



Universidade de Brasília – UnB

Instituto de Biologia - IB

Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

O papel do ômega-3 (DHA) na modulação do tecido adiposo branco e marrom e sua função sobre células de melanoma

Débora Santos da Silva

Brasília

2023



Universidade de Brasília – UnB

Instituto de Biologia - IB

Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

Débora Santos da Silva

**O papel do ômega-3 (DHA) na modulação do tecido adiposo
branco e marrom e sua função sobre células de melanoma**

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

Orientadora:

Profa. Dra. Kelly Grace Magalhães

Brasília

Débora Santos da Silva

O papel do ômega-3 (DHA) na modulação do tecido adiposo branco e marrom e sua
função sobre células de melanoma

Data: 07/07/2023

Banca Examinadora

Prof.^a Dra. Kelly Grace Magalhães (Presidente)

Programa de Pós-graduação de Biologia Molecular - Universidade de Brasília

Prof.^a Dra. Nathalia Marcolini Pelucio Pizato (Membro)

Universidade de Brasília

Prof.^a Dra. Gabriela Nestal de Moraes (Membro)

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dra. Gabriella Simões Heyn Roth Cardoso (Membro Suplente)

Novo Nordisk Foundation Center for Basic Metabolic Research, vinculada à

Universidade de Copenhagen

Agradecimentos

A Deus por todas as bênçãos concedidas, pois cada realização minha foi obra de suas mãos. Sem o seu amor, sua graça e fidelidade não seria capaz de realizar esse projeto. Senhor, obrigada por me dar forças e ser meu refúgio em todos os momentos.

À minha família, em especial meus pais, José e Marinalva, pelo amor, suporte e cuidado em todos esses anos. Obrigada por todo o esforço e dedicação na minha criação e por sempre me apoiarem em todas as minhas escolhas. Sou grata por tê-los como pais. Agradeço também à minha irmã Priscilla e à minha tia Marlene por toda a motivação, conselhos e por serem grandes amigas minhas. Agradeço à minha cachorrinha Amora por tornar os meus dias mais felizes.

À minha orientadora Kelly G. Magalhães por ter confiado em mim, acreditado no meu potencial e por ter me concedido oportunidades de crescer profissionalmente. Sou muito grata por todos esses anos repletos de ensinamentos, motivações e repreensões, pois eles me fizeram querer ser cada vez melhor. Tenho grande admiração e carinho por você.

Às minhas queridas amigas Laura, Jenifer e Marielly e ao meu amigo Júlio por sempre me apoiarem e me motivarem em todos os momentos de minha graduação e do meu mestrado. Vocês têm um lugar especial em meu coração.

À minha colaboradora Heloísa por todos os ensinamentos e por ter me acolhido desde que eu era apenas uma estagiária. Foi um privilégio trabalhar com você todos esses anos. Agradeço aos meus outros colaboradores Luana, Ramon e Nathalia, pois sem vocês não seria possível realizar esse trabalho.

À minha amiga e colega de laboratório Sarah por toda ajuda e por se aventurar comigo nos experimentos. Agradeço também aos meus amigos e colegas de laboratório Sabrina, Fernanda, Júlia, Milena, Pasqua, Calixto, Clarissa, Mikaela, Miguel e Jáder por todo apoio, ajuda e por tornarem a jornada científica mais leve e divertida. Agradeço aos ex-integrantes do LIMI Gabi e Rafael por todos os ensinamentos e ao técnico Chiquinho pelas ajudas, cafezinhos e por todo cuidado e preocupação comigo.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular por ter possibilitado a realização desse projeto, aos laboratórios do Instituto de Biologia e às agências de fomento CAPES e FAP-DF pelo auxílio financeiro prestado.

“Porque o SENHOR dá a sabedoria, e da sua boca vem a inteligência e o entendimento.” Provérbios 1:6

Sumário

1. Introdução	15
1.1. Ácidos graxos poli-insaturados ômega-3.....	15
1.2. Ácido docosahexaenóico (DHA)	17
1.3. O tecido adiposo	18
1.4. Ômega-3 e tecido adiposo.....	21
1.5. Câncer	23
1.6. Melanoma	24
1.7. Morte celular.....	26
1.8. Piroptose	27
2. Justificativa	30
3. Objetivos.....	31
3.1. Objetivo Geral.....	31
3.2. Objetivos específicos	31
4. Metodologia.....	32
4.1. Modelo animal	32
4.2. Suplementação com o ácido docosahexaenóico (DHA).....	32
4.3 Culturas celulares.....	32
4.4. Produto de secreção do tecido adiposo	33
4.5. Estímulo com produto de secreção dos tecidos adiposos	33
4.6. Estímulo com o DHA	34
4.6. Peso corporal e dos órgãos.....	34
4.7. Histologia dos órgãos e análise morfológica	34
4.8. Aquisição de células do lavado peritoneal.....	35
4.9. Produção de Espécies reativas de oxigênio	35
4.10. Biogênese de corpúsculos lipídicos	35
4.11. Dosagem de Citocinas	36
4.12. Viabilidade mitocondrial	36
4.13. Morte Celular.....	37
4.14. Detecção de LDH.....	37
4.15. Ativação de caspase-1.....	38
4.16. Perda da integridade da membrana	38
4.17. Estresse oxidativo	39

5. Resultados	40
5.1. A suplementação com ômega-3, enriquecido em DHA, não altera o peso corporal, mas reduz o peso dos tecidos adiposos gonadal, subcutâneo e marrom.....	40
5.2. A suplementação com ômega-3, enriquecido em DHA, reduz a área dos adipócitos do gWAT.....	42
5.3. A suplementação com ômega-3, enriquecido em DHA, reduz os níveis das citocinas TGF- β e MCP-1 no BAT.....	44
5.4. A suplementação com ômega-3, enriquecido em DHA, não altera a morfologia e o peso do fígado e do baço.....	46
5.5. A suplementação com ômega-3, enriquecido em DHA, aumenta a biogênese de corpúsculos lipídicos, reduz a formação de espécies reativas de oxigênio, e não modula a secreção de citocinas das células do lavado peritoneal.....	48
5.6. A suplementação com ômega-3, enriquecido em DHA diminui os níveis das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e IL-12 no soro.....	50
5.7. O produto de secreção do tecido adiposo marrom, dos animais suplementados com ômega-3, enriquecido em DHA, reduz drasticamente a viabilidade mitocondrial das células B16F10.....	52
5.8. O produto de secreção tecido adiposo marrom, dos animais suplementados com ômega-3, enriquecido em DHA, aumenta a morte celular das células B16F10.....	54
5.9. O produto de secreção do tecido adiposo branco, dos animais tratados com ômega-3, enriquecido em DHA, reduz a secreção das citocinas IL-6 e TGF- β pelas células B16F10. Já o produto de secreção do tecido adiposo marrom reduz apenas IL-6.....	56
5.10. O DHA induz a secreção de LDH das células de melanoma humano (MeWo).....	58
5.11. O DHA induz a secreção de LDH em macrófagos apenas em altas concentrações e tempos tardios.....	59
5.12. O DHA induz a perda da integridade da membrana plasmática das células de melanoma humano.....	61
5.13. O DHA induz a ativação de caspase-1 nas células MeWo.....	62
5.14. O DHA não modula a formação de espécies reativas de oxigênio nas células MeWo.....	63
5.15. O DHA não modula a secreção das citocinas IL-1 β e TNF- α , mas aumenta a secreção de IL-6 nas células MeWo em 48 horas.....	64
6. Discussão	66
7. Conclusão	74
8. Referências	76

O papel do ômega-3 (DHA) na modulação do tecido adiposo branco e marrom e a sua função sobre células de melanoma

Débora Santos da Silva

RESUMO

Os ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 (n-3 PUFAs), como o ácido docosahexaenóico (DHA), possuem mecanismos protetores contra o estabelecimento de doenças inflamatórias, como a obesidade e o câncer. O DHA não só tem efeitos importantes sobre os tecidos adiposos, mas também tem a capacidade de induzir a morte celular por piroptose em alguns tipos de células tumorais. No entanto, o papel dos n-3 PUFAs na comunicação entre o câncer de melanoma e os tecidos adiposos ainda é pouco conhecido. Desta forma, este trabalho teve como objetivo investigar o papel do ômega-3 na modulação dos tecidos adiposos e sua função sobre células de melanoma, especialmente, na indução de morte celular por piroptose. Camundongos (C57BL/6) foram suplementados ou não com ômega-3 enriquecido em DHA na concentração de 1g/kg por 35 dias. Após esse período, foram analisados soro, lavado peritoneal, tecidos adiposos, fígado e baço. Além disso, produtos de secreção de tecido adiposo desses camundongos suplementados com ômega-3 foram isolados e usados para estimular a linhagem celular de melanoma B16F10 *in vitro*. Análises como viabilidade celular, morte celular e quantificação de citocinas foram avaliados. Além disso, a linhagem celular de melanoma humano MeWo foi estimulada com DHA (12,5 μ M, 25 μ M, 50 μ M e 100 μ M) por 48h *in vitro*. A secreção de lactato desidrogenase (LDH), captação de Iodeto de propídeo, e ativação da caspase-1 foram analisados. Nossos dados demonstraram que a suplementação com ômega-3 enriquecido em DHA reduziu o peso dos tecidos adiposos. As células do lavado peritoneal dos animais suplementados aumentaram a biogênese de corpúsculos lipídicos, mas reduziram a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Além disso, o estímulo da B16F10 com os produtos de secreção de tecido adiposo marrom (BAT) de animais suplementados levou a uma diminuição na viabilidade celular, bem como um aumento da morte celular e redução da secreção da citocina IL-6 de células de melanoma. Ademais, a concentração de 25 μ M de DHA induziu a liberação de LDH, aumentou a captação de Iodeto de propídeo e induziu a ativação da caspase-1, marcadores característicos de morte celular por piroptose. Portanto, este trabalho demonstrou o potencial da suplementação com ômega-3 em modular o perfil e a função imunológica dos tecidos adiposos, assim como sugere a capacidade do DHA em induzir piroptose na em células de melanoma *in vitro*. Esse trabalho gera, assim, novas perspectivas para a utilização do ômega-3 DHA como adjuvante no tratamento do melanoma.

The role of omega-3 (DHA) in white and brown adipose tissue modulation and the function of these over the melanoma cells

Débora Santos da Silva

ABSTRACT

Omega-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFAs) such as docosahexaenoic acid (DHA) have protective mechanisms against the establishment of inflammatory diseases, such as obesity and cancer. DHA not only has important effects on adipose tissues, but also has the ability to induce pyroptosis cell death in some types of tumoral cells. However, the role of n-3 PUFAs in the crosstalk between melanoma cancer and adipose tissue is poorly known. In this way, this work aimed to investigate the role of omega-3 in adipose tissue modulation and the function of these over the melanoma cells, as well as the induction of pyroptosis. Mice C57BL/6 were supplemented or not with omega-3 enriched in DHA at a concentration of 1g/kg for 30 days. After this period, serum, peritoneal washing, adipose tissues, liver, and spleen were analyzed. In addition, secretion products of adipose tissues from these omega-3 supplemented mice were isolated and used to stimulate melanoma cell line B16F10. Analyzes such as cell viability, cell death, and cytokine quantification were evaluated. Moreover, the human melanoma cell line, MeWo were stimulated with DHA (12.5 μ M, 25 μ M, 50 μ M and 100 μ M) for 48h *in vitro*. Secretion of lactate dehydrogenase (LDH), caspase-1 activation and loss of plasma membrane integrity were analyzed. Our data demonstrated that supplementation with omega-3 enriched in DHA reduced the weight of adipose tissues. Peritoneal washing cells from supplemented animals had increased lipid droplet (LD) biogenesis but reduced reactive oxygen species (ROS) formation. In addition, the stimulation of B16F10 with the secretion products of brown adipose tissue (BAT) from omega-3 supplemented animals led to a decrease in cell viability as well as increased cell death and reduced IL-6 secretion by melanoma cells. Furthermore, the 25 μ M DHA concentration induced LDH release, increased Propidium Iodide uptake and induced caspase-1 activation, which are characteristic markers of cell death by pyroptosis. Thus, this study demonstrated the potential of omega-3 supplementation in modulating the profile and immune function of adipose tissues, as well as suggested the ability of DHA to induce pyroptosis in melanoma cells *in vitro*. Therefore, it provides new perspectives for the use of omega-3 as adjuvants in the treatment of melanoma.

Lista de figuras

Figura 1. Síntese dos ácidos eicosapentaenóico (EPA), docosapentaenóico (DPA) e docosahexaenóico (DHA) a partir do ácido α-linolênico (ALA).....	16
Figura 2. O Aumento da reserva lipídica em adipócitos favorece a inflamação. ...	20
Figura 3. Resumo dos mecanismos pelos quais os n-3 PUFAs (ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA)) regulam o metabolismo e as funções do tecido adiposo.....	22
Figura 4. Proximidade entre o tecido adiposo subcutâneo e o melanoma.....	26
Figura 5. Geração de poros na membrana plasmática induzida pela ativação de GSDMD durante a piroptose mediada por caspases.....	29
Figura 6. A suplementação com ômega-3, enriquecido em ácido DHA, modula o peso dos tecidos adiposos gonadal, subcutâneo e marrom sem alterar o peso corporal.	41
Figura 7. A suplementação com ômega-3, enriquecido em ácido DHA, reduz a área dos adipócitos do tecido adiposo gonadal.....	43
Figura 8. A suplementação com ômega-3, enriquecido em DHA, no tecido adiposo marrom modula os níveis da citocina TGF-β e da quimiocina MCP-1.....	45
Figura 9. A morfologia e o peso do fígado e do baço não são moduladas pela suplementação com ômega-3, enriquecido em DHA.	47
Figura 10. A suplementação com ômega-3, enriquecido em DHA, aumenta a biogênese de corpúsculos lipídicos e reduz a formação de espécies reativas de oxigênio, apesar de não modular a secreção da citocina MCP-1 das células do lavado peritoneal.....	49
Figura 11. Redução dos níveis das citocinas TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-10 e IL-12 no soro pela suplementação com ômega-3, enriquecido em DHA.....	51
Figura 12. O produto de secreção do tecido adiposo marrom, dos animais suplementados com ômega-3, enriquecido em DHA, reduz drasticamente a viabilidade mitocondrial das células B16F10.....	53
Figura 13. Aumento de morte celular das células B16F10 pelo produto de secreção tecido adiposo marrom dos animais suplementados com ômega-3, enriquecido em DHA.	55

Figura 14. O produto de secreção do tecido adiposo branco, dos animais tratados com ômega-3, enriquecido em DHA, reduz a secreção das citocinas IL-6 e TGF-β pelas células B16F10. Já o produto de secreção do tecido adiposo marrom reduz apenas IL-6.....	57
Figura 15. Indução da secreção de LDH nas células de melanoma humano (MeWo) pelo estímulo com DHA.....	58
Figura 16.O DHA induz a secreção de LDH em macrófagos apenas em altas concentrações e tempos tardios.	60
Figura 17. Análise da perda da integridade da membrana plasmática das células MeWo estimuladas com DHA.	61
Figura 18. O DHA modula a ativação de caspase-1 na concentração de 25 μM. ...	62
Figura 19. Análise da formação de espécies reativas de oxigênio nas células MeWo estimuladas com DHA.....	63
Figura 20. O DHA promove aumento da secreção da citocina IL-6, apesar de não modular as citocinas IL-1β e TNF-α nas células MeWo.	65

Lista de abreviaturas

AA	Ácido araquidônico
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
BAT	Tecido adiposo marrom
BMDM	Bone-marrow-derived macrophage
B16F10	Linhagem de celular de melanoma murino
CAA	Adipócitos associados ao câncer
CL	Corpúsculo lipídico
CLS	Estrutura semelhante a coroa
COX	Ciclooxigenase
DFC-DA	2',7' Diclorodihidrofluoresceína-diacetato
DHA	Ácido docosahexaenoico
DMEM	Meio Dulbecco MEM
DMSO	Dimetilsulfóxido
EPA	Ácido eicosapentanoico
gWAT	Tecido adiposo gonadal
GSDMD	Gasdermin-D
HE	Hematoxilina e Eosina
ICAM	Molécula de adesão intercelular-1
IL	Interleucina
LDH	Lactato desidrogenase
LOX	Lipooxigenase
LTB	Leucotrieno
MeWo	Linhagem celular de melanoma humano
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio brometo
MCP-1	Proteína quimiotática de macrófagos 1
NFkB	Fator nuclear kappa B
PGE	Prostaglandina E
PI	Iodeto de Propídeo
PPAR	Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma
PUFAs	Ácidos-graxos poli-insaturados de ômega-3
RPMI	Meio Roswell Park Memorial Institute

sWAT	Tecido adiposo branco subcutâneo
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
TX	Tromboxano
WAT	Tecido adiposo branco
VCAM	Molécula de adesão vascular-1
vWAT	Tecido adiposo branco visceral
μg	Micrograma
μM	Micromolar

1. Introdução

1.1. Ácidos graxos poli-insaturados ômega-3

Os ácidos graxos poli-insaturados ômega-3, conhecidos como n:3 PUFAs ou ω -3 PUFAs, são ácidos graxos de cadeia longa caracterizados por múltiplas insaturações ao longo da cadeia carbônica, sendo a primeira ligação dupla encontrada entre o terceiro e o quarto carbono da extremidade metil (Cholewski et al., 2018). Dentre os n:3 PUFAs mais importantes destacam-se, o ácido α -linolênico (ALA), o qual, através da ação de enzimas específicas responsáveis pelas reações de alongação e dessaturação, pode ser convertido ao ácido eicosapentaenoico (EPA), e posteriormente, ao ácido docosahexaenoico (DHA) (Figura 1). Tais ácidos graxos são considerados essenciais, visto que não podem ser sintetizados pela *via de novo* em mamíferos, sendo, portanto, adquiridos através da alimentação (Metherel & Bazinet, 2019; Shahidi & Ambigaipalan, 2018). As principais fontes de ALA incluem, óleos e sementes vegetais como, linhaça, soja e chia, por outro lado, o DHA e EPA podem ser encontrados em peixes de águas frias profundas e alguns mamíferos marinhos. Outro meio mais eficiente de obtê-los ocorre através da suplementação com óleo de peixe, já que a conversão do ALA a EPA e DHA é ineficiente em humanos devido a competição entre os ácidos graxos de ômega 6 e os de n:3 PUFAS pelas mesmas enzimas de conversão (Das, 2011; Metherel & Bazinet, 2019).

Após o consumo de ômega-3, esses ácidos graxos são incorporados aos fosfolipídios de membrana celular podendo modular a composição da mesma, e conseqüentemente, sua fluidez (Calder, 2015). Os n:3 PUFAs atuam sobre subdomínios de membrana, conhecidos como *lipid rafts*, modulando sua formação e estrutura. Esses microdomínios são responsáveis pela síntese de proteínas sinalizadoras chaves e pelo transporte de proteínas intracelulares. Com isso, alguns estudos mostraram que alterações nos *lipid rafts* de células imunes, induzidas pelo ômega-3, podem levar a alterações na resposta imune (W. Kim et al., 2008; Shaikh et al., 2009). Os n:3 PUFAs presentes nas membranas celulares também operam através da ligação com o receptor GPR120, o qual, quando ativado inibe a via de ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B). Esse fator de transcrição nuclear age na expressão gênica de proteínas envolvidas em processos inflamatórios tais como, as citocinas pró-inflamatórias interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral α (TNF- α), moléculas de adesão

intercelular-1 e vascular-1 (ICAM e VCAM), enzima ciclooxigenase (COX) e metaloproteinases da matriz extracelular (Calder, 2015).

Além disso, os n:3 PUFAs internalizados para dentro da célula são responsáveis pela síntese de moléculas com efeitos anti-inflamatórios, conhecidas como mediadores lipídicos, através da ação das enzimas COX, lipooxigenases (LOX) e do citocromo P450. Essas mesmas enzimas são responsáveis pela síntese dos eicosanóides provenientes do ômega-6. Contudo, apresentam maior afinidade pelos de ômega-3 (Lands, 2012). O ácido araquidônico, um tipo de ômega-6, é precursor de eicosanóides como a prostaglandina E₂ (PGE₂), leucotrieno B₄ (LTB₄) e tromboxano 2 (TX₂), conhecidos como de série par com potencial pró-inflamatório, enquanto que o EPA e o DHA formam os de série ímpar, PGE₃ (vaso dilatador e inibidor plaquetário), LTB₅ (fraco indutor de inflamação) e TX₃ (fraco agregador plaquetário), os quais possuem ação anti-inflamatória (Robinson & Stone, 2006).

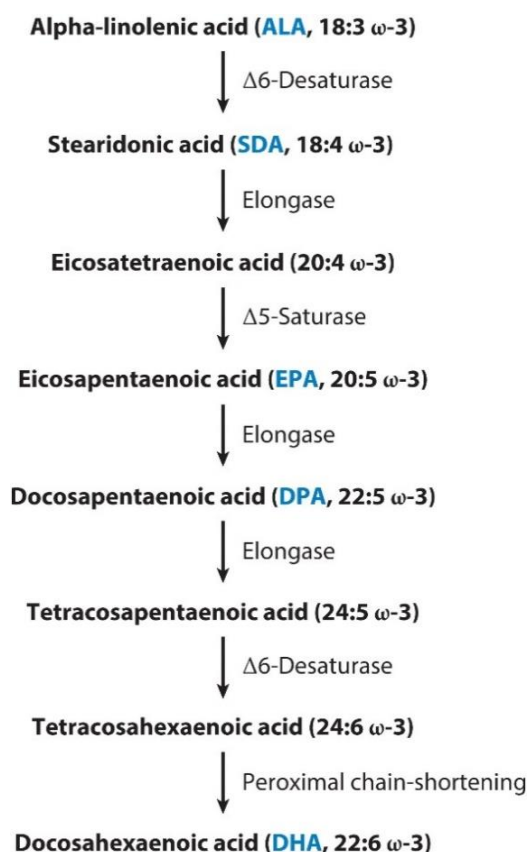


Figura 1. Síntese dos ácidos eicosapentaenóico (EPA), docosapentaenóico (DPA) e docosahexaenóico (DHA) a partir do ácido α -linolênico (ALA). Reações de dessaturação e alongação do ALA tem como produto o EPA, DPA, e o DHA. Fonte: Shahidi F, Ambigaipalan P. 2018. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Their Health Benefits.

1.2. Ácido docosahexaenóico (DHA)

O DHA é um nutriente encontrado principalmente nas membranas celulares do sistema nervoso central (Tanaka et al., 2012). Estudos recentes demonstram o papel neuroprotetor do DHA em diversas doenças associadas ao sistema nervoso, como Alzheimer, Parkinson, depressão, esquizofrenia, e danos neuronais causados por infecções virais (Avallone et al., 2019; Braz-De-Melo et al., 2019; Pawełczyk et al., 2015). Além disso, o consumo de DHA durante a gravidez mostrou ser benéfico para o desenvolvimento embrionário do cérebro, bem como da retina (Basak et al., 2020). Os efeitos provenientes do DHA em células neuronais são, em parte, decorrentes de sua capacidade em prevenir a apoptose neural através da translocação e ativação de Raf-1 e AKT induzido pelo aumento dos níveis de fosfatidilserina em membranas neuronais (H.-Y. Kim et al., 2010). Ademais, o DHA inibe as proteínas Bax, Bad e caspase 3, moléculas pró-apoptóticas, além de aumentar a expressão das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-xL no hipocampo (Ajami et al., 2011; Dyall, 2015).

Outros efeitos promovidos pelo DHA envolvem a síntese de metabólitos, conhecidos como docosanóides, os quais são mediadores lipídicos pró-resolução originados pela ação do citocromo P450 monooxidase nas vias mediadas pelas enzimas COX e LOX. São conhecidos pela sua potente ação anti-inflamatória e podem regular a expressão gênica (López-Vicario et al., 2016). Dentre eles, destacam-se, as resolvinas de série D, cuja ação ocorre através da ativação dos receptores acoplados a proteína G e estão envolvidas no processo de redução de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-13 e no controle da migração do neutrófilos; as maresinas, as quais estão relacionadas ao reparo e regeneração tecidual; e as protectinas, os quais atuam promovendo sobrevivência celular no sistema nervoso e também em injúrias neuronais (Poudyal et al., 2011; Serhan, 2007).

Devido à influência do DHA em processos envolvidos com a inflamação, diversas pesquisas vêm demonstrando a relevância do DHA em doenças metabólicas, como doenças cardiovasculares, obesidade e diabetes, além da promoção e progressão da carcinogênese (Arnoldussen & Kiliaan, 2014; Newell et al., 2017; Siddiqui et al., 2011). É sabido que os mecanismos moleculares exercidos pelo DHA *in vitro* podem inibir o crescimento tumoral. Estudos mostraram a capacidade do DHA em induzir morte celular programada, sendo a apoptose a principal delas, em diferentes tipos de câncer, como o de

mama, próstata e pâncreas (K. S. Kang et al., 2010; Park et al., 2018; Shin et al., 2013). Também foi descrito a indução de morte lítica por piroptose pelo DHA em células de câncer de mama MDA-MB-231 (Pizato et al., 2018). Já quando em conjunto com o delta-tocotrienol (vitamina E), ambos levaram a redução da biogênese de corpúsculos lipídicos e indução da lipofagia, processos considerados biomarcadores de agressividade e indicadores de maior atividade cancerígena, neste mesmo tipo de câncer (Pizato et al., 2019). Além de neoplasias, o DHA também pode atuar sobre a obesidade, visto que apresenta ação direta sobre o tecido adiposo. Um estudo mostrou que o DHA induziu a apoptose e inibiu a diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 a adipócitos maduros (H.-K. Kim et al., 2006). Também foi demonstrado que a suplementação com DHA em camundongos obesos e idosos induziu uma remodelação metabólica do tecido adiposo subcutâneo, modulando genes lipolíticos nos adipócitos, reduzindo o estado inflamatório e induzindo marcadores de adipócitos bege (Félix-Soriano et al., 2023). Portanto, o tratamento com DHA como adjuvante em diferentes comorbidades tem se mostrado bastante promissor nos últimos anos.

