

ESCOLA DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FARMACOLOGIA BIOQUÍMICA E MOLECULAR

THAÍS CRISTINA MURADÁS

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DOS EFEITOS DE ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA  
NO CÂNCER DE MAMA**

Porto Alegre  
2022

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica  
do Rio Grande do Sul

THAÍS CRISTINA MURADÁS

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DOS EFEITOS DE ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA NO CÂNCER DE MAMA**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, área de concentração em Farmacologia Bioquímica e Molecular, Escola de Medicina, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Martha Campos

Porto Alegre

2022

## Ficha Catalográfica

M972a Muradás, Thaís Cristina

Avaliação in vitro e in vivo dos efeitos de ácidos graxos de cadeia curta no câncer de mama / Thaís Cristina Muradás. – 2022.  
103.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Martha Campos.

1. Câncer de mama. 2. ácidos graxos de cadeia curta. 3. cultivo celular. 4. modelo de câncer de mama metastático 4T1. 5. camundongos. I. Campos, Maria Martha. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecária responsável: Clarissa Jesinska Selbach CRB-10/2051

THAÍS CRISTINA MURADÁS

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DOS EFEITOS DE ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA NO CÂNCER DE MAMA**

Tese apresentada como requisito para obtenção do grau de Doutora pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, área de concentração em Farmacologia Bioquímica e Molecular, Escola de Medicina, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

BANCA EXAMINADORA

---

Dra. Natália Fontana Nicoletti – UCS

---

Dr. Daniel Rodrigo Marinowic – PUCRS

---

Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira – PUCRS

---

Dra. Denise Cantarelli Machado (Suplente) – PUCRS

*Dedico esta tese aos meus pais por sempre acreditarem na transformação que o ensino gera e valorizarem isso tanto quanto eu. Sim, eu sempre vou ouvir vocês.*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Mara e Nilo pilares na minha formação moral e ética. Agradeço por sempre acreditarem em mim, por toda a motivação e apoio incondicional durante todas as etapas da minha vida.

Ao meu irmão, Rômulo fonte de carinho e alegria, independente do momento. Te agradeço por me permitir enxergar que a vida sempre pode ser mais leve - como tu és.

Ao meu irmão de coração, Rafael por tanta profundidade, humanidade e ensinamentos. Agradeço todos os dias o privilégio da nossa convivência. A tua passagem foi precoce para quem ficou, mas o teu legado é permanente.

À Noa, por me acompanhar durante todo esse processo ao se despedir quando eu saía, mas, principalmente, ao me receber mesmo que muito tarde com ronrons e muitos carinhos, além de me proteger de ameaças voadoras com suas lindas patinhas felinas.

Aos amigos, David e Thais por sempre estarem atentos, pelo carinho e apoio. Vocês são serenidade e motivação imensuráveis. *“Idem velle, et idem nolle”*

À Marisa pelos cuidados durante todos esses anos. Agradeço por constantemente me ensinar a superar quaisquer obstáculos e hoje poder estar contando esta tese, inclusive.

Ao meu fisioterapeuta Guilherme por ter sido o anjo que me fez recuperar os movimentos do braço. Assim foi possível eu dar continuidade na vida e finalizar o doutorado. Sou eternamente grata.

À professora Maria Martha Campos pelo aprendizado durante esses anos e, por acreditar e investir no meu projeto. Agradeço por contribuir na minha formação científica e me ensinar a valorizar cada descoberta, cada resultado.

Ao professor Fábio Dal Moro Maito pelos ensinamentos sobre a patologia de tumores. Essa experiência foi enriquecedora dentro dessa área que eu admiro tanto.

Ao técnico Willian pelo auxílio com os cortes histológicos e confecção de todas as lâminas histológicas.

Às alunas de iniciação científica Lúcia e Júlia pela disponibilidade nos experimentos *in vivo*. Mesmo que breve, sou muito grata pela nossa convivência e por ter compartilhado conhecimentos com vocês.

Aos profissionais do INTOX, Gabriel, Jiane, Juliano e Rafaela, agradeço o convívio, auxílio e todo suporte técnico. Vocês são uma equipe maravilhosa.

Aos colegas do INTOX por todas as trocas de experiências, interação de conhecimentos e momentos de descontração. Foi gratificante conviver com um grupo tão multidisciplinar e harmônico.

À Raquel Dal Sasso Freitas pela inspiração com o tema desse trabalho e, principalmente, pelo encorajamento para trabalhar com os animais, assim como o manejo deles do início ao fim. Te acompanhar foi fundamental para o meu crescimento como pesquisadora.

Ao CNPq e à CAPES pelo suporte financeiro.

*“Se a potência de conhecer a verdade constitui a semente da inteligência, esta semente só floresce por iniciativa da vontade, e também pela vontade ela enfraquece e morre.*

*Vontade significa o exercício da liberdade”*

Olavo de Carvalho



## RESUMO

O câncer de mama apresenta a maior incidência mundial entre todos os tipos de tumores. Os tratamentos são direcionados conforme o subtipo molecular: luminais A e B, HER2+ e triplo negativo. Apesar das taxas de sucesso para os tipos hormonais e HER2+, os pacientes que apresentam recidivas para os tumores mais agressivos ou triplos negativos permanecem com baixa sobrevida geral e o prognóstico é desfavorável devido, por exemplo, à ausência de um alvo terapêutico ou elevada agressividade. Ademais, alterações na composição da microbiota e, conseqüentemente, dos ácidos graxos de cadeia curta (SCFA) – através das condições clínicas basais ou por efeitos colaterais dos tratamentos – pode afetar o risco e o prognóstico para o câncer de mama. Neste sentido, este estudo avaliou os efeitos dos SCFA em diferentes modelos de câncer de mama com o propósito de identificar uma nova abordagem para o tratamento desses tumores.

Os ensaios *in vitro* utilizando as linhagens celulares de câncer de mama de diferentes subtipos moleculares, humanas, MCF-7, SK-BR-3 e MDA-MB-231; ou murina, 4T1 exibiram efeitos contrastantes após os tratamentos com os SCFA. Na análise da viabilidade celular, o acetato apresentou efeitos positivos em concentrações acima de 100 mM. Enquanto o propionato apresentou efeito dual dependente da concentração. De maneira tempo e concentração-dependente, o butirato, propionato e valerato reduziram significativamente a viabilidade celular das linhagens humanas e, o valerato reduziu a viabilidade celular da linhagem murina sob o IC<sub>50</sub> de 9,6 mM em 48 h. Por outro lado, os agonistas seletivos de FFA2 e FFA3, 4-CMTB e AR420626, respectivamente, reduziram modestamente a viabilidade celular apenas das linhagens mais agressivas MDA-MB-231 e 4T1. Da mesma forma que na avaliação dos antagonistas de FFA2 e FFA3, CATPB e β-hidroxibutirato, respectivamente, somente o CATPB produziu efeitos inibitórios na linhagem 4T1. Esses dados sugerem que os SCFA apresentam efeitos antitumorais no câncer de mama provavelmente por mecanismos independentes à ligação aos receptores FFA2 e FFA3.

A partir desse *screening*, os SCFA com melhores efeitos inibitórios, butirato, propionato e valerato, foram selecionados para investigar seus efeitos na capacidade de malignidade nas células MDA-MB-231 e 4T1. Alterações significativas na morfologia celular foram observadas, assim como na redução da formação de novas colônias. Na avaliação da adesão celular, o valerato reduziu este parâmetro na linhagem MDA-MB-231, no entanto, aumentou em relação à linhagem 4T1. Em relação à avaliação da

migração celular, somente o tratamento com butirato (10 mM) preveniu a migração da linhagem 4T1 em 24 h. Apesar de discretos, estes resultados corroboram os efeitos antitumorais observados na redução da formação de colônias e alterações da morfologia celular após a exposição com o butirato na linhagem 4T1, principalmente.

Para investigar os efeitos desses SCFA na progressão tumoral foi utilizado o modelo ortotópico de câncer de mama metastático em camundongos fêmea Balb/CJ induzido pela inoculação das células 4T1. Os resultados preliminares da administração por via oral dos SCFA tanto no protocolo terapêutico quanto no preventivo não demonstraram um efeito espelhado de acordo com a avaliação *in vitro*, exceto pelo número de metástases pulmonares que foram significativamente reduzidas pelo butirato (600 mg/kg) no esquema terapêutico.

Essas evidências sugerem que a participação do microambiente tumoral está envolvida na ação dos SCFA, assim como seus efeitos celulares podem ser modulados por mecanismos alternativos aos receptores FFA2 e FFA3, como pela inibição de HDAC. Portanto, para estabelecer um tratamento promissor, a definição desses mecanismos pode contribuir na determinação dos SCFA como um alvo terapêutico no manejo do câncer de mama.

**Palavras-chave:** Câncer de mama; ácidos graxos de cadeia curta; cultivo celular; modelo de câncer de mama murino 4T1; metástases; camundongos.

## ABSTRACT

Breast cancer has the highest worldwide incidence of all types of tumors. Treatments are defined according to molecular subtypes: luminal A and B, HER2+, and triple-negative. Despite the success rates for hormonal and HER2+ types, patients who relapse for the most aggressive or triple-negative tumors remain with low overall survival and the prognosis is poor due, for example, to the absence of a therapeutic target or high aggressiveness. Furthermore, alterations in the microbiota composition, consequently, in short-chain fatty acids (SCFA) – through baseline clinical conditions or side effects of treatments – might affect the risk and prognosis for breast cancer. In this sense, this study evaluated the effects of SCFA in different models of breast cancer to identify a new approach for the treatment of these tumors.

In vitro assays using breast cancer cell lines of different molecular subtypes, human (MCF-7, SK-BR-3, and MDA-MB-231) or murine (4T1) exhibited contrasting effects after treatments with SCFA. In the analysis of cell viability, acetate showed positive effects at concentrations above 100 mM. While propionate demonstrated a dual concentration-dependent effect. In a time and concentration-dependent manner, butyrate, propionate, and valerate significantly reduced the cell viability of human cells, and valerate reduced the viability of the murine cells under an  $IC_{50}$  of 9.6 mM in 48 h. On the other hand, selective FFA2 and FFA3 agonists 4-CMTB and AR420626, respectively, modestly reduced cell viability only of the more aggressive MDA-MB-231 and 4T1 cell lines. As in the evaluation of the FFA2 and FFA3 antagonists CATPB and  $\beta$ -hydroxybutyrate, respectively, only CATPB produced inhibitory effects in the 4T1 cells. These data suggest that SCFA have antitumor effects in breast cancer, probably through FFA2 and FFA3 receptor independent mechanisms.

From this screening, SCFAs with best inhibitory effects, butyrate, propionate, and valerate, were selected to investigate their effects on the malignancy capacity of MDA-MB-231 and 4T1 cells. Several changes in cell morphology were observed, as well as a reduction in the new colonies formation. In the evaluation of cell adhesion, valerate reduced this parameter in the MDA-MB-231 cells, however, it increased about the 4T1 cells. Regarding the evaluation of cell migration, only the treatment with butyrate (10 mM) prevented the migration of the 4T1 cells within 24 h. Although discreet, these results corroborate the antitumor effects observed in the reduction of colony formation and changes in cell morphology after exposure with butyrate in the 4T1 cells, mainly.

To investigate the effects of these SCFAs on tumor progression, was used the orthotopic model of metastatic breast cancer in female Balb/CJ mice induced by inoculation of 4T1 cells. The preliminary results of oral administration of SCFA in both the therapeutic and preventive protocols did not demonstrate a mirror effect according to the in vitro evaluation, except for the number of lung metastases that were significantly reduced by butyrate (600 mg/kg) in the therapeutic scheme.

These evidence suggests that the participation of the tumor microenvironment is involved in the action of SCFA, as well as their cellular effects can be modulated by alternative mechanisms to the FFA2 and FFA3 receptors, such as the HDACs inhibition. Therefore, to establish a promising treatment, the definition of these mechanisms might contribute to the determination of SCFA as a therapeutic target in the management of breast cancer.

