



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

PEDRO FLORENCIO DA CUNHA FORTES JUNIOR

**O EFEITO DA FNDC5 E IRISINA EM LINHAGENS DE
CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA MCF-7 E MDA-MB-231**

VITÓRIA

2023

PEDRO FLORENCIO DA CUNHA FORTES JUNIOR

**O EFEITO DA FNDC5 E IRISINA EM LINHAGENS DE CÉLULAS DE
CÂNCER DE MAMA MCF-7 E MDA-MB-231**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade de Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Dra. Renata Dalmaschio Daltoé

Coorientador(a): Dra. Klesia Pirola Madeira

VITÓRIA

2023

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

F738e FORTES JUNIOR, PEDRO FLORENCIO DA CUNHA, 1974-
O efeito da FNDC5 e Irisina em linhagens de células de
câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231 / PEDRO
FLORENCIO DA CUNHA FORTES JUNIOR. - 2023.
54 f. : il.

Orientadora: Renata Dalmaschio Daltoé.

Coorientadora: Klesia Pirola Madeira.

Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Câncer de mama. 2. MCF-7. 3. MDA-MB-231. 4. MIOCINA. 5. IRISINA. 6. FNDC5. I. Daltoé, Renata Dalmaschio. II. Madeira, Klesia Pirola. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

PEDRO FLORENCIO DA CUNHA FORTES JUNIOR

**O EFEITO DA FNDC5 E IRISINA EM LINHAGENS DE CÉLULAS DE
CÂNCER DE MAMA MCF-7 E MDA-MB-231**


Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da
Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Bioquímica.

Aprovado(a) em 1º de setembro de 2023.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^ª. Dr^ª. Klesia Pirola Madeira - Coorientadora - Presidente
Prof^ª. Dr^ª. Renata Dalmaschio Daltoé - Orientadora

Prof^ª. Dr^ª. Juliana Barbosa Coitinho Gonçalves – Examinador Interno

Documento assinado digitalmente
 **NUNO MANUEL FRADE DE SOUSA**
Data: 05/09/2023 07:29:31-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Nuno Manuel Frade de Sousa – Examinador Externo



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
JULIANA BARBOSA COITINHO GONCALVES - SIAPE 2077211
Departamento de Ciências Fisiológicas - DCFI/CCS
Em 04/09/2023 às 15:19

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/787710?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
KLESIA PIROLA MADEIRA - SIAPE 4433029
Departamento de Farmácia e Nutrição - DFN/CCENS
Em 02/09/2023 às 12:01

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/786649?tipoArquivo=O>

AGRADECIMENTOS

À minha família, minha esposa Daniela, meu filho Gabriel e meus pais, Pedro e Margarete, que sempre me apoiaram nesta escolha. Sem o apoio de vocês, esta jornada seria muito mais difícil.

À UFES, ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e a todos os professores do PPGBiq que contribuíram para minha formação.

Às agências de fomento FAPES e CAPES.

Aos meus amigos do laboratório, pelos ensinamentos, pela paciência, por sempre se mostrarem disponíveis para sanarem minhas dúvidas e por todo suporte durante os experimentos; sem vocês não teria chegado aqui.

Aos meus colegas de turma que sempre me ajudaram.

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Renata Dalmaschio Daltoé, sempre atenciosa, paciente e pronta a ajudar da melhor forma possível. Acredito que falo em nome de todos seus orientados quando digo a honra que é tê-la como orientadora e professora. Sem a sua confiança, não seria possível a realização deste trabalho que tenho tanto carinho desde o momento da escolha. Obrigado por me receber e acolher em seu laboratório e assim fazer parte deste time incrível. Sou extremamente grato por acreditar e confiar em mim, por seu jeito único de tratar, falar e até mesmo chamar a atenção. Não há palavras que expressem a minha eterna gratidão!

Agradeço também a uma pessoa mais que especial e essencial ao PPBiq, Damiana Monteiro, por sempre sanar dúvidas referente ao programa, prazos e afins.

À minha coorientadora, professora Dra. Klesia Pirola Madeira, à professora Dra. Juliana B. Coitinho e ao professor Dr. Nuno Manuel Frade, por tão prontamente aceitarem participar da banca, tanto da qualificação quanto da defesa e, assim, contribuir com a melhoria do trabalho.

“A falta de atividade física destrói a
boa condição de qualquer ser humano,
enquanto o movimento e o exercício físico
metódico o salva e o preserva”.

HIPÓCRATES (460 a.C. - 370 a.C.)

RESUMO

O câncer é a segunda doença mais prevalente e causadora de óbitos em todo o mundo. Entre os cânceres com maior prevalência entre as mulheres está o câncer de mama; estima-se que 2,3 milhões de novos casos surjam anualmente no mundo. Neste contexto há uma preocupação crescente no campo científico com avanço desta doença. Foi descoberta em 2012 uma miocina que parece diminuir a proliferação de células cancerosas, aumentando a expressão de proteínas pró-apoptóticas, diminuindo a ação de mecanismos de síntese e proliferação celular e outros fatores pró-inflamatórios, além de regular a homeostase energética. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito das moléculas FNDC5 e Irisina em linhagens de câncer de mama humano. Foram utilizadas as moléculas recombinantes Irisina (glicosilada) e FNDC5. As moléculas foram avaliadas nas concentrações de **0,625 nmol/L, 1,25 nmol/L, 2,5 nmol/L, 5 nmol/L, 10 nmol/L, 20 nmol/L e 40 nmol/L e as células foram tratadas** 48 horas. Após este período foi adicionado o reagente MTT na concentração de 5mg/mL, sendo feita a incubação por 3 horas. Após este período foi descartado o sobrenadante, sendo adicionados 100 µl do reagente DMSO em todos os poços e, após 15 minutos, foi feita a leitura das absorbâncias a 540 nm. Foi efetuado o cálculo estimado dos valores da concentração inibitória de 50% da proliferação celular (IC50). Os cálculos foram efetuados com a utilização do software GraphPad Prism na versão 8.0. Em relação aos dados dos experimentos de MTT, para dados normais foi utilizada ANOVA de uma via com post hoc de Dunnett, e os dados não normais foram analisados por Kruskal-Wallis com post hoc de Dunn. Os resultados mostraram que a Irisina exerceu citotoxicidade na linhagem MDA-MB-231 nas concentrações 1,25 nmol/L ($p < 0,01$), 5 nmol/L ($p < 0,01$), 10 nmol/L ($p < 0,0001$), 20 nmol/L ($p < 0,05$) e 40 nmol/L ($p < 0,01$) com valores de VCM atingindo 77,66%, 78,75%, 67,25%, 77,83% e 75,5% respectivamente. Na linhagem MCF-7 tratada com Irisina, foi observada redução na viabilidade com a concentração de 2,5 nmol/L ($p < 0,05$), concentração na qual a VCM observada foi de 83,58%. Por sua vez, a molécula FNDC5 não provocou redução estatisticamente significativa na viabilidade celular metabólica nas linhagens testadas. Nossos dados mostram que a irisina pode ter um papel importante no tratamento, com efeitos deletérios sobre a viabilidade celular das células cancerosas.

Palavras-chave: Câncer de mama; MCF-7; MDA-MB-231; Miocina; FNDC5; Irisina.

ABSTRACT

Cancer is the second most prevalent disease and causes of deaths worldwide. Among the most prevalent cancers among women is breast cancer; It is estimated that 2.3 million new cases appear annually around the world. In this context, there is growing concern in the scientific field about the advancement of this disease. A myokine was discovered in 2012 that appears to reduce the proliferation of cancer cells, increasing the expression of pro-apoptotic proteins, decreasing the action of cell synthesis and proliferation mechanisms and other pro-inflammatory factors, in addition to regulating energy homeostasis. The objective of this work was to evaluate the effect of FNDC5 and Irisin molecules on human breast cancer lines. The recombinant molecules Irisin (glycosylated) and FNDC5 were used. The molecules were evaluated at concentrations of 0,625 nmol/L, 1,25 nmol/L, 2.5 nmol/L, 5 nmol/L, 10 nmol/L, 20 nmol/L and 40 nmol/L and the cells were treated 48 hours. After this period, the MTT reagent was added at a concentration of 5 mg/mL, and incubation was carried out for 3 hours. After this period, the supernatant was discarded, 100 μ l of DMSO reagent was added to all wells and, after 15 minutes, the absorbances were read at 540 nm. The estimated values of the 50% inhibitory concentration of cell proliferation (IC₅₀) were calculated. The calculations were carried out using the GraphPad Prism software in version 8.0. Regarding the data from the MTT experiments, for normal data, one-way ANOVA with Dunnett's post hoc was used, and non-normal data were analyzed by Kruskal-Wallis with Dunn's post hoc. The results showed that Irisin exerted cytotoxicity on the MDA-MB-231 strain at concentrations of 1.25 nmol/L ($p < 0.01$), 5 nmol/L ($p < 0.01$), 10 nmol/L ($p < 0.0001$), 20 nmol/L ($p < 0.05$) and 40 nmol/L ($p < 0.01$) with MCV values reaching 77.66%, 78.75%, 67.25%, 77, 83% and 75.5% respectively. In the MCF-7 line treated with Irisin, a reduction in viability was observed at a concentration of 2.5 nmol/L ($p < 0.05$), a concentration at which the observed MCV was 83.58%. In turn, the FNDC5 molecule did not cause a statistically significant reduction in metabolic cell viability in the tested lines. Our data show that irisin can play an important role in treatment, with deleterious effects on the cell viability of cancer cells.

Keywords: breast cancer; MCF-7; MDA-MB-231; myokines; FNDC5; Irisin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Tumorigênese.....	13
Figura 2 – Estrutura anatômica da mama.....	18
Figura 3 – Custos com tratamento de câncer.....	22
Figura 4 – Microambiente Tumoral (MAT).....	26
Figura 5 – Representação de domínios de FNDC5 e Irisina	27
Figura 6 - IRISINA e algumas das funções no organismo.....	28
Figura 7 – Metabolismo de MTT em um sal de formazan por células viáveis, conforme mostrado em uma reação química.	36
Figura 8 - MCF-7 e Irisina.....	38
Figura 9 - MCF-7 e FNDC5	39
Figura 10 – Comparação entre Irisina e FNDC5 no tratamento da linhagem MCF-7	40
Figura 11 – Linhagem MDA-MB-231 tratada com Irisina.....	41
Figura 12 – Linhagem MDA-MB-231 tratada com FNDC5	42
Figura 13 - Comparação na linhagem MDA-MB-231 com os tratamentos com Irisina e FNDC5	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resumo dos resultados do níveis de irisina em estudos in vitro.....	29
Tabela 2 - Concentração inibitória estimada de 50% (IC50) das moléculas, FNDC5 e IRISINA, em linhagens MCF-7 e MDA-MB-231.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ATCC	American Type Culture Collection
AJCC	American Joint Committee on Cancer
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
CAF	Fibroblastos associados ao Câncer
CaMK	Calmodulina quinase cálcio-dependente
DCNT	Doença Crônica Não Transmissível
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMT	Transição epitélio-mesênquima
GLUT-4	Transportador de glicose 4
HER-2	Fator de crescimento humano epidermal 2
HIF-1	Fator induzido por hipóxia 1
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
IC50	Concentração inibitória de 50% da proliferação celular
INCA	Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva
ml	Mililitro
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógenos
MEF2C	Fator intensificador de miócitos 2 C
MEF2D	Fator intensificador de miócitos 2 D
mTOR	Alvo mecanístico da rapamicina
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]
NK	Célula Natural killer
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato salino
PD-1	ligante 1 de morte celular programada
PDH	Piruvato desidrogenase (PDH)
PDK1	Piruvato desidrogenase quinase 1
PI3K	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-cinase
PTEN	Fosfatase homóloga à tensina
RE	Receptor de estrogênio
RP	Receptor de progesterona

RTK	Receptor Tirosina Kinase
RPMI	Instituto Memorial Roswell Park
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
MAT	Microambiente tumoral
VCM	Viabilidade Celular Metabólica
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
μ l	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
1.1	CÂNCER	12
2	ESTRUTURA ANATÔMICA DA MAMA	17
2.1	CÂNCER DE MAMA (CAM)	18
2.2	FATORES DE RISCO	20
2.3	CUSTOS COM O CÂNCER DE MAMA	21
2.4	ESTILO DE VIDA	22
2.5	METABOLISMO CELULAR	23
3	MIOCINAS: FNDC5 E IRISINA	26
3.1	IRISINA E CÂNCER	29
4	OBJETIVOS	33
4.1	GERAL	33
4.2	ESPECÍFICOS	33
5	MATERIAIS E MÉTODOS	34
5.1	LINHAGENS CELULARES	34
5.2	SUBSTÂNCIAS TESTADAS	34
5.3	CULTIVO CELULAR	35
5.4	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR METABÓLICA (VCM) POR ENSAIO DE MTT	36
5.5	DETERMINAÇÃO DAS IC50 DOS COMPOSTOS TESTADOS	37
5.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
6	RESULTADOS	38
6.1	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR METABÓLICA (VCM) POR MTT	38
7	DISCUSSÃO	44
8	CONCLUSÕES	47
9	PERSPECTIVAS	48
	REFERÊNCIAS	49

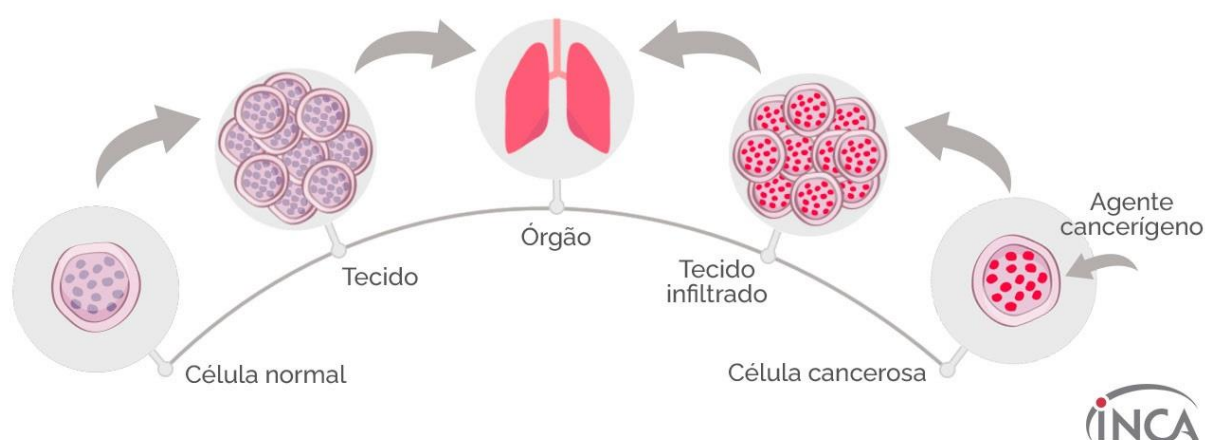
1 INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 CÂNCER

O câncer é um grande problema de saúde pública mundial, uma vez que é a segunda principal causa de óbito, sendo considerada uma doença complexa que afeta milhões de pessoas em todo o mundo. Em 2020, o diagnóstico e tratamento do câncer foram afetados negativamente devido à pandemia do coronavírus 2019 (COVID-19). O acesso reduzido aos cuidados devido ao medo da exposição a COVID-19 resultou em atrasos no diagnóstico e tratamento que podem ter levado a uma queda na incidência de câncer, seguida por um aumento no número em estágio avançado e, finalmente, aumento da mortalidade (YABROFF *et al.*, 2021).

O câncer é uma das doenças de maior prevalência e que mais vem se desenvolvendo. Estima-se que a cada ano, mais de 19 milhões de pessoas são diagnosticadas com algum tipo de câncer no mundo (SUNG *et al.*, 2021). Além disso, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é um grande grupo de doenças que podem surgir em qualquer órgão ou tecido do corpo em que células anormais possuem um crescimento descontrolado, que podem ultrapassar seus limites habituais para invadir partes adjacentes e/ou se espalhar para outros tecidos distantes (WILD; WEIDERPASS; STEWART, 2020; INCA, 2021b), a esse processo dá-se o nome de tumorigênese, conforme mostrado na figura 1. O câncer pode ocorrer em qualquer parte do corpo e se apresentar de diferentes formas, podendo causar sérios danos à saúde e levar a óbito (INCA, 2022).

Figura 1 – Desenvolvimento Tumoral (Tumorigênese)



Fonte: INCA, 2022

Os fatores que formam um conjunto de capacidades funcionais adquiridas por células humanas à medida que estas passam da normalidade para estados de crescimento neoplásico, mais especificamente capacidades que são cruciais para formar tumores malignos, são designados como “*Hallmarks of cancer*” (HANAHAN; WEINBERG, 2000, 2011) e incluem: (i) sinalização proliferativa sustentada; (ii) evasão dos supressores de crescimento; (iii) invasão e metástase; (iv) imortalidade replicativa; (v) indução de angiogênese; (vi) resistência à morte celular; (vii) reprogramação do metabolismo energético; (viii) evasão imunológica; (ix) instabilidade e mutação do genoma; (x) inflamação promotora de tumores; (xi) desbloqueio da plasticidade fenotípica; (xii) reprogramação epigenética; (xiii) microbiomas polimórficos; e (xiv) células senescentes (HANAHAN; WEINBERG, 2000, 2011; HANAHAN, 2022).

Ainda, segundo o INCA, as causas podem variar e, em muitos casos, são multifatoriais. Diversos fatores podem contribuir para o desenvolvimento desta doença, como:

- Predisposição genética;
- Histórico familiar;
- Idade avançada;
- Exposição a agentes cancerígenos;
- Obesidade ou sobrepeso;
- Uso de tabaco;
- Consumo etílico excessivo;

- Exposição à radiação ionizante; e
- Infecção por alguns tipos de vírus, tais como o Papilomavírus humano e o vírus da hepatite.

O câncer pode se manifestar em diferentes partes do corpo, sendo denominado conforme a região primária em que se desenvolve. Os dez principais tipos de câncer representam mais de 60% do total de casos novos. O câncer de mama feminina, por exemplo, é o mais incidente no mundo, com 2,3 milhões (11,7%), seguido pelo câncer de pulmão, 2,2 milhões (11,4%); cólon e reto, 1,9 milhões (10,0%), próstata, 1,4 milhões (7,3%), e pele não melanoma, 1,2 milhões (6,2%) de casos novos, segundo dados do GLOBOCAN 2020 (SUNG *et al.*, 2021). Estima-se que um em cada cinco pessoas terão algum tipo de câncer durante a vida (FERLAY *et al.*, 2021; SUNG *et al.*, 2021). Cada tipo de câncer possui suas particularidades e deve ser tratado conforme as mesmas. Por exemplo, o câncer de mama possui, como alternativa de tratamento, mastectomia, radioterapia, quimioterapia e terapia hormonal, dependendo do estágio do tumor e das necessidades individuais da paciente, tais como a existência de outras morbidades, idade, sarcopenia, entre outras (SLEDGE *et al.*, 2014).

O tratamento do câncer de mama depende do estadiamento tumoral, sendo este é o processo utilizado para determinar a localização e a extensão do câncer no corpo da paciente e o avanço da doença no organismo. O estadiamento é realizado quando o paciente recebe o diagnóstico inicial de câncer e antes de qualquer tratamento ser iniciado (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019). Os principais tipos de estadiamento são:

- Estadiamento clínico: Este, na verdade, é uma estimativa da extensão da doença com base nos resultados do exame físico, exames de imagem (raios X, tomografia computadorizada, etc.) e biópsia de tumor. O estágio clínico é uma parte fundamental do diagnóstico para decidir o melhor tratamento a ser iniciado (AJCC, 2017).
- Estadiamento patológico: se o tratamento cirúrgico foi realizado, os médicos podem determinar o estadiamento patológico, também denominado estadiamento cirúrgico. O estadiamento patológico baseia-se nos resultados dos exames e testes mencionados anteriormente, bem como o que foi observado durante a cirurgia. O estadiamento patológico oferece informações mais precisas, que podem ser utilizadas para prever a resposta ao tratamento e seus resultados (prognóstico) (AJCC, 2017).

Pode ser classificado quanto ao subtipo e quanto à disseminação, quando não teve estágio 0 ou 1, caso tenha disseminado para locais próximos, para os gânglios linfáticos (estágios II ou III) ou para outras partes do corpo (estágio IV). Os tratamentos visam minimizar a recidiva tumoral, que podem incluir: cirurgia para remoção do tumor da mama, radioterapia para reduzir o risco de recidiva na mama e nos tecidos circundantes e medicamentos para eliminar células cancerosas e prevenir a propagação, incluindo terapias hormonais, quimioterapia ou terapias biológicas direcionadas (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

Os tratamentos médicos para CAM, que podem ser administrados antes (“neoadjuvante”) ou depois da cirurgia (“adjuvante”), baseiam-se na subtipagem biológica. O câncer que expressa o receptor de estrogênio (ER) e/ou receptor de progesterona (PR) provavelmente responderá a terapias endócrinas (hormonais), como tamoxifeno ou inibidores de aromatase (ALLISON *et al.*, 2020; GOLDBERG *et al.*, 2021).

Os cânceres que não expressam ER ou PR são “negativos aos receptores hormonais” e necessitam ser tratados com quimioterapia, a menos que o câncer seja muito pequeno. Os regimes de quimioterapia disponíveis hoje são muito eficazes na redução das chances de disseminação ou recidiva tumoral e geralmente são administrados como terapia ambulatorial (ALLISON *et al.*, 2020; GOLDBERG *et al.*, 2021).

Os cânceres de mama podem superexpressar independentemente uma molécula chamada oncogene HER-2/neu. Esses cânceres “HER-2 positivos” são passíveis de tratamento com agentes biológicos direcionados, como o trastuzumabe, que são muito eficazes, mas também muito caros, porque são anticorpos e não produtos químicos. Quando são administradas terapias biológicas direcionadas, elas são combinadas com quimioterapia para torná-las eficazes na destruição de células cancerosas (WOLFF *et al.*, 2018).

A radioterapia desempenha um papel muito importante no tratamento do câncer de mama, pois, no caso de câncer de mama em estágio inicial, a radiação pode impedir que a paciente seja submetida a uma mastectomia. Com cânceres em estágio avançado, a radioterapia pode reduzir o risco de recidiva, mesmo caso tenha sido realizado a mastectomia. Para o estágio avançado do câncer de mama, em algumas circunstâncias, a radioterapia pode reduzir o risco de morte pela doença. A eficácia

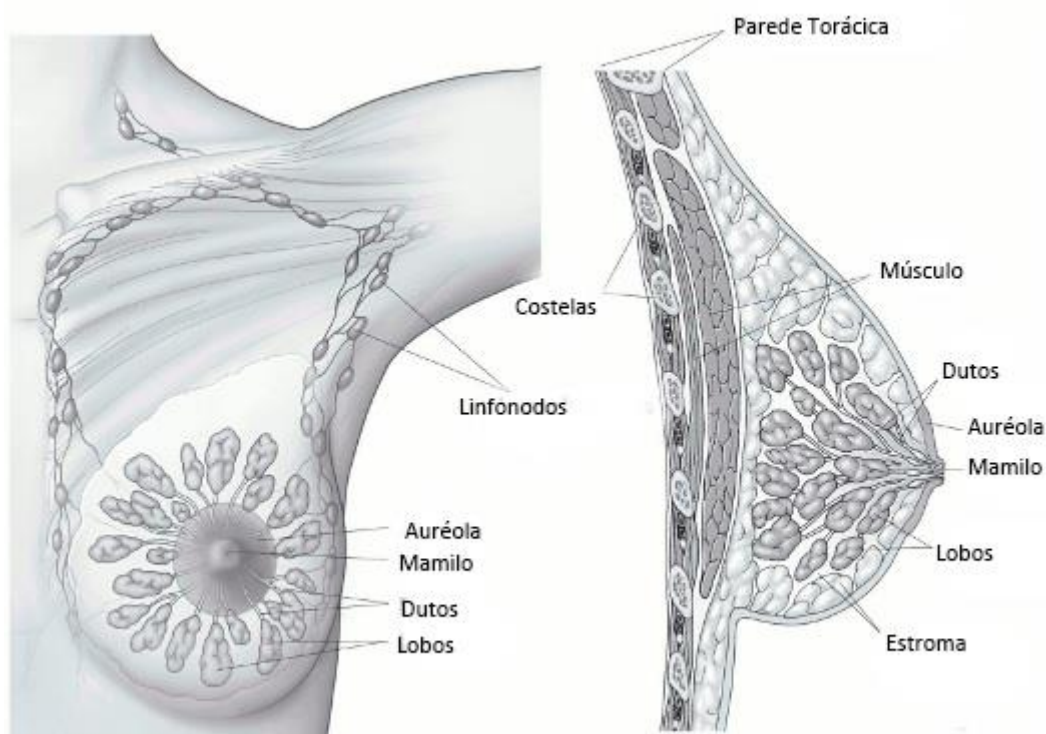
das terapias contra este tipo de câncer depende do curso completo do tratamento (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2023).

Conclui-se que, apesar dos avanços tecnológicos e das pesquisas, o câncer ainda permanece como uma doença de grande impacto na sociedade. Todos os anos, milhões de pessoas são diagnosticadas com algum tipo de câncer e muitas vão a óbito. Nesse contexto, a prevenção desempenha um papel crucial no combate a esta doença e adotar um estilo de vida saudável, evitar o uso de tabaco, evitar consumo excessivo de álcool, praticar exercícios físicos regularmente, manter uma alimentação balanceada e fazer exames regulares de rastreamento podem ajudar na identificação precoce e aumentar as chances de recuperação (INCA, 2021a, 2021b; IARC, 2020).

2 ESTRUTURA ANATÔMICA DA MAMA

A glândula mamária é um órgão par o qual se situa na parede anterior do tórax, na parte superior e está apoiada sobre o músculo peitoral maior. Estende-se da segunda a sexta costela no plano vertical e do esterno a linha axilar anterior no plano horizontal, podendo ser dividida em quatro quadrantes para facilitar os estudos, análises e diagnósticos: súpero-medial, ínfero lateral, ínfero medial e súperolateral, e as maiores incidências do câncer de mama acontecem no quadrante súperolateral. Está firmemente fixada à derme da pele sobrejacente, sobretudo por ligamentos cutâneos significativos, os ligamentos suspensores da mama (de Cooper).

Essas condensações de tecido conectivo fibroso, mais desenvolvidas na parte superior da glândula, ajudam a sustentar os lobos e lóbulos da glândula mamária (MOORE, 2013). São compostas por uma porção ductal e uma porção secretora, cada glândula tem um ducto excretor – ducto lactífero. Sob a aréola, cada ducto tem o seio lactífero. Os ductos lactíferos dão origem a brotos que formam 15 a 20 lóbulos da glândula mamária, que constituem o parênquima; assim, cada lóbulo é drenado por um ducto lactífero; esses ductos convergem e têm aberturas independentes. Cada ducto tem uma parte dilatada, situada profundamente à aréola, o seio lactífero, na qual uma pequena gotícula de leite se acumula ou permanece na lactante (MOORE; DALLEY; AGUR, 2013).

Figura 2 – Estrutura anatômica da mama

A figura 2 representa a glândula mamária saudável, um órgão par, que se situa na parede anterior e superior do tórax e está apoiada sobre o músculo peitoral maior; se estende da segunda à sexta costela no plano vertical e do esterno à linha axilar anterior no plano horizontal. A mama feminina é composta por lobos (glândulas produtoras de leite), por ductos (pequenos tubos que transportam o leite dos lobos ao mamilo) e por estroma (tecido adiposo e tecido conjuntivo que envolve os ductos e lobos além de vasos sanguíneos e vasos linfáticos).

Fonte: Moore, 2013.

Existem diferentes tipos de câncer e diferentes meios de descrevê-los. Assim, quando o tumor se origina a partir de células epiteliais, que revestem órgãos e tecidos, é chamado de carcinoma. No entanto, quando surge a partir de células epiteliais que contém glândulas, tais como o estômago, cólon, pâncreas, próstata ou mama, o carcinoma é chamado de adenocarcinoma, sendo a maioria dos cânceres de mama do tipo adenocarcinoma (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2022).

2.1 CÂNCER DE MAMA (CAM)

Segundo a *International Agency for Research on Cancer* (IARC), em 2020, o câncer de mama, excetuando-se o câncer de pele não melanoma, se tornou o principal tipo diagnosticado no mundo, correspondendo a 11,7% do total de casos. Ocorreram 2,3 milhões de novos casos, equivalendo a 24,5% de todos os cânceres em mulheres, seguido pelos cânceres de cólon e reto, 865 mil (9,4%), pulmão, 771 mil (8,4%); colo do útero, com 604 mil (6,5%), e pele não melanoma, com 475 mil (5,2%) novos casos

no mundo (FERLAY *et al.*, 2021; SUNG *et al.*, 2021). Do total de mulheres diagnosticadas com câncer de mama, aproximadamente, 685.000 foram a óbitos, tornando-se a principal causa de óbitos por câncer em mulheres.

No Brasil, estima-se, para cada ano do triênio 2023-2025, 704 mil novos casos, sendo 70% deles previstos para as regiões Sul e Sudeste. O câncer de mama em mulheres (Sul: 71,44/100 mil; Sudeste: 84,46/100 mil), o de próstata (Sul: 57,23/ 100 mil; Sudeste: 77,89/ 100 mil) e o de cólon e reto (Sul: 26,46/100 mil; Sudeste: 28,75/100 mil) são os três tipos mais incidentes nessas duas regiões. Enquanto no Norte e Nordeste, o câncer de próstata (Norte: 28,40/100 mil; Nordeste: 73,28/100 mil) é o mais incidente, seguido do câncer de mama feminina (Norte: 24,99/100 mil; Nordeste: 52,20/100 mil) e câncer do colo do útero (Norte: 20,48/100 mil; Nordeste: 17,59/100 mil). E na região Centro-oeste, o câncer de próstata apresenta um risco estimado de 61,60/ 100 mil, que representa o que mais incide sobre esta população, seguido do de mama feminina (57,28/ 100 mil) e do câncer colorretal (17,08/100 mil) (INCA, 2023).

As taxas de novos casos de câncer de mama estão aumentando rapidamente em países de baixo e médio desenvolvimento, como os da América do Sul, da África e da Ásia. Esse aumento resulta principalmente das transições demográfica e epidemiológica pelas quais o mundo está passando. Do ponto de vista demográfico, observa-se uma redução nas taxas de fertilidade e de mortalidade infantil e um consequente aumento na proporção de idosos na população; do ponto de vista da transição epidemiológica, dá-se a substituição gradual da mortalidade por doenças infecciosas pelas mortes relacionadas às doenças crônicas. O envelhecimento e a mudança de comportamento e do ambiente, incluindo mudanças estruturais, que têm impacto na mobilidade, na recreação, na dieta e na exposição a poluentes ambientais, favorecem o aumento da incidência e da mortalidade por câncer (WILD *et al.*, 2020).

O câncer de mama é uma doença heterogênea com grande variação em suas características morfológicas e moleculares e em sua resposta clínica. A maioria dos casos, quando descoberto em estágios iniciais, apresenta bom prognóstico (INCA, 2021b; WILD *et al.*, 2020). As células cancerosas podem se espalhar para o tecido mamário próximo (invasão) e assim criarem tumores que causam caroços ou espessamento do tecido. Esses tumores (invasivos) podem se espalhar para os gânglios linfáticos próximos ou para órgãos mais distantes, caracterizando assim a metástase (OMS, 2023).

Quanto às classificações existentes, a apresentação histológica é a base das classificações para o CAM (CSERNI, 2020; IARC, 2020c), já que se baseia no padrão de crescimento, arquitetura e morfologia celular. Conforme descrito a seguir os tumores podem ser classificados em:

- Carcinoma Ductal “*in situ*”, é considerado não invasivo ou câncer de mama pré-invasivo;
- Carcinoma Ductal Invasivo é o tipo mais comum de câncer de mama (70 a 80%);
- Carcinoma Ductal invasivo (ou infiltrante) se inicia em um ducto de leite, rompe a parede desse ducto e cresce no tecido adiposo da mama;
- Carcinoma Lobular “*in situ*” as células se parecem com as células cancerosas que crescem nos lóbulos das glândulas produtoras de leite, mas não se desenvolvem através da parede dos lóbulos;
- Carcinoma Lobular Invasivo inicia nas glândulas produtoras de leite e assim como o carcinoma ductal invasivo, pode se espalhar para outras partes do corpo. É o segundo tipo mais comum, correspondendo de 10 a 15% dos casos. Complementarmente, existem subtipos do carcinoma invasivo menos comuns. Alguns deles podem ter um prognóstico melhor do que o carcinoma ductal invasivo e incluem: epidermóide; cístico adenoide; metaplásico; medular; mucinoso, papilífero ou papilar e apócrino tubular (HENRY *et al.*, 2020).

2.2 FATORES DE RISCO

O CAM é uma doença complexa e multifatorial, relacionado aos seguintes fatores de risco:

- Não-Modificáveis: Envelhecimento, menarca precoce, nuliparidade (não ter amamentado), menopausa tardia (após os 55 anos), primeira gravidez após os 30 anos. (INCA, 2020);
- Fatores Genéticos: Histórico familiar de câncer de mama (relacionados à presença de mutações em determinados genes transmitidos na família, especialmente BRCA1 e BRCA2) (INCA, 2020). Representa ~ 5 a 10% dos

casos (American Cancer Society, 2022, INCA, 2021a, 2021b; SUNG et al., 2021; WILD *et al.*, 2020).

- Fatores Epigenéticos (comportamentais/ambientais): Ingestão de bebida alcoólica; exposição à radiação ionizante (tipo de radiação presente na radioterapia e em exames de imagem como raios X, mamografia e tomografia computadorizada), tabagismo, inatividade física, sobrepeso e obesidade (principalmente, após a menopausa) (INCA, 2020). Representa ~ 90% dos casos (American Cancer Society, 2022).

2.3 CUSTOS COM O CÂNCER DE MAMA

Como apresentado, câncer de mama é a principal causa de morbidade e mortalidade por câncer entre mulheres no mundo. No Brasil, essa realidade não é diferente, e o tratamento para esta doença representa um desafio tanto para o paciente devido ao sistema de saúde, principalmente, ao sistema público de saúde (DATASUS, 2022).

Os gastos com o tratamento de câncer de mama envolvem uma série de despesas que vão desde a prevenção à terapia neoadjuvante e adjuvante (radioterapia, quimioterapia, hormonioterapia e terapia-alvo). Além disso, são necessários recursos para tratar eventuais complicações e fornecer cuidados paliativos a pacientes em estágios avançados (DATASUS, 2022).

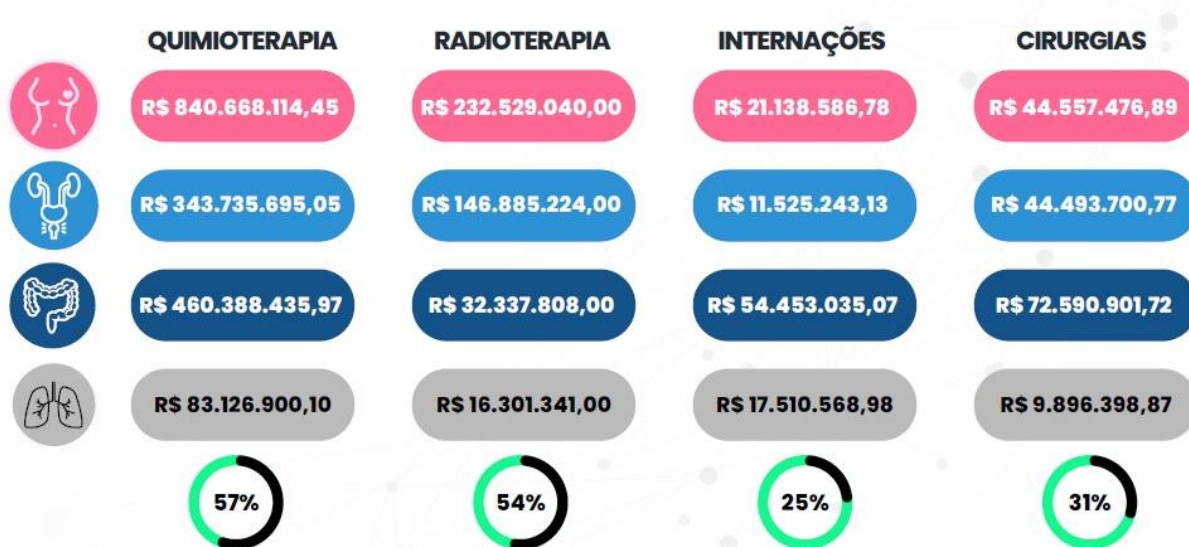
Um estudo publicado no *Journal of Cancer Epidemiology and Prevention* (2019) demonstrou que o custo médio do tratamento do CAM está diretamente relacionado com o estadiamento da doença. Os autores analisaram os dados de 583 mulheres e constataram que o custo total médio de tratamento por paciente em estágio inicial foi de R\$ 30.000,00, enquanto em pacientes em estágios avançados foi de aproximadamente R\$ 90.000,00.

Mais recentemente, uma pesquisa realizada pela Associação Brasileira de Linfoma e Leucemia (ABRALE), em 2022, apresentou o estudo: “Quanto custa o câncer no SUS?”. Com base nos gastos federais, não incluindo números estaduais, municipais, filantrópicos e privados, a pesquisa mostra que as despesas executadas na área de saúde, em 2022, passaram de R\$ 136 bilhões. Desse total, mais de R\$ 62 bilhões foram gastos em assistência hospitalar e ambulatorial e quase R\$ 4 bilhões

em tratamento oncológico, divididos, percentualmente, em tratamento ambulatorial (77%), cirurgias (13%) e internações (10%).

Conforme mostrado na figura 3, esses valores evidenciam a importância de investir em estratégias de prevenção e diagnóstico precoce, tendo em vista que o tratamento em estágios iniciais tende a ser menos oneroso para o sistema de saúde, além de possuir maior chance de cura e tratamento menos agressivo.

Figura 3 – Custos com tratamento de câncer



Fonte: Datasus, 2022.

2.4 ESTILO DE VIDA

A OMS estima que, anualmente, ocorram 41 milhões de mortes por Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT), o equivalente a 74% de todas as mortes no mundo e 17 milhões de mortes prematuras (30 a 70 anos). As principais doenças que mais acometem são: doenças cardiovasculares (17,9 milhões), seguidas por cânceres (9,3 milhões), doenças respiratórias crônicas (4,1 milhões) e diabetes (2 milhões incluindo mortes por doenças renais causadas pela diabetes) (OMS, 2020).

Devido ao aumento de óbitos por DCNT, gerando uma epidemia global, em 2012, na Conferência das Nações Unidas sobre Desenvolvimento Sustentável (Rio de Janeiro, 20–22 de junho de 2012), foi assinado um compromisso no qual os países participantes se comprometeram, no período de 2013-2020, a diminuir em 25%, os óbitos por DCNT, em especial as 4 principais doenças: doenças cardiovasculares, câncer (neoplasias), doenças respiratórias crônicas e diabetes, por meio do

fortalecimento dos sistemas de saúde para o fornecimento de cobertura de saúde universal e equitativa e promoção acessível à prevenção, tratamento, atenção e apoio relacionados, e ao estabelecimento ou fortalecimento de políticas nacionais multissetoriais para a prevenção e controle das DCNT. Em 2019, a assembleia da OMS estendeu o plano de ação global para prevenção e controle da DCNT 2013-2020 para 2021-2030, solicitando o desenvolvimento de um Roteiro de Implementação 2023 a 2030 para acelerar o progresso na prevenção e controle de DCNTs (OMS, 2023).

A resolução WHA57.17 se refere à estratégia Global sobre Dieta, Atividade Física e Saúde. Nesse contexto, o estilo de vida cada vez mais sedentário, estresse crônico, alimentação rica em gorduras com baixo valor nutricional tem levado ao ganho de gordura corporal, elegendo-o como o quarto principal fator de risco para mortalidade global por qualquer tipo de doença (OMS, 2020). A atividade física surge como um promotor do bem-estar cardiometabólico, uma vez que melhora o desempenho cognitivo e ajuda efetivamente na prevenção e no tratamento de uma variedade de condições de saúde, incluindo doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2, câncer e outros distúrbios metabólicos (Departamento de Saúde dos EUA e Human Services, 2008; BOUCHARD *et al.*, 1990; GARBER *et al.*, 2011; PATE *et al.*, 1995; STRANAHAN; MATTSON, 2012).

2.5 METABOLISMO CELULAR

O metabolismo celular alterado é uma marca registrada da patogênese do câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2011; PAVLOVA; THOMPSON, 2016). A reprogramação do metabolismo das células cancerosas, principalmente devido à ativação exacerbada de vias de síntese, crescimento, proliferação e Transição Epitélio Mesenquimal (EMT) (PI3K/AKT/mTOR, STAT3 e Snail)(MOON; MANTZOROS, 2014) (SHAO *et al.*, 2017), além da inibição das vias de morte celular. Isso resulta em alterações significativas no influxo de metabólitos, como o lactato, na regulação da via e as decisões sobre o destino da célula, o que contribui para a tumorigênese (PAVLOVA; THOMPSON, 2016).

Essa reprogramação também altera a composição do metabólito extracelular no microambiente circundante, conduzindo assim mudanças fenotípicas nas células do estroma e mais propagação do crescimento do tumor (SCHWÖRER *et al.*, 2019).

Respostas imunológicas alteradas ou enganadas e os microambientes tumorais (MAT) inflamatórios, ácidos e com pouco oxigênio, também são promotores estabelecidos do câncer (HANAHAN *et al.*, 2011; PALUCKA *et al.*, 2016). Evasão de células cancerosas da “destruição” imunológica por linfócitos T e B, macrófagos e células natural killer (NK) é uma característica de todo tumor que escapa à vigilância imunológica (HANAHAN; WEINBERG, 2011). O acúmulo de células imunes inatas, como monócitos, neutrófilos e macrófagos, no MAT, pode promover a tumorigênese. O ambiente pobre em oxigênio aumenta a expressão de HIF-1alfa e estimula a síntese de VEGF e angiogênese, que ocorre pela ativação da via de sinalização PI3K/Akt (PARK *et al.*, 2011).

Sistemas regulatórios, incluindo metabolismo e função imunológica, não operam isoladamente, mas são altamente interdependentes na manutenção da homeostase do organismo (WANG *et al.*, 2019). Um exemplo de tal interação é a reprogramação metabólica das células cancerosas, que induz um MAT ácido e pobre em nutrientes, levando ao acúmulo de células imunossupressoras e fenótipos que inibem apresentação de antígeno tumoral e ativação de células T, reduzindo as respostas imunes antitumorais apropriadas (SCHWÖRER *et al.*, 2019).

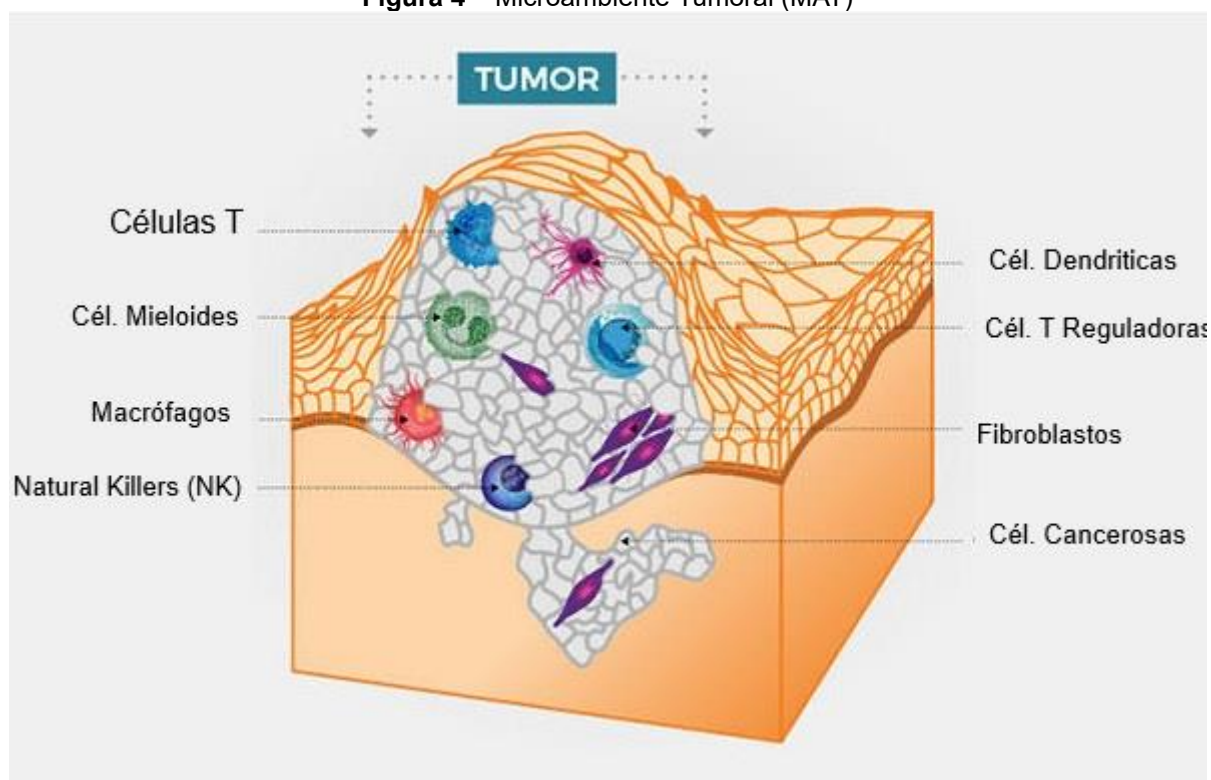
No nível celular, as vias de sinalização fosfatidilinositol-3 quinase (PI3-K), proteína Quinase B (AKT ou PKB), alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), parecem ser uma das principais vias. PI3K/Akt/mTOR é uma importante via de sinalização intracelular, que responde à disponibilidade de nutrientes, hormônios e fatores de crescimento sendo bem estabelecida por desempenhar um papel muito significativo no crescimento e proliferação de células tumorais. O papel central desta via é desempenhado pelo heterodímero PI3K, que pertence à classe IA das PI3Ks. Este heterodímero consiste em duas subunidades, com a subunidade reguladora (p85), regulando a ativação da subunidade catalítica (p110) em resposta à ausência ou presença de estimulação pelas tirosina quinases receptoras do fator de crescimento (RTKs) (Cantley, 2002). Cada subunidade possui isótopos diferentes em mamíferos e seus respectivos genes os codificam. Nomeadamente, as subunidades p110 α , p110 β e p110 δ são codificadas por PIK3CA, PIK3CB e PIK3CD, enquanto a subunidade reguladora é codificada por PIK3R1, PIK3R2, PIK3R3 (Engelman *et al.*, 2006).

PI3Ks fosforilam fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP2) em fosfatidilinositol 3,4,4-trifosfato (PIP3) que por sua vez leva à fosforilação de Akt, uma serina/treonina

quinase, impactando no ciclo das celular, na sobrevivência e crescimento [Zhao e Vogt, 2008]. A fosfatase homóloga a tensina (PTEN) é um importante supressor tumoral, que tem ação oposta e desfosforila PIP3 a PIP2 [Maehama e Dixon, 1998]. A perda de PTEN e mutações no gene PIK3CA, estão entre as alterações mais comumente observadas em cânceres humanas, incluindo o câncer de mama (Network, 2012; Samuels, 2004). Este processo resulta na ativação da subunidade catalítica levando a um aumento da atividade de sinalização de PI3K. Foi sugerido que a ativação independente de Akt da via de sinalização PI3K pode ocorrer independente de mutações em PIK3CA podendo levar à tumorigênese (Bruhn et al., 2013; Zhang et al., 2012).

mTORC1 é um complexo que consiste em uma proteína Raptor, mLST8 e substrato Akt 40 rico em prolina (PRAS40). mTORC1 é ativado por Akt através da inibição da esclerose tuberosa 1/2 (TSC1/2), um supressor tumoral e heterodímero de tuberina e hamartina, que atua como uma proteína ativadora da guanosina trifosfatase para Rheb-GTP. Akt fosforila TSC2 nos locais serina 939 e treonina 1462, inibindo assim TSC1/2; também fosforila o PRAS40, estimulando assim o mTORC1, que por sua vez afeta o metabolismo celular e leva ao crescimento celular por meio de sua ação na proteína ribossômica S6 quinase 1 40S (S6K1) e na proteína de ligação ao fator de iniciação eucariótica 4E (4EBP1) (Dowling et al., 2010; Holz, 2012). Estas vias desempenham um papel crucial no ciclo celular, metabolismo celular, crescimento, proliferação, sobrevivência e inibição da apoptose (morte celular programada), assim como resistência a quimioterápicos. (Khan et al., 2013; Page C, Lin HJ, Jin Y, Castle VP, Nunez G, Huang M, 2000; Pixu Liu, Hailing Cheng, Thomas M. Roberts, 2011; Wang et al., 2017).

Figura 4 – Microambiente Tumoral (MAT)



Fonte: adaptado do American Cancer Society, 2020.

3 MIOCINAS: FNDC5 E IRISINA

O músculo esquelético passa a ter uma função endócrina a partir da contração muscular promovida pela atividade física, estimulando a síntese e liberação de proteínas com funções autócrinas, parácrinas ou endócrinas produzidas no músculo esquelético, denominadas miocinas (CARSON, 2017). Elas apresentam características anti-inflamatórias e tem a função de mensageiro químico, realizando a comunicação entre o músculo esquelético e outros tecidos e órgãos, justificando os principais benefícios da atividade física para saúde (BOSTRÖM *et al.*, 2012; SWICK; ORENA; O'CONNOR, 2013; ROBERTS *et al.*, 2017). Entre essas miocinas, podem ser citadas a interleucina-6 (IL-6), Interleucina 15 (IL-15), oncostatina, miostatina, fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (RASCHKE *et al.*, 2013; DI RAIMONDO *et al.*, 2017) e Irisina (Ir) (BOSTRÖM *et al.*, 2012).

Foi descrita pela primeira vez em 2012 por Boström *et al.* como sendo um hormônio liberado na corrente sanguínea a partir do músculo esquelético em resposta a atividade física, a Ir é parte integrante de uma proteína de membrana denominada FNDC5. A síntese e translocação da FNDC5, resulta na formação de uma nova

proteína, chamada de Irisina (Ir) a partir da clivagem proteolítica. Este processo é controlado pelo PGC1 α (coativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma coativador transcricional).

Como mencionado acima, as células musculares produzem a proteína FNDC5, cujo destino é a membrana plasmática. A sequência N-terminal é seguida por um domínio de fibronectina tipo III (FNIII), um domínio transmembranar e uma cauda c-terminal correspondente à região citosólica da proteína, conforme mostrado na figura 5. A irisina é produzida após a clivagem proteolítica da proteína FNDC5 ativa, e o fragmento N-terminal resultante, correspondente ao ectodomínio FNDC5 extracelular, chamado de irisina, é liberado na circulação (ALBRECHT *et al.*, 2020). A irisina é um peptídeo formado por 112 resíduos de aminoácidos com um peso molecular de 12 kDa (ALBRECHT *et al.*, 2020; BOSTRÖM *et al.*, 2012), conforme mostrado na figura 5. Além disso, a sequência de aminoácidos da irisina é altamente conservada em todas as espécies de mamíferos sequenciadas, sendo a irisina do camundongo e a humana 100% idêntica (BOSTRÖM *et al.*, 2012).

Figura 5 – Representação de domínios de FNDC5 e Irisina

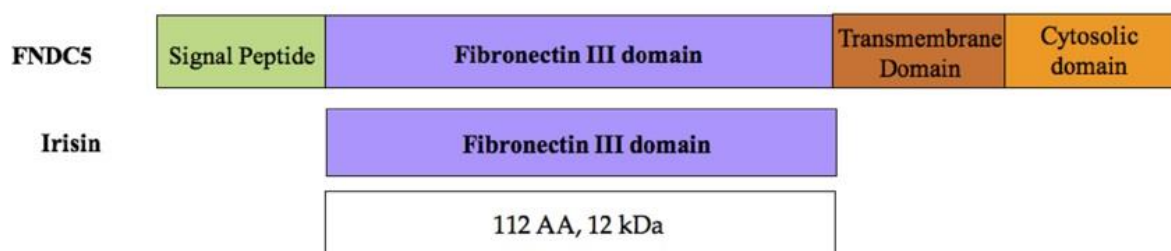


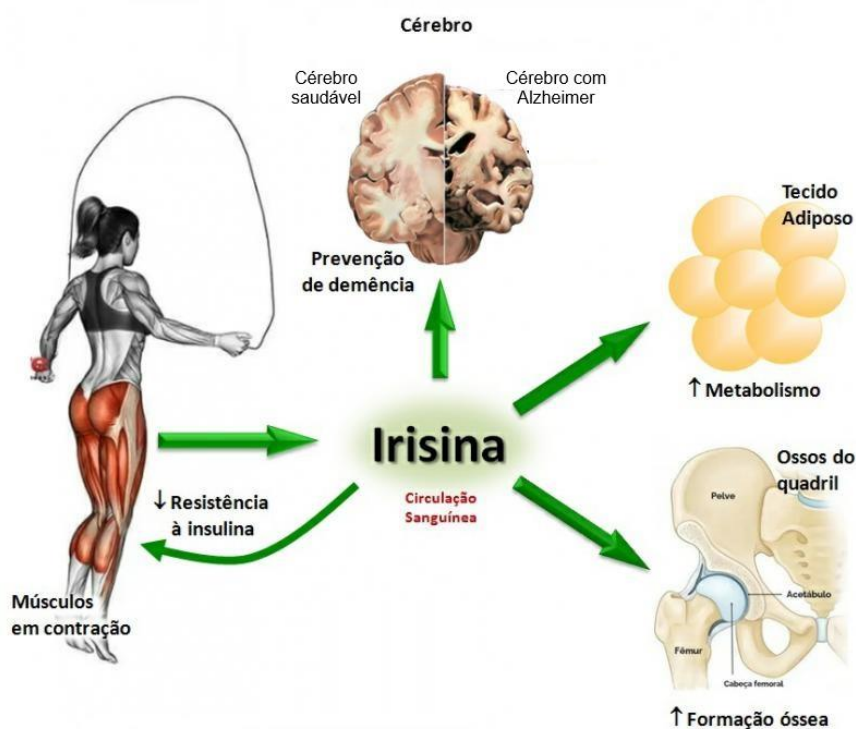
Figura 5 Sequência de sinal N-terminal é seguida por um tipo de fibronectina Domínio III (FNIII), um domínio transmembrana e uma cauda c-terminal correspondente à região citosólica da proteína. A Ir é produzida a partir da clivagem proteolítica de FNDC5 ativa
Fonte: Albrecht *et al.* (2020).

O processo de síntese e posterior liberação da Irisina na corrente sanguínea ocorre por meio da contração muscular pelo exercício físico, mediada pelo fator transcricional PGC1 α (AKIMOTO *et al.*, 2005; BOSTRÖM *et al.*, 2012). A contração muscular leva ao aumento do influxo de cálcio intracelular e à ativação da calmodulina quinase cálcio-dependente (CaMK). Esse aumento na concentração de cálcio intracelular resulta na ativação de serina/treonina proteína fosfatase calcineurina e em diferentes fatores de transcrição, incluindo a proteína de ligação ao elemento de resposta ao cAMP (CREB), fator nuclear de células T ativadas (NFAT), fator

intensificador de miócitos 2 C (MEF2C) e -D (MEF2D), levando ao aumento da expressão de PGC1 α . PGC1 α , mediante interação com fator transcricional receptor alfa relacionado ao estrogênio (ERR α), considerado um regulador metabólico central (LUO et al., 2003), leva ao aumento da expressão do gene FNDC5 e codifica a proteína de mesmo nome, FNDC5.

Adicionalmente, ocorre a redução dos níveis celulares de ATP, resultando no aumento da relação AMP/ATP e levando a ativação do sensor energético metabólico AMP dependente de Kinase (AMPK). AMPK fosforila PGC1 α a threonina-177 e Serina-538 (JÄGER et al., 2007). Essa cascata ocasiona aumento da expressão de FNDC5/Irisina (GAMAS; MATAFOME; SEICA, 2015; KANG; JI, 2012). Originalmente, essa proteína (FNDC5) possui uma sequência de sinal N-terminal que a direciona à membrana plasmática, formada por um domínio de Fibronectina tipo III (FNIII), um domínio transmembrana e uma cauda C-terminal, que corresponde à região localizada no citosol. Na membrana plasmática, essa proteína sofre uma clivagem proteolítica, seguida de uma glicosilação, levando à ativação biológica e liberação da Irisina na corrente sanguínea (VILLARROYA, 2012) e exercendo diversas funções, conforme mostrado na figura 6.

Figura 6 - IRISINA e algumas das funções no organismo



Fonte: VILLARROYA, 2012.

As miocinas medeiam os benefícios do exercício para a saúde e, por meio das contrações musculares, induzem a produção e liberação de miocinas pelos músculos, que são entregues pela circulação sanguínea a diferentes tecidos do corpo, melhorando a função geral dos tecidos e proporcionando benefícios à saúde.

3.1 IRISINA E CÂNCER

A Irisina ativa a via de sinalização da Proteína Quinase Ativada por Monofosfato de Adenosina (AMPK), um importante regulador do metabolismo energético, e age como inibidor da ativação da via de sinalização PI3K/Akt/mTOR, diminuindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias, fator nuclear kappa B (NF- κ B), TNF- α e IL-6 e fatores de transcrição (STAT3, Snail), de maneira dependente da concentração, indicando um potencial efeito anti-inflamatório (GANNON *et al.*, 2015b). Ademais, estudos mostram o efeito inibitório da Ir na proliferação celular.

Em um estudo *in vitro*, Gannon *et al.* demonstraram o efeito inibitório do Ir no tamanho da população e na capacidade migratória de linhagens celulares de câncer de mama. Além disso, demonstraram que a Ir induziu a apoptose de linhagens celulares malignas ao inibir a atividade do fator nuclear NF- κ B, o que pode indicar um potencial efeito anti-inflamatório da Ir contra citocinas pró-inflamatórias. O efeito inibitório da Ir na proliferação de células cancerosas também foi demonstrado em outros estudos.

Tekin *et al.* encontraram o efeito antiproliferativo da Ir em linhagens celulares de câncer de próstata em estudo *in vitro*. Além disso, Shao *et al.* demonstraram o efeito antiproliferativo da Ir em linhagens celulares de câncer de pulmão. Já Liu *et al.* relataram esse efeito em células cancerosas pancreáticas e Shi *et al.* mostraram que a Ir estimulou a proliferação celular em linhagens de câncer de fígado em estudo *in vitro*, ativando a via PI3K/Akt. Os resultados dos estudos acima são contrários aos obtidos por Gannon *et al.* Por sua vez, Moon e Mantzoros, em estudo *in vitro*, não mostraram efeito da Ir na proliferação em linhagens celulares de câncer de endométrio, cólon, tireoide ou esôfago. Muitos estudos apoiam o efeito antiproliferativo da Ir no modelo *in vitro*. Os achados conflitantes podem ser devidos à especificidade tecidual e celular da Ir, conforme relatado por Shi *et al.* Na tabela 1, segue um sumário dos achados citados nas pesquisas apresentadas acima.

Tabela 1 – Resumo dos resultados do níveis de irisina em estudos in vitro

Pesquisadores	Câncer/Linhagem celular	Irisina	Resultado
(Moon & Mantzoros, 2014)	Endométrio (KLE, RL95-2) Cólon (HT29, MCA38) Tireoide (SW579, BHP7) Esôfago (OE13, OE33) KLE, RL95-2, HT29, SW579 BHP7, OE13, OE33- American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) MCA38, National Cancer Institute, National Institute of Health, Dr. Nicholas Restifo	Human recombinant Ir Aviscera Bioscience (Santa Clara, CA, USA) Phoenix Pharmaceuticals (Burlingame, CA, USA) Nível de Ir: 5–10 nmol/L (fisiológica) 50–100 nmol/L (farmacológica)	Sem impacto na proliferação, adesão ou número quando comparado ao grupo controle.
(Gannon et al., 2015)	Breast MCF-7, MDA-MB-231 e MCF-10a- controle (American Type Culture Collection; Manassas, VA, USA)	Human recombinant nonmodified Ir-INM Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) Human recombinant modified and active (glycosylated) Ir-IM PlexBio (San Francisco, CA, USA) Nível de Ir: 0,625–20 nM/L	Reduziu o número de células cancerosas (INM), migração (INM, IM) induziu a apoptose de células tumerais (INM) Inibiu a atividade NF- κB (INM) Melhorou o efeito do Dox em células cancerosas (INM em todas as concentrações; IM apenas 1.0 µgM)
(Shi et al., 2017)	Carcinoma Hepatocelular HepG2, SMMC7721	Human recombinant modified and active (glycosylated) Ir-IM PlexBio (San Francisco, CA, USA) Human recombinant non-modified Ir-INM CaymanChemical (Ann Arbor, MI, USA) Ir: 0,625–20 nM/L	Aumento da viabilidade celular em todas as linhagens (IM, INM). Na concentração de 2,5 nM/L, estimulou a migração e invasão pela linhagem HepG2 em comparação ao controle. Inibiu a citotoxicidade do DOX em 2,5nM/L (IM)

Pesquisadores	Câncer/Linhagem celular	Irisina	Resultado
(Shao et al., 2017)	Câncer de Pulmão A549 (NSCLC) NCI-H446 (SCLC) Institute of Biochemistry and Cell Biology, Chinese Academy of Science, China	Ir: 0–50 nM/L	Na concentração de 20–50 nM/L Inibição significativa da proliferação celular de A549 Ir >20 nM/L inibiu a migração e invasão de A549
(Liu et al., 2018)	Câncer de Pâncreas MIA PaCa-2 Panc03.27 ATCC (Manassas, VA, USA)	Human recombinant glycosylated E-Ir Human nonrecombinant P-Ir Sangon Biotech, Shanghai, China Ir: 0–100nM/L	Ambas as formas de Ir inibiram o crescimento, migração e invasão das linhagens celulares.
(Tekin et al., 2015)	Câncer de próstata LNCaP DU-145 PC3	Ir (Phoenix peptide, Burlingame, CA, USA) Ir: 0.1–100 nM/L	Efeito Antiproliferativo Diminuição do tempo de vida de LNCaP Cel em altas concentrações de Ir (10–100 nM/L; $p < 0.05$; $p < 0.01$)

Gannon *et al.* investigaram o efeito da Ir com um fármaco utilizado na terapia anticâncer, o doxorubicin (Dox) e o resultado mostrou o efeito inibitório da Ir na proliferação e migração em linhagens de câncer de mama MDA-MB-231 em um modelo in vitro. Esse fármaco pode causar inúmeros efeitos adversos, incluindo cardiotoxicidade. Nesse estudo, a Ir aumentou o efeito citotóxico do Dox, mas somente em linhagens malignas (MCF-7 e MDA-MB-231), sem afetar linhagens não malignas (MCF10a). O resultado foi que a Ir aumentou a eficácia do Dox, reduzindo o efeito tóxico em células saudáveis e diminuindo o risco de efeitos colaterais associados ao fármaco.

Shi *et al.* (2017), analisaram o efeito da Ir associada ao Dox em uma linhagem celular de câncer de fígado (HepG2) e concluíram que houve uma diminuição da citotoxicidade pelo Dox. Ainda em outro estudo com o antitumoral Paclitaxel, Fan *et al.* (2020) associaram o fármaco a Ir e observaram que, quando silenciado FNDC5, a sensibilidade das células cancerosas ao fármaco foi diminuída, enquanto pacientes

que receberam doses de Ir antes do tratamento mostraram maior sensibilidade ao fármaco. Foi constatada, portanto, maior atividade de proteínas pró-apoptótica, por meio do aumento da expressão de Bax e p53, além de baixos níveis de expressão de proteínas antiapoptótica Bcl-2 (FAN; ZHU; HUANG, 2020). Os pesquisadores concluem que o uso combinado de Ir e Ptx podem trazer efeitos benéficos ao tratamento de câncer de pulmão, bem como diminuir a resistência ao Ptx em fases avançadas de quimioterapia.

Neste contexto, nosso trabalho possui relevância por contribuir a partir de uma miocina sintetizada pelo próprio organismo e mediada pelo exercício físico, como uma possibilidade, não farmacológica, na prevenção e tratamento do câncer de mama melhorando a resposta ao tratamento tradicional, diminuindo os efeitos adversos e os custos relacionados ao tratamento do câncer de mama.

4 OBJETIVOS

4.1 GERAL

Avaliar o efeito das moléculas FNDC5 e Irisina em linhagens de câncer de mama.

4.2 ESPECÍFICOS

1- Avaliar a viabilidade celular metabólica das linhagens celulares de câncer de mama após o tratamento com as moléculas de FNDC5 e Irisina em diferentes concentrações;

2- Determinar IC50 das moléculas Irisina e FNDC5 sobre as linhagens MCF-7 e MDA-MB-231.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 LINHAGENS CELULARES

Foram utilizadas duas linhagens de câncer de mama humana: MDA-MB-231 e MCF-7. A linhagem MDA-MB-231 foi adquirida comercialmente do Banco de Células do Rio de Janeiro e foi estabelecida a partir de uma efusão pleural de uma paciente caucasiana de 51 anos, com um adenocarcinoma mamário metastático. Ademais, é uma linhagem celular de CAM triplo negativo, altamente agressiva e invasiva, e não expressa RE e RP, além de se caracterizar pela ausência de expressão e amplificação de HER-2 (CAILLEAU *et al.*, 1974). Semelhante a outras linhagens de células de câncer invasivas, a capacidade de invasão das células MDA-MB-231 é mediada pela degradação proteolítica da matriz extracelular.

Enquanto a linhagem MCF-7 foi cedida pelo Laboratório de Divisão de Pesquisa Clínica e Desenvolvimento Tecnológico do INCA, MCF-7 foi derivada de um derrame pleural de uma mulher de 69 anos que sofria de um adenocarcinoma de mama (SOULE *et al.*, 1973), recebendo o nome da Michigan Cancer Foundation (MCF). As células MCF-7 são de interesse porque mantêm uma série de características semelhantes ao epitélio mamário e possui uma morfologia semelhante ao epitelial. As monocamadas, por sua vez, formam estruturas de cúpula devido ao acúmulo de fluido entre a placa de cultura e a monocamada celular. É um dos poucos cânceres de mama que expressam o receptor de estrogênio alfa (ER- α) (HORWITZ *et al.*, 1975; LIPPMAN; BOLAN, 1975) (BROOKS; LOCKE; SOULE, 1973). Classificada como luminal A, expressa receptores hormonais (RE e RP) e não expressa para HER2. Além disso, foi demonstrado que o tratamento de MCF7 com estrogênios tem um efeito antiapoptótico (HUANG *et al.*, 1997; PERILLO *et al.*, 2000).

5.2 SUBSTÂNCIAS TESTADAS

Foram utilizadas as moléculas de Irisina recombinante expressas em células CHO, com FLAG® e com pureza superior a 95% (conforme SDS-PAGE), sendo glicosiladas, fornecidas pela Sigma Aldrich, assim como FNDC5 recombinante expresso em E. coli, com pureza superior a 95% (conforme SDS-PAGE), fornecido pela Sigma Aldrich. As moléculas foram avaliadas nas concentrações de 0,625 nmol/L,

1,25 nmol/L, 2,5 nmol/L, 5 nmol/L, 10 nmol/L, 20 nmol/L e 40 nmol/L, tendo sido reconstituídas em PBS e, posteriormente, feitas as diluições seriadas. As concentrações de FNDC5 e Irisina foram determinadas empiricamente com base em artigos publicados.

5.3 CULTIVO CELULAR

As linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 foram mantidas em meios de cultura RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY, USA) e DMEM High Glucose (4500,0 mg/L, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), respectivamente. A suplementação de ambos os meios de cultura se deu por adição de 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) (CRIPION, Andradina, SP, Brasil), 1% (v/v) de solução Penicilina-Estreptomicina (10000 u/mL - 10 mg/mL) e 0,5% (v/v) de Anfotericina B (250 µg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). As células foram cultivadas em garrafas de 75 cm² e mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. A troca do meio de cultura foi realizada duas a três vezes por semana conforme o desenvolvimento celular, sendo a análise morfológica das células realizada em microscópio óptico de luz invertida (Axio Observer Z1, Carl Zeiss, Jena, TH, Alemanha).

Ao atingir confluência ótima, o conteúdo das garrafas foi desprezado e as células foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS) para retirada de resíduos de células mortas, seguido do processo de dissociação enzimática com solução de tripsina (0,25% tripsina/0,53mM EDTA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), para o desprendimento das células da garrafa. Em seguida, foi realizada a inativação da tripsina por adição de meio de cultura suplementado, e coletada uma alíquota (80 µl) da suspensão celular resultante para contagem do número total de células viáveis em câmara de Neubauer.

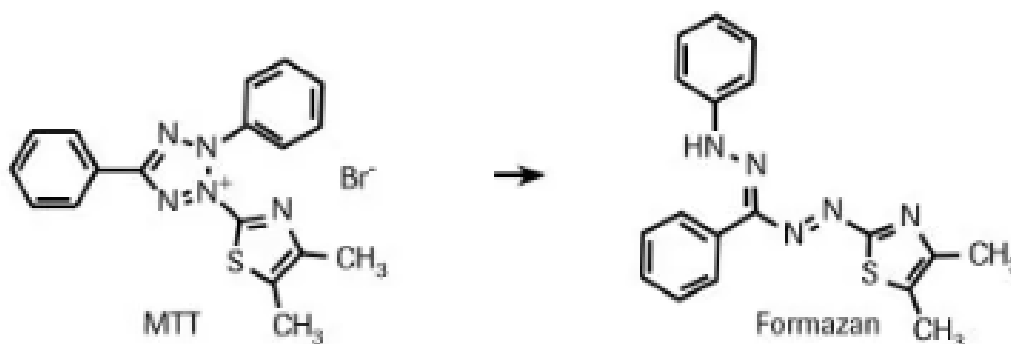
Ademais, empregou-se o corante azul de tripan 0,4% (v/v) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) para a distinção entre células viáveis e não viáveis. Para contagem, foi calculada a diluição 1 para 2, sendo 20 µl de azul de tripan + 20 µl de células, totalizando 40 µl de suspensão ou, em caso de muitas células, foi utilizado 1 para 4, sendo 60 µl de azul de tripan + 20 µl de células, totalizando 80 µl de suspensão. Foi, então, retirada uma alíquota de 10 µl da suspensão preparada para contagem na câmara de Neubauer. Após a contagem e realização dos cálculos da concentração celular necessária para os experimentos, o volume adequado da suspensão de

células foi transferido para um novo tubo do tipo falcon e um novo meio de cultura foi adicionado para alcançar a concentração de células/ml ideal calculada para os ensaios.

5.4 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR METABÓLICA (VCM) POR ENSAIO DE MTT

O ensaio colorimétrico quantitativo baseia-se na redução do sal de tetrazólio de coloração amarela solúvel em água MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] em cristais de formazan de coloração roxa, insolúveis em água (MOSMANN, 1983; MOLINARI *et al.*, 2005). O MTT é captado pelas células por endocitose e sua conversão é possibilitada pelo sistema succinato desidrogenase das mitocôndrias ativas e da coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), como representado na figura 10 (BURANAAMNUAY, 2021).

Figura 7 – Metabolismo de MTT em um sal de formazan por células viáveis, conforme mostrado em uma reação química.



Fonte: Buranaamnuay, 2021.

O MTT é reduzido pelas células viáveis e metabolicamente ativas a cristais de formazan, que é solubilizado em solventes orgânicos. Nesta pesquisa, foi utilizado o DMSO, sendo sua concentração determinada por densidade óptica em comprimento de onda de 540 nm, utilizando um espectrofotômetro ou leitor de placas. A intensidade da cor proveniente da solubilização dos cristais é proporcional ao número de células viáveis (KUMAR; NAGARAJAN; UCHIL, 2018; BURANAAMNUAY, 2021).

Após o período de incubação de 24 horas do plaqueamento, foi realizado o tratamento das células, que são levadas a estufa por um período de incubação de 48 horas. Após esse período, foi realizado o preparo do reagente MTT na concentração de 5mg/mL diluída em 1.400 µl de PBS 1x. Foram adicionados 11 µl da solução de MTT em todos os poços (tratados, não tratados e branco); em seguida, foi realizada a incubação por adicionais 3 horas e descartado, poço a poço, o sobrenadante, sendo adicionado 100 µl do reagente DMSO em todos os poços (tratados, não tratados e branco) para a solubilização dos cristais de formazan. Após 15 minutos, a placa foi levada para leitura das absorbâncias, sendo medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm e no equipamento EPOCH2 da Biotek, sendo posteriormente realizada a análise dos resultados obtidos.

5.5 DETERMINAÇÃO DAS IC50 DOS COMPOSTOS TESTADOS

Foi efetuado o cálculo estimado dos valores da concentração inibitória de 50% da proliferação celular (IC50) a partir da curva dose-resposta de cada molécula testada para cada linhagem, obtida por meio do ensaio de VCM descrito acima, com fins de comparação das potências entre as moléculas testados. Os cálculos foram efetuados com a utilização do software GraphPad Prism na versão 8.0.

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Em relação aos dados dos experimentos de VCM, para dados normais, foi utilizada ANOVA de uma via com post hoc de Dunnett, e os dados não normais foram analisados por Kruskal-Wallis com post hoc de Dunn (teste não paramétrico correspondente do ANOVA de uma via). Para todos os ensaios, consideraram-se os valores significativos quando $p < 0.05$, e as análises foram realizadas utilizando o software Graphpad Prism na versão 8.0.

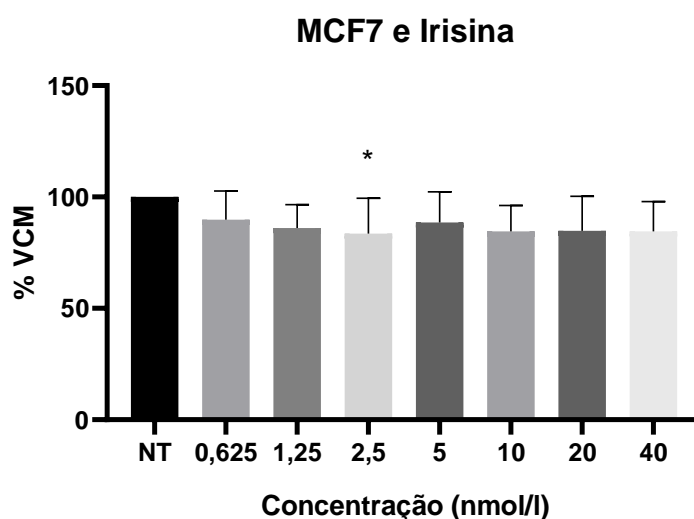
6 RESULTADOS

6.1 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR METABÓLICA (VCM) POR MTT

A viabilidade celular metabólica (VCM) foi analisada empregando o teste por MTT, no qual foi avaliada a citotoxicidade *in vitro* das moléculas FNDC5 e Irisina nas concentrações de 0,625 nmol/L, 1,25 nmol/L, 2,5 nmol/L, 5 nmol/L, 10 nmol/L, 20 nmol/L e 40 nmol/L nas linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231. Ademais, as células não tratadas foram consideradas como controle, e os experimentos, realizados em triplicatas.

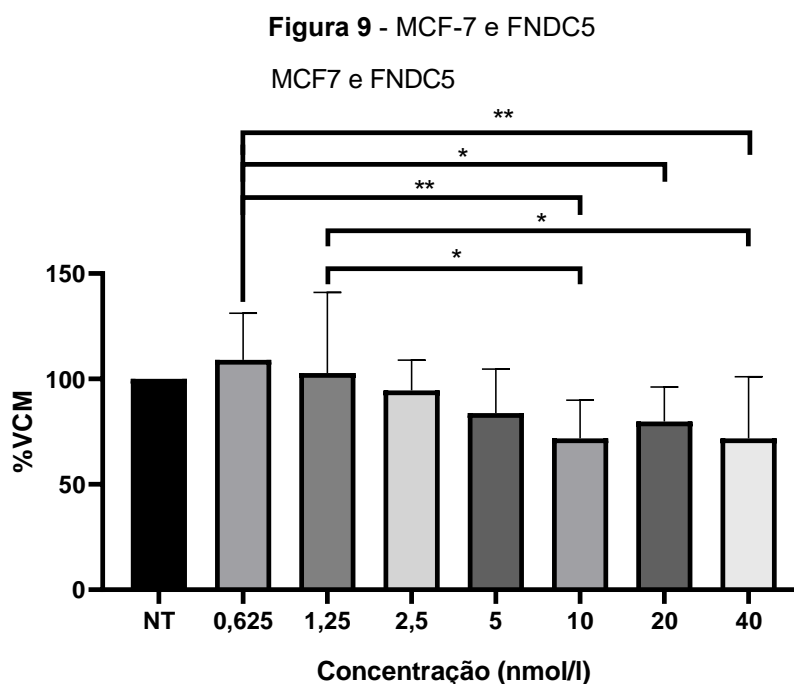
Nas figuras 8 e 9, são apresentados os resultados obtidos nos ensaios de VCM na linhagem celular MCF-7 com tempo de tratamento de 48 horas. As VCM das células tratadas com Irisina foram, da menor para a maior concentração do composto, respectivamente de 89,83%, 86,08%, 83,58%, 88,58%, 84,58%, 84,83%, e 84,5%. Diferença estatística foi observada quando comparamos a concentração 2,5 nmol/L de irisina em relação às Não Tratadas (NT), conforme mostrado.

Figura 8 - MCF-7 e Irisina

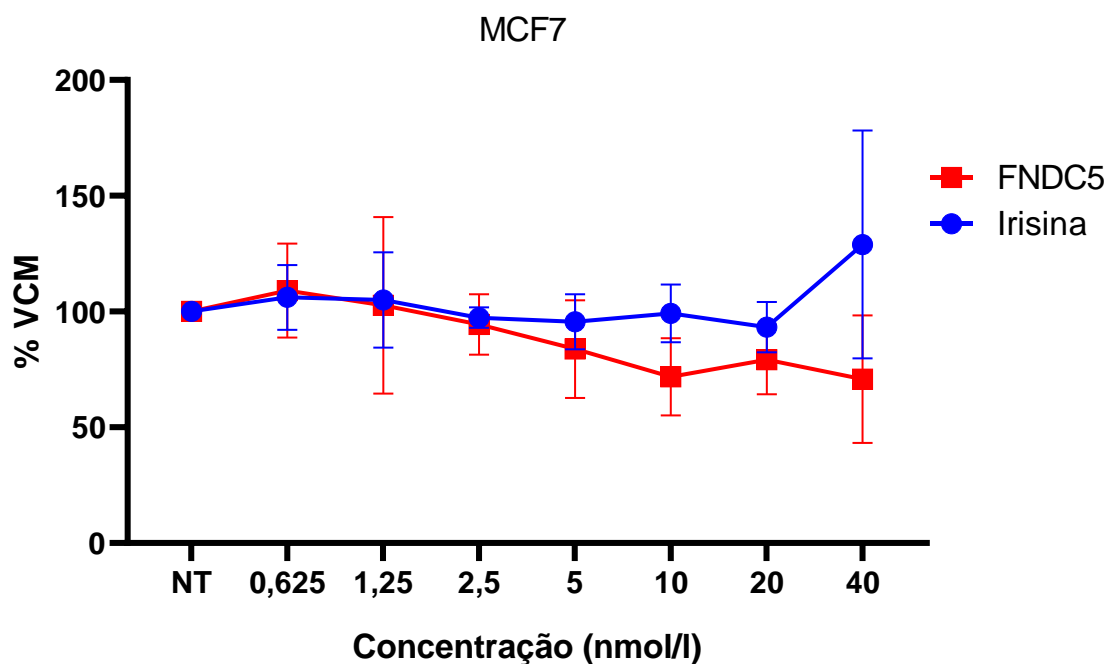


Representação gráfica dos resultados do ensaio de viabilidade celular metabólica a partir do ensaio por MTT da linhagem de MCF-7. Com tratamento das células por 48 horas com as moléculas Irisina nas concentrações de 0,625 nmol/L, 1,25 nmol/L, 2,5 nmol/L, 5 nmol/L, 10 nmol/L, 20 nmol/L e 40 nmol/L. Representam as médias e desvios padrão de 3 experimentos para cada molécula e linhagem celular. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via com post hoc de Dunnett ou por ensaio de Kruskal-Wallis com post hoc de Dunn. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$; quando comparadas ao grupo controle não tratado com VC de 100%. Fonte: Próprio autor.

A linhagem MCF-7 tratada com a molécula FNDC5 apresentaram diferenças estatísticas entre as concentrações (0,625 – 10 nmol/L), (0,625 – 20 nmol/L), (0,625 – 40 nmol/L), (1,25 – 10 nmol/L), (1,25 – 40 nmol/L), conforme demonstrado na figura 10. Já os resultados obtidos por concentração testada foram de 109%, 102,83%, 94,5%, 83,75%, 71,83%, 79,83%, 71,75%.



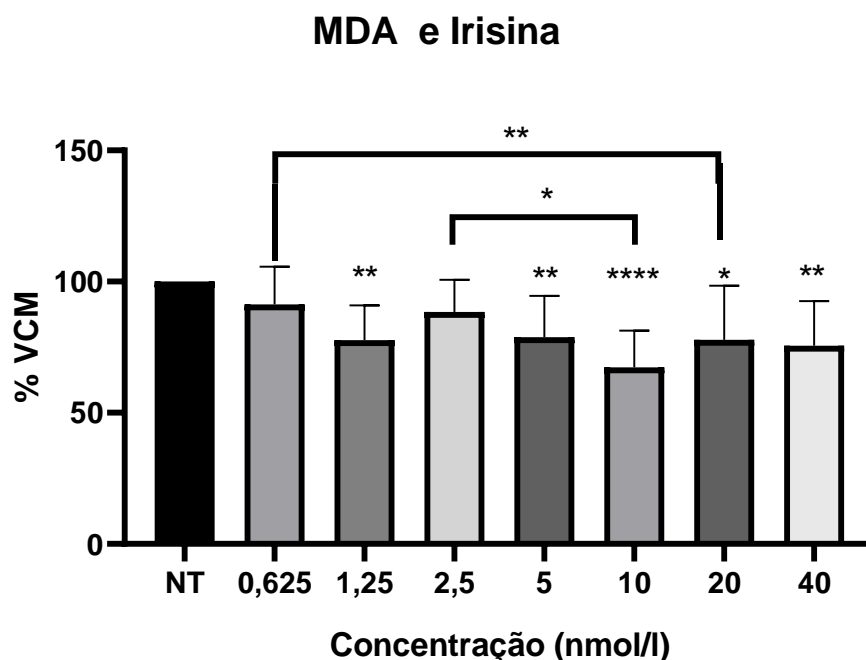
Representação gráfica dos resultados do ensaio de viabilidade celular metabólica a partir do ensaio por MTT da linhagem de MCF-7. Com tratamento das células por 48 horas com as moléculas FNDC5 nas concentrações de 0,625 nmol/L, 1,25 nmol/L, 2,5 nmol/L, 5 nmol/L, 10 nmol/L, 20 nmol/L e 40 nmol/L. Representam as médias e desvios padrão de 3 experimentos para cada molécula e linhagem celular. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via com post hoc de Dunnett ou por ensaio de Kruskal-Wallis com post hoc de Dunn. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$; quando comparadas ao grupo controle não tratado com VC de 100%. Enquanto na figura 10 é apresentado a comparação entre os tratamentos com IRISINA e FNDC5 na linhagem MCF-7. Fonte: Próprio autor.

Figura 10 – Comparação entre Irisina e FNDC5 no tratamento da linhagem MCF-7

Na linhagem MDA-MB-231, cujos resultados serão apresentados a seguir, na figura 11 é apresentado o tratamento com Irisina. Houve diferença estatisticamente significativa, em relação ao controle não tratado (NT), nas concentrações 1,25 nmol/L, 5 nmol/L, 10 nmol/L, 20 nmol/L e 40 nmol/L e ainda diferença estatística entre a concentração 0,625 nmol/L - 20 nmol/L e 2,5 nmol/L - 10 nmol/L. As VCM das células tratadas com Irisina, foram, da menor para a maior concentração do composto, respectivamente de 91,33%, 77,66%, 88,41%, 78,75%, 67,25%, 77,83%, e 75,5%.

Fonte: Próprio autor.

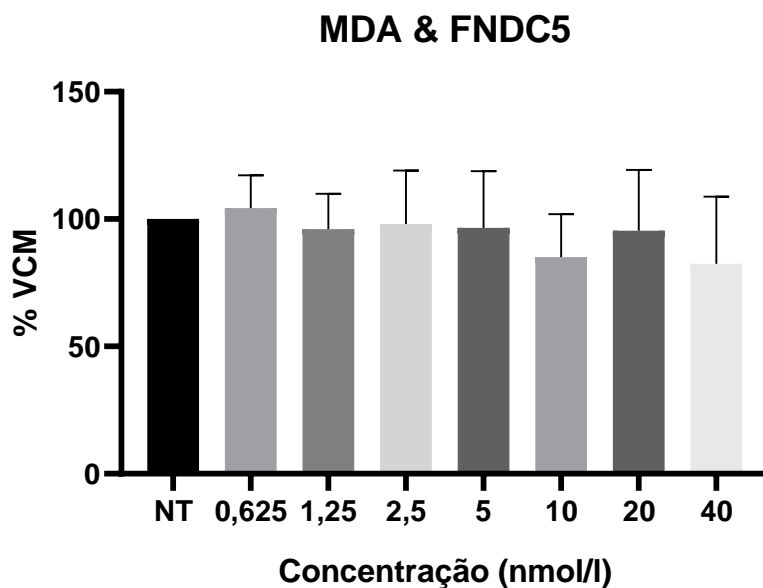
Figura 11 – Linhagem MDA-MB-231 tratada com Irisina



Representação gráfica dos resultados do ensaio de viabilidade celular metabólica a partir do ensaio por MTT da linhagem de MDA-MB-231. Com tratamento das células por 48 horas com as moléculas Irisina nas concentrações de 0,625 nmol/L, 1,25 nmol/L, 2,5 nmol/L, 5 nmol/L, 10 nmol/L, 20 nmol/L e 40 nmol/L. Representam as médias e desvios padrão de 3 experimentos para cada molécula e linhagem celular. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via com post hoc de Dunnett ou por ensaio de Kruskal-Wallis com post hoc de Dunn. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$; quando comparadas ao grupo controle não tratado com VC de 100%.
Fonte: Próprio autor.

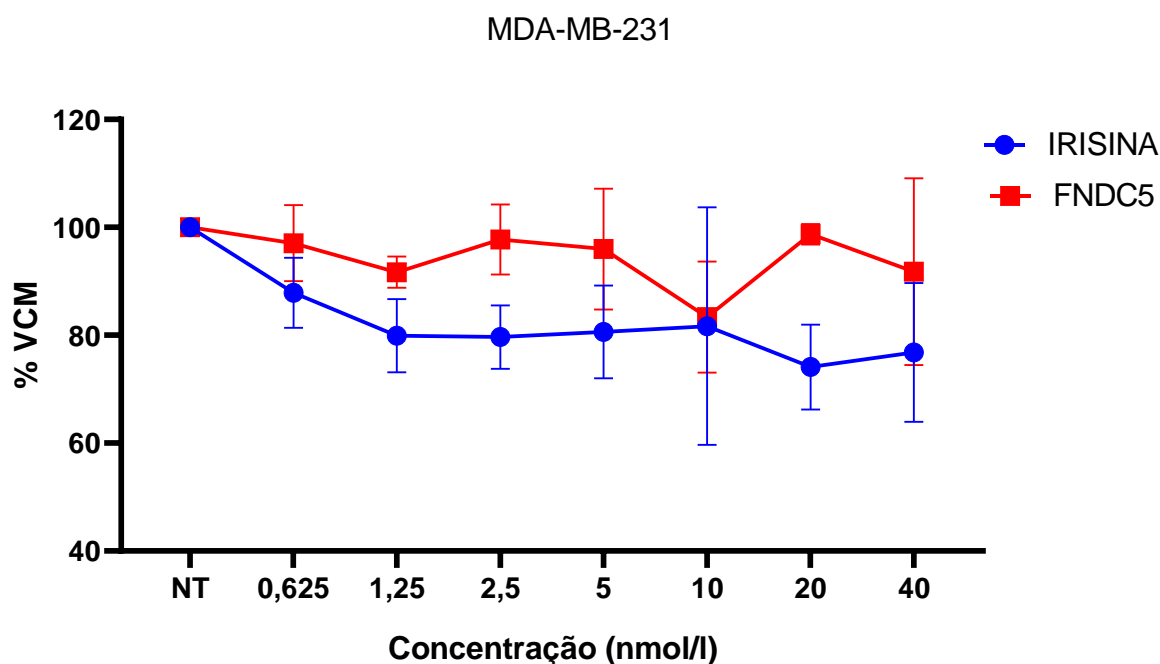
Já na figura 12, é apresentado o tratamento com FNDC5, que não provocou diferença estatística entre as concentrações utilizadas na linhagem celular MDA-MB-231. Nos experimentos de MTT feitos tratando-se a linhagem com a molécula FNDC5, os percentuais de VCM encontrados, apresentados da menor para maior concentração foram de: 104,25%, 96,08%, 98%, 96,58%, 85%, 95,41%, e 82,41%, respectivamente. Os valores acima de 100% sugerem que houve uma aumento da viabilidade celular quando comparados ao NT, necessário mais estudos para verificação de tais resultados.

Figura 12 – Linhagem MDA-MB-231 tratada com FNDC5



Representação gráfica dos resultados do ensaio de viabilidade celular metabólica a partir do ensaio por MTT da linhagem de MDA-MB-231. Com tratamento das células por 48 horas com as moléculas FNDC5 nas concentrações de 0,625 nmol/L, 1,25 nmol/L, 2,5 nmol/L, 5 nmol/L, 10 nmol/L, 20 nmol/L e 40 nmol/L. Representam as médias e desvios padrão de 3 experimentos para cada molécula e linhagem celular. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via com post hoc de Dunnett ou por ensaio de Kruskal-Wallis com post hoc de Dunn. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$; quando comparadas ao grupo controle não tratado com VC de 100%.
Fonte: Próprio autor.

Figura 13 - Comparação na linhagem MDA-MB-231 com os tratamentos com Irisina e FNDC5



Fonte: Próprio autor.

As curvas dose-resposta obtidas foram empregadas para realização dos cálculos da concentração inibitória estimada de 50% (IC50), para ambas as linhagens, e foram calculadas após os experimentos com MTT. Além disso, estão apresentadas na tabela 2, na qual é possível observar que as moléculas necessitam de valores mais altos para alcançarem a inibição de 50% da viabilidade celular.

Tabela 2 – Concentração inibitória estimada de 50% (IC50) das moléculas, FNDC5 e IRISINA, em linhagens MCF-7 e MDA-MB-231

Linhagem	Molécula	IC50 estimada (nmol/L)
MCF-7	Irisina	3,18 ⁵⁰
MCF-7	FNDC5	67,85
MDA-MB-231	Irisina	70,11
MDA-MB-231	FNDC5	333,90

Fonte: Próprio autor.

7 DISCUSSÃO

Por meio dos dados apresentados, é possível observar que as moléculas testadas provocaram diminuição na viabilidade celular metabólica na linhagem MDA-MB-231 tratada com Irisina nas concentrações 1,25 nmol/L ($p < 0,01$), 5 nmol/L ($p < 0,01$), 10 nmol/L ($p < 0,0001$), 20 nmol/L ($p < 0,05$) e 40 nmol/L ($p < 0,01$) com valores de VCM atingindo 77,66%, 78,75%, 67,25%, 77,83% e 75,5% respectivamente. Já na linhagem MCF7, tratada com Irisina na concentração de 2,5 nmol/L ($p < 0,05$), foi observada uma VCM de 83,58%.

Ressalta-se que não se trata de quimioterápico e, sim, de moléculas sintetizadas a partir do estímulo físico pelo próprio organismo e com a possibilidade de ser obtida de forma exógena, podendo influenciar na dosagem de quimioterápicos, diminuindo os riscos associado a efeitos adversos, como foi apresentado por Gannon *et al.* (2015), melhorando o efeito do Dox na linhagem MDA-MB-231. Ainda não pode ser inferido, mas pode-se vislumbrar um possível papel benéfico das moléculas Irisina e FNDC5 contra o câncer de mama, visto que estudos vêm demonstrando a importância dessas moléculas no tratamento de inúmeras doenças crônicas e metabólicas, tais como obesidade, diabetes tipo 2, Alzheimer e, mais recentemente, o câncer de mama.

Provatopoulou *et al.* (2015) realizaram um estudo com 51 mulheres saudáveis e 101 pacientes com câncer de mama ductal invasivo e foram encontrados níveis significativamente reduzidos de Ir sérica nas pacientes oncológicas. De acordo com os dados da pesquisa, níveis baixos de Ir estão intimamente relacionados com a ocorrência e um preditor independente para CAM. Ainda, estimou-se que o aumento de uma unidade nos níveis de Ir ocasiona uma diminuição de ~90% do risco de desenvolvimento de CAM. Os níveis de Ir puderam, neste estudo, mostrar efetividade em pacientes com CAM, com ponto de corte de 3,21 µg/mL, com uma sensibilidade de 62,7% e especificidade 91,1%. Foi demonstrado, ainda, que os níveis séricos de Ir apresentaram uma correlação positiva com o estadiamento do tumor, ou seja, quanto mais baixo o nível de Ir, mais avançado é o estadiamento (PROVATOPOULOU *et al.*, 2015).

Em outro estudo conduzido por Zhang *et al.* (2018), foram analisados 148 pacientes com CAM, no qual 53 apresentavam metástase espinhal, representando 35,8% da amostra. O resultado obtido mostrou que pacientes com síndrome

metabólica e sem metástase possuíam os níveis séricos de Ir mais elevados em comparação ao grupo controle. Por meio de uma análise multivariada e após ajustes de idade e IMC, constatou-se que níveis elevados de Ir representam um efeito protetor contra metástase da espinha em pacientes com CAM. Kuloglu *et al.* (2016) pesquisaram, mediante imuno-histoquímica, o tecido mamário e descobriram que os níveis de Ir foram significativamente mais elevados em carcinoma lobular invasivo, papiloma intraductal, carcinoma ductal invasivo, carcinoma papilar invasivo e tecido de carcinoma mucinoso quando comparado com tecido mamário saudável. Por sua vez, Gannon *et al.* (2015) utilizaram diferentes concentrações (0,625 – 20 nmol/L) de Irisina não modifica (INM) para tratar linhagens de células de CAM (MDA-MB-231, MCF-7 e MCF-10a), resultando na diminuição no número de células, migração e viabilidade celular na linhagem MDA-MB-231.

Ainda segundo os autores, a viabilidade celular foi significativamente reduzida nas concentrações a partir de 2,5 nmol/L, resultado este que corrobora os achados no nosso estudo na linhagem MDA-MB-231. Já as linhagens MCF-7 e MCF-10a não apresentaram redução em nenhuma das concentrações testadas. A MCF-10a sofreu uma diminuição na concentração mais elevada com IM. Ademais, a INM proporcionou melhora do efeito citotóxico do Dox na linhagem MDA-MB-231. Adicionalmente, a Ir potencializou a atividade da Caspase-3 e Caspase-7, responsáveis por induzir a apoptose e inibir a atividade de NF- κ B, indicando uma ação anti-inflamatória. Dessa forma, nossos resultados estão de acordo com esses estudos, que mostraram que a irisina e FNDC5 podem ser moléculas com potencial de atuarem na prevenção, no auxílio ao diagnóstico e no tratamento coadjuvante do CAM.

Finalmente, os resultados já realizados por outros grupos, assim como os nossos dados, mostram que a Ir pode ter um papel importante no diagnóstico, tratamento e prognóstico de tumores, pois os efeitos protetivos têm sido demonstrados em muitos estudos *in vitro*. No entanto, ainda existem muitas contradições quanto à influência da Ir na tumorigênese e na progressão tumoral em vários modelos de ensaio celular com câncer de mama, possivelmente devido às diferenças nos métodos de detecção, reagentes, anticorpos, tecidos ou linhagens celulares. Por isso, Zhang *et al.* (2013) sugerem o desenvolvimento de experimentos follow-up, ou seja, realizar um acompanhamento do início ao fim de um processo, avaliando a manutenção dos resultados ao longo do tempo (PERRY, 2004). Vale ressaltar que a Ir possui a sua descoberta relativamente recente, e muitos aspectos

de sua síntese, liberação e ação em tecidos, assim como suas vias de sinalização, não são totalmente conhecidas ou compreendidas.

No entanto, o aumento da expressão de Ir em diferentes tumores sugerem ser uma área potencial para mais estudos e pesquisas para prevenção e tratamento de tumores, sendo necessários mais estudos acerca dos efeitos antitumorais dessa miocina. Os pesquisadores acreditam que a irisina possa ter um potencial terapêutico ou ser um biomarcador na tumorigênese, representando, dessa forma, uma abordagem na prevenção e no tratamento de tumores, reduzindo os custos com tratamento.

Ademais, o efeito citotóxico na linhagem MDA-MB-231 (triplo negativo), uma linhagem extremamente agressiva, invasiva, pouco diferenciado e com limitadas opções de tratamento, devido as suas características de não expressar receptores hormonais (RE e RP) e a proteína HER2 (*human epidermal growth factor receptor 2*) (LIU et al., 2003; CHAVEZ et al., 2010). Evidencia uma possibilidade terapêutica de grande importância para o tratamento de mulheres com este tipo de tumor mamário.

Por conta dos altos custos, muitas pessoas em tratamento oncológico e os sobreviventes passam por dificuldades financeiras, incluindo problemas para pagar contas médicas, esgotamento das economias ou falta de cuidados médicos necessários e potencial falência (HAN et al., 2020). Assim, uma proteína endógena, sintetizada, principalmente, a partir da contração muscular mediada pelo exercício físico e com possibilidade de ser suplementada, talvez possa contribuir para uma melhor resposta ao tratamento e assim proporcionar uma melhor qualidade de vida, um melhor custo-benefício e uma melhor sobrevida sem recidiva em relação ao tratamento oncológico tradicional.

8 CONCLUSÕES

Considerando a necessidade de aprimorar os estudos para a compreensão do câncer, em específico o câncer de mama, o presente trabalho se propôs a avaliar a citotoxicidade das miocinas FNDC5 e Irisina sobre linhagens de câncer de mama MDA-MB-231 e MCF-7. Os resultados permitiram concluir que:

- As moléculas testadas exerceram citotoxicidade na linhagem MDA-MB-231 tratada com Irisina nas concentrações 1,25 nmol/L ($p < 0,01$), 5 nmol/L ($p < 0,01$), 10 nmol/L ($p < 0,0001$), 20 nmol/L ($p < 0,05$) e 40 nmol/L ($p < 0,01$), com valores de VCM atingindo 77,66%, 78,75%, 67,25%, 77,83% e 75,5% respectivamente.
- Na linhagem MCF-7 tratada com Irisina na concentração de 2,5 nmol/L ($p < 0,05$), concentração na qual a VCM observada foi de 83,58%.
- Nenhuma das linhagens, MCF-7 e MDA-MB-231, tratadas com a molécula FNDC5, apresentaram diferença estatística entre as concentrações em relação ao controle não tratado.

9 PERSPECTIVAS

- Realização de novos ensaios de citotoxicidade com quimioterápicos utilizados no tratamento tradicional do câncer de mama, tal como Paclitaxel e Doxorubicina, combinado às moléculas FNDC5 e Irisina nas MCF-7 e MDA-MB-231;
- Realização de ensaios de citotoxicidade com as moléculas FNDC5 e Irisina nas MCF-7 e MDA-MB-231, utilizando o modelo de cultivo 3D padronizado;
- Realização ensaios em modelo animal para avaliação da resposta ao nível de Irisina e FNDC5 em de câncer de mama.

REFERÊNCIAS

- AKIMOTO, T. *et al.* Exercise stimulates Pgc-1 α transcription in skeletal muscle through activation of the p38 MAPK pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 20, p. 19587-19593, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15767263/>. Acesso em: 12 ago. 2023.
- ALBRECHT, E. *et al.* Irisin: Still chasing shadows. **Molecular Metabolism**, v. 34, n. January, p. 124-135, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32180552/>. Acesso em: 8 jul. 2023.
- BOSTRÖM, P. *et al.* A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. **Nature**, v. 481, n. 7382, p. 463-468, 26 jan. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22237023/>. Acesso em: 19 ago. 2023.
- BURANAAMNUAY, K. The MTT assay application to measure the viability of spermatozoa: A variety of the assay protocols. **Open Veterinary Journal**, v. 11, n. 2, p. 251-269, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8288735/>. Acesso em: 11 jun. 2023.
- CAILLEAU, R. *et al.* Breast tumor cell lines from pleural effusions. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 53, n. 3, p. 661-674, 1974. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4412247/>. Acesso em: 18 jan. 2023.
- DI RAIMONDO, D. *et al.* New insights about the putative role of myokines in the context of cardiac rehabilitation and secondary cardiovascular prevention. **Annals of Translational Medicine**, v. 5, n. 15, p. 1-14, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5555997/>. Acesso em: 12 jan. 2023.
- FAN, G. H.; ZHU, T. Y.; HUANG, J. FNDC5 promotes paclitaxel sensitivity of non-small cell lung cancers via inhibiting MDR1. **Cellular Signalling**, v. 72, n. 238, p. 109665, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32353410/>. Acesso em: 22 fev. 2023.
- FERLAY, J. *et al.* Cancer statistics for the year 2020: An overview. **International Journal of Cancer**, v. 149, n. 4, p. 778-789, 15 ago. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33818764/>. Acesso em: 12 ago. 2023.
- GAMAS, L.; MATAFOME, P.; SEICA, R. Irisin and myonectin regulation in the insulin resistant muscle: Implications to adipose tissue: Muscle crosstalk. **Journal of Diabetes Research**, v. 2015, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26075283/>. Acesso em: 12 dez. 2022.
- GANNON, N. P. *et al.* Effects of the exercise-inducible myokine irisin on malignant and non-malignant breast epithelial cell behavior in vitro. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 4, p. 197-202, 2015a. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25124080/>. Acesso em: 1 ago. 2023.

HAN, X. *et al.* Medical financial hardship intensity and financial sacrifice associated with cancer in the United States. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 29, n. 2, p. 308-317, 1 fev. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31941708/>. Acesso em: 1 set. 2023.

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*American **Association for Cancer Research Inc**, 1 jan. 2022.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. **The Hallmarks of Cancer Review evolve progressively from normalcy via a series of preCell.**

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. **Hallmarks of cancer:** The next Generation. *Cell*, 4 mar. 2011.

JÄGER, S. *et al.* AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 29, p. 12017-12022, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17609368/>. Acesso em: 16 ago. 2023.

KANG, C.; JI, L. L. Role of PGC-1 α signaling in skeletal muscle health and disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1271, n. 1, p. 110-117, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23050972/>. Acesso em: 22 jul. 2023.

KHAN, K. H. *et al.* Targeting the PI3K-AKT-mTOR signaling network in cancer. *Chinese Journal of Cancer*, v. 32, n. 5, p. 253-265, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3845556/>. Acesso em: 30 maio 2023.

KUMAR, P.; NAGARAJAN, A.; UCHIL, P. D. Analysis of cell viability by the MTT assay. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2018, n. 6, p. 469-471, 2018. Disponível em: <https://cshprotocols.cshlp.org/content/2018/6/pdb.prot095505>. Acesso em: 2 ago. 2022.

LIU, P. targeting the phosphoinositide 3-kinase. **Pi. Cancer**, v. 8, n. 8, p. 627-644, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19644473/>. Acesso em: 14 ago. 2022.

LIU, J. *et al.* Irisin inhibits pancreatic cancer cell growth via the AMPK-mTOR pathway. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2018. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-33229-w>. Acesso em: 19 mar. 2023.

LUO, J. *et al.* Reduced Fat Mass in Mice Lacking Orphan Nuclear Receptor Estrogen-Related Receptor α . **Molecular and Cellular Biology**, v. 23, n. 22, p. 7947-7956, 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC262360/>. Acesso em: 23 set. 2022.

MOON, H. S.; MANTZOROS, C. S. Regulation of cell proliferation and malignant potential by irisin in endometrial, colon, thyroid and esophageal cancer cell lines. *Metabolism: Clinical and Experimental*, v. 63, n. 2, p. 188-193, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24268368/>. Acesso em: 19 out. 2022.

MOORE, K. L.; DALLEY, A.; AGUR, A. M. R. **Anatomia orientada para a clínica**. 4. ed. Rio de Janeiro: GEN GRUPO EDITORIAL NACIONAL PARTICIPACOES S/A, 2013.

PAGE C. *et al.* Overexpression of Akt/AKT can modulate chemotherapy-induced apoptosis. **Anticancer Res.**, n. PMID: 10769688., p. 20, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10769688/>. Acesso em: 8 fev. 2023.

PAVLOVA, N. N.; THOMPSON, C. B. The emerging hallmarks of câncer Metabolism. **Cell Metab**, v. 23, n. 1, p. 27-47, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26771115/>. Acesso em: 11 jan. 2023.

RASCHKE, S. *et al.* Evidence against a beneficial effect of irisin in humans. **PloS one**, v. 8, n. 9, p. 1-12, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3770677/>. Acesso em: 13 set. 2022.

ROBERTS, M. D. *et al.* Elevated skeletal muscle irisin precursor FNDC5 mRNA in obese OLETF rats. **Bone**, v. 23, n. 1, p. 1-7, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23498898/>. Acesso em: 14 mar. 2023.

SHAO, L. *et al.* Irisin suppresses the migration, proliferation, and invasion of lung cancer cells via inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 485, n. 3, p. 598-605, 8 abr. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27986567/>. Acesso em: 10 jun. 2023.

SHI, G. *et al.* Irisin stimulates cell proliferation and invasion by targeting the PI3K/AKT pathway in human hepatocellular carcinoma. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 493, n. 1, p. 585-591, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28867187/>. Acesso em: 8 mar. 2023.

SLEDGE, G. W. *et al.* Past, Present, and Future Challenges in Breast Cancer Treatment. [s.l.: s.n.]. Disponível em: www.jco.org. Acesso em: 11 maio 2023.

SOULE, H. D. *et al.* A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma^{1,2}. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 51, n. 5, p. 1409-1416, 1973. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4357757/>. Acesso em: 19 abr. 2023.

SUNG, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209-249, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33538338/>. Acesso em: 1 ago. 2022.

SWICK, A. G.; ORENA, S.; O'CONNOR, A. Irisin levels correlate with energy expenditure in a subgroup of humans with energy expenditure greater than predicted by fat free mass. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 62, n. 8, p. 1070-1073, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23578923/>. Acesso em: 7 jun. 2023.

TEKIN, S. *et al.* Is Irisin an Anticarcinogenic Peptide? **Medicine Science | International Medical Journal**, v. 4, n. 2, p. 2172, 2015. Disponível em: <https://dergipark.org.tr/tr/pub/medsci/issue/10432/127706>. Acesso em: 11 jul. 2023.

VILLARROYA, F. Irisin, turning up the heat. **Cell Metabolism**, v. 15, n. 3, p. 277-278, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22405065/>. Acesso em: 11 maio 2023.

WANG, Q.; CHEN, X.; HAY, N. Akt as a target for cancer therapy: More is not always better (lessons from studies in mice). **British Journal of Cancer**, v. 117, n. 2, p. 159-163, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28557977/>. Acesso em: 10 jan. 2023.

YABROFF, K. R. *et al.* Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, Part 2: Patient Economic Burden Associated With Cancer Care. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 113, n. 12, p. 1670-1682, 1 dez. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34698839/>. Acesso em: 31 mar. 2023.