1.3. O tecido adiposo

O tecido adiposo é caracterizado por ser um órgão endócrino e metabólico, com alta plasticidade fenotípica, cuja principal função está associada ao armazenamento de energia na forma de gordura (Kershaw & Flier, 2004). Este tecido é composto majoritariamente por adipócitos altamente especializados responsáveis por secretar inúmeras adipocinas como adiponectina, leptina, resistina e visfatina, e citocinas, tais como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-18 e proteína quimiotática de macrófagos (MCP-1), os quais podem atuar tanto localmente, quanto a nível sistêmico modulando, conseqüentemente, o metabolismo de inúmeros órgãos (Fantuzzi, 2005). Outros componentes como pré-adipócitos, fibroblastos, células-tronco, endoteliais, estromais, e imunes também integram esse tecido (Ouchi et al., 2011). Atualmente, são conhecidos quatro tipos de adipócitos, sendo eles, o branco, marrom, bege e rosa, com fisiologias, atividades metabólicas e funções bem distintas (Corrêa et al., 2019).

Os adipócitos brancos apresentam uma grande gotícula lipídica na porção central e um número escasso de mitocôndrias em seu citoplasma. O tecido adiposo branco (WAT) é o principal local de armazenamento de energia, bem como responsável em

regular o balanço energético mediante processos de lipogênese e lipólise, e está localizado principalmente nas regiões subcutânea, visceral e gonadal (Vázquez-Vela et al., 2008). Em indivíduos obesos, a expansão não saudável do WAT, especialmente, na região visceral está envolvida com maior produção e secreção de moléculas pró-inflamatórias, atuando como conexão da obesidade com as doenças crônicas que se associam a essa condição (Brandão et al., 2017).

Já os adipócitos marrons, diferentemente dos adipócitos brancos, apresentam uma natureza anti-inflamatória, devido a uma menor produção de citocinas pró-inflamatórias e gotículas lipídicas menores. O tecido adiposo marrom é mais vascularizado e retém uma abundante quantidade de mitocôndrias, as quais expressam a proteína-1 de desacoplamento (UCP1), proteína transmembrana que dissipa calor ao desacoplar a cadeia respiratória mitocondrial, sendo responsável pelo caráter termogênico do tecido (Cypess et al., 2009). O tecido adiposo marrom (BAT) tende a diminuir com a idade e sua ativação promove a captação de glicose e ácidos graxos afetando o metabolismo de todo o corpo, podendo alterar a sensibilidade à insulina e modificar a susceptibilidade ao ganho de peso (Scheele & Nielsen, 2017). O depósito de BAT, por sua vez, é encontrado nas áreas cervical, supraclavicular, axial, mediastinal, paraespinal e abdominal (Leitner et al., 2017).

Por outro lado, adipócitos bege apresentam um fenótipo intermediário entre os adipócitos brancos e marrons. Possuem um número relativo de gotículas lipídicas e mitocôndrias, e podem facilmente, sobre estímulos externos, adquirir características funcionais de adipócitos marrons, como elevados níveis de expressão de UCP1 e, posteriormente, capacidade termogênica. Esse fenômeno é caracterizado como “amarronzamento” do tecido adiposo branco, sendo um processo reversível. Estímulos como, frio, exercício físico, dieta e os receptores β 2-adrenérgicos são os principais indutores desse fenômeno (Blondin et al., 2020; Machado et al., 2022). Por fim, um outro tipo de tecido adiposo pode ser composto por adipócitos rosa, os quais, estão localizados exclusivamente na mama e só são produzidos durante gravidez e no período de lactação. Apresentam uma superfície apical com microvilosidades, retículo endoplasmático rugoso robusto (RER), aparato de golgi, grânulos contendo leite e gotículas lipídicas (Giordano et al., 2014). Entretanto, pouco se sabe a respeito do papel desse adipócito em patologias.

O acúmulo exacerbado de WAT pode levar à desregulação do funcionamento desse tecido e, conseqüentemente, aumento da inflamação local e sistêmica (Figura 2). Nesse contexto, altos níveis de secreção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL- β , IL-6, IL-12, TNF- α , e o aumento de síntese de óxido nítrico, pelos adipócitos são observados (Ellulu et al., 2017). Isso resulta, posteriormente, no recrutamento, infiltração e acúmulo de linfócitos T CD8 e macrófagos com fenótipo M1, bem como um aumento da angiogênese, no WAT (Chait & den Hartigh, 2020). O aumento de macrófagos também pode ser decorrente da morte de adipócitos por morte lítica, como a piroptose ou necrose pela qual as células liberam fragmentos DNA e ácidos graxos livres. Os macrófagos, ao circundarem os adipócitos em processo de morte formam uma estrutura conhecida como “estrutura em formato de coroa” (CLS), estando assim envolvidas com a inflamação local (Giordano et al., 2013; Murano et al., 2008).

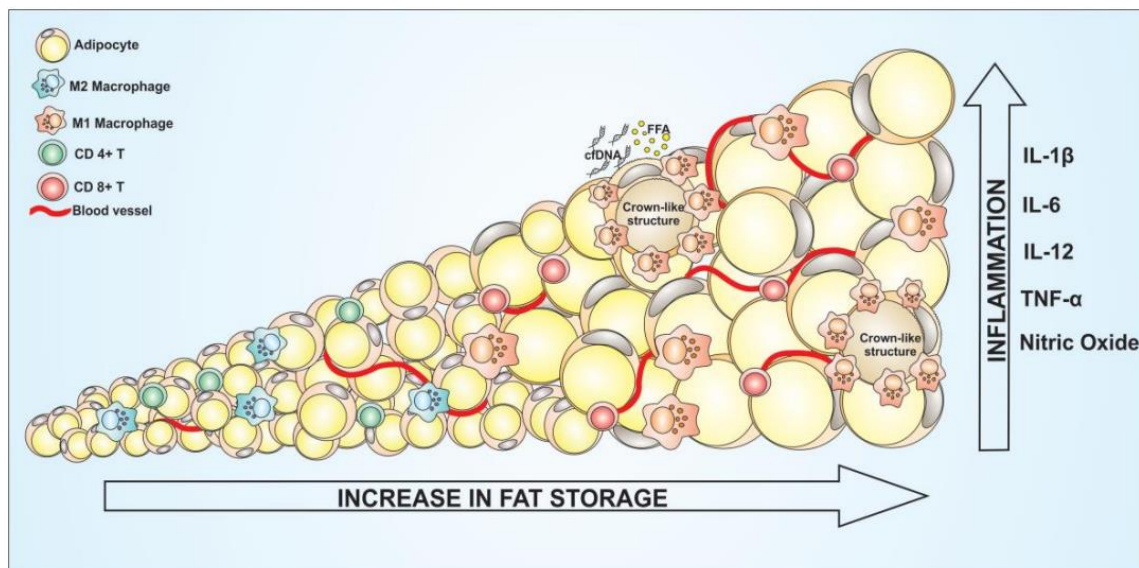


Figura 2. O Aumento da reserva lipídica em adipócitos favorece a inflamação. A hiperplasia e a hipertrofia dos adipócitos são responsáveis por aumentar a secreção de mediadores inflamatórios. Fonte: Corrêa LH, Heyn GS, Magalhaes KG. 2019. The Impact of the Adipose Organ Plasticity on Inflammation and Cancer Progression.

O tecido adiposo também está envolvido com o surgimento e desenvolvimento de diferentes tipos de neoplasias malignas. Adipócitos localizados próximos às células cancerosas, denominados adipócitos associados ao câncer (CAA), favorecem o agravamento e estabelecimento do microambiente tumoral e podem servir de fonte para

o crescimento do tumor (Corrêa et al., 2017). A comunicação entre esses dois tipos celulares leva a redução do conteúdo lipídico e obtenção de uma morfologia semelhante a fibroblasto, como também aumento da capacidade migratória e invasiva da célula tumoral, tornando-o mais agressivo (Q. Wu et al., 2019). Apesar disso, pesquisas envolvendo o amarronzamento do tecido adiposo branco mostram eficácia ao combate da obesidade e, conseqüentemente, outros fatores a ela relacionados, como a progressão tumoral, devido a diminuição da inflamação e promoção de um metabolismo regulado promovidos pelo amarronzamento (J. Wu et al., 2013).

1.4. Ômega-3 e tecido adiposo

Outros tecidos também são favorecidos pelas ações anti-inflamatórias decorrentes do ômega-3, especialmente, o tecido adiposo. A capacidade dos n:3 PUFAs de promoverem a modulação do perfil metabólico de células do tecido adiposo são oriundos de mecanismos diversos (Figura 3). Dentre eles, a ativação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) pelo EPA e DHA e, conseqüentemente, promoção da β -oxidação do tecido adiposo. Além de prevenirem a lipogênese hepática de maneira dependente de AMPK e PPAR α , um fator de transcrição regulador do metabolismo da glicose e lipídeos (Siriwardhana et al., 2013). Já um outro fator de transcrição regulador da adipogênese, PPAR γ , conjuntamente com o ômega-3 estão envolvidos na polarização de macrófagos M2 e posteriormente diminuição da inflamação (Chang et al., 2015). Os PUFAs de ômega-3 também atuam nos processos de diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos maduros, prevenindo a hiperplasia e hipertrofia adipocitária (Simopoulos, 2016). Ademais, estimulam a biogênese mitocondrial e, conseqüentemente, aumento do metabolismo energético (Hensler et al., 2011).

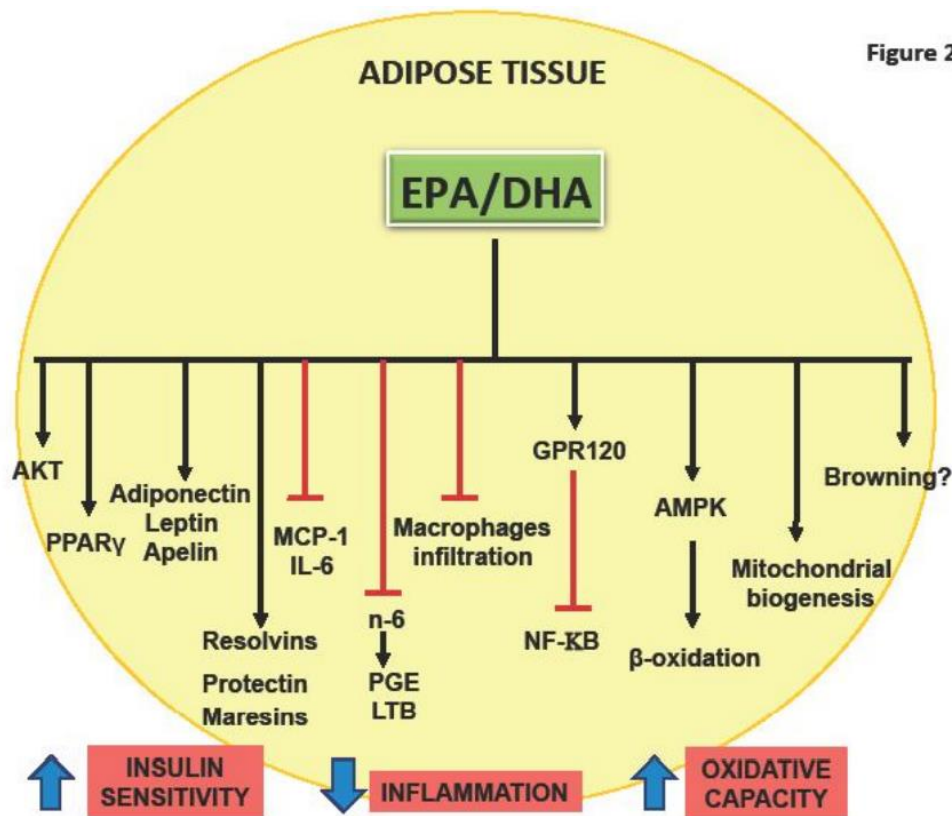


Figura 3. Resumo dos mecanismos pelos quais os n-3 PUFAs (ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA)) regulam o metabolismo e as funções do tecido adiposo. Os n:3 PUFAs podem modular o armazenamento e a mobilização de gotículas lipídicas dos adipócitos favorecendo o metabolismo oxidativo. Além disso, regulam o processo inflamatório, a utilização de glicose e a sensibilidade à insulina no tecido adiposo. Fonte: Martínez-Fernández L, Laiglesia LM, Huerta AE, Martínez JA, Moreno-Aliaga MJ. 2015. Omega-3 fatty acids and adipose tissue function in obesity and metabolic syndrome

O BAT desempenha um papel crucial na manutenção da homeostase energética por meio da termogênese, o qual, os n:3 PUFAs podem exercer influência direta sobre esse mecanismo. Por meio da ligação com o receptor celular GPR120, o ômega-3 estimula o aumento da expressão e liberação do fator de Crescimento do Fibroblasto-21 (FGF21), hormônio capaz de se ligar ao receptores β 3-adrenérgicos e induzir o fenótipo de adipócitos marrons no WAT (Quesada-López et al., 2016). Em um outro estudo mostrou-se que adipócitos tratados com EPA/DHA apresentam um maior aumento da expressão de genes envolvidos na biogênese mitocondrial, como Pgc1 α e Nrf1 (Flachs et al., 2005). Além da expressão gênica de UCP1, um clássico marcador do tecido adiposo marrom (M.

Kim et al., 2015). O ômega-3 aumenta o amarronzamento de WAT no contexto da obesidade através da secreção de oxilipinas anti-inflamatórias, produtos derivados da oxidação dos n:3 PUFAS, já que as oxilipinas derivadas de AA inibem o amarronzamento de adipócitos e a atividade de UCP1 via $\text{PGF2}\alpha$ de maneira dependente de cálcio (Barquissau et al., 2017; Pisani et al., 2014).

A suplementação com ômega-3 está intimamente associada a uma melhora do perfil inflamatório do WAT devido ao aumento de adipocinas anti-inflamatórias como a adiponectina, e reduções nas citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, TNF- α , MCP-1 e inibidor do ativador do plasminogênio 1 (PAI-1) (Hernandez et al., 2021; Mehta et al., 1988; Neschen et al., 2006). Tendo em vista que os adipócitos secretam eicosanóides com ação pró-inflamatória, já foi descrito que uma dieta rica em ômega-3 diminui a síntese de eicosanóides provenientes do ácido araquidônico, ácido graxo da família dos ômega-6, incluindo tromboxano A₂ (TXA₂) e PGE₂ de adipócitos 3T3-L1 *in vitro*, uma vez que EPA compete com o ácido araquidônico pela incorporação nas membranas celulares (Wortman et al., 2009). Além disso, os n:3 PUFAs estão envolvidos na diminuição de citocinas, como IL-1, IL-6 e TNF- α , cujas concentrações são elevadas nos casos de obesidade (Kalupahana et al., 2011).

1.5. Câncer

O câncer está entre as principais causas responsáveis pelo aumento do número de óbitos na população mundial, ocupando a segunda colocação, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS). Os fatores responsáveis pelo aumento da doença estão correlacionados tanto a fatores extrínsecos, como o uso do tabagismo, álcool, falta de exercício físico, a má alimentação e o alto índice de massa corporal, quanto intrínsecos, incluindo hormônios, condições imunológicas e mutações genéticas (Anand et al., [s.d.]). Outras razões para o aumento do número de mortes estão correlacionadas ao diagnóstico tardio e ausência de tratamento de qualidade, especialmente, em países de baixa e média renda. O impacto na economia devido ao câncer também é bastante preocupante, pois estima-se que em 2010 foram gastos em torno de US\$ 1,16 trilhão com a doença, sendo significativo e maior que do ano anterior (OPAS).

O nome câncer é dado a um conjunto de doenças, cuja característica em comum envolve o crescimento anormal e desordenado de células, podendo ter qualquer tecido ou órgão como origem (WEINBERG, 2015). O surgimento de neoplasias malignas está relacionado ao descontrole do ciclo celular e ao desequilíbrio da morte celular levando a formação de tumores primários. As células tumorais podem se deslocar do seu local de origem através da migração por via sanguínea ou linfática e dar origem a novas tumores secundários, processo conhecido como metástase. Como consequência, os novos órgãos e tecidos afetados perdem sua função original ocasionando o desequilíbrio da homeostase do organismo (Fares et al., 2020).

Outro traço marcante das neoplasias malignas abrange o princípio da heterogeneidade tumoral, pois muitas vezes considera-se um tumor sendo uma entidade homogênea, quando na realidade pode ser constituído por vários tipos de células com características e comportamentos bem distintos uns dos outros. Esse aspecto é resultado das alterações genéticas e epigenéticas desenvolvidas durante o desdobramento da doença (Dagogo-Jack & Shaw, 2018). Além disso, os tumores interagem e modulam o microambiente aos quais estão inseridos, constituindo um ambiente propício e favorável para manutenção e proliferação de células cancerosas (Whiteside, 2008). Assim, o grau de heterogeneidade constitui uma barreira para a abordagem terapêutica das neoplasias, pois devido à grande complexidade e variedade de tumores, terapias com alvos gerais muitas vezes tornam-se ineficazes ao combate da doença.

As terapias mais decorrentes envolvem cirurgia, quimioterapia, radioterapia e transplante de medula óssea, sendo em alguns casos, necessário a combinação de mais de uma modalidade (J. A. Kim, 2003). Entretanto, tais terapias favorecem apenas a erradicação do tumor primário sendo pouco eficazes no combate de células tumorais em tecidos distantes do tumor primário, como também no caso de metástases. Alguns tipos de câncer, incluindo o melanoma, devido à alta capacidade de metástase e mutação, têm demonstrado resistência às terapias atuais, o que eleva a taxa de letalidade da doença (Czarnecka et al., 2020).

1.6. Melanoma

O melanoma é um tipo de câncer de pele que se origina nos melanócitos, que são as células produtoras de melanina, substância responsável pela pigmentação e proteção contra a radiação solar. Embora, o câncer de pele seja o mais frequente no Brasil e corresponda a 30% de todos os tumores malignos registrados no país, o melanoma representa apenas 3% das neoplasias malignas do órgão. Trata-se de um câncer extremamente agressivo e invasivo em decorrência de sua alta capacidade metastática, tornando-o a neoplasia de pele mais letal. Estima-se que cerca de 8450 novos casos de melanoma surgiram em 2020, sendo mais frequente em adultos de cor de pele branca (INCA, 2020).

O surgimento do melanoma pode ocorrer nas regiões da pele, membranas mucosas, nos olhos e nas meninges (Ali et al., 2013). Nos estágios iniciais, as células malignas crescem horizontalmente entre as camadas da derme e epiderme e apresentam um comportamento mais benigno, fase chamada de crescimento radial. Mais tarde, essas células invadem a derme reticular ou o subcutâneo e podem, posteriormente, invadir os vasos linfáticos e sanguíneos causando metástases, caracterizando a fase de crescimento vertical (Balois & Amar, 2014). O prognóstico do melanoma pode ser considerado bom quando detectado em sua fase inicial, pois sua excisão precoce é a forma mais eficiente de reduzir a mortalidade de indivíduos doentes (Lideikaitė et al., 2017). Além da remoção, outros tratamentos como imunoterapia, terapia alvo, quimioterapia e radioterapia podem ser utilizados em casos mais graves (Domingues et al., 2018). Os principais fatores de risco para o surgimento do melanoma englobam: coloração de pele clara, fatores hereditários, radiação solar UV, pintas congênitas, nevos, bem como a obesidade (Conforti & Zalaudek, 2021).

O tecido adiposo está relacionado com o desenvolvimento do melanoma devido a sua proximidade com o tecido adiposo subcutâneo encontrado na camada da hipoderme (Figura 4). Ademais, os sinais endócrinos secretados pelos adipócitos dos demais tecidos adiposos branco e marrom podem atuar como um fator crítico na fisiopatologia do câncer. Um estudo mostrou que a obesidade induzida por dieta em camundongos C57BL/6 aumenta a progressão do melanoma através da ativação da via AKT (Pandey et al., 2012). Além disso, os produtos secretados pelos adipócitos como lipídios, quimiocinas, fatores inflamatórios e adipocinas, incluindo leptina, podem estar relacionados com a progressão do melanoma (Olszańska et al., 2021). Pacientes obesos apresentam aumento dos receptores de fatores de crescimento como insulina e IGF-1, os quais estão envolvidos com a progressão do melanoma e em modelos pré-clínicos podem promover a

proliferação, migração e evasão da morte celular de células de melanoma (L. K. Smith et al., 2020).

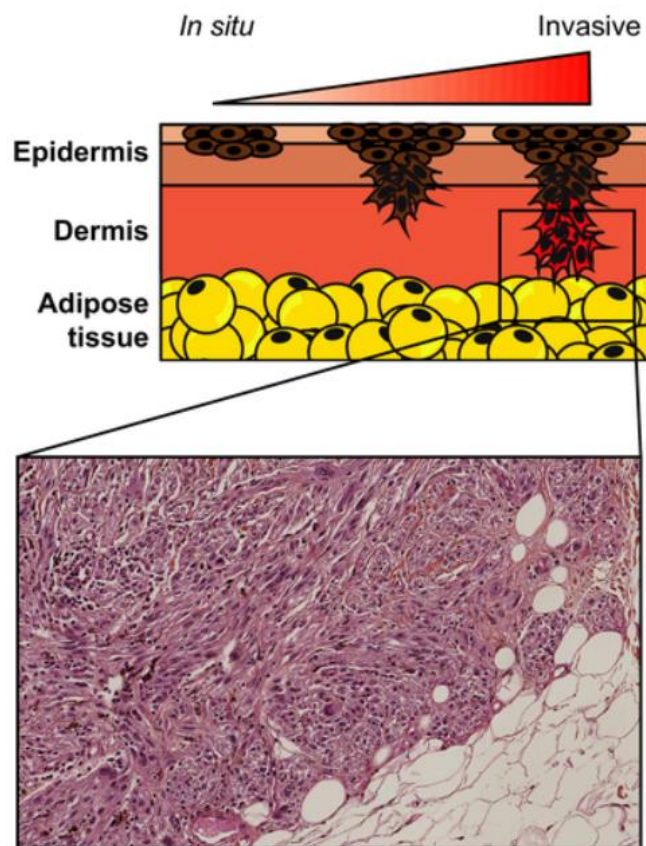


Figura 4. Proximidade entre o tecido adiposo subcutâneo e o melanoma. À medida que o melanoma se torna agressivo e invade as camadas mais profundas da pele, as células tumorais entram em contato com o tecido adiposo subcutâneo. Fonte: Clement, E.; Lazar, I.; Muller, C.; Nieto, L. 2017. Obesity and melanoma: could fat be fueling malignancy?

1.7. Morte celular

O mecanismo de morte celular é essencial para a manutenção da homeostase dos seres vivos. Nesse processo, moléculas que possam causar o desequilíbrio, seja por modificação genética, perda de função ou por excessiva proliferação são removidas do organismo. Além disso, o desencadeamento da morte celular é de suma importância para o combate de patógenos e eliminação de células tumorais (Strasser & Vaux, 2020). O processo de morte celular é tradicionalmente dividido em dois principais tipos, a morte celular acidental causada por danos graves de natureza física e química, o qual não apresenta correlação com nenhuma via celular específica. E a morte celular regulada,

dependente da ativação de uma maquinaria molecular específica podendo sofrer intervenções genéticas e farmacológicas (Galluzzi et al., 2018).

A apoptose é um tipo de morte celular regulada caracterizada por típicas alterações morfológicas como, perda de volume, condensação da cromatina, fragmentação celular e posteriormente formação de corpos apoptóticos, os quais são fagocitados pelos macrófagos sem ativação do processo inflamatório (Hu & Zheng, 2008). Existem duas vias apoptóticas principais, a via extrínseca e intrínseca. A sequência de eventos da via extrínseca se inicia com a interação entre os sinais de morte provenientes do meio extracelular e os receptores de morte, receptor do fator de necrose tumoral (TNFR), Fas e receptor ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL), presentes na membrana plasmática. O então complexo formado receptor/ligante é responsável pela ativação direta de caspase-8. Quando ativada, a caspase-8 iniciadora cliva e ativa as caspases efetoras 3,6 e 7, levando a morte celular (Elmore, 2007). Já a via intrínseca envolve a participação das mitocôndrias, onde ocorre a translocação de proteínas apoptóticas da família das Bcl-2, incluindo Bax e Bad, bem como do citocromo c, os quais serão liberadas no citoplasma levando a formação do apoptosomo e posterior ativação das caspases desencadeadoras da apoptose (Opferman & Kothari, 2018).

Por outro lado, a morte celular regulada por necrose resulta no aumento do volume celular, agregação da cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática e consequente ruptura celular com o extravasamento do conteúdo intracelular. Outros processos como, disfunção mitocondrial, aumento da geração de espécies reativas de oxigênio, depleção de ATP, proteólise generalizada também fazem parte desse tipo de morte (Syntichaki & Tavernarakis, 2002). Já a piroptose é um tipo de morte celular regulada inflamatória dependente de caspases (1, 4 e 5 em humanos, e 1 e 11 em murinos), e leva a formação de poros na membrana. Além das caspases, o inflamassoma, a proteína Gasdermin-D, e citocinas pró-inflamatórias IL-1 e IL-18 são de suma importância para o desencadeamento da piroptose (Bergsbaken et al., 2009).

1.8. Piroptose

A piroptose é um tipo de morte celular regulada com caráter lítico mediada por caspases inflamatórias. As principais características relacionadas a esse tipo de morte envolvem o aumento do volume celular, perda da integridade da membrana pela formação

de poros, fragmentação nuclear e condensação da cromatina, além da presença de caspases inflamatórias (Bergsbaken et al., 2009). Atualmente, são descritas duas vias responsáveis pelo desencadeamento da piroptose, a via canônica e a via não canônica.