**Keywords:** Breast cancer; short-chain fatty acids; cell culture, mouse 4T1 breast tumor model, metastasis; mice.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Taxas de incidência mundial de câncer de mama estimadas em 2020 (GLOBOCAN, 2021). .....	18
Figura 2. Taxas de mortalidade mundial por câncer de mama estimadas em 2020 (GLOBOCAN, 2021). .....	19
Figura 3. Casos de câncer atribuídos à obesidade em 2012 (IARC, 2017). .....	21
Figura 4. Comparação ente OS, sobrevida global; PFS, sobrevida livre de progressão, PPS, sobrevivência pós-progressão de diferentes subtipos moleculares (Bonotto et al. 2014). Número de licença: 4955480385958.....	22
Figura 5. Protocolos de tratamento para o câncer de mama segundo o subtipo molecular e progressão tumoral (Burguin, Diorio, and Durocher 2021) .....	23
Figura 6. Sobrevida de pacientes com câncer de mama primário (A) ou metastático (B) conforme o subtipo molecular (Yang et al. 2020). Licença: Creative Commons CC BY. ....	24
Figura 7. Prognóstico para cada subtipo molecular (Gong et al. 2017). Licença: Creative Commons CC BY.....	25
Figura 8. Influência do microambiente tumoral à formação de metástases (Sousa, Ribeiro, and Paredes 2019). Número de licença: 4960410538778. ....	28
Figura 9. Ligantes seletivos para os receptores FFA2 e FFA3 humanos e murino (Bolognini et al. 2016). Licença por carta de permissão. ....	30
Figura 10. Vias de sinalização dos receptores FFA2 e FFA3 (Ikuo Kimura et al. 2020). Licença: Creative Commons CC BY.....	31
Figura 11. Funções do FFA3 (GPR41) e FFA2 (GPR43). Extraído de (Yonezawa et al. 2013).....	32
Figura 12. Efeitos dos receptores de ácidos graxos livres em linhagens celulares de câncer. Extraído de (Hopkins e Meier, 2016). Número de licença: 4956250903469.....	35

## LISTA DE ABREVIATURAS

- 4-CMTB – 4-cloro- $\alpha$ - (1-metiletil) -N-2-tiazolilbenzenoacetamida
- 5-HT – Serotonina
- ABCB1 – Membro 1 da subfamília B de cassetes de ligação de ATP
- ABCG2 – Membro 2 da Subfamília G de transportadores de cassetes de ligação de ATP
- AC – Adenilato ciclase
- ALDH1 – Aldeído-desidrogenase
- AMPC – Monofosfato de adenosina cíclico
- BCRP – Proteína de resistência ao câncer de mama
- BCSCs – Células-tronco de câncer de mama
- BHB -  $\beta$ -hidroxibutirato
- BRCA1/2 – Gene do câncer de mama 1 e 2
- C1 – Formato
- C2 – Acetato
- C3 – Propionato
- C4 – Butirato
- C5 – Valerato/pentanoato
- Ca<sup>2+</sup> – Íon cálcio
- CATPB – (S)-3-[2(3-clorofenil) acetamido]-4-[4-(trifluorometil) fenil] ácido butanoico
- CD24 - Cluster de diferenciação 24
- CD44 - Cluster de diferenciação 44
- CDH1 – Gene da e-caderina
- CE<sub>50</sub> – Concentração efetiva média
- CREB – Proteína ligadora do elemento responsivo ao AMPC
- CSC – Células-tronco de câncer
- CSF – Fator estimulante de colônias
- DAG – Diacilglicerol
- DC – Células dendríticas
- EMT – Transição epitélio-mesenquimal
- EpCAM – Molécula de adesão celular epitelial
- ER – Receptor de estrogênio
- ERK1/2 - Proteínas quinases 1 e 2 reguladas por sinal extracelular

FEMAMA – Federação Brasileira de Instituições Filantrópicas de Apoio à Saúde da  
Mama

FFAs – Receptores de ácidos graxos

HDAC – Histona desacetilase

HER2 – Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano

HR – Receptor hormonal

HSP27 – Proteína de choque térmico 27

i.p. – Intraperitoneal

IC<sub>50</sub> – Concentração inibitória média

ICC – Índice de comorbidade de Charlson

IDH – Índice de desenvolvimento humano

IMC – Índice de massa corporal

IP3 – 1,4,5-trifosfato de inositol

IP3R – Receptor de 1,4,5-trifosfato de Inositol

JAK2 – Gene Janus quinase 2

JNK – Proteína c-Jun N-terminal quinase

Ki-67 – Marcador de proliferação

MAPK – Proteína quinase ativada por mitógenos

mTOR – Proteína alvo da rapamicina em mamíferos

p38 - Proteína quinase ativada por mitógenos p38

PARP – Poli-ADP-ribose polimerase

PBMC – Células mononucleares de sangue periférico

PI3K – Fosfatidilinositol-3-quinase

PIP2 – 4,5-bifosfato de fosfatidilinositol

PKA – Proteína quinase A

PLC – Fosfolipase-C

PMN – Polimorfonuclear

PR – Receptor de progesterona

PYY – Peptídeo YY

Rac2 – Proteína Rho-GTPase específica de hematopoiese

RE – Retículo endoplasmático

RNA<sub>m</sub> – Ácido ribonucleico mensageiro

ROS – Espécies reativas de oxigênio

SBM – Sociedade Brasileira de Mastologia

SCFA – Ácido graxo de cadeia curta

Smo – Proteína Smoothened

STAT-3 – Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3

SUS – Sistema Único de Saúde

TNBC – Câncer de mama triplo negativo

Tregs – Células T reguladoras

YAP1 – Regulador de transcrição associado a Yes1



## SUMÁRIO

<b>Capítulo 1</b> .....	17
<b>1. Fundamentação Teórica</b> .....	17
1.1 <i>Câncer de mama</i> .....	17
1.2 <i>Ácidos graxos de cadeia curta</i> .....	28
<b>3. Objetivos</b> .....	39
3.1 <i>Objetivo geral</i> .....	39
3.2 <i>Objetivos específicos</i> .....	39
<b>Capítulo 2</b> .....	40
<b>Manuscrito do trabalho experimental</b> .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>Considerações finais</b> .....	1
<b>Produção científica e apresentações de trabalhos</b> .....	3
<b>Referências</b> .....	5
<b>Anexo A: Aprovação Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – PUCRS)</b>	10

## 1. Fundamentação Teórica

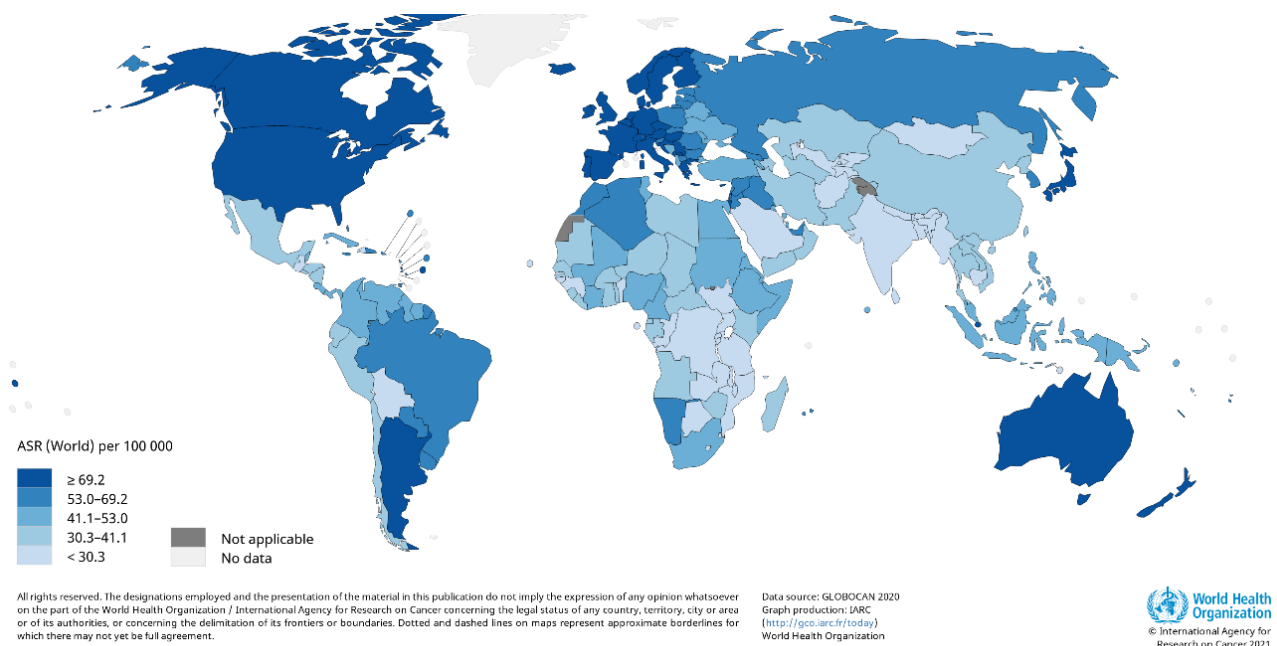
### 1.1 Câncer de mama

Um a cada quatro diagnósticos oncológicos em mulheres no mundo se refere ao câncer de mama (Sung et al. 2021). Apesar de ser uma das doenças mais estudadas no mundo, as dificuldades de detecção precoce e a heterogeneidade da doença causam diferenças no prognóstico e resistência aos tratamentos. Tais fatores podem contribuir para o aumento de recidivas e para as altas taxas de mortalidade, uma vez que a sobrevida global após 5 anos da doença metastática é inferior a 30% (Breastcancer.org, 2020; Sociedade Brasileira de Mastologia, 2019; Wang et al. 2020; Zhong et al. 2020; Liang et al. 2020).

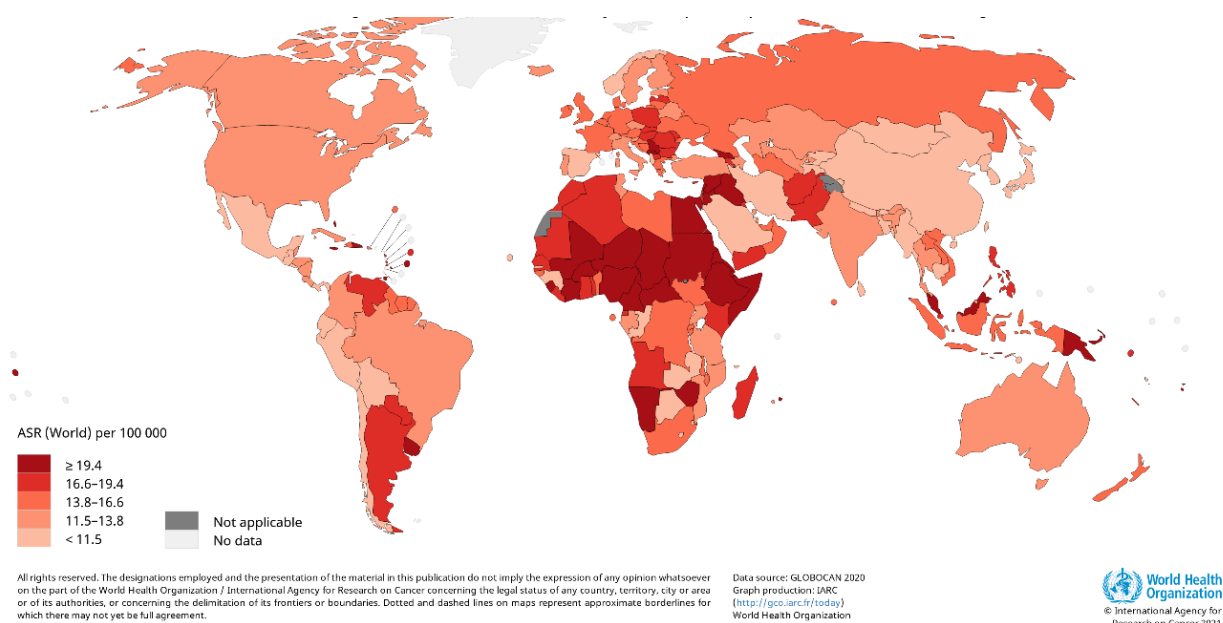
O tratamento do câncer de mama pode interferir negativamente na qualidade de vida relacionada à saúde de pacientes sobreviventes, diante da alta comorbidade, efeitos indesejáveis da quimioterapia, complicações cirúrgicas, insatisfação com a cirurgia reconstrutora, experiência com recorrências e metástases (Park et al 2020; Binotto e Schwartzmann 2020). Apesar da popularidade através dos programas nacionais de conscientização para prevenção, o câncer de mama permanece com casos de diagnóstico tardio, em estágio avançado ou final. Segundo a Federação Brasileira de Instituições Filantrópicas de Apoio à Saúde da Mama (FEMAMA), a incidência de câncer de mama é maior a partir dos 40 anos e o diagnóstico precoce aumenta as chances de cura em até 95%. Conforme a Lei 11.664/2008, a FEMAMA e a Sociedade Brasileira de Mastologia (SBM) recomendam a realização da mamografia uma vez por ano a partir dos 40 anos. No entanto, o Ministério da Saúde, através do Sistema Único de Saúde (SUS), orienta a realização de exames preventivos entre 50 e 60 anos, a cada 2 anos, onde o risco é 10 vezes maior.

A prevalência mundial vem aumentando ao longo dos anos, o que pode estar relacionado à complexidade da doença, aumento da expectativa de vida, além da exposição a múltiplos fatores de risco individuais e ambientais, tais como, urbanização e adoção de estilos de vida ocidentais (WHO, 2020). O câncer de mama apresentou piora no cenário mundial, passando a representar o tipo tumoral com maior incidência, com 2,3 milhões de novos casos (11,7%; Figura 1), representando a quinta causa principal de

morte por câncer, com 685.000 óbitos (6,9%) no mundo, em 2020 (Figura 2). As taxas mundiais de incidência e mortalidade por câncer foram de 19,3 milhões de novos casos (18,1 excluindo câncer de pele não-melanoma) e 10 milhões de mortes (Sung et al. 2021). Nas mulheres, o câncer de mama apresenta 24,5% de incidência e 15,5% de mortalidade, sendo também o mais frequente na maioria dos países (159 de 185 países), com a maior mortalidade em mais de 110 países, com raras exceções (WHO, 2021). Nos Estados Unidos, em 2020, a estimativa para novos casos e a taxa de mortalidade entre as mulheres, foi de 246.480 (15,3%) e 42.170 (7%), respectivamente (SEER/NIH, 2020). No Brasil, em 2018, foram registrados 85.620 novos casos, representando 15,3% do número total de casos de câncer no Brasil e, 18.442 (7,6%) de mortes. Entre as mulheres, a incidência e a mortalidade são alarmantes, com taxas de 30,5% e 13%, respectivamente (IARC, 2019).



*Figura 1. Taxas de incidência mundial de câncer de mama estimadas em 2020 (GLOBOCAN, 2021).*



*Figura 2. Taxas de mortalidade mundial por câncer de mama estimadas em 2020 (GLOBOCAN, 2021).*

Estima-se que no triênio 2020-2022, ocorram 625 mil novos casos de câncer por ano no Brasil, onde o câncer de mama será o mais frequente, acometendo cerca de 66.280 mulheres, seguido da maior taxa de incidência (29,7%), à exceção dos tumores de pele não melanoma. Nas regiões Sul e Sudeste, o câncer de mama é o mais prevalente, sendo o mais frequente nas mulheres brasileiras em todas as regiões territoriais: região Sul (71,16/100 mil), Sudeste (81,06/100 mil), Centro-Oeste (45,24/100 mil), Nordeste (44,29/100 mil) e Norte (21,34/100 mil). Florianópolis é a capital que apresenta a maior incidência nacional, com 134 casos novos a cada 100 mil mulheres. No Rio Grande do Sul, o câncer de mama pode apresentar 4.050 casos novos, a partir de 21.160 novos casos entre as mulheres, com 660 casos, só em Porto Alegre. A incidência na capital, a cada 100 mil mulheres, é superior à do Estado, correspondendo a 81,82 e 42,95, respectivamente (Estimativa INCA 2019).

De acordo com o índice de desenvolvimento humano (IDH), entre as mulheres, o câncer de mama foi o mais incidente em regiões com IDH mais alto (55,9/100mil habitantes), do que em regiões com IDH menor (29,7/100 mil habitantes), embora não haja diferença significativa nos índices de mortalidade (GLOBOCAN, 2020), devido, possivelmente, à dificuldade de acesso aos meios diagnósticos. Dessa forma, acredita-se que o IDH não interfere nas taxas de câncer de mama nas mulheres (INCA, 2019). Os riscos para desenvolver o câncer de mama estão associados, principalmente, ao estilo de

vida e às condições individuais e, em parte, ao histórico familiar positivo e às demais alterações genéticas, tais como as mutações dos genes BRCA1/2. Menarca precoce, menopausa tardia, nuliparidade, idade avançada, terapia de reposição hormonal, exposição excessiva à radiação ionizante, uso de alguns anticoncepcionais, alcoolismo, sedentarismo e tabagismo são os fatores mais comuns que têm sido relacionados ao câncer de mama (Breastcancer.org, 2020).

A obesidade e o sobrepeso (Figura 3), após a menopausa, aumentam o risco para o câncer de mama. Após a interrupção da produção de estrogênio pelos ovários, ocorre a compensação desses níveis através do tecido adiposo, ou seja, há uma proporcionalidade entre o aumento da gordura corporal e o câncer de mama, com receptor hormonal positivo. No entanto, antes da menopausa, alguns estudos sugerem que esta correlação também está envolvida no aumento do risco de desenvolver câncer de mama do subtipo triplo negativo. Além disso, esta condição metabólica promove a elevação dos níveis de insulina no sangue, o que tem sido amplamente associado ao desenvolvimento de diversos tipos tumorais, incluindo o câncer de mama (American Cancer Society, 2019; Iacoviello et al., 2020).

O índice de massa corporal (IMC) pode interferir no grau e no tamanho tumoral. Um estudo realizado por Blair e colaboradores (2019) revelou que mulheres obesas têm risco maior de desenvolver a doença em estágio III/IV, tumores de grau 3/4 e probabilidade elevada de morte por tumores hormonais do subtipo Luminal A e B. Ao considerar, a relação entre câncer e obesidade, essa condição se torna um problema de saúde pública mais expressivo (Blair et al. 2019). Evidências apontam que o tecido adiposo contém células-tronco pluripotentes que podem ser responsáveis pela angiogênese tumoral, uma vez que foi demonstrado que tais células promovem o crescimento do câncer de mama em modelos pré-clínicos, podendo ocorrer estímulo à recorrência tumoral, ao serem utilizadas células de tecido adiposo na reconstrução mamária (Bertolini 2013; Goldhirsch et al. 2013). Dessa forma, a obesidade pode contribuir na evolução do câncer de mama, uma vez que o excesso de gordura corrobora a hipótese do “*commom soil*”, que se refere à presença de precursores comuns no desenvolvimento de diversas doenças crônicas, como o câncer de mama, implicando em um modelo de estratégias preventivas gerais, como a adesão a hábitos saudáveis, de acordo com Iacoviello e colaboradores (2020).

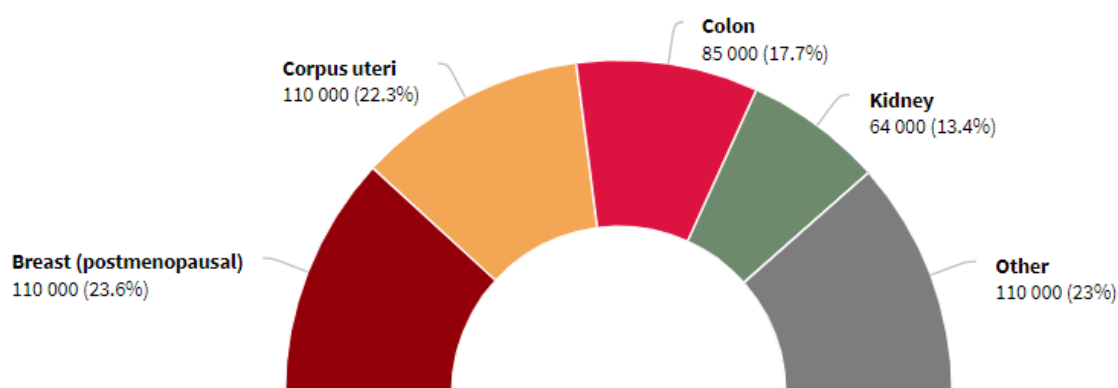
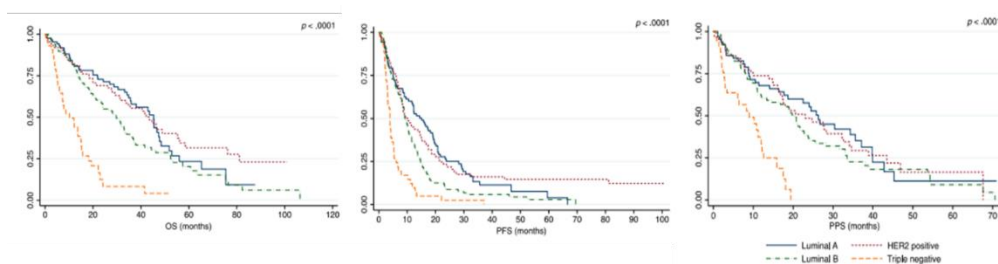


Figura 3. Casos de câncer atribuídos à obesidade em 2012 (IARC, 2017).

A grande variedade de parâmetros de identificação caracteriza o câncer de mama como uma doença biologicamente heterogênea. O diagnóstico leva em conta diversos fatores, como o grau de diferenciação, tamanho, características histológicas, envolvimento de linfonodos, marcadores tumorais e perfil genético (Breastcancer.org, 2020). Segundo a classificação histológica, os tipos mais comuns são o carcinoma ductal invasivo (70-80%), no qual as células saem dos ductos mamários e apresentam maior chance de iniciar metástases e, o carcinoma lobular invasivo (em torno de 10%), onde as células migram dos lóbulos para os tecidos mamários adjacentes, apresentando também alto potencial metastático. No entanto, as opções terapêuticas e o prognóstico são definidos pela classificação dos subtipos moleculares, os quais são categorizados conforme a imunopositividade para os marcadores dos receptores hormonais (HR) de estrogênio (ER) e progesterona (PR), para o receptor do fator de crescimento epidermoide humano tipo 2 (HER2) e, para o marcador de proliferação Ki-67 (American Cancer Society, 2019; CDC, 2020; Tsang e Tse 2020).

Durante a 13ª Conferência Internacional de Câncer de Mama de St Gallen (2013), especialistas redefiniram a classificação molecular do câncer de mama, como: luminal A (ER/PR+ , HER2- , Ki-67+ < 20%), luminal B (ER+, PR < 20%, HER2- , Ki-67+ ≥ 20%); HER2+ (ER-, PR-, HER2 superexpresso ou amplificado) e, triplo negativo (TNBC) (ER-, PR-, HER2-) (Goldhirsch et al. 2013). Em um estudo de coorte com 427 pacientes com tumor de mama metastático, foi observado que a maioria das pacientes apresentavam tumores ER+ (78.3%), sendo 24,5% do tipo Luminal A, 38,4% classificados como Luminal B, 24,8% HER2+ e, por fim, 12,3% como triplo negativo. Os pacientes com tumores do tipo Luminal A e HER2+ tiveram os melhores prognósticos.

Alternativamente, o subtipo molecular triplo negativo apresentou os piores parâmetros com relação à média de sobrevida global (Figura 4) (Bonotto et al., 2014).



*Figura 4. Comparação ente OS, sobrevida global; PFS, sobrevida livre de progressão, PPS, sobrevivência pós-progressão de diferentes subtipos moleculares (Bonotto et al. 2014). Número de licença: 4955480385958.*

A partir da identificação do subtipo molecular e da progressão tumoral, o protocolo terapêutico é definido de maneira personalizada, para cada paciente, conforme o estágio clínico: câncer de mama em estágio inicial ou doença metastática/avançada. No primeiro, o tratamento é iniciado pela terapia neoadjuvante para reduzir o tamanho do tumor, geralmente com a utilização de quimioterapia - e imunoterapia em tumores HER2+ -, seguido da remoção completa ou cirurgia conservadora de mama e radioterapia quando necessário, sendo concluído com a terapia adjuvante, a fim de eliminar as células remanescentes e reduzir as chances de recidiva mediante terapia alvo por hormonioterapia ou imunoterapia ou, quimioterapia com inibidores da poli ADP-ribose polimerase (PARP), quando há mutação do gene BRCA (Burguin, Diorio, and Durocher 2021). Entretanto, quando é diagnosticada doença metastática/avançada, a prioridade é conter a propagação tumoral, visto que este tipo de câncer de mama não tem cura. Portanto, os tratamentos são divididos em linhas terapêuticas que consistem na administração da mesma terapia sistêmica do estágio inicial, combinadas a outros agentes, como, inibidores de ciclinas e hormonioterapia para os tumores hormonais; e, quimioterapia de segunda e terceira linha e inibidores de tirosina-quinase para os tumores HER2+ e triplo-negativos (Figura 5).

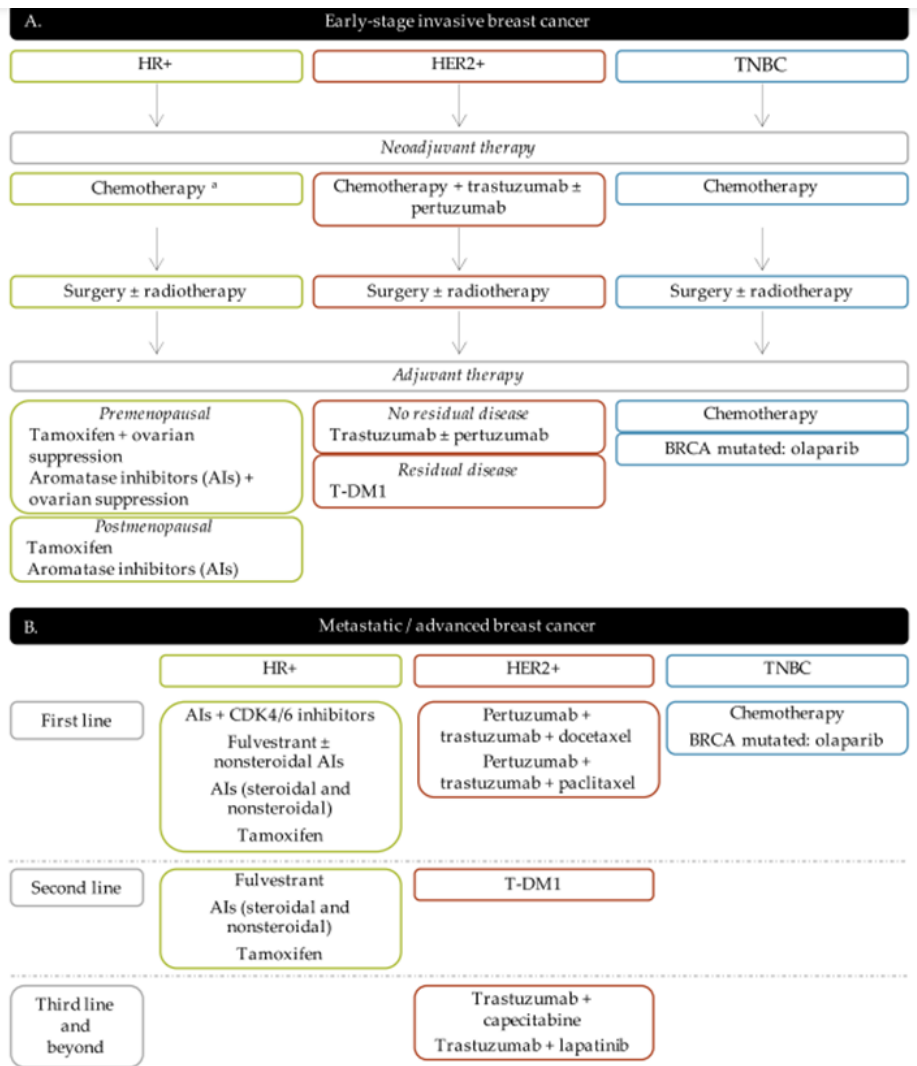


Figura 5. Protocolos de tratamento para o câncer de mama segundo o subtipo molecular e progressão tumoral (Burguin, Diorio, and Durocher 2021)

Em casos de tumores mais agressivos, como o subtipo triplo negativo, as opções terapêuticas são limitadas. O tratamento é mais complexo, uma vez que não há um alvo específico como nos casos de tumores HER2+ ou subtipos hormonais (ER+ ou EP+), para que a terapia alvo ou hormonioterapia sejam adotadas. No estágio IV da doença, definido pela ocorrência de metástases, diferentes alternativas terapêuticas são empregadas, como a inclusão de outros agentes quimioterápicos, estratégias de imunoterapia, inibidores de PARP e vacinas, através de estudos clínicos recentes (Burguin, Diorio, and Durocher 2021; Oncogua.org 2020).

Tanto mulheres jovens, quanto na pós-menopausa, podem desenvolver a doença. No entanto, mulheres com menos de 40 anos de idade têm incidência relativamente maior



de doença triplo negativa e HER2+ (Goldhirsch et al. 2013). Yang e colaboradores (2020) avaliaram a influência dos subtipos moleculares sobre a ocorrência de metástases, além de analisarem a sobrevida dos pacientes na doença primária e na doença metastática. Este estudo relevou que a sobrevida na doença primária no subtipo ER+ foi a mais longa, com uma média de 78,5 meses. Por outro lado, a menor sobrevida ocorreu no subtipo triplo negativo, com 69,1 meses, assim como na doença metastática (18,5 meses) (Figura 6) (Yang et al. 2020).

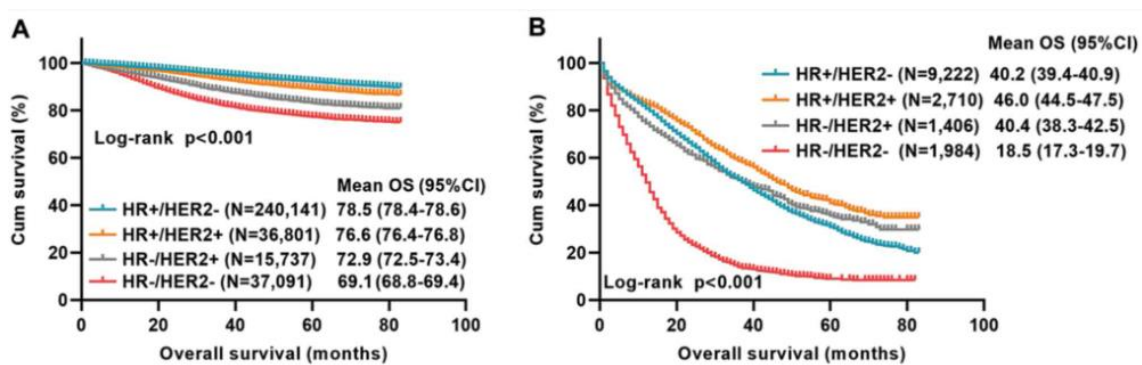


Figura 6. Sobrevida de pacientes com câncer de mama primário (A) ou metastático (B) conforme o subtipo molecular (Yang et al. 2020). Licença: Creative Commons CC BY.

Os subtipos HER2+ e triplo negativo apresentam os piores prognósticos, segundo as taxas de metástase e a sobrevivência pós-recidiva, com menor sobrevida e risco três vezes maior de morte por câncer de mama (Tobin et al. 2015). O subtipo triplo negativo tem prevalência de 10 a 15% e é diagnosticado, principalmente, em mulheres jovens, pré-menopáusicas, com menos de 40 anos, apresentando pior prognóstico devido à menor taxa de sobrevida, com mortalidade em torno de 40%. Apresenta alto potencial de invasão, sendo que 46% das pacientes desenvolvem metástases, e a sobrevida após esse avanço é de 13,3 meses, com recorrência de 25% após cirurgia (Figura 7) (Gong et al. 2017; Valla et al. 2016; Yin et al. 2020). Pacientes com tumores triplo negativos demonstram captação particularmente elevada de fluorodeoxiglicose (FDG), com sensibilidade de 100%, comparado aos demais subtipos moleculares, sugerindo que o aumento da glicólise seria um indicativo da agressividade desse tipo tumoral (Basu et al. 2008). Em um modelo multivariável, ajustado de acordo com idade, etnia, ano de diagnóstico, grau, índice de comorbidade de Charlson (ICC) e histologia, foi observado

que mulheres com o subtipo triplo negativo apresentaram aumento significativo do risco de mortalidade, em 107-111% (Press et al. 2017).

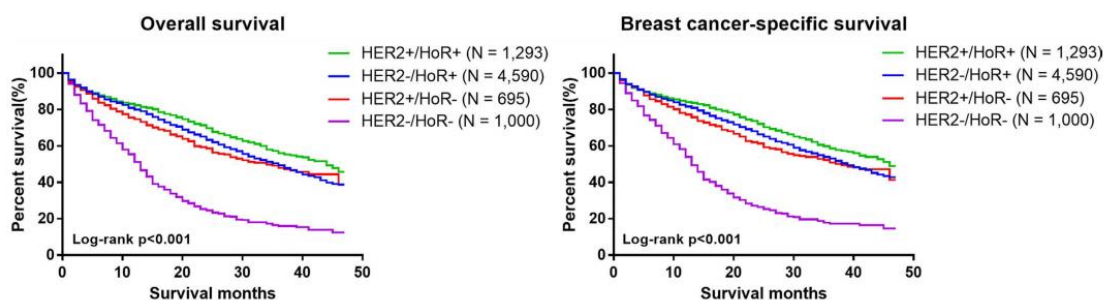


Figura 7. Prognóstico para cada subtipo molecular (Gong et al. 2017). Licença: Creative Commons CC BY.

As metástases são decorrentes da capacidade de migração de células oriundas do tumor primário, que invadem tecidos adjacentes, entram na corrente sanguínea e vasos linfáticos e, então, promovem a formação de um sítio tumoral secundário (Ward et al. 2015). Este processo envolve a invasão e a migração das células tumorais, com influência do microambiente tumoral (Scully et al. 2012). Em torno de 20 a 30% das mulheres com câncer de mama podem desenvolver metástases à distância, que em adição às suas complicações, resulta em uma alta mortalidade, de aproximadamente 90% (Yang et al. 2020). A análise de biópsias líquidas permite avaliar a evolução do paciente no que se refere ao desenvolvimento de novas mutações e à resposta terapêutica, a fim de oferecer um tratamento personalizado e eficiente. Integrando-se essas informações à compreensão do organotropismo metastático, seria possível prevenir e/ou manejar a doença metastática de forma mais adequada (Chen et al. 2018).

Os subtipos moleculares acrescidos às características intrínsecas tumorais estão amplamente relacionados aos sítios específicos de metástases, chamados de metástases organotrópicas (Chen et al. 2018). Os pacientes com tumores do subtipo triplo negativo ou HER2+ apresentam mais metástases cerebrais, em comparação aos demais subtipos (Yang et al. 2020). Pacientes HER2+ apresentam uma alta incidência de doença avançada, taxa de recidiva elevada e sobrevida global reduzida, além de um aumento do risco de metástases, com maior propensão para o cérebro, pulmão e fígado. Já para o subtipo triplo negativo, não é possível determinar uma terapia efetiva, com necessidade de tratamentos muito tóxicos, apresentando um perfil tumoral agressivo e propensão a

desenvolver depósitos metastáticos no cérebro e pulmões, além de apresentar um tempo curto de sobrevivência (Lam, Jimenez, and Boven 2014). A quantidade de metástases ósseas foi maior no subtipo HR+/HER2+, enquanto as metástases pulmonares foram superiores no subtipo HER2+ e as hepáticas nos subtipos HR+/HER2+ e HER2+. Os subtipos HER2+ e triplo negativo tiveram frequência de 4 ou mais sítios de metástases (Yang et al. 2020).

As células-tronco tumorais (CSC; cancer stem cells) são subpopulações capazes de iniciar tumores, envolvidas na resistência aos tratamentos, que apresentam alta capacidade de metástase e invasão, habilidade de auto-renovação e diferenciação, desenvolvendo tumorigenicidade (Aztopal et al. 2018; Takahashi et al. 2011). As primeiras CSC de tumores sólidos foram descobertas no câncer de mama, em 2003 (Al-Hajj et al. 2003). Células com marcadores de superfície CD44<sup>+</sup>, CD24<sup>-baixo</sup>, EpCAM e ALDH1 foram associadas à malignidade e à capacidade de reproduzir as mesmas características do tumor primário (Takahashi et al. 2011). Proteínas da via de auto-renovação (Wnt/β, Smo, γ-secretase, STAT-3), transportadores de efluxo de drogas (ABCG2 e ABCB1), proteínas apoptóticas e anti-apoptóticas, além de moléculas implicadas na autofagia, metabolismo e regulação do microambiente, estão envolvidas nesses mecanismos (Pindiprolu, Krishnamurthy, and Chintamaneni 2018). As células-tronco tumorais de câncer de mama (BCSCs; *breast cancer stem cells*) têm a capacidade de ficar em suspensão na corrente sanguínea. Podem se deslocar e proliferar durante a metástase, promovendo a disseminação do tumor através da transição epitélio-mesenquimal (EMT), aumentando o perfil de invasão e migração, devido à perda da adesão intercelular dessas células (Pindiprolu, Krishnamurthy, and Chintamaneni 2018).

Os subtipos moleculares, claudin-low, triplo negativo e HER2+ apresentam as maiores taxas de mortalidade e isso se deve à ampla resistência terapêutica, uma vez que estes subtipos geralmente apresentam alta proporção de BCSCs CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-baixo</sup>, enquanto as BCSCs ALDH1<sup>+</sup> apresentam distribuição com altos níveis nos subtipos triplo negativo e HER2+. O aumento de uma população semelhante com um perfil composto por células-tronco e mesenquimais no subtipo claudin-low foi demonstrado por expressão gênica e pode permitir a EMT, conferindo um prognóstico ruim aos pacientes (Shima et al. 2017). O tecido adiposo apresenta células tronco mesenquimais precursoras que podem facilitar a disseminação das células tumorais mamárias (Esposito et al. 2020). Foi demonstrado que adipócitos murinos derivados de células tronco têm maior afinidade de

fusão por células tumorais de mama mais agressivas e com alta expressão de CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/baixo</sup>EpCAM<sup>+</sup>, sem alterar a proliferação (Chan et al. 2020).

No microambiente tumoral (Figura 8), a infiltração de macrófagos pode definir um padrão invasivo e migratório decorrente das suas características pró-tumorigênicas. De acordo com o estímulo de ativação, eles podem ser classificados em M1, caracterizados pela produção de citocinas pró-inflamatórias, espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico, ou, em M2, responsáveis pela produção de citocinas anti-inflamatórias, síntese de prostaglandina E2 e capacidade de estimular a angiogênese. Além disso, os macrófagos M2 são mais prevalentes e diretamente relacionados a um mau prognóstico do câncer de mama, uma vez que secretam fatores angiogênicos e agentes mitogênicos (Burnett et al. 2008; Ward et al. 2015). Macrófagos associados a tumores (TAM) podem se acumular em regiões necróticas e pouco vascularizadas no câncer de mama, sob condições de hipóxia, aumentando a agressividade do tumor (Choi et al. 2018; Obeid et al. 2013). Compõem 50% da massa tumoral em humanos, indicando sua importância nos mecanismos de progressão tumoral (Larionova et al. 2020). Macrófagos M2 são capazes de estimular a migração de células no tumor e a atividade das BCSC, uma vez que a interação entre macrófagos e células tumorais é bidirecional, onde essas células também ativam proteínas, tais como o fator estimulante de colônias (CSF), que promove o recrutamento de macrófagos M2 para o estroma tumoral (Choi et al. 2018; Ward et al. 2015). A inibição da ação de macrófagos M2 no microambiente tumoral pode reduzir a ativação de BCSCs e, conseqüentemente, melhorar o prognóstico, ao reduzir a capacidade migratória e metastática (Ward et al. 2015).

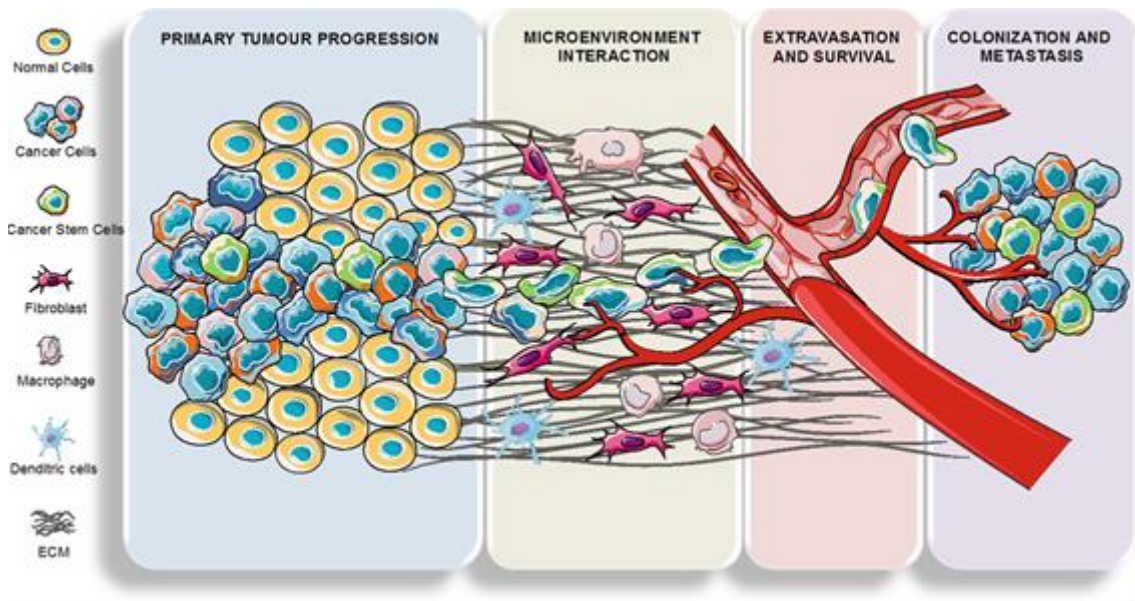


Figura 8. Influência do microambiente tumoral à formação de metástases (Sousa, Ribeiro, and Paredes 2019). Número de licença: 4960410538778.

## 1.2 Ácidos graxos de cadeia curta

A descoberta recente de receptores de ácidos graxos livres (FFAs, *free fatty acid receptors*) introduziu um novo modelo de regulação mediada por lipídeos em processos celulares, ou seja, ácidos graxos livres como moléculas de sinalização celular (Edfalk and Edlund 2008). Os FFAs são receptores acoplados à proteína G, conhecidos por participarem de diversas funções fisiológicas, como a regulação do metabolismo e inflamação, produção de leptina, produção de peptídeo YY, secreção de insulina estimulada por glicose e secreção de glucagon (Bindels, Dewulf, e Delzenne 2013; Brown et al. 2003; Nilsson, Kotarsky, e Owman 2003; Poul et al. 2003).

A família de receptores FFA é composta por quatro membros: FFA1 (GPR40), FFA2 (GPR43), FFA3 (GPR41) e FFA4 (GPR120). A afinidade molécula-receptor se dá através da complexidade do ácido graxo: os receptores FFA1 e FFA4 são ativados por ácidos graxos de cadeia longa e média (> 13 carbonos), como, ômega-3, ômega-6, ômega-9 e os ácidos graxos saturados. Por outro lado, os ligantes endógenos do FFA2 e do FFA3 são SCFA ( $\leq 6$  carbonos), principalmente, acetato, propionato e butirato (Laure B Bindels, Dewulf, and Delzenne 2013; Milligan et al. 2017).

Os SCFA podem ser obtidos a partir do processo da fermentação anaeróbica de fibras alimentares solúveis (frutas, legumes, feijão, lentilha, ervilha, grãos inteiros, aveia) ou insolúveis (casca comestível em frutas e vegetais, sementes, alguns vegetais, fubá,

alguns cereais, arroz integral), através da microbiota intestinal saudável. Apresentam propriedades anti-inflamatórias, além de serem utilizados com fonte energética primária em mamíferos (C. H. Kim 2017). Agem como moléculas de sinalização, desempenhando um papel importante em diferentes funções celulares, como, em células polimorfonucleares (PMN), incluindo a alteração do pH citoplasmático, regulação das concentrações de cálcio, metabolismo do oxigênio, fagocitose, proliferação celular, distribuição de actina citoesquelética, motilidade granulocitária e quimiotaxia (Kimura et al. 2011; Yonezawa et al. 2013; Lazar et al. 2018). Exercem funções imunológicas fundamentais na interação hospedeiro-microbioma, pela inibição de histonas desacetilases (HDAC) e ativação de GPR109A e GPR43, possuindo efeitos anti-inflamatórios e conferindo tolerância a patógenos microbianos através do impacto em reações imunes intestinais, como, na diferenciação de células T reguladoras (Tregs), atividade de células dendríticas (DC) e macrófagos, produção de citocinas anti-inflamatórias, proliferação de células B plasmáticas e produção de anticorpos (Mirzaei et al. 2021).

Os ligantes endógenos apresentam valores de concentração efetiva 50% ( $CE_{50}$ ) entre 0,1 e 1,0 mM, com níveis séricos fisiológicos entre 50 e 200  $\mu$ M. Apesar de serem estruturalmente semelhantes, o FFA2 e o FFA3 são ativados de forma distinta pelos ligantes naturais, assim como pelos sintéticos (Figura 9). A relação estrutura-atividade com os receptores humanos varia de acordo com o comprimento de cadeia carbônica, apresentando os seguintes valores de potência  $C2$  (acetato) =  $C3$  (propionato) >  $C4$  (butirato) >  $C5$  (valerato/pentanoato) =  $C1$  (formato) para FFA2 e,  $C3 = C4 = C5 > C2 = C1$  para FFA3 (Milligan, Stoddart, and Smith 2009).

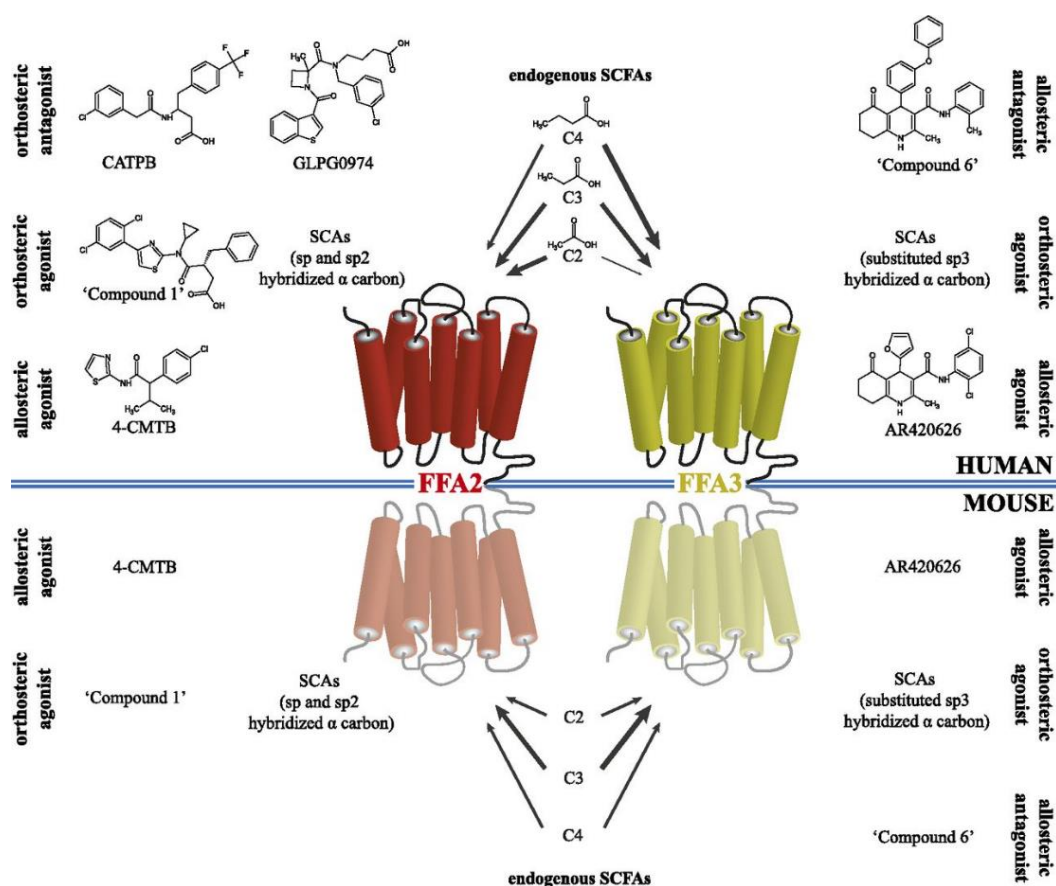


Figura 9. Ligantes seletivos para os receptores FFA2 e FFA3 humanos e murino (Bolognini et al. 2016). Licença por carta de permissão.

O acetato (C2) se comporta como um ligante seletivo para o receptor FFA2, diferentemente do propionato (C3). Embora o acetato (C2) tenha sido confirmado como um agonista seletivo para o receptor FFA2 humano, com potência 20 vezes maior em relação ao receptor FFA3, este ligante não se mostrou seletivo entre os receptores ortólogos de camundongos. Dados distintos também foram observados com relação à afinidade dos ácidos graxos C1-C5 pelo receptor FFA3 de ratos, com potência 3 a 5 vezes maior em comparação aos ortólogos humanos. Embora o propionato (C3) seja equipotente entre os ortólogos humanos, esse agonista apresenta seletividade para o receptor FFA3 de camundongos (Hudson et al. 2012).

A transdução de sinal desses receptores é mediada através do acoplamento à proteína G (Figura 10), via dissociação dos complexos heterotriméricos,  $G\alpha_{q/11}$  e  $G\alpha_{i/0}$ , para FFA2 ou, somente  $G\alpha_{i/0}$  para o FFA3. A subunidade  $G\alpha_{i/0}$  inibe a atividade da adenilato ciclase (AC) e, conseqüentemente, diminui os níveis de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) intracelular e a atividade da proteína quinase A (PKA), o que



resulta na diminuição da fosforilação de CREB, envolvida na transcrição de genes. Por outro lado, na via da  $G_{\alpha q/11}$ , ocorre a ativação da fosfolipase-C (PLC) que catalisa a clivagem do 4,5-bifosfato de fosfatidilinositol (PIP2) em 1,4,5-trifosfato de inositol (IP3) e diacilglicerol (DAG). Por sua vez, IP3 se liga aos receptores IP3 (IP3R) na membrana do retículo endoplasmático (RE), aumentando as concentrações intracelulares de cálcio. Além disso, o receptor FFA2 também pode ser regulado através do recrutamento de  $\beta$ -arrestina-1 e, particularmente,  $\beta$ -arrestina-2, que são relacionadas à internalização do receptor da superfície celular e/ou iniciam a transdução de sinal via proteína G de forma independente (Hudson et al. 2013; Neves et al. 2015; Ortiz-masia e Barrachina 2020).

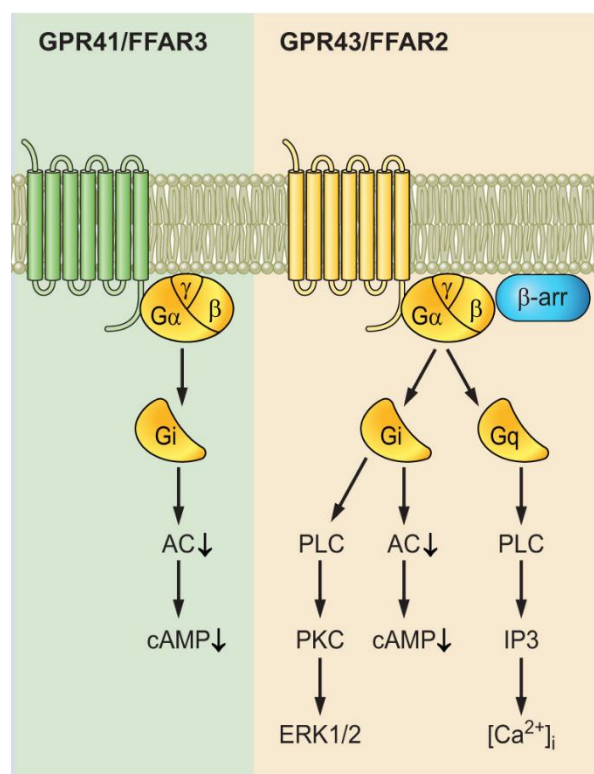


Figura 10. Vias de sinalização dos receptores FFA2 e FFA3 (Ikuo Kimura et al. 2020).  
Licença: Creative Commons CC BY.

A sinalização de FFA2 pode levar à regulação da secreção de leptina e adipogênese. Apresenta alta expressão em neutrófilos, monócitos, células mononucleares de sangue periférico (PBMC), linfócitos B, pâncreas (células  $\beta$ ), intestino (células L, células epiteliais intestinais) e tecido adiposo branco (Nilsson, Kotarsky, and Owman 2003; Tolhurst et al., 2012; Smith et al., 2013, M. H. Kim et al. 2013; Kimura et al., 2013; Priyadarshini et al., 2015). Induz o influxo de cálcio intracelular e quimiotaxia (Nilsson,



Kotarsky, and Owman 2003; Poul et al. 2003), como observado em neutrófilos de medula óssea de camundongos, via ativação de PI3K $\gamma$ , Rac2, p38 e ERK1/2 (Vinolo et al. 2011). Juntamente ao receptor FFA2, o receptor FFA3 também está expresso no tecido adiposo e ambos regulam a secreção de PYY e 5-HT em células enteroendócrinas (Figura 11), além de estar expresso no sistema nervoso periférico, pâncreas (células  $\beta$ ), intestino (células L e K) e tecido imunológico (células dendríticas e timo) (Zaibi et al, 2010; Ikuo Kimura et al. 2011; Duca et al., 2013; Trompette et al., 2014; Priyadarshini and Layden 2015; Lee et al., 2018).

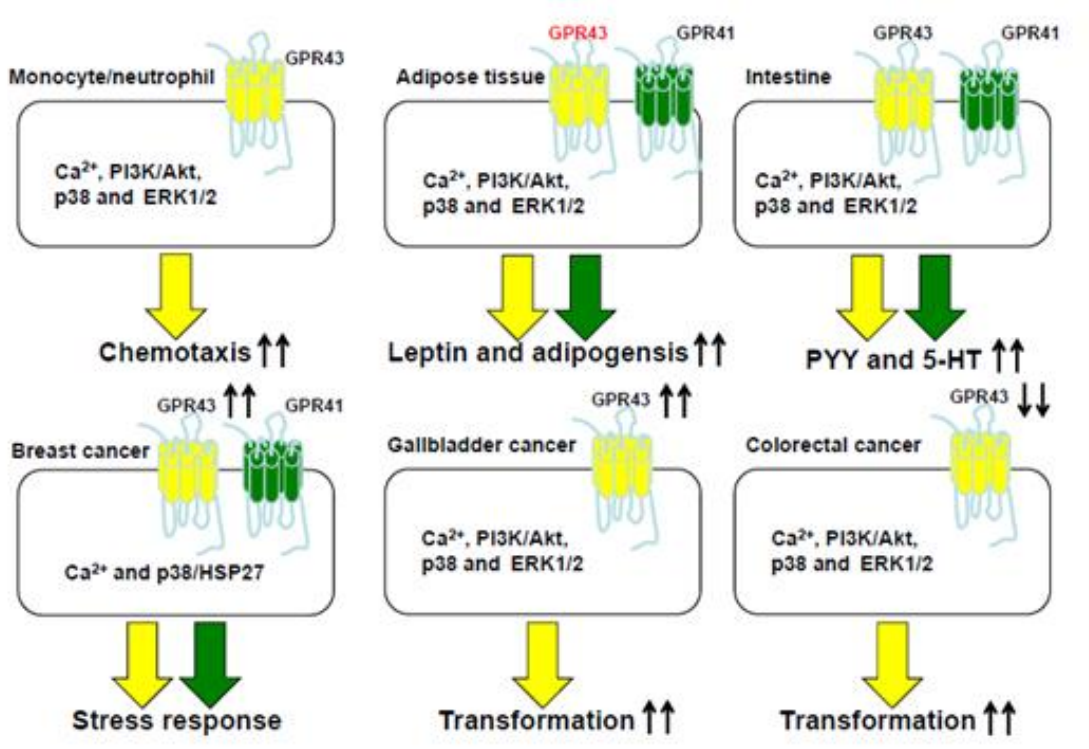


Figura 11. Funções do FFA3 (GPR41) e FFA2 (GPR43). Extraído de (Yonezawa et al. 2013)

Os receptores de ácidos graxos são comumente estudados em doenças metabólicas, como diabetes e obesidade. No entanto, nos últimos anos, houve um aumento de estudos investigando o envolvimento dos FFA em processos inflamatórios, com relevância em várias doenças, incluindo o câncer (Hopkins and Meier n.d.). De forma interessante, os SCFA têm sido relatados como agentes antitumorais por serem capazes de induzir diferenciação celular, parada de crescimento celular, morte celular por apoptose e inibição seletiva da proliferação em células de câncer de cólon,

principalmente, o propionato e butirato (Tang et al. 2011). Os SCFA podem sensibilizar células tumorais para a ação de agentes quimioterápicos melhorando a eficácia terapêutica. Foi observado que o tratamento de butirato combinado à cisplatina inibiu a proliferação celular através da parada do ciclo celular em G1 e induziu apoptose em células de câncer de bexiga (Maruyama and Yamamoto 2012).

Os receptores FFA2 e FFA3 estão expressos em vários tipos de câncer como, por exemplo, mama, cólon e fígado (Tang et al. 2011; Bindels et al. 2012; Yonezawa, Kobayashi, e Obara 2007). A redução da expressão desses receptores parece contribuir para a progressão do câncer, assim como, pode estar envolvida no desenvolvimento tumoral (Thirunavukkarasan et al. 2017). Transportadores de efluxo, como a proteína de resistência ao câncer de mama (BCRP), são proteínas que conferem resistência a múltiplas drogas e, geralmente, estão superexpressas em células tumorais. Foi demonstrado que o butirato funciona como um substrato para a BCRP humana e murina, em células de câncer de mama e de cólon, o que pode explicar seu efeito protetor e antiproliferativo em células epiteliais de cólon murino, podendo potencializar as ações anti-carcinogênicas e anti-inflamatórias (Gonçalves, Gregório, e Martel 2011). O receptor FFA2 foi identificado na biblioteca de DNAC de câncer de vesícula biliar, sendo capaz de induzir a transformação de fibroblastos 3T3 normais. Esse receptor está reduzido ou ausente na maioria dos tecidos de adenocarcinoma colorretal, apresentando alta expressão no cólon normal (Yonezawa et al. 2013), sendo mais expresso em tecidos linfáticos, como baço e adenoide (Brown et al. 2003). O FFA2 está regulado negativamente em células metastáticas e em carcinomas de cólon, sugerindo seu papel no desenvolvimento da carcinogênese. Ao restaurar a expressão do receptor FFA2 em células de cólon HCT8 foi observada uma redução da proliferação celular, aumento da apoptose, parada do ciclo celular em G0/G1, após a exposição, principalmente, ao propionato (Tang et al. 2011).

Em células de câncer de mama, MCF-7 (humana) e JIMT-1 (murina), o FFA2 é altamente expresso, em relação ao FFA3, regulando a resposta de estresse celular através da via p38/HSP27; essa relação é inversa em células epiteliais mamárias de bovinos (Park et al. 2020; Yonezawa et al. 2009, 2013; Yonezawa, Kobayashi, and Obara 2007). Estudos recentes demonstraram um papel na supressão tumoral por estes receptores, através da inibição da invasão de células de câncer de mama, por vias de sinalização distintas. Em células MDA-MB-231 (triplo negativo), o FFA3 inibe a via de Hippo-Yap e aumenta a expressão de e-caderina, enquanto o FFA2 inibe a sinalização MAPK (Thirunavukkarasan et al. 2017).

A expressão dos receptores FFA2 e FFA3 foi analisada na linhagem de câncer de mama humano MCF-7 (ER+). Observou-se que os níveis de expressão de RNAm do FFA2 são significativamente superiores em relação ao FFA3. A ativação desses receptores pela exposição a 10 mM de diferentes tipos de SCFA desencadeou a sinalização de uma cascata de segundos mensageiros. Foi observado um aumento marcante de  $Ca^{2+}$  intracelular, de forma concentração-dependente, fosforilação da chaperona HSP27 e, indução da fosforilação da MAPK p38 de forma tempo-dependente, sem efeitos sobre ERK 1/2 e JNK. Nessa mesma concentração, os SCFA foram capazes de inibir significativamente a proliferação celular em 24 h. É possível inferir que a ativação de FFA2 mediada por SCFA promove diferentes efeitos nas vias de sinalização em células MCF-7, uma vez que o silenciamento gênico do FFA2 inibiu o aumento de cálcio intracelular induzido por propionato (Yonezawa, Kobayashi, and Obara 2007).

A perda da expressão do marcador molecular E-caderina, frequentemente investigada no câncer de mama, é um fator indicativo de agressividade tumoral, favorecendo o processo de metástase. Os receptores FFA2 e FFA3 foram capazes de modular diferentes respostas relacionadas ao perfil de invasão em linhagens de câncer de mama mais agressivas. A exposição ao propionato, por 24 h, reduziu o padrão de invasibilidade, comparado ao veículo, na linhagem MDA-MB-231, que expressa ambos os receptores. Além disso, a regulação de E-caderina em células com superexpressão dos dois receptores foi associada ao aumento da fosforilação de YAP1, com efeito dependente do ligante e proporcional à superexpressão dos receptores. Entretanto, somente o FFA2 parece regular a via da YAP1, através da modulação da expressão da quinase LATS1, enquanto que a expressão de FFA3 levou a uma redução significativa da via ERK 1/2 (Thirunavukkarasan et al. 2017).

O perfil genético comparativo entre amostras de tecidos de carcinoma de mama invasivo e triplo negativo relevou uma expressão reduzida de FFA3 e FFA2, em comparação com amostras de tecido mamário normal. O mesmo padrão foi observado em modelo *in vitro*, uma vez que a superexpressão de FFA3 leva ao aumento de E-caderina (CDH1) nas linhagens de câncer de mama mesenquimais/triplo negativas, MDA-MB-231 e MDA-MB-436, quando comparadas às linhagens MCF-7 ou BT-474, do tipo epitelial/luminal A (Thirunavukkarasan et al. 2017).

O propionato suprimiu a invasão de diferentes tipos de células de câncer de mama com superexpressão de FFA2 e FFA3, através da inibição da sinalização de JAK2/STAT3, parada do ciclo celular na fase G0/G1, aumento de ROS e fosforilação de

p38/MAPK. Em concentrações entre 5-20 mM, o propionato teve efeito sobre a proliferação celular, apoptose, autofagia e capacidade antioxidante. Em modelo xenográfico de câncer de mama, induzido pela implantação de células JIMT-1 e MCF7, a administração de propionato (20 mg/ml em água potável) após 5-6 semanas de tratamento, reduziu significativamente o crescimento tumoral através da regulação de STAT3 e p38 (Park et al. 2020).

Considerando as evidências científicas prévias sobre o envolvimento desses receptores na progressão do câncer de mama (Figura 12) (Hopkins e Meier, 2016), tanto o FFA2, quanto o FFA3, podem ser apontados como alvos promissores na prevenção ou no tratamento desse tipo de tumor, indicando a necessidade de novos estudos nessa linha de investigação.

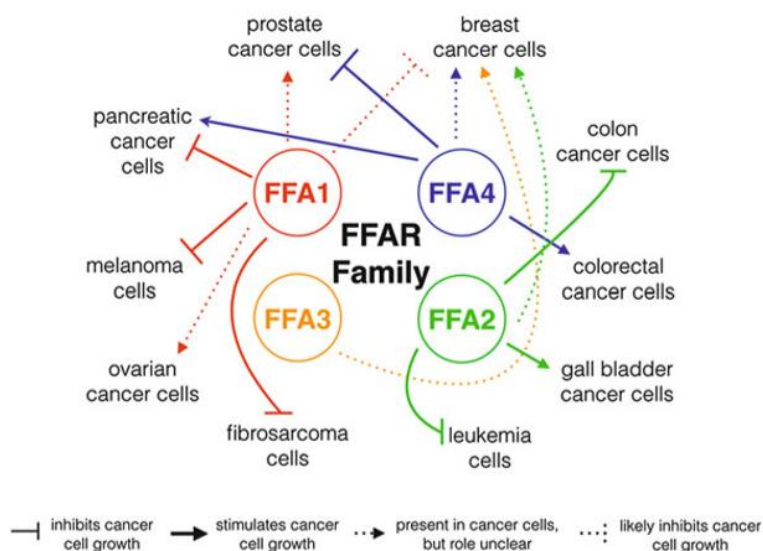


Figura 12. Efeitos dos receptores de ácidos graxos livres em linhagens celulares de câncer. Extraído de (Hopkins e Meier, 2016). Número de licença: 4956250903469

O desenvolvimento de agonistas e antagonistas sintéticos para os receptores de ácidos graxos de cadeia curta, bem como, o estudo dos seus efeitos farmacológicos pré-clínicos são recentes. O GLPG0974 é um antagonista seletivo, com alta afinidade pelo receptor FFA2, de baixo peso molecular, ativo por via oral em humanos, mas não em roedores, que apresenta potencial para o tratamento de doenças inflamatórias intestinais (Miyamoto et al. 2016; Namour et al. 2016; Pizzonero et al. 2014). Em modelos *in vitro*, foi capaz de inibir a migração e a ativação de neutrófilos CD11b (AE) induzida por acetato, em sangue total humano, de forma concentração-dependente ( $IC_{50} = 483 \text{ nM} \pm 72$ ), além de induzir a mobilização de cálcio (Pizzonero et al. 2014). O efeito da incubação

do GLPG0974 em células de câncer de útero, Hela, levou ao aumento da viabilidade celular contrastando com o efeito antiproliferativo, concentração- e tempo- dependentes, dos ligantes naturais, acetato, propionato e butirato, via supressão de AMPc. Foi demonstrado que o receptor FFA2 está altamente expresso em neoplasias cervicais e no citoplasma de células Hela (Matsuya-ogawa et al. 2019), permitindo inferir que os SCFA podem desempenhar papel oncoprotetor. Em ensaio clínico de fase 2 (NCT01829321), a administração diária de 400 mg de GLPG0974 foi bem tolerada e a inibição da quimiotaxia induzida por acetato em neutrófilos foi confirmada. No entanto, esse antagonista não foi efetivo para o tratamento de pacientes com colite ulcerativa leve a moderada (Namour et al. 2016).

O (S)-3-[2(3-clorofenil)acetamido]-4-[4-(trifluorometil) fenil] ácido butanoico (CATPB) é um antagonista seletivo de FFA2, capaz de inibir a indução de neutrófilos EC80 causada pelo propionato, de maneira concentração-dependente (Hudson et al. 2012). A ativação de neutrófilos humanos induzida por 1 mM de acetato e, 1  $\mu$ M do agonista Cmp58, foi potencialmente inibida por CATPB, na concentração de 1  $\mu$ M (IC<sub>50</sub> 9,2 nM) (Mårtensson et al. 2018). O 4-cloro- $\alpha$ - (1-metiletil)-N-2-tiazolilbenzenoacetamida (4-CMTB) é um agonista alostérico seletivo, com maior potência para FFA2 e interage com neutrófilos (LEE et al. 2008), com atividade semelhante em humanos e camundongos (Hudson et al. 2012).

O ligante AR420626, agonista seletivo para o receptor FFA3, teve papel supressor no desenvolvimento de tumor xenográfico na linhagem celular HepG2 (nas doses de 0,1-0,2 mg/kg/d) e inibiu a proliferação de células de hepatocarcinoma, através da indução de apoptose, via ativação do proteossoma e fosforilação de mTOR e, parcialmente pela regulação da expressão de TNF, por meio da inibição da via de sinalização HDAC, em concentrações entre 10 e 25  $\mu$ M (Mikami et al., 2020). O  $\beta$ -hidroxibutirato (BHB) é o único antagonista FFA3 descrito até o momento. Foi observado que após a administração de 500 mg/kg (via i.p.) desse composto, em camundongos FFA3<sup>-/-</sup>, a atividade do sistema nervoso simpático foi suprimida, indicando que esse receptor estaria envolvido na regulação do gasto energético corporal, promovendo a manutenção da homeostase metabólica. Em células HEK293 que expressam FFA3, esse antagonista suprimiu a ativação de ERK 1/2 induzida pelo acetato, de forma concentração-dependente e, inibiu a redução da produção de AMPc induzida por propionato, na concentração de 100 mM (I. Kimura et al. 2011). Entretanto, há evidências controversas que demonstraram um efeito agonista do BHB, considerando uma ação endógena gerada em condições

cetogênicas. Como exemplo, após a aplicação de 10 mM de BHB, foi observada uma rápida inibição de correntes de cálcio, enquanto a co-incubação com propionato não demonstrou diferença em relação ao propionato isolado (Won et al. 2013). Sugere-se que uma dieta cetogênica poderia beneficiar pacientes oncológicos, uma vez que o tratamento com BHB sob condições de privação de glicose, reduziu a proliferação de células de câncer de mama, MCF-7 e T47D, de maneira específica, sendo que a mesma suplementação aumentou a proliferação de células epiteliais mamárias MCF-10A (Maldonado et al. 2021).

## 2. Justificativa

O câncer de mama é um grave problema de saúde pública mundial, devido ao constante aumento das taxas de incidência, acrescido dos casos de recidiva tumoral ou de progressão da doença, com desenvolvimento de metástases. Apesar da evolução dos tratamentos oncológicos, principalmente com a introdução da terapia-alvo e imunoterapia, esse cenário reflete a baixa resposta terapêutica de alguns subtipos tumorais e a necessidade novas alternativas no enfrentamento da doença.

Segundo a revisão sistemática e metanálise de Farvid e colaboradores (2020), o alto consumo de fibras alimentares está associado à redução significativa do risco de câncer de mama (Farvid et al. 2020). A partir dessas fibras, bactérias intestinais produzem os SCFA que apresentam diversas propriedades biológicas e modulam os receptores FFA2 e FFA3 que, por sua vez, já demonstraram efeitos relevantes no câncer de mama.

De acordo com os achados farmacológicos e a necessidade do desenvolvimento de abordagens inovadoras para o tratamento e estadiamento do câncer de mama, justifica-se a realização do presente projeto, com o propósito de melhor compreender os efeitos dos ácidos graxos de cadeias curta neste tipo de tumor, através de abordagens *in vitro* e *in vivo* em um modelo murino de câncer de mama.

### 3. Objetivos

#### 3.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos de ligantes naturais e sintéticos dos receptores FFA2 e FFA3 em modelos *in vitro* e *in vivo* de câncer de mama.

#### 3.2 Objetivos específicos

- i. Analisar o efeito de ligantes naturais e sintéticos dos receptores FFA2 e FFA3 sobre a viabilidade e adesão celular das linhagens MCF-7, SK-BR-3 e MDA-MB-231 (adenocarcinoma mamário humano) e 4T1 (murino).
- ii. Avaliar o efeito de ligantes naturais dos receptores FFA2 e FFA3 sobre a morfologia, formação de colônias e migração de células de adenocarcinoma mamário humano e murino.
- iii. Avaliar o efeito da administração de ligantes naturais dos receptores FFA2 e FFA3 na progressão do câncer de mama metastático em camundongos.
- iv. Determinar os parâmetros comportamentais após a administração de ligantes naturais de ambos os receptores, em modelo de câncer de mama metastático em camundongos.
- v. Analisar os parâmetros hematológicos após a administração dos ligantes naturais FFA2 e FFA3 no modelo de câncer de mama metastático em camundongos.
- vi. Quantificar as metástases pulmonares no modelo de câncer de mama metastático em camundongos.



## Capítulo 2

*Manuscrito submetido ao periódico Pharmacological Research - Fator de Impacto 7,658*

Manuscript Number: YPHRS-D-22-01122

Short-chain fatty acids and their effects on in vitro and in vivo breast cancer models

Dear Dr. CAMPOS,

Your above referenced submission has been assigned a manuscript number: YPHRS-D-22-01122.

To track the status of your manuscript, please log in as an author at <https://www.editorialmanager.com/yphrs/>, and navigate to the "Submissions Being Processed" folder.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,  
Pharmacological Research

**Short-chain fatty acids and their effects on in vitro and in vivo breast cancer models**

Thaís C. Muradás<sup>1,2</sup>, Fábio Dal Moro Maito<sup>3,4</sup>, Maria M. Campos<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Escola de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>2</sup>Centro de Pesquisa em Toxicologia e Farmacologia, Escola de Ciências da Saúde e da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>3</sup>Curso de Graduação em Odontologia, Escola de Ciências da Saúde e da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>4</sup>Laboratório de Patologia Bucal, Escola de Ciências da Saúde e da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

**Corresponding Author:** Maria M. Campos, Escola de Ciências da Saúde e da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, Partenon, Porto Alegre, RS 90619-900, Brazil. E-mail: [maria.campos@pucrs.br](mailto:maria.campos@pucrs.br); [camposmmartha@yahoo.com](mailto:camposmmartha@yahoo.com)

## **Abstract**

The effects of short-chain fatty acids (SCFA) have been mostly explored in colorectal cancer, due to their production by intestinal microbiota. We evaluated the SCFA effects in both in vitro and in vivo breast cancer models. In vitro, the SCFA displayed contrasting effects on viability index, according to the evaluation of breast cancer cells with different phenotypes, namely human MCF-7, SK-BR-3, and MDA-MD-231; or the mouse 4T1 lineage. Acetate displayed minimal effects, at concentrations up to 100 mM. Alternatively, propionate increased or reduced cell viability, depending on the concentration. Butyrate and valerate showed consistent time- and concentration-dependent effects on the viability of human or mouse breast cancer cells. The selective FFA2 4-CMTB or FFA3 AR420626 receptor agonists failed to overtake the SCFA actions, except by modest inhibitory effects on MDA-MB-231 and 4T1 cell viability. The FFA2 CATPB or FFA3 and  $\beta$ -hydroxybutyrate receptor antagonists lacked any significant activity on human cell lines, although CATPB reduced 4T1 cell viability. Butyrate displayed significant effects on cell morphology, clonogenicity, and migration, according to the evaluation of MDA-MB-231 and 4T1 cells. A preliminary examination of in vivo oral effects of butyrate, propionate, or valerate, dosed in prophylactic or therapeutic regimens, on several parameters evaluated in an orthotopic mouse breast cancer model showed a reduction of lung metastasis in post-tumor induction butyrate-treated mice. Overall, the present results indicate that in vitro effects of SCFA did not rely on FFA2 or FFA3 receptor activation, and they were not mirrored in vivo, at least at the tested conditions.

**Keywords:** short-chain fatty acids; FFA2 and FFA3 receptors; breast cancer; in vitro; in vivo.

**Abbreviations:**

The area under the curve (AUC); Analysis of Variance (ANOVA); Estrogen receptor (ER); Free Fatty Acid Receptor 2 (FFA2); Free Fatty Acid Receptor 3 (FFA3); histone deacetylases (HDACs); human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2); Inhibitory Concentration 50% (IC<sub>50</sub>); Progesterone receptor (PR); Short-chain fatty acids (SCFA); triple-negative breast cancer (TNBC).

## 1. Introduction

Breast cancer represents the tumor type with the highest worldwide incidence, with an estimation of 2.3-million new detected cases [1]. Besides clinical evaluation, a breast cancer diagnosis is based on immunohistochemistry investigation, considering the positivity for hormone receptors (estrogen and progesterone, namely ER+ and PR+), the labeling for the human epidermal growth factor receptor 2 (denoted HER2+), or the percentage of Ki67-positive cells (Ki67+), as a marker of cell proliferation index. From this evaluation, breast cancer can be classified as luminal A (ER+ and/or PR+, HER2-, Ki67+ < 20%), luminal B (ER+ and/or PR < 20%, HER2-, Ki67+ ≥ 20%); HER2+ (ER-, PR-, and HER2 overexpressed) or triple-negative breast cancer (TNBC) (ER-, PR-, HER2-) [2,3]. As for the metastatic TNBC, the recurrence and the relative 5-year survival rates are inferior if compared with the other breast cancer subtypes at the metastatic stage, corresponding to 12% and 2.6 years, respectively [4,5]. Therefore, new therapeutic strategies are urgently required for the management of these cases.

Short-chain fatty acids (SCFA), such as acetate, propionate, and butyrate, represent a group of bacterial-derived active biomolecules, which exert their effects by activation of two G protein-coupled receptors, denoted as FFA2 (GPR43) and FFA3 (GPR41), also having the ability to modulate alternative cell targets, such as histone deacetylases (HDACs). They can also modify immune responses, including the modulation of regulatory T cells (Tregs), the maturation of dendritic cells, the production of anti- and pro-inflammatory cytokines by macrophages, besides the proliferation of plasma B cells [6,7]. Noteworthy, it has been postulated that changes in microbiota and SCFA contents might affect the risk and prognosis of breast cancer [8]. As suggested, SCFA might impact breast cancer outcomes positively or negatively, depending on the experimental paradigm [9]. When incubated in vitro, the SCFA butyrate and propionate

were able to reduce the proliferation of the ER+ MCF-7 breast cancer cells [10]. However, critical gaps remain to be solved concerning the role of SCFA in breast cancer. Therefore, the present study aimed to perform a comprehensive characterization of the in vitro effects of SCFA in different breast cancer cell subtypes compared with selective FFA2 and FFA3 receptor ligands. Special attempts have been made to analyze the SCFA actions on TNBC and metastatic tumors, either in vitro or in vivo.

## **2. Material and Methods**

### *2.1. Drugs and reagents*

The common reagents for the cell culture were purchased from Invitrogen™ (Carlsbad, California, USA). Sodium acetate, sodium butyrate, sodium propionate, valeric acid, sodium hydroxybutyrate, 4-Chloro- $\alpha$ -(1-methyl ethyl)-N-2-thiazolyl-benzene acetamide (4-CMTB), (S)-3-(2-(3-Chlorophenyl) acetamido)-4-(4-(trifluoromethyl)phenyl)butanoic acid (CATPB), and N-(2,5-Dichlorophenyl)-4-(furan-2-yl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydro-quinoline-3-carboxamide (AR420626) were acquired from Sigma-Aldrich (San Luis, Missouri, EUA). Stock solutions of ligands ( $\geq 1$  M) were prepared in phosphate-buffered saline (PBS) or dimethyl-sulfoxide (DMSO) and kept frozen until experiments. The final concentrations of DMSO never exceeded 0.5%.

### *2.2. Cell lines and general cell culture protocol*

The human breast cancer cell lines MCF-7 (ER+; BCRJ code: 0162), SK-BR-3 (HER2+; BCRJ code: 0226), MDA-MB-231 (TNBC; BCRJ code: 0164), and the mouse mammary gland cell line 4T1 (stage IV breast cancer; BCRJ code: 0022) were purchased from the Rio de Janeiro Cell Bank (BCRJ, Rio de Janeiro, Brazil). The cells were cultured

in RPMI 1640 medium with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% of penicillin-streptomycin, and 1% amphotericin B, kept at 37 °C under a minimum relative humidity of 95%, in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>.

### *2.3. Screening the SCFA effects on breast cancer cell viability*

As a first approach, the effects of incubation with the SCFA, namely acetate, propionate, butyrate, or valerate, were evaluated on the viability of different human and mouse breast cancer cell lines, at a range of concentrations varying from 0.1 to 300 mM, depending on the compound. Briefly, the cells were seeded in triplicate, at a density of  $6-8 \times 10^3$ /well, in 96-well plates. Following 24-h for allowing attachment, the cells were incubated with log-based increasing concentrations of each SCFA, for different intervals of time: 24 h, 48 h, and 96 h. The cell viability was assessed by a 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay [11]. The results were analyzed on a spectrophotometer (Spectramax M2, Molecular Devices, CA, USA) at 595 nm, and expressed as the percentage of control, of 2-3 independent experiments.

### *2.4. In vitro effects of selective FFA2 and FFA3 ligands*

The effects of SCFA on cell viability were compared with those displayed by the selective FFA2 and FFA3 agonists 4-CMTB (0.3 to 30 μM) and AR420626 (0.1 to 30 μM), or the FFA2 and FFA3 antagonists CATPB (0.1 to 30 μM) and β-hydroxybutyrate (1 to 30 mM), respectively. The MTT assay was performed as described above, over 24 h, 48 h, or 96 h incubation with the selective ligands, according to the assessment of human MCF-7, SK-BR-3, and MDA-MB-231, or the mouse 4T1 breast cancer cell lineages. The range of concentrations for the FFA2 and FFA3 ligands was based on previous literature data [12–14].

### *2.5. In vitro SCFA combination assays*

In an attempt to reproduce the actions of microbiota-derived SCFA, the effects of a combination of acetate (12 mM), propionate (5 mM) plus butyrate (3 M), or propionate plus valerate (both at 1 mM), were evaluated on the MTT viability assay, conducted with the human MCF-7, SK-BR-3, and MDA-MB-231 or the mouse 4T1 breast cancer cells, after 48 h of incubation. The concentrations for this assay were chosen based on a prior publication [15] or based on the screening data of this study.

### *2.6. SCFA and changes of cell morphology*

From the concentration-response experiments on cell viability, three SCFA, namely butyrate, propionate, or valerate, were assessed at the concentration of 10 mM regarding the cell morphology changes. For this purpose, the human TNBC MDA-MB-231, or the metastatic mouse 4T1 breast cancer cell lineages were plated at  $2 \times 10^5$ /well, in 24-well plates, in triplicate. After allowing 40-50% confluence, the medium was renewed and the cells were exposed to each SCFA, for 48 h. At the end of treatment, the cell morphology was registered using an inverted microscope coupled to a computer (Nikon, ECLIPSE Ts2, Melville, NY, USA). Five fields per well, from three independent experiments, were captured. The cell perimeter and area were determined as described before [16], with adaptations. The cell polarity was calculated as the major migration axis length divided by the perpendicular axis length intersecting the nucleus, according to Lamers et al. (2011) [17]. For all measures, data are expressed as the percentage of control.

### *2.7. Effects of SCFA on breast cancer cell adhesion*

For this protocol, the methodology described by Li et al. (2014) [18] was adopted. Briefly, 96-well plates were coated with 0.1% gelatin overnight. The human MDA-MB-



231 or the mouse 4T1 breast cancer cells were treated with butyrate, propionate, or valerate (3, 10, and 30 mM). The FFA2 agonist 4-CMTB (3, 10, and 30  $\mu$ M) was evaluated in a separate experimental set, for comparison purposes. After 48 h of ligand incubation, the cells were seeded (at  $2 \times 10^5$ /well) and incubated for one-h to allow adhesion. The non-adherent cells were removed by PBS washing, and 200  $\mu$ l of 0.05% MTT solution/well was added. The reaction was stopped by adding 100  $\mu$ l of DMSO. The results were read on a spectrophotometer (Spectramax M2, Molecular Devices, CA, USA) at 595 nm, and expressed as the percentage of control of at least four independent experiments.

### 2.8. Clonogenic assay

As a next step, we assessed the effects of SCFA on the efficiency of colony formation of the human MDA-MB-231 or the mouse 4T1 breast cancer cells. For this purpose, the cells were seeded in 24-well plates, at a density of  $5 \times 10^4$  cells/well, in duplicate. After allowing attachment, the cells were incubated with butyrate, propionate, or valerate (3, 10, and 30 mM). After 48 h, the cells were re-plated on a density of  $1 \times 10^2$  in 6-well plates. Ten days later, the cells were fixed in 10% formaldehyde solution for 30 min and stained with 0.5% crystal violet for a further 30 min period. After capturing images at x200 magnification (Zeiss AxioImager M2 light microscope, Carl Zeiss, Germany), the mean number of colonies (as a percentage of control) and the survival fraction were determined from three independent experiments [19].

### 2.9. Scratching assay

The ability of SCFA in altering cell migration was analyzed as described by Amaral et al. [11], with adaptations. The human MDA-MB-231 or the mouse 4T1 cells were seeded in 24-well plates ( $1.25$ - $2.5 \times 10^5$  cells/well; in triplicate) and allowed to reach

80-90% confluence. A wound gap in a cell monolayer was created by scratching, using a 200- $\mu$ l pipette tip. After a PBS washing and medium renewal, the cells were treated with butyrate, propionate, or valerate (at 10 mM). The cell migration was documented at 0, 3, 6, 12, 24, and 48 h, under an inverted microscope coupled to a computer, under x4 magnification (Nikon, ECLIPSE Ts2, Melville, NY, USA). The cell uncovered area from three independent experiments was calculated by using NIH Image J 1.52a Software (NIH, Bethesda, MD, USA), and expressed as the percentage of control.

### 2.10. *Animals and ethics*

For in vivo experiments, female Balb/CJ mice (14–18 g; 2-months old; N=3-4/group) were obtained from the Center for Experimental Biological Models (PUCRS; CeMBE, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil). Mice were maintained in microisolators, equipped with inlet/outlet air filters, under controlled temperature ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) and humidity (50% - 70%), and a light-dark cycle of 12 h (lights on at 7 AM, lights off at 7 PM). Cages were filled with autoclaved wood chip bedding and animals received pelleted feed and sterile water *ad libitum*.

The procedures followed the current Brazilian guidelines for the care and use of animals for scientific and didactic procedures, from the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA, Brazil). The local Animal Ethics Committee approved the protocols (PUCRS/CEUA 9011).

### 2.11. *In vivo treatments with SCFA*

Two different protocols of treatment were adopted. In the first protocol, the tumor was induced and the treatment with the SCFA, butyrate (600 mg/kg/day), or propionate (75 mg/kg/day), was given orally, from day fourteen after tumor inoculation, continuing

until the day before euthanasia (day twenty-nine; Supplementary Fig. S2A), completing 15 days of treatment. In the second protocol, the SCFA, namely, butyrate (600 mg/kg/day), propionate (75 mg/kg/day), or valerate (0.3 mg/kg/day) were administered orally for 21 days, until tumor injection. The treatment lasted for an additional period of 28 days, finishing the day before euthanasia, totaling 48 days of treatment (Fig. 8A). In both protocols, the control animals received the vehicle at the same schedules of treatment (0.9% NaCl; 10 ml/kg). The doses of SCFA were selected from previous publications [20–22].

### *2.12. Orthotopic mammary tumor model and overall assessments*

The model was accomplished as described by Khadge et al. [23]. For the tumor induction, the animals were previously anesthetized by a mixture of xylazine (10 mg/kg) and ketamine (100 mg/kg). The mouse 4T1 breast cancer cells were cultured as described above, and 100  $\mu$ l of PBS containing  $1 \times 10^6$  cells were injected into the 10<sup>th</sup> mammary fat pad. The negative tumor-free control group received 100  $\mu$ l of PBS at the same anatomical site. The body weight variation (in g), the tumor volume (in mm<sup>3</sup>; tumor length x tumor width x tumor width/2), and the survival rates were recorded at different time points. The general locomotor activity of the animals was measured by using an automated open-field system (46 x 46 x 36 cm) equipped with infrared sensors. After 1-min adaptation, the ambulatory movement, rearing, traveled distance (cm), and speed (mm/s) were evaluated for 5 min [24].

On the day after behavioral analysis, mice were euthanized by 4-5% isoflurane inhalation, and tissue samples and blood were collected. The blood was used for the evaluation of hematocrit and neutrophil-lymphocyte ratio (NLR), as previously described [24]. Besides tumor-free carcass and tumor weight assessment, brain, colon, left femur,

kidneys, liver, lungs, and spleen were harvested and weighted (in g). The lungs were also photographed for gross analysis of metastasis.

### *2.13. Histological analysis of breast tumors and lung metastasis*

After weighing the tumor and lungs, the samples were fixed in 10%-formaldehyde solution and submitted to conventional histological processing. Five- $\mu$ m sections were stained with hematoxylin-eosin. Histological images were captured in a Zeiss AxioImager M2 light microscope (Carl Zeiss, Gottingen, Germany) under x200 magnification. An experienced pathologist (F.D.M.M.) blinded to the experimental groups analyzed the number of lung metastasis [25] and tumor necrosis areas [26].

### *2.14. Statistical analysis*

Data are expressed as the mean  $\pm$  the standard error mean (SEM) or the median accompanied by the interquartile intervals and maximal and minimum values. The statistical analysis of in vitro data was performed by one-way (treatment as the outcome) or two-way (treatment and time as variables) analysis of variance (ANOVA), followed by Dunnett's posthoc test, except for the comparison between two groups, when an unpaired Student t-test was used. For in vivo studies, the statistical analysis was accomplished by one-way (for treatment only) or repeated-measures (effects of treatment along the time) ANOVA, followed by Tukey's posthoc test. In some cases, the areas under the curve (AUC) were calculated. The survival rates were analyzed by the Log-rank test for trend. The inhibitory concentration of 50% (IC<sub>50</sub>) and the corresponding intervals of confidence were calculated using the function [Inhibitor] vs. normalized response. P values less than 0.05 were considered as indicative of significance. The graphs and statistical analysis were built with the GraphPad Software Prism 9.3.1 for Windows (GraphPad Software; San Diego, California, USA).

### **3. Results**

#### *3.1. Effects of SCFA on breast cancer cell viability*

As for acetate (0.1 to 300 mM), only the non-physiological concentