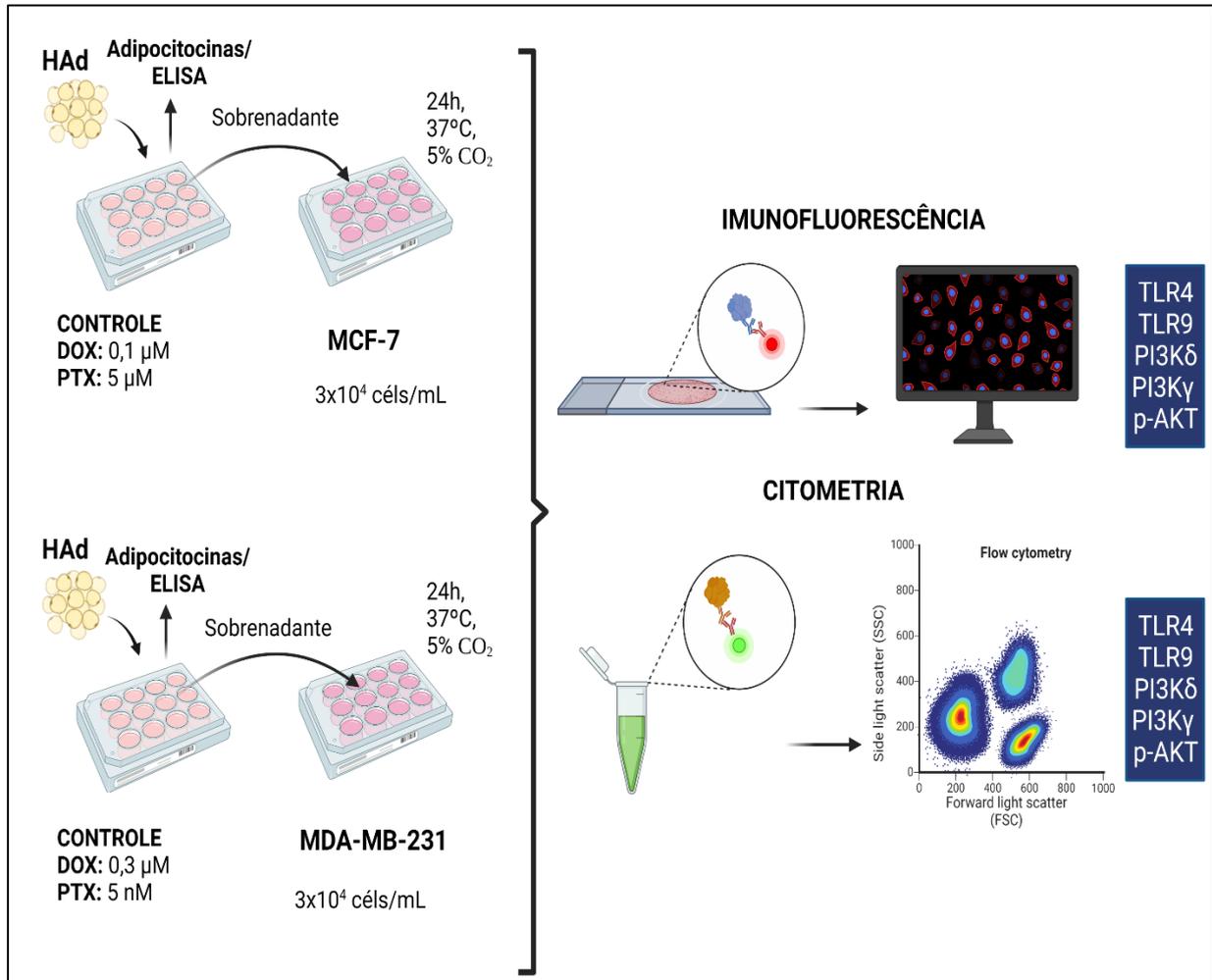
Fonte: Própria autora

4.2.4.3. Protocolo 3: Avaliação da expressão de TLR4, TLR9, PI3K δ , PI3K γ e pAKT nas células tumorais MCF-7 e MDA-MB-231 tratadas com o sobrenadante de HAd estimulados com DOX e PTX

Avaliação da expressão de TLR4, TLR9, PI3K δ , PI3K γ e pAKT nas células tumorais MCF-7 e MDA-MB-231 foram feitas por citometria de fluxo (quantitativo) e Imunofluorescência (qualitativo).

A quantificação de adiponectinas foi feita por ELISA (**Figura 12**).

Figura 12 – Protocolo 3

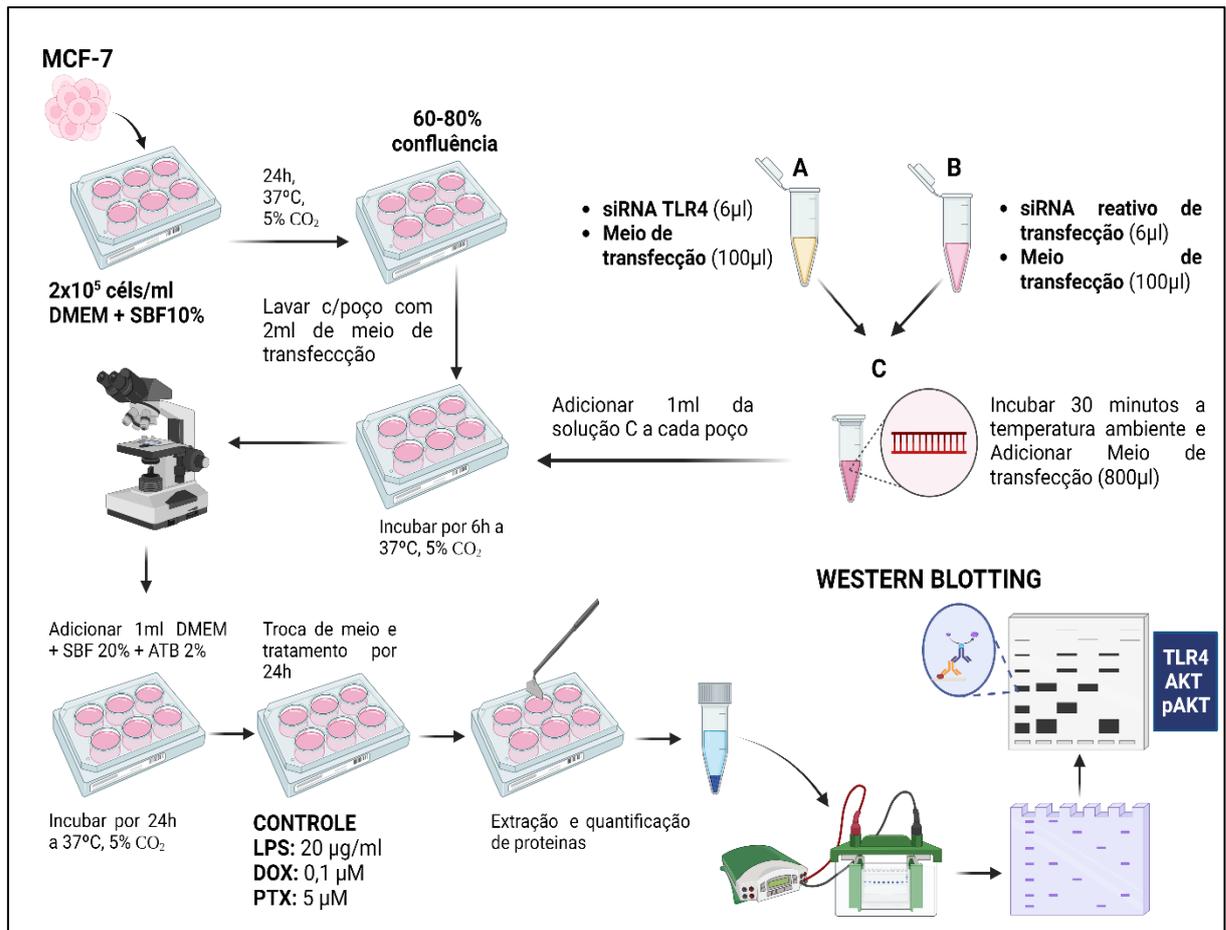


Fonte: Própria autora

4.2.4.4. Protocolo 4: Silenciamento gênico do TLR4 utilizando siRNA

Os receptores TLR4 da célula MCF-7 foram silenciados utilizando RNA de interferência (TLR4 siRNA). A avaliação da expressão de TLR4, GAPDH, AKT e pAKT nas células foi feita por Western blotting (**Figura 13**).

Figura 13 – Protocolo 4



Fonte: Própria autora

4.2.5. Avaliação da IC₅₀ das células tumorais tratadas com DOX e PTX

4.2.5.1. Ensaio da sulforrodamina B (SRB)

O ensaio com sulforrodamina B (SRB) foi desenvolvido por Skehan e colaboradores para medir a citotoxicidade induzida por substâncias e a proliferação celular para aplicações de triagem de drogas em larga escala (ORELLANA; KASINSKI, 2016). Seu princípio se baseia na habilidade que este composto tem de se ligar a componentes proteicos das células fixadas pelo ácido tricloroacético. Tal ligação ocorre independentemente da atividade metabólica das células, diferindo do método do MTT.

Em condições levemente ácidas, o SRB se liga e, em condições levemente básicas, pode ser extraído das células e solubilizado para medição por espectrofotometria. Sua sensibilidade é comparável à de vários ensaios de fluorescência e superior à de Lowry ou Bradford (VOIGT,

2005). Em contraste com o ensaio MTT, a coloração SRB não depende da atividade mitocondrial, o que resulta em uma baixa variação entre as linhas celulares e, portanto, há menos necessidade de otimização específica à linha celular. O ensaio SRB é preferido por sua menor variação entre as linhas celulares, maior sensibilidade e maior faixa linear (VOLMER *et al.*, 2022).

Para o procedimento experimental, as células tumorais MCF-7 ou MDA-MB-231 foram cultivadas em placas de 96 poços na densidade de 3×10^4 céls/ml. Depois de 24 horas do plaqueamento, as células foram tratadas com DOX ou PTX por 24 horas. No momento em que as células foram tratadas, a placa, tempo zero (células não tratadas), foi fixada com ácido tricloroacético (TCA) a 10% e preservadas a uma temperatura de 4°C por 1 hora. Depois de transcorrido o tempo de tratamento das células com os quimioterápicos, realizou-se a fixação com TCA como descrito anteriormente. Após o período da fixação, as placas foram lavadas 3 vezes com água destilada. Em seguida, adicionaram-se 100 µl da solução de SRB 0,4% e as placas foram mantidas na estufa a 5% de CO₂, 37 °C por 30 minutos. Ao término do tempo da incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com ácido acético 1% com a finalidade de remover o excesso de SRB.

Para realizar a leitura das placas, adicionaram-se 200 µl de tampão tris base 10 mM. Posteriormente, as placas foram homogeneizadas em mesa agitadora por 10 minutos a temperatura ambiente. As absorbâncias foram lidas no espectrofotômetro com leitor de placa no comprimento de onda de 570 nm.

Análise de dados:

A normalização dos dados foi desenvolvida em Excel para verificação do efeito obtido, citostático ou citotóxico, a partir das seguintes equações:

Efeito citostático, se $T \geq T_0$ e $< CN$

$$\% \text{ Proliferação celular} = \frac{(T - T_0)}{CN - T_0} \times 100$$

Efeito citotóxico, se $T < T_0$

$$\% \text{ Proliferação celular} = \frac{(T - T_0)}{T_0} \times 100$$

Onde:

T: Absorbância das células incubadas com a amostra

T₀: Absorbância das células da placa tempo zero

CN: Absorbância das células do controle negativo

A partir da interpolação de regressão não-linear da absorbância e a concentração, no GraphPad Prism (GraphPad Software versão 8.0), foi gerada um gráfico com a finalidade de determinar a inibição do crescimento celular em 50% (IC_{50}), a inibição do crescimento total (CIT) e seu efeito citotóxico com a concentração letal média (CL_{50}).

4.2.5.2. Teste de sobrevivência através do ensaio clonogênico

Para avaliar a capacidade das células tumorais (MCF-7 e MDA-MB-231) de proliferar indefinidamente mantendo sua capacidade para formar colônias, as linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 foram cultivadas em placas de 6 poços na quantidade de 500 células por poço em meio DMEM completo. Após 24 horas do plaqueamento, as células foram incubadas (24h) com DOX ou PTX nas concentrações iguais ao IC_{50} de cada droga. Utilizou-se como controle negativo células tratadas apenas com o veículo (salina). Após 24 horas do tratamento, o meio de cada poço foi trocado por um meio novo. Todas as placas foram mantidas em incubadora a 5% de CO_2 a 37°C. O teste finalizou quando as colônias começaram a se aproximar (12 dias).

Para a contagem das colônias, o meio foi removido e os poços foram lavados 3 vezes com PBS 1X. A cada poço, adicionaram-se 2 ml de cristal violeta (0,5% de cristal violeta em metanol 50%), seguido de agitação por um período de 1 hora. Os poços foram lavados com água destilada até a remoção do excesso do corante. Em seguida, as placas foram secas a temperatura ambiente.

As colônias (a partir de 30 células) foram contadas sob microscopia estereoscópica.

4.2.6. Avaliação da expressão de TLR4, TLR9, PI3K δ , PI3K γ e pAKT pelas linhagens tumorais MCF-7 e MDA-MB-231.

4.2.6.1. Tratamento das células

Para avaliar a expressão de TLR4, TLR9, PI3K δ , PI3K γ e pAKT, as linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 foram cultivadas em placas de 12 poços (6 poços para Western Blotting) numa densidade celular de 3×10^4 céls/ml. Após 24h, as células foram tratadas com as concentrações iguais à IC_{50} de cada droga por um período adicional de 24 h, conforme a seguir: DOX (0,1 μ M em células MCF-7; 0,3 μ M em células MDA-MB-231), PTX (5 μ M em células MCF-7; 5 nM em células MDA-MB-231), LPS (20 μ g/ml em células MCF-7; 10 μ g/ml em células MDA-

MB-231) ou CpG-ODN (10 µg/ml). O grupo controle foi tratado apenas com o veículo (salina). A expressão dos marcadores foi avaliada por Citometria, Imunofluorescência ou Western Blotting. As concentrações de LPS e CpG-ODN foram utilizadas segundo o sugerido nas data sheets dos reagentes.

Para avaliar se o sobrenadante das células adiposas (HAd) tratadas com quimioterapia estimularia a ativação da via TLR/PI3K/Akt /Interleucina em células tumorais, as células HPAAd foram cultivadas em placas de 12 poços. Quando a confluência de 100% foi atingida, as células foram diferenciadas a HAd (12 dias de diferenciação). As células HAd foram tratadas com DOX (0,1 µM para células MCF-7; 0,3 µM para células MDA-MB-231), PTX (5 µM para células MCF-7; 5 nM para células MDA-MB-231) por 24h. No grupo controle somente foi realizada a troca de meio. Após o período de tratamento das células HAd, as células tumorais MCF-7 e MDA-MB-231 foram incubadas por 24h com os sobrenadantes das células adiposas HAd previamente estimuladas com os quimioterápicos. A expressão dos marcadores foi avaliada por Citometria e Imunofluorescência. Todos os testes foram realizados em triplicata.

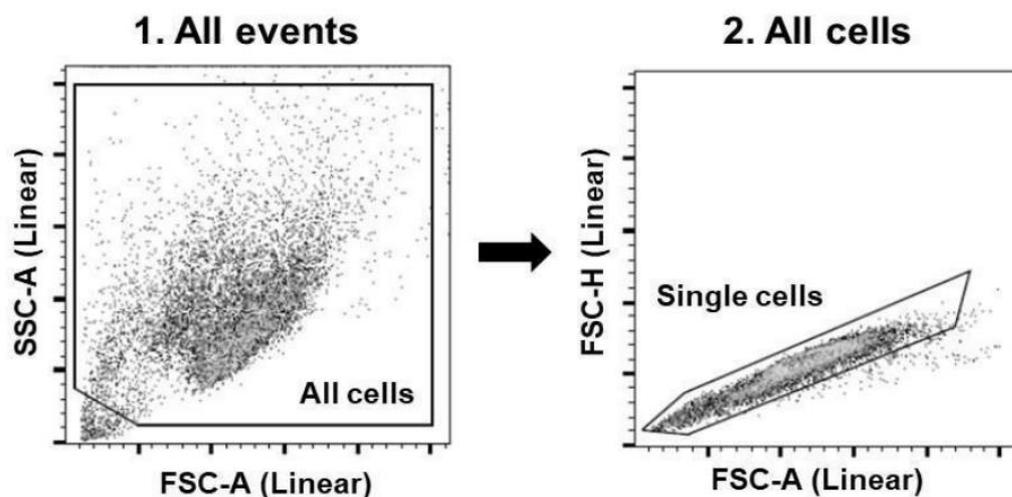
4.2.6.2. Citometria de fluxo

Depois do período de tratamento, as células foram tripsinizadas, transferidas para microtubos e centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se solução FACs (SBF4%, 200µl) para ressuspender o pellet. As amostras foram novamente centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi incubado (1h) com anticorpo primário (anti-TLR4, anti-TLR9, anti-PI3Kδ, anti-PI3Kγ ou anti-pAKT) numa concentração de 1:100. Em seguida, as amostras foram lavadas com solução FACs e incubadas com anticorpo secundário Alexa Fluor 488 (diluição 1:500) por 1h. Nos 15 minutos finais de incubação foi adicionado o DAPI em uma concentração de 2 µM/ml. Finalmente, as células foram centrifugadas e ressuspensas em tampão FACs para aquisição por citometria de fluxo.

Para a análise dos dados, utilizou-se estratégias de *gates*, de modo que, após a marcação adequada, 10 mil eventos (sem debris e doublets) foram adquiridos no citômetro de fluxo. Inicialmente, foi criado um gráfico de pontos (*dot plot*) com parâmetros de morfologia (FSC vs SSC) contendo todos os eventos adquiridos pelo citômetro (*all events*) onde foi criada uma região de seleção (*gate*) contendo todas as células adquiridas (*all cells*) de forma a excluir os debris e outliers. Em um novo gráfico contendo apenas a população de *all cells* criou-se um *gate* para selecionar os eventos simples (*single cells*) através da plotagem de 2 medidas do

parâmetro FSC (**Figura 14**). Esses gráficos e *gates* (*all cells e single cells*) são comuns para todos os testes de citometria. Ademais, os dez mil eventos celulares adquiridos foram referentes a população de *single cells* e foram contados de cada replicata de cada grupo. Os resultados de todos os testes foram analisados no software FlowJo (Tree Star Inc) obtendo valores em porcentagem das populações ou em intensidade mediana de fluorescência (MFI, do inglês *median fluorescence intensity*). Para verificação da ocorrência de diferenças entre os diferentes grupos, os dados foram analisados no programa GraphPad Prism (GraphPad Software versão 8.0) com nível de significância máximo de 5% ($p < 0,05$).

Figura 14 – Estratégia de *gates* para citometria de fluxo.



Gráficos em formato *dot plot* contendo os *gates* de *all cells* e *single cells* que são comuns de todos os testes realizados por citometria de fluxo.

4.2.6.3. Imunofluorescência

Para a realização da Imunofluorescência, as células foram fixadas em formaldeído 3% (Sigma-Aldrich®) durante 15 minutos. Em seguida, realizou-se a permeabilização da membrana celular e o bloqueio de ligações inespecíficas, por 20 minutos, utilizando triton X-100 a 0,1% (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) e BSA 3% (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA).

As células foram incubadas com os anticorpos primários de camundongo ou coelho TLR4 (sc-293072, Santa Cruz Biotechnology, INC.), TLR9 (sc-47723, Santa Cruz

Biotechnology, INC.), PI3K δ (19591S, Cell Signaling Technology®, Danvers, MA, EUA), PI3K γ (5405S, Cell Signaling Technology®, Danvers, MA, EUA) e pAKT (sc-51403, Santa Cruz Biotechnology, INC.) (diluição de 1:100), durante 2 horas, a temperatura ambiente. Posteriormente, foi realizada a incubação com o anticorpo secundário feito em cabra anti-IgG de camundongo Alexa Fluor 488 ou anti-IgG de coelho Alexa Fluor 568 (Invitrogen®, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), na diluição de 1:500, durante 1 hora. Com a finalidade de marcar os núcleos, as células foram incubadas, durante 30 minutos, com DAPI (Invitrogen®, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) (4 μ l em 200 ml de PBS 1X). Para montagem das lamínulas, foi utilizado o meio Prolong Gold Antifade Mountant (Invitrogen®, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

Para a aquisição das fotomicrografias, foi utilizado o Leitor multimodo para geração de imagens de células cytation™3 Biotek. As fotomicrografias foram analisadas através de um “software” de imagem (Fiji Image J, National Institutes of Health, Washington, DC, EUA).

4.2.6.3. Silenciamento genético dos receptores TLR4 nas células tumorais MCF-7

Em uma placa de seis poços foram cultivadas 2×10^5 células/2ml em meio DMEM sem antibióticos e suplementado com 10% de FBS. As células foram incubadas a 37°C em uma incubadora de CO₂ até atingir um 60-80% de confluência.

Para o silenciamento de TLR4, a solução duplex de TLR4 siRNA (sc-40260, Santa Cruz Biotechnology, INC) (Solução A) e o Reagente de Transfecção diluído (sc-29528, Santa Cruz Biotechnology, INC) (Solução B) foram misturadas e incubadas por 15 a 45 minutos em temperatura ambiente. Depois do período de incubação, adicionou-se Meio de Transfecção de siRNA (sc-36868, Santa Cruz Biotechnology, INC).

As células foram lavadas com 1ml de Meio de Transfecção de siRNA (sc-36868, Santa Cruz Biotechnology, INC) e posteriormente foi adicionado 1 ml do reagente de transfecção de siRNA (solução A + solução B). As células foram incubadas por 5 a 7 horas a 37°C em uma incubadora de CO₂. Passado o tempo de incubação, adicionou-se 1 ml/poço de meio DMEM contendo 2 vezes a concentração normal de soro e antibióticos, e continuou-se com mais 24 horas de incubação. Finalmente, o meio foi substituído por meio DMEM com 10% de SBF e 1% de antibiótico.

O tratamento das células com LPS (20µg/ml), DOX (0,1µM) e PTX (5µM) foram feitos dentro das 24-72 horas após a adição do meio fresco na etapa anterior. O efeito da DOX e do PTX nas células MCF-7 silenciadas para TLR4 foi analisada por Western Blotting e qPCR.

4.2.6.4. Western Blotting

Finalizado o período de silenciamento e tratamento, o sobrenadante foi removido e as células foram lavadas com PBS 1X estéril. Em seguida, adicionou-se 300µl de tampão RIPA 1X com inibidor de protease 1:100. O lisado foi transferido a microtubos e incubado por 30-60 minutos no gelo. Os microtubos foram centrifugados a 12000xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi preservado a 4°C em outros microtubos para a quantificação das proteínas.

As proteínas foram quantificadas com o kit BCA Protein Assay Kit da Pierce Cat.#23227 (Reagente B + Reagente A 1:50 + 10 µl de amostra ou BSA) e a absorbância foi analisada a 562 nm usando um espectrofotômetro. A curva padrão foi feita com BSA nas concentrações indicadas pelo fabricante (concentração máxima de 2000µg/ml). As amostras foram aliquotadas e armazenadas (-80°C), contendo 20µg de proteína total, em Tampão Laemmli 4X.

As amostras foram aquecidas a 95°C por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 15 µl de amostra para cada poço no gel 10% (SDS-PAGE) de 1mm. A eletroforese foi feita a 60V por 30 minutos e 100V até finalizar a corrida. O padrão de peso molecular utilizado foi o Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards (Cat.#1610375).

A transferência das proteínas para a membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF) foi feita por eletro-transferência semisseca no Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad). A transferência foi realizada a 20V por 20 minutos. Após a transferência, as membranas foram bloqueadas com 2% de leite em pó desnatado em TBS-T 1X por 1 hora a temperatura ambiente sob agitação. As membranas foram lavadas 3 vezes por 5 minutos como TBS-T 1X sob agitação.

Subsequentemente, as membranas foram incubadas durante a noite a 4°C com os anticorpos primários mouse anti-TLR4, anti-pAKT ou anti-AKT (1:1000) e GAPDH (1:6000) sob agitação. No dia seguinte, as membranas foram lavadas 3 vezes por 5 minutos como TBS-T 1X e incubadas com anticorpo secundário (goat anti-mouse IgG, HRP peroxidase conjugated, 1:1000) (Thermo Fisher Scientific, 31430) por 1h a temperatura ambiente.

A imunorreatividade foi detectada através do kit Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad, 1705061). Finalmente, a ligação do anticorpo foi revelada usando um sistema de imagem

iBright™ CL1500 Imaging System (Invitrogen™, A44114). Após revelação e captura das imagens, utilizando Image Lab da BIO-RAD, foram obtidos os valores de densidade relativa referentes de cada banda testada.

4.2.7. Dosagem de adipocitocinas

Para a dosagem das adipocitocinas (Leptina, Resistina, Adiponectina) no sobrenadante das células HAd estimulados com DOX ou PTX, foi utilizado kit de DuoSet® ELISA. Resumidamente, numa placa de ELISA de 96 poços, incubaram-se 100 µl/poço de anticorpo de captura por 12 h a 4°C. Após a incubação, as placas foram deixadas por um período de 10 – 15 minutos a temperatura ambiente e em seguida foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem (PBS 1X + Tween 20 0,05%). As placas foram incubadas por 1h a temperatura ambiente com BSA 1% (100 µl/poço) e em seguida foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem. Adicionaram-se 50-100 µl de amostra em cada poço, seguido de incubação por 2h a temperatura ambiente. Após o período de incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem e em seguida foi feita incubação por 2h a temperatura ambiente com o anticorpo de detecção (100 µl/poço). As placas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem e incubadas protegidas da luz com 100 µl/poço de Streptoavidina-HRP (1:40) por 20 minutos. As placas foram novamente lavadas 3 vezes com tampão de lavagem e incubadas com 100 µl/poço de solução substrato A+B (peróxido de hidrogênio:tetrametilbenzidina, 1:1) por 5 a 15 minutos. A reação foi interrompida com 50 µl da solução de parada (ácido sulfúrico 2N), e a absorbância foi analisada a 570nm usando um espectrofotômetro.

As leituras de absorbância foram plotadas em uma curva padrão da citocina de interesse como descrito nas recomendações do fabricante.

4.2.8. Expressão gênica de *Il-33*, *Il-18*, *Il-1β* e *Il-6* por qPCR

Finalizado o período de tratamento das células MCF-7 e MDA-MB-231 com DOX ou PTX, o sobrenadante foi removido e a extração de RNA foi realizado pelo método Trizol de acordo com as especificações do fabricante. Resumidamente, adicionou-se 300 µl de Trizol a cada poço e com ajuda de um “scraper” foram removidas e colhidas todas as células. O lisado foi transferido a microtubos, foi adicionado 200 µl de clorofórmio (vortex) e as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado, misturado com 500 µl de isopropanol e incubado até o dia seguinte a -20°C. As amostras foram centrifugadas

12000 rpm por 10 minutos a 4°C, para eliminação do sobrenadante e preservação do pellet. Adicionou-se 100 µl de álcool 75° e as amostras foram centrifugadas a 7.5g a 4°C por 5 minutos. O sobrenadante alcoólico foi eliminado por evaporação por 20 minutos e o pellet foi ressuspensão com 25 – 50 µl de água livre de RNase (as amostras podem ser preservadas a -80°C).

O RNA total foi quantificado em Espectrofotômetro de Microplacas Epoch™ (BioTek). A transcrição de RNA em DNA complementar foi realizada com o High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, usando o Veriti 96 Thermocycler. Ao término da transcrição reversa, todas as amostras foram armazenadas em freezer a -20°C. O qPCR foi realizado no QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Thermo Scientific), utilizando TaqMan Gene Expression Assays (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) conforme detalho na **Tabela 2**, de acordo com as instruções do fabricante. A expressão de mRNA foi determinada após a normalização dos valores com o gene de referência *Rplp0* (Cat.# 4448489). Utilizou-se o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para o cálculo da expressão relativa.

Tabela 2 – Identificação dos alvos usados na expressão gênica por qPCR.

FLUORÓFORO	GENE	ID DO ENSAIO
TaqMan	<i>Il-33</i>	Hs00369211_m1
	<i>Il-6</i>	Hs00174131_m1
	<i>Il-18</i>	Hs01038788_m1
	<i>Il-1β</i>	Hs01555410_m1
	<i>Rplp0</i>	Hs00420895_gH

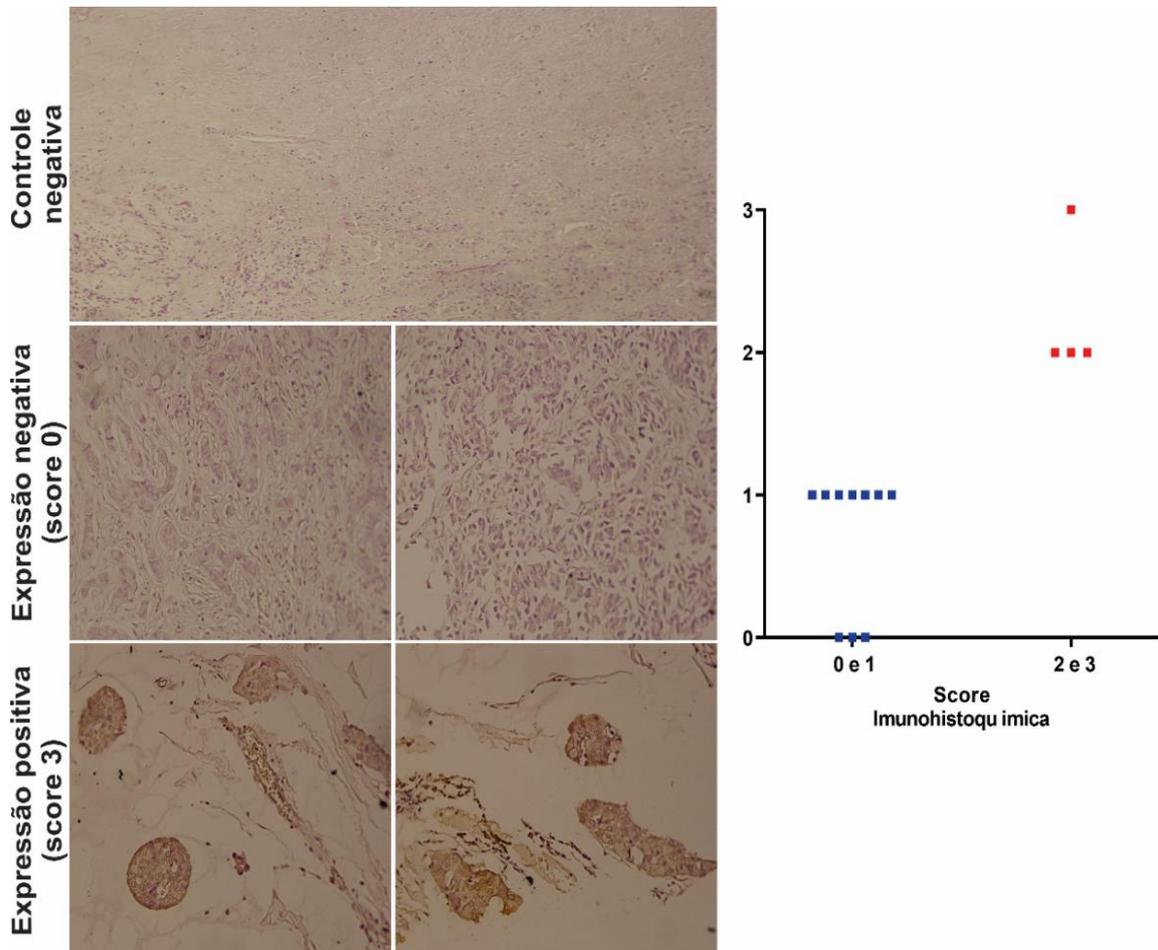
5. RESULTADOS

5.1. Resultados da etapa clínica

As biópsias de 13 pacientes com câncer de mama expostas à QTneo foram analisadas por imunohistoquímica (IHQ) para a identificação da expressão de TLR4 e TLR9.

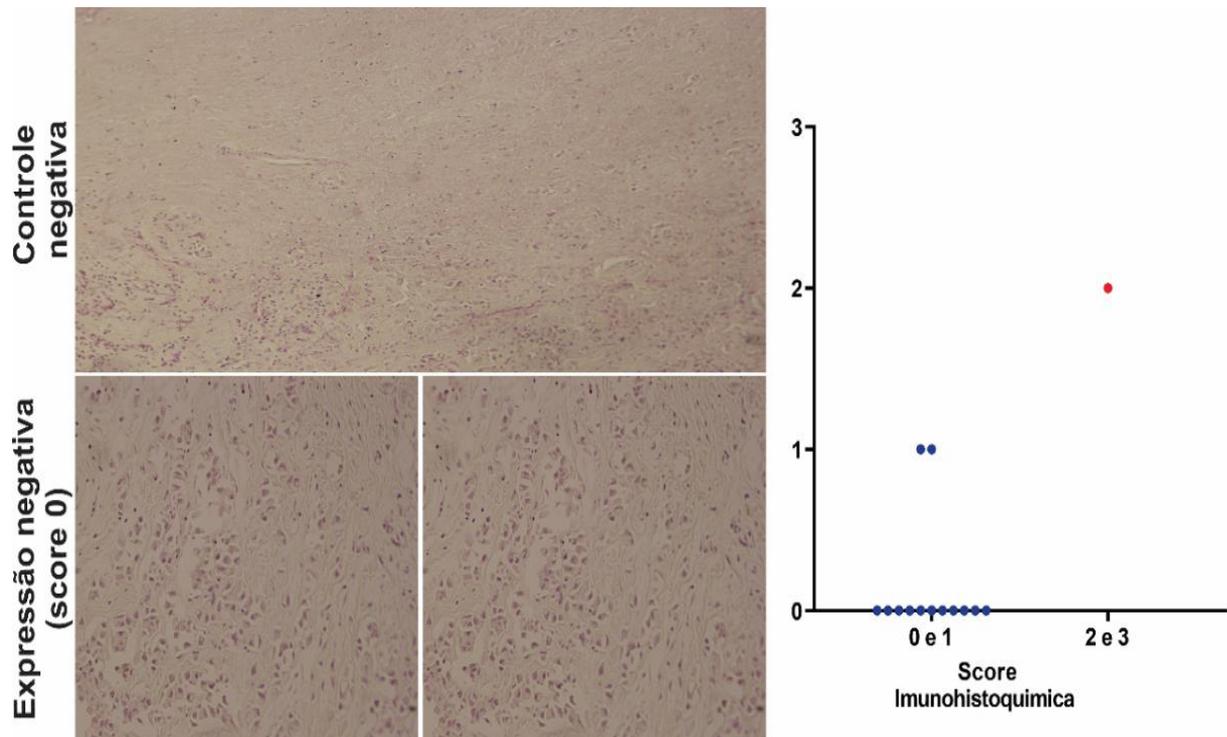
A análise da expressão de TLR4 (**Figura 15**) indicou que 6% das pacientes tinham um escore de 3, 18% um score de 2, 59% um escore de 1 e 18% um score de 0. Por outro lado, a expressão de TLR9 foi predominantemente negativa nas amostras dessas pacientes (**Figura 16**) 0% escore de 3; 6% escore 2; 12% escore 1; 82% escore 0.

Figura 15 – Identificação de TLR4 em biópsia de câncer de mama em pacientes após QTneo



Biópsia de tecido de pacientes com câncer de mama após QTneo. Os cortes dos tecidos foram feitos em seções de 3 μ m em lâminas silanizadas para a verificação da expressão de TLR4 por imunohistoquímica. Imagens representativas de escores 0 ou 3 Aumento: 100 \times .

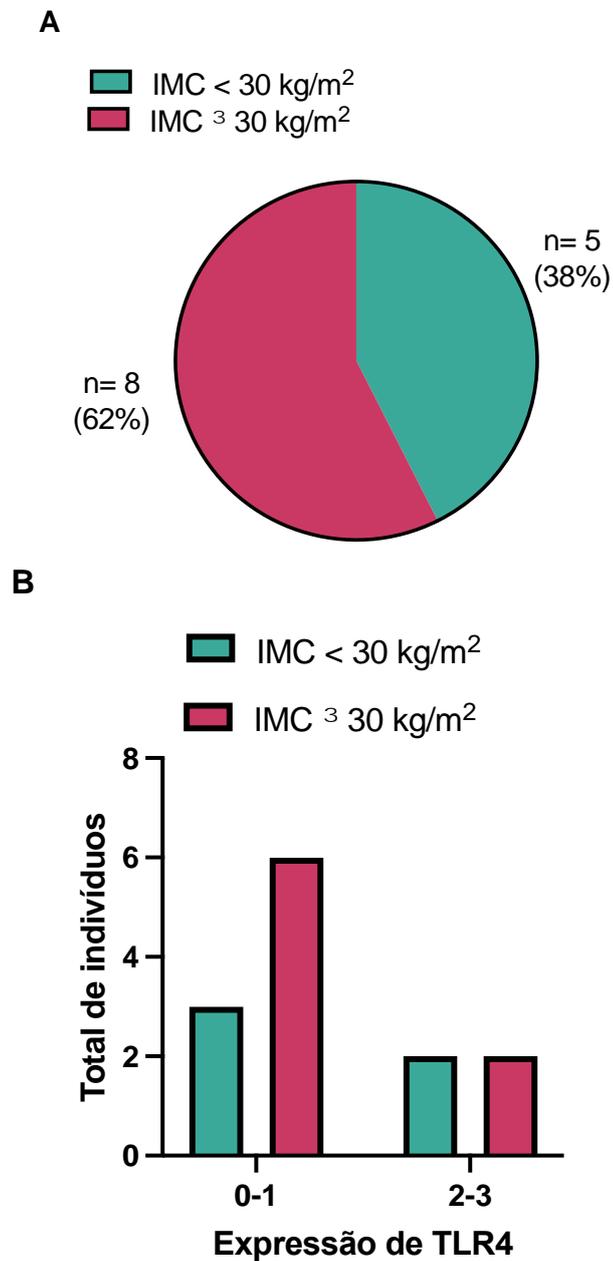
Figura 16– Identificação de TLR9 em biópsia de câncer de mama em pacientes após QTneo.



Biópsia de tecido de pacientes com câncer de mama após QTneo. Os cortes dos tecidos foram feitos em seções de 3 μm em lâminas silanizadas para a verificação da expressão de TLR9 por imunohistoquímica. Aumento: 100 \times .

Segundo o IMC das pacientes com câncer de mama, 38% das pacientes tinham obesidade ($\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$), enquanto 62% apresentavam sobrepeso ($\text{IMC} 25 - 29.5$) antes de começar a QTneo (**Figura 17A**). O perfil de expressão de TLR4, baixo (escores 0 ou 1) ou alto (escores 2 ou 3), entre os grupos de pacientes com obesidade versus aquelas com sobrepeso foi idêntico (**Figura 17B**, $P > 0,05$).

Figura 17 – Classificação das pacientes segundo o Índice de Massa Corpórea (IMC) e Expressão de TLR4



P>0,05; Teste exato de Fisher

Pacientes com câncer de mama foram agrupadas de acordo com o índice de massa corpórea (A) e submetidas ao tratamento com QTneo para avaliação da expressão de TLR4 por imunohistoquímica (B). Os dados indicam que o nível de expressão desse marcador foi idêntico em ambos os grupos (pacientes obesas vs. Sobrepeso).

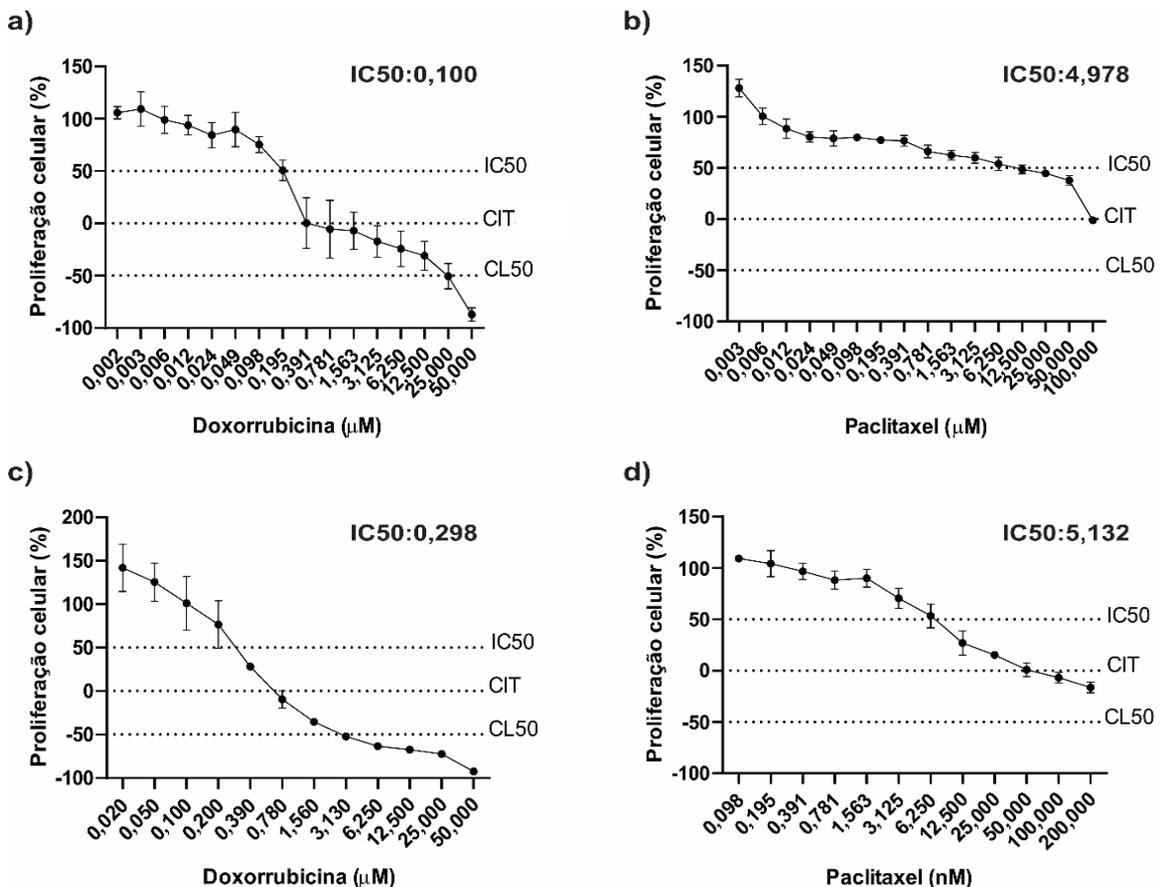
Resultados do estudo *in vitro*

5.2.Cálculo do IC50 da DOX e o PTX em células tumorais MCF-7 e MDA-MB-231

5.2.1. Ensaio da sulforodamina B

Como mostrado na **Figura 18**, a concentração inibitória média (IC50) da DOX e do PTX sobre as células MCF-7 foi 0,1 μ M e 5 μ M, respectivamente. Do mesmo modo, a IC50 da DOX e do PTX sobre as células MDA-MB-231 foi 0,3 μ M e 5 nM, respectivamente. Com os dados obtidos, também foram calculados a Concentração inibitória total (CIT) e a Concentração letal média (CL50), mas para o desenvolvimento do presente trabalho, foi utilizado a IC50.

Figura 18 – Cálculo dos valores de IC50.

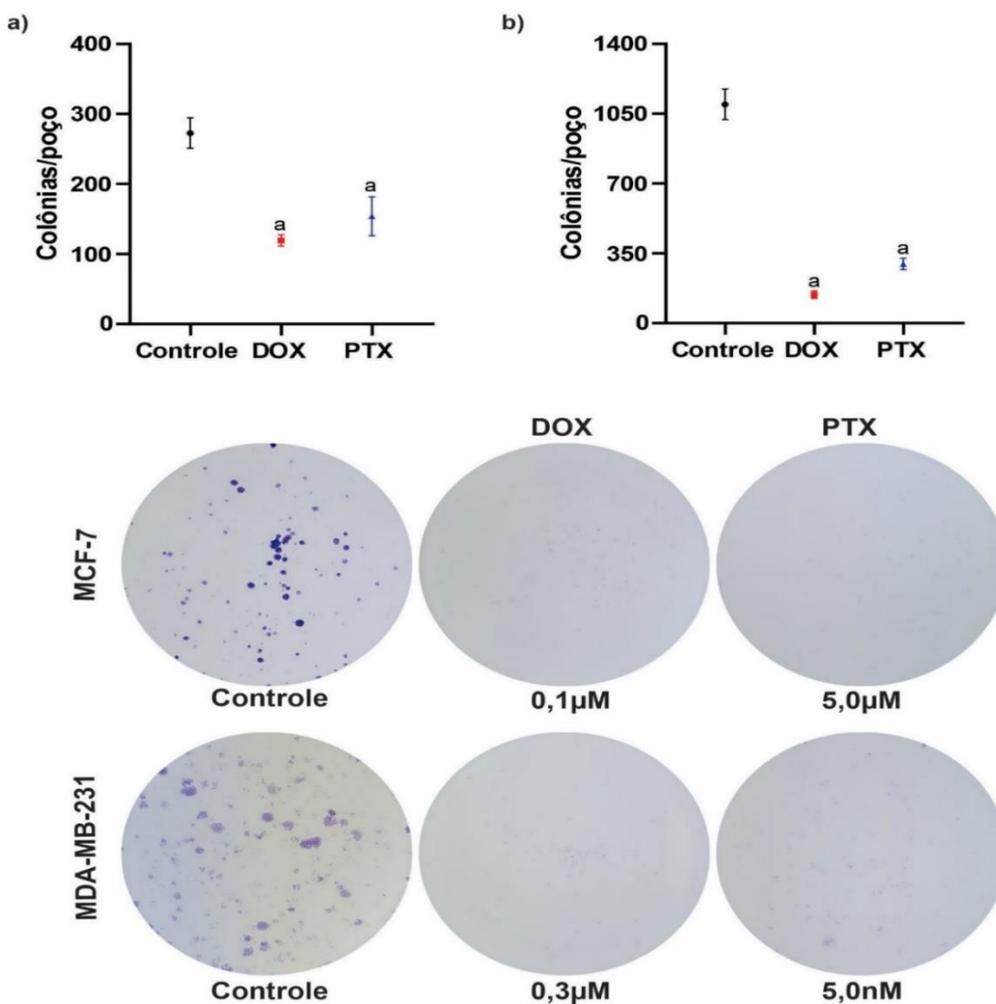


O IC50 é a concentração capaz de inibir em 50% o crescimento celular. A porcentagem de proliferação celular é fornecida no eixo vertical e a concentração da DOX ou PTX (μ M ou nM) no eixo horizontal. **a)** IC50 da DOX sobre as células MCF-7 foi 0,1 μ M. **b)** IC50 do PTX sobre as células MCF-7 foi 5 μ M. **c)** IC50 da DOX sobre as células MDA-MB-231 foi 0,3 μ M. **d)** IC50 do PTX sobre as células MDA-MB-231 foi 5 nM.

5.2.2. Avaliação da sobrevivência através do ensaio clonogênico

Como o intuito de avaliar a capacidade das células MCF-7 e MDA-MB-231 de proliferar indefinidamente mantendo sua capacidade de formação de colônia frente ao tratamento com as respectivas IC50 de DOX ou PTX, foi realizada a avaliação da sobrevivência através do ensaio clonogênico.

Figura 19 – Avaliação da sobrevivência de células tumorais *in vitro* por meio do ensaio clonogênico.



As células MCF-7 foram tratadas com DOX ou PTX nas concentrações de 0,1 μM e 5 μM , respectivamente. No caso das células MDA-MB-231, DOX ou PTX foram utilizadas nas concentrações de 0,3 μM e 5 nM, respectivamente. Após 12 dias de incubação, observou-se **a)** formação de colônias de células MCF-7 e **b)** MDA-MB-231. Amostras representativas do número de colônias em **c)** MCF-7 e **d)** MDA-MB-231 relativo aos poços com células incubadas com os quimioterápicos. A análise estatística foi realizada com o teste anova ($p < 0,05$).

Os resultados obtidos no ensaio de sobrevivência são mostrados na **Figura 19**. Observou-se que durante 12 dias de incubação, as células MCF-7 e as células MDA-MB-231, previamente tratadas com seu respectivo IC50 de DOX ou PTX, começaram a formar colônias. Tal resultado foi indicativo de que as diferentes concentrações de IC50 da DOX e do PTX, previamente calculadas com o ensaio de Sulforrodamina B, não matavam 100% das células e que, pelo contrário, as células após o tratamento quimioterápico, ainda mantinham a capacidade de proliferação.

5.3. Efeito da DOX ou do PTX sobre a expressão de TLR4, TLR9, PI3K δ , PI3K γ e pAKT em linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231.

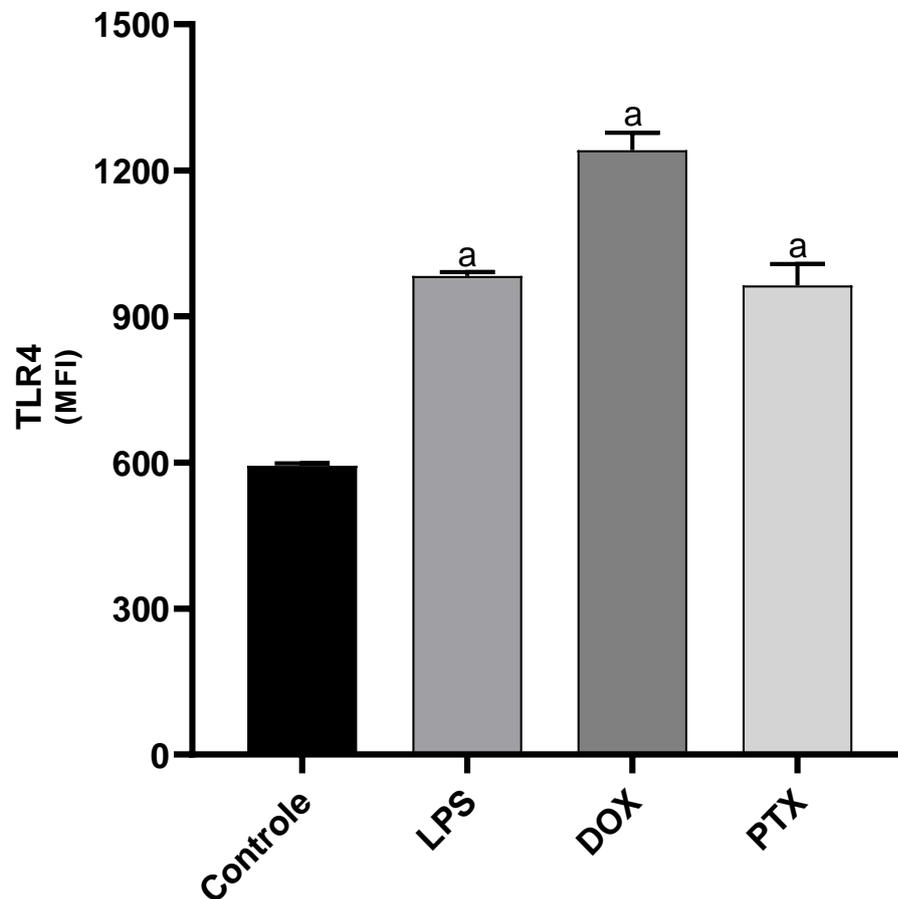
Uma vez calculado o IC50 da DOX e do PTX tanto para as células MCF-7 quanto para as células MDA-MB-231, cada linhagem tumoral celular foi tratada com os quimioterápicos antes mencionados por um período de 24 horas. Cabe mencionar que como controles positivos da ativação de TLR4 e TLR9 foram utilizados LPS e CpG-ODN, respectivamente.

Finalizado o tempo de tratamento, a expressão de TLR4, TLR9, PI3K δ , PI3K γ e pAKT foi analisada quantitativamente por Citometria de fluxo e qualitativamente por Imunofluorescência. Adicionalmente, para cada linhagem avaliou-se a expressão gênica de *Il-33*, *Il-18*, *Il-1 β* e *Il-6* por qPCR.

5.3.1. Expressão de TLR4, TLR9, PI3K δ , PI3K γ e pAKT por Citometria de fluxo e Imunofluorescência em células MCF-7.

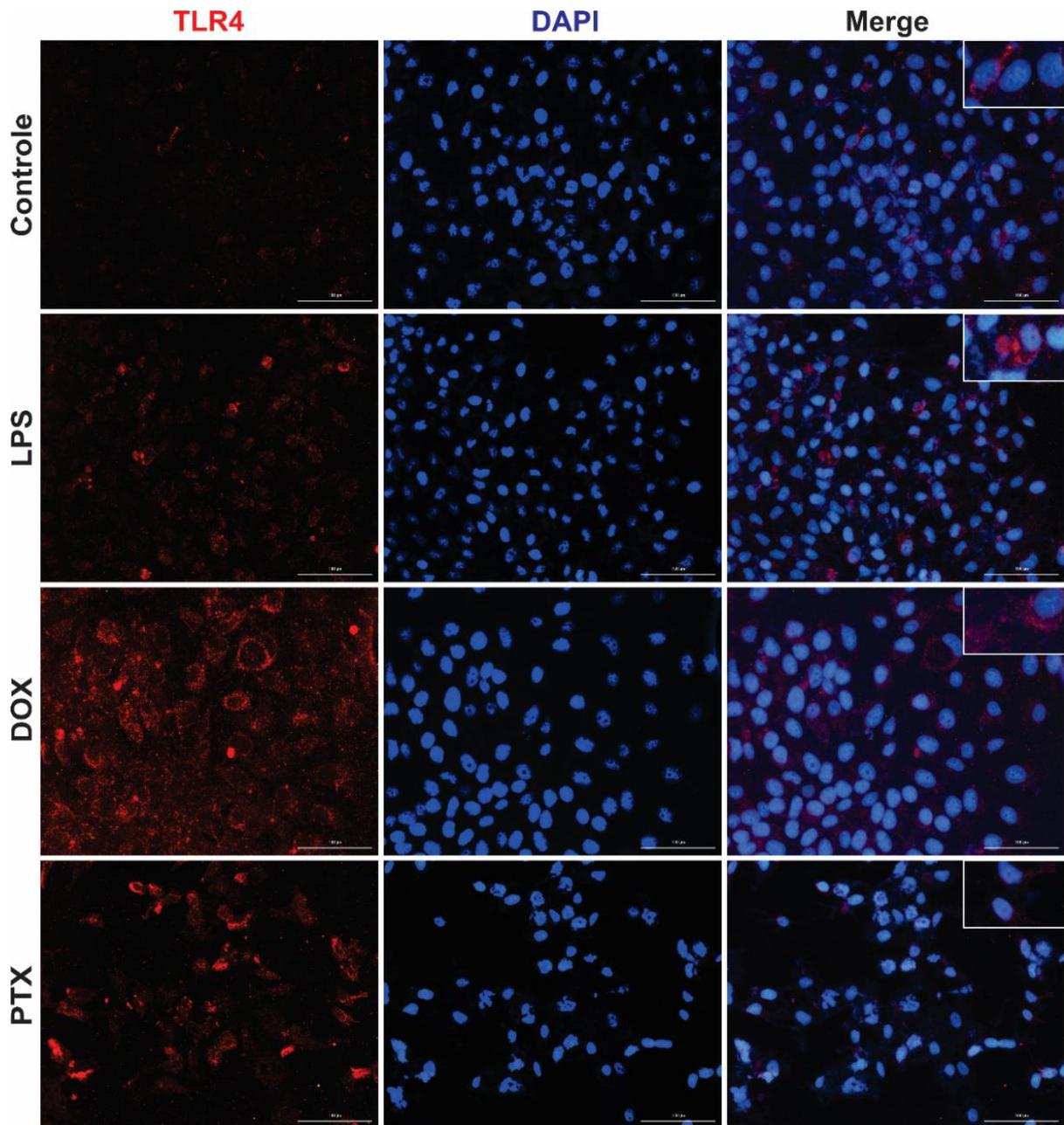
Após o tratamento das células MCF-7 (3×10^4 células/ml) com LPS (20 μ g/ml), DOX (0,1 μ M) ou PTX (5 μ M) por 24 horas, os resultados quantitativos da expressão de TLR4 na **Figura 20** mostram que o LPS, a DOX e o PTX têm a capacidade de ativar a expressão de TLR4 em 66% (LPS), 109% (DOX) e 62% (PTX) quando comparado com o grupo controle. Uma imagem representativa dessa ativação é apresentada na **Figura 21**, onde se pode observar um aumento da imunofluorescência para TLR4 (vermelho) nos mesmos grupos antes mencionados.

Figura 20 – Quantificação, por citometria de fluxo, da expressão de TLR4 em células MCF-7 tratadas com LPS, DOX ou PTX.



Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média da intensidade de fluorescência média (MFI). As células MCF-7 (3×10^4 células/ml) foram tratadas com LPS (20 $\mu\text{g/ml}$), DOX (0,1 μM) ou PTX (5 μM) por 24 horas. Após o período de tratamento, as células foram tripsinizadas e incubadas com os respectivos anticorpos para a posterior análise por citometria de fluxo. Células MCF-7 tratadas com LPS, DOX ou PTX mostraram um aumento significativo MFI para TLR4. ^a $p < 0,05$ vs grupo controle. A análise estatística foi realizada com o teste One-way ANOVA e pós teste de Dunnett.

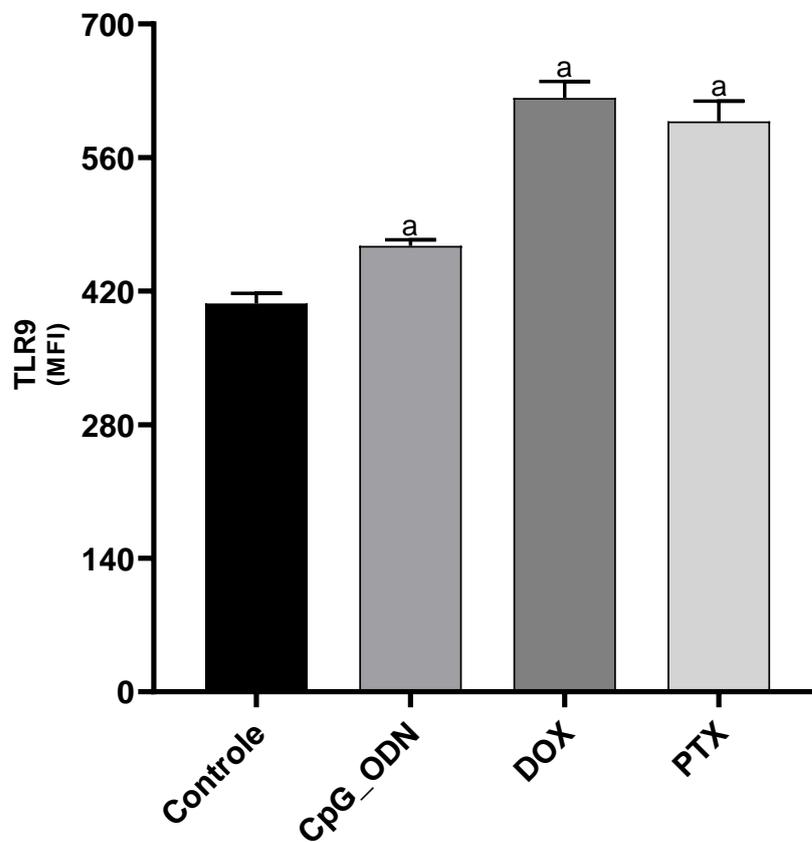
Figura 21 – Expressão de TLR4 em células MCF-7 tratadas com LPS, DOX ou PTX.



Células MCF-7 (3×10^4 células/ml) foram tratadas com LPS ($20 \mu\text{g/l}$), DOX ($0,1 \mu\text{M}$) ou PTX ($5 \mu\text{M}$) por 24 horas. Após o período de tratamento, as células foram fixadas para a realização da imunofluorescência. As células MCF-7 tratadas com LPS, DOX ou PTX mostraram aumento da imunofluorescência para TLR4 (vermelho). O grupo controle não mostrou marcação para TLR4. Os núcleos celulares foram corados com DAPI (azul). Aumento: $200 \times$.

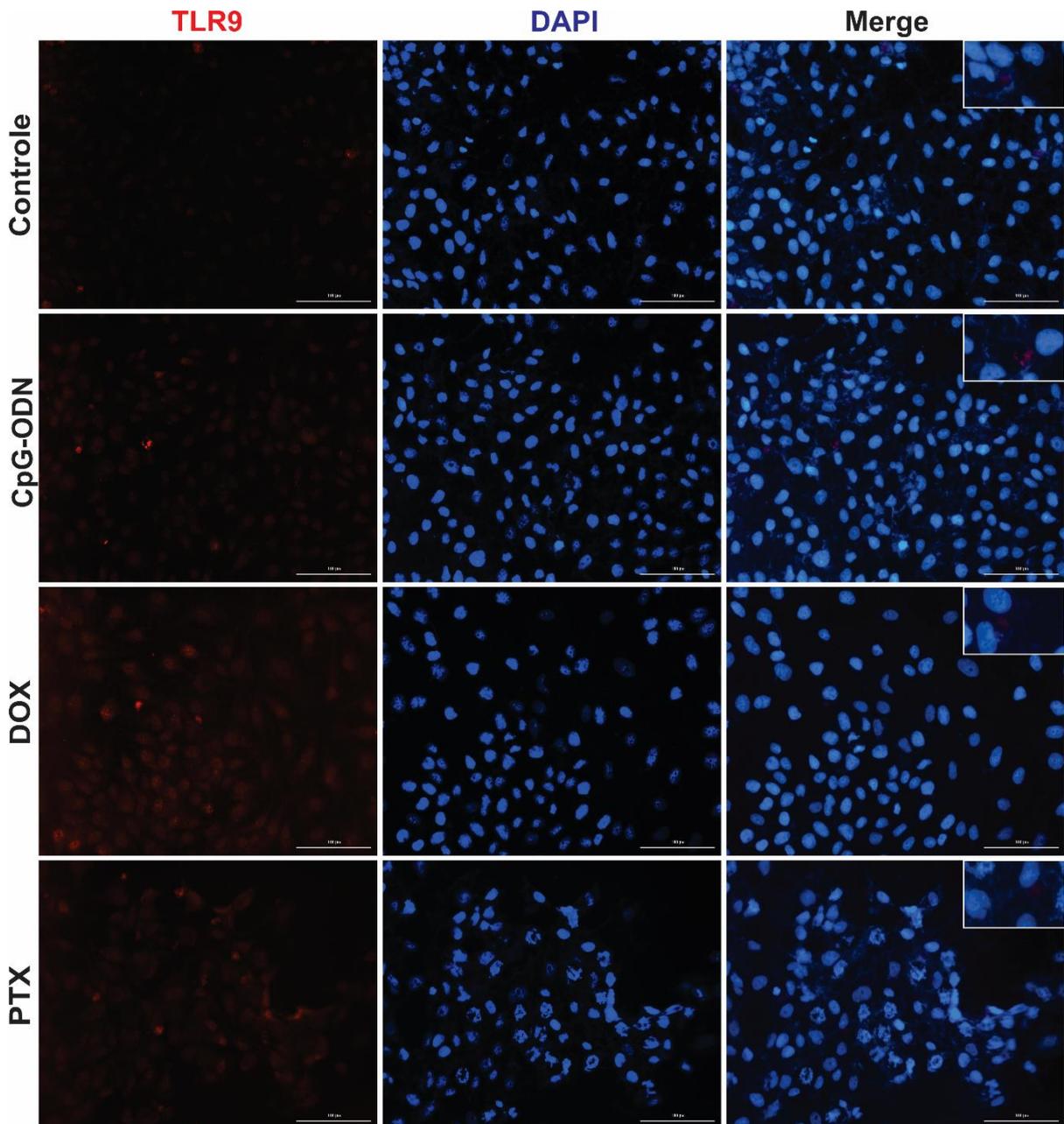
Quanto ao tratamento das células MCF-7 (3×10^4 células/ml) com CpG-ODN ($10 \mu\text{g/ml}$), DOX ($0,1 \mu\text{M}$) ou PTX ($5 \mu\text{M}$) por 24 horas, os resultados quantitativos da expressão de TLR9 na **Figura 22** mostram que o CpG-ODN, a DOX e o PTX ativaram a expressão de TLR9 em 15% (CpG-ODN), 53% (DOX) e 47% (PTX) quando comparado com o grupo controle. Uma imagem representativa dessa ativação é apresentada na **Figura 23**, onde se pode observar um aumento da imunofluorescência para TLR9 (vermelho) nos mesmos grupos antes mencionados.

Figura 22 – Quantificação, por citometria de fluxo, da expressão de TLR9 em células MCF-7 tratadas com CpG-ODN, DOX ou PTX.



Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média da intensidade de fluorescência média (MFI). As células MCF-7 (3×10^4 células/ml) foram tratadas com CpG-ODN ($10 \mu\text{g/ml}$), DOX ($0,1 \mu\text{M}$) ou PTX ($5 \mu\text{M}$) por 24 horas. Após o período de tratamento, as células foram tripsinizadas e incubadas com os respectivos anticorpos para a posterior análise por citometria de fluxo. Células MCF-7 tratadas com CpG-ODN, DOX ou PTX mostraram um aumento significativo da MFI para TLR9. ^a $p < 0,05$ vs grupo controle. A análise estatística foi realizada com o teste One-way ANOVA e pós teste de Dunnett.

Figura 23 – Expressão de TLR9 em células MCF-7 tratados com CpG-ODN, DOX ou PTX.

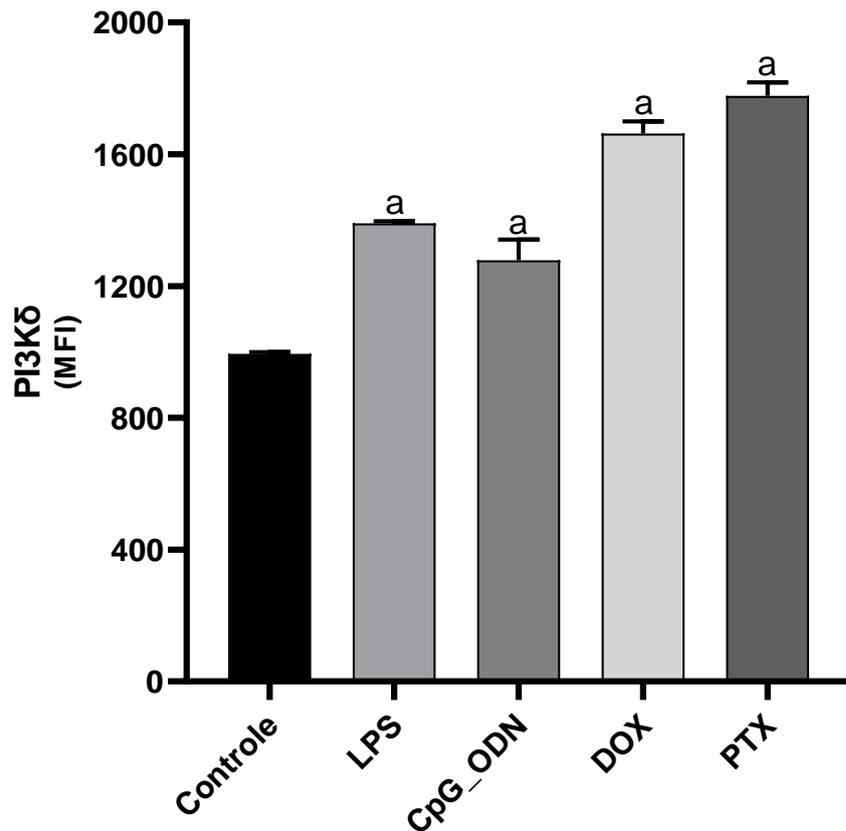


Células MCF-7 (3×10^4 células/ml) foram tratadas com CpG-ODN ($10 \mu\text{g/ml}$), DOX ($0,1 \mu\text{M}$) ou PTX ($5 \mu\text{M}$) por 24 horas. Após o período de tratamento, as células foram fixadas para a realização da imunofluorescência. As células MCF-7 tratadas com CpG-ODN, DOX ou PTX mostraram aumento da imunofluorescência para TLR9 (vermelho). O grupo controle não mostrou marcação para TLR9. Os núcleos celulares foram corados com DAPI (azul). Aumento: $200 \times$.

Em relação à expressão de PI3K δ , a **Figura 24** evidencia que o LPS, o CpG-ODN, a DOX e o PTX ativam a expressão de PI3K δ em 40% (LPS), 29% (CpG-ODN), 67% (DOX) e

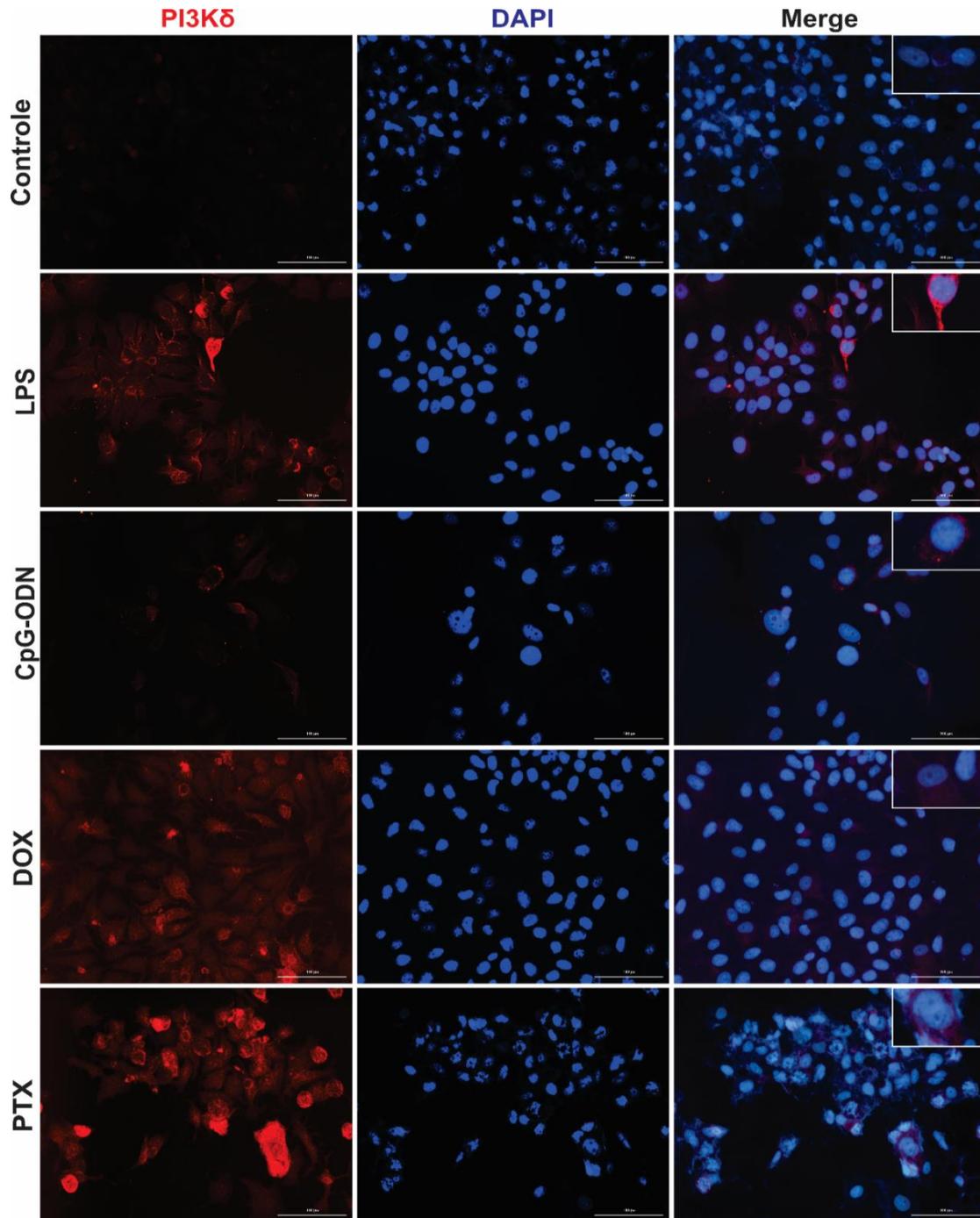
79% (PTX) quando comparado com o grupo controle. Do mesmo modo, na **Figura 25** pode se observar um aumento das fluorescências de PI3K δ (vermelho) nos mesmos grupos antes mencionados.

Figura 24 – Quantificação, por citometria de fluxo, da expressão de PI3K δ em células MCF-7 tratadas com LPS, CpG-ODN, DOX ou PTX.



Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média da intensidade de fluorescência média (MFI). As células MCF-7 (3×10^4 células/ml) foram tratadas com LPS (20 μ g/ml), CpG-ODN (10 μ g/ml), DOX (0,1 μ M) ou PTX (5 μ M) por 24 horas. Após o período de tratamento, as células foram tripsinizadas e incubadas com os respectivos anticorpos para a posterior análise por citometria de fluxo. Células MCF-7 tratadas com LPS, CpG-ODN, DOX ou PTX mostraram um aumento significativo MFI de PI3K δ . ^a $p < 0,05$ vs grupo controle. A análise estatística foi realizada com o teste One-way ANOVA e pós teste de Dunnett.

Figura 25 – Expressão de PI3K δ em células MCF-7 tratadas com LPS, CpG-ODN, DOX ou PTX.

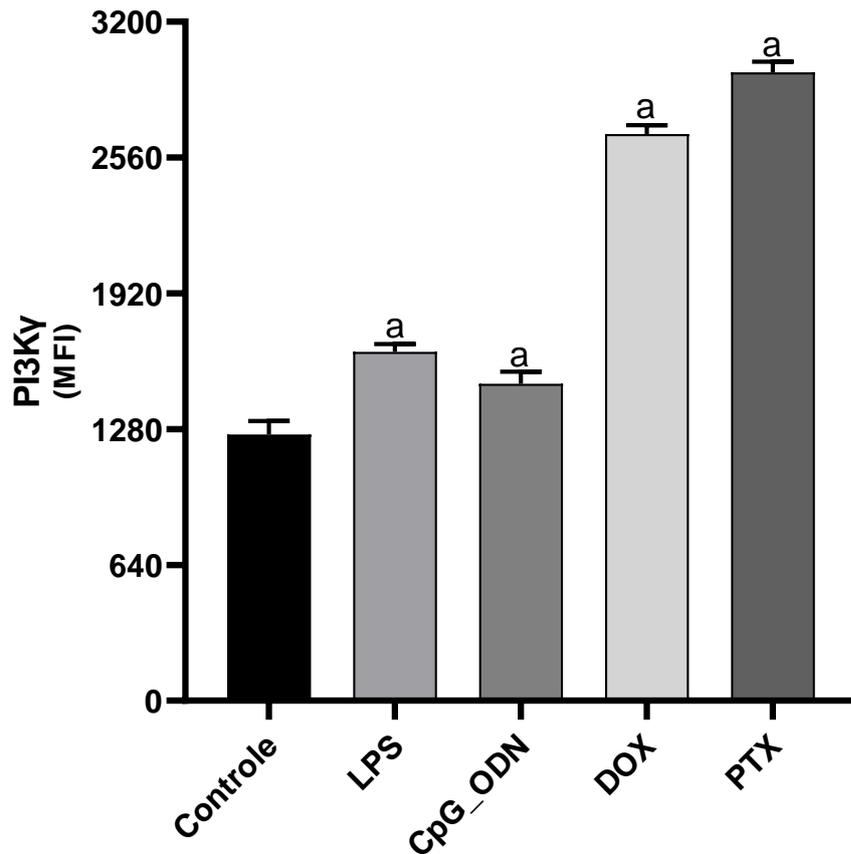


Células MCF-7 (3×10^4 células/ml) foram tratadas com LPS (20 $\mu\text{g/ml}$), CpG-ODN (10 $\mu\text{g/ml}$), DOX (0,1 μM) ou PTX (5 μM) por 24 horas. Após o período de tratamento, as células foram fixadas para a realização da imunofluorescência. As células MCF-7 tratadas com LPS, CpG-ODN, DOX ou PTX mostraram aumento da imunofluorescência para PI3K δ (vermelho). O grupo controle não mostrou marcação para PI3K δ . Os núcleos celulares foram corados com DAPI (azul). Aumento: 200 \times .

Em relação à expressão de PI3K γ , a **Figura 26** evidencia que o LPS, o CpG-ODN, a DOX e o PTX ativaram a expressão de PI3K γ em 31% (LPS), 19% (CpG-ODN), 113% (DOX)

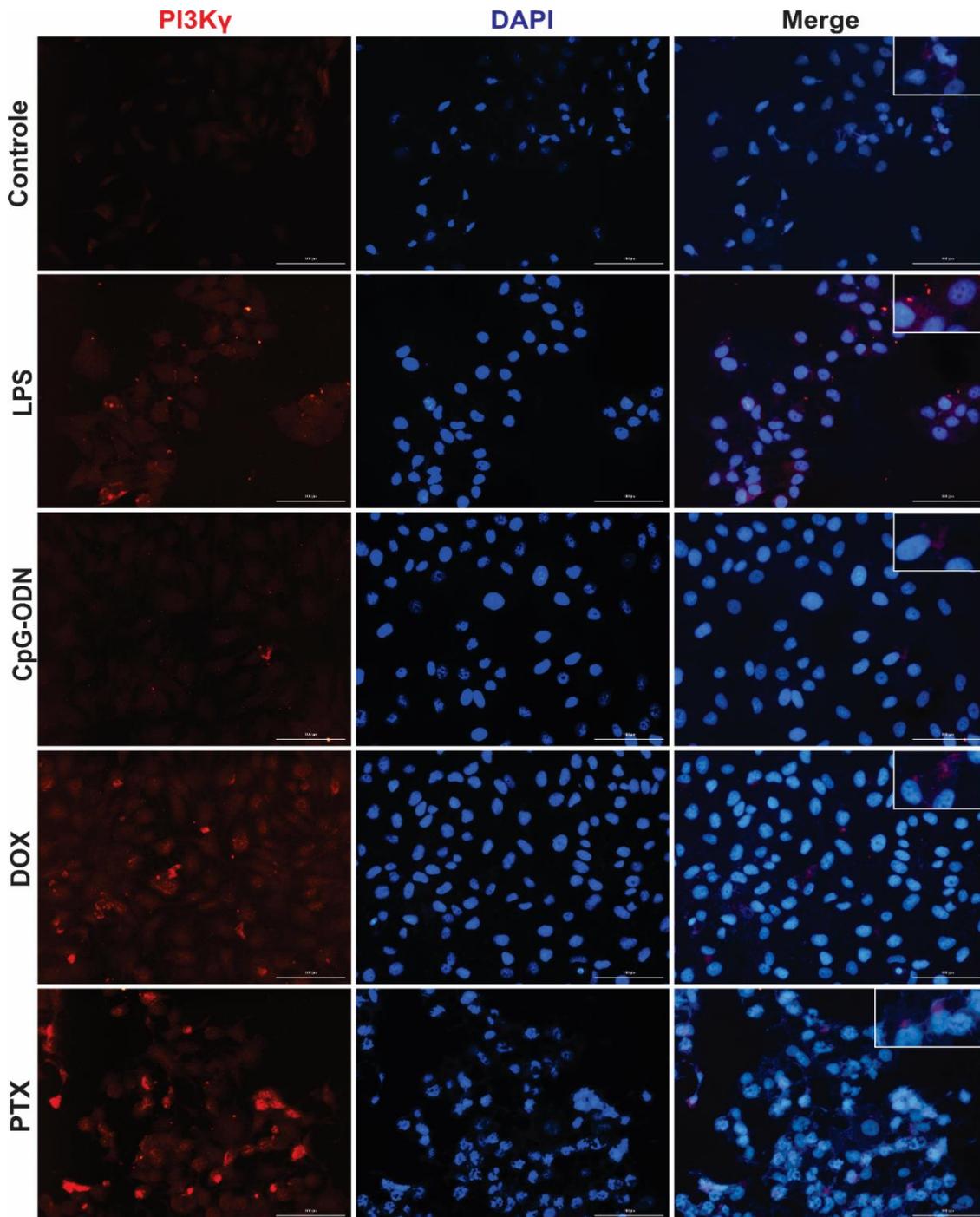
e 136% (PTX) quando comparado com o grupo controle. Do mesmo modo, note-se que na **Figura 27** pode se observar um aumento da fluorescência para PI3K γ (vermelho) nos mesmos grupos antes mencionados.

Figura 26 – Quantificação, por citometria de fluxo, da expressão de PI3K γ em células MCF-7 tratadas com LPS, CpG-ODN, DOX ou PTX.



Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média da intensidade de fluorescência média (MFI). As células MCF-7 (3×10^4 células/ml) foram tratadas com LPS (20 μ g/ml), CpG-ODN (10 μ g/ml), DOX (0,1 μ M) ou PTX (5 μ M) por 24 horas. Após o período de tratamento as células foram tripsinizadas e incubadas com os respectivos anticorpos para o posterior análise por citometria de fluxo. Células MCF-7 tratadas com LPS, CpG-ODN, DOX ou PTX mostraram um aumento significativo da MFI para PI3K γ . ^ap<0,05 vs grupo controle. A análise estatística foi realizada com o teste One-way ANOVA e pós teste de Dunnett.

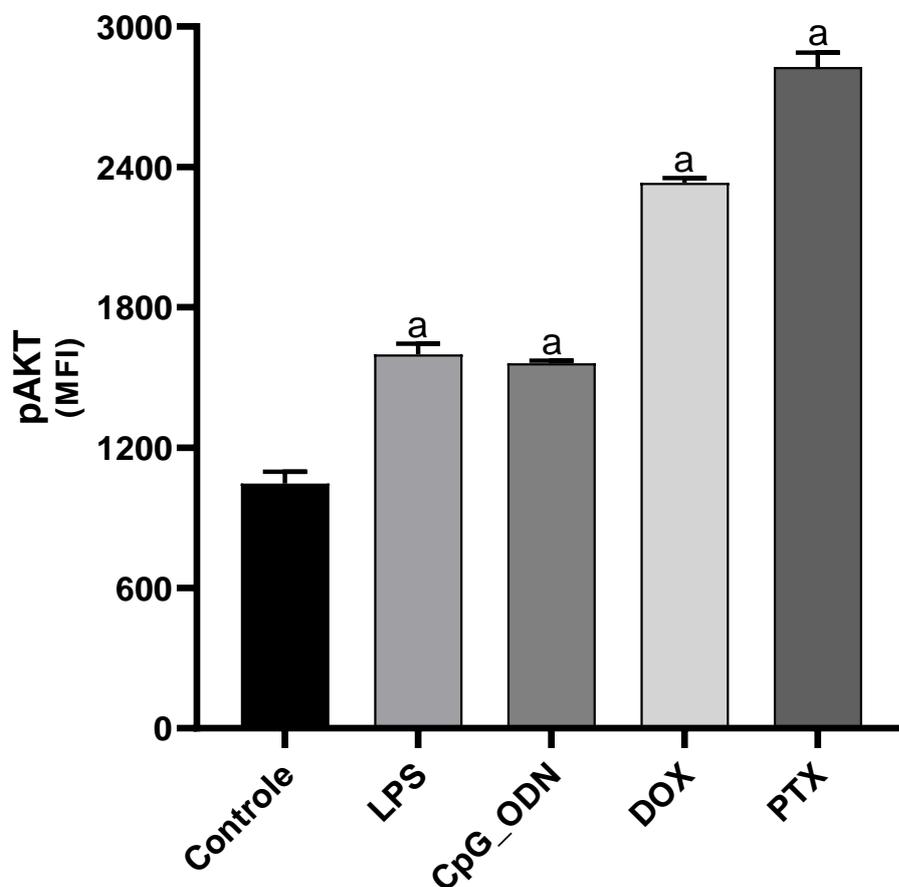
Figura 27 – Expressão de PI3K γ em células MCF-7 tratadas com LPS, CpG-ODN, DOX ou PTX.



Células MCF-7 (3×10^4 células/ml) foram tratadas com LPS (20 $\mu\text{g/ml}$), CpG-ODN (10 $\mu\text{g/ml}$), DOX (0,1 μM) ou PTX (5 μM) por 24 horas. Após o período de tratamento, as células foram fixadas para a realização da imunofluorescência. As células MCF-7 tratadas com LPS, CpG-ODN, DOX ou PTX mostraram aumento da imunofluorescência para PI3K γ (vermelho). O grupo controle não mostrou marcação para PI3K γ . Os núcleos celulares foram corados com DAPI (azul). Aumento: 200 \times .

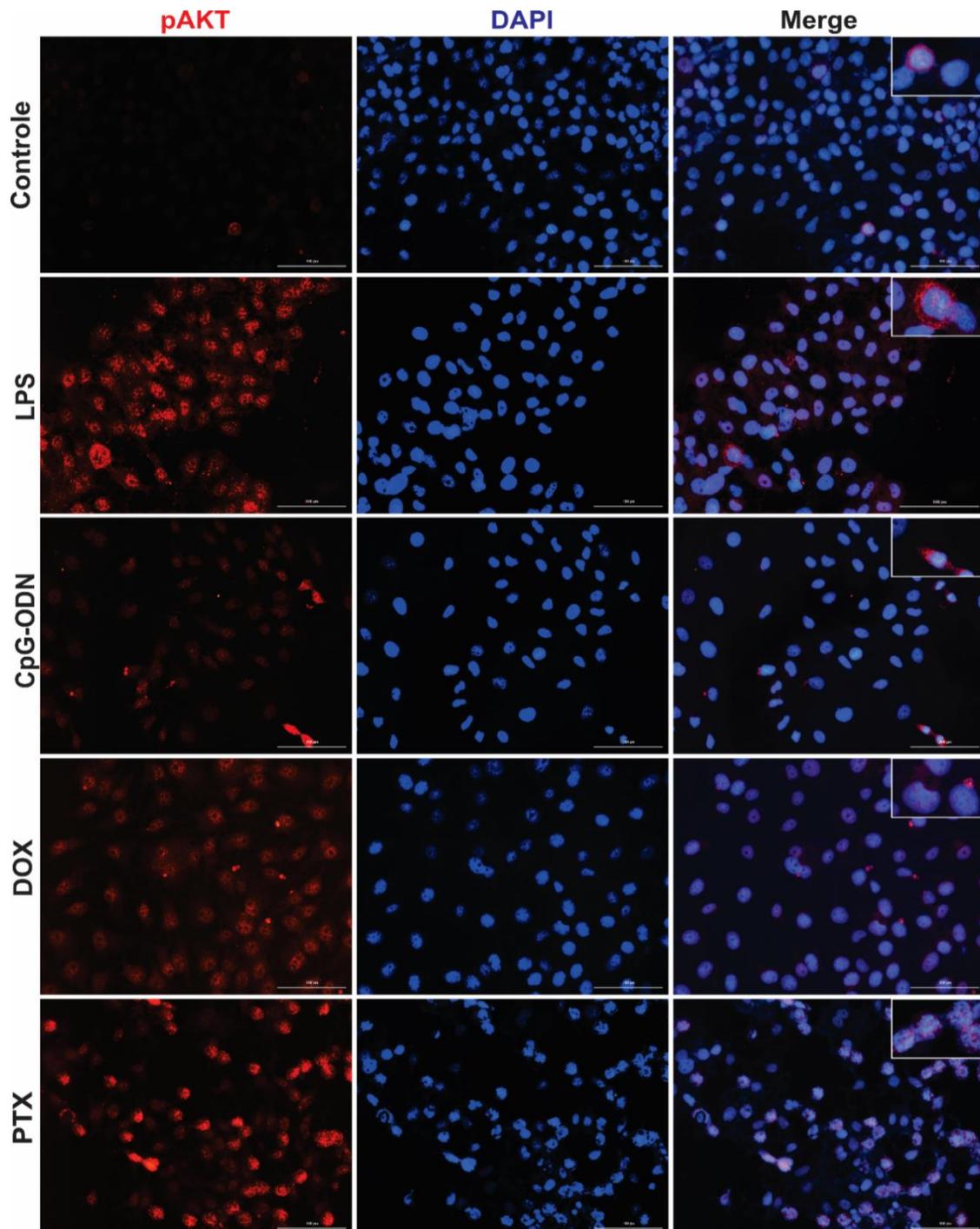
Em relação à expressão de pAKT, a **Figura 28** demonstra que o LPS, o CpG-ODN, a DOX e o PTX ativaram a expressão de pAKT em 51% (LPS), 49% (CpG-ODN), 123% (DOX) e 170% (PTX) quando comparado com o grupo controle. Do mesmo modo, na **Figura 29** pode se observar um aumento das fluorescências de pAKT (vermelho) nos mesmos grupos antes mencionados.

Figura 28 – Quantificação, por citometria de fluxo, da expressão de pAKT em células MCF-7 tratadas com LPS, CpG-ODN, DOX ou PTX.



Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média da intensidade de fluorescência média (MFI). As células MCF-7 (3×10^4 células/ml) foram tratadas com LPS (20 $\mu\text{g/ml}$), CpG-ODN (10 $\mu\text{g/ml}$), DOX (0,1 μM) ou PTX (5 μM) por 24 horas. Após o período de tratamento as células foram tripsinizadas e incubadas com os respectivos anticorpos para o posterior análise por citometria de fluxo. Células MCF-7 tratadas com LPS, CpG-ODN, DOX ou PTX mostraram um aumento significativo da MFI para pAKT. ^a $p < 0,05$ vs grupo controle. A análise estatística foi realizada com o teste One-way ANOVA e pós teste de Dunnett.

Figura 29 – Expressão de pAKT em células MCF-7 tratadas com LPS, CpG-ODN, DOX ou PTX.

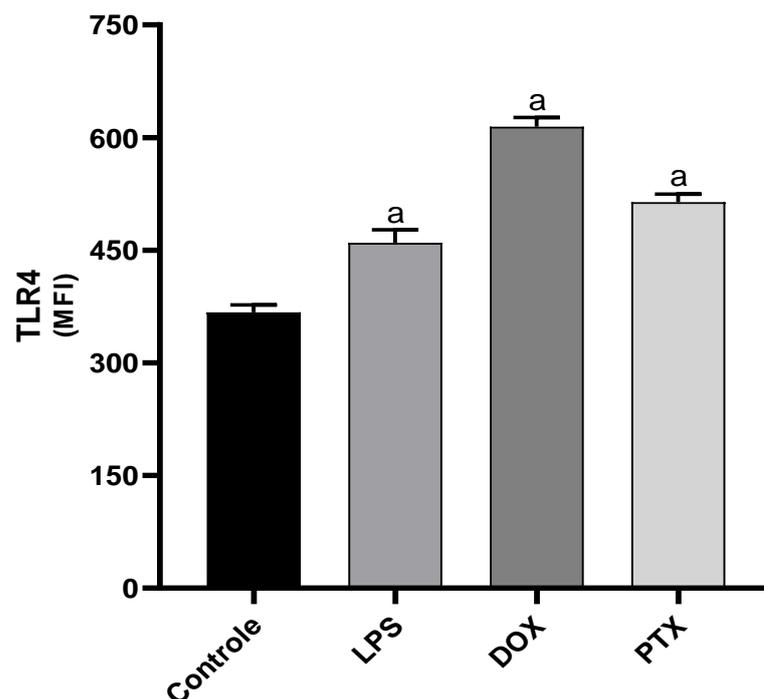


Células MCF-7 (3×10^4 células/ml) foram tratadas com LPS (20 $\mu\text{g/ml}$), CpG-ODN (10 $\mu\text{g/ml}$), DOX (0,1 μM) ou PTX (5 μM) por 24 horas. Após o período de tratamento, as células foram fixadas para a realização da imunofluorescência. As células MCF-7 tratadas com LPS, CpG-ODN, DOX ou PTX mostraram aumento da fluorescência de pAKT (vermelho). O grupo controle não mostrou marcação para pAKT. Os núcleos celulares foram corados com DAPI (azul). Aumento: 200 \times .

5.3.2. Expressão de TLR4, TLR9, PI3K δ , PI3K γ e pAKT por Citometria de fluxo e Imunofluorescência em células MDA-MB-231.

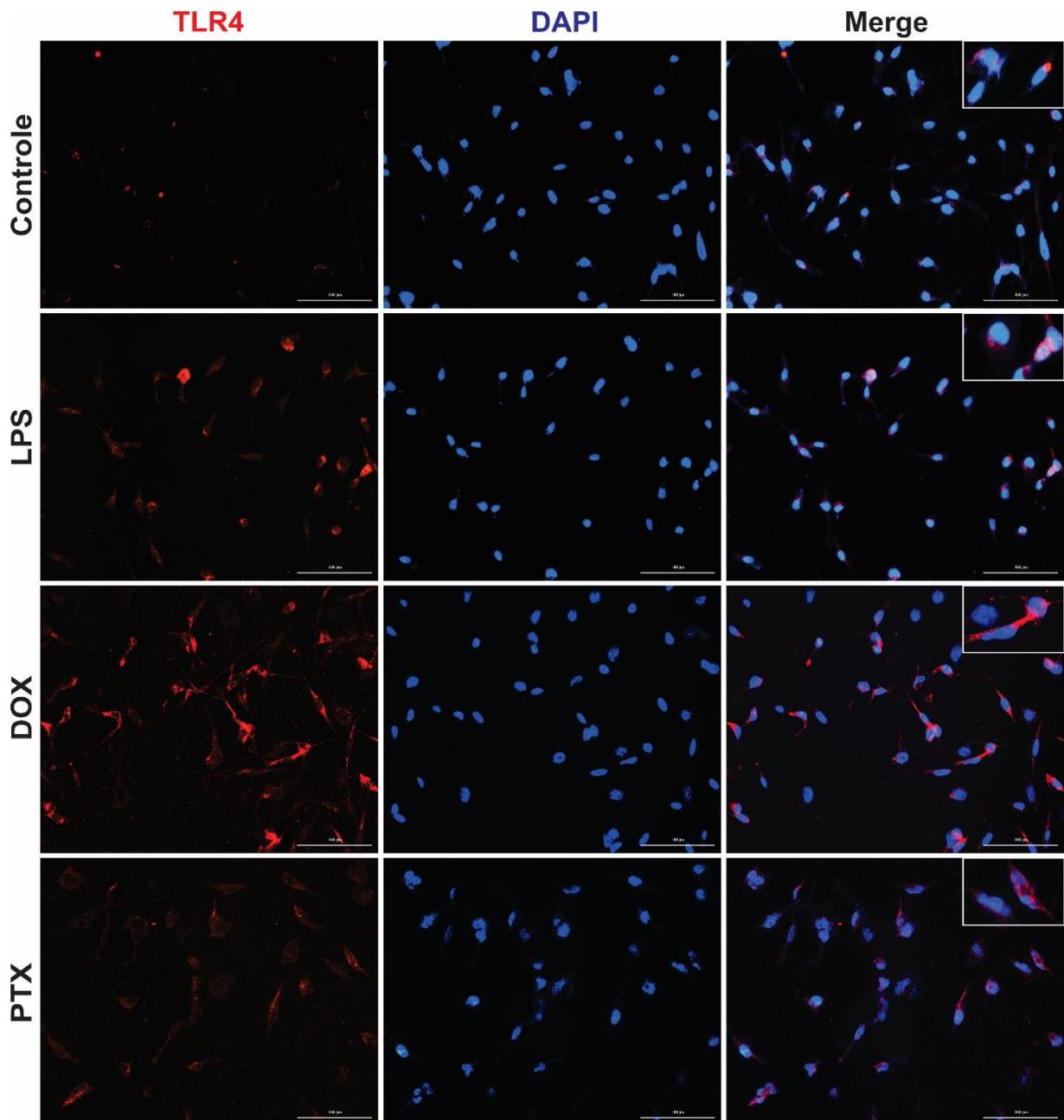
Após o tratamento das células MDA-MB-231 (3×10^4 células/ml) com LPS ($10 \mu\text{g/ml}$), DOX ($0,3 \mu\text{M}$) ou PTX (5 nM) por 24 horas, os resultados quantitativos da expressão de TLR4 na **Figura 230** mostram que o LPS, a DOX e o PTX têm a capacidade de ativar a expressão de TLR4 em 25% (LPS), 67% (DOX) e 40% (PTX) quando comparado com o grupo controle. Uma imagem representativa dessa ativação é apresentada na **Figura 31**, onde se pode observar um aumento da imunofluorescência para TLR4 (vermelho) nos mesmos grupos antes mencionados.

Figura 30 – Quantificação, por citometria de fluxo, da expressão de TLR4 em células MDA-MB-231 tratadas com LPS, DOX ou PTX.



Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média da intensidade de fluorescência média (MFI). As células MDA-MB-231 (3×10^4 células/ml) foram tratadas com LPS ($10 \mu\text{g/ml}$), DOX ($0,3 \mu\text{M}$) ou PTX (5 nM) por 24 horas. Após o período de tratamento, as células foram tripsinizadas e incubadas com os respectivos anticorpos para o posterior análise por citometria de fluxo. Células MDA-MB-231 tratadas com LPS, DOX ou PTX mostraram um aumento significativo da MFI para TLR4. ^a $p < 0,05$ vs grupo controle. A análise estatística foi realizada com o teste One-way ANOVA e pós teste de Dunnett.

Figura 31 – Expressão de TLR4 em células MDA-MB-231 tratadas com LPS, DOX ou PTX.

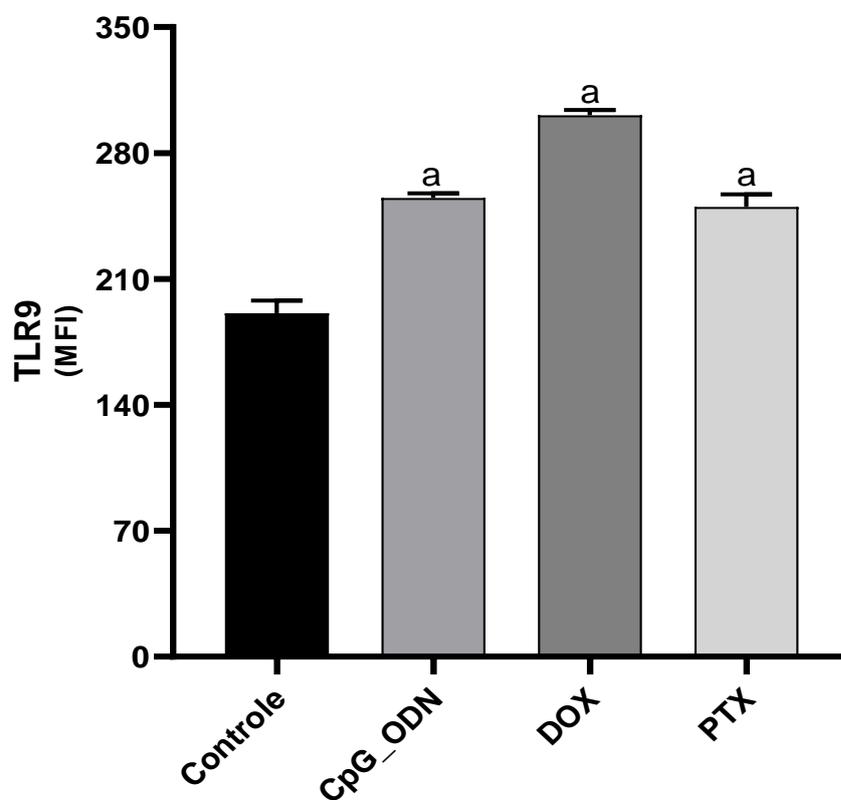


Células MDA-MB-231 (3×10^4 células/ml) foram tratadas com LPS ($10 \mu\text{g/ml}$), DOX ($0,3 \mu\text{M}$) ou PTX (5 nM) por 24 horas. Após o período de tratamento, as células foram fixadas para a realização da imunofluorescência. As células MDA-MB-231 tratadas com LPS, DOX ou PTX mostraram aumento da fluorescência para TLR4 (vermelho). O grupo controle não mostrou marcação para TLR4. Os núcleos celulares foram corados com DAPI (azul). Aumento: $200 \times$.

Quanto ao tratamento das células MDA-MB-231 (3×10^4 células/ml) com CpG-ODN ($10 \mu\text{g/ml}$), DOX ($0,3 \mu\text{M}$) ou PTX (5 nM) por 24 horas, os resultados quantitativos da expressão

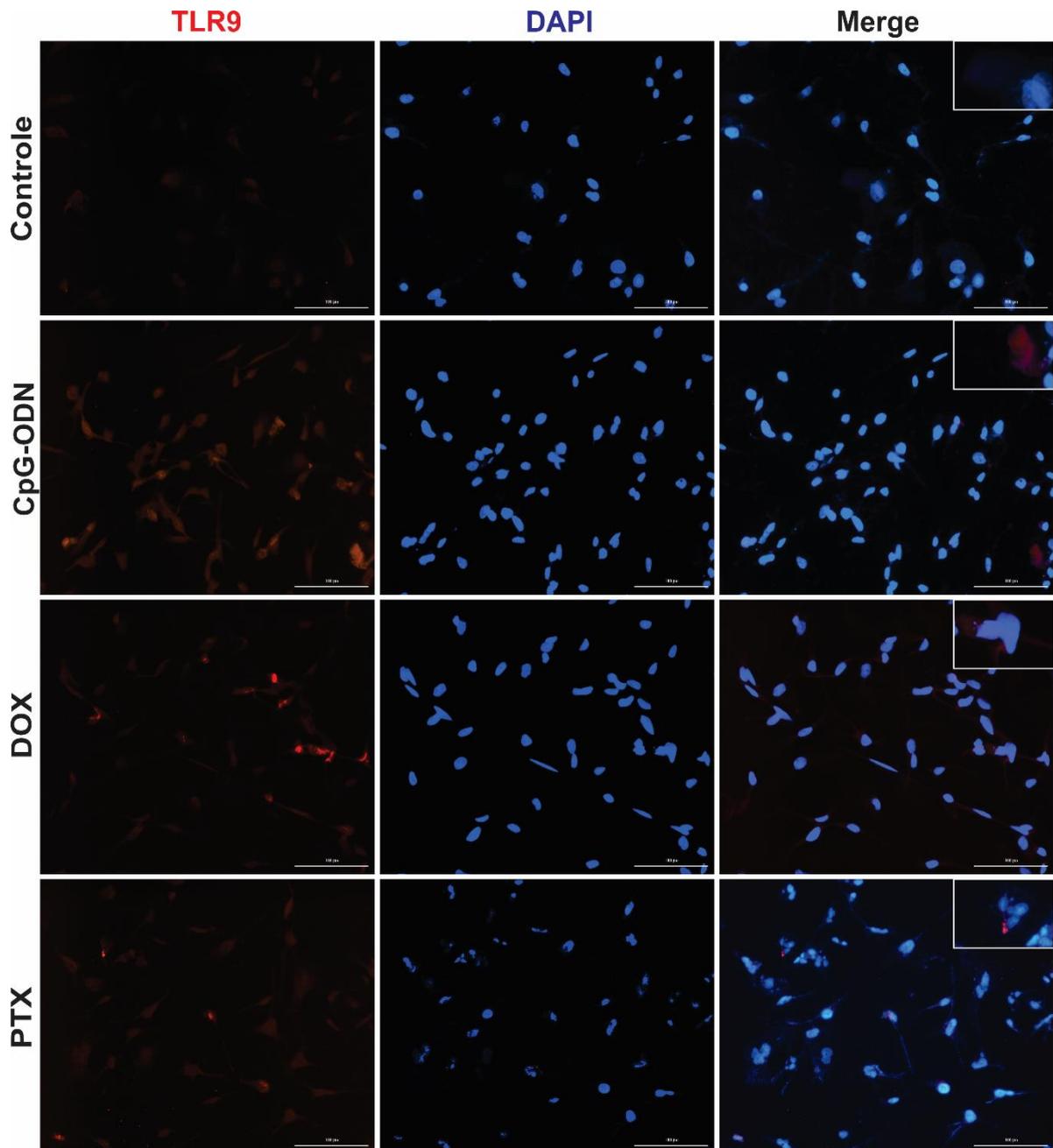
de TLR9 na **Figura 32** mostram que o CpG-ODN, a DOX e o PTX têm a capacidade de ativar a expressão de TLR9 em 34% (CpG-ODN), 58% (DOX) e 31% (PTX) quando comparado com o grupo controle. Uma imagem representativa dessa ativação é apresentada na **Figura 33**, onde se pode observar um aumento da imunofluorescência para TLR9 (vermelho) nos mesmos grupos antes mencionados.

Figura 32 – Quantificação, por citometria de fluxo, da expressão de TLR9 em células MDA-MB-231 tratadas com CpG-ODN, DOX ou PTX.



Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média da intensidade de fluorescência média (MFI). As células MDA-MB-231 (3×10^4 células/ml) foram tratadas com CpG-ODN (10 $\mu\text{g/ml}$), DOX (0,3 μM) e PTX (5 nM) por 24 horas. Após o período de tratamento, as células foram tripsinizadas e incubadas com os respectivos anticorpos para o posterior análise por citometria de fluxo. Células MDA-MB-231 tratadas com CpG-ODN, DOX ou PTX mostraram um aumento significativo da MFI para TLR9. ^a $p < 0,05$ vs grupo controle. A análise estatística foi realizada com o teste One-way ANOVA e pós teste de Dunnett.

Figura 33 – Expressão de TLR9 em células MDA-MB-231 tratados com CpG-ODN, DOX ou PTX.

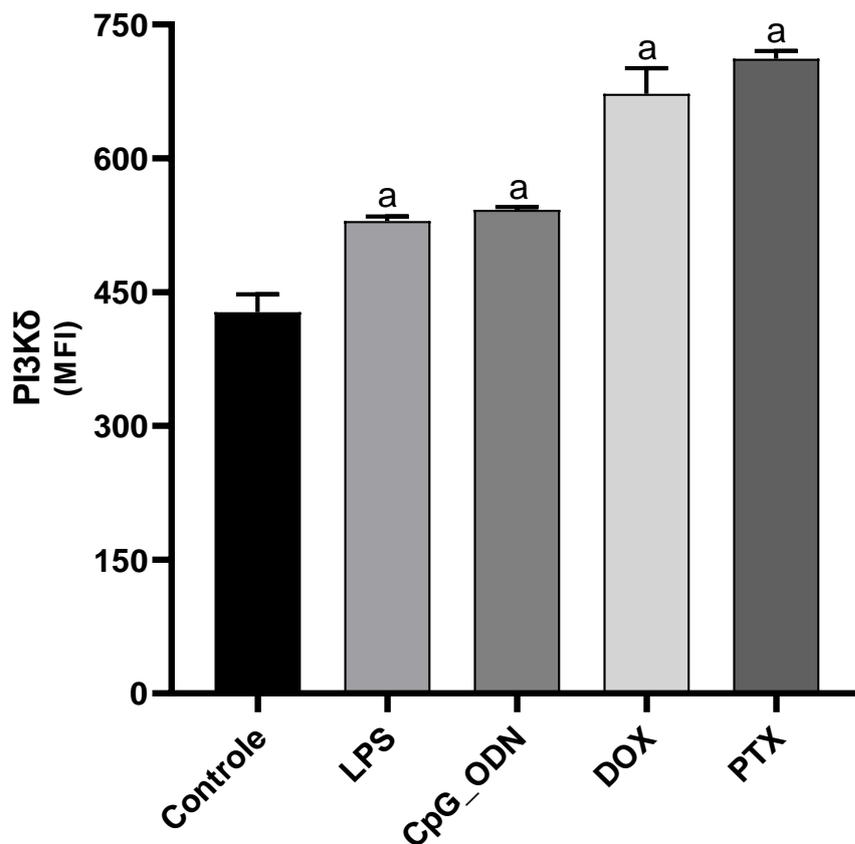


Células MDA-MB-231 (3×10^4 células/ml) foram tratadas com CpG-ODN ($10 \mu\text{g/ml}$), DOX ($0,3 \mu\text{M}$) ou PTX (5 nM) por 24 horas. Após o período de tratamento, as células foram fixadas para a realização da imunofluorescência. As células MDA-MB-231 tratadas com CpG-ODN, DOX ou PTX mostraram aumento da imunofluorescência de TLR9 (vermelho). O grupo controle não mostrou marcação para TLR9. Os núcleos celulares foram corados com DAPI (azul). Aumento: $200 \times$.

Em relação à expressão de PI3K δ , a **Figura 34** demonstra que o LPS, o CpG-ODN, a DOX e o PTX ativam a expressão de PI3K δ em 24% (LPS), 27% (CpG-ODN), 57% (DOX) e

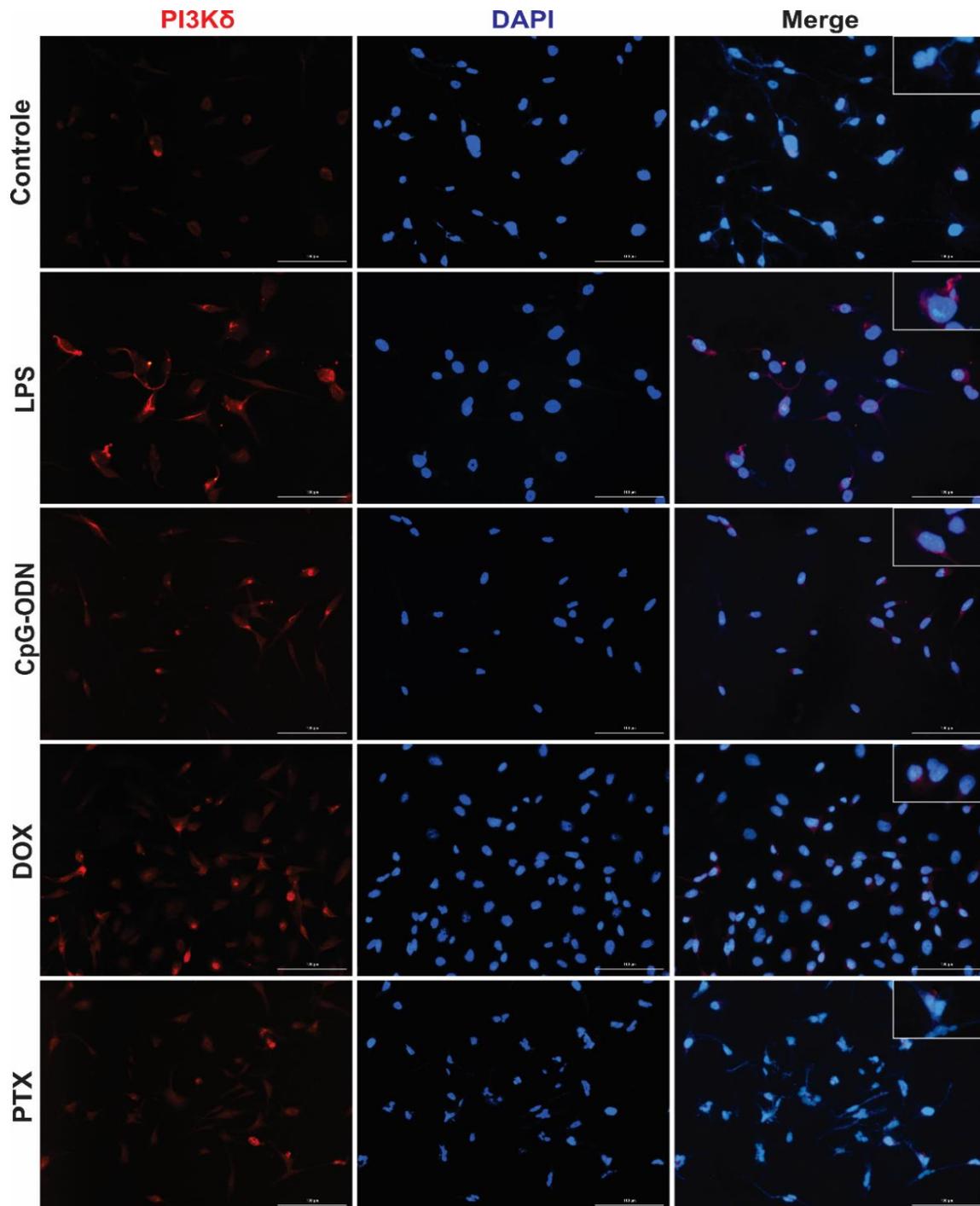
66% (PTX) quando comparado com o grupo controle. Do mesmo modo, na **Figura 35** pode se observar um aumento das fluorescências de PI3K δ (vermelho) nos mesmos grupos antes mencionados.

Figura 34 – Quantificação, por citometria de fluxo, da expressão de PI3K δ em células MDA-MB-231 tratadas com LPS, CpG-ODN, DOX ou PTX.



Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média da intensidade de fluorescência média (MFI). As células MDA-MB-231 (3×10^4 células/ml) foram tratadas com LPS (10 μ g/ml), CpG-ODN (10 μ g/ml), DOX (0,3 μ M) ou PTX (5 nM) por 24 horas. Após o período de tratamento, as células foram tripsinizadas e incubadas com os respectivos anticorpos para o posterior análise por citometria de fluxo. Células MDA-MB-231 tratadas com LPS, CpG-ODN, DOX ou PTX mostraram um aumento significativo MFI de PI3K δ . ^ap<0,05 vs grupo controle. A análise estatística foi realizada com o teste One-way ANOVA e pós teste de Dunnett.

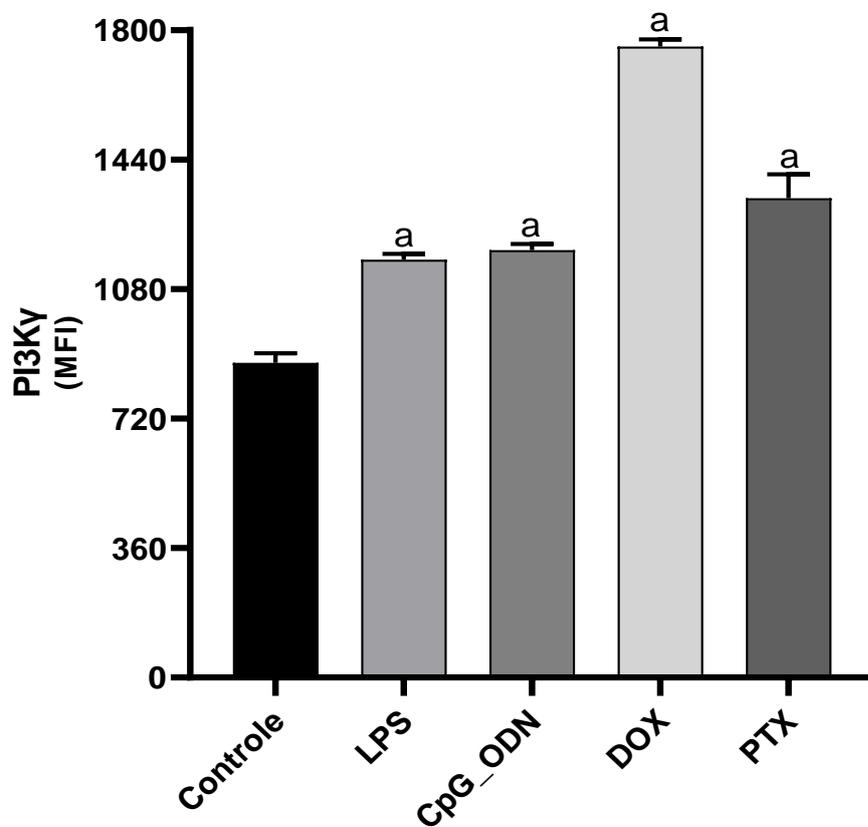
Figura 35 – Expressão de PI3K δ em células MDA-MB-231 tratadas com LPS, CpG-ODN, DOX ou PTX.



Células MDA-MB-231 (3×10^4 células/ml) foram tratadas com LPS ($10 \mu\text{g/ml}$), CpG-ODN ($10 \mu\text{g/ml}$), DOX ($0,3 \mu\text{M}$) ou PTX (5 nM) por 24 horas. Após o período de tratamento, as células foram fixadas para a realização da imunofluorescência. As células MDA-MB-231 tratadas com LPS, CpG-ODN, DOX ou PTX mostraram aumento da imunofluorescência para PI3K δ (vermelho). O grupo controle não mostrou marcação para PI3K δ . Os núcleos celulares foram corados com DAPI (azul). Aumento: $200 \times$.

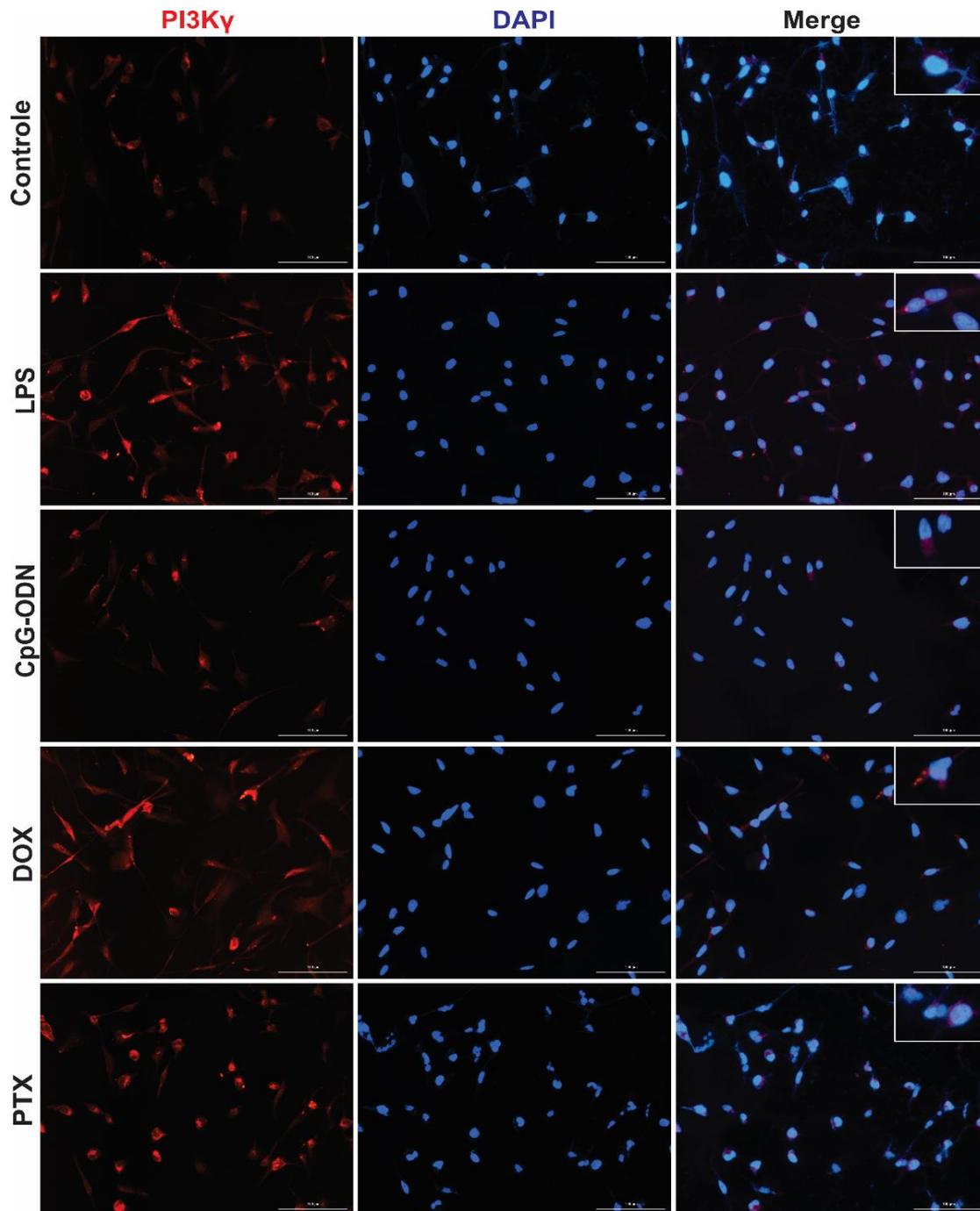
Em relação à expressão de PI3K γ , a **Figura 36** mostra que o LPS, o CpG-ODN, a DOX e o PTX ativaram a expressão de PI3K γ em 33% (LPS), 36% (CpG-ODN), 100% (DOX) e 52% (PTX) quando comparado com o grupo controle. Do mesmo modo, note-se que na **Figura 37** pode se observar um aumento das fluorescências de PI3K γ (vermelho) nos mesmos grupos antes mencionados.

Figura 36 – Quantificação, por citometria de fluxo, da expressão de PI3K γ em células MDA-MB-231 tratadas com LPS, CpG-ODN, DOX ou PTX.



Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média da intensidade de fluorescência média (MFI). As células MDA-MB-231 (3×10^4 células/ml) foram tratadas com LPS (10 μ g/ml), CpG-ODN (10 μ g/ml), DOX (0,3 μ M) ou PTX (5 nM) por 24 horas. Após o período de tratamento as células foram tripsinizadas e incubadas com os respectivos anticorpos para o posterior análise por citometria de fluxo. Células MDA-MB-231 tratadas com LPS, CpG-ODN, DOX ou PTX mostraram um aumento significativo da MFI para PI3K γ . ^a $p < 0,05$ vs grupo controle. A análise estatística foi realizada com o teste One-way ANOVA e pós teste de Dunnett.

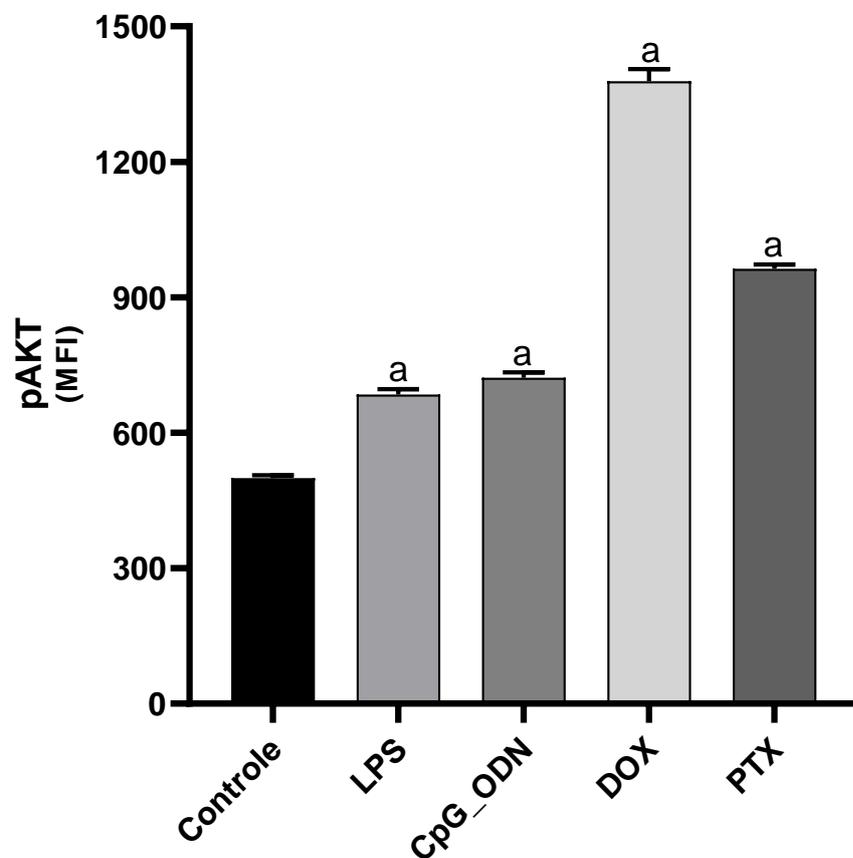
Figura 37 – Expressão de PI3K γ em células MDA-MB-231 tratadas com LPS, CpG-ODN, DOX ou PTX.



Células MDA-MB-231 (3×10^4 células/ml) foram tratadas com LPS (10 $\mu\text{g/ml}$), CpG-ODN (10 $\mu\text{g/ml}$), DOX (0,3 μM) ou PTX (5 nM) por 24 horas. Após o período de tratamento, as células foram fixadas para a realização da imunofluorescência. As células MDA-MB-231 tratadas com LPS, CpG-ODN, DOX ou PTX mostraram aumento da imunofluorescência para PI3K γ (vermelho). O grupo controle não mostrou marcação para PI3K γ . Os núcleos celulares foram corados com DAPI (azul). Aumento: 200 \times .

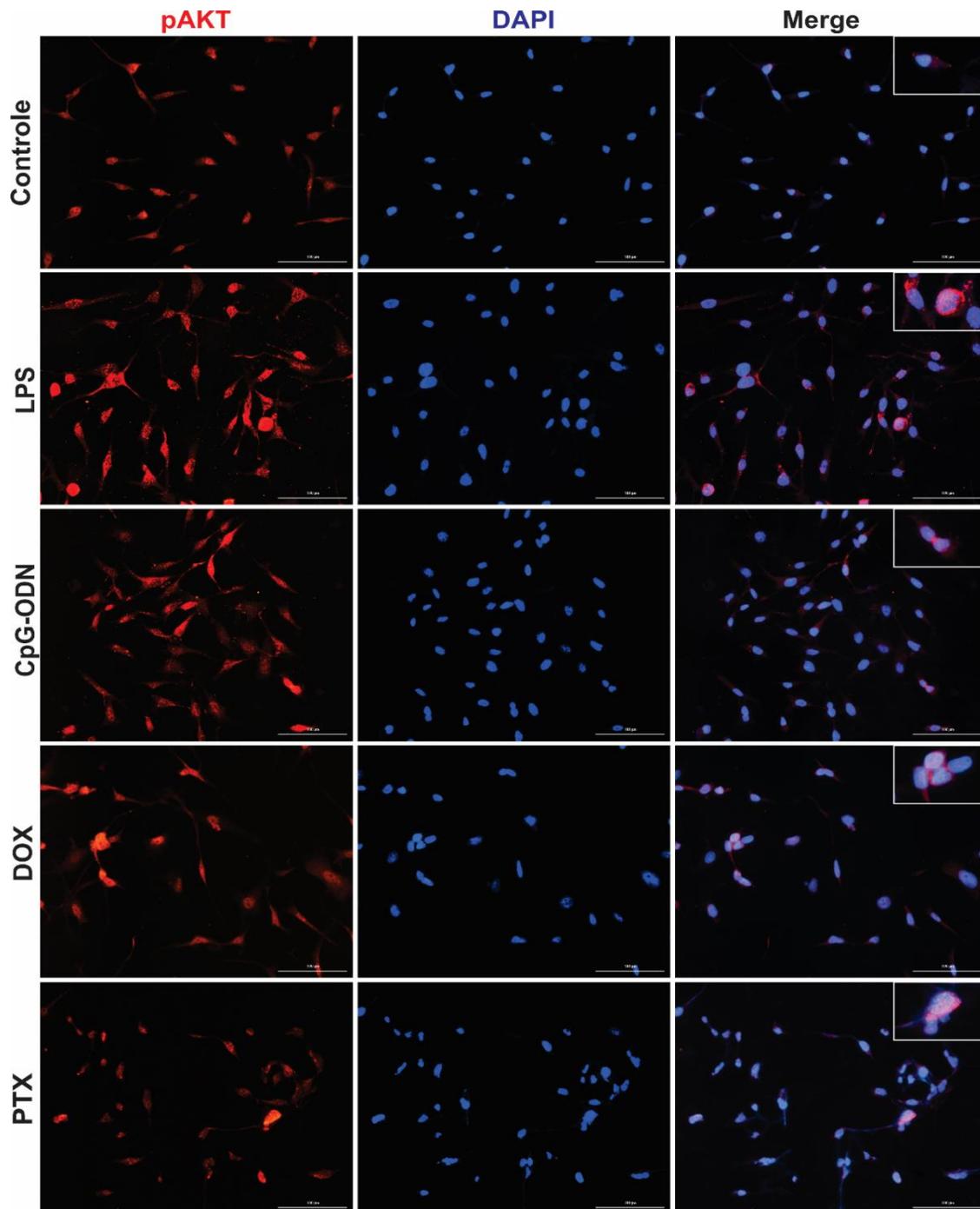
Em relação à expressão de pAKT, a **Figura 38** evidencia que o LPS, o CpG-ODN, a DOX e o PTX ativaram a expressão de pAKT em 37% (LPS), 45% (CpG-ODN), 176% (DOX) e 93% (PTX) quando comparado com o grupo controle. Do mesmo modo, na **Figura 39** pode se observar um aumento das fluorescências de pAKT (vermelho) nos mesmos grupos antes mencionados.

Figura 38 – Quantificação, por citometria de fluxo, da expressão de pAKT em células MDA-MB-231 tratadas com LPS, CpG-ODN, DOX ou PTX.



Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média da intensidade de fluorescência média (MFI). As células MDA-MB-231 (3×10^4 células/ml) foram tratadas com LPS (10 μ g/ml), CpG-ODN (10 μ g/ml), DOX (0,3 μ M) ou PTX (5 nM) por 24 horas. Após o período de tratamento, as células foram tripsinizadas e incubadas com os respectivos anticorpos para o posterior análise por citometria de fluxo. Células MDA-MB-231 tratadas com LPS, CpG-ODN, DOX ou PTX mostraram um aumento significativo da MFI para pAKT. ^a $p < 0,05$ vs grupo controle. A análise estatística foi realizada com o teste One-way ANOVA e pós teste de Dunnett.

Figura 39 – Expressão de pAKT em células MDA-MB-231 tratadas com LPS, CpG-ODN, DOX ou PTX.

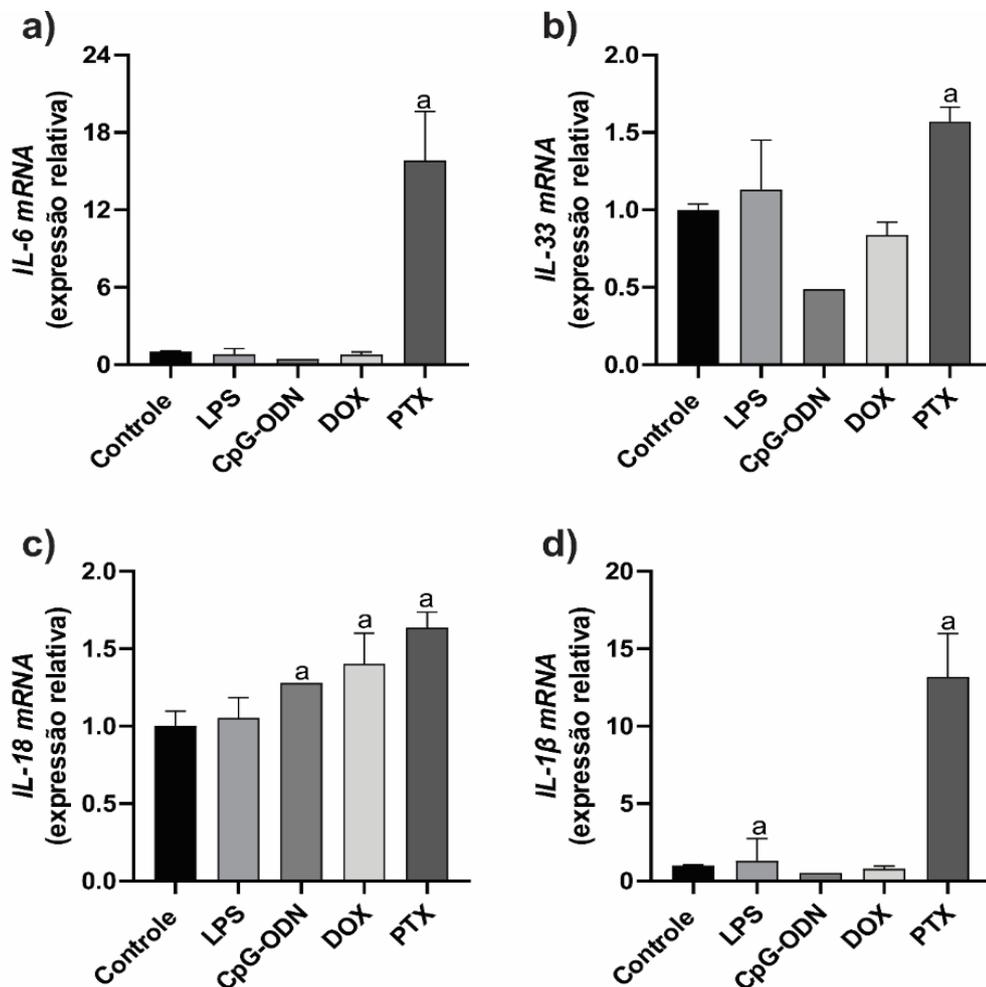


Células MDA-MB-231 (3×10^4 células/ml) foram tratadas com LPS ($10 \mu\text{g/ml}$), CpG-ODN ($10 \mu\text{g/ml}$), DOX ($0,3 \mu\text{M}$) ou PTX (5 nM) por 24 horas. Após o período de tratamento, as células foram fixadas para a realização da imunofluorescência. As células MDA-MB-231 tratadas com LPS, CpG-ODN, DOX ou PTX mostraram aumento da fluorescência de pAKT (vermelho). O grupo controle não mostrou marcação para pAKT. Os núcleos celulares foram corados com DAPI (azul). Aumento: $200 \times$.

5.3.3. Expressão gênica de *Il6*, *Il33*, *Il18* e *Il1 β* nas células MCF-7 tratadas com DOX ou PTX.

Como demonstrado na **Figura 40** relativamente à análise por qPCR, o tratamento das células MCF-7 com o PTX (5 μ M) aumentou a expressão de *Il6*, *Il33*, *Il18* e *Il1 β* em comparação ao grupo controle. Entretanto o tratamento com DOX (0,1 μ M) aumentou a expressão de *Il18*, mas não de *Il6*, *Il33* nem *Il1 β* .

Figura 40 – Expressão gênica de *Il6*, *Il33*, *Il18* e *Il1 β* nas células MCF-7 tratadas com DOX ou PTX.

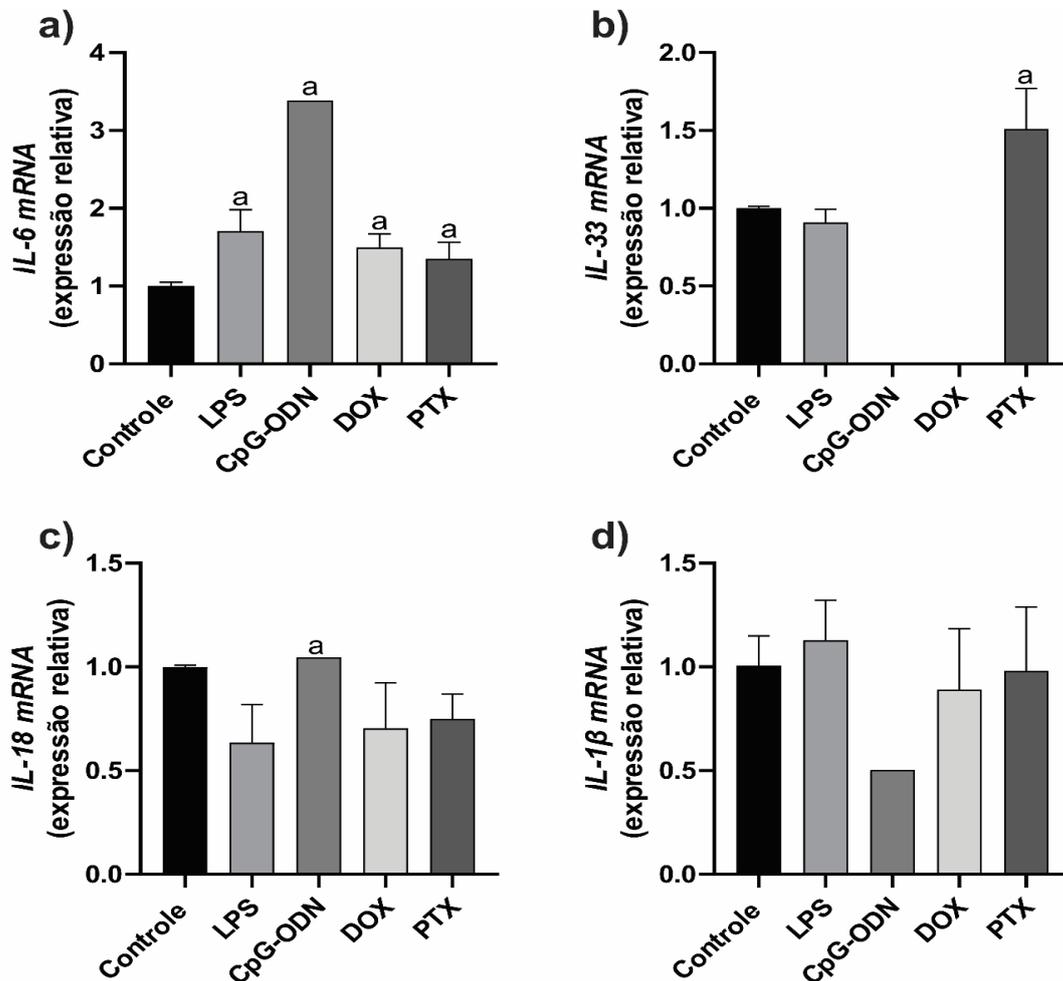


Células MCF-7 (3x10⁴ células/ml) foram tratadas com LPS (20 μ g/ml), CpG-ODN (10 μ g/ml), DOX (0,1 μ M) ou PTX (5 μ M) por 24 horas. Após o período de tratamento, as células foram coletadas para a análise por qPCR. Os resultados são apresentados como expressão relativa. ^ap<0,05 vs grupo controle. A análise estatística foi realizada com o teste One-way ANOVA e pós teste de Dunnett.

5.3.4. Expressão gênica de *Il6*, *Il33*, *Il18* e *Il1β* nas células MDA-MB-231 tratadas com DOX ou PTX.

Como demonstrado na **Figura 41** relativamente à análise por qPCR, o tratamento das células MDA-MB-231 com o PTX (5 nM) aumentou a expressão de *Il6* e *Il33*, mas não de *Il18* nem *Il1β* quando comparado ao grupo controle. Entretanto o tratamento com DOX (0,3 μM) aumentou somente a expressão de *Il6*, mas não de *Il33*, *Il18* nem *Il1β*.

Figura 41 – Expressão gênica de *Il6*, *Il33*, *Il18* e *Il1β* nas células MDA-MB-231 tratadas com DOX ou PTX.



Células MDA-MB-231 (3×10^4 células/ml) foram tratadas com LPS (10 μg/ml), CpG-ODN (10 μg/ml), DOX (0,3 μM) ou PTX (5 nM) por 24 horas. Após o período de tratamento, as células foram coletadas para a análise por qPCR. Os resultados são apresentados como expressão relativa. ^a $p < 0,05$ vs grupo controle. A análise estatística foi realizada com o teste One-way ANOVA e pós teste de Dunnett.

A **Tabela 3** a seguir resume os achados experimentais descritos até aqui.

Tabela 3. Integração dos resultados das células MCF-7 e MDA-MB-231 tratados com DOX ou PTX

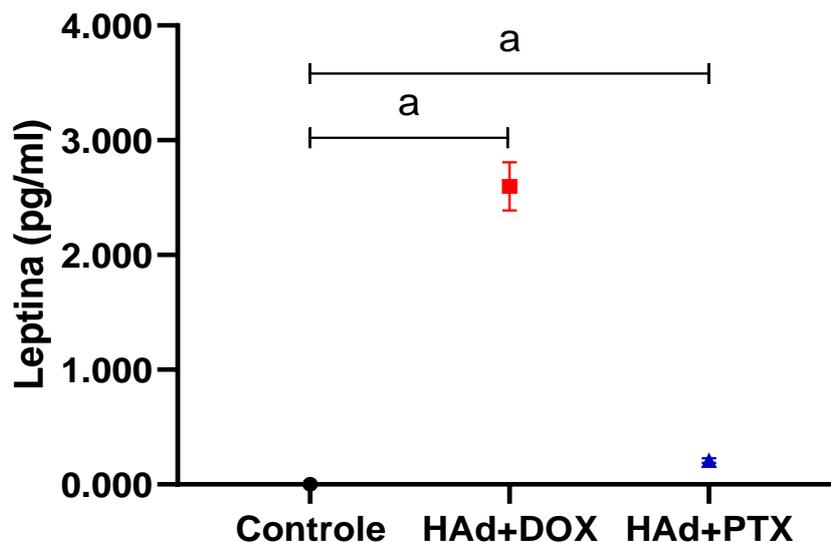
MARCADORES	METODOLOGIA	MCF-7		MDA-MB-231	
		DOX	PTX	DOX	PTX
TLR4	CITOMETRIA / IF	+	+	+	+
TLR9		+	+	+	+
PI3K δ		+	+	+	+
PI3K γ		+	+	+	+
pAKT		+	+	+	+
<i>Il33</i>	qPCR	-	+	-	+
<i>Il18</i>		+	+	-	-
<i>Il6</i>		-	+	+	+
<i>Il1b</i>		-	+	-	-

NA: não aplica

5.4.Efeito da DOX e PTX na produção de adipocitocinas a partir de adipócitos (HAd).

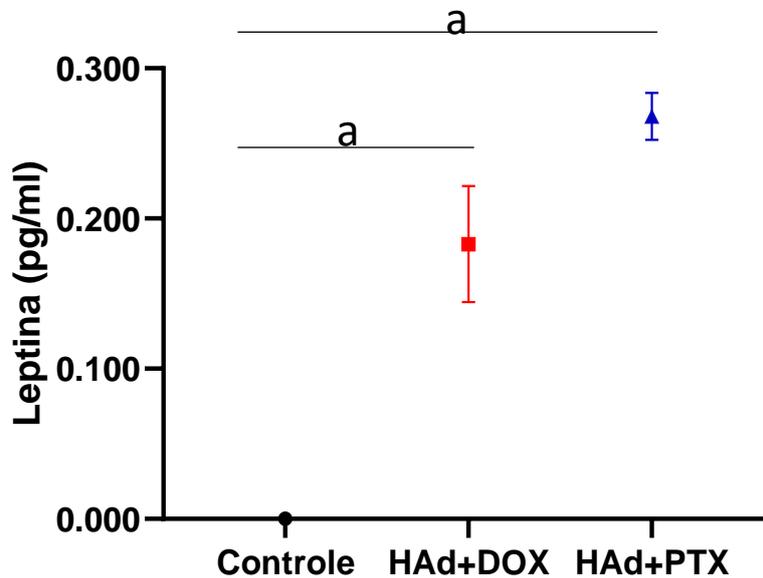
Após o período da diferenciação dos pré-adipócitos (HPAd), os adipócitos (HAd) foram estimulados por 24 horas com DOX (0,1 μ M); PTX (5 μ M) (IC50 para MCF-7) ou DOX (0,3 μ M) ou PTX (5nM) (IC50 para MDA-MB-231). Posteriormente, as adipocitocinas leptina, resistina e adiponectina foram quantificadas no sobrenadante dos adipócitos pelo método ELISA. Os resultados apresentados nas **Figuras 42 e 43** evidenciam que as diferentes concentrações, tanto da DOX, quanto do PTX, favoreceram um aumento significativo das concentrações de leptina no sobrenadante das células MCF-7 e MDA-MB-231 quando comparado ao grupo controle. Porém, as adipocitocinas resistina e adiponectina foram não detectáveis.

Figura 42 – Leptina em Adipócitos (HAd) tratados com DOX ou PTX (IC50 DE MCF7).



Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média da quantidade de Leptina em pg/ml. Os adipócitos (HAd) foram tratados por 24 horas com 0,1 μ M de DOX (HAd+DOX) ou 5 μ M de PTX (HAd+PTX). Após o período de tratamento, o sobrenadante foi coletado para a análise de Leptina por ELISA. O sobrenadante dos adipócitos tratados com DOX ou PTX apresentou um aumento significativo das concentrações de leptina. ^ap<0,05 vs grupo controle. A análise estatística foi realizada com o teste One-way ANOVA e pós teste de Dunnett.

Figura 43 – Leptina em Adipócitos (HAd) tratados com DOX e PTX (IC50 DE MDA-MB-231).



Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média da quantidade de Leptina em pg/ml. Os adipócitos (HAd) foram tratados por 24 horas com 0,3 μ M de DOX (HAd+DOX) ou 5 nM de PTX (HAd+PTX). Após o período de tratamento, o sobrenadante foi aproveitado para a análise de Leptina por ELISA. O sobrenadante dos adipócitos tratados com DOX ou PTX apresentou um aumento significativo das concentrações de leptina. ^a $p < 0,05$ vs grupo controle. A análise estatística foi realizada com o teste One-way ANOVA e pós teste de Dunnett.

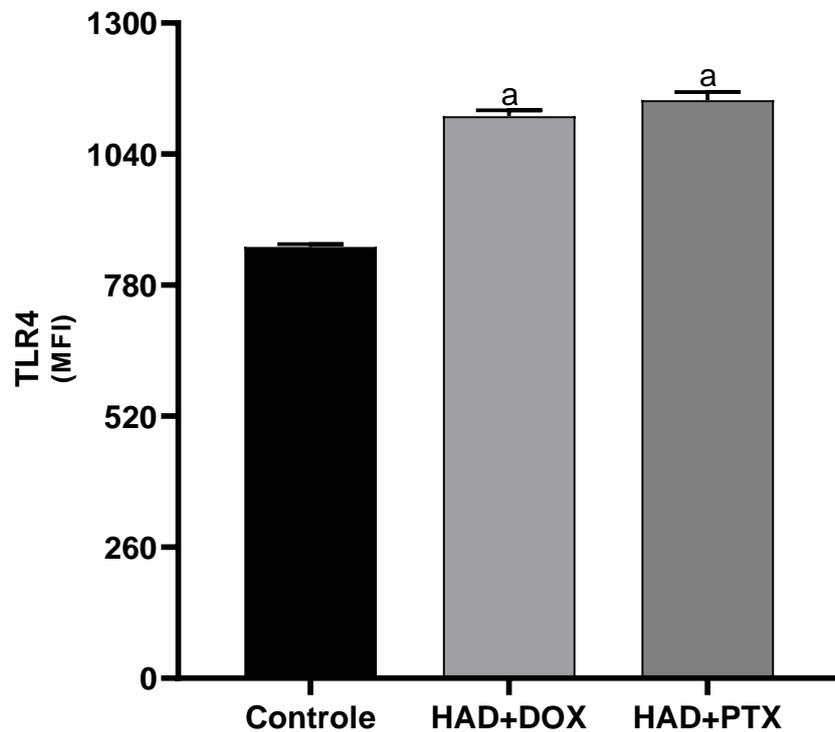
5.5.Resultados das células tumorais MCF-7 e MDA-MB-231 tratadas com o sobrenadante dos adipócitos (HAd) previamente estimulados com DOX ou PTX.

5.5.1. Expressão de TLR4, TLR9, PI3K δ , PI3K γ e pAKT por Citometria de fluxo e Imunofluorescência em células MCF-7 tratadas com o sobrenadante de HAd

As células MCF-7 (3×10^4 células/ml) foram tratadas com o sobrenadante dos HAd previamente estimulados com 0,1 μ M de DOX (HAd+DOX) ou 5 μ M de PTX (HAd+PTX) por 24 horas. Como evidenciado na **Figura 44**, observa-se a análise quantitativa da expressão

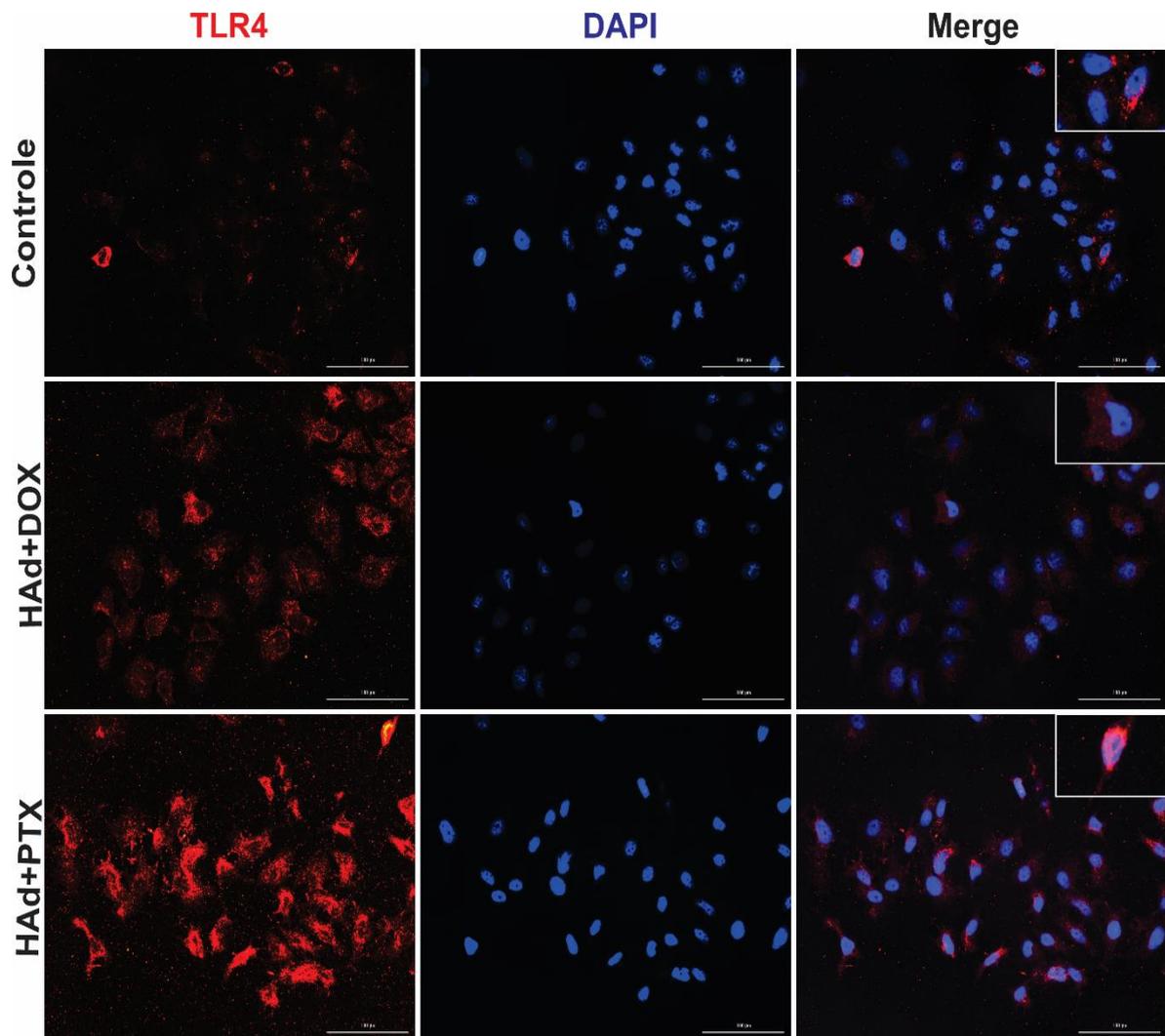
de TLR4, a qual demonstra que o tratamento de células MCF-7 com o sobrenadante de HAD+DOX ou HAD+PTX aumentou a expressão de TLR4, respectivamente, em 30% ou 34%. Resultados da análise qualitativa são apresentados na **Figura 45**, onde pode ser observado um aumento da fluorescência para TLR4 (vermelho).

Figura 44 – Quantificação, por citometria de fluxo, da expressão de TLR4 em células MCF-7 tratadas com o sobrenadante de adipócitos (HAD) estimulados com DOX ou PTX.



Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média da intensidade de fluorescência média (MFI). As células MCF-7 (3×10^4 células/ml) foram tratadas por 24 horas com o sobrenadante de adipócitos (HAD) estimulados com $0,1 \mu\text{M}$ de DOX (HAD+DOX) ou $5 \mu\text{M}$ de PTX (HAD+PTX). Após o período de tratamento, as células foram tripsinizadas e incubadas com os respectivos anticorpos para o posterior análise por citometria de fluxo. Células MCF-7 tratadas com HAD+DOX ou HAD+PTX mostraram um aumento significativo da MFI para TLR4. ^a $p < 0,05$ vs grupo controle. A análise estatística foi realizada com o teste One-way ANOVA e pós teste de Dunnett.

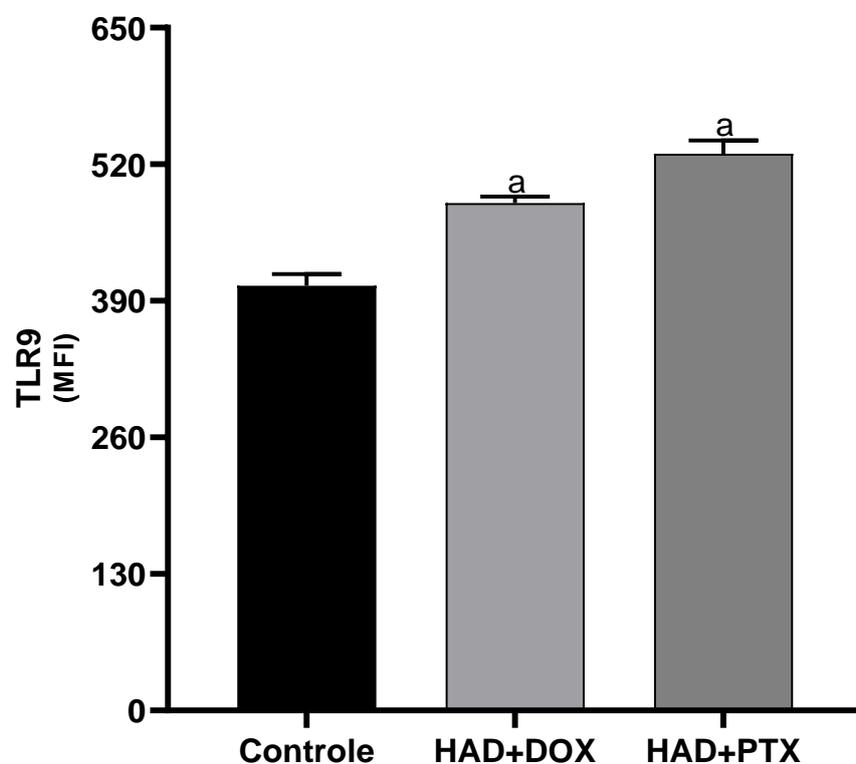
Figura 45 – Expressão de TLR4 em células MCF-7 tratadas com o sobrenadante de adipócitos (HAd) estimulados com DOX ou PTX.



Células MCF-7 (3×10^4 células/ml) foram tratadas por 24 horas com o sobrenadante de adipócitos (HAd) estimulados com $0,1 \mu\text{M}$ de DOX (HAd+DOX) ou $5 \mu\text{M}$ de PTX (HAd+PTX). Após o período de tratamento as células foram fixadas para a realização da imunofluorescência. As células MCF-7 tratadas com HAd+DOX ou HAd+PTX mostraram aumento da fluorescência para TLR4 (vermelho). Adicionalmente, o grupo controle não mostrou significativa marcação para TLR4. Os núcleos celulares foram corados com DAPI (azul). Aumento: $200 \times$.

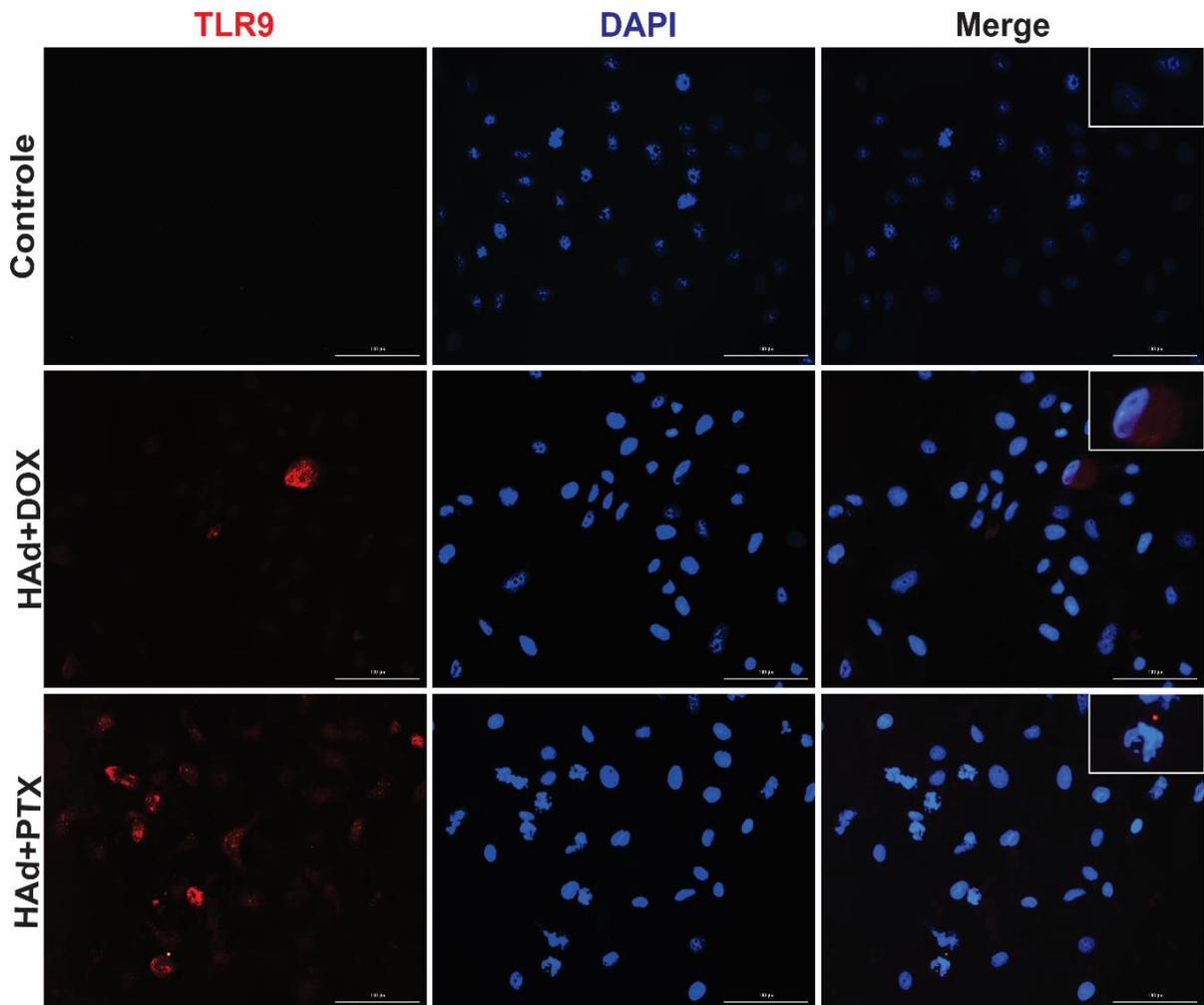
Como apresentado na **Figuras 46**, a análise quantitativa da expressão de TLR9 mostrou que o tratamento de células MCF-7 com o sobrenadante de HAD+DOX ou HAD+PTX aumentou a expressão de TLR9, respectivamente, em 19% ou 31%. Resultados da análise qualitativa são apresentados na **Figura 47** onde pode ser observado um aumento da fluorescência para TLR9 (vermelho).

Figura 46 – Quantificação, por citometria de fluxo, da expressão de TLR9 em células MCF-7 tratadas com o sobrenadante de adipócitos (HAD) estimulados com DOX ou PTX.



Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média da intensidade de fluorescência média (MFI). As células MCF-7 (3×10^4 células/ml) foram tratadas por 24 horas com o sobrenadante de adipócitos (HAD) estimulados com $0,1 \mu\text{M}$ de DOX (HAD+DOX) ou $5 \mu\text{M}$ de PTX (HAD+PTX). Após o período de tratamento as células foram tripsinizadas e incubadas com os respectivos anticorpos para a posterior análise por citometria de fluxo. Células MCF-7 tratadas com HAD+DOX ou HAD+PTX mostraram um aumento significativo da MFI para TLR9. ^a $p < 0,05$ vs grupo controle. A análise estatística foi realizada com o teste One-way ANOVA e pós teste de Dunnett.

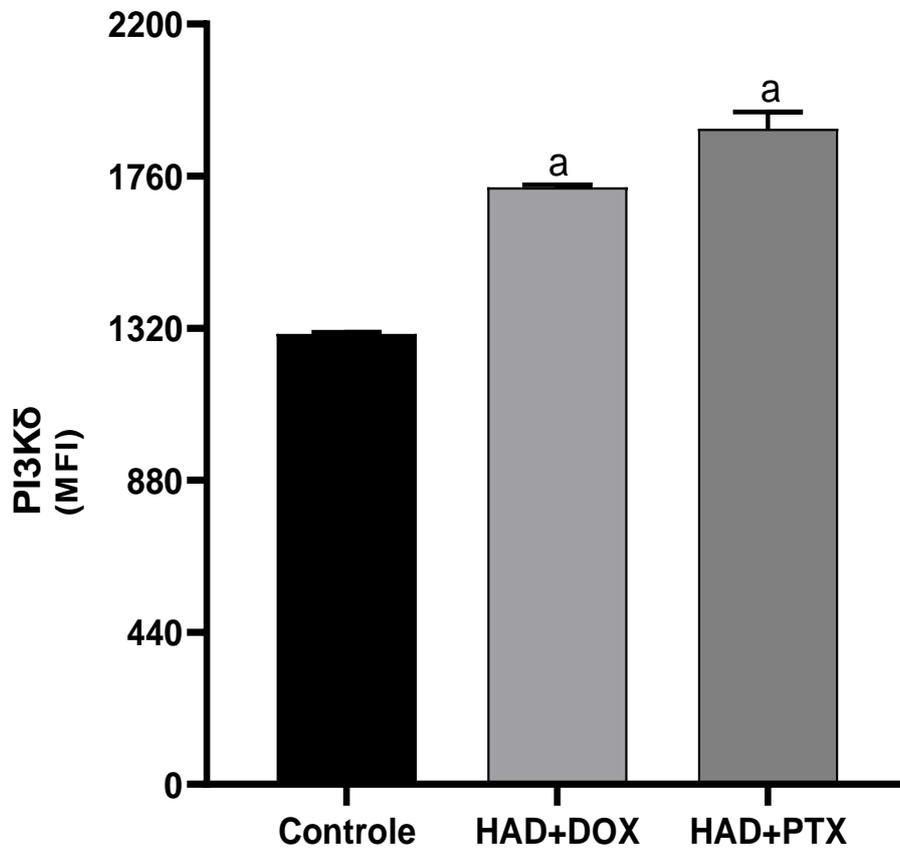
Figura 47 – Expressão de TLR9 em células MCF-7 tratadas com o sobrenadante de adipócitos (HAd) estimulados com DOX ou PTX.



Células MCF-7 (3×10^4 células/ml) foram tratadas por 24 horas com o sobrenadante de adipócitos (HAd) estimulados com $0,1 \mu\text{M}$ de DOX (HAd+DOX) ou $5 \mu\text{M}$ de PTX (HAd+PTX). Após o período de tratamento as células foram fixadas para a realização da imunofluorescência. As células MCF-7 tratadas com HAd+DOX ou HAd+PTX mostraram aumento da fluorescência para TLR9 (vermelho). Adicionalmente, o grupo controle não mostrou significativa marcação para TLR9. Os núcleos celulares foram corados com DAPI (azul). Aumento: $200 \times$.

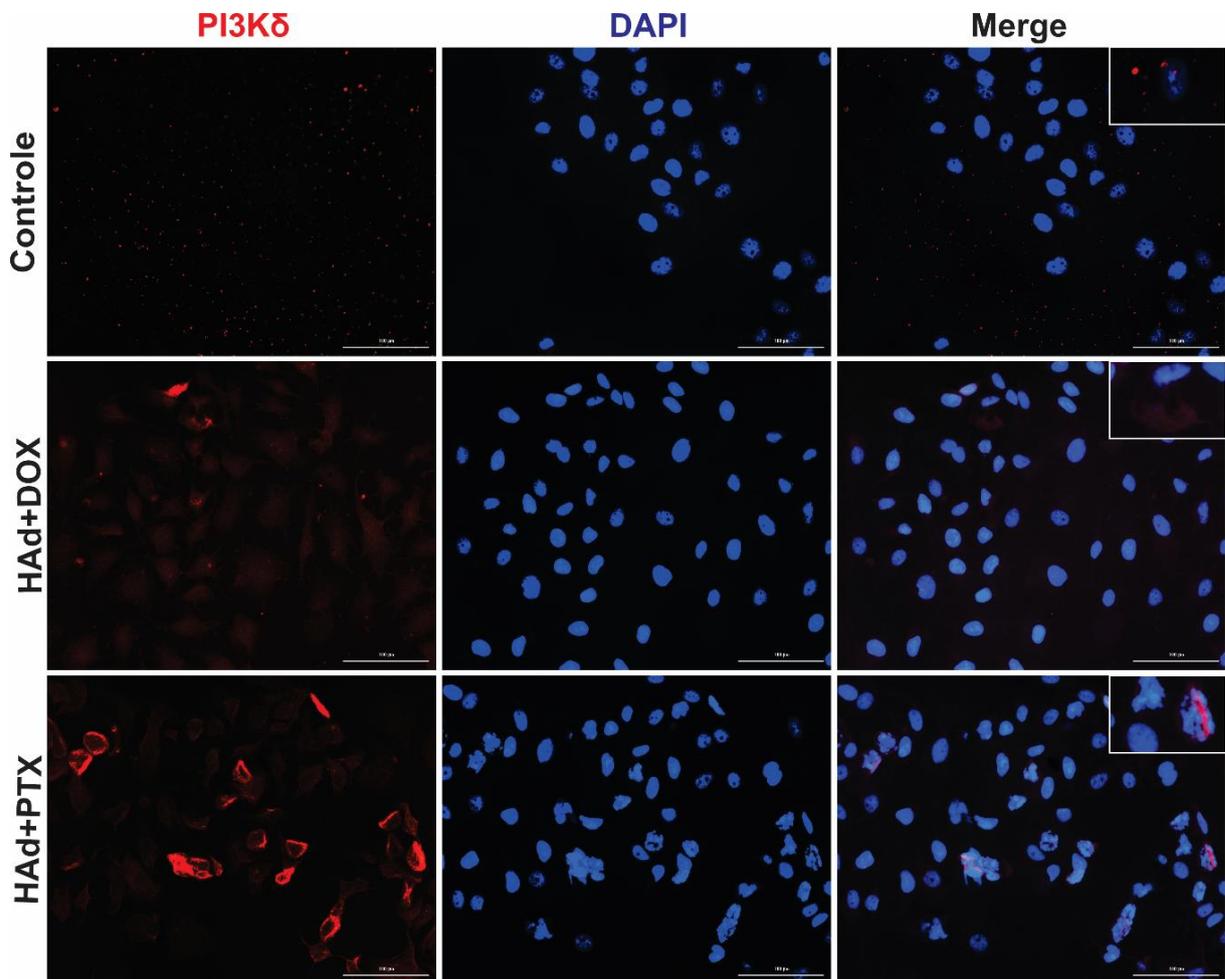
Como apresentado na **Figuras 48**, a análise quantitativa da expressão de PI3K δ mostrou que o tratamento de células MCF-7 com o sobrenadante de HAd+DOX ou HAd+PTX aumentou a expressão de PI3K δ em 33% ou 46%. Resultados da análise qualitativa são apresentados na **Figura 49** onde pode ser observado um aumento da fluorescência para PI3K δ (vermelho).

Figura 48 – Quantificação, por citometria de fluxo, da expressão de PI3K δ em células MCF-7 tratadas com o sobrenadante de adipócitos (HAD) estimulados com DOX ou PTX.



Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média da intensidade de fluorescência média (MFI). As células MCF-7 (3×10^4 células/ml) foram tratadas por 24 horas com o sobrenadante de adipócitos (HAD) estimulados com $0,1 \mu\text{M}$ de DOX (HAD+DOX) ou $5 \mu\text{M}$ de PTX (HAD+PTX). Após o período de tratamento as células foram tripsinizadas e incubadas com os respectivos anticorpos para a posterior análise por citometria de fluxo. Células MCF-7 tratadas com HAD+DOX ou HAD+PTX mostraram um aumento significativo da MFI para PI3K δ . ^a $p < 0,05$ vs grupo controle. A análise estatística foi realizada com o teste One-way ANOVA e pós teste de Dunnett.

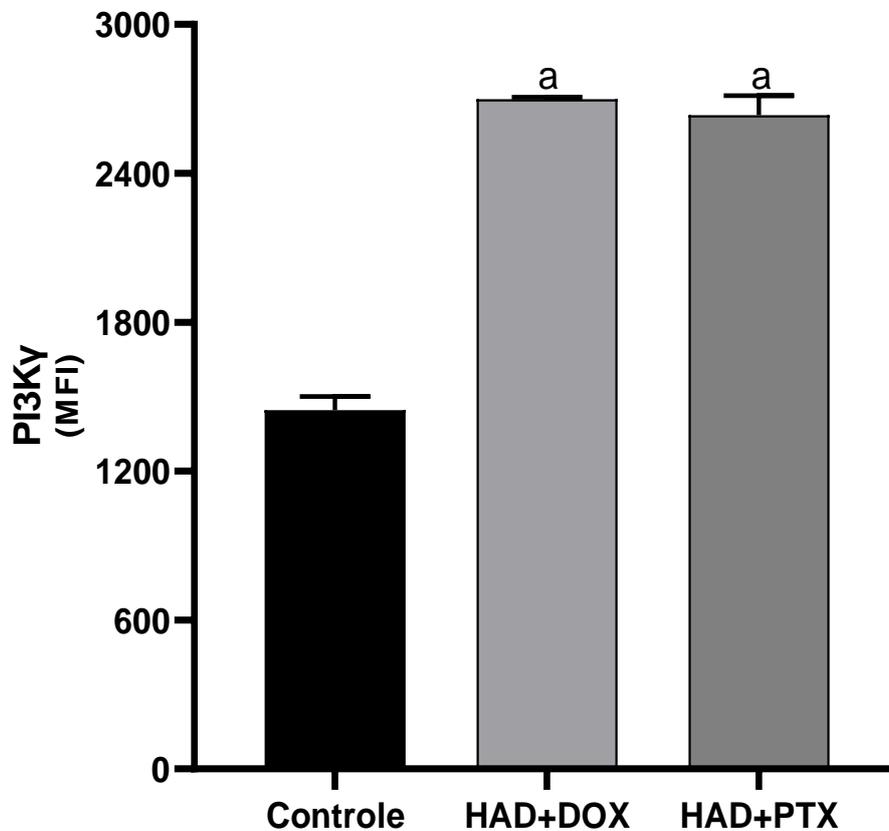
Figura 49 – Expressão de PI3K δ em células MCF-7 tratadas com o sobrenadante de adipócitos (HAd) estimulados com DOX ou PTX.



Células MCF-7 (3×10^4 células/ml) foram tratadas por 24 horas com o sobrenadante de adipócitos (HAd) estimulados com $0,1 \mu\text{M}$ de DOX (HAd+DOX) ou $5 \mu\text{M}$ de PTX (HAd+PTX). Após o período de tratamento as células foram fixadas para a realização da imunofluorescência. As células MCF-7 tratadas com HAd+DOX ou HAd+PTX mostraram aumento da fluorescência para PI3K δ (vermelho). Adicionalmente, o grupo controle não mostrou significativa marcação para PI3K δ . Os núcleos celulares foram corados com DAPI (azul). Aumento: $200 \times$.

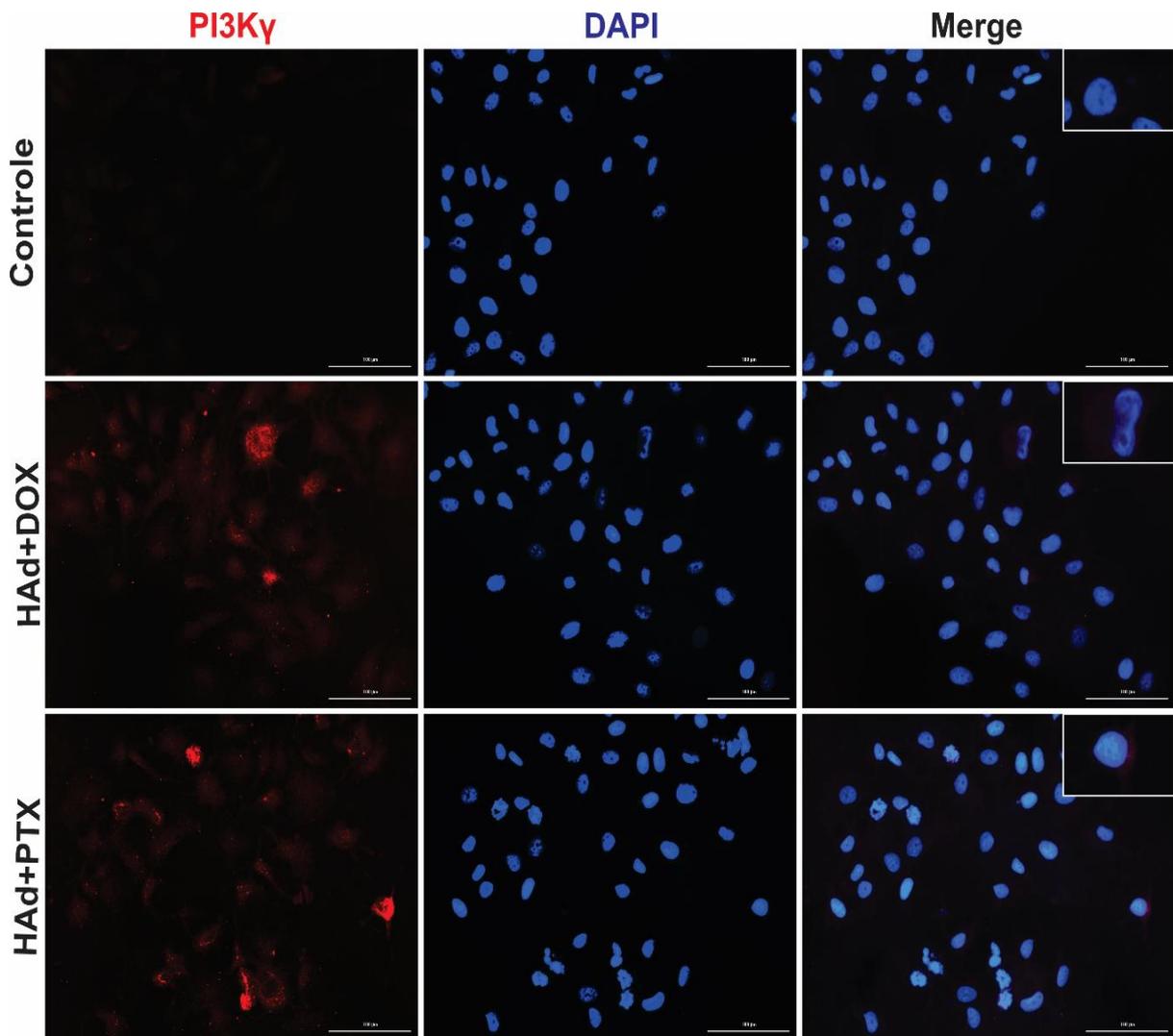
Como apresentado na **Figuras 50**, a análise quantitativa da expressão de PI3K γ mostrou que o tratamento de células MCF-7 com o sobrenadante de HAd+DOX ou HAd+PTX aumentou a expressão de PI3K γ em 87% ou 82%. Resultados da análise qualitativa são apresentados na **Figura 51** onde pode ser observado um aumento da fluorescência para PI3K γ (vermelho).

Figura 50 – Quantificação, por citometria de fluxo, da expressão de PI3K γ em células MCF-7 tratadas com o sobrenadante de adipócitos (HAD) estimulados com DOX ou PTX.



Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média da intensidade de fluorescência média (MFI). As células MCF-7 (3×10^4 células/ml) foram tratadas por 24 horas com o sobrenadante de adipócitos (HAD) estimulados com $0,1 \mu\text{M}$ de DOX (HAD+DOX) ou $5 \mu\text{M}$ de PTX (HAD+PTX). Após o período de tratamento as células foram tripsinizadas e incubadas com os respectivos anticorpos para a posterior análise por citometria de fluxo. Células MCF-7 tratadas com HAD+DOX ou HAD+PTX mostraram um aumento significativo da MFI para PI3K γ . ^a $p < 0,05$ vs grupo controle. A análise estatística foi realizada com o teste One-way ANOVA e pós teste de Dunnett.

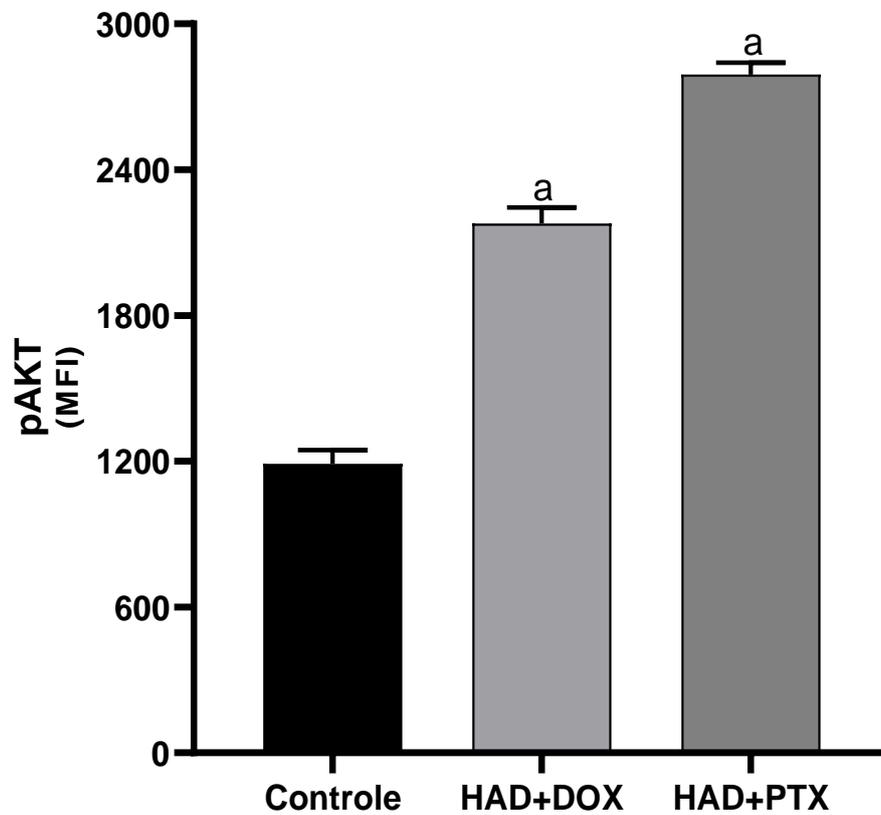
Figura 51 – Expressão de PI3K γ em células MCF-7 tratadas com o sobrenadante de adipócitos (HAd) estimulados com DOX ou PTX.



Células MCF-7 (3×10^4 células/ml) foram tratadas por 24 horas com o sobrenadante de adipócitos (HAd) estimulados com $0,1 \mu\text{M}$ de DOX (HAd+DOX) ou $5 \mu\text{M}$ de PTX (HAd+PTX). Após o período de tratamento as células foram fixadas para a realização da imunofluorescência. As células MCF-7 tratadas com HAd+DOX ou HAd+PTX mostraram aumento da fluorescência para PI3K γ (vermelho). Adicionalmente, o grupo controle não mostrou significativa marcação para PI3K γ . Os núcleos celulares foram corados com DAPI (azul). Aumento: $200 \times$.

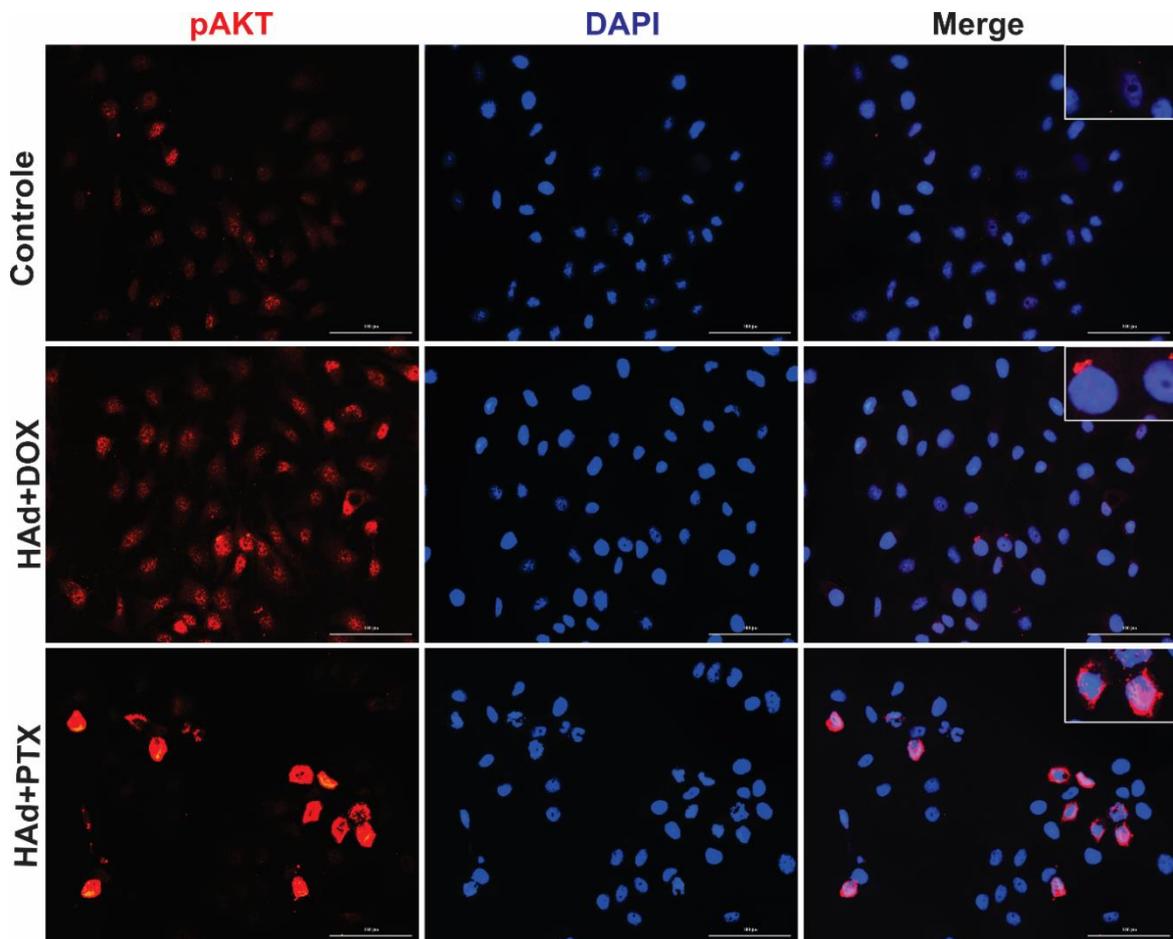
Como apresentado na **Figuras 52**, a análise quantitativa da expressão de pAKT mostrou que o tratamento de células MCF-7 com o sobrenadante de HAd+DOX ou HAd+PTX aumentou a expressão de pAKT em 83% ou 135%. Resultados da análise qualitativa são apresentados na **Figura 53** onde pode ser observado um aumento da fluorescência para pAKT (vermelho).

Figura 52 – Quantificação, por citometria de fluxo, da expressão de pAKT em células MCF-7 tratadas com o sobrenadante de adipócitos (HAD) estimulados com DOX ou PTX.



Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média da intensidade de fluorescência média (MFI). As células MCF-7 (3×10^4 células/ml) foram tratadas por 24 horas com o sobrenadante de adipócitos (HAD) estimulados com $0,1 \mu\text{M}$ de DOX (HAD+DOX) ou $5 \mu\text{M}$ de PTX (HAD+PTX). Após o período de tratamento as células foram tripsinizadas e incubadas com os respectivos anticorpos para a posterior análise por citometria de fluxo. Células MCF-7 tratadas com HAD+DOX ou HAD+PTX mostraram um aumento significativo da MFI para pAKT. ^a $p < 0,05$ vs grupo controle. A análise estatística foi realizada com o teste One-way ANOVA e pós teste de Dunnett.

Figura 53 – Expressão de pAKT em células MCF-7 tratadas com o sobrenadante de adipócitos (HAd) estimulados com DOX ou PTX.



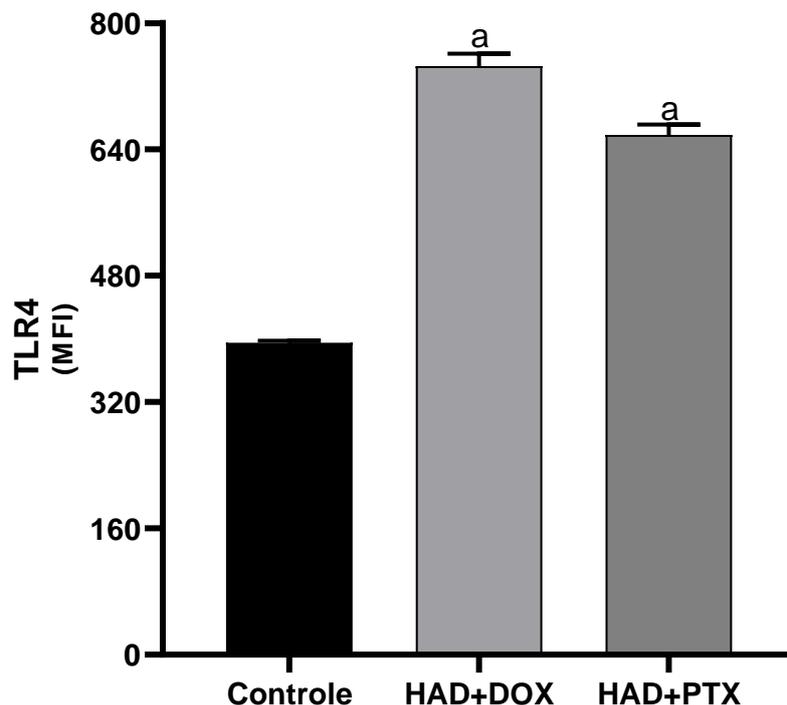
Células MCF-7 (3×10^4 células/ml) foram tratadas por 24 horas com o sobrenadante de adipócitos (HAd) estimulados com $0,1 \mu\text{M}$ de DOX (HAD+DOX) ou $5 \mu\text{M}$ de PTX (HAD+PTX). Após o período de tratamento as células foram fixadas para a realização da imunofluorescência. As células MCF-7 tratadas com HAD+DOX ou HAD+PTX mostraram aumento da fluorescência para pAKT (vermelho). Adicionalmente, o grupo controle não mostrou significativa marcação para pAKT. Os núcleos celulares foram corados com DAPI (azul). Aumento: $200 \times$.

5.5.2. Expressão de TLR4, TLR9, PI3K δ , PI3K γ e pAKT por Citometria de fluxo e Imunofluorescência em células MDA-MB-231 tratadas com o sobrenadante de HAd

As células MDA-MB-231 (3×10^4 células/ml) foram tratadas com o sobrenadante dos HAd previamente estimulados com $0,3 \mu\text{M}$ de DOX (HAD+DX) ou 5 nM de PTX (HAD+PTX) por 24 horas. Como evidenciado na **Figura 54**, observa-se a análise quantitativa da expressão de TLR4, a qual demonstra que o tratamento de células MDA-MB-231 com o sobrenadante de

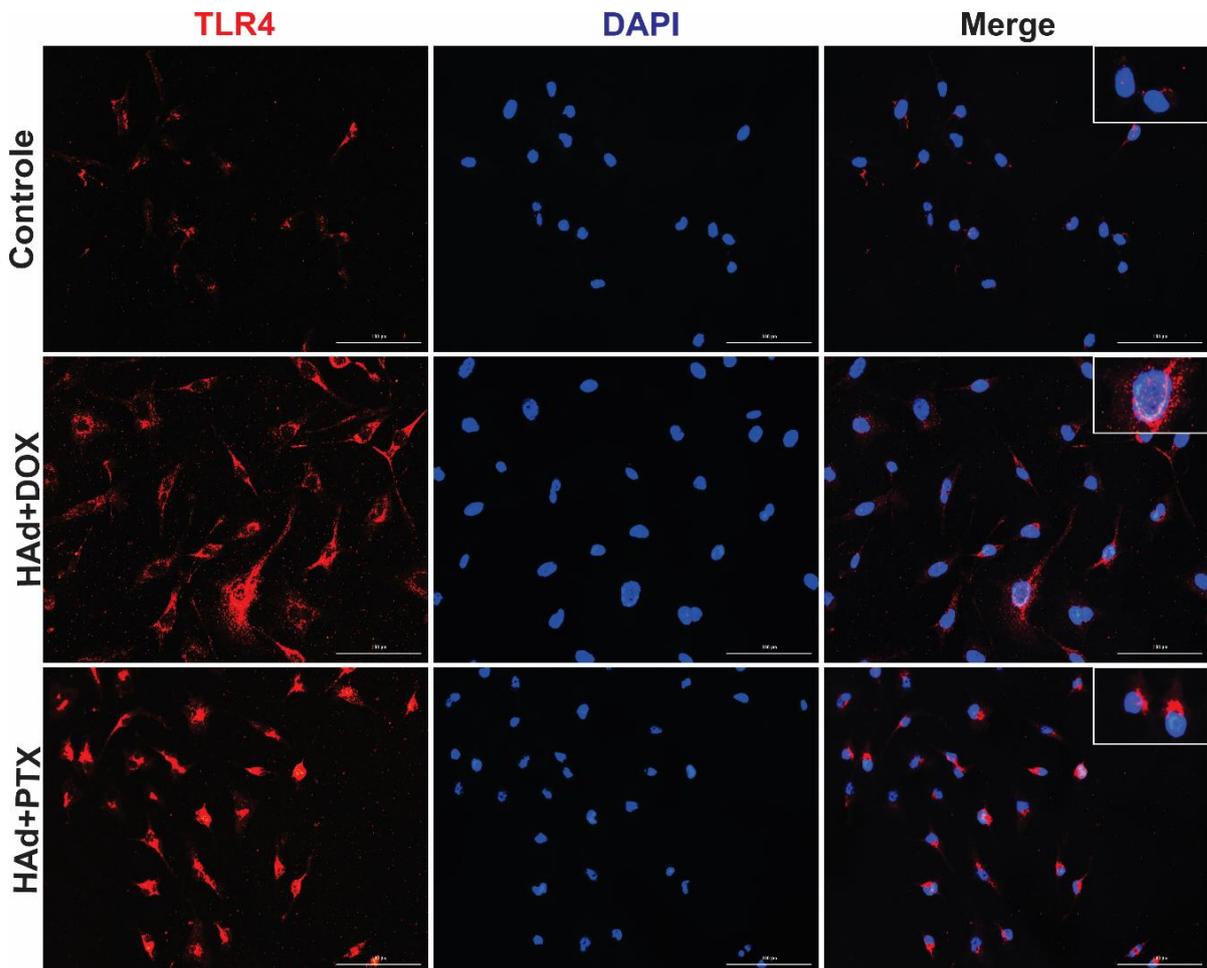
HAD+DOX ou HAD+PTX aumentou a expressão de TLR4, respectivamente, em 89% ou 67%. Resultados da análise qualitativa são apresentados na **Figura 55**, onde pode ser observado um aumento da fluorescência para TLR4 (vermelho).

Figura 54 – Quantificação, por citometria de fluxo, da expressão de TLR4 em células MDA-MB-231 tratadas com o sobrenadante de adipócitos (HAD) estimulados com DOX ou PTX.



Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média da intensidade de fluorescência média (MFI). As células MDA-MB-231 (3×10^4 células/ml) foram tratadas por 24 horas com o sobrenadante de adipócitos (HAD) estimulados com $0,3 \mu\text{M}$ de DOX (HAD+DOX) ou 5 nM de PTX (HAD+PTX). Após o período de tratamento, as células foram tripsinizadas e incubadas com os respectivos anticorpos para o posterior análise por citometria de fluxo. Células MDA-MB-231 tratadas com HAD+DOX ou HAD+PTX mostraram um aumento significativo da MFI para TLR4. ^a $p < 0,05$ vs grupo controle. A análise estatística foi realizada com o teste One-way ANOVA e pós teste de Dunnett.

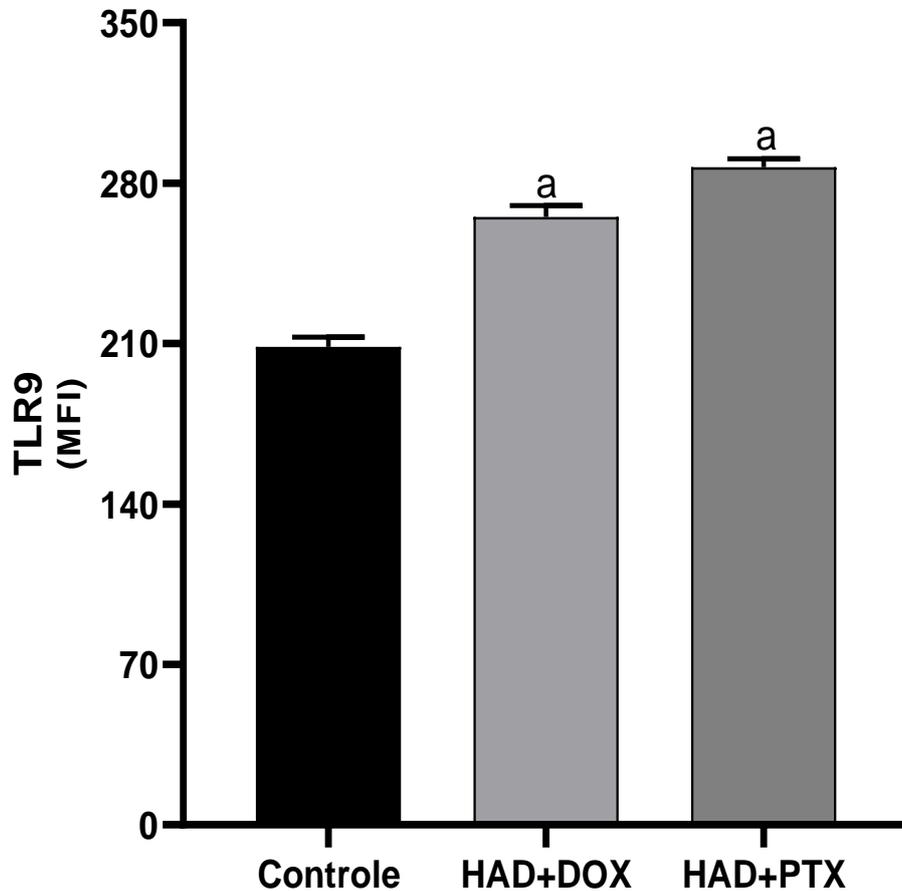
Figura 55 – Expressão de TLR4 em células MDA-MB-231 tratadas com o sobrenadante de adipócitos (HAd) estimulados com DOX ou PTX.



Células MDA-MB-231 (3×10^4 células/ml) foram tratadas por 24 horas com o sobrenadante de adipócitos (HAd) estimulados com $0,3 \mu\text{M}$ de DOX (HAd+DOX) ou 5 nM de PTX (HAd+PTX). Após o período de tratamento as células foram fixadas para a realização da imunofluorescência. As células MDA-MB-231 tratadas com HAd+DOX ou HAd+PTX mostraram aumento da fluorescência para TLR4 (vermelho). Adicionalmente, o grupo controle não mostrou significativa marcação para TLR4. Os núcleos celulares foram corados com DAPI (azul). Aumento: $200 \times$.

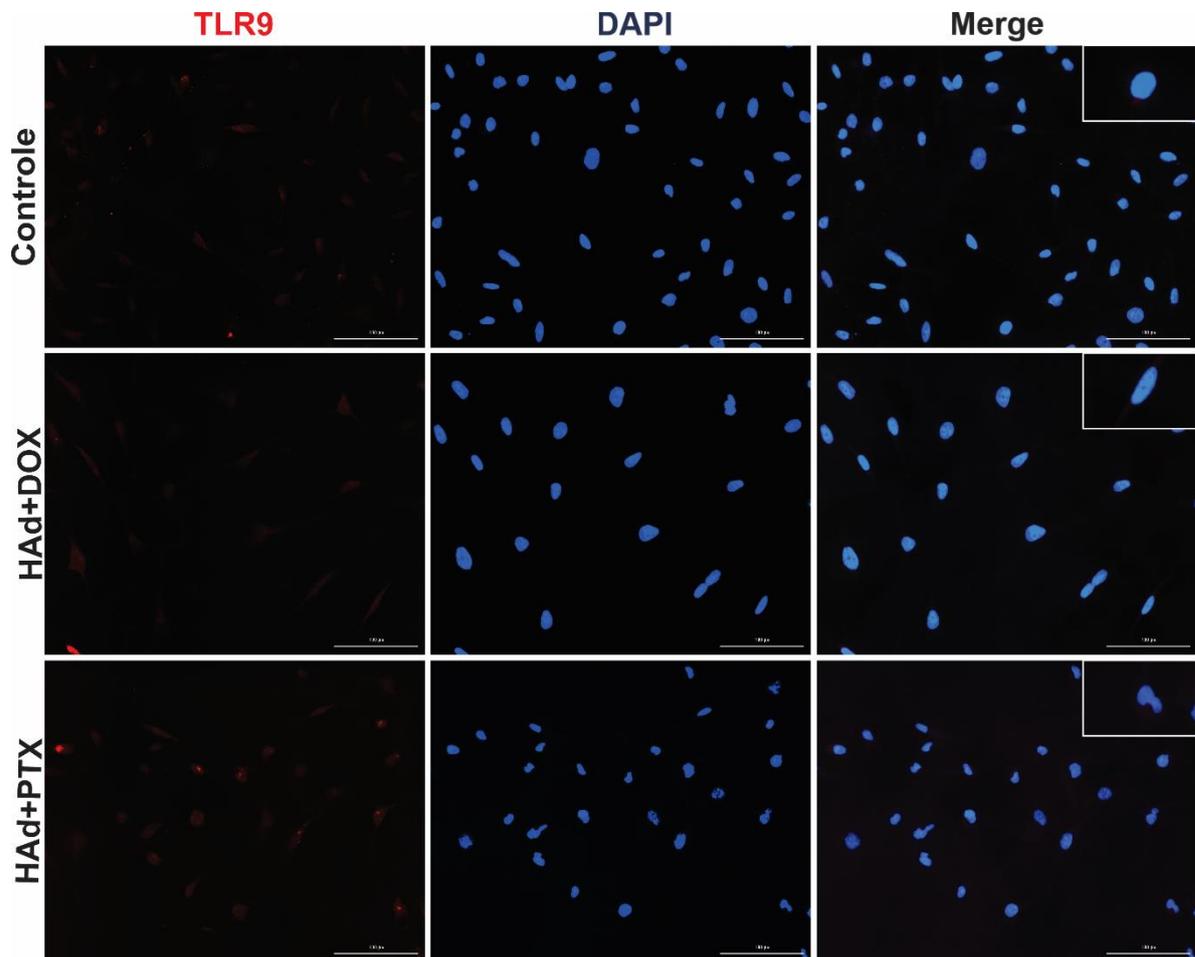
Como apresentado na **Figuras 56**, a análise quantitativa da expressão de TLR9 mostrou que o tratamento de células MDA-MB-231 com o sobrenadante de HAd+DOX ou HAd+PTX aumentou a expressão de TLR9, respectivamente, em 27% ou 38%. Resultados da análise qualitativa são apresentados na **Figura 57** onde pode ser observado um aumento da fluorescência para TLR9 (vermelho).

Figura 56 – Quantificação, por citometria de fluxo, da expressão de TLR9 em células MDA-MB-231 tratadas com o sobrenadante de adipócitos (HAd) estimulados com DOX ou PTX.



Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média da intensidade de fluorescência média (MFI). As células MDA-MB-231 (3×10^4 células/ml) foram tratadas por 24 horas com o sobrenadante de adipócitos (HAd) estimulados com $0,3 \mu\text{M}$ de DOX (HAD+DOX) ou 5 nM de PTX (HAD+PTX). Após o período de tratamento as células foram tripsinizadas e incubados com os respectivos anticorpos para o posterior análise por citometria de fluxo. Células MDA-MB-231 tratadas com HAD+DOX ou HAD+PTX mostraram um aumento significativo da MFI para TLR9. ^a $p < 0,05$ vs grupo controle. A análise estatística foi realizada com o teste One-way ANOVA e pós teste de Dunnett.

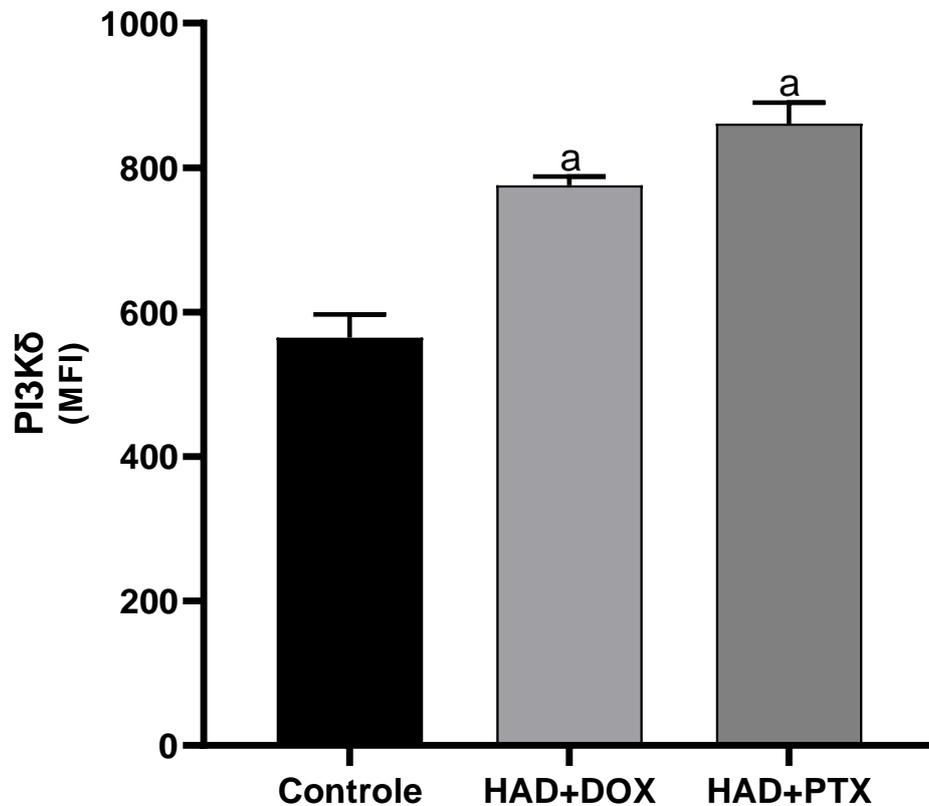
Figura 57 – Expressão de TLR9 em células MDA-MB-231 tratadas com o sobrenadante de adipócitos (HAd) estimulados com DOX ou PTX.



Células MDA-MB-231 (3×10^4 células/ml) foram tratadas por 24 horas com o sobrenadante de adipócitos (HAd) estimulados com $0,3 \mu\text{M}$ de DOX (HAD+DOX) ou 5 nM de PTX (HAD+PTX). Após o período de tratamento as células foram fixadas para a realização da imunofluorescência. As células MDA-MB-231 tratadas com HAD+DOX ou HAD+PTX mostraram aumento da fluorescência para TLR9 (vermelho). Adicionalmente, o grupo controle não mostrou significativa marcação para TLR9. Os núcleos celulares foram corados com DAPI (azul). Aumento: $200 \times$.

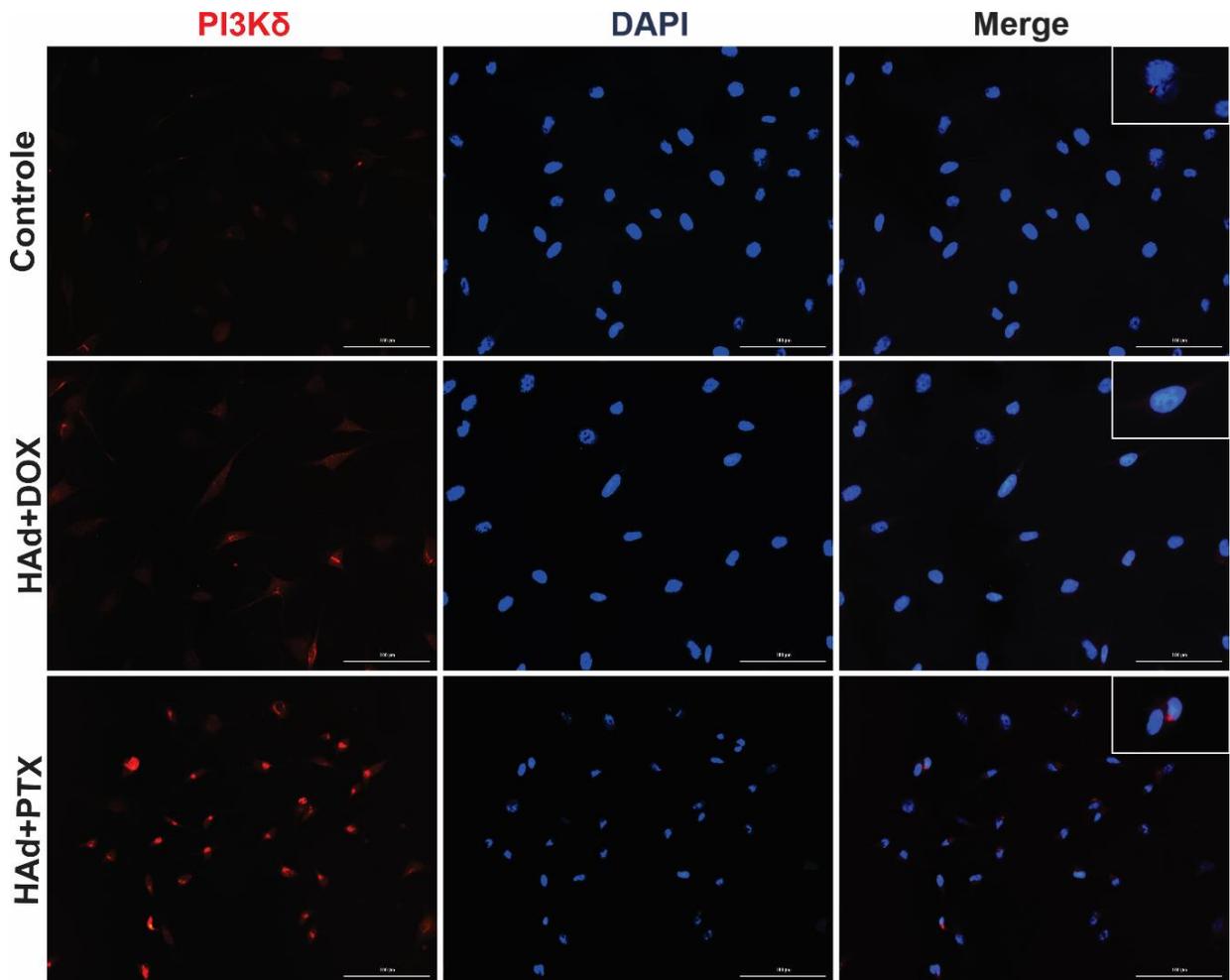
Como apresentado na **Figuras 58**, a análise quantitativa da expressão de PI3K δ mostrou que o tratamento de células MDA-MB-231 com o sobrenadante de HAD+DOX ou HAD+PTX aumentou a expressão de PI3K δ em 37% ou 52%. Resultados da análise qualitativa são apresentados na **Figura 59** onde pode ser observado um aumento da fluorescência para PI3K δ (vermelho).

Figura 58 – Quantificação, por citometria de fluxo, da expressão de PI3K δ em células MDA-MB-231 tratadas com o sobrenadante de adipócitos (HAD) estimulados com DOX ou PTX.



Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média da intensidade de fluorescência média (MFI). As células MDA-MB-231 (3×10^4 células/ml) foram tratadas por 24 horas com o sobrenadante de adipócitos (HAD) estimulados com $0,3 \mu\text{M}$ de DOX (HAD+DOX) ou 5 nM de PTX (HAD+PTX). Após o período de tratamento as células foram tripsinizadas e incubadas com os respectivos anticorpos para o posterior análise por citometria de fluxo. Células MDA-MB-231 tratadas com HAD+DOX ou HAD+PTX mostraram um aumento significativo da MFI para PI3K δ . ^a $p < 0,05$ vs grupo controle. A análise estatística foi realizada com o teste One-way ANOVA e pós teste de Dunnett.

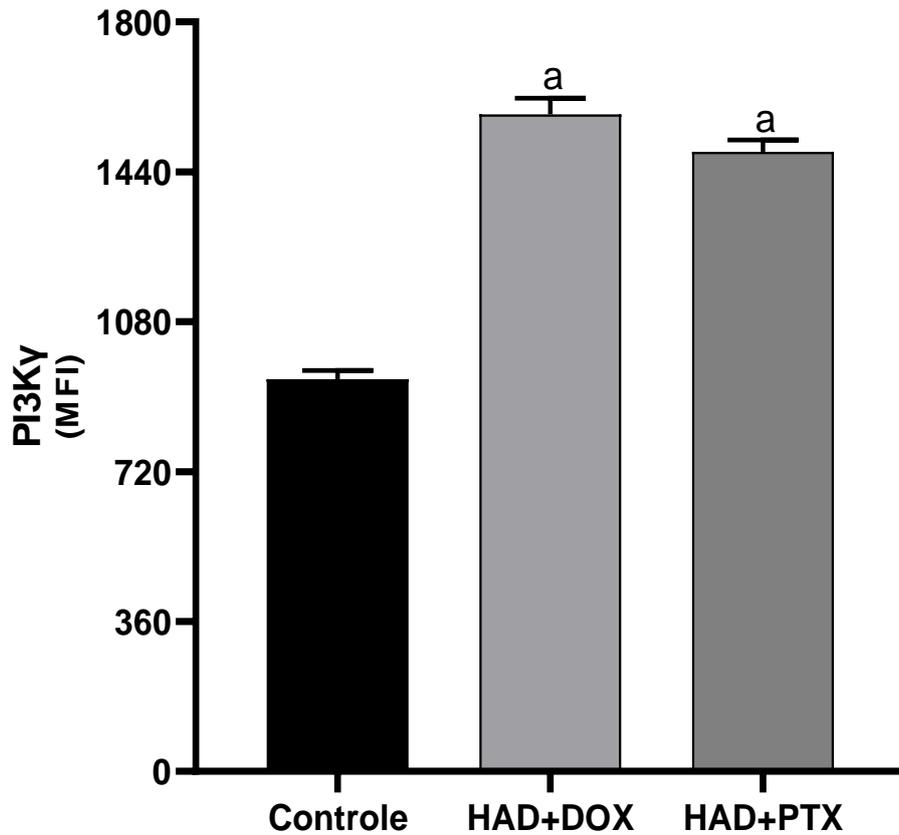
Figura 59 – Expressão de PI3K δ em células MDA-MB-231 tratadas com o sobrenadante de adipócitos (HAd) estimulados com DOX ou PTX.



Células MDA-MB-231 (3×10^4 células/ml) foram tratadas por 24 horas com o sobrenadante de adipócitos (HAd) estimulados com $0,3 \mu\text{M}$ de DOX (HAd+DOX) ou 5 nM de PXT (HAd+PTX). Após o período de tratamento as células foram fixadas para a realização da imunofluorescência. As células MDA-MB-231 tratadas com HAd+DOX ou HAd+PTX mostraram aumento da fluorescência para PI3K δ (vermelho). Adicionalmente, o grupo controle não mostrou significativa marcação para PI3K δ . Os núcleos celulares foram corados com DAPI (azul). Aumento: $200 \times$.

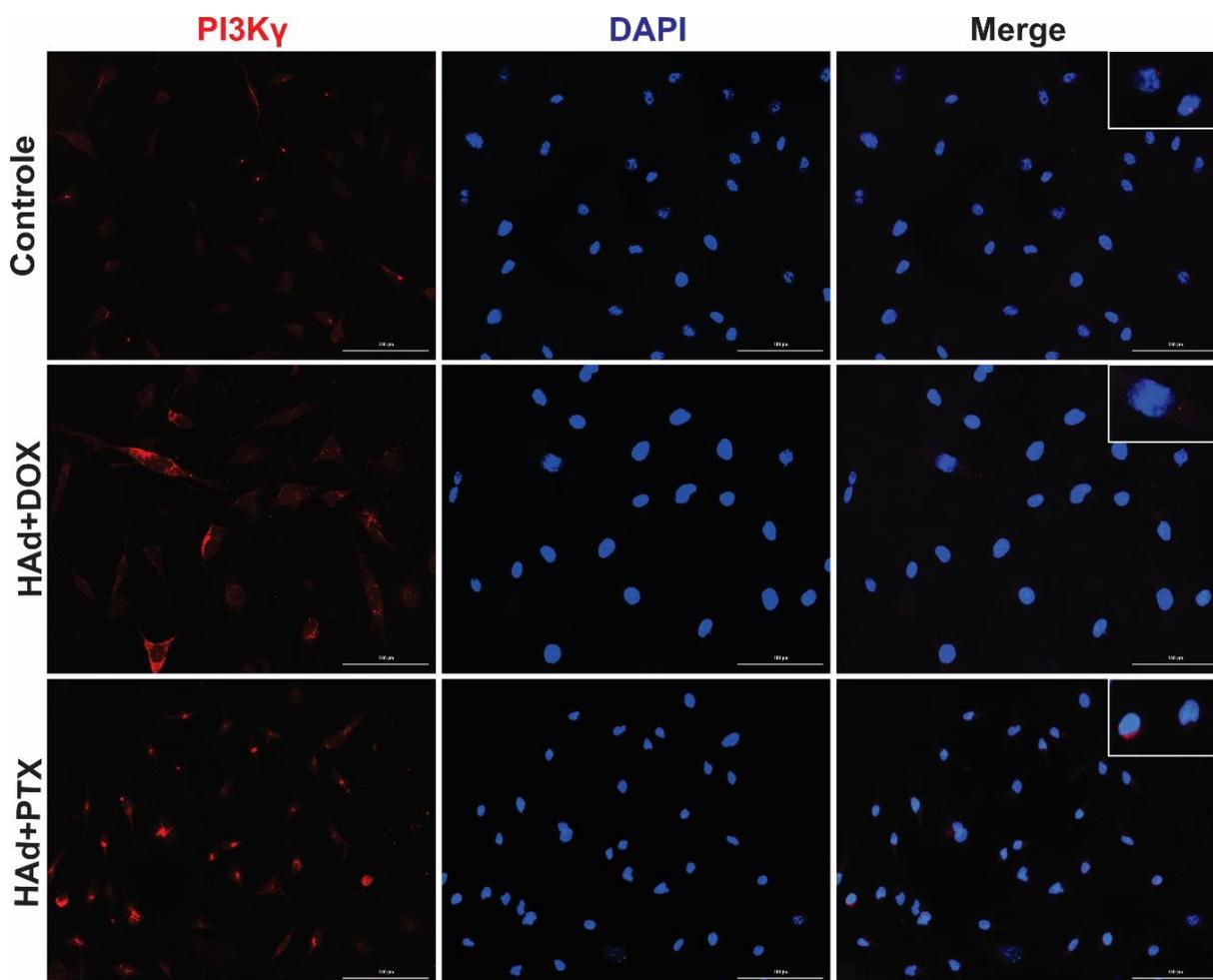
Como apresentado na **Figuras 60**, a análise quantitativa da expressão de PI3K γ mostrou que o tratamento de células MDA-MB-231 com o sobrenadante de HAd+DOX ou HAd+PTX aumentou a expressão de PI3K γ em 68% ou 58%. Resultados da análise qualitativa são apresentados na **Figura 61** onde pode ser observado um aumento da fluorescência para PI3K γ (vermelho).

Figura 60 – Quantificação, por citometria de fluxo, da expressão de PI3K γ em células MDA-MB-231 tratadas com o sobrenadante de adipócitos (HAd) estimulados com DOX ou PTX.



Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média da intensidade de fluorescência média (MFI). As células MDA-MB-231 (3×10^4 células/ml) foram tratadas por 24 horas com o sobrenadante de adipócitos (HAD) estimulados com $0,3 \mu\text{M}$ de DOX (HAD+DOX) ou 5 nM de PTX (HAD+PTX). Após o período de tratamento as células foram tripsinizadas e incubadas com os respectivos anticorpos para o posterior análise por citometria de fluxo. Células MDA-MB-231 tratadas com HAD+DOX ou HAD+PTX mostraram um aumento significativo da MFI para PI3K γ . ^a $p < 0,05$ vs grupo controle. A análise estatística foi realizada com o teste One-way ANOVA e pós teste de Dunnett.

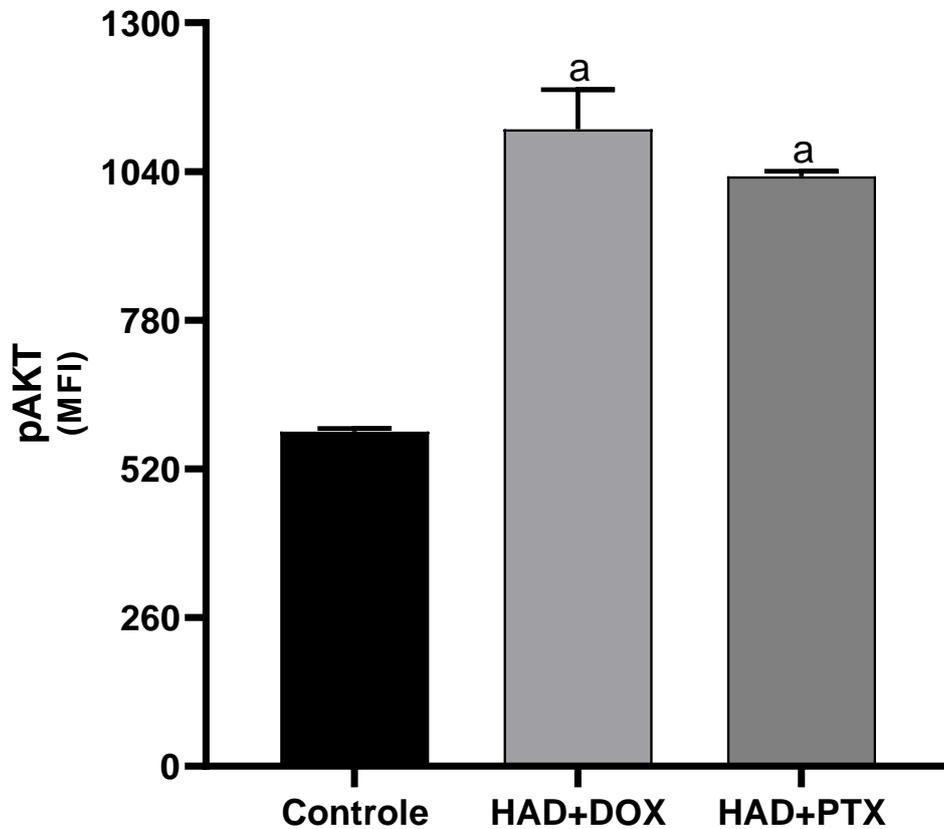
Figura 61 – Expressão de PI3K γ em células MDA-MB-231 tratadas com o sobrenadante de adipócitos (HAd) estimulados com DOX ou PTX.



Células MDA-MB-231 (3×10^4 células/ml) foram tratadas por 24 horas com o sobrenadante de adipócitos (HAd) estimulados com $0,3 \mu\text{M}$ de DOX (HAd+DOX) ou 5 nM de PTX (HAd+PTX). Após o período de tratamento as células foram fixadas para a realização da imunofluorescência. As células MDA-MB-231 tratadas com HAd+DOX ou HAd+PTX mostraram aumento da fluorescência para PI3K γ (vermelho). Adicionalmente, o grupo controle não mostrou significativa marcação para PI3K γ . Os núcleos celulares foram corados com DAPI (azul). Aumento: $200 \times$.

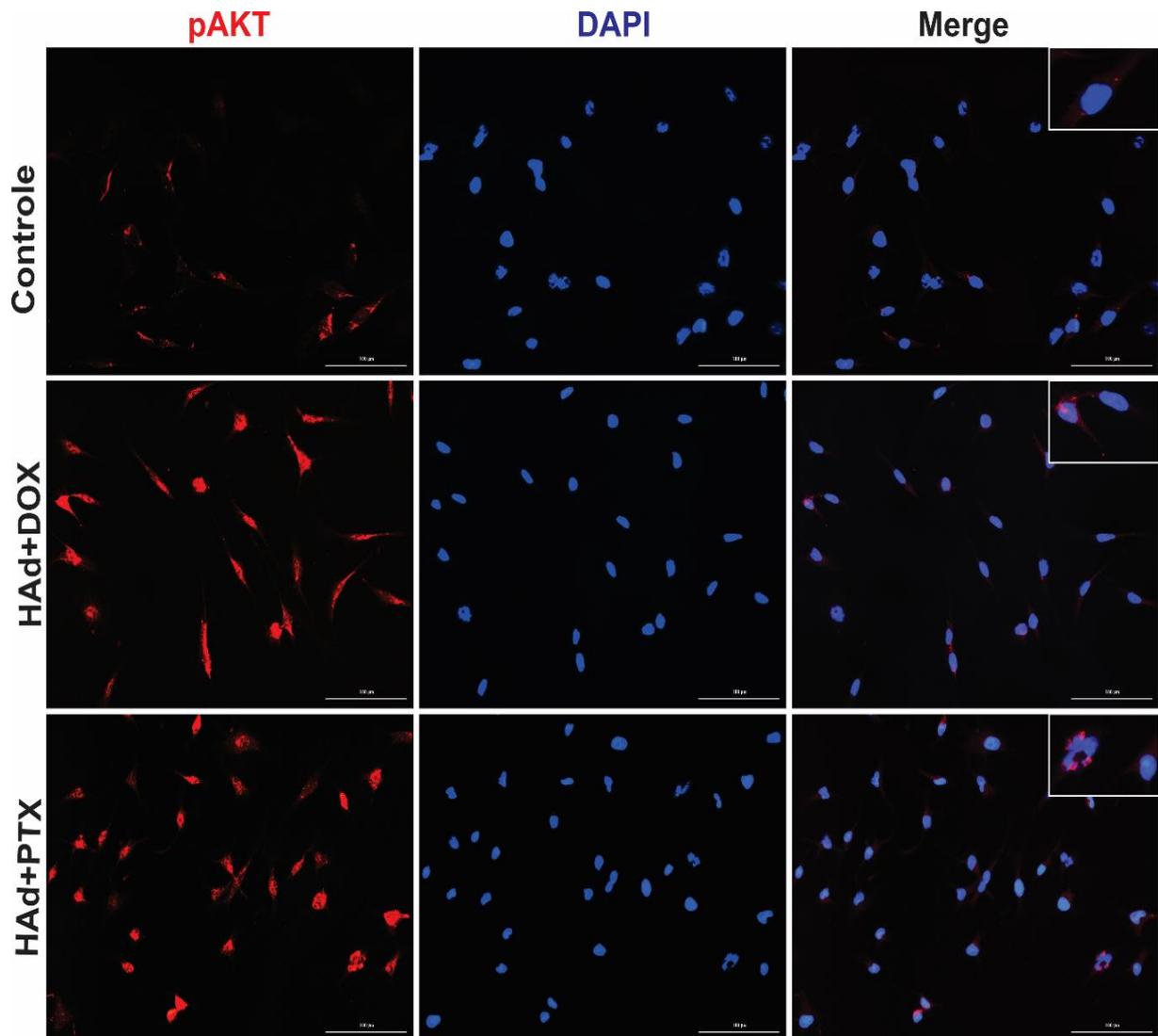
Como apresentado na **Figuras 62**, a análise quantitativa da expressão de pAKT mostrou que o tratamento de células MDA-MB-231 com o sobrenadante de HAd+DOX ou HAd+PTX aumentou a expressão de pAKT em 90% ou 76%. Resultados da análise qualitativa são apresentados na **Figura 63** onde pode ser observado um aumento da fluorescência para pAKT (vermelho).

Figura 62 – Quantificação, por citometria de fluxo, da expressão de pAKT em células MDA-MB-231 tratadas com o sobrenadante de adipócitos (HAD) estimulados com DOX ou PTX.



Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média da intensidade de fluorescência média (MFI). As células MDA-MB-231 (3×10^4 células/ml) foram tratadas por 24 horas com o sobrenadante de adipócitos (HAD) estimulados com $0,3 \mu\text{M}$ de DOX (HAD+DOX) ou 5 nM de PTX (HAD+PTX). Após o período de tratamento as células foram tripsinizadas e incubadas com os respectivos anticorpos para o posterior análise por citometria de fluxo. Células MDA-MB-231 tratadas com HAD+DOX ou HAD+PTX mostraram um aumento significativo da MFI para pAKT. ^a $p < 0,05$ vs grupo controle. A análise estatística foi realizada com o teste One-way ANOVA e pós teste de Dunnett.

Figura 63 – Expressão de pAKT em células MDA-MB-231 tratadas com o sobrenadante de adipócitos (HAd) estimulados com DOX ou PTX.



Células MDA-MB-231 (3×10^4 células/ml) foram tratadas por 24 horas com o sobrenadante de adipócitos (HAd) estimulados com $0,3 \mu\text{M}$ de DOX (HAd+DOX) ou 5 nM de PTX (HAd+PTX). Após o período de tratamento as células foram fixadas para a realização da imunofluorescência. As células MDA-MB-231 tratadas com HAd+DOX ou HAd+PTX mostraram aumento da fluorescência de pAKT (vermelho). Adicionalmente, o grupo controle não mostrou significativa marcação para pAKT. Os núcleos celulares foram corados com DAPI (azul). Aumento: $200 \times$.

A **Tabela 4** a seguir resume os achados experimentais descritos até aqui para os resultados de células MCF-7 e MDA-MB-231 estimuladas com o sobrenadante de adipócitos (HAd).

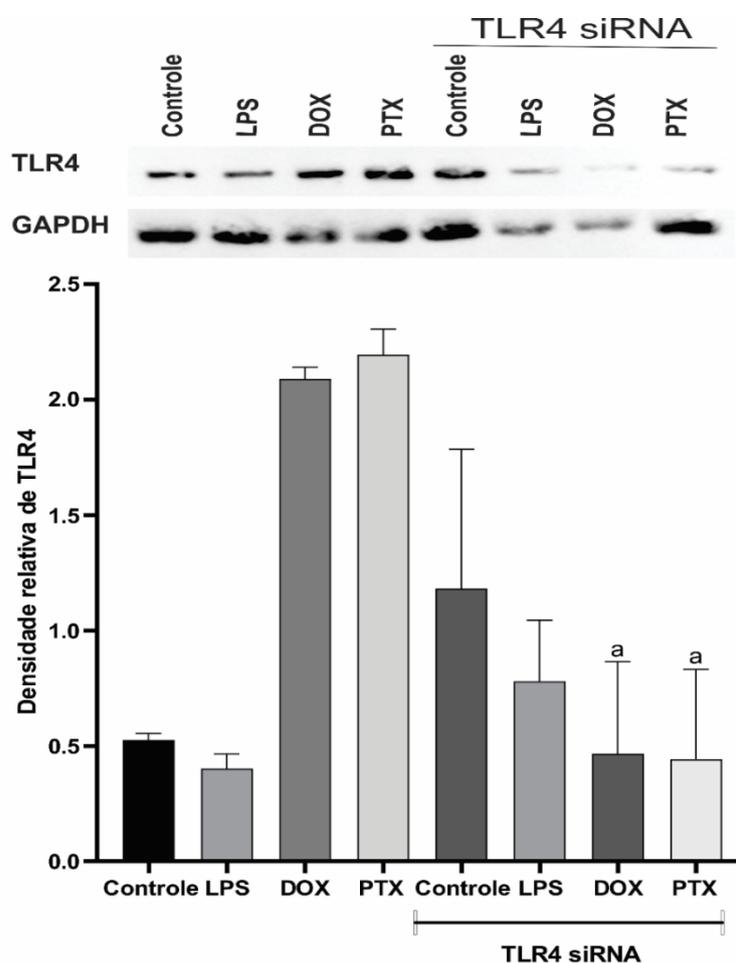
Tabela 4 – Integração dos resultados das células MCF-7 e MDA-MB-231 estimuladas com o sobrenadante de adipócitos (HAd) tratados previamente com DOX ou PTX.

MARCADORES	METODOLOGIA	MCF7 + HAd		MDA-MB-231 + HAd	
		DOX	PTX	DOX	PTX
TLR4	CITOMETRIA / IF	+	+	+	+
TLR9		+	+	+	+
PI3K δ		+	+	+	+
PI3K γ		+	+	+	+
AKT		+	+	+	+
LEPTINA	ELISA	+	+	+	+
RESISTINA		-	-	-	-
ADIPONECTINA		-	-	-	-

5.5.3. Efeito da DOX e do PTX sobre as células MCF-7 silenciadas para TLR4 (siRNA) e analisadas por Western Blotting

Na **Figura 64**, evidencia-se o resultado semiquantitativo do silenciamento de TLR4 em células MCF-7. As células MCF-7 silenciadas para TLR4 tratadas com DOX ou PTX mostraram uma diminuição significativa da densidade relativa de TLR4.

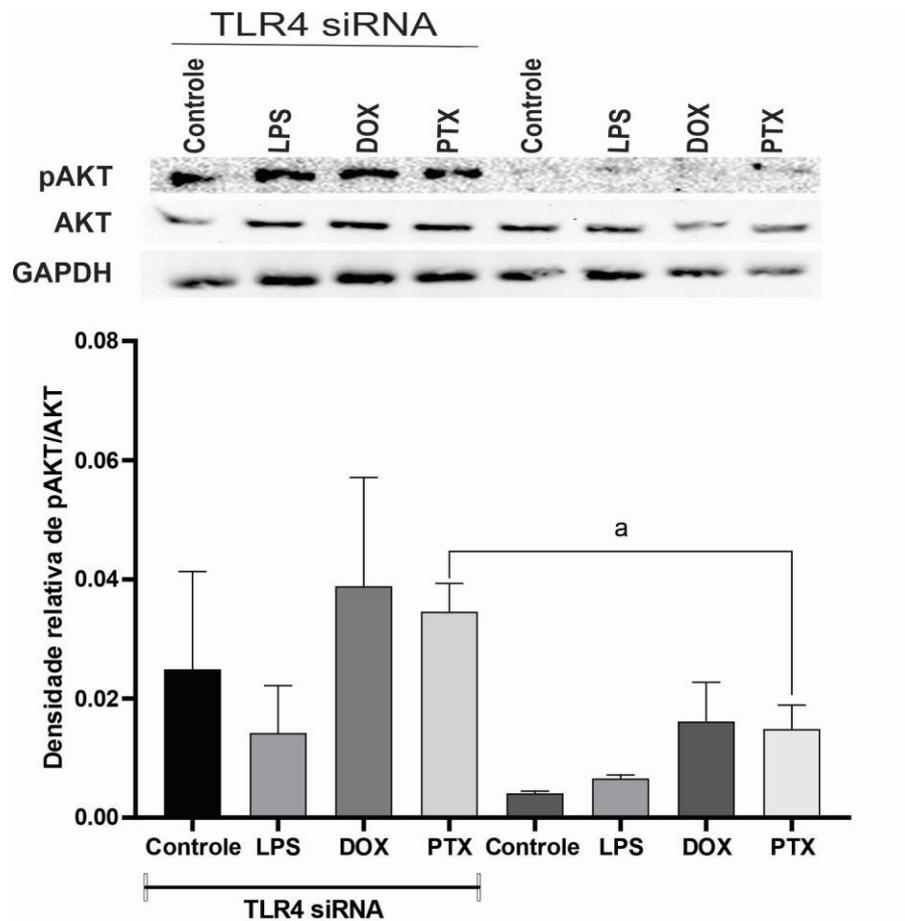
Figura 64 – Expressão de TLR4 em células MCF-7 silenciadas (TLR4 siRNA) tratadas com DOX ou PTX.



Os valores são expressos como densidade relativa de TLR4 \pm erro padrão da média. As células MCF-7 foram silenciadas para TLR4 (siRNA). Posteriormente, as células foram tratadas com 0,1 μ M de DOX ou 5 μ M de PTX. Após o período de tratamento as células foram coletadas para o posterior análise por Western Blotting. As células MCF-7 tratadas com DOX ou PTX mostraram uma diminuição significativa da densidade relativa de TLR4. ^ap<0,05 vs grupo não silenciado. A análise estatística foi realizada com o teste One-way ANOVA e pós teste de Dunnett.

Na **Figura 65** é mostrado o resultado quantitativo da expressão de pAKT por Western Blotting em células MCF-7 silenciadas geneticamente ou não para TLR4. As células MCF-7 silenciadas com TLR4 siRNA e tratadas com DOX ou PTX mostraram não mostraram uma diminuição significativo da expressão de pAKT quando comparado as células não silenciadas.

Figura 65 – Expressão de AKT e pAKT em células MCF-7 silenciadas (TLR4 siRNA) tratadas com DOX ou PTX.



Os valores são expressos como densidade relativa de pAKT/AKT \pm erro padrão da média. As células MCF-7 foram silenciadas para TLR4 (siRNA). Posteriormente, as células foram tratadas com 0,1 μ M de DOX ou 5 μ M de PTX. Após o período de tratamento as células foram coletadas para o posterior análise por Western Blotting. As células MCF-7 silenciadas e tratadas com PTX mostraram uma diferença significativa da densidade relativa de pAKT/AKT quando comparado com o resultado das células que não foram silenciadas. ^ap<0,05 vs grupo não silenciado. A análise estatística foi realizada com o teste One-way ANOVA e pós teste de Dunnett.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, foi avaliado se fármacos comumente utilizados na QTneo para o câncer de mama, quais sejam, DOX ou PTX, exercem um papel na ativação da via TLR/PI3K/AKT/Interleucinas. Avaliou-se, ainda, se os mesmos quimioterápicos teriam impacto sobre células adiposas em regular a ativação da mesma sinalização em linhagens celulares de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231). Tal condição representa a simulação de um contexto de obesidade.

Dados anteriores suportam a ideia de que a QTneo do câncer de mama favorece o aumento de taxa de disseminação de células tumorais na medula óssea em comparação com uma coorte de controle sem tratamento prévio (VOLMER *et al.*, 2022). Adicionalmente, a positividade para disseminação na medula óssea se correlaciona com recidiva em vários órgãos distantes, implicando que a disseminação de células tumorais não se restringe à medula óssea (VOLMER *et al.*, 2022).

De forma interessante, no presente estudo, verificou-se que alguns pacientes com câncer de mama tratadas com QTneo apresentaram alta expressão de receptores TLR4, mas não TLR9. Essa evidência qualitativa nos fez questionar qual seria o papel funcional da quimioterapia sobre a sinalização desses receptores. Para tanto, buscamos validar tal achado em linhagens de células de câncer de mama.

Os resultados obtidos demonstraram que os quimioterápicos utilizados têm a capacidade de ativar a expressão de TLR4, TLR9, PI3K δ , PI3K γ e pAKT nas células tumorais MCF-7 e MDA-MB-231. Além disso, os resultados de qPCR mostraram que nas células MCF-7, o PTX estimulou a expressão de *Il-6*, *Il-33*, *Il-18* e *Il-1 β* . No entanto, a DOX aumentou a expressão de *Il-18*, mas não de *Il-6*, *Il-33* nem *Il-1 β* . Do mesmo modo, nas células MDA-MB-231, o PTX aumentou a expressão de *Il-6* e *Il-33*, mas não de *Il-18* nem *Il-1 β* , Entretanto o tratamento com DOX só aumentou a expressão de *Il-6*, mas não de *Il-33*, *Il-18* nem *Il-1 β* .

Evidências sugerem que a quimioterapia citotóxica pode inibir o crescimento dos tumores primários. Contudo, paradoxalmente, pode promover a ativação de mecanismos de resistência ao tratamento ou mesmo favorecer o desenvolvimento de metástase. Nesse contexto, em um estudo clínico, Sandeep e colaboradores observaram que o TLR4 se encontrava superexpresso na maioria das amostras de pacientes com câncer de mama. Adicionalmente, em ensaios *in vitro*, o mesmo estudo evidenciou uma alta expressão de TLR4 em 68% das linhagens de câncer de mama, particularmente, MDA-MB-231 e HCC1806 (RAJPUT; VOLK-DRAPER;

RAN, 2013). Com o intuito de avaliar se o TLR4 teria contribuição para a quimiorresistência de câncer de mama ao PTX, os autores realizaram a depleção ou induziram a superexpressão de TLR4 nas linhagens celulares. De forma interessante, a depleção de TLR4 em células MDA-MB-231 reduziu a IC50 para o PTX e regulou negativamente os genes pró-sobrevivência *in vitro*, além de reduzir a recorrência tumoral *in vivo*. O oposto foi observado quando da superexpressão de TLR4. Esses achados sugerem que o bloqueio do TLR4 poderia melhorar significativamente a resposta à terapia com PTX (RAJPUT; VOLK-DRAPER; RAN, 2013).

Em um estudo pré-clínico realizado por Volk-Draper e colaboradores, foi mostrado que a ativação do TLR4 pelo paclitaxel (administrada como nab-paclitaxel, nanopartículas de PTX ligadas à albumina) aumentou consideravelmente a expressão de mediadores inflamatórios, não apenas localmente no microambiente do tumor primário, mas também sistemicamente no sangue, nos linfonodos, no baço, na medula óssea e nos pulmões. Os resultados mostraram que, após o tratamento com PTX, os níveis de proteínas IL-6 e IL-8 circulantes no sangue são significativamente aumentados no grupo TLR4 positivo (mas não no negativo) em 80 e 330 pg/ml respectivamente. Adicionalmente, foi mostrado que a expressão de *Il6* e a *Il1 β* aumenta respectivamente em 276 e 57 vezes após o tratamento com PTX (VOLK-DRAPER *et al.*, 2014). De fato, os achados do presente estudo corroboram o descrito por Volk-Draper e colaboradores e indicam que o PTX ativa o TLR4 estimulando, nas células MCF-7, a expressão de *Il-6*, *Il-33*, *Il-18* e *Il-1 β* e a expressão de *Il-6* e *Il-33* nas células MDA-MB-231. Em suma, a terapia com PTX promove a metástase do câncer de mama de maneira dependente do TLR4.

A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina com papel importante na regulação de diferentes processos fisiológicos e patológicos (doenças inflamatórias crônicas, autoimunes, infecciosas e neoplásicas). Na cascata de sinalização da IL-6, a citocina ativa seu receptor através de três vias diferentes, clássica, transsinalização ou transapresentação, posteriormente desencadeia sinalização intracelular pela via da JAK/STAT; assim, a IL-6 está intimamente relacionada com a imunidade inata e adaptativa. O transdutor de sinal da interleucina-6 (IL6ST) (gp130) é uma subunidade complexa de vários receptores (IL6-R) para a família de citocinas da IL6 (MASJEDI *et al.*, 2018).

Em um estudo feito por Mosly e colaboradores, foi estudado o potencial de transsinalização da IL-6 demonstrando que a adição de sIL6-R aumentou tanto o efeito estimulador de crescimento da IL-6 em MCF-7 quanto o efeito inibidor de crescimento em células ZR751, respectivamente mostrando que a resposta de interação da citocina IL6ST pode produzir uma resposta estimulante ou inibitória que pode depender do nível de expressão da IL6ST. O nocauteamento da IL6ST reduz significativamente a resposta ao crescimento e a sinalização

intracelular e modifica a expressão dos principais genes de sinalização celular, ciclo celular e proliferação. Adicionalmente, foi mostrado que a interleucina-6 estimula as vias STAT e ERK observando que a ativação de STAT3 e ERK aumenta pela combinação de IL-6 e sIL6-R em comparação com a IL-6 isolada (MOSLY *et al.*, 2023).

O STAT3 é um membro da família de transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STAT), que regula a transcrição de genes. Estudos demonstraram que a fosforilação do STAT3 desempenha um papel importante na promoção da proliferação celular e na inibição da apoptose no câncer de próstata (PC). Adicionalmente, é sabido que o STAT3 pode ser ativado por fosforilação em resposta a citocinas como IL5 e IL6 (CAO *et al.*, 2023)

Em suma, a IL-6 é uma citocina importante no câncer de mama e seus processos de sinalização poderiam desempenhar funções essenciais na promoção do tumor.

Na prática clínica, a resistência aos fármacos citotóxicos é um dos principais obstáculos para o sucesso da terapia anticâncer. A literatura provém consistentes relatos que a quimiorresistência pode ser promovida por substâncias liberadas de células mortas ou lesadas, ativando o programa de reparo do hospedeiro. Receptores TLR podem se constituir como reguladores mestre nesse contexto (RAN, 2015). Nesse contexto, Krysko e colaboradores demonstram que as células apoptóticas mortas pela DOX são uma fonte potencial de DAMPs que podem estimular o TLR2 e o TLR9 e induzir a inflamação aguda (KRYSKO *et al.*, 2011). Nossos resultados, de fato, indicam que o tratamento das células MCF-7 e MDA-MB-231 com DOX ativam a expressão não só de TLR9, mas também de TLR4, PI3K δ , PI3K γ e pAKT. Portanto, os TLRs além de conduzir a respostas inflamatórias, também regulariam a proliferação e o potencial de sobrevivência celular. Paradoxalmente, há estudos que apontam a que alguns compostos utilizados na quimioterapia induziriam a progressão do câncer através da ativação de alguns TLRs (RAN, 2015).

Apesar de a DOX ser amplamente utilizada como um fármaco antitumoral eficaz, a cardiotoxicidade que leva à insuficiência cardíaca é o principal fator que limita seu uso clínico. Estudos anteriores avaliaram o desenvolvimento da cardiomiopatia induzida por DOX em camundongos com deficiência de TLR4 (TLR4 $^{-/-}$), evidenciando que a deficiência de TLR4 melhora a função ventricular esquerda e atenua a cardiomiopatia induzida por DOX. Esses resultados sugerem que parte do mecanismo local mediado pela DOX tem o envolvimento de TLR4 (RIAD *et al.*, 2008). Evidências adicionais sugerem que o mecanismo de lesão cardíaca associado à doxorubicina também parece envolver receptores TLR9, visto que animais injetados com esse quimioterápico apresentam liberação de DNA mitocondrial, que por sua vez ativa TLR9 e a sinalização via PI3K γ e que a modulação farmacológica ou genética desses

intermediários reduz significativamente o dano tecidual (LI *et al.*, 2018a). É lúcido extrapolar, que tal mecanismo seja também ativo no contexto do microambiente tumoral.

Apesar dos estudos sugerirem que tanto a DOX como o PTX regularem mecanismos de sinalização celular via TLRs em linhagens celulares de câncer de mama (KASHANI *et al.*, 2019; VOLK-DRAPER *et al.*, 2014), nenhum evidenciou o envolvimento da sinalização via fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K)/Akt nesse mecanismo.

A via PI3K/Akt desempenha uma função crucial em vários processos celulares e é aberrantemente ativada em cânceres, contribuindo para a ocorrência e a progressão de tumores, regulando angiogênese, metástase, o metabolismo e desempenhando funções essenciais no microambiente tumoral, ao deflagrar mecanismos inflamatórios (HE *et al.*, 2021a). A ativação dessa via está relacionada a muitos fatores como receptores do tipo Toll (TLRs). No presente estudo, com o intuito de estudar o subtipo de PI3K que estaria sendo ativado pela DOX e o PTX, células MCF-7 e MDA-MB-231 foram tratadas com estes quimioterápicos. Curiosamente, o tratamento das células MCF-7 e MDA-MB-231 com DOX ou PTX favoreceu a expressão de PI3K δ e PI3K γ . Tais evidências sugerem que a quimioterapia baseada em DOX ou PTX pode contribuir para a ativação de mecanismos pró-sobrevivência celular.

Ruhui e colaboradores investigaram a expressão de FGFR1 (Receptor 1 do fator de crescimento de fibroblastos) e TLR4 em tecidos tumorais primários de 60 pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC) e em 3 linhagens celulares (A549, PC-9 e SK-MES-1), indicando que o nível de expressão desse receptor estava positivamente correlacionado com o nível de expressão do TLR4 em tecidos de NSCLC. Adicionalmente, foi mostrado que a sinalização PI3K/Akt é uma das vias comuns da ativação de FGFR1 e TLR4 induzindo a liberação de IL-6 e TNF- α (ZHANG *et al.*, 2019). Por outro lado, sabe-se que a fosforilação do AKT (pAKT) é capaz de regular múltiplos substratos que podem desencadear alterações metabólicas e ativar o crescimento, proliferação e sobrevivência celular. É de se salientar que o presente estudo evidenciou que o tratamento das células MCF-7 e MDA-MB-231 com DOX ou PTX favoreceu a expressão de pAKT. Nesse sentido, em conjunto, os dados sugerem que a DOX e o PTX ativam e favorecem de forma direta a expressão do TLR4 e TLR9 ativando as isoformas PI3K δ e PI3K γ e a fosforilação do AKT.

Mulheres com obesidade que desenvolvem câncer de mama têm pior prognóstico, com diminuição das taxas de sobrevivência e aumento das taxas de metástase. A obesidade também está associada à diminuição da resposta do câncer de mama aos tratamentos endócrinos e

quimioterápicos (HILLERS-ZIEMER *et al.*, 2022). Alterações na função dos adipócitos têm sido implicadas no rápido crescimento de tumores de mama no contexto da obesidade mediante a secreção de citocinas e adipocinas, como a leptina, e alteração dos níveis locais de estrogênio no microambiente tumoral mamário, o que pode explicar a resistência a múltiplas terapias (STRONG *et al.*, 2015).

A leptina é um hormônio da saciedade circulante produzido principalmente pelo tecido adiposo branco e é expressa no epitélio mamário normal. Como os níveis circulantes de leptina são elevados em indivíduos obesos e o excesso de peso corporal demonstrou aumentar o risco de câncer de mama em mulheres na pós-menopausa (CIRILLO *et al.*, 2008).

Por outro lado, o papel da leptina não é apenas metabólico, mas também imunorregulador na resposta imunológica por meio da ativação de imunócitos e da secreção de citocinas. A leptina atua em receptores que estão espalhados por todo o corpo e que são expressos em muitos tipos de tecido. Como consequência, descobriu-se que a expressão anormal da leptina está correlacionada a várias doenças, incluindo cânceres, doenças autoimunes e doenças cardiovasculares (JAEDICKE *et al.*, 2013; YUAN *et al.*, 2019). Sob outra perspectiva, sabe-se que a leptina atua como um potente estimulador da inflamação por meio da regulação da função dos macrófagos. Além disso, a leptina pode ativar o receptor de leptina, diferentes vias de sinalização, a enzima aromatase e exercer seus efeitos proliferativos sobre as células epiteliais malignas, o que pode induzir a carcinogênese do tecido mamário e promover a proliferação e a angiogênese das células do câncer de mama, além disso, foi relatado que a expressão elevada de leptina no câncer de mama está envolvida em maior grau e tamanho do tumor (GU *et al.*, 2019b; HAN *et al.*, 2008).

Alinhado a essa premissa, o presente trabalho teve o intuito de determinar se os adipócitos (HAd) estimulados com DOX ou PTX responderiam liberando adipocitocinas que poderiam favorecer a expressão de TLR4, TLR9, PI3K δ , PI3K γ e pAKT em linhagens de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231). Como evidenciado, tanto a DOX quanto o PTX favoreceram um aumento significativo das concentrações de leptina no sobrenadante dos adipócitos (HAd), sem aumento de resistina ou adiponectina. De forma interessante, o sobrenadante dos HAd previamente estimuladas com (DOX) ou (PTX) ativou a expressão de TLR4, TLR9, PI3K δ , PI3K γ e pAKT nas células tumorais MCF-7 e MDA-MB-231. Esse achado sugere que a quimioterapia tem capacidade de ativar células tumorais de forma direta e indireta.

Em um estudo que avaliou a possível função da leptina na expressão de TLR e CD14 de monócitos, foi revelado que a leptina aumenta a expressão do TLR2 na superfície celular em

THP-1 (monócitos isolados do sangue periférico de um paciente com leucemia monocítica aguda) e em monócitos humanos primários. Em contrapartida, a leptina não teve efeito sobre a expressão de TLR4 de monócitos em THP-1 ou monócitos primários (JAEDICKE *et al.*, 2013; YUAN *et al.*, 2019).

Em outro contexto, a obesidade tem sido associada à osteoartrite devido ao aumento da massa e a fatores metabólicos que são independentes da contribuição biomecânica para a carga articular. Assim, alguns estudos propõem que a leptina está associada à patogênese da osteoartrite por meio da via de sinalização JAK-STAT3. Além disso, é considerado que a leptina pode ativar a via de sinalização TLR4/TRAF6 via CD14 promovendo a secreção de citocinas inflamatórias como a IL-1 β (JIANG *et al.*, 2017). Tal mecanismo da leptina via ativação do CD14/TLR4 e sinalização JAK2-STAT3 também foi validado em outros estudos (JIANG *et al.*, 2021). Esses dados nos levam a pensar que a leptina quantificada nos sobrenadante do HAd estimulada com DOX e PTX, seria uns dos possíveis ativadores do TLR4 com a subsequente ativação de PI3K δ , PI3K γ e pAKT.

Há relatos consistentes que demonstram que a leptina é capaz de induzir o crescimento de células de câncer de mama por meio da ativação das vias Jak/STAT3, ERK1/2 e/ou PI3K, e pode mediar a angiogênese induzindo a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Por meio da ativação de vias reguladas por ErbB-2, a leptina interage em células de câncer de mama triplo-negativas promovendo a invasão e a migração das células tumorais (CIRILLO *et al.*, 2008).

Estudos sugerem através de ensaios de atividade celular que a leptina reduz a quimiossensibilidade das células tumorais de ovário (HO8910PM, OV-MZ-15, OVCAR8, ES-2, SKOV-3 e IGROV-1) ao paclitaxel/docetaxel. Parte dessa premissa é reforçada por citometria de fluxo em que células tratadas com leptina exógena apresentam reduzida proporção na fase G2/M e que a quimioterapia restabelece este perfil e fase da mitose (GU *et al.*, 2019a). Portanto, a leptina teria potencial como preditor de resistência quimioterápica e/ou como um novo alvo terapêutico em pacientes com câncer de ovário epitelial submetidas à quimioterapia com paclitaxel ou docetaxel (GU *et al.*, 2019a). Os achados do presente estudo corroboram tal observação.

Com o objetivo de confirmar se a DOX ou o PTX teriam a capacidade de ativar a via TLR4/PI3K/AKT, foi realizado o silenciamento genético do TLR4 nas células MCF-7 utilizando um RNA de interferência (siRNA TLR4). A reduzida expressão de TLR4 corroborou a eficiência do método. Ao se verificar a expressão de pAKT por western blotting, está se mostrou aumentada nas células silenciadas tratadas com DOX e PTX quando comparados às

células não silenciadas, o que parece contraditório em relação ao conceito de via de sinalização TLR4/PI3K/AKT. Contudo, dados anteriores em um modelo de mucosite intestinal experimental induzida por irinotecano indicam um aumento na expressão de TLR9 em animais deletados geneticamente para TLR4 e sob estresse da quimioterapia (WONG *et al.*, 2021). Esse dado indica que a supressão de um dado mecanismo de reconhecimento de DAMPs ou PAMPs, leva à ativação compensatória de vias paralelas de inflamação. Como TLR4 e TLR9 são descritos como ativadores de PI3K/AKT, não se pode descartar essa sinalização no contexto da resistência ao tratamento quimioterápico neoadjuvante no câncer de mama.

Devido à função da sinalização PI3K/Akt na oncogênese, vários inibidores que têm como alvo a PI3K estão sendo explorados para o tratamento de vários tipos de câncer. Assim, pan-inibidores de PI3K que tem como alvo as subunidades p110 das PI3Ks de classe IA têm sido desenvolvidos. Sabe-se que esses inibidores têm ampla atividade anticâncer (HE *et al.*, 2021b) e inibidores específicos de isoformas (alfa, delta, gama) têm ganhado interesse por apresentarem menor toxicidade fora do alvo (LI *et al.*, 2018b).

Devido à existência de três subunidades de AKT (Akt1, Akt2 e Akt3), a maioria dos inibidores atuais de AKT são pan-bloqueadores AKT, e a pesquisa e o desenvolvimento de inibidores específicos contra as três subunidades de AKT serão muito desafiadoras. Atualmente, vários inibidores de AKT estão sendo investigados em ensaios clínicos, como MK-2206, GSK-2141795, GSK-2110183, AZD5363 e GDC0068 (NUNNERY; MAYER, 2019).

Esses resultados, em conjunto, ressaltam a capacidade da DOX e o PTX de favorecer a expressão e ativação da via TLR4/PI3K δ e PI3K γ /pAKT em células MCF-7 assim como a expressão de TLR9, PI3K δ , PI3K γ e pAKT em células tumorais MCF-7 e MDA-MB-231. Outro achado importante de nossos resultados é que em um contexto de obesidade, os HAd estimuladas como DOX e PTX tem a capacidade de liberar leptina quem por sua vez teria a capacidade de favorecer a expressão de TLRs nas células tumorais MCF-7 e MDA-MB-231.

O presente trabalho apresenta algumas limitações, pois utilizamos somente DOX e PTX em ensaios *in vitro*. Outros medicamentos como ciclofosfamida ou Docetaxel podem gerar dados que elucidem ainda mais a ativação da via TLR/PI3K/AKT.

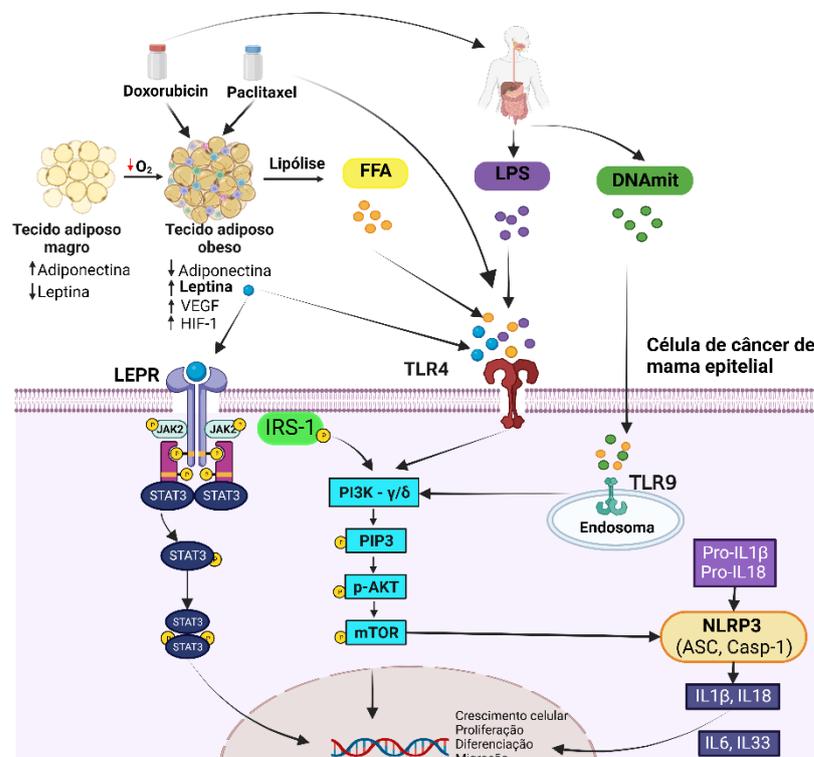
Observamos que algumas perguntas como 1) Qual será o efeito dos quimioterápicos estudados em modelos *in vitro*, 2) Será que os quimioterápicos poderiam modular mecanismo de quimioresistência? 3) ainda permanecem abertas com possibilidades de serem desenvolvidos utilizando as informações que até agora disponibilizamos.

7. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados, podemos concluir que:

- Pacientes expostas à quimioterapia neoadjuvante expressam TLR4, mas não TLR9.
- O tratamento de linhagens celulares de câncer de mama com Doxorubicina ou Paclitaxel, ativam a expressão de receptores TLR4, TLR9, PI3K δ , PI3K γ , pAKT. Por outro lado, células MCF-7 e MDA-MB-231 apresentam um padrão particularizado de expressão de citocinas pró-inflamatórias *Il6*, *Il33*, *Il18* e *Il1 β* a depender do quimioterápico ao qual são expostas.
- Os adipócitos estimulados com quimioterapia respondem liberando leptina, mas não outras adiponectinas.
- Linhagens celulares de câncer de mama respondem ao sobrenadante de adipócitos estimulados com quimioterapia expressando TLR4, TLR9, PI3K δ , PI3K γ , pAKT.
- O silenciamento genético para TLR4 não interfere na capacidade das células de ativar a fosforilação de AKT em resposta à quimioterapia.

Figura 66 – Resumo gráfico



8. ANEXOS

Anexo 1 – Termo de consentimento livre e esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
LABORATÓRIO DE FARMACOLOGIA DA INFLAMAÇÃO E DO CÂNCER (LAFICA)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE A OBESIDADE E MECANISMOS DE RESISTÊNCIA EM PACIENTES COM CARCINOMA MAMÁRIO NÃO- RESPONSIVO À TERAPIA NEOADJUVANTE

Você está sendo convidada como participante do projeto de uma pesquisa científica. Você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente todas as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar, para que todos os procedimentos dessa pesquisa sejam esclarecidos.

Este trabalho tem por objetivo investigar o impacto da presença ou não de obesidade na falha ao tratamento do câncer de mama. O tratamento é muito importante para combater as células do tumor que se originou na mama. Os remédios indicados pelo médico são a opção mais adequada para sua condição. Entretanto, pode haver falha no controle do tumor e esta pesquisa busca entender a razão dessa falha. Inicialmente, serão realizadas medidas corporais para determinar o teor de gordura e músculo em seu corpo. Para o diagnóstico do tipo de tumor que você possui, uma amostra do tumor foi retirada por biópsia como prática comum da rotina de diagnóstico. Esta pesquisa também utilizará essa mesma amostra para identificar algumas substâncias que podem explicar essa falha no tratamento. Adicionalmente, você deverá realizar exames de sangue nos dias indicados pela equipe médica que a atende. Serão coletados 10 mL de sangue antes de iniciar o tratamento, no dia do quarto ciclo e ao final do último ciclo do tratamento. Paratanto, uma veia do seu braço será acessada por um profissional treinado na coleta de sangue. Os riscos que esta pesquisa pode lhe ocasionar são de lhe causar algum constrangimento durante a avaliação nutricional ou no momento de responder algumas perguntas ou de mostrar a sua perna ou cintura para medição. Existe o risco de aparecimento de manchas roxas no local do exame de sangue, porém os riscos dos procedimentos serão reduzidos, porque serão realizados por profissionais capacitados e em locais reservados. Se a Sra aceitar participar, terá como benefício direto maior conhecimento sobre nutrição e câncer. Indiretamente, a pesquisa contribuirá futuramente para maiores informações científicas sobre quais substâncias e como estas substâncias que podem explicar falha no tratamento do câncer de mama. Durante o período de quimioterapia, você terá visitas semanais ao seu médico, quando ele fará o acompanhamento clínico quanto a sua resposta ao tratamento. Você responderá a algumas perguntas sobre seu estado de saúde. Esse questionário será aplicado pelo pesquisador até o primeiro dia de coleta de sangue. Em hipótese alguma este material poderá sofrer qualquer outra análise sem o seu conhecimento e prévia autorização. Durante a pesquisa, você poderá retirar o seu consentimento a qualquer momento. Sua identidade será mantida em sigilo, sendo a divulgação dos resultados dos exames totalmente proibida a terceiros, ficando restrita à discussão em ambiente acadêmico com propósito científico, sem qualquer possibilidade de identificação dos pacientes por outros componentes da equipe de saúde, exceto pelos responsáveis diretos por seu tratamento. A sua participação deverá ser voluntária e consciente. Você não receberá qualquer pagamento por sua participação neste

estudo. Em qualquer momento, você terá o direito de desistir da pesquisa, em qualquer fase do estudo sem necessidade de dar explicações. A eventual desistência não acarretará prejuízo ou discriminação quanto à manutenção do seu tratamento.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior que pode ser encontrado no endereço a seguir: Rua Coronel Nunes de Melo, nº 1000, NPDM-LAFICA, Universidade Federal do Ceará, telefone celular: 85-98612-2574.

ATENÇÃO: Se você tiver alguma consideração ou dúvida, sobre a sua participação na pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFC/PROPESQ – Rua Coronel Nunes de Melo, 1000 - Rodolfo Teófilo, fone: 3366- 8344/46. (Horário: 08:00-12:00 horas de segunda a sexta-feira).

O CEP/UFC/PROPESQ é a instância da Universidade Federal do Ceará responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos.

Eu, _____, _____ anos,
 RG: _____, abaixo assinado, declaro que é de livre e espontânea vontade que está como participante de uma pesquisa. Eu declaro que li cuidadosamente este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que, após sua leitura, tive a oportunidade de fazer perguntas sobre o seu conteúdo, como também sobre a pesquisa, e recebi explicações que responderam por completo minhas dúvidas. E declaro, ainda, estar recebendo uma via assinada deste termo.

Nome do participante da

pesquisa: _____ Data _____

Assinatura: _____

Nome do

pesquisador: _____ Data _____

Assinatura: _____

Nome da

testemunha: _____ Data _____

Assinatura: _____

(se o voluntário não souber ler)

Nome do profissional que aplicou o

TCLE: _____ Data _____

Assinatura _____

9. REFERÊNCIAS

ADAMS, J. L.; DUFFY, K. J.; MOORE, M. L.; YANG, J. Cancer Immunotherapy—An Emerging Field That Bridges Oncology and Immunology Research. **Comprehensive Medicinal Chemistry III**, v. 5–8, p. 357–394, 1 jan. 2017.

BARTOK, B.; HAMMAKER, D.; FIRESTEIN, G. S. Phosphoinositide 3-kinase δ regulates migration and invasion of synoviocytes in rheumatoid arthritis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 192, n. 5, p. 2063–2070, 1 mar. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24470496/>>. Acesso em: 27 maio. 2023.

BARTON, G. M. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 2, p. 413, 2 fev. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17111113/>>. Acesso em: 8 maio. 2023.

BHASKARAN, K.; DOUGLAS, I.; FORBES, H.; DOS-SANTOS-SILVA, I.; LEON, D. A.; SMEETH, L. Body-mass index and risk of 22 specific cancers: a population-based cohort study of 5.24 million UK adults. **Lancet (London, England)**, v. 384, n. 9945, p. 755–765, 30 ago. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25129328/>>. Acesso em: 7 maio. 2023.

BILANGES, B.; POSOR, Y.; VANHAESEBROECK, B. PI3K isoforms in cell signalling and vesicle trafficking. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 20, n. 9, p. 515–534, 1 set. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31110302/>>. Acesso em: 27 maio. 2023.

BUCHHOLZ, T. A.; MITTENDORF, E. A.; HUNT, K. K. Surgical Considerations After Neoadjuvant Chemotherapy: Breast Conservation Therapy. **Journal of the National Cancer Institute. Monographs**, v. 2015, n. 51, p. 11–14, 1 maio 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26063878/>>. Acesso em: 31 maio. 2023.

CAO, H.; WANG, D.; GAO, R.; CHEN, L.; FENG, Y.; SUN, P. Zhoushi Qi Ling decoction inhibits the progression of castration-resistant prostate cancer in vivo by regulating macrophage infiltration via IL6-STAT3 signaling. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, 7 jun. 2023.

CAO, Y. Adipocyte and lipid metabolism in cancer drug resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 129, n. 8, p. 3006, 7 jul. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31110302/>>. Acesso em: 3 jun. 2023.

Cell line profile MCF7. Disponível em: <<https://www.culturecollections.org.uk/media/130237/mcf7-cell-line-profile.pdf>>. Acesso

em: 25 jun. 2023.

Cell line profile MDA-MB-231. Disponível em: <https://www.culturecollections.org.uk/media/133182/mda-mb-231-cell-line-profile.pdf>.

Acesso em: 25 jun. 2023.

CHARFARE, H.; LIMONGELLI, S.; PURUSHOTHAM, A. D. Neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. **The British journal of surgery**, v. 92, n. 1, p. 14–23, jan. 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15635596/>. Acesso em: 31 maio. 2023.

CHEN, W.; LIU, I.; TOMIYASU, H.; LEE, J.; CHENG, C.; LIAO, A. T.; LIU, B.; LIU, C.; LIN, C. Imatinib enhances the anti-tumour effect of doxorubicin in canine B-cell lymphoma cell line. **Veterinary journal (London, England : 1997)**, v. 254, 1 dez. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31836165/>. Acesso em: 31 maio. 2023.

CIRILLO, D.; RACHIGLIO, A. M.; LA MONTAGNA, R.; GIORDANO, A.; NORMANNO, N. Leptin signaling in breast cancer: An overview. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 105, n. 4, p. 956–964, 1 nov. 2008. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jcb.21911>. Acesso em: 30 jun. 2023.

CLINICALTRIALS.GOV. **Study of the Safety and Pharmacology of GDC-0980 in Combination With Paclitaxel With or Without Bevacizumab in Patients With Locally Recurrent or Metastatic Breast Cancer - Full Text View - ClinicalTrials.gov.** Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01254526>. Acesso em: 2 jun. 2023.

COLDITZ, G. A.; LINDSAY, L. Obesity and Cancer: Evidence, Impact, and Future Directions. **Clinical chemistry**, v. 64, n. 1, p. 154–162, 1 jan. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29038151/>. Acesso em: 24 jul. 2022.

CORREA GEYER, F.; REIS-FILHO, J. S. Microarray-based gene expression profiling as a clinical tool for breast cancer management: are we there yet? **International journal of surgical pathology**, v. 17, n. 4, p. 285–302, ago. 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19103611/>. Acesso em: 17 maio. 2023.

DAN COSTA, S.; LOIBL, S.; KAUFMANN, M.; ZAHM, D. M.; HILFRICH, J.; HUOBER, J.; EIDTMANN, H.; DU BOIS, A.; BLOHMER, J. U.; ATASEVEN, B.; WEISS, E.; TESCH, H.; GERBER, B.; BAUMANN, K. H.; THOMSEN, C.; BREITBACH, G. P.; IBISHI, S.; JACKISCH, C.; MEHTA, K.; VON MINCKWITZ, G. Neoadjuvant chemotherapy shows similar response in patients with inflammatory or locally advanced breast cancer when compared with operable breast cancer: a secondary analysis of the GeparTrio trial data. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 28, n. 1, p. 83–91, 1 jan. 2010.

DI LORENZO, A.; BOLLI, E.; RUIU, R.; FERRAUTO, G.; DI GREGORIO, E.; AVALLE, L.; SAVINO, A.; POGGIO, P.; MERIGHI, I. F.; RICCARDO, F.; BRANCACCIO, M.; QUAGLINO, E.; CAVALLO, F.; CONTI, L. Toll-like receptor 2 promotes breast cancer progression and resistance to chemotherapy. **Oncoimmunology**, v. 11, n. 1, 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35756841/>>. Acesso em: 27 nov. 2023.

DOMIN, J.; WATERFIELD, M. D. Using structure to define the function of phosphoinositide 3-kinase family members. **FEBS letters**, v. 410, n. 1, p. 91–95, 23 jun. 1997. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9247130/>>. Acesso em: 27 maio. 2023.

EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. **Lancet (London, England)**, v. 365, n. 9472, p. 1687–1717, 14 maio 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15894097/>>. Acesso em: 31 jul. 2021.

EICKHOLT, B. J.; AHMED, A. I.; DAVIES, M.; PAPAKONSTANTI, E. A.; PEARCE, W.; STARKEY, M. L.; BILANCIO, A.; NEED, A. C.; SMITH, A. J. H.; HALL, S. M.; HAMERS, F. P.; GIESE, K. P.; BRADBURY, E. J.; VANHAESEBROECK, B. Control of Axonal Growth and Regeneration of Sensory Neurons by the p110 δ PI 3-Kinase. **PLOS ONE**, v. 2, n. 9, p. e869, 12 set. 2007. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0000869>>. Acesso em: 27 maio. 2023.

ELGOHARY, S.; EL TAYEBI, H. M. Inflammasomes in breast cancer: the ignition spark of progression and resistance? **Expert reviews in molecular medicine**, v. 25, 20 jun. 2023. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37337426/>>. Acesso em: 27 nov. 2023.

FISHER, B.; REDMOND, C. K.; FISHER, E. R. Evolution of knowledge related to breast cancer heterogeneity: a 25-year retrospective. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 26, n. 13, p. 2068–2071, 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18445835/>>. Acesso em: 17 maio. 2023.

FRAGOMENI, S. M.; SCIAL LIS, A.; JERUSS, J. S. Molecular Subtypes and Local-Regional Control of Breast Cancer. **Surgical oncology clinics of North America**, v. 27, n. 1, p. 95–120, 1 jan. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29132568/>>. Acesso em: 24 jul. 2022.

GAMBARDELLA, G.; VISCIDO, G.; TUMAINI, B.; ISACCHI, A.; BOSOTTI, R.; DI BERNARDO, D. A single-cell analysis of breast cancer cell lines to study tumour heterogeneity and drug response. **Nature communications**, v. 13, n. 1, 1 dez. 2022. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35361816/>>. Acesso em: 26 nov. 2023.

GARCIA-MARTINEZ, L.; ZHANG, Y.; NAKATA, Y.; CHAN, H. L.; MOREY, L. Epigenetic mechanisms in breast cancer therapy and resistance. **Nature Communications** 2021 **12:1**, v. 12, n. 1, p. 1–14, 19 mar. 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41467-021-22024-3>>. Acesso em: 27 nov. 2023.

GLOBOCAN. **Cancer Today**. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2020&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&group_cancer=1&include_nmsc=0&include_nmsc_other=1&type_multiple=%257B%2522inc%2522%253Atrue%252C%2522mort%2522%253Afalse%252C%2522prev%2522%253Afalse%257D&orientation=horizontal&type_sort=0&type_nb_items=%257B%2522top%2522%253Atrue%252C%2522bottom%2522%253Afalse%257D>. Acesso em: 24 jul. 2022.

GOULIELMAKI, E.; BERMUDEZ-BRITO, M.; ANDREOU, M.; TZENAKI, N.; TZARDI, M.; DE BREE, E.; TSENTELIEROU, E.; MAKRIGIANNAKIS, A.; PAPAKONSTANTI, E. A. Pharmacological inactivation of the PI3K p110 δ prevents breast tumour progression by targeting cancer cells and macrophages. **Cell Death & Disease**, v. 9, n. 6, 1 jun. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32296634/>>. Acesso em: 27 maio. 2023.

GOZZELINO, L.; DE SANTIS, M. C.; GULLUNI, F.; HIRSCH, E.; MARTINI, M. PI(3,4)P2 Signaling in Cancer and Metabolism. **Frontiers in oncology**, v. 10, 31 mar. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32296634/>>. Acesso em: 24 jul. 2022.

GREEN, T. L.; SANTOS, M. F.; EJAEIDI, A. A.; CRAFT, B. S.; LEWIS, R. E.; CRUSE, J. M. Toll-like receptor (TLR) expression of immune system cells from metastatic breast cancer patients with circulating tumor cells. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 97, n. 1, p. 44–48, 1 ago. 2014.

GU, F.; ZHANG, H.; YAO, L.; JIANG, S.; LU, H.; XING, X.; ZHANG, C.; JIANG, P.; ZHANG, R. Leptin contributes to the taxol chemoresistance in epithelial ovarian cancer. **Oncology Letters**, v. 18, n. 1, p. 561–570, 1 jul. 2019a. Disponível em: <<http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2019.10381/abstract>>. Acesso em: 1 jul. 2023.

GU, L.; WANG, C. Di; CAO, C.; CAI, L. R.; LI, D. H.; ZHENG, Y. Z. Association of serum leptin with breast cancer: A meta-analysis. **Medicine**, v. 98, n. 5, 2019b. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32296634/>>. Acesso em: 1 jul. 2023.

HAN, C. Z.; DU, L. L.; JING, J. X.; ZHAO, X. W.; TIAN, F. G.; SHI, J.; TIAN, B. G.; LIU,

- X. Y.; ZHANG, L. J. Associations among lipids, leptin, and leptin receptor gene Gin223Arg polymorphisms and breast cancer in China. **Biological trace element research**, v. 126, n. 1–3, p. 38–48, dez. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18668212/>>. Acesso em: 1 jul. 2023.
- HE, Y.; SUN, M. M.; ZHANG, G. G.; YANG, J.; CHEN, K. S.; XU, W. W.; LI, B. Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy. **Signal Transduction and Targeted Therapy** **2021** **6:1**, v. 6, n. 1, p. 1–17, 16 dez. 2021a. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41392-021-00828-5>>. Acesso em: 30 jun. 2023.
- HE, Y.; SUN, M. M.; ZHANG, G. G.; YANG, J.; CHEN, K. S.; XU, W. W.; LI, B. Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy. **Signal Transduction and Targeted Therapy** **2021** **6:1**, v. 6, n. 1, p. 1–17, 16 dez. 2021b. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41392-021-00828-5>>. Acesso em: 1 jul. 2023.
- HILLERS-ZIEMER, L. E.; KUZIEL, G.; WILLIAMS, A. E.; MOORE, B. N.; ARENDT, L. M. Breast cancer microenvironment and obesity: challenges for therapy. **Cancer metastasis reviews**, v. 41, n. 3, p. 627–647, 1 set. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35435599/>>. Acesso em: 27 nov. 2023.
- HOSSAIN, F. M.; DANOS, D. M.; FU, Q.; WANG, X.; SCRIBNER, R. A.; CHU, S. T.; HORSWELL, R. L.; PRICE-HAYWOOD, E. G.; COLLINS-BUROW, B. M.; WU, X. C.; OCHOA, A. C.; MIELE, L. Association of Obesity and Diabetes With the Incidence of Breast Cancer in Louisiana. **American Journal of Preventive Medicine**, v. 63, n. 1, p. S83–S92, 1 jul. 2022.
- JAEDICKE, K. M.; ROYTHORNE, A.; PADGET, K.; TODRYK, S.; PRESHAW, P. M.; TAYLOR, J. J. Leptin up-regulates TLR2 in human monocytes. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 93, n. 4, p. 561–571, 1 abr. 2013. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1189/jlb.1211606>>. Acesso em: 30 jun. 2023.
- JIANG, M.; HE, J.; SUN, Y.; DONG, X.; YAO, J.; GU, H.; LIU, L. Leptin Induced TLR4 Expression via the JAK2-STAT3 Pathway in Obesity-Related Osteoarthritis. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2021, 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34457118/>>. Acesso em: 25 jun. 2023.
- JIANG, M.; LI, X.; YU, X.; LIU, X.; XU, X.; HE, J.; GU, H.; LIU, L. Oral Administration of Resveratrol Alleviates Osteoarthritis Pathology in C57BL/6J Mice Model Induced by a High-Fat Diet. **Mediators of Inflammation**, v. 2017, 2017.
- KASHANI, B.; ZANDI, Z.; KARIMZADEH, M. R.; BASHASH, D.; NASROLLAHZADEH, A.; GHAFARI, S. H. Blockade of TLR4 using TAK-242 (resatorvid) enhances anti-cancer

effects of chemotherapeutic agents: a novel synergistic approach for breast and ovarian cancers. **Immunologic Research**, v. 67, n. 6, p. 505–516, 1 dez. 2019. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s12026-019-09113-8>>. Acesso em: 27 nov. 2023.

KHODABANDEH, Z.; VALILO, M.; VELAEI, K.; PIRPOUR TAZEHKAND, A. The potential role of nicotine in breast cancer initiation, development, angiogenesis, invasion, metastasis, and resistance to therapy. **Breast cancer (Tokyo, Japan)**, v. 29, n. 5, p. 778–789, 1 set. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35583594/>>. Acesso em: 27 nov. 2023.

KO, E.; SEO, H. W.; JUNG, E. S.; JU, S.; KIM, B. hui; CHO, H.; KIM, Y. J.; PARK, Y. M.; KIM, J. S.; JUNG, G. PI3K δ Is a Therapeutic Target in Hepatocellular Carcinoma. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 68, n. 6, p. 2285–2300, 1 dez. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30300952/>>. Acesso em: 27 maio. 2023.

KRYSKO, D. V.; KACZMAREK, A.; KRYSKO, O.; HEYNDRICKX, L.; WOZNICKI, J.; BOGAERT, P.; CAUWELS, A.; TAKAHASHI, N.; MAGEZ, S.; BACHERT, C.; VANDENABEELE, P. TLR-2 and TLR-9 are sensors of apoptosis in a mouse model of doxorubicin-induced acute inflammation. **Cell Death & Differentiation**, v. 18, n. 8, p. 1316–1325, 11 fev. 2011. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/cdd20114>>. Acesso em: 1 jun. 2023.

KUMAR, V.; BARRETT, J. E. Toll-Like Receptors (TLRs) in Health and Disease: An Overview. **Handbook of experimental pharmacology**, v. 276, p. 1–21, 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35091824/>>. Acesso em: 3 maio. 2023.

LAW, A. J.; WANG, Y.; SEI, Y.; O'DONNELL, P.; PIANTADOSI, P.; PAPALEO, F.; STRAUB, R. E.; HUANG, W.; THOMAS, C. J.; VAKKALANKA, R.; BESTERMAN, A. D.; LIPSKA, B. K.; HYDE, T. M.; HARRISON, P. J.; KLEINMAN, J. E.; WEINBERGER, D. R. Neuregulin 1-ErbB4-PI3K signaling in schizophrenia and phosphoinositide 3-kinase-p110 δ inhibition as a potential therapeutic strategy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 30, p. 12165–12170, 24 jul. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22811111/>>. Acesso em: 27 maio. 2023.

LI, M.; SALA, V.; DE SANTIS, M. C.; CIMINO, J.; CAPPELLO, P.; PIANCA, N.; DI BONA, A.; MARGARIA, J. P.; MARTINI, M.; LAZZARINI, E.; PIROZZI, F.; ROSSI, L.; FRANCO, I.; BORNBAUM, J.; HEGER, J.; ROHRBACH, S.; PERINO, A.; TOCCHETTI, C. G.; LIMA, B. H. F.; TEIXEIRA, M. M.; PORPO-RATO, P. E.; SCHULZ, R.; ANGELINI, A.; SANDRI, M.; AMERI, P.; SCIARRETTA, S.; LIMA-JÚNIOR, R. C. P.; MONGILLO, M.; ZAGLIA, T.; MORELLO, F.; NOVELLI, F.; HIRSCH, E.; GHIGO, A. Phosphoinositide 3-Kinase Gamma

Inhibition Protects From Anthracycline Cardiotoxicity and Reduces Tumor Growth. **Circulation**, v. 138, n. 7, p. 696–711, 2018a. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29348263/>>. Acesso em: 24 jul. 2022.

LI, M.; SALA, V.; DE SANTIS, M. C.; CIMINO, J.; CAPPELLO, P.; PIANCA, N.; DI BONA, A.; MARGARIA, J. P.; MARTINI, M.; LAZZARINI, E.; PIROZZI, F.; ROSSI, L.; FRANCO, I.; BORNBAUM, J.; HEGER, J.; ROHRBACH, S.; PERINO, A.; TOCCHETTI, C. G.; LIMA, B. H. F.; TEIXEIRA, M. M.; PORPO-RATO, P. E.; SCHULZ, R.; ANGELINI, A.; SANDRI, M.; AMERI, P.; SCIARRETTA, S.; LIMA-JÚNIOR, R. C. P.; MONGILLO, M.; ZAGLIA, T.; MORELLO, F.; NOVELLI, F.; HIRSCH, E.; GHIGO, A. Phosphoinositide 3-Kinase Gamma Inhibition Protects From Anthracycline Cardiotoxicity and Reduces Tumor Growth. **Circulation**, v. 138, n. 7, p. 696–711, 2018b. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29348263/>>. Acesso em: 1 jul. 2023.

LI, S.; ZHANG, Y.; ZHANG, P.; XUE, S.; CHEN, Y.; SUN, L.; YANG, R. Predictive and prognostic values of tumor infiltrating lymphocytes in breast cancers treated with neoadjuvant chemotherapy: A meta-analysis. **The Breast**, v. 66, p. 97–109, 1 dez. 2022.

LI, X.; JIANG, S.; TAPPING, R. I. Toll-like receptor signaling in cell proliferation and survival. **Cytokine**, v. 49, n. 1, p. 1–9, 1 jan. 2010.

LITAK, J.; GROCHOWSKI, C.; LITAK, J.; OSUCHOWSKA, I.; GOSIK, K.; RADZIKOWSKA, E.; KAMIENIAK, P.; ROLINSKI, J. TLR-4 Signaling vs. Immune Checkpoints, miRNAs Molecules, Cancer Stem Cells, and Wntless-Signaling Interplay in Glioblastoma Multiforme-Future Perspectives. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 9, 1 maio 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32354122/>>. Acesso em: 3 maio. 2023.

LOIBL, S.; GIANNI, L. HER2-positive breast cancer. **Lancet (London, England)**, v. 389, n. 10087, p. 2415–2429, 17 jun. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27939064/>>. Acesso em: 17 maio. 2023.

MASJEDI, A.; HASHEMI, V.; HOJJAT-FARSANGI, M.; GHALAMFARSA, G.; AZIZI, G.; YOUSEFI, M.; JADIDI-NIARAGH, F. The significant role of interleukin-6 and its signaling pathway in the immunopathogenesis and treatment of breast cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 108, p. 1415–1424, 1 dez. 2018.

MATZ, K. M.; GUZMAN, R. M.; GOODMAN, A. G. The Role of Nucleic Acid Sensing in Controlling Microbial and Autoimmune Disorders. **International Review of Cell and Molecular Biology**, v. 345, p. 35–136, 1 jan. 2019.

MAYER, I. A.; PRAT, A.; EGGLE, D.; BLAU, S.; PEREZ FIDALGO, A. J.; GNANT, M.;

FASCHING, P. A.; COLLEONI, M.; WOLFF, A. C.; WINER, E. P.; SINGER, C. F.; HURVITZ, S.; ESTEVEZ, L. G.; VAN DAM, P. A.; KUMMEL, S.; MUNDHENKE, C.; HOLMES, F.; BABBAR, N.; CHARBONNIER, L.; DIAZ-PADILLA, I.; VOGL, F. D.; SELLAMI, D.; ARTEAGA, C. L. A Phase II Randomized Study of Neoadjuvant Letrozole Plus Alpelisib for Hormone Receptor-Positive, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Negative Breast Cancer (NEO-ORB). **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 25, n. 10, p. 2975–2987, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30723140/>>. Acesso em: 2 jun. 2023.

MCF7 - HTB-22 | ATCC. Disponível em: <<https://www.atcc.org/products/htb-22>>. Acesso em: 25 jun. 2023.

MDA-MB-231 - HTB-26 | ATCC. Disponível em: <<https://www.atcc.org/products/htb-26>>. Acesso em: 25 jun. 2023.

MISHRA, R.; PATEL, H.; ALANAZI, S.; KILROY, M. K.; GARRETT, J. T. PI3K Inhibitors in Cancer: Clinical Implications and Adverse Effects. **International Journal of Molecular Sciences** 2021, Vol. 22, Page 3464, v. 22, n. 7, p. 3464, 27 mar. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/22/7/3464/htm>>. Acesso em: 2 jun. 2023.

MOSLY, D.; MACLEOD, K.; MOIR, N.; TURNBULL, A.; SIMS, A. H.; LANGDON, S. P. Variation in IL6ST cytokine family function and the potential of IL6 trans-signalling in ER α positive breast cancer cells. **Cellular Signalling**, v. 103, p. 110563, 1 mar. 2023.

NATIONAL INSTITUTE OF DIABETES AND DIGESTIVE AND KIDNEY DISEASES. Taxanes. **LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury**, 7 set. 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548797/>>. Acesso em: 31 maio. 2023.

NUNNERY, S. E.; MAYER, I. A. Management of toxicity to isoform α -specific PI3K inhibitors. **Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology**, v. 30 Suppl 10, n. Suppl_10, p. x21–x26, 1 dez. 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31928691>>. Acesso em: 1 jul. 2023.

O'SHAUGHNESSY, J.; GRADISHAR, W.; O'REGAN, R.; GADI, V. Risk of Recurrence in Patients With HER2+ Early-Stage Breast Cancer: Literature Analysis of Patient and Disease Characteristics. **Clinical Breast Cancer**, 22 mar. 2023.

ORELLANA, E.; KASINSKI, A. Sulforhodamine B (SRB) Assay in Cell Culture to Investigate Cell Proliferation. **BIO-PROTOCOL**, v. 6, n. 21, 2016.

PATHAK, M.; DWIVEDI, S. N.; DEO, S. V. S.; THAKUR, B.; SREENIVAS, V.; RATH, G. K. Neoadjuvant chemotherapy regimens in treatment of breast cancer: a systematic review and

network meta-analysis protocol. **Systematic Reviews**, v. 7, n. 1, 26 jun. 2018. Disponível em: </pmc/articles/PMC6020442/>. Acesso em: 31 maio. 2023.

PAVITRA, E.; KANCHARLA, J.; GUPTA, V. K.; PRASAD, K.; SUNG, J. Y.; KIM, J.; TEJ, M. B.; CHOI, R.; LEE, J. H.; HAN, Y. K.; RAJU, G. S. R.; BHASKAR, L. V. K. S.; HUH, Y. S. The role of NF- κ B in breast cancer initiation, growth, metastasis, and resistance to chemotherapy. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 163, p. 114822, 1 jul. 2023.

PICÓ, C.; PALOU, M.; POMAR, C. A.; RODRÍGUEZ, A. M.; PALOU, A. Leptin as a key regulator of the adipose organ. **Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders**, v. 23, n. 1, p. 13, 1 fev. 2022. Disponível em: </pmc/articles/PMC8873071/>. Acesso em: 25 jun. 2023.

QURESHI, R.; PICON-RUIZ, M.; AURREKOETXEA-RODRIGUEZ, I.; NUNES DE PAIVA, V.; D'AMICO, M.; YOON, H.; RADHAKRISHNAN, R.; MORATA-TARIFA, C.; INCE, T.; LIPPMAN, M. E.; THALLER, S. R.; RODGERS, S. E.; KESMODEL, S.; VIVANCO, M. del M.; SLINGERLAND, J. M. The Major Pre- and Postmenopausal Estrogens Play Opposing Roles in Obesity-Driven Mammary Inflammation and Breast Cancer Development. **Cell metabolism**, v. 31, n. 6, p. 1154- 1172.e9, 2 jun. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32492394/>. Acesso em: 7 maio. 2023.

RAJPUT, S.; VOLK-DRAPER, L. D.; RAN, S. TLR4 is a novel determinant of the response to paclitaxel in breast cancer. **Molecular cancer therapeutics**, v. 12, n. 8, p. 1676–1687, ago. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23720768/>. Acesso em: 1 jun. 2023.

RAN, S. The role of TLR4 in chemotherapy-driven metastasis. **Cancer research**, v. 75, n. 12, p. 2405, 6 jun. 2015. Disponível em: </pmc/articles/PMC4470764/>. Acesso em: 29 jun. 2023.

RAYNER, D. M.; CUTTS, S. M. Anthracyclines. **Side Effects of Drugs Annual**, v. 36, p. 683–694, 30 jan. 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538187/>. Acesso em: 31 maio. 2023.

RIAD, A.; BIEN, S.; GRATZ, M.; ESCHER, F.; WESTERMANN, D.; HEIMESAAT, M. M.; BERESWILL, S.; KRIEG, T.; FELIX, S. B.; SCHULTHEISS, H. P.; KROEMER, H. K.; TSCHÖPE, C. Toll-like receptor-4 deficiency attenuates doxorubicin-induced cardiomyopathy in mice. **European journal of heart failure**, v. 10, n. 3, p. 233–243, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18321777/>. Acesso em: 29 jun. 2023.

RUSSNES, H. G.; LINGJÆRDE, O. C.; BØRRESEN-DALE, A. L.; CALDAS, C. Breast Cancer Molecular Stratification: From Intrinsic Subtypes to Integrative Clusters. **The American Journal of Pathology**, v. 187, n. 10, p. 2152–2162, 1 out. 2017.

SAVVA, C.; COPSON, E.; JOHNSON, P. W. M.; CUTRESS, R. I.; BEERS, S. A. Obesity Is Associated with Immunometabolic Changes in Adipose Tissue That May Drive Treatment

Resistance in Breast Cancer: Immune-Metabolic Reprogramming and Novel Therapeutic Strategies. **Cancers**, v. 15, n. 9, 1 maio 2023. Disponível em: </pmc/articles/PMC10177091/>. Acesso em: 27 nov. 2023.

SAWYER, C.; STURGE, J.; BENNETT, D.; O'HARE, M.; ALLEN, W. E.; BAIN, J.; JONES, G. E.; VANHAESEBROECK, B. Regulation of breast cancer cell chemotaxis by the phosphoinositide 3-kinase p110delta . **Cancer Res.**, v. 7, p. 1667–1675, 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12670921/>. Acesso em: 27 maio. 2023.

SCHOTT, A. F.; HAYES, D. F. Defining the benefits of neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 30, n. 15, p. 1747–1749, 20 maio 2012.

SELVES, J.; LONG-MIRA, E.; MATHIEU, M. C.; ROCHAIX, P.; ILIÉ, M. Immunohistochemistry for Diagnosis of Metastatic Carcinomas of Unknown Primary Site. **Cancers**, v. 10, n. 4, 1 abr. 2018. Disponível em: </pmc/articles/PMC5923363/>. Acesso em: 17 maio. 2023.

SHI, H.; KOKOEVA, M. V.; INOUE, K.; TZAMELI, I.; YIN, H.; FLIER, J. S. TLR4 links innate immunity and fatty acid–induced insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 11, p. 3015, 11 nov. 2006. Disponível em: </pmc/articles/PMC1616196/>. Acesso em: 9 maio. 2023.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; FUCHS, H. E.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2021. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 1, p. 7–33, 1 jan. 2021. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21654>. Acesso em: 17 maio. 2023.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; SANDEEP WAGLE, N.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2023. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 73, n. 1, p. 17–48, 1 jan. 2023. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21763>. Acesso em: 3 maio. 2023.

SONG, Z.; WANG, J.; SU, Q.; LUAN, M.; CHEN, X.; XU, X. A função da MMP-2 e MMP-9 na metástase e no desenvolvimento de carcinoma hipofaríngeo. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 87, n. 5, p. 521–528, 1 set. 2021. Disponível em: <http://www.bjorl.org//pt-a-funcao-da-mmp2-e-articulo-S2530053921001127>. Acesso em: 2 jun. 2023.

SØRLIE, T.; PEROU, C. M.; TIBSHIRANI, R.; AAS, T.; GEISLER, S.; JOHNSEN, H.; HASTIE, T.; EISEN, M. B.; VAN DE RIJN, M.; JEFFREY, S. S.; THORSEN, T.; QUIST, H.; MATESE, J. C.; BROWN, P. O.; BOTSTEIN, D.; LØNNING, P. E.; BØRRESEN-DALE, A. L. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 19, p. 10869–10874, 11 set. 2001. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11553815/>>. Acesso em: 17 maio. 2023.

SOTIRIOU, C.; WIRAPATI, P.; LOI, S.; HARRIS, A.; FOX, S.; SMEDS, J.; NORDGREN, H.; FARMER, P.; PRAZ, V.; HAIBE-KAINS, B.; DESMEDT, C.; LARSIMONT, D.; CARDOSO, F.; PETERSE, H.; NUYTEN, D.; BUYSE, M.; VAN DE VIJVER, M. J.; BERGH, J.; PICCART, M.; DELORENZI, M. Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 98, n. 4, p. 262–272, 15 fev. 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16478745/>>. Acesso em: 17 maio. 2023.

STRONG, A. L.; OHLSTEIN, J. F.; BIAGAS, B. A.; RHODES, L. V.; PEI, D. T.; TUCKER, H. A.; LLAMAS, C.; BOWLES, A. C.; DUTREIL, M. F.; ZHANG, S.; GIMBLE, J. M.; BUROW, M. E.; BUNNELL, B. A. Leptin produced by obese adipose stromal/stem cells enhances proliferation and metastasis of estrogen receptor positive breast cancers. **Breast cancer research : BCR**, v. 17, n. 1, 19 ago. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26286584/>>. Acesso em: 27 nov. 2023.

SWAMY, M. K.; PULLAIAH, T.; CHEN, Z.-S. **Paclitaxel : sources, chemistry, anticancer actions and current Biotechnology**. 1st. ed. [s.l: s.n.]

TREJO-DE LA O, A.; HERNÁNDEZ-SANCÉN, P.; MALDONADO-BERNAL, C. Relevance of single-nucleotide polymorphisms in human TLR genes to infectious and inflammatory diseases and cancer. **Genes & Immunity** 2014 15:4, v. 15, n. 4, p. 199–209, 13 mar. 2014. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/gene201410>>. Acesso em: 3 maio. 2023.

TREVELLIN, E.; BETTINI, S.; PILATONE, A.; VETTOR, R.; MILAN, G. Obesity, the Adipose Organ and Cancer in Humans: Association or Causation? **Biomedicines**, v. 11, n. 5, p. 1319, 28 abr. 2023. Disponível em: </pmc/articles/PMC10215824/>. Acesso em: 3 jun. 2023.

TUOMELA, J.; SANDHOLM, J.; KAAKINEN, M.; PATEL, A.; KAUPPILA, J. H.; ILVESARO, J.; CHEN, D.; HARRIS, K. W.; GRAVES, D.; SELANDER, K. S. DNA from dead cancer cells induces TLR9-mediated invasion and inflammation in living cancer cells. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 142, n. 3, p. 477–487, 10 dez. 2013. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10549-013-2762-0>>. Acesso em: 1 jun. 2023.

VANHAESEBROECK, B.; PERRY, M. W. D.; BROWN, J. R.; ANDRÉ, F.; OKKENHAUG, K. PI3K inhibitors are finally coming of age. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 20, n. 10, p. 741–769, 1 out. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34127844/>>. Acesso em: 27 maio. 2023.

VIJAY, K. Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: Past, present, and future. **International immunopharmacology**, v. 59, p. 391–412, 1 jun. 2018. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29730580/>>. Acesso em: 3 maio. 2023.

VOIGT, W. Sulforhodamine B assay and chemosensitivity. **Methods in molecular medicine**, v. 110, p. 39–48, 2005. Disponível em: <<https://link.springer.com/protocol/10.1385/1-59259-869-2:039>>. Acesso em: 2 jun. 2023.

VOLK-DRAPER, L.; HALL, K.; GRIGGS, C.; RAJPUT, S.; KOHIO, P.; DENARDO, D.; RAN, S. Paclitaxel Therapy Promotes Breast Cancer Metastasis in a TLR4-Dependent Manner. **Cancer Research**, v. 74, n. 19, p. 5421–5434, 1 out. 2014. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0067>>. Acesso em: 30 jun. 2023.

VOLMER, L.; KOCH, A.; MATOVINA, S.; DANNEHL, D.; WEISS, M.; WELKER, G.; HAHN, M.; ENGLER, T.; WALLWIENER, M.; WALTER, C. B.; OBERLECHNER, E.; BRUCKER, S. Y.; PANTEL, K.; HARTKOPF, A. Neoadjuvant Chemotherapy of Patients with Early Breast Cancer Is Associated with Increased Detection of Disseminated Tumor Cells in the Bone Marrow. **Cancers**, v. 14, n. 3, 1 fev. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35158902/>>. Acesso em: 27 nov. 2023.

VON MINCKWITZ, G. Docetaxel/anthracycline combinations for breast cancer treatment. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 8, n. 4, p. 485–495, mar. 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17309343/>>. Acesso em: 31 maio. 2023.

WAGNER SOUZA WANDERLEY, C. DE. **Paclitaxel reduz o crescimento tumoral através da reprogramação de macrófagos associados ao tumor para o perfil m1 via tlr4**. 2018. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/34977/1/2018_tese_cwswanderley.pdf>. Acesso em: 26 jun. 2020.

WANG, H.; MAO, X. Evaluation of the Efficacy of Neoadjuvant Chemotherapy for Breast Cancer. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 14, p. 2423, 2020. Disponível em: <[pmc/articles/PMC7308147/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3308147/)>. Acesso em: 31 maio. 2023.

WANG, X.; SIMPSON, E. R.; BROWN, K. A. Aromatase overexpression in dysfunctional adipose tissue links obesity to postmenopausal breast cancer. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 153, p. 35–44, 1 set. 2015.

WHITEHEAD, M. A.; BOMBARDIERI, M.; PITZALIS, C.; VANHAESEBROECK, B. Isoform-selective induction of human p110 δ PI3K expression by TNF α : identification of a new and inducible PIK3CD promoter. **Biochemical Journal**, v. 443, n. Pt 3, p. 857, 5 maio 2012. Disponível em: <[pmc/articles/PMC3328000/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22328000/)>. Acesso em: 27 maio. 2023.

WIRAPATI, P.; SOTIRIOU, C.; KUNKEL, S.; FARMER, P.; PRADERVAND, S.; HAIBE-KAINS, B.; DESMEDT, C.; IGNATIADIS, M.; SENGSTAG, T.; SCHÜTZ, F.; GOLDSTEIN,

- D. R.; PICCART, M.; DELORENZI, M. Meta-analysis of gene expression profiles in breast cancer: toward a unified understanding of breast cancer subtyping and prognosis signatures. **Breast cancer research : BCR**, v. 10, n. 4, 28 jul. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18662380/>>. Acesso em: 17 maio. 2023.
- WOLFF, A. C.; HAMMOND, M. E. H.; HICKS, D. G.; DOWSETT, M.; MCSHANE, L. M.; ALLISON, K. H.; ALLRED, D. C.; BARTLETT, J. M. S.; BILOUS, M.; FITZGIBBONS, P.; HANNA, W.; JENKINS, R. B.; MANGU, P. B.; PAIK, S.; PEREZ, E. A.; PRESS, M. F.; SPEARS, P. A.; VANCE, G. H.; VIALE, G.; HAYES, D. F. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31, n. 31, p. 3997–4013, 1 nov. 2013.
- WONG, D. V. T.; HOLANDA, R. B. F.; CAJADO, A. G.; BANDEIRA, A. M.; PEREIRA, J. F. B.; AMORIM, J. O.; TORRES, C. S.; FERREIRA, L. M. M.; LOPES, M. H. S.; OLIVEIRA, R. T. G.; PEREIRA, A. F.; SANT'ANA, R. O.; ARRUDA, L. M. alverne; RIBEIRO-JÚNIOR, H. L.; PINHEIRO, R. F.; ALMEIDA, P. R. C.; CARVALHO, R. F.; CHAVES, F. F.; ROCHA-FILHO, D. R.; CUNHA, F. Q.; LIMA-JÚNIOR, R. C. P. TLR4 deficiency upregulates TLR9 expression and enhances irinotecan-related intestinal mucositis and late-onset diarrhoea. **British journal of pharmacology**, v. 178, n. 20, p. 4193–4209, 1 out. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34216140/>>. Acesso em: 27 nov. 2023.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity**. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/obesity#tab=tab_1>. Acesso em: 7 maio. 2023.
- XU, F.; WANG, F.; YANG, T.; SHENG, Y.; ZHONG, T.; CHEN, Y. Differential drug resistance acquisition to doxorubicin and paclitaxel in breast cancer cells. **Cancer Cell International**, v. 14, n. 1, p. 1–13, 21 dez. 2014. Disponível em: <<https://cancerbiomedcentral.com/articles/10.1186/s12935-014-0142-4>>. Acesso em: 1 jun. 2023.
- YAN, C.; YANG, J.; SALEH, N.; CHEN, S. C.; AYERS, G. D.; ABRAMSON, V. G.; MAYER, I. A.; RICHMOND, A. Inhibition of the PI3K/mTOR Pathway in Breast Cancer to Enhance Response to Immune Checkpoint Inhibitors in Breast Cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 10, 2 maio 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34069042/>>. Acesso em: 2 jun. 2023.
- YANG, S. X.; POLLEY, E.; LIPKOWITZ, S. New insights on PI3K/AKT pathway alterations and clinical outcomes in breast cancer. **Cancer treatment reviews**, v. 45, p. 87–96, 1 abr. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26995633/>>. Acesso em: 24 jul. 2022.
- YUAN, Q.; CHEN, H.; LI, X.; WEI, J. Leptin: an unappreciated key player in SLE. **Clinical**

- Rheumatology** 2019 39:2, v. 39, n. 2, p. 305–317, 9 nov. 2019. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10067-019-04831-8>>. Acesso em: 1 jul. 2023.
- ZHANG, Q.; DAN, J.; MENG, S.; LI, Y.; LI, J. TLR4 inhibited autophagy by modulating PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in Gastric cancer cell lines. **Gene**, v. 876, 5 ago. 2023. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37257791/>>. Acesso em: 27 nov. 2023.
- ZHANG, R.; DONG, Y.; SUN, M.; WANG, Y.; CAI, C.; ZENG, Y.; WU, Y.; ZHAO, Q. Tumor-associated inflammatory microenvironment in non-small cell lung cancer: correlation with FGFR1 and TLR4 expression via PI3K/Akt pathway. **Journal of Cancer**, v. 10, n. 4, p. 1004–1012, 2019.
- ZHU, K.; WU, Y.; HE, P.; FAN, Y.; ZHONG, X.; ZHENG, H.; LUO, T. PI3K/AKT/mTOR-Targeted Therapy for Breast Cancer. **Cells**, v. 11, n. 16, 1 ago. 2022. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC9406657/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37257791/)>. Acesso em: 27 maio. 2023.