A via canônica é ativada pela interação entre os receptores de reconhecimento padrão (PRRs), contidos nas membranas celulares, e os DAMPs e PAMPS, presentes no espaço extracelular. Após essa interação, os PRRs se oligomerizam para formar um complexo multiprotéico conhecido como inflamassoma. Esse complexo é composto por um domínio de pirimidina responsável pelo recrutamento de moléculas adaptadores que levam a ativação de pró-caspase-1 em caspase-1 ativa. A caspase-1 cliva e ativa as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18, que irão induzir uma inflamação local e sistêmica. É também durante esse processo que ocorre a translocação da proteína da caixa 1 do grupo de alta mobilidade (HMGB1) do núcleo para o citoplasma. A caspase-1 também é responsável por levar a clivagem e ativação da proteína Gasdermin-D. Esta possui uma porção N-terminal, o qual será direcionada para a membrana plasmática através da interação com cardiolipinas e fosfatidilinosítídeos. A oligomerização da porção N-terminal induz a formação de poros na membrana com cerca de 12-14 nm de diâmetro interno, conseqüentemente, levando à lise celular (Figura 5) (Shi et al., 2017).

Já a via não canônica foi identificada após a descoberta de uma rota alternativa, no qual, a caspase-1 não estava envolvida. A ativação dessa via não canônica é mediada pela interação entre caspase-11 e o lipopolissacarídeo (LPS) citoplasmático. LPS é componente presente nas membranas celulares de bactérias gram-negativas que podem sinalizar, independente de PRRs, a caspase-11. Juntos eles formam um complexo por meio da ligação do domínio CARD da caspase-11 com o lipídeo A do LPS. Após a oligomerização desse complexo, os eventos se assemelham ao da via canônica com a clivagem e ativação de pró-IL-1 β e pró-IL-18 e posterior formação de poros pela Gasdermin-D (Pellegrini et al., 2017).

Recentemente, estudos vêm mostrando que a ativação da piroptose pode ser um possível alvo para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para doenças de base inflamatória, incluindo o câncer. Já é descrito na literatura a capacidade dos ácidos graxos poli-insaturados de ômega em induzir piroptose no câncer de mama e inibir o crescimento de células de câncer de ovário (Pizato et al., 2018; West et al., 2020). Além disso, uma pesquisa mostrou que o DHA diminui a expressão de mRNA da proteína 4 contendo o domínio CARD da família NLR (NLRC4), ativação de caspase 1 e a secreção de citocinas

pró inflamatórias causadas pelo palmitato em células de hepatocarcinoma (G. Li et al., 2017). Os n:3 PUFAs também podem atuar sobre o inflamassoma em macrófagos, reduzindo, conseqüentemente, a secreção de citocinas pró inflamatórias no ambiente (Shen et al., 2017). Sendo assim, os n:3 PUFAs se mostram-se bastante promissores na modulação da morte celular piroptótica. Porém, esse mecanismo ainda não foi relatado em muitos tipos de câncer, em especial o melanoma.

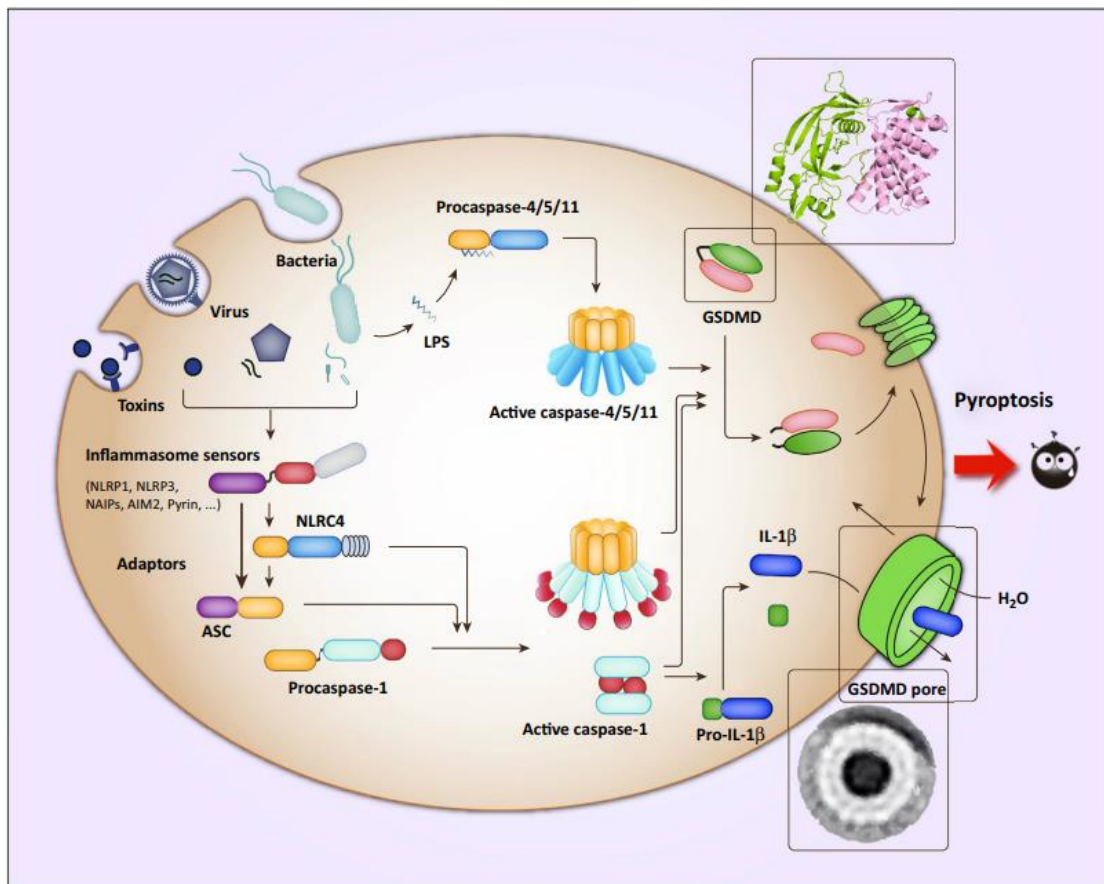


Figura 5. Geração de poros na membrana plasmática induzida pela ativação de GSDMD durante a piroptose mediada por caspases. A piroptose é caracterizada pela formação de inflamassomos, por ativação de caspase 1, e posteriormente de GSDMD, gerando a formação de poros na membrana plasmática, além do desencadeamento da inflamação mediada por citocinas. Fonte: Shi, J., Gao, W., & Shao, F. 2017. Pyroptosis: Gasdermin-Mediated Programmed Necrotic Cell Death.

2. Justificativa

Os ácidos graxos poli-insaturados ômega-3, conhecidos como n:3 PUFAs, possuem funções biológicas essenciais para a homeostase do organismo, uma vez que apresentam mecanismos protetores contra o estabelecimento de doenças metabólicas, como o câncer e a obesidade. Estudos mostram a capacidade do DHA de induzir morte celular por apoptose e piroptose em alguns tipos de câncer como, por exemplo, o de mama. Ademais, os n:3 PUFAs apresentam ação direta no tecido adiposo modulando adipocinas e citocinas secretadas pelos adipócitos. O tecido adiposo é um órgão endócrino com alta plasticidade fenotípica, quando desregulado pode desempenhar inúmeros papéis favoráveis ao desenvolvimento de diferentes patologias, em especial, o câncer. O melanoma, um tipo de câncer de pele com alta frequência no Brasil, possui elevada capacidade metastática e altos índices de mortalidade. Contudo, pouco se sabe sobre a função dos tecidos adiposos sobre o melanoma metastático *in vivo* e em *in vitro*. Além disso, a ação imunomodulatória do ômega-3 sobre os diferentes tecidos adiposos e a sua função sobre a sobrevivência/viabilidade de células de melanoma, bem como na indução de morte celular por piroptose, é bastante escassa na literatura. Portanto, é de suma importância uma melhor compreensão sobre o papel diferencial dos tecidos adiposos branco e marrom em relação aos mecanismos envolvidos com a progressão do melanoma metastático, assim como investigar os efeitos dos n:3 PUFAs sobre os tecidos adiposos e células tumorais de melanoma em busca de novas moléculas coadjuvantes capazes de interferir na progressão tumoral.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Investigar o papel da suplementação com ômega-3 (DHA) sobre o perfil inflamatório do tecido adiposo branco e marrom, e sua função sobre as células de melanoma.

3.2. Objetivos específicos

A) Analisar se o ômega-3 (DHA) modula o perfil morfológico e inflamatório dos animais suplementados;

B) Verificar se produtos de secreção de tecidos adiposos brancos e marrons, dos animais suplementados com ômega-3 (DHA), modulam a sobrevivência/viabilidade de células de melanoma murino;

C) Caracterizar a morte celular por piroptose nas células MeWo tratadas com DHA.

4. Metodologia

4.1. Modelo animal

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 de 8 semanas, concedidos pelo biotério do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília. Os animais foram mantidos sob condições específicas, em ambiente livre de patógenos, em *racks* isolados e ventilados, a 23 ± 1 ° C em ciclo de luz / escuro de 12 horas, com livre disponibilidade de água e ração *ad libitum*. O manuseio dos camundongos estava de acordo com as normas institucionais sobre ética em experimentos com animais aprovadas pelo Comitê de Ética em Uso Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, SEI n.23106.102647/2022-14.

4.2. Suplementação com o ácido docosaexanóico (DHA)

Para a suplementação dos animais foram utilizadas cápsulas de ômega-3 à base de óleo de peixe enriquecidos em DHA (1500mg de DHA e 300mg de EPA, Vitafor). Os animais tratados receberam a dose de 1g/kg diariamente durante 35 dias, enquanto que os animais do grupo controle receberam água filtrada, ambos via oral utilizando uma micropipeta. Após os 35 dias, todos os camundongos foram eutanasiados para posteriores análises. A escolha dose foi estabelecida com base em estudos que mostram que a concentração de 1g/kg equivale a uma dieta rica em lipídios (Soni et al., 2019), além do seu potencial em trazer benefícios ao organismo e modular o desenvolvimento tumoral em modelos murinos (Fasano et al., 2017).

4.3 Culturas celulares

Células B16F10: Células tumorais de melanoma murino (*Mus musculus*), foram cultivadas com DMEM (meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco) adquirido da Sigma-Aldrich, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina + estreptomicina em uma incubadora a temperatura de 37°C com uma atmosfera contendo 5% de CO₂.

Células MeWo: linhagem de células derivadas do melanoma humano (*Homo sapiens*). Foram cultivadas em meio RPMI 1640 obtidos da Gibco (Life Technologies, MD, EUA), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino, 1% Penicilina/Estreptomicina e mantidas em estufa úmida a 37 °C e 5 % de CO₂.

BMDM (Bone Marrow Derived Macrophage) foram utilizados a fim de avaliar *in vitro* o efeito do DHA em células não tumorais. As células foram coletadas do fêmur e tíbia de camundongos da linhagem C57/BL6 e cultivadas em placas de Petri com meio R20/30, sendo 10 ml de meio RPMI 1640 (Gibco, Life Technologies, MD, EUA), 1% de penicilina/estreptomicina e 30% de sobrenadante de cultura de células L929 (LCCM - L-Cell Conditioned Media) como uma fonte de M-CSF (do inglês Macrophage Colony-Stimulating Factor). Após 4 dias, mais 8ml de meio R20/30 foram acrescentadas as placas de Petri, sendo que no sétimo dia os macrófagos diferenciados foram desaderidos e plaqueados para análises posteriores.

4.4. Produto de secreção do tecido adiposo

O BAT foi coletado da região supraescapular e o WAT da região subcutânea, visceral e gonadal dos camundongos C57BL6, suplementados ou não com DHA, sendo transferidos para placas de 6 poços contendo meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) + 10% de soro fetal bovino adicionado a 1% de penicilina + estreptomicina, o qual foram mantidos em incubadora a 37°C com 5% CO₂ por 24h. Após esse período, foi coletado o produto de secreção, em seguida, centrifugado a 1800 RPMI por 10 minutos sendo retirado apenas o sobrenadante e armazenado a -80°C.

4.5. Estímulo com produto de secreção dos tecidos adiposos

As células tumorais B16F10 foram estimuladas por 48h com o meio de cultura DMEM contendo os produtos de secreção dos tecidos adiposos marrons e brancos, suplementado ou não com DHA, na proporção 2:1, sendo duas partes de produto de secreção do tecido adiposo para uma parte de meio de cultura contendo 10% de soro fetal bovino, 1% penicilina/estreptomicina, mantidos em incubadora a 37°C contendo 5% CO₂.

4.6. Estímulo com o DHA

O DHA (Sigma-Aldrich) foi usado na concentração estoque de 40mM tendo sido diluído em etanol absoluto (J.T.Baker) e armazenado, protegido da luz, a -20 °C em um frasco de vidro previamente autoclavado. Para o estímulo das células MeWo e do BMDM, foram utilizadas as concentrações 12,5 µM, 25 µM, 50 µM e 100 µM de DHA, sendo adicionados os volumes requeridos em frascos de vidro autoclavados. Após a espera do processo de evaporação do etanol, foi-se adicionado meio de cultura RPMI, correspondente a cada diluição, e posteriormente, os frascos foram sonicados por 10 minutos, em temperatura ambiente, para abertura das cadeias lipídicas. Em seguida, as células foram estimuladas com suas respectivas concentrações e mantidas na estufa a 37°C com 5% CO₂.

4.6. Peso corporal e dos órgãos

O peso corporal, dos animais suplementados ou não com ômega-3, foi mensurado diariamente até o dia da eutanásia em uma balança de precisão. Após a eutanásia, foram pesados os seguintes órgãos: tecido adiposo branco gonadal (gWAT), subcutâneo (sWAT) e BAT, fígado e baço.

4.7. Histologia dos órgãos e análise morfológica

Para o processo histológico, os órgãos: tecido adiposo branco gonadal, (gWAT), branco subcutâneo (sWAT), tecido adiposo visceral (vWAT), BAT, fígado e baço, foram fixados em formalina 37-41%, posteriormente, desidratados em soluções alcoólicas crescentes (70%, 80%, 90% e 100%), seguido da desparafinização utilizando Xilol I e II e emblocados em parafina. Em seguida, cortes microscópicos entre 8 e 12 micrômetros foram feitos e corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE). As lâminas histológicas foram examinadas no microscópio óptico Olympus BX51, escaneadas no equipamento Aperio Scanscope CS. As imagens foram obtidas no software Aperio ImageSCO e analisadas no software Adiposoft para mensuração da área dos adipócitos, sendo utilizado três campos diferentes de cada lâmina representativa por grupo.

4.8. Aquisição de células do lavado peritoneal

A lavagem da cavidade peritoneal, afim de se obter células peritoneais, foi feita injetando 3mL de DMEM refrigerado dentro do peritônio. Logo em seguida, o meio foi recolhido e centrifugado a 300G por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em DMEM para análises posteriores.

4.9. Produção de Espécies reativas de oxigênio

Com o intuito de analisar a formação de espécies reativas de oxigênio nas células do lavado peritoneal dos camundongos suplementados ou não com DHA, foi utilizada a sonda não fluorescente 2',7' Diclorodihidrofluoresceína-diacetato (DFC-DA), a qual é permeável à membrana celular. Quando na presença de espécies reativas de oxigênio, esse composto é oxidado e gera um composto fluorescente chamado 2',7' – diclorofluoresceína (DFC) no interior da célula. As células do lavado peritoneal foram incubadas com a sonda DFC-DA na concentração de 20 µM por 30 minutos a 37°C protegida da luz. Após a marcação, as células foram lavadas 3 vezes com a solução salina tamponada com fosfato (PBS) 1X e ressuspensas em 400µM com o fixador PFA 1%. A leitura das amostras foi feita por citometria de fluxo, utilizando o equipamento FACS Calibur no canal FL-1 em escala logarítmica. A análise dos dados foi feita no software FlowJo V10 (Tree Star Inc).

4.10. Biogênese de corpúsculos lipídicos

Tendo-se como objetivo avaliar a formação de corpúsculos lipídicos (CLs), nas células do lavado peritoneal dos camundongos suplementados ou não com DHA, foi utilizado a sonda fluorescente lipofílica, BODIPY 493/503 (Life technologies), cuja função está relacionada a identificação de lipídeos neutros intracelulares presentes em grandes quantidades em CLs. As células do lavado peritoneal foram marcadas com a solução de Bodipy/PBS 1x na concentração de 1/5000 por 30 minutos a 4°C ao abrigo de luz. Após a marcação, as células foram lavadas 2 vezes com PBS1X e ressuspensas em 400µM com o fixador PFA 1%. A leitura das amostras foi feita por citometria de fluxo, utilizando o equipamento FACS Calibur no canal FL-1 em escala logarítmica. A análise dos dados foi feita no software FlowJo V10 (Tree Star Inc).

4.11. Dosagem de Citocinas

A análise da secreção de citocinas foi realizada no BAT e WAT dos camundongos C57/BL6 suplementados ou não com DHA, nas células do lavado peritoneal, células B16F10 estimuladas com o produto de secreção do tecido adiposo branco e marrom dos animais suplementados ou não com DHA, bem como nas células MeWo tratadas ou não com DHA. Para a quantificação de citocinas no BAT e WAT foi realizada a coleta e congelamento dos tecidos adiposos em nitrogênio líquido para posterior extração de proteínas. Já para as células do lavado peritoneal, células B16F10 estimuladas com o produto de secreção, e para as células MeWo tratadas com DHA, após 48h, foram coletados os sobrenadantes para dosagem. Foi utilizado para a dosagem de citocinas o método ELISA de acordo com as instruções do fabricante, e as placas foram lidas no espectrofotômetro SpectraMax M3 (Molecular Devices, Sunnyvale, EUA) com o comprimento de onda de 450 nm. Os níveis de citocinas foram apresentados em níveis absolutos (pg/mL).

4.12. Viabilidade mitocondrial

A fim de verificar os possíveis efeitos dos produtos de secreção do sWAT e do BAT sobre a viabilidade das células B16F10, foi realizado o ensaio colorimétrico de MTT, o qual consiste na reação de redução do composto, de coloração amarela, MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio brometo) em cristais de formazan, cuja coloração é roxa, pela ação das enzimas desidrogenases mitocondriais. As células B16F10 foram semeadas em placas de 96h com densidade celular de 5×10^3 por poço. Posteriormente, foram estimuladas com os produtos de secreção dos tecidos adiposos por 48h. Após esse período, foi adicionado às células uma solução de MTT (Thermo Fisher 5mg/ml), contendo 10% de MTT em meio DMEM sem SFB. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e os cristais de formazan foram dissolvidos utilizando-se 100 μ L de DMSO. Para a leitura da absorbância foi utilizado um comprimento de onda de 570 nm no espectrofotômetro Spectramax M3. Células expostas ao agente citotóxico DMSO foram utilizadas como controle do respectivo experimento. A análise dos dados de viabilidade foi feita utilizando o software GraphPad Prism, considerando a média do valor

de absorvância do não-estimulado como 100% de viabilidade e analisando os outros grupos de forma proporcional.

4.13. Morte Celular

Para análise de morte celular apoptótica e lítica das células B16F10 estimuladas com o produto de secreção do tecido adiposo dos animais suplementados ou não com DHA, as células foram marcadas com Anexina V-FITC e Iodeto de propídeo (PI), e analisadas em citômetro FACS Calibur (BD Biosciences). O ensaio consiste na capacidade da Anexina V em interagir com a fosfatidilserina quando exposta na face externa da membrana celular de células em processo de morte por apoptose. Em células normais, a fosfatidilserina está localizada na parte interior da membrana plasmática. Já o Iodeto de propídeo atua como um agente intercalante de ácidos nucléicos (o DNA ou RNA), marcando as células em processo de morte lítica, cuja membranas foram rompidas. As células foram plaqueadas em placas de 24 poços com densidade celular de 10^5 por poço, e estimuladas com o produto de secreção de WAT e BAT por 48h. Após o estímulo, as células foram desaderidas e colocadas em tubos eppendorf onde foram lavadas 2x com PBS e centrifugadas a 1500 RPM por 5 minutos. Em seguida, as células foram marcadas com 2,5µL de Anexina e 2,5 µL de solução de Iodeto de Propídeo – PI em 95 µL de binding buffer. As células foram incubadas por 15 minutos protegidas da luz à temperatura ambiente. Após essa etapa, as células foram lavadas uma vez com PBS 1 X, ressuspendidas em 400 µL de tampão de ligação 1 X (PFA) e imediatamente analisadas no citômetro utilizando os canais FL-1 e FL-3, ambos em escala exponencial. Os dados obtidos foram analisados utilizando o software FlowJo V10 (Tree Star Inc). Células aquecidas à 100 °C por 10 minutos foram utilizadas como controle do respectivo experimento.

4.14. Detecção de LDH

Visando investigar a citotoxicidade celular induzida pelo DHA nas células MeWo e do BMDM, foi realizado o ensaio colorimétrico de detecção de LDH no espaço extracelular. Esse ensaio se baseia no fato de que a liberação de LDH no meio de cultura celular circundante é resultado de danos causados à membrana plasmática, sendo assim, proporcional ao número de células que sofreram morte lítica. O LDH extracelular pode

ser quantificada por uma reação enzimática acoplada, na qual o LDH catalisa a conversão de lactato em piruvato via redução de NAD⁺ em NADH. A enzima Diaforase então usa NADH para reduzir um sal de tetrazólio em vermelho de formazan. As células MeWo e do BMDM foram plaqueadas em placas de 96 poços com densidade celular de 5×10^4 e 1×10^5 , respectivamente, por poço. Posteriormente, foram estimuladas com o DHA nas concentrações de 12,5 μ M, 25 μ M, 50 μ M e 100 μ M. Após o respectivo tempo de 48h, os sobrenadantes das células foram coletados e transferidos para uma nova placa, onde foi acrescentado uma mistura de reação, proveniente do kit CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay (Invitrogen™). Após esse período foi utilizado uma solução de parada. A leitura da absorbância foi realizada em dois comprimentos de onda, 490 nm e 680nm, utilizando o espectrofotômetro *Spectramax M3*. A análise dos dados de % de citotoxicidade foi feita utilizando o software GraphPad Prism, considerando a subtração entre os dois valores de absorbância. Como controle do experimento foi utilizado o LDH controle positivo.

4.15. Ativação de caspase-1

Com o intuito de avaliar se o tratamento com DHA afeta a ativação de caspase-1 nas células MeWo, foi utilizado uma sonda fluorescente FAM-FLICA (FAM-YVAD-FMK caspase-1 FLICATM Kit, Immunochemistry Technologies) segundo as instruções do fabricante. Essa sonda fluoresce quando se liga aos quatro resíduos de aminoácidos (YVAD) expostos pela caspase-1 ativada. As células MeWo foram plaqueadas em placas de 24 poços com densidade celular de 10^5 por poço e estimuladas com o DHA nas concentrações de 25 μ M e 50 μ M no tempo de 24h. Após esse período, as células foram coletadas, lavadas com binding buffer e marcadas com a solução de trabalho por 30 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas e novamente levadas para serem adquiridas no citômetro de fluxo (FACS Calibur - BD Biosciences) utilizando o canal FL-1 em escala exponencial. Os dados foram analisados utilizando o software FlowJo V10 (Tree Star Inc).

4.16. Perda da integridade da membrana

Para análise da perda da integridade da membrana plasmática das células MeWo, quando estimuladas com DHA, foi avaliado a emissão de fluorescência de forma cinética

pelo PI, esse composto é impermeável a célula, porém quando a membrana plasmática sofre alguma ruptura, o PI migra para o espaço intracelular e interage com os ácidos nucleicos emitindo fluorescência. As células MeWo foram plaqueadas em placas de 96 poços de paredes escuras com densidade celular de 10^5 por poço, sendo adicionado o PI (1000 $\mu\text{g/ml}$) aos estímulos com DHA nas concentrações de 25 μM e 50 μM em meio RPMI sem vermelho de fenol suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de Penicilina/Estreptomicina. Após o estímulo, a fluorescência do PI foi detectada no espectrofotômetro Spectramax durante 8h em intervalos de 30 minutos entre as leituras. Foi utilizado o comprimento de excitação de 538 nm e de 617 nm de emissão. Os dados estatísticos gerados foram analisados utilizando o software *GraphPad Prism*.

4.17. Estresse oxidativo

O estresse oxidativo foi analisado nas células MeWo estimuladas com diferentes concentrações DHA. Para a quantificação de espécies reativas de oxigênio foi utilizado a sonda não fluorescente CellROX Deep Red Reagent, o qual é permeável a célula. Esse composto, quando na presença de espécies reativas de oxigênio é oxidado, emitindo fluorescência no citoplasma. As células MeWo foram plaqueadas em placas de 24 poços com densidade celular de 10^5 por poço e estimuladas com o DHA nas concentrações de 25 μM e 50 μM no tempo de 24h. Após o estímulo, as células foram incubadas com o CellROX Deep Red Reagent (5 μM) por 30 minutos a 37°C e, posteriormente, lavadas 3 vezes com PBS 1X. As amostras foram lidas no citômetro de fluxo (FACS Calibur - BD Biosciences) utilizando o canal FL-1 em escala exponencial. Os dados foram analisados utilizando o software FlowJo V10 (Tree Star Inc).

4.18. Análises estatísticas

Os dados gerados foram analisados estatisticamente utilizando o programa GraphPadPrism v.9.0.0. Afim de se determinar as diferenças estatísticas apenas entre as condições dos animais suplementados ou não com DHA foi realizado o teste T. Já para condições envolvendo os tratamentos *in vitro* com DHA foi considerado os testes one-way ou two-way ANOVA sendo, posteriormente, aplicados os pós testes indicados para cada caso. Significância estatística foi considerada quando $p \leq 0.05$.

5. Resultados

5.1. A suplementação com ômega-3, enriquecido em DHA, não altera o peso corporal, mas reduz o peso dos tecidos adiposos gonadal, subcutâneo e marrom.

Com o intuito de se avaliar o efeito da suplementação com ômega-3 sobre o peso corporal dos camundongos C57/BL6, foi realizada a suplementação com cápsulas de ômega-3, contendo alta concentração de DHA, durante 35 dias. Durante esse período, os camundongos foram pesados semanalmente, e após o último dia de suplementação foi feito uma curva de ganho de peso. A partir dos dados obtidos, nós observamos um aumento do ganho de peso de todos os animais submetidos a esse experimento. Entretanto, não houve diferença de peso dos animais suplementados com ômega-3 quando comparados com os animais do grupo controle (Figura 6A). Após a eutanásia dos animais, ao fim do experimento, foi também realizado a pesagem dos tecidos adiposos branco gonadal, (gWAT), branco subcutâneo (sWAT) e marrom (BAT), sendo possível identificar uma redução significativa do peso de todos os tecidos adiposos dos animais suplementados em relação ao grupo controle (Figura 6B, C e D).

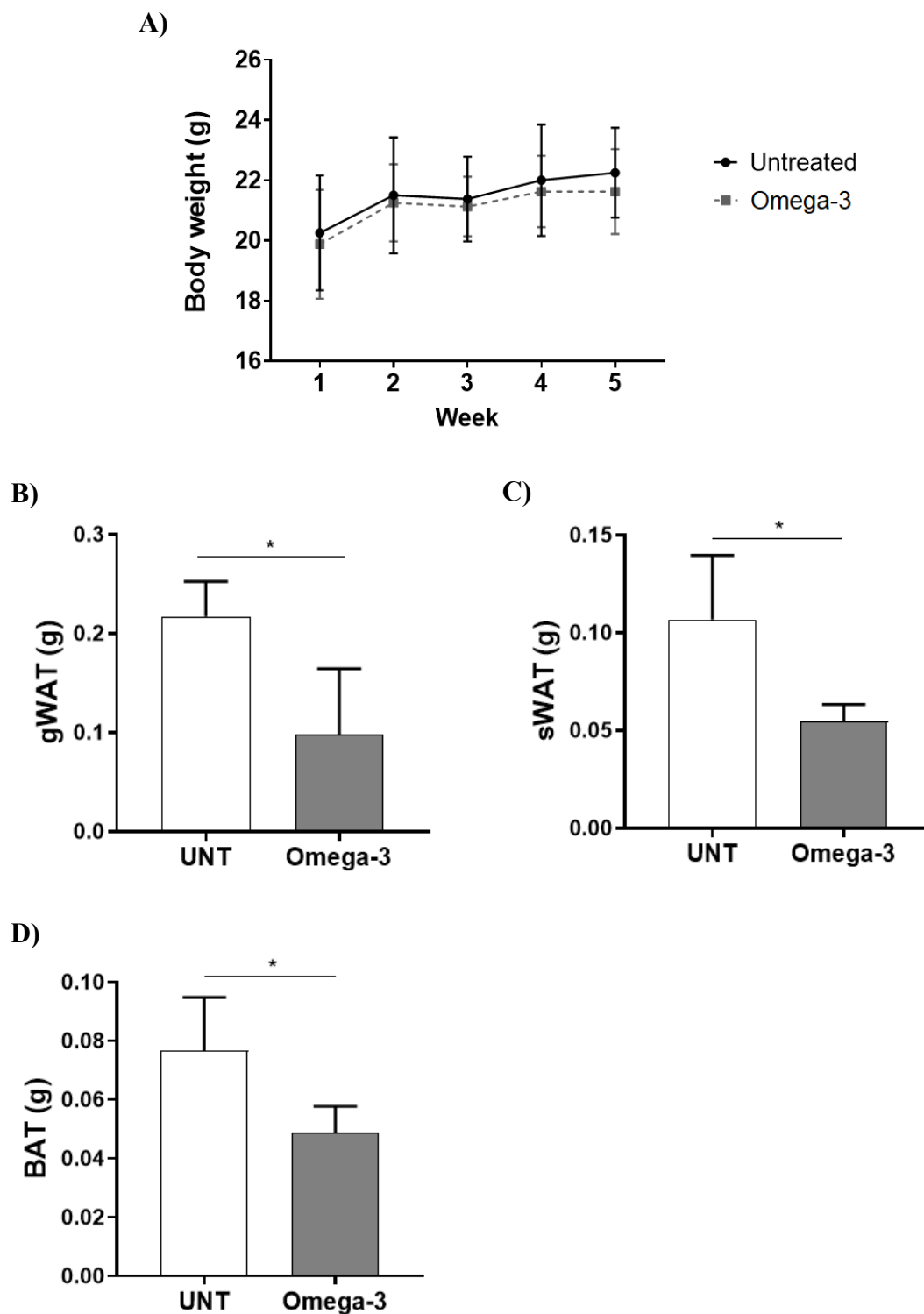


Figura 6. A suplementação com ômega-3, enriquecido em ácido DHA, modula o peso dos tecidos adiposos gonadal, subcutâneo e marrom sem alterar o peso corporal. Os animais foram pesados semanalmente durante cinco semanas de suplementação gerando uma curva de ganho de peso (A). Logo após a eutanásia, os tecidos adiposos gonadal (gWAT) (B), subcutâneo (sWAT) (C) e marrom (D) foram pesados. Os resultados estão expressos em forma de média \pm desvio padrão, sendo a diferença estatística significativa representada por (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (UNT) indicado por Test T.

5.2. A suplementação com ômega-3, enriquecido em DHA, reduz a área dos adipócitos do gWAT.

Tendo em vista analisar o efeito da suplementação com ômega-3 sobre a morfologia dos tecidos adiposos gWAT, sWAT, visceral (vWAT) e BAT foi realizado lâminas histológicas com coloração em Hematoxilina-Eosina (Figura 7A-H), assim como a análise da área dos adipócitos de cada tecido adiposo pelo adiposoft. Os presentes resultados mostraram que a suplementação com ômega-3 induziu uma diminuição na área dos adipócitos do gWAT comparado aos mesmos tecidos de animais não suplementados (Figura 7I). Em relação ao sWAT, vWAT e BAT não foi observado nenhuma alteração morfológica ou diferença significativa da área dos adipócitos do grupo suplementado com ômega-3 quando comparado com os do grupo não suplementado (Figura 7J, K eL).

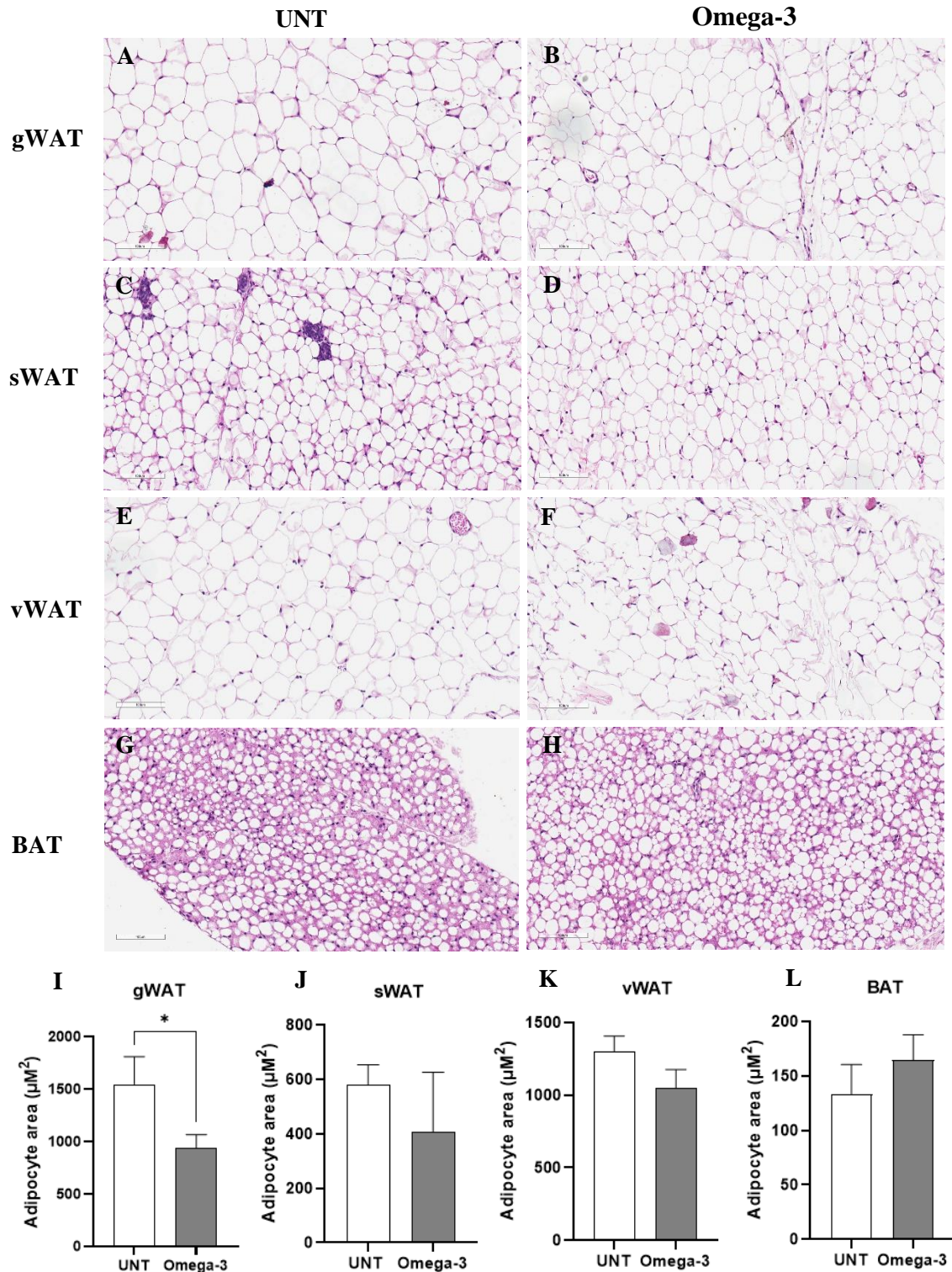


Figura 7. A suplementação com ômega-3, enriquecido em ácido DHA, reduz a área dos adipócitos do tecido adiposo gonadal. Histologia dos tecidos adiposos gonadal (gWAT) (A-B), subcutâneo (sWAT) (C-D), visceral (vWAT) (E-F) e marrom (BAT) (G-H) com coloração em HE. Área dos adipócitos de gWAT (I), sWAT (J), vWAT (K) analisados pelo adiposoft. UNT: grupo controle; Omega-3: grupo suplementado com ômega-3, enriquecido em DHA. Os resultados estão expressos em forma de média \pm desvio padrão, sendo a diferença estatística significativa representada por (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (UNT) indicado por Test T.

5.3. A suplementação com ômega-3, enriquecido em DHA, reduz os níveis das citocinas TGF- β e MCP-1 no BAT.

Buscando investigar o papel da suplementação com ômega-3, enriquecido em DHA, sobre a secreção de citocinas pelos gWAT e BAT, foi dosado as citocinas TGF- β , MCP-1, IL-6 e TNF- α por meio do ensaio de ELISA. Nossos dados demonstraram que os tecidos adiposos branco e marrom não apresentam diferença significativa na secreção das citocinas TGF- β , MCP-1, e IL-6 (Figura 8A, B e D). Contudo, a suplementação com ômega-3, enriquecido em DHA, no BAT mostrou-se capaz de reduzir significativamente os níveis da citocina TGF- β e da quimiocina MCP-1 em comparação com o BAT do grupo controle (Figura 8A e B). Apesar do gWAT secretar mais TNF- α do que o BAT, a suplementação com ômega-3 não modulou os seus níveis (Figura 8C).

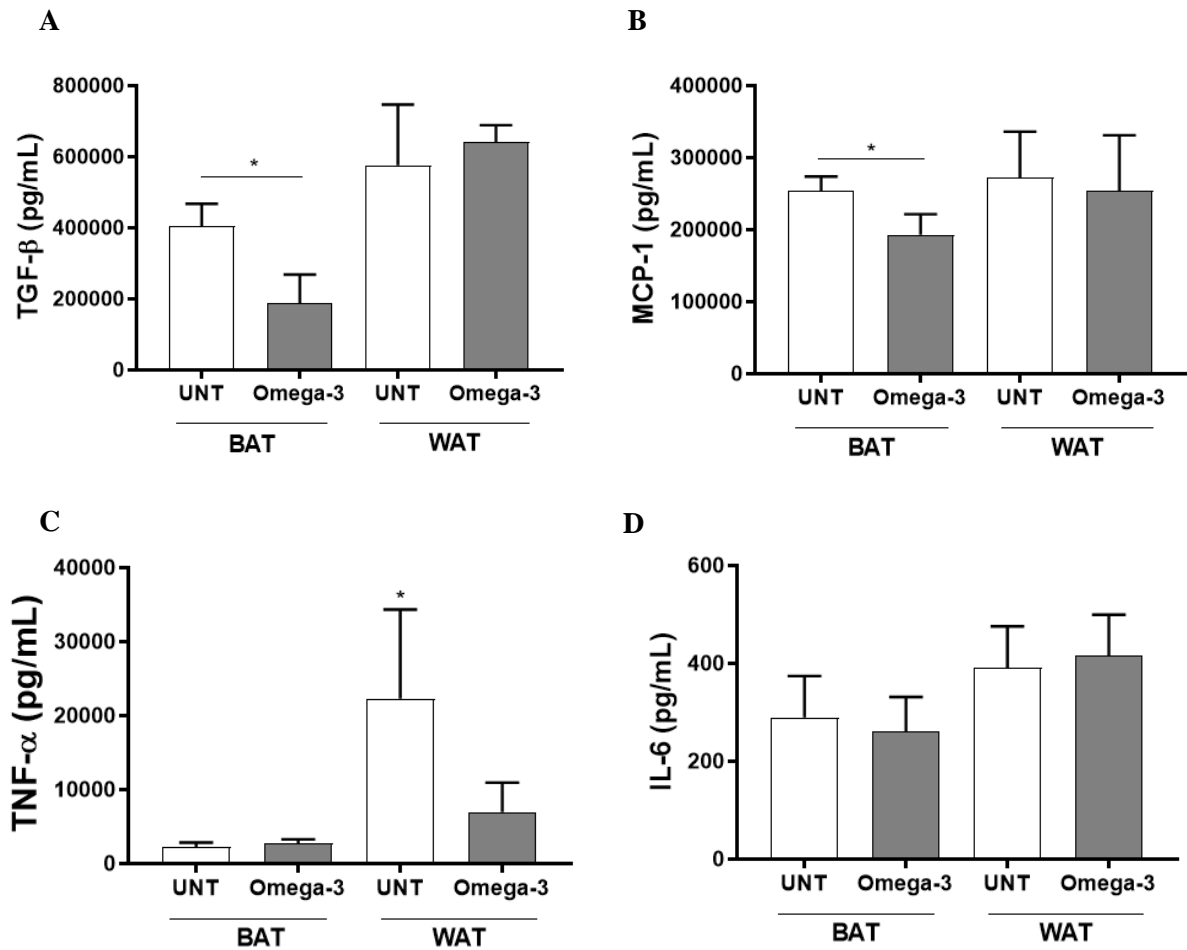


Figura 8. A suplementação com ômega-3, enriquecido em DHA, no tecido adiposo marrom modula os níveis da citocina TGF-β e da quimiocina MCP-1. Dosagem de citocinas dos tecidos adiposos branco gonadal (WAT) e marrom (BAT) realizada pelo método de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). TGF-β - Fator de transformação do crescimento β (A); MCP1 - proteína quimioatraente de monócito 1 (B); TNF-α - fator de necrose tumoral α (C); IL-6 - Interleucina 6 (D). UNT: grupo controle; Omega-3: grupo suplementado com ômega-3, enriquecido em DHA. Os resultados estão expressos em forma de média ± desvio padrão, sendo a diferença estatística significativa representada por (*) $p < 0,05$ em relação

5.4. A suplementação com ômega-3, enriquecido em DHA, não altera a morfologia e o peso do fígado e do baço.

A fim de se avaliar a capacidade da suplementação com ômega-3, enriquecido em DHA, em modular a morfologia e o peso do fígado e do baço, foram realizados a coleta e a pesagem em uma balança de precisão desses dois órgãos, após a eutanásia dos animais descritos nesse experimento. Posteriormente, foram feitas lâminas histológicas do fígado e do baço com coloração Hematoxilina-Eosina. Conforme observado na Figura 9A-D, não foi observado nenhuma alteração na arquitetura tecidual do fígado e baço dos animais suplementados com ômega-3, assim como nenhuma modulação no peso dos mesmos (Figura 9E e F). Sendo assim, os resultados sugerem que a suplementação com ômega-3, enriquecido em DHA, não causa hepatoesplenomegalia.

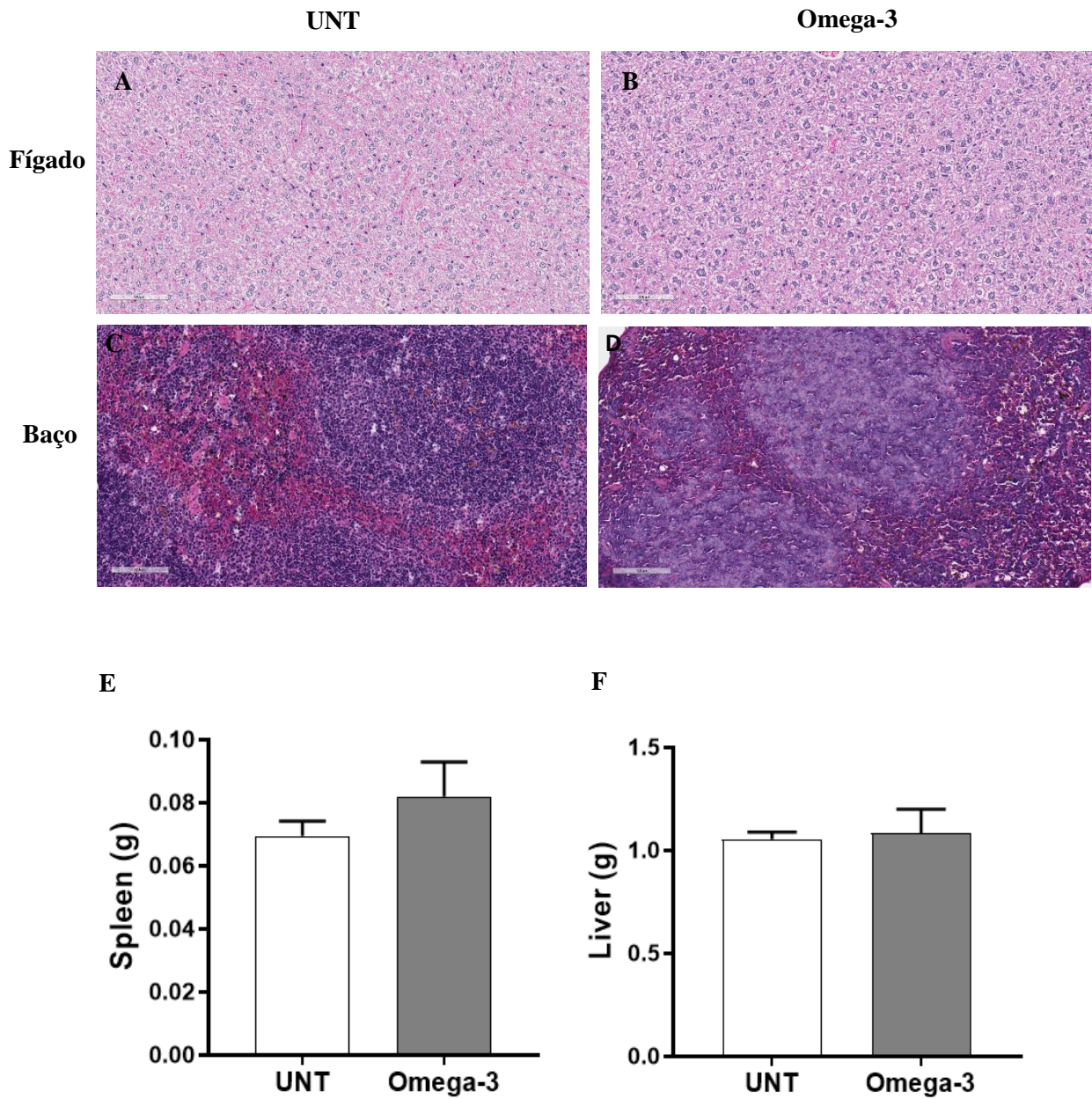


Figura 9. A morfologia e o peso do fígado e do baço não são moduladas pela suplementação com ômega-3, enriquecido em DHA. Histologia do fígado (A-B) e do baço (C-D) com coloração HE. Peso do fígado (E) e do (F). UNT: grupo controle; Omega-3: grupo suplementado com ômega-3, enriquecido em DHA. Os resultados estão expressos em forma de média \pm desvio padrão indicado por Test T.

5.5. A suplementação com ômega-3, enriquecido em DHA, aumenta a biogênese de corpúsculos lipídicos, reduz a formação de espécies reativas de oxigênio, e não modula a secreção de citocinas das células do lavado peritoneal.

Com o objetivo de investigar se a suplementação com ômega-3, enriquecido em DHA, possui influência sobre a biogênese de corpúsculos lipídicos das células do lavado peritoneal, foi realizada a lavagem da cavidade peritoneal, e as células obtidas foram marcadas com a sonda fluorescente BODIPY e analisadas por citometria de fluxo. Conforme os resultados gerados, as células do lavado peritoneal dos camundongos tratados com ômega-3, enriquecido em DHA aumenta a biogênese de corpúsculos lipídicos em relação ao grupo não suplementado (Figura 10A).

Também foi avaliado se a suplementação com ômega-3, enriquecido em DHA, estaria induzindo estresse oxidativo nas células do lavado peritoneal, sendo utilizado a sonda fluorescente DFC-DA para a marcação. De acordo com a figura 5B é possível observar redução significativa da formação de espécies reativas das células provenientes do grupo tratado com ômega-3 quando comparado com as do grupo controle (Figura 10B).

Para a análise da secreção de citocinas dessas mesmas células, foi feita a extração de proteínas, e posterior, quantificação das citocinas TGF- β , MCP-1 e IL-6, por meio do ensaio de ELISA. Os níveis das citocinas TGF- β e IL-6 não foram detectados. Apesar dos níveis de MCP-1 terem sido detectados, não houve nenhuma alteração significativa nos níveis dessa citocina entre o grupo tratado com ômega-3 e o grupo não tratado (Figura 10C).

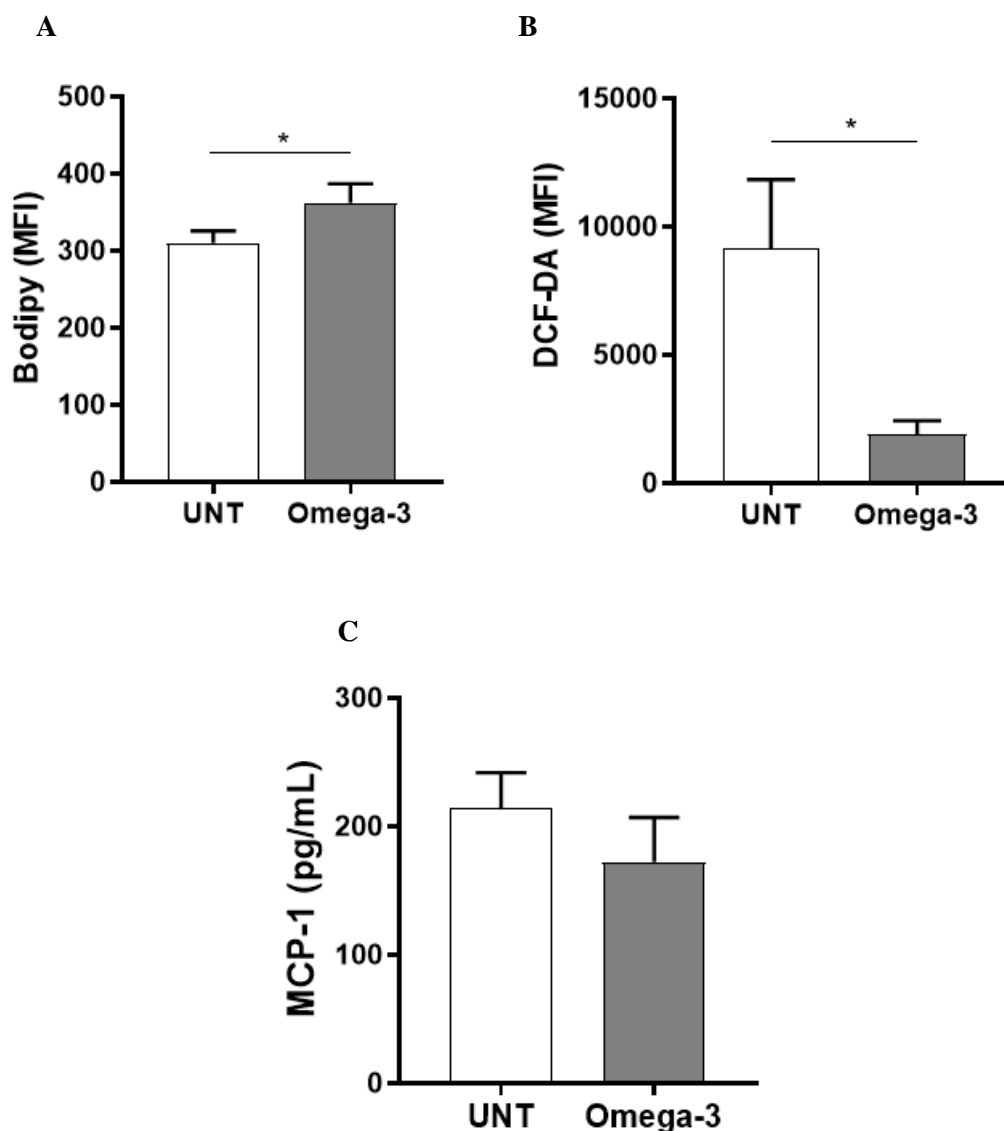


Figura 10. A suplementação com ômega-3, enriquecido em DHA, aumenta a biogênese de corpúsculos lipídicos e reduz a formação de espécies reativas de oxigênio, apesar de não modular a secreção da citocina MCP-1 das células do lavado peritoneal. Biogênese de corpúsculos lipídicos (A) e formação de espécies reativas de oxigênio (B) em células peritoneais de animais suplementados ou não com ômega-3. A marcação foi feita em pool de células dos animais de cada grupo com sonda Bodipy e DFC-DA. As barras representam os valores da média de intensidade de fluorescência (MFI) adquiridos a partir de leitura feita por FACS no canal FITC/FL1. Quantificação de MCP-1 (C) de células do lavado peritoneal foi realizada pelo ensaio de ELISA. UNT: grupo controle; Omega-3: grupo suplementado com ômega-3, enriquecido em DHA. Os resultados estão expressos em forma de média \pm desvio padrão, sendo a diferença estatística significativa representada por (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (UNT) indicado por Test T.

5.6. A suplementação com ômega-3, enriquecido em DHA diminui os níveis das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e IL-12 no soro.

A produção exacerbada de citocinas no soro é um dos indicativos da desregulação do sistema imune. Com base nisso, avaliamos se a suplementação com ômega-3, enriquecido em DHA, modula o perfil das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 e anti-inflamatória IL-10 no soro dos animais, através do ensaio colorimétrico ELISA. De acordo com os nossos dados, o tratamento com ômega-3 reduz de maneira significativa os níveis das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e IL-12 no soro com relação ao grupo controle (Figura 11A-E), sugerindo que a suplementação com ômega-3, enriquecido em DHA, atua a nível sistêmico.

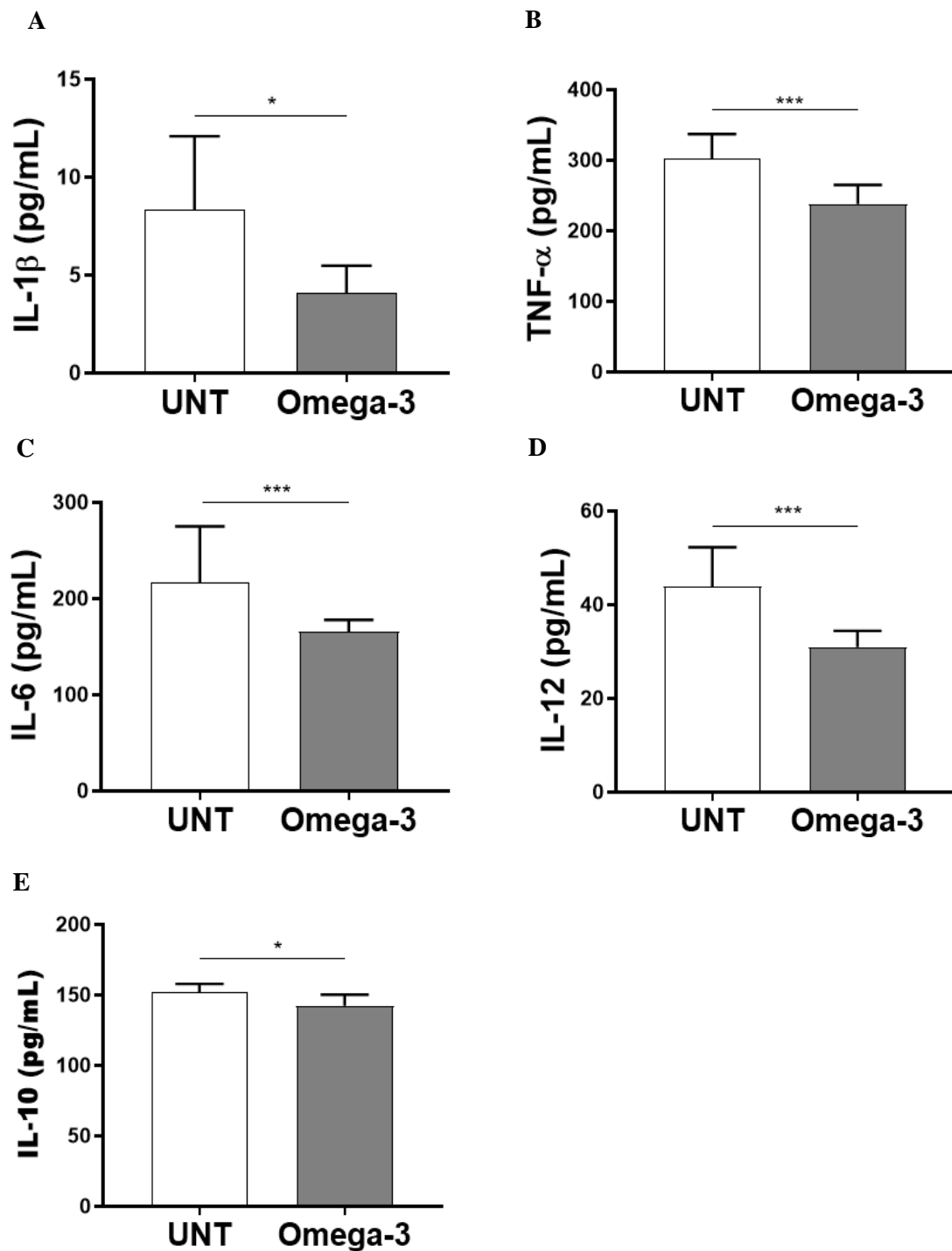


Figura 11. Redução dos níveis das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e IL-12 no soro pela suplementação com ômega-3, enriquecido em DHA. Quantificação de IL-1 β , (A) TNF- α (B), IL-6 (C) e IL-12 (D) e IL-10 (E) do soro, dos animais suplementados ou não com ômega-3, realizada pelo ensaio de ELISA. UNT: grupo controle; Omega-3: grupo suplementado com ômega-3, enriquecido em DHA. Os resultados estão expressos em forma de média \pm desvio padrão, sendo a diferença estatística significativa representada por (*) $p < 0,05$, () $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$ em relação ao grupo controle (UNT) indicado por Test T.**

5.7. O produto de secreção do tecido adiposo marrom, dos animais suplementados com ômega-3, enriquecido em DHA, reduz drasticamente a viabilidade mitocondrial das células B16F10.

Para avaliar se o produto de secreção dos tecidos adiposos branco e marrom, dos camundongos tratados com ômega-3, enriquecido em DHA, influencia a viabilidade mitocondrial das células B16F10, foi realizado o ensaio colorimétrico de MTT. Após 48h de estímulo com os produtos de secreção de BAT e WAT nas células de melanoma murino, foi possível observar que mesmo na ausência da suplementação com ômega-3, os produtos de secreção de BAT e WAT induzem significativamente perda da viabilidade mitocondrial das células B16F10 em comparação com o não-estimulado. Contudo, o produto de secreção de BAT, dos animais suplementados com ômega-3, enriquecido em DHA, induziram mais ainda a perda da viabilidade mitocondrial das células B16F10 quando comparados com o grupo não suplementado, sugerindo que o produto de secreção de BAT, dos animais tratados com ômega-3, enriquecido em DHA, é extremamente citotóxico para as células B16F10. O mesmo não foi observado para o produto de secreção de WAT do grupo suplementado (Figura 12).

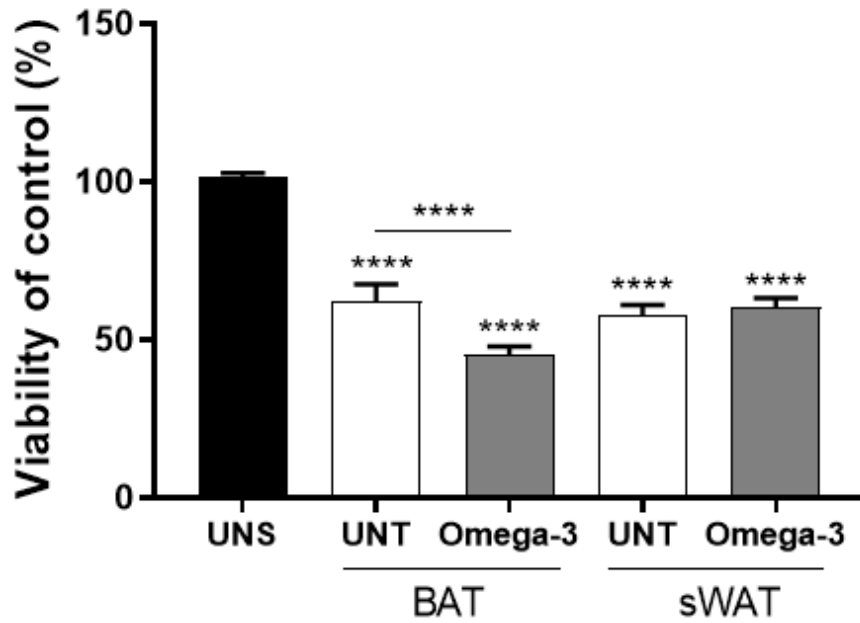


Figura 12. O produto de secreção do tecido adiposo marrom, dos animais suplementados com ômega-3, enriquecido em DHA, reduz drasticamente a viabilidade mitocondrial das células **B16F10**. As células B16F10 foram estimuladas com o produto de secreção dos tecidos adiposos branco (WAT) e marrom (BAT) por 48 horas. Após os estímulos, as células foram expostas ao MTT e a citotoxicidade foi calculada a partir das médias dos percentuais de células vivas em relação às células não-estimuladas (UNS), a quais foram consideradas 100 % vivas. Os resultados estão expressos em forma de média \pm desvio padrão, sendo a diferença estatística significativa representada por (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$, (****) $p < 0,0001$ indicado por Anova.

5.8. O produto de secreção tecido adiposo marrom, dos animais suplementados com ômega-3, enriquecido em DHA, aumenta a morte celular das células B16F10.

Com o objetivo de averiguar se os produtos de secreção de BAT e WAT são capazes de modular o perfil de morte lítica e apoptótica das células B16F10 foi realizado a dupla marcação com Anexina-V fluorescente (FL-1) e iodeto de propídeo (FL-3), após 48h de estímulo. Nós observamos que de acordo com os dados gerados pela citometria de fluxo, o produto de secreção de BAT, na ausência da suplementação com ômega-3, aumenta cerca de 22% da população positiva de células para Anexina-V em relação ao não-estimulado, demonstrando um aumento de morte por apoptose pelo produto de secreção de BAT. Esse evento foi mais ainda intensificado nos animais suplementados com ômega-3, enriquecido em DHA, ocorrendo um aumento de 23,9 % de células mortas por apoptose em relação as células estimuladas com BAT na ausência da suplementação. Em contrapartida, apesar de estímulo com o produto de secreção de WAT, na ausência da suplementação com ômega-3, aumentar cerca de 27,2% da população positiva de células para Anexina-V em relação ao não-estimulado, não foi possível observar nenhuma diferença significativa em relação ao estímulo com o produto de secreção de WAT dos animais suplementados. (Figura 13A, B, C e D).

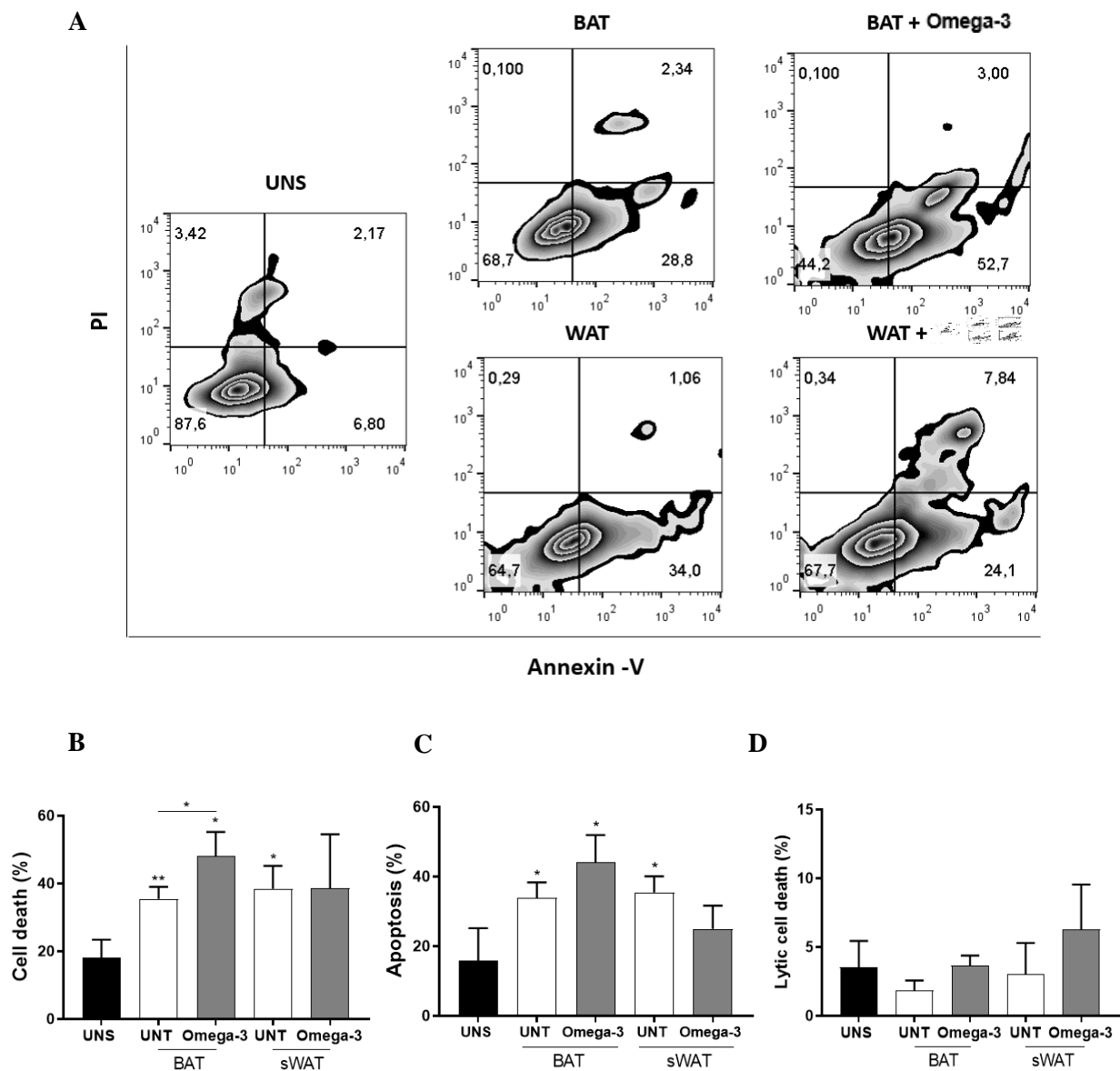


Figura 13. Aumento de morte celular das células B16F10 pelo produto de secreção tecido adiposo marrom dos animais suplementados com ômega-3, enriquecido em DHA. Células B16F10 foram estimuladas por 48 horas com o produto de secreção de tecidos adiposos brancos e marrons de animais suplementados ou não com ômega-3, enriquecido em DHA. Após estímulo, células foram marcadas com as sondas Anexina V (FL-1) e o Iodeto de Propídeo (FL-3) e analisados por citometria de fluxo (FACS Calibur) e no software FlowJ. A quantificação da morte total, apoptótica, e lítica foi analisada pelo GraphPad Prism Version 9.0 e representada em gráfico de barras, onde os resultados estão expressos em forma de média \pm desvio padrão, sendo a diferença estatística significativa representada por (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ indicado por Anova.

5.9. O produto de secreção do tecido adiposo branco, dos animais tratados com ômega-3, enriquecido em DHA, reduz a secreção das citocinas IL-6 e TGF- β pelas células B16F10. Já o produto de secreção do tecido adiposo marrom reduz apenas IL-6.

Buscando avaliar os efeitos dos produtos de secreção de BAT e WAT, dos animais suplementados com ômega-3, enriquecido em DHA, sobre a secreção de citocinas pelas células B16F10, foi feito o ensaio imunoenzimático ELISA. Após 48h de estímulo, nós realizamos a extração proteica e dosamos os níveis de duas citocinas, IL-6 e TGF- β . A partir dos dados obtidos, podemos observar que as células B16F10 estimuladas com o produto de secreção de BAT e WAT secretam mais IL-6 e TGF- β do que as células não-estimuladas (Figura 14A e B). Todavia, é possível verificar uma redução significativa de IL-6 e TGF- β pelas células estimuladas com o produto de secreção de WAT dos animais suplementados com ômega-3, enriquecido em DHA, em comparação ao grupo controle (Figura 14A e B). Com relação ao produto de secreção de BAT, do grupo tratado, houve apenas redução significativa da citocina IL-6 pelas células de melanoma murino (Figura 14A).

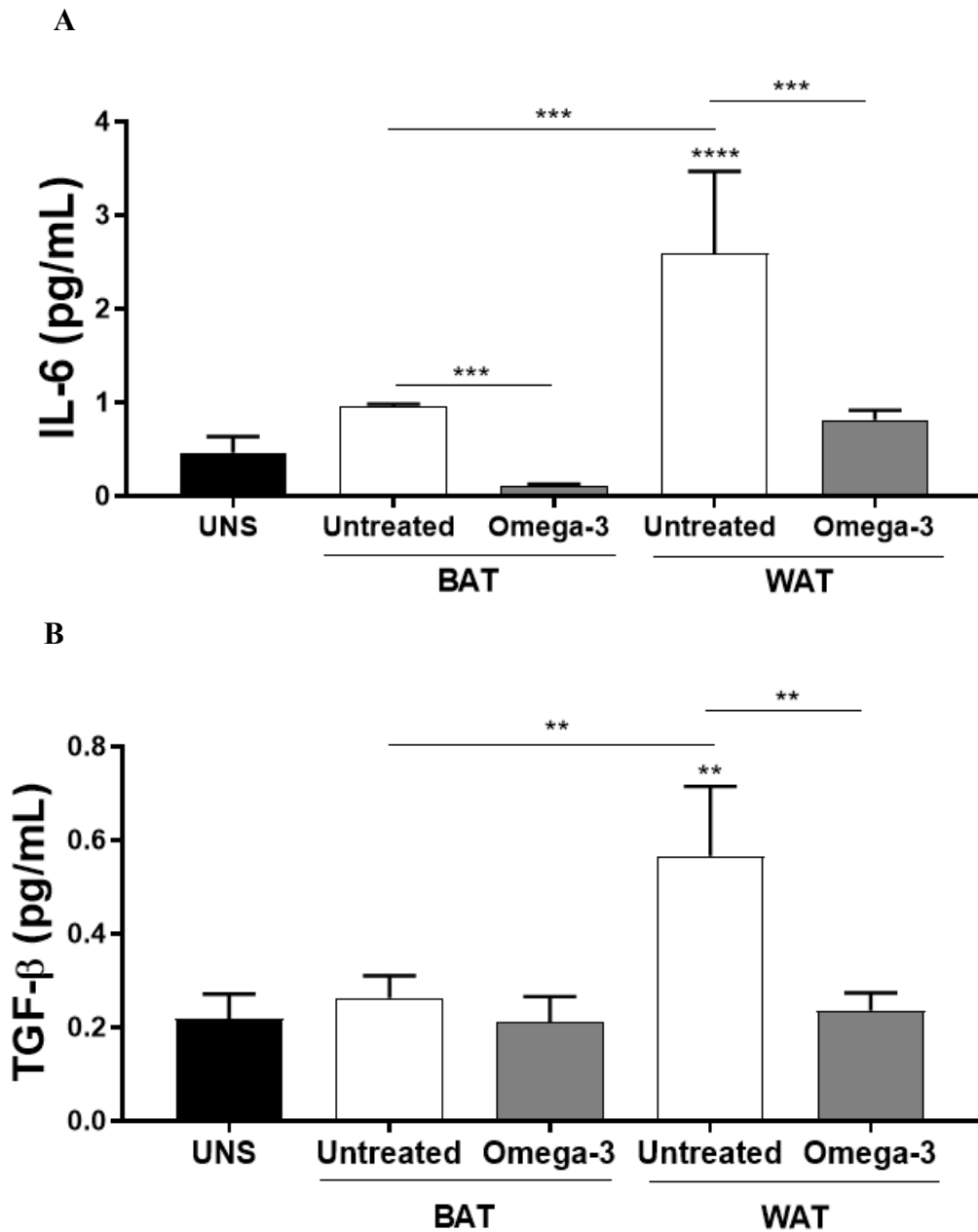


Figura 14. O produto de secreção do tecido adiposo branco, dos animais tratados com ômega-3, enriquecido em DHA, reduz a secreção das citocinas IL-6 e TGF- β pelas células B16F10. Já o produto de secreção do tecido adiposo marrom reduz apenas IL-6. As células B16F10 foram estimuladas com o produto de secreção dos tecidos adiposos branco (WAT) e marrom (BAT), dos animais suplementados ou não com ômega-3, enriquecido em DHA, por 48 horas. Após os estímulos, foi dosado as citocinas IL-6 (A) e TGF- β (B) do sobrenadante das células pelo ensaio de ELISA. Untreated: grupo controle; Omega-3: grupo suplementado com ômega-3, enriquecido em DHA. Os resultados estão expressos em forma de média \pm desvio padrão, sendo a diferença estatística significativa representada por (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$ indicado por Anova.

5.10. O DHA induz a secreção de LDH das células de melanoma humano (MeWo).

Buscando investigar se o DHA apresenta efeito sobre a secreção da enzima LDH no meio extracelular das células MeWo, realizamos o ensaio de citotoxicidade de LDH. A análise foi feita após 48h de estímulo com as concentrações de 12 μ M, 25 μ M, 50 μ M e 100 μ M de DHA nas células MeWo. Observamos um aumento da secreção de LDH a partir da concentração de 25 μ M, 50 μ M e 100 μ M quando comparados com o não-estimulado, não apresentando diferença significativa entre as concentrações (Figura 15). Nossos dados sugerem um efeito citotóxico do DHA nas células MeWo em diferentes concentrações, não sendo dose-dependente.

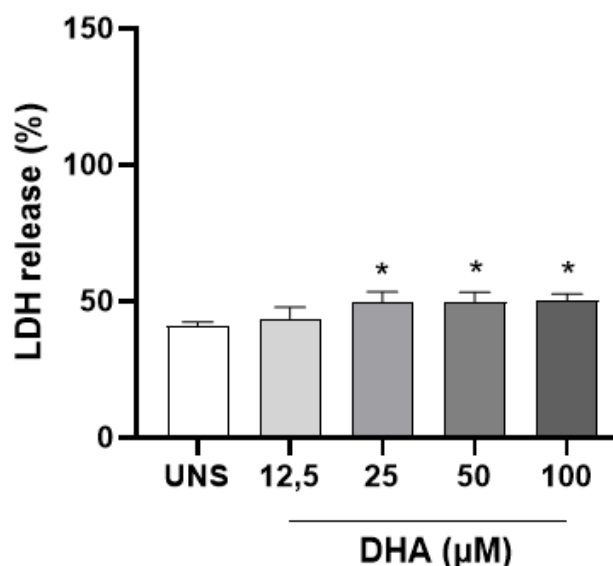


Figura 15. Indução da secreção de LDH nas células de melanoma humano (MeWo) pelo estímulo com DHA. Células MeWo foram estimuladas com DHA nas concentrações de 12,5 μ M, 25 μ M, 50 μ M e 100 μ M por 48 horas. Os valores de liberação de LDH foram calculados conforme a orientação do fabricante a partir dos percentuais de células vivas em relação às células não-estimuladas (UNS), as quais foram consideradas 100 % vivas. Os resultados estão expressos em forma de média \pm desvio padrão, sendo a diferença estatística significativa representada por (*) $p < 0,05$ indicado por Anova.

5.11. O DHA induz a secreção de LDH em macrófagos apenas em altas concentrações e tempos tardios.

A fim de se analisar se o DHA induz citotoxicidade em células não tumorais, foi realizado o ensaio colorimétrico de secreção da enzima Lactato Desidrogenase (LDH) no meio de cultura proveniente de macrófagos extraídos por BMDM. Após 24h e 48h do estímulo com DHA nas concentrações de 12,5 μM , 25 μM , 50 μM e 100 μM , nossos dados mostraram que não houve nenhuma diferença significativa entre as concentrações e o não-estimulado (Figura 16A e B). Por outro lado, após 72h do estímulo, as concentrações de 50 μM e 100 μM levaram a um aumento significativo da secreção LDH em relação ao não estimulado (Figura 16C). Esse resultado sugere que altas concentrações de DHA apenas em tempos tardios, *in vitro*, induzem citotoxicidade em células não tumorais.

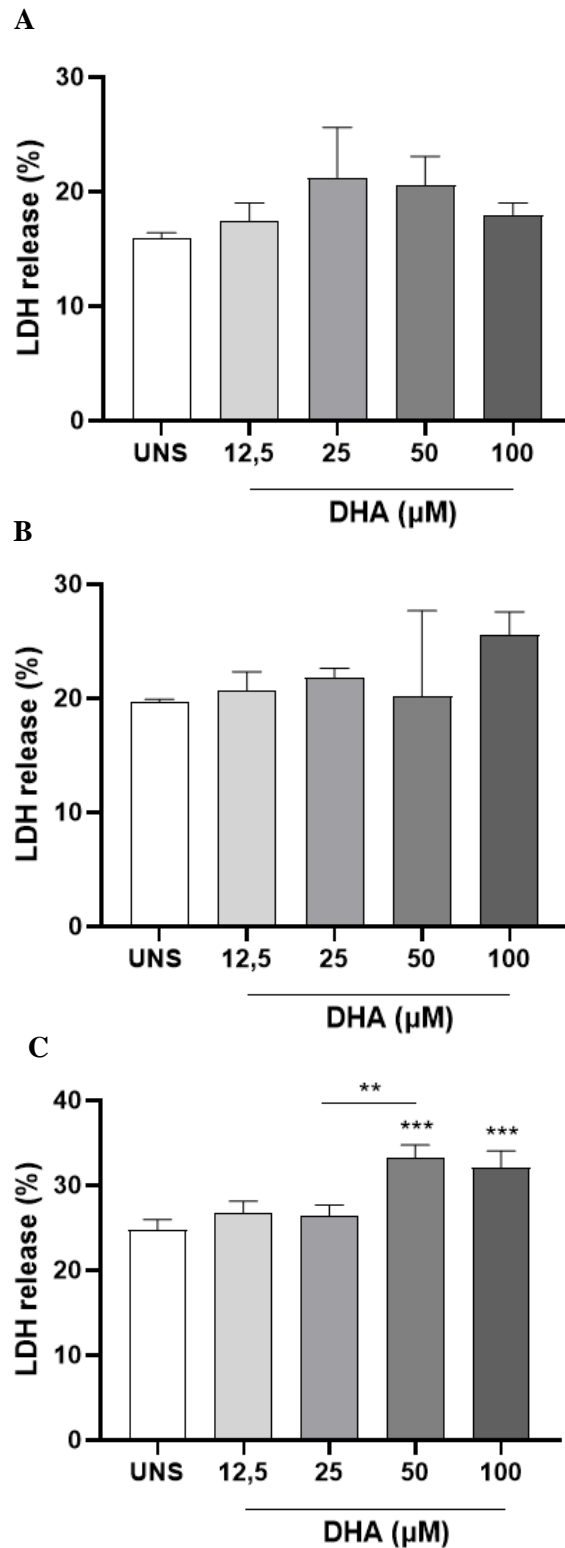


Figura 16. O DHA induz a secreção de LDH em macrófagos apenas em altas concentrações e tempos tardios. Células provenientes do BMDM estimuladas com DHA nas concentrações de 12,5 μM, 25 μM, 50 μM e 100 μM por 24 horas (A), 48 horas (B) e 72 horas (C). Os valores de liberação de LDH foram calculados conforme a orientação do fabricante a partir dos percentuais de células vivas em relação às células não-estimuladas (UNS), as quais foram consideradas 100 % vivas. Os resultados estão expressos em forma de média ± desvio padrão, sendo a diferença estatística significativa representada por (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$ indicado por Anova.

5.12. O DHA induz a perda da integridade da membrana plasmática das células de melanoma humano.

Para avaliar se o DHA causa ruptura na membrana plasmática das células MeWo, investigamos a perda da integridade da membrana usando o ensaio de captação de iodeto de propídio (PI). As células MeWo foram expostas ao PI em conjunto com os estímulos apenas nas concentrações de 25 μM e 50 μM durante 8 horas. Conforme verificado na Figura 17A, ambas as concentrações de DHA induziram perda da integridade da membrana plasmática das células MeWo quando comparadas com as células não-estimuladas, não sendo observado nenhuma diferença significativa entre as concentrações (Figura 17B). Esse resultado sugere a capacidade do DHA em causar danos na membrana plasmática das células MeWo independente da concentração.

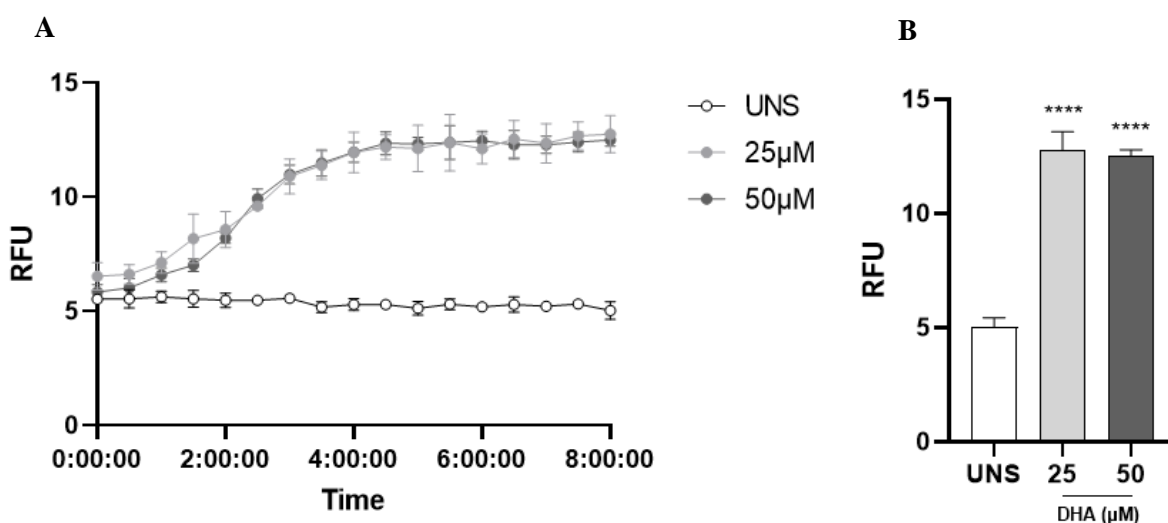


Figura 17. Análise da perda da integridade da membrana plasmática das células MeWo estimuladas com DHA. Células MeWo foram estimuladas com DHA nas concentrações 25 μM e 50 μM e exposta ao iodeto de propídio durante 8 horas com intervalos de 30 minutos entre as leituras no espectrofotômetro. Os gráficos foram gerados através do GraphPad Prism Version 9.0 e estão expressos em forma de média \pm desvio padrão, sendo a diferença estatística significativa representada por (****) $p < 0,0001$ indicado por Anova.

5.13. O DHA induz a ativação de caspase-1 nas células MeWo.

Após a análise dos resultados de citotoxicidade e perda da integridade da membrana, avaliamos se o DHA modula a ativação de caspase-1 nas células MeWo, por meio do ensaio FAM-FLICA. As células MeWo foram estimuladas com as concentrações de 25 μM e 50 μM , durante 24h, e posteriormente marcadas com a sonda fluorescente FAM-FLICA. Nossos dados demonstraram que o estímulo com 25 μM de DHA induziu o aumento da ativação de caspase-1 quando comparado com o não-estimulado, no tempo de 24h. Não foi observado diferença no percentual de células fluorescentes entre o não-estimulado e a concentração de 50 μM de DHA (Figura 18). Portanto, os resultados obtidos indicam que o DHA induz a ativação de caspase-1 nas células MeWo apenas na concentração de 25 μM .

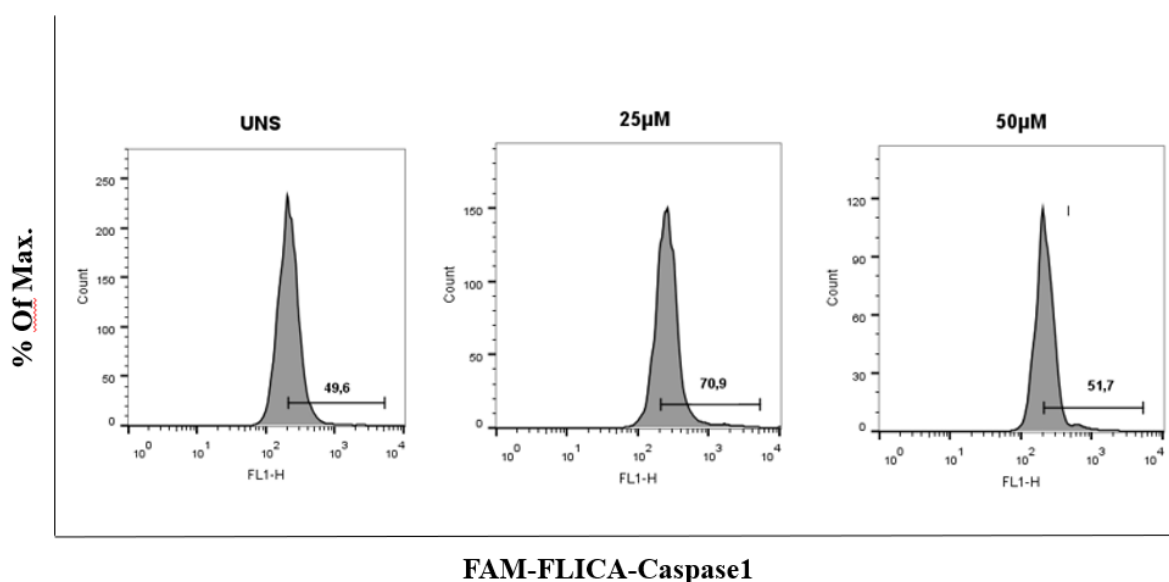


Figura 18. O DHA modula a ativação de caspase-1 na concentração de 25 μM . Células MeWo foram estimuladas com DHA nas concentrações 25 μM e 50 μM por 24h, sendo posteriormente marcadas com a sonda fluorescente FAM-FLICA e analisadas por citometria de fluxo no canal FL-1. Os gráficos foram gerados através do software FlowJ.

5.14. O DHA não modula a formação de espécies reativas de oxigênio nas células MeWo.

O efeito do DHA sobre a formação de espécies reativas de oxigênio foi avaliado através da marcação com a sonda CellROX. A análise foi feita após 24h de estímulo com as concentrações de 25 μM , e 50 μM de DHA nas células MeWo. Conforme observado na Figura 18, o não-estimulado apresentou valor de intensidade média de fluorescência (MFI) próximo as células expostas as concentrações de 25 μM , e 50 μM , não apresentando diferença significativa entre as concentrações e o grupo não tratado (Figura 19A e B).

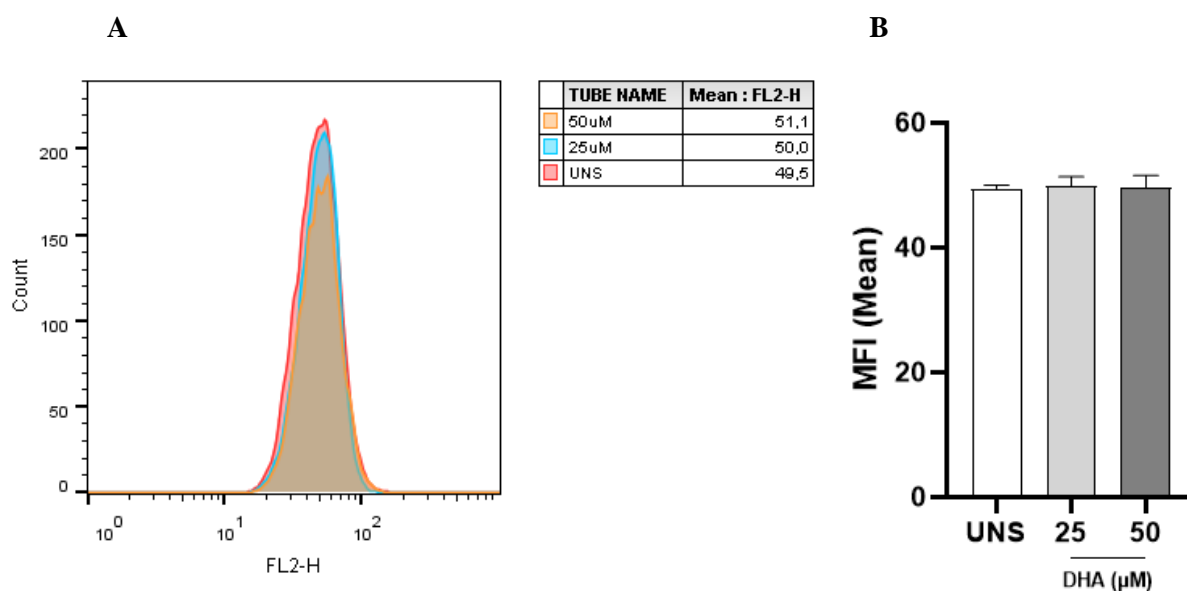


Figura 19. Análise da formação de espécies reativas de oxigênio nas células MeWo estimuladas com DHA. As Células MeWo foram tratadas com DHA nas concentrações 25 μM e 50 μM por 24h, sendo posteriormente marcadas com a sonda fluorescente CellROX e analisadas por citometria de fluxo (FACS Calibur) no canal FL-2. Os dados obtidos foram gerados pelo software FlowJ (A) e GraphPad Prism Version 9.0 (B) e estão expressos na forma de média \pm desvio padrão indicado por Anova.

5.15. O DHA não modula a secreção das citocinas IL-1 β e TNF- α , mas aumenta a secreção de IL-6 nas células MeWo em 48 horas.

Buscando avaliar o efeito do estímulo com DHA sobre a secreção de citocinas pró-inflamatórias pelas células MeWo, foi feito o ensaio imunoenzimático ELISA. Após 48h de estímulo com as concentrações de 25 μ M e 50 μ M, nós realizamos a extração proteica e dosamos os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Conforme verificado na Figura 16B, ambas as concentrações de DHA induziram aumento da secreção da citocina IL-6 quando comparadas com o não-estimulado, não sendo observado diferença significativa entre as concentrações. Todavia, o estímulo com DHA não alterou os níveis das citocinas IL-1 β e TNF- α secretadas pelas células MeWo (Figura 20B e C).

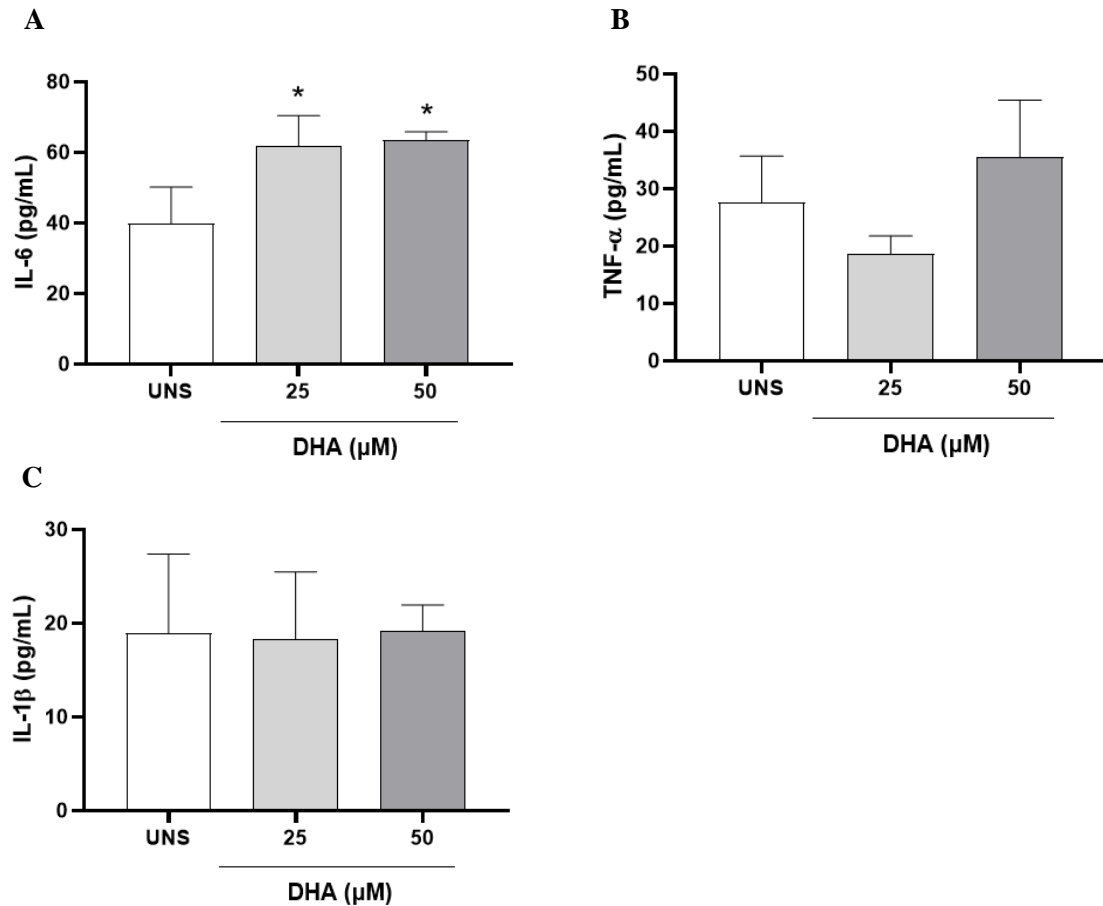


Figura 20. O DHA promove aumento da secreção da citocina IL-6, apesar de não modular as citocinas IL-1β e TNF-α nas células MeWo. O sobrenadante das células MeWo tratadas com as concentrações de 25 μM e 50 μM de DHA foram coletados após 48 horas de estímulo. As citocinas IL-1β, TNF-α e IL-6 presentes no sobrenadante foram dosadas pelo ensaio de ELISA. Os resultados foram analisados no GraphPad Prism Version 9.0 e estão expressos em forma de média ± desvio padrão, sendo a diferença estatística significativa representada por (*) $p < 0,05$ indicado por Anova.

6. Discussão

O presente trabalho evidenciou o papel modulador da suplementação com ômega-3 (DHA) sobre o perfil morfológico e inflamatório dos tecidos adiposos branco e marrom, bem como os efeitos benéficos do produto de secreção desses tecidos, suplementados ou não, sobre a sobrevivência/viabilidade das células B16F10, provenientes do melanoma murino. Descrevemos também a capacidade do DHA, *in vitro*, em induzir morte celular por piroptose em células de melanoma humano (MeWo).

A utilização do ômega-3 como suplemento pode ter efeitos adversos sobre o peso corporal e dos tecidos adiposos, dependendo da dose e do tempo de suplementação. Conforme observado em nossos dados, a suplementação com ômega-3, contendo altas concentrações de DHA, em camundongos fêmeas C57/BL6 na concentração 1g/kg durante 30 dias, não leva alteração do peso corporal, entretanto, reduz o peso dos tecidos gWAT, sWAT e BAT. A redução do peso dos tecidos adiposos em decorrência da suplementação com ômega-3 já foi observado em diversos estudos em modelos murinos, devido a capacidade dos n3: PUFAs em reduzir a adipogênese, aumentar a lipólise e a β -oxidação de ácidos graxos no fígado, além do aumento da biogênese mitocondrial no tecido adiposo (Chacińska et al., 2019; Rossmeisl et al., 2012; Sato et al., 2010). Apesar de não termos avaliado, evidências indicam que a não alteração do peso corporal possa estar relacionada com a atividade dos n:3 PUFAS sobre as vias anticatabólicas e/ou anabólicas no músculo esquelético a fim de promover a manutenção de massa magra. Sabe-se que ômega-3 influencia na ativação de quinases reguladoras envolvidas com a síntese de proteínas musculares, incluindo mTOR e S6K, além de suprimir a ativação da via ubiquitina-proteassoma, o qual é responsável pela proteólise muscular durante a restrição de energia (G. I. Smith et al., 2011), prejudicando a ativação do fator de transcrição NF- κ B, um importante regulador dessa via. Com isso, é possível que o ômega-3 esteja promovendo aumento de massa de tecido magro e, conseqüentemente, aumento da taxa metabólica e, portanto, esteja contribuindo indiretamente para a redução do tecido adiposo sem necessariamente influenciar na redução do peso corporal.

Além disso, já foi descrita a capacidade da suplementação com ômega-3 em modular a morfologia do tecido adiposo, prevenindo a hiperplasia e hipertrofia dos adipócitos brancos (Antraco et al., 2021). Os adipócitos brancos são caracterizados pela presença de uma grande gotícula lipídica central, sendo que a diminuição do tamanho em

conjunto com o aumento do número desses depósitos de gordura pode servir como indicativos do processo de amarronzamento do tecido adiposo branco. Por outro lado, os adipócitos marrons apresentam múltiplas gotículas lipídicas distribuídas ao longo de seu citoplasma e podem sofrer o processo inverso, conhecido como branqueamento do tecido adiposo marrom (Corrêa et al., 2019). Alguns estudos mostraram que o processo de amarronzamento de WAT pode ser induzido pela suplementação com DHA devido ao aumento da expressão gênica de marcadores de BAT como UPC-1, PGC-1 α , além do aumento da biogênese mitocondrial (M. Kim et al., 2015). Com base nisso, avaliamos a morfologia dos tecidos gWAT, sWAT, vWAT e BAT através de lâminas histológicas e análise da área dos adipócitos. Foi possível observar que a suplementação com ômega-3, enriquecido em DHA, reduz a área dos adipócitos do gWAT em relação ao grupo controle, porém o mesmo não foi verificado nos outros tecidos. Apenas redução da área dos adipócitos não é suficiente para a caracterização do processo de amarronzamento de WAT, mas demonstra que a suplementação com ômega-3, enriquecido em DHA, possa ter efeitos benéficos na redução do tecido adiposo branco.

É sabido que o tecido adiposo é responsável por secretar inúmeros peptídeos bioativos capazes de atuar tanto localmente quanto a nível sistêmico, além de estar envolvido na regulação do metabolismo e no desenvolvimento de patologias. Tais substâncias são conhecidas como adipocinas e apresentam papel fundamental como mediadores e reguladores de respostas imunes e inflamatórias (Mancuso, 2016). Também já é conhecido os efeitos de ômega-3 sobre a secreção de adipocinas favorecendo um ambiente mais anti-inflamatório ao tecido adiposo (Moreno-Aliaga et al., 2010). Em nossos dados, observamos redução apenas da citocina anti-inflamatória TGF- β e da quimiocina MCP-1, no tecido adiposo marrom dos animais suplementados.

Tendo em vista que a suplementação com ômega-3 é categorizada como uma dieta “High fat” devido ao seu alto teor lipídico, órgãos como fígado e baço podem ser afetados pelo acúmulo de lipídeos resultando em um aumento de peso desses órgãos, além do desenvolvimento de patologias (Geng et al., 2021). Nossos resultados demonstraram que a suplementação com ômega-3, enriquecido em DHA, não leva ao acúmulo de lipídeos no fígado e baço como observado nas análises histológicas, e não causa hepatoesplenomegalia, uma vez que não altera o peso dos mesmos quando comparados com os animais do grupo controle.

Outras análises como a biogênese de corpúsculos lipídicos e a produção de espécies reativas de oxigênio em células do lavado peritoneal são importantes parâmetros para avaliação dos efeitos anti-inflamatórios decorrentes da suplementação com ômega-3. Sabe-se que a cavidade peritoneal por estar localizada no interior da cavidade abdominal é responsável por armazenar grande parte dos órgãos e nela ocorre a produção de uma grande quantidade de células imunes como, macrófagos, linfócitos T, linfócitos B, células NK, células dendríticas, eosinófilo, mastócito e neutrófilos (Ray & Dittel, 2010). Com isso, diversos estudos utilizam as células do lavado peritoneal como modelo de análise do perfil inflamatório sistêmico, já que essas células podem ser obtidas facilmente e em grandes concentrações.

Os corpúsculos lipídicos (CLs) são organelas heterogêneas responsáveis pelo armazenamento de lipídeos, regulação do metabolismo lipídico, biossíntese de membranas, e controle da síntese e secreção de mediadores inflamatórios. A formação de CLs tem sido apontada como citoprotetora devido aos danos causados pela peroxidação lipídica (Bailey et al., 2015). O processo de degradação oxidativa de ácidos graxos poli-insaturados presente em membranas celulares gera radicais livres que alteram a permeabilidade, fluidez e integridade das mesmas levando a morte celular. Um estudo mostrou que ácidos graxos poli-insaturados armazenados em CLs estão mais protegidos da peroxidação lipídica do que quando associados às membranas, desta forma os CLs estariam minimizando a peroxidação lipídica bem como limitando os níveis de ROS circulante (N. Li et al., 2018). Além disso, sabe-se que o DHA encontrado em excesso no interior da célula ou na região exógena pode ser armazenado em CLs (Tremblay et al., 2016). No trabalho em discussão, foi possível verificar o aumento da biogênese de corpúsculos lipídicos, por meio da sonda fluorescente BODIPY 493/503, e a redução da formação de espécies reativas de oxigênio, através da marcação com DFC-DA, em células do lavado peritoneal dos camundongos suplementados com ômega-3, enriquecido em DHA.

Dando continuidade à análise do perfil inflamatório de células do lavado peritoneal, buscamos dosar por ELISA os níveis das citocinas IL-6 (responsável por estimular o crescimento de linfócitos b e inibir a geração de células T reguladoras), TGF- β (inibe a proliferação e a ativação de linfócitos e outros leucócitos) e da quimiocina MCP-1 (atua no recrutamento de monócitos). Conforme nossos dados obtidos, não foi possível observar nenhuma alteração nos níveis dessas citocinas presentes nas células do

lavado peritoneal dos animais do grupo tratado, demonstrando que a suplementação com ômega-3, enriquecido em DHA, não modula a inflamação em células da cavidade peritoneal.

Sabe-se que os elevados níveis de citocinas no soro também são indicativos de uma grande variedade de estados de doença associadas a inflamação. As citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-12 e a anti-inflamatória IL-10 são as principais citocinas responsáveis por mediar e regular a resposta imune inata (Van der Meide & Schellekens, 1996). Os resultados obtidos com o presente trabalho demonstraram redução nos níveis de todas essas citocinas no soro dos animais submetidos a suplementação. A redução das citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-12 é característico dos efeitos anti-inflamatórios do ômega-3 (J. X. Kang & Weylandt, [s.d.]), porém a redução de IL-10 foi um evento não esperado, visto que essa citocina atua na inibição da síntese de citocinas inflamatórias (Moore et al., 2001). Possivelmente, esse resultado esteja associado a capacidade do ômega-3 em manter o equilíbrio entre citocinas pró- e anti-inflamatórias.

Atualmente, diversos estudos estão voltados para a influência dos tecidos adiposos sobre o microambiente tumoral. Disfunções do tecido adiposo branco leva ao favorecimento de um ambiente mais pró-inflamatório caracterizado por um maior recrutamento de células imunes como macrófagos do tipo I, linfócitos CD8+ e células NK, e uma maior liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6 e IL-1 β , consequentemente, um estado de inflamação crônica é estabelecido (Corrêa et al., 2019). Os adipócitos associados ao tumor também favorecem o desenvolvimento de células tumorais, liberando ácidos graxos livres que servirão como fonte de alimento para o crescimento do tumor e ativação de células imunes, como miócitos, células endoteliais e macrófagos, os quais quando presentes no microambiente tumoral são polarizadas a um perfil M2 via CCL2, IL-1 β e CXCL12. Assim, o microambiente torna-se propício para estabelecimento e desenvolvimento tumoral (Arendt et al., 2013). Alguns tipos de câncer, como mama, pele, ovário (Karimi et al., 2016; Olsen et al., 2013; Picon-Ruiz et al., 2017), dentre outros, já foram associados ao tecido adiposo.

O papel do tecido adiposo marrom no microambiente tumoral ainda é incerto. Sabe-se que BAT apresenta um caráter anti-inflamatório e está envolvido com o aumento da expressão do gene PTEN, o qual atua na regulação do crescimento e proliferação celular, sendo um dos mais importantes reguladores antitumorais. Entretanto, a grande atividade de BAT já foi associada ao agravamento do quadro de caquexia associada ao

câncer, além de servir como fonte de energia para o crescimento do tumor (Corrêa et al., 2019). Nossos resultados mostraram que os produtos de secreção dos tecidos adiposos de WAT e BAT, mesmo na ausência da suplementação, são capazes de reduzir a viabilidade mitocondrial das células B16F10, mostrando que ambos os tecidos podem apresentar papéis antitumorais sobre o melanoma. Também foi possível observar que o produto de secreção do tecido adiposo marrom dos animais suplementados com ômega-3, enriquecido em DHA, reduz significativamente mais a viabilidade mitocondrial das células B16F10 do que o do grupo controle. Possivelmente, esse efeito mais anti-tumoral de BAT promovido pela suplementação com ômega-3 esteja relacionado ao aumento da expressão de genes envolvidos com a biogênese mitocondrial podendo levar aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, e conseqüentemente perda da viabilidade celular.

Buscando avaliar os possíveis efeitos da suplementação com ômega-3, enriquecido em DHA, sobre os produtos de secreção dos tecidos adiposos branco e marrom, bem como esses modulam as células de melanoma murino, avaliamos o perfil de morte celular por apoptose e morte lítica. Conforme nossos dados, é possível observar um aumento de morte apoptótica em células estimuladas com os produtos de secreção de BAT e WAT mesmo na ausência da suplementação. Contudo, a porcentagem de células mortas por apoptose estimuladas com o produto de secreção de BAT quase dobrou em decorrência da suplementação com ômega-3. A capacidade do ômega-3 em induzir morte celular por apoptose e lítica em células tumorais já foram descritas em outros trabalhos, incluindo, câncer de mama, próstata e ovário (Pizato et al., 2018; Shin et al., 2013; West et al., 2020). Entretanto, a capacidade do ômega-3 em modular os produtos de secreção de WAT e BAT e induzir apoptose e morte lítica em células de melanoma murino nunca foram descritos antes.

Levando em consideração a secreção de citocinas pelo tecido adiposo, assim como os efeitos anti-inflamatórios do ômega-3 na redução de citocinas pró-inflamatórias e sua relação com o microambiente, buscamos avaliar a secreção de citocinas pelas células B16F10 estimuladas com o produto de secreção de WAT e BAT dos animais suplementados com ômega-3, enriquecido em DHA. Nossos dados demonstraram que o produto de secreção do WAT dos animais tratados com ômega-3 reduz os níveis das citocinas IL-6 e TGF- β e o produto de secreção do BAT reduz apenas IL-6. A citocina anti-inflamatória TGF- β é responsável por inibir a proliferação e ativação linfócitos e

outros leucócitos. Por ser imunoreguladora, alguns tipos de câncer, incluindo o melanoma, induzem o aumento dessa citocina como mecanismos de escape do sistema imune (Lasfar & Cohen-Solal, 2010). A alta secreção de IL-6 também é característica do melanoma, pois promove o crescimento tumoral e induz a angiogênese (Hoejberg et al., 2012). Assim a redução dos níveis das citocinas TGF- β e IL-6 promovidas pelo produto de secreção de WAT e BAT, dos animais tratados, mostra-se benéfico no combate ao melanoma.

O processo de morte celular é essencial para a manutenção do desenvolvimento dos seres vivos, sendo importante na eliminação de moléculas danificadas ou potencialmente prejudiciais, bem como na resolução contra patógenos e células tumorais (Gadiyar et al., 2020). Pesquisas mostram que os n:3 PUFAs participam de mecanismos envolvidos com o desencadeamento da morte celular de células tumorais (D'Eliseo & Velotti, 2016). Embora o DHA seja conhecido por aumentar a apoptose em diferentes tipos de câncer, como de mama, próstata, ovário, cólon e hepatocarcinoma (Darwish et al., 2022; Huang et al., 2020; K. S. Kang et al., 2010; Shin et al., 2013; West et al., 2020), pouco se sabe sobre a indução de outros tipos de morte como a piroptose. Devido ao fato da piroptose ser uma morte celular de caráter inflamatório, sua ativação tem sido alvo de estudos envolvidos com desenvolvimento de estratégias terapêuticas para doenças de base inflamatória, como o câncer (Lu et al., 2022). Assim, os n:3 PUFAs se mostram bastante promissores na modulação da piroptose, porém, esse mecanismo ainda não foi relatado em diversas neoplasias, incluindo o melanoma.

Um dos primeiros ensaios utilizados para caracterizar a piroptose é o ensaio de detecção de liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) no meio extracelular, por ser um indicador de lise celular (Rajamäki et al., 2010). Conforme observado em nossos dados, o estímulo com DHA, nas concentrações de 12,5 μ M, 25 μ M, 50 μ M e 100 μ M, no tempo de 48 horas, induz a secreção de LDH a partir da concentração de 25 μ M, não apresentando diferença significativa entre as concentrações. O efeito de citotoxicidade do DHA em linhagens tumorais já foi observado em estudos anteriores (Ding et al., 2004), inclusive, em outras linhagens celulares de melanoma como A375, A2058 e G361 (Zajdel et al., 2013), contudo, essa é a primeira vez descrita na linhagem celular MeWo. Além disso, buscamos avaliar se os efeitos citotóxicos dessas concentrações de DHA estariam direcionados apenas a células tumorais ou se comprometeria a viabilidade de células imunes. Por isso, realizamos o ensaio de LDH em

macrófagos estimulados com DHA, nos tempos de 24h, 48h e 72h. Os resultados obtidos demonstraram que DHA não é citotóxico para macrófagos nos tempos de 24h e 48h, sendo prejudicial apenas em tempos tardios (72h) e apenas em concentrações mais altas (50 μ M e 100 μ M).

O desencadeamento da piroptose está relacionado com a formação de complexos multiproteicos conhecidos como inflamassomas. Uma vez ativado, os inflamassomas induzem o recrutamento de adaptadores para ativação de caspase-1. Quando ativada, a caspase-1 exerce dois grandes papéis: a maturação de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β e IL-18 e a clivagem e ativação da proteína efetora da piroptose GSDMD (Shi et al., 2017). Portanto, buscamos avaliar se o DHA apresenta a capacidade de induzir a ativação de caspase-1 nas células MeWo, considerando um indicador da progressão da morte por piroptose. Foi possível observar em nossos dados, um aumento da ativação de caspase-1 após 48h de estímulo com DHA na concentração de 25 μ M. Pizato e colaboradores (Pizato et al., 2018) também demonstraram a capacidade do DHA em induzir ativação de caspase-1 em células tumorais (MDA-MB-231), porém em maiores concentrações (100 μ M) e tempos mais precoces (6h). Por outro lado, Snodgrass e colaboradores (Snodgrass et al., 2013) mostraram maior expressão de caspase-1 em concentrações mais baixas de DHA, contudo em monócitos humanos privados de soro fetal bovino.

Como descrito anteriormente, a ativação de caspase-1 culmina na ativação da proteína efetora Gasdermina-D, essa possui uma porção N-terminal, o qual será direcionada para a membrana plasmática através da interação com cardiolipinas e fosfatidilinosítídeos promovendo a formação de poros, e conseqüentemente o extravasamento do conteúdo celular (Shi et al., 2017). Por ser característico a ruptura da membrana plasmática de células que estejam sofrendo piroptose, decidimos averiguar se o estímulo com DHA, nas células de melanoma humano, leva a perda da integridade de membrana plasmática. As células MeWo foram expostas ao PI em conjunto com os estímulos nas concentrações de 25 μ M e 50 μ M durante 8 horas. Conforme avaliado, o estímulo com DHA levou a perda na integridade de membrana das células MeWo em ambas as concentrações, não sendo observado diferença significativa entre as concentrações, demonstrando não ser dose-dependente. Apesar de outros estudos já descreverem a indução de poros na membrana plasmática de outros tipos células (Herr et al., 2020), essa é a primeira vez observado em células MeWo.

Outro efeito decorrente da ativação de caspase-1 resulta na maturação da citocina pró-inflamatória IL-1 β , o qual é secretada pelos poros formados na membrana pela GSDMD (Shi et al., 2017). Além disso, outras citocinas pró-inflamatórias podem ser liberadas no meio extracelular como TNF- α e IL-6. Tais citocinas exercem um papel crucial no microambiente inflamatório e na inicialização e progressão tumoral (Balkwill & Mantovani, 2001). Com isso, avaliamos se o estímulo com DHA, nas concentrações de 25 μ M e 50 μ M, induzem a secreção de IL-1 β , TNF- α e IL-6 nas células MeWo em 48 horas através do ensaio de ELISA. No trabalho em discussão, foi possível verificar que o tratamento com DHA induziu um aumento da secreção da citocina IL-6, contudo, não alterou os níveis de IL-1 β e TNF- α . O resultado obtido não foi o esperado, visto que o dado anterior demonstrou a formação de poros na membrana. Possivelmente, a secreção de IL-1 β e TNF- α esteja acontecendo em tempos mais precoces, todavia, é necessário a realização de novas análises para a confirmação do evento.

Estudos recentes têm demonstrado que espécies reativas de oxigênio atuam na ativação e regulação do inflamassoma NLRP3, e, em seguida, causa a piroptose celular dependente de caspase-1 (Bai et al., 2021). Ademais, ROS participa na modulação da inflamação e da resposta imune (Fokam, 2020). Por isso, avaliamos o efeito do DHA, nas concentrações de 25 μ M e 50 μ M, sobre a formação de espécies reativas de oxigênio nas células MeWo, no tempo de 24h, utilizando a sonda CellROX. Conforme observado em nossos resultados, não foi possível observar nenhuma modulação na formação de espécies reativas de oxigênio nas células MeWo pelo DHA. Estudos demonstram que a participação das espécies reativas de oxigênio na ativação do inflamassoma ainda é controverso (Latz et al., 2013).

7. Conclusão

A partir dos resultados obtidos nesse trabalho, pode-se concluir que a suplementação com ômega-3, enriquecido em DHA, apresenta benefícios ao organismo, modula o perfil e a função imunológica do tecido adiposo, bem como interfere na interação entre o produto de secreção dos tecidos adiposos e células de câncer de melanoma. Além disso, o DHA é capaz de induzir a morte celular por piroptose no melanoma humano. De maneira mais específica o presente estudo demonstrou que:

- A suplementação com ômega-3, enriquecido em DHA, não altera o peso corporal, mas reduz o peso dos tecidos adiposos gonadal, subcutâneo e marrom;
- A suplementação com ômega-3, enriquecido em DHA, reduz a área dos adipócitos do tecido adiposo gonadal e os níveis das citocinas TGF- β e MCP-1 no tecido adiposo marrom;
- A morfologia e o peso do fígado e do baço não são moduladas pela suplementação com ômega-3, enriquecido em DHA;
- A suplementação com ômega-3, enriquecido em DHA, aumenta a biogênese de corpúsculos lipídicos e reduz a formação de espécies reativas de oxigênio das células do lavado peritoneal;
- A suplementação com ômega-3, enriquecido em DHA, diminui a quantidade de citocinas no soro;
- O produto de secreção do tecido adiposo marrom, dos animais suplementados com ômega-3, enriquecido em DHA, reduz drasticamente a viabilidade mitocondrial e aumenta a morte celular das células B16F10;
- O produto de secreção do sWAT dos animais tratados com ômega-3, enriquecido em DHA, reduz a secreção das citocinas IL-6 e TGF- β pelas células B16F10. Já o produto de secreção do tecido adiposo marrom reduz apenas IL-6;
- O DHA induz citotoxicidade nas células de melanoma humano (MeWo). Já em macrófagos é citotóxico apenas em altas concentrações e tempos tardios;
- O DHA induz morte celular por piroptose nas células MeWo, ao causar perda da integridade da membrana plasmática, liberação de LDH e ativação de caspase-1 nestas células;
- O DHA não modula a formação de espécies reativas de oxigênio e a secreção das citocinas IL-1 β e TNF- α , mas aumenta a secreção de IL-6 nas células MeWo.



Brasília, 24 de outubro de 2022.

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**O PAPEL DO ÔMEGA-3 NA MODULAÇÃO DO TECIDO ADIPOSEO BRANCO E MARROM E A FUNÇÃO DESSES SOBRE OS PARÂMETROS CARCINOGENÉTICOS DO CÂNCER DE MELANOMA**", SEI n.

23106.102647/2022-14, sob responsabilidade da professora Kelly Grace Magalhães, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília, na 182ª reunião ordinária, em 11/10/2022. Este projeto foi aprovado para utilização de *Mus musculus* C57BL/6 J (34 fêmeas), provenientes do biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

O presente certificado é válido pelo período de 24/10/2022 a 1/12/2026.



Carina Krewer

Dra. Carina da Costa Krewer

Coordenadora da CEUA – UnB



8. Referências

- Ajami, M., Eghtesadi, S., Razaz, J. M., Kalantari, N., Habibey, R., Nilforoushzadeh, M. A., Zarrindast, M., & Pazoki-Toroudi, H. (2011). Expression of Bcl-2 and Bax after hippocampal ischemia in DHA + EPA treated rats. *Neurological Sciences*, *32*(5), 811–818. <https://doi.org/10.1007/s10072-011-0621-5>
- Ali, Z., Yousaf, N., & Larkin, J. (2013). Melanoma epidemiology, biology and prognosis. *European Journal of Cancer Supplements*, *11*(2), 81–91. <https://doi.org/10.1016/j.ejcsup.2013.07.012>
- Anand, P., Kunnumakara, A. B., Sundaram, C., Harikumar, K. B., Tharakan, S. T., Lai, O. S., Sung, B., & Aggarwal, B. B. ([s.d.]). *Expert Review Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes*. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9661-9>
- Antraco, V. J., Hirata, B. K. S., de Jesus Simão, J., Cruz, M. M., da Silva, V. S., da Cunha de Sá, R. D. C., Abdala, F. M., Armelin-Correa, L., & Alonso-Vale, M. I. C. (2021). Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Prevent Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH) and Stimulate Adipogenesis. *Nutrients*, *13*(2), 622. <https://doi.org/10.3390/nu13020622>
- Arendt, L. M., McCready, J., Keller, P. J., Baker, D. D., Naber, S. P., Seewaldt, V., & Kuperwasser, C. (2013). Obesity Promotes Breast Cancer by CCL2-Mediated Macrophage Recruitment and Angiogenesis. *Cancer Research*, *73*(19), 6080–6093. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-0926>
- Arnoldussen, I., & Kiliaan, A. (2014). Impact of DHA on Metabolic Diseases from Womb to Tomb. *Marine Drugs*, *12*(12), 6190–6212. <https://doi.org/10.3390/md12126190>
- Avallone, R., Vitale, G., & Bertolotti, M. (2019). Omega-3 Fatty Acids and Neurodegenerative Diseases: New Evidence in Clinical Trials. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(17), 4256. <https://doi.org/10.3390/ijms20174256>
- Bailey, A. P., Koster, G., Guillermier, C., Hirst, E. M. A., MacRae, J. I., Lechene, C. P., Postle, A. D., & Gould, A. P. (2015). Antioxidant Role for Lipid Droplets in a Stem Cell Niche of *Drosophila*. *Cell*, *163*(2), 340–353. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.020>

- Bai, R., Lang, Y., Shao, J., Deng, Y., Refuhati, R., & Cui, L. (2021). The Role of NLRP3 Inflammasome in Cerebrovascular Diseases Pathology and Possible Therapeutic Targets. *ASN Neuro*, *13*, 175909142110181. <https://doi.org/10.1177/17590914211018100>
- Balkwill, F., & Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *The Lancet*, *357*(9255), 539–545. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04046-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04046-0)
- Balois, T., & Amar, M. Ben. (2014). Morphology of melanocytic lesions in situ. *Scientific Reports*, *4*(1), 3622. <https://doi.org/10.1038/srep03622>
- Barquissau, V., Ghandour, R. A., Ailhaud, G., Klingenspor, M., Langin, D., Amri, E.-Z., & Pisani, D. F. (2017). Control of adipogenesis by oxylipins, GPCRs and PPARs. *Biochimie*, *136*, 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.12.012>
- Basak, S., Mallick, R., & Duttaroy, A. K. (2020). Maternal Docosahexaenoic Acid Status during Pregnancy and Its Impact on Infant Neurodevelopment. *Nutrients*, *12*(12), 3615. <https://doi.org/10.3390/nu12123615>
- Bergsbaken, T., Fink, S. L., & Cookson, B. T. (2009). Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nature Reviews Microbiology*, *7*(2), 99–109. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2070>
- Blondin, D. P., Nielsen, S., Kuipers, E. N., Severinsen, M. C., Jensen, V. H., Miard, S., Jespersen, N. Z., Kooijman, S., Boon, M. R., Fortin, M., Phoenix, S., Frisch, F., Guérin, B., Turcotte, É. E., Haman, F., Richard, D., Picard, F., Rensen, P. C. N., Scheele, C., & Carpentier, A. C. (2020). Human Brown Adipocyte Thermogenesis Is Driven by β 2-AR Stimulation. *Cell Metabolism*, *32*(2), 287-300.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.07.005>
- Brandão, B. B., Guerra, B. A., & Mori, M. A. (2017). Shortcuts to a functional adipose tissue: The role of small non-coding RNAs. *Redox Biology*, *12*, 82–102. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.01.020>
- Braz-De-Melo, H. A., Pasquarelli-do-Nascimento, G., Corrêa, R., das Neves Almeida, R., de Oliveira Santos, I., Prado, P. S., Picolo, V., de Bem, A. F., Pizato, N., & Magalhães, K. G. (2019). Potential neuroprotective and anti-inflammatory effects provided by omega-3 (DHA) against Zika virus infection in human SH-SY5Y cells. *Scientific Reports*, *9*(1), 20119. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56556-y>

- Calder, P. C. (2015). Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1851(4), 469–484. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.08.010>
- Chacińska, Zabielski, Książek, Szałaj, Jarzabek, Kojta, Chabowski, & Błachnio-Zabielska. (2019). The Impact of OMEGA-3 Fatty Acids Supplementation on Insulin Resistance and Content of Adipocytokines and Biologically Active Lipids in Adipose Tissue of High-Fat Diet Fed Rats. *Nutrients*, 11(4), 835. <https://doi.org/10.3390/nu11040835>
- Chait, A., & den Hartigh, L. J. (2020). Adipose Tissue Distribution, Inflammation and Its Metabolic Consequences, Including Diabetes and Cardiovascular Disease. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 7. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.00022>
- Chang, H. Y., Lee, H.-N., Kim, W., & Surh, Y.-J. (2015). Docosahexaenoic acid induces M2 macrophage polarization through peroxisome proliferator-activated receptor γ activation. *Life Sciences*, 120, 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.10.014>
- Cholewski, M., Tomczykowa, M., & Tomczyk, M. ([s.d.]). *A Comprehensive Review of Chemistry, Sources and Bioavailability of Omega-3 Fatty Acids*. <https://doi.org/10.3390/nu10111662>
- Conforti, C., & Zalaudek, I. (2021). Epidemiology and Risk Factors of Melanoma: A Review. *Dermatology Practical & Conceptual*, 2021161S. <https://doi.org/10.5826/dpc.11S1a161S>
- Corrêa, Heyn, & Magalhaes. (2019). The Impact of the Adipose Organ Plasticity on Inflammation and Cancer Progression. *Cells*, 8(7), 662. <https://doi.org/10.3390/cells8070662>
- Corrêa, L. H., Corrêa, R., Farinasso, C. M., de Sant'Ana Dourado, L. P., & Magalhães, K. G. (2017). Adipocytes and Macrophages Interplay in the Orchestration of Tumor Microenvironment: New Implications in Cancer Progression. *Frontiers in Immunology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01129>
- Cypess, A. M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A. B., Kuo, F. C., Palmer, E. L., Tseng, Y.-H., Doria, A., Kolodny, G. M., & Kahn, C. R. (2009). Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans. *New*

England Journal of Medicine, 360(15), 1509–1517.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa0810780>

- Czarnecka, A. M., Bartnik, E., Fiedorowicz, M., & Rutkowski, P. (2020). Targeted Therapy in Melanoma and Mechanisms of Resistance. *International journal of molecular sciences*, 21(13). <https://doi.org/10.3390/ijms21134576>
- Dagogo-Jack, I., & Shaw, A. T. (2018). Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 15(2), 81–94. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.166>
- Darwish, N. M., Elshaer, M. M. A., Almutairi, S. M., Chen, T.-W., Mohamed, M. O., Ghaly, W. B. A., & Rasheed, R. A. (2022). Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Provoke Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma through Knocking Down the STAT3 Activated Signaling Pathway: In Vivo and In Vitro Study. *Molecules*, 27(9), 3032. <https://doi.org/10.3390/molecules27093032>
- Das, U. N. (2011). Essential Fatty Acids—Biochemistry, Physiology and Clinical Significance. In *Molecular Basis of Health and Disease* (p. 101–151). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0495-4_4
- D'Eliseo, D., & Velotti, F. (2016). Omega-3 Fatty Acids and Cancer Cell Cytotoxicity: Implications for Multi-Targeted Cancer Therapy. *Journal of Clinical Medicine*, 5(2), 15. <https://doi.org/10.3390/jcm5020015>
- Ding, W.-Q., Vaught, J. L., Yamauchi, H., & Lind, S. E. (2004). Differential sensitivity of cancer cells to docosahexaenoic acid-induced cytotoxicity: The potential importance of down-regulation of superoxide dismutase 1 expression. *Molecular Cancer Therapeutics*, 3(9), 1109–1117. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.1109.3.9>
- Domingues, B., Lopes, J., Soares, P., & Populo, H. (2018). Melanoma treatment in review. *ImmunoTargets and Therapy*, Volume 7, 35–49. <https://doi.org/10.2147/ITT.S134842>
- Dyall, S. C. (2015). Long-chain omega-3 fatty acids and the brain: a review of the independent and shared effects of EPA, DPA and DHA. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 7. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00052>

- Ellulu, M. S., Patimah, I., Khaza' ai, H., Rahmat, A., & Abed, Y. (2017). Obesity and inflammation: the linking mechanism and the complications. *Archives of Medical Science*, 4, 851–863. <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.58928>
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Estatísticas Para Câncer de Pele Melanoma. || Estatísticas Para Câncer de Pele Melanoma.* ([s.d.]). Recuperado 25 de junho de 2023, de <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/estatisticas-para-cancer-demama/6562/34/>
- FANTUZZI, G. (2005). Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 115(5), 911–919. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2005.02.023>
- Fares, J., Fares, M. Y., Khachfe, H. H., Salhab, H. A., & Fares, Y. (2020). Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 28. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0134-x>
- Fasano, E., Serini, S., Cittadini, A., & Calviello, G. (2017). Long-chain n-3 PUFA against breast and prostate cancer: Which are the appropriate doses for intervention studies in animals and humans? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(11), 2245–2262. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.850060>
- Félix-Soriano, E., Sáinz, N., Fernández-Galilea, M., Gil-Iturbe, E., Celay, J., Martínez-Climent, J. A., & Moreno-Aliaga, M. J. (2023). Chronic docosahexaenoic acid supplementation improves metabolic plasticity in subcutaneous adipose tissue of aged obese female mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 111, 109153. <https://doi.org/10.1016/J.JNUTBIO.2022.109153>
- Flachs, P., Horakova, O., Brauner, P., Rossmeisl, M., Pecina, P., Franssen-van Hal, N., Ruzickova, J., Sponarova, J., Drahotka, Z., Vlcek, C., Keijer, J., Houstek, J., & Kopecky, J. (2005). Polyunsaturated fatty acids of marine origin upregulate mitochondrial biogenesis and induce β -oxidation in white fat. *Diabetologia*, 48(11), 2365–2375. <https://doi.org/10.1007/s00125-005-1944-7>
- Fokam, D. (2020). Instrumental role for reactive oxygen species in the inflammatory response. *Frontiers in Bioscience*, 25(6), 4848. <https://doi.org/10.2741/4848>

- Gadiyar, V., Lahey, K. C., Calianese, D., Devoe, C., Mehta, D., Bono, K., Desind, S., Davra, V., & Birge, R. B. (2020). Cell Death in the Tumor Microenvironment: Implications for Cancer Immunotherapy. *Cells*, 9(10), 2207. <https://doi.org/10.3390/cells9102207>
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E. S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D. W., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A. V., Arama, E., Baehrecke, E. H., Barlev, N. A., Bazan, N. G., Bernassola, F., Bertrand, M. J. M., Bianchi, K., ... Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*, 25(3), 486–541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>
- Geng, Y., Faber, K. N., de Meijer, V. E., Blokzijl, H., & Moshage, H. (2021). How does hepatic lipid accumulation lead to lipotoxicity in non-alcoholic fatty liver disease? *Hepatology International*, 15(1), 21–35. <https://doi.org/10.1007/s12072-020-10121-2>
- Giordano, A., Murano, I., Mondini, E., Perugini, J., Smorlesi, A., Severi, I., Barazzoni, R., Scherer, P. E., & Cinti, S. (2013). Obese adipocytes show ultrastructural features of stressed cells and die of pyroptosis. *Journal of Lipid Research*, 54(9), 2423–2436. <https://doi.org/10.1194/jlr.M038638>
- Giordano, A., Smorlesi, A., Frontini, A., Barbatelli, G., & Cinti, S. (2014). MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: White, brown and pink adipocytes: the extraordinary plasticity of the adipose organ. *European Journal of Endocrinology*, 170(5), R159–R171. <https://doi.org/10.1530/EJE-13-0945>
- Hensler, M., Bardova, K., Jilkova, Z. M., Wahli, W., Meztger, D., Chambon, P., Kopecky, J., & Flachs, P. (2011). The inhibition of fat cell proliferation by n-3 fatty acids in dietary obese mice. *Lipids in Health and Disease*, 10(1), 128. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-10-128>
- Hernandez, J. D., Li, T., Rau, C. M., LeSuer, W. E., Wang, P., Coletta, D. K., Madura, J. A., Jacobsen, E. A., & De Filippis, E. (2021). ω -3PUFA supplementation ameliorates adipose tissue inflammation and insulin-stimulated glucose disposal in

- subjects with obesity: a potential role for apolipoprotein E. *International Journal of Obesity*, 45(6), 1331–1341. <https://doi.org/10.1038/s41366-021-00801-w>
- Herr, D. R., Yam, T. Y. A., Tan, W. S. D., Koh, S. S., Wong, W. S. F., Ong, W.-Y., & Chayaburakul, K. (2020). Ultrastructural Characteristics of DHA-Induced Pyroptosis. *NeuroMolecular Medicine*, 22(2), 293–303. <https://doi.org/10.1007/s12017-019-08586-y>
- Hoejberg, L., Bastholt, L., & Schmidt, H. (2012). Interleukin-6 and melanoma. *Melanoma Research*, 22(5), 327–333. <https://doi.org/10.1097/CMR.0b013e3283543d72>
- Huang, Z., Liu, C.-A., Cai, P.-Z., Xu, F.-P., Zhu, W.-J., Wang, W.-W., & Jiang, H.-P. (2020). Omega-3PUFA Attenuates MNU-Induced Colorectal Cancer in Rats by Blocking PI3K/AKT/Bcl-2 Signaling. *Oncotargets and Therapy*, Volume 13, 1953–1965. <https://doi.org/10.2147/OTT.S241298>
- Hu, B. H., & Zheng, G. L. (2008). Membrane disruption: An early event of hair cell apoptosis induced by exposure to intense noise. *Brain Research*, 1239, 107–118. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.08.043>
- Kalupahana, N. S., Claycombe, K. J., & Moustaid-Moussa, N. (2011). (n-3) Fatty Acids Alleviate Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance: Mechanistic Insights. *Advances in Nutrition*, 2(4), 304–316. <https://doi.org/10.3945/an.111.000505>
- Kang, J. X., & Weylandt, K. H. ([s.d.]). Modulation of Inflammatory Cytokines by Omega-3 Fatty Acids. *Em Lipids in Health and Disease* (p. 133–143). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8831-5_5
- Kang, K. S., Wang, P., Yamabe, N., Fukui, M., Jay, T., & Zhu, B. T. (2010). Docosahexaenoic Acid Induces Apoptosis in MCF-7 Cells In Vitro and In Vivo via Reactive Oxygen Species Formation and Caspase 8 Activation. *PLoS ONE*, 5(4), e10296. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010296>
- Karimi, K., Lindgren, T. H., Koch, C. A., & Brodell, R. T. (2016). Obesity as a risk factor for malignant melanoma and non-melanoma skin cancer. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 17(3), 389–403. <https://doi.org/10.1007/s11154-016-9393-9>

- Kershaw, E. E., & Flier, J. S. (2004). Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(6), 2548–2556. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-0395>
- Kim, H.-K., Della-Fera, M., Lin, J., & Baile, C. A. (2006). The Journal of Nutrition Nutrient Physiology, Metabolism, and Nutrient-Nutrient Interactions Docosahexaenoic Acid Inhibits Adipocyte Differentiation and Induces Apoptosis in 3T3-L1 Preadipocytes 1. *Em J. Nutr* (Vol. 136). <https://academic.oup.com/jn/article-abstract/136/12/2965/4663949>
- Kim, H.-Y., Akbar, M., & Kim, Y.-S. (2010). Phosphatidylserine-dependent neuroprotective signaling promoted by docosahexaenoic acid. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*, 82(4–6), 165–172. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2010.02.025>
- Kim, J. A. (2003). Targeted therapies for the treatment of cancer. *The American Journal of Surgery*, 186(3), 264–268. [https://doi.org/10.1016/S0002-9610\(03\)00212-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9610(03)00212-5)
- Kim, M., Goto, T., Yu, R., Uchida, K., Tominaga, M., Kano, Y., Takahashi, N., & Kawada, T. (2015). Fish oil intake induces UCP1 upregulation in brown and white adipose tissue via the sympathetic nervous system. *Scientific Reports*, 5(1), 18013. <https://doi.org/10.1038/srep18013>
- Kim, W., Fan, Y.-Y., Barhoumi, R., Smith, R., McMurray, D. N., & Chapkin, R. S. (2008). n-3 Polyunsaturated Fatty Acids Suppress the Localization and Activation of Signaling Proteins at the Immunological Synapse in Murine CD4+ T Cells by Affecting Lipid Raft Formation. *The Journal of Immunology*, 181(9), 6236–6243. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.9.6236>
- Lands, B. (2012). Consequences of Essential Fatty Acids. *Nutrients*, 4(9), 1338–1357. <https://doi.org/10.3390/nu4091338>
- Lasfar, A., & Cohen-Solal, K. A. (2010). Resistance to transforming growth factor - mediated tumor suppression in melanoma: are multiple mechanisms in place? *Carcinogenesis*, 31(10), 1710–1717. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgq155>
- Latz, E., Xiao, T. S., & Stutz, A. (2013). Activation and regulation of the inflammasomes. *Nature Reviews Immunology*, 13(6), 397–411. <https://doi.org/10.1038/nri3452>

- Leitner, B. P., Huang, S., Brychta, R. J., Duckworth, C. J., Baskin, A. S., McGehee, S., Tal, I., Dieckmann, W., Gupta, G., Kolodny, G. M., Pacak, K., Herscovitch, P., Cypess, A. M., & Chen, K. Y. (2017). Mapping of human brown adipose tissue in lean and obese young men. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(32), 8649–8654. <https://doi.org/10.1073/pnas.1705287114>
- Lideikaitė, A., Mozūraitienė, J., & Letautienė, S. (2017). Analysis of prognostic factors for melanoma patients. *Acta medica Lituanica*, *24*(1), 25–34. <https://doi.org/10.6001/actamedica.v24i1.3460>
- Li, G., Chen, Z., Bhat, O. M., Zhang, Q., Abais-Battad, J. M., Conley, S. M., Ritter, J. K., & Li, P.-L. (2017). NLRP3 inflammasome as a novel target for docosahexaenoic acid metabolites to abrogate glomerular injury. *Journal of Lipid Research*, *58*(6), 1080–1090. <https://doi.org/10.1194/jlr.M072587>
- Li, N., Sancak, Y., Frasor, J., & Atilla-Gokcumen, G. E. (2018). A Protective Role for Triacylglycerols during Apoptosis. *Biochemistry*, *57*(1), 72–80. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00975>
- López-Vicario, C., Rius, B., Alcaraz-Quiles, J., García-Alonso, V., Lopategi, A., Titos, E., & Clària, J. (2016). Pro-resolving mediators produced from EPA and DHA: Overview of the pathways involved and their mechanisms in metabolic syndrome and related liver diseases. *European Journal of Pharmacology*, *785*, 133–143. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.03.092>
- Lu, L., Zhang, Y., Tan, X., Merkher, Y., Leonov, S., Zhu, L., Deng, Y., zhang, H., Zhu, D., Tan, Y., Fu, Y., Liu, T., & Chen, Y. (2022). Emerging mechanisms of pyroptosis and its therapeutic strategy in cancer. *Cell Death Discovery*, *8*(1), 338. <https://doi.org/10.1038/s41420-022-01101-6>
- Machado, S. A., Pasquarelli-do-Nascimento, G., da Silva, D. S., Farias, G. R., de Oliveira Santos, I., Baptista, L. B., & Magalhães, K. G. (2022). Browning of the white adipose tissue regulation: new insights into nutritional and metabolic relevance in health and diseases. *Nutrition & Metabolism*, *19*(1), 61. <https://doi.org/10.1186/s12986-022-00694-0>
- Mancuso, P. (2016). The role of adipokines in chronic inflammation. *ImmunoTargets and Therapy*, *47*. <https://doi.org/10.2147/ITT.S73223>

- Mehta, J., Lawson, D., & Saldeen, T. (1988). Reduction in plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) with omega-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) intake. *American Heart Journal*, *116*(5), 1201–1206. [https://doi.org/10.1016/0002-8703\(88\)90440-1](https://doi.org/10.1016/0002-8703(88)90440-1)
- Metherel, A. H., & Bazinet, R. P. (2019). Updates to the n-3 polyunsaturated fatty acid biosynthesis pathway: DHA synthesis rates, tetracosahexaenoic acid and (minimal) retroconversion. *Progress in Lipid Research*, *76*, 101008. <https://doi.org/10.1016/J.PLIPRES.2019.101008>
- Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L., & O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the Interleukin-10 Receptor. *Annual Review of Immunology*, *19*(1), 683–765. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.683>
- Moreno-Aliaga, M. J., Lorente-Cebrián, S., & Martínez, J. A. (2010). Regulation of adipokine secretion by n -3 fatty acids. *Proceedings of the Nutrition Society*, *69*(3), 324–332. <https://doi.org/10.1017/S0029665110001801>
- Murano, I., Barbatelli, G., Parisani, V., Latini, C., Muzzonigro, G., Castellucci, M., & Cinti, S. (2008). Dead adipocytes, detected as crown-like structures, are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice. *Journal of Lipid Research*, *49*(7), 1562–1568. <https://doi.org/10.1194/jlr.M800019-JLR200>
- Neschen, S., Morino, K., Rossbacher, J. C., Pongratz, R. L., Cline, G. W., Sono, S., Gillum, M., & Shulman, G. I. (2006). Fish Oil Regulates Adiponectin Secretion by a Peroxisome Proliferator–Activated Receptor- γ –Dependent Mechanism in Mice. *Diabetes*, *55*(4), 924–928. <https://doi.org/10.2337/diabetes.55.04.06.db05-0985>
- Newell, M., Baker, K., Postovit, L., & Field, C. (2017). A Critical Review on the Effect of Docosahexaenoic Acid (DHA) on Cancer Cell Cycle Progression. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(8), 1784. <https://doi.org/10.3390/ijms18081784>
- Olsen, C. M., Nagle, C. M., Whiteman, D. C., Ness, R., Pearce, C. L., Pike, M. C., Rossing, M. A., Terry, K. L., Wu, A. H., __, __, Risch, H. A., Yu, H., Doherty, J. A., Chang-Claude, J., Hein, R., Nickels, S., Wang-Gohrke, S., Goodman, M. T., ... Webb, P. M. (2013). Obesity and risk of ovarian cancer subtypes: evidence from the Ovarian Cancer Association Consortium. *Endocrine-Related Cancer*, *20*(2), 251–262. <https://doi.org/10.1530/ERC-12-0395>

- Olszańska, J., Pietraszek-Gremplewicz, K., & Nowak, D. (2021). Melanoma Progression under Obesity: Focus on Adipokines. *Cancers*, *13*(9), 2281. <https://doi.org/10.3390/cancers13092281>
- OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde. Folha informativa - Câncer. ([s.d.]). Recuperado 25 de junho de 2023, de https://www3.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5588:folha-informativacancer&Itemid=1094#:~:text=O%20c%C3%A2ncer%20%C3%A9%20a%20segunda,de%20baixa%20e%20m%C3%A9dia%20renda
- Opferman, J. T., & Kothari, A. (2018). Anti-apoptotic BCL-2 family members in development. *Cell Death & Differentiation*, *25*(1), 37–45. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.170>
- Ouchi, N., Parker, J. L., Lugus, J. J., & Walsh, K. (2011). Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature Reviews Immunology*, *11*(2), 85–97. <https://doi.org/10.1038/nri2921>
- Pandey, V., Vijayakumar, M. V., Ajay, A. K., Malvi, P., & Bhat, M. K. (2012). Diet-induced obesity increases melanoma progression: Involvement of Cav-1 and FASN. *International Journal of Cancer*, *130*(3), 497–508. <https://doi.org/10.1002/ijc.26048>
- Park, M., Lim, J., & Kim, H. (2018). Docosahexaenoic Acid Induces Apoptosis of Pancreatic Cancer Cells by Suppressing Activation of STAT3 and NF-κB. *Nutrients*, *10*(11), 1621. <https://doi.org/10.3390/nu10111621>
- Pawelczyk, T., Grancow, M., Kotlicka-Antczak, M., Trafalska, E., Gębski, P., Szemraj, J., Żurner, N., & Pawelczyk, A. (2015). Omega-3 fatty acids in first-episode schizophrenia - a randomized controlled study of efficacy and relapse prevention (OFFER): rationale, design, and methods. *BMC Psychiatry*, *15*(1), 97. <https://doi.org/10.1186/s12888-015-0473-2>
- Pellegrini, C., Antonioli, L., Lopez-Castejon, G., Blandizzi, C., & Fornai, M. (2017). Canonical and Non-Canonical Activation of NLRP3 Inflammasome at the Crossroad between Immune Tolerance and Intestinal Inflammation. *Frontiers in Immunology*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00036>

- Picon-Ruiz, M., Morata-Tarifa, C., Valle-Goffin, J. J., Friedman, E. R., & Slingerland, J. M. (2017). Obesity and adverse breast cancer risk and outcome: Mechanistic insights and strategies for intervention. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *67*(5), 378–397. <https://doi.org/10.3322/caac.21405>
- Pisani, D. F., Ghandour, R. A., Beranger, G. E., Le Faouder, P., Chambard, J.-C., Giroud, M., Vegiopoulos, A., Djedaini, M., Bertrand-Michel, J., Tauc, M., Herzig, S., Langin, D., Ailhaud, G., Durantou, C., & Amri, E.-Z. (2014). The ω 6-fatty acid, arachidonic acid, regulates the conversion of white to brite adipocyte through a prostaglandin/calcium mediated pathway. *Molecular Metabolism*, *3*(9), 834–847. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2014.09.003>
- Pizato, Kiffer, Luzete, Assumpção, Correa, Melo, Sant'Ana, Ito, & Magalhães. (2019). Omega 3-DHA and Delta-Tocotrienol Modulate Lipid Droplet Biogenesis and Lipophagy in Breast Cancer Cells: the Impact in Cancer Aggressiveness. *Nutrients*, *11*(6), 1199. <https://doi.org/10.3390/nu11061199>
- Pizato, N., Luzete, B. C., Kiffer, L. F. M. V., Corrêa, L. H., de Oliveira Santos, I., Assumpção, J. A. F., Ito, M. K., & Magalhães, K. G. (2018). Omega-3 docosahexaenoic acid induces pyroptosis cell death in triple-negative breast cancer cells. *Scientific Reports*, *8*(1), 1952. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20422-0>
- Poudyal, H., Panchal, S. K., Diwan, V., & Brown, L. (2011). Omega-3 fatty acids and metabolic syndrome: Effects and emerging mechanisms of action. *Progress in Lipid Research*, *50*(4), 372–387. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.06.003>
- Quesada-López, T., Cereijo, R., Turatsinze, J.-V., Planavila, A., Cairó, M., Gavaldà-Navarro, A., Peyrou, M., Moure, R., Iglesias, R., Giralt, M., Eizirik, D. L., & Villarroya, F. (2016). The lipid sensor GPR120 promotes brown fat activation and FGF21 release from adipocytes. *Nature Communications*, *7*(1), 13479. <https://doi.org/10.1038/ncomms13479>
- Rajamäki, K., Lappalainen, J., Öörni, K., Välimäki, E., Matikainen, S., Kovanen, P. T., & Eklund, K. K. (2010). Cholesterol Crystals Activate the NLRP3 Inflammasome in Human Macrophages: A Novel Link between Cholesterol Metabolism and Inflammation. *PLoS ONE*, *5*(7), e11765. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011765>

- Ray, A., & Dittel, B. N. (2010). Isolation of Mouse Peritoneal Cavity Cells. *Journal of Visualized Experiments*, 35. <https://doi.org/10.3791/1488>
- Robinson, J. G., & Stone, N. J. (2006). Antiatherosclerotic and Antithrombotic Effects of Omega-3 Fatty Acids. *The American Journal of Cardiology*, 98(4), 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2005.12.026>
- Rossmesl, M., Jilkova, Z. M., Kuda, O., Jelenik, T., Medrikova, D., Stankova, B., Kristinsson, B., Haraldsson, G. G., Svensen, H., Stoknes, I., Sjövall, P., Magnusson, Y., Balvers, M. G. J., Verhoeckx, K. C. M., Tvrzicka, E., Bryhn, M., & Kopecky, J. (2012). Metabolic effects of n-3 PUFA as phospholipids are superior to triglycerides in mice fed a high-fat diet: possible role of endocannabinoids. *PloS one*, 7(6), e38834. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038834>
- Sangiuliano, B., Pérez, N. M., Moreira, D. F., & Belizário, J. E. (2014). Cell Death-Associated Molecular-Pattern Molecules: Inflammatory Signaling and Control. *Mediators of Inflammation*, 2014, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2014/821043>
- Sato, A., Kawano, H., Notsu, T., Ohta, M., Nakakuki, M., Mizuguchi, K., Itoh, M., Suganami, T., & Ogawa, Y. (2010). Antiobesity Effect of Eicosapentaenoic Acid in High-Fat/High-Sucrose Diet-Induced Obesity. *Diabetes*, 59(10), 2495–2504. <https://doi.org/10.2337/db09-1554>
- Scheele, C., & Nielsen, S. (2017). Metabolic regulation and the anti-obesity perspectives of human brown fat. *Redox Biology*, 12, 770–775. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.04.011>
- Serhan, C. N. (2007). Resolution Phase of Inflammation: Novel Endogenous Anti-Inflammatory and Proresolving Lipid Mediators and Pathways. *Annual Review of Immunology*, 25(1), 101–137. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141647>
- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2018). *Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Their Health Benefits*. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-111317>
- Shaikh, S. R., Rockett, B. D., & Carraway, K. (2009). Docosahexaenoic Acid Modifies the Clustering and Size of Lipid Rafts and the Lateral Organization and Surface Expression of MHC Class I of EL4 Cells. *The Journal of Nutrition*, 139(9), 1632–1639. <https://doi.org/10.3945/jn.109.108720>

- Shen, L., Yang, Y., Ou, T., Key, C.-C. C., Tong, S. H., Sequeira, R. C., Nelson, J. M., Nie, Y., Wang, Z., Boudyguina, E., Shewale, S. V., & Zhu, X. (2017). Dietary PUFAs attenuate NLRP3 inflammasome activation via enhancing macrophage autophagy. *Journal of Lipid Research*, 58(9), 1808–1821. <https://doi.org/10.1194/jlr.M075879>
- Shi, J., Gao, W., & Shao, F. (2017). Pyroptosis: Gasdermin-Mediated Programmed Necrotic Cell Death. *Trends in Biochemical Sciences*, 42(4), 245–254. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.10.004>
- Shin, S., Jing, K., Jeong, S., Kim, N., Song, K.-S., Heo, J.-Y., Park, J.-H., Seo, K.-S., Han, J., Park, J.-I., Kweon, G.-R., Park, S.-K., Wu, T., Hwang, B.-D., & Lim, K. (2013). The Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid DHA Induces Simultaneous Apoptosis and Autophagy via Mitochondrial ROS-Mediated Akt-mTOR Signaling in Prostate Cancer Cells Expressing Mutant p53. *BioMed Research International*, 2013, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2013/568671>
- Siddiqui, R. A., Harvey, K. A., Xu, Z., Bammerlin, E. M., Walker, C., & Altenburg, J. D. (2011). Docosahexaenoic acid: A natural powerful adjuvant that improves efficacy for anticancer treatment with no adverse effects. *BioFactors*, 37(6), 399–412. <https://doi.org/10.1002/biof.181>
- Simopoulos, A. (2016). An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. *Nutrients*, 8(3), 128. <https://doi.org/10.3390/nu8030128>
- Siriwardhana, N., Kalupahana, N. S., Cekanova, M., LeMieux, M., Greer, B., & Moustaid-Moussa, N. (2013). Modulation of adipose tissue inflammation by bioactive food compounds. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(4), 613–623. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.12.013>
- Smith, G. I., Atherton, P., Reeds, D. N., Mohammed, B. S., Rankin, D., Rennie, M. J., & Mittendorfer, B. (2011). Dietary omega-3 fatty acid supplementation increases the rate of muscle protein synthesis in older adults: a randomized controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 93(2), 402–412. <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.005611>

- Smith, L. K., Arabi, S., Lelliott, E. J., McArthur, G. A., & Sheppard, K. E. (2020). Obesity and the Impact on Cutaneous Melanoma: Friend or Foe? *Cancers*, *12*(6). <https://doi.org/10.3390/cancers12061583>
- Snodgrass, R. G., Huang, S., Choi, I.-W., Rutledge, J. C., & Hwang, D. H. (2013). Inflammasome-Mediated Secretion of IL-1 β in Human Monocytes through TLR2 Activation; Modulation by Dietary Fatty Acids. *The Journal of Immunology*, *191*(8), 4337–4347. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300298>
- Soni, N., Ross, A. B., Scheers, N., Nookaew, I., Gabriellsson, B. G., & Sandberg, A.-S. (2019). The Omega-3 Fatty Acids EPA and DHA, as a Part of a Murine High-Fat Diet, Reduced Lipid Accumulation in Brown and White Adipose Tissues. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(23), 5895. <https://doi.org/10.3390/ijms20235895>
- Strasser, A., & Vaux, D. L. (2020). Cell Death in the Origin and Treatment of Cancer. *Molecular Cell*, *78*(6), 1045–1054. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.05.014>
- Syntichaki, P., & Tavernarakis, N. (2002). Death by necrosis. *EMBO reports*, *3*(7), 604–609. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvf138>
- Tanaka, K., Farooqui, A. A., Siddiqi, N. J., Alhomida, A. S., & Ong, W.-Y. (2012). Effects of Docosahexaenoic Acid on Neurotransmission. *Biomolecules and Therapeutics*, *20*(2), 152–157. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2012.20.2.152>
- Tremblay, M.-E., Zhang, I., Bisht, K., Savage, J. C., Lecours, C., Parent, M., Titorenko, V., & Maysinger, D. (2016). Remodeling of lipid bodies by docosahexaenoic acid in activated microglial cells. *Journal of Neuroinflammation*, *13*(1), 116. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0580-0>
- Van der Meide, P. H., & Schellekens, H. (1996). Cytokines and the immune response. *Biotherapy*, *8*(3–4), 243–249. <https://doi.org/10.1007/BF01877210>
- Vázquez-Vela, M. E. F., Torres, N., & Tovar, A. R. (2008). White Adipose Tissue as Endocrine Organ and Its Role in Obesity. *Archives of Medical Research*, *39*(8), 715–728. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2008.09.005>
- WEINBERG, R. A. (2015). *A biologia do câncer*.

- West, L., Yin, Y., Pierce, S. R., Fang, Z., Fan, Y., Sun, W., Tucker, K., Staley, A., Zhou, C., & Bae-Jump, V. (2020). Docosahexaenoic acid (DHA), an omega-3 fatty acid, inhibits tumor growth and metastatic potential of ovarian cancer. *American journal of cancer research*, *10*(12), 4450–4463.
- Whiteside, T. L. (2008). The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene*, *27*(45), 5904–5912. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.271>
- Wortman, P., Miyazaki, Y., Kalupahana, N. S., Kim, S., Hansen-Petrik, M., Saxton, A. M., Claycombe, K. J., Voy, B. H., Whelan, J., & Moustaid-Moussa, N. (2009). n3 and n6 polyunsaturated fatty acids differentially modulate prostaglandin E secretion but not markers of lipogenesis in adipocytes. *Nutrition & Metabolism*, *6*(1), 5. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-6-5>
- Wu, J., Cohen, P., & Spiegelman, B. M. (2013). Adaptive thermogenesis in adipocytes: Is beige the new brown? *Genes & Development*, *27*(3), 234–250. <https://doi.org/10.1101/gad.211649.112>
- Wu, Q., Li, B., Li, Z., Li, J., Sun, S., & Sun, S. (2019). Cancer-associated adipocytes: key players in breast cancer progression. *Journal of Hematology & Oncology*, *12*(1), 95. <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0778-6>
- Zajdel, A., Wilczok, A., Chodurek, E., Gruchlik, A., & Dzierzewicz, Z. (2013). Polyunsaturated fatty acids inhibit melanoma cell growth in vitro. *Acta poloniae pharmaceutica*, *70*(2), 365–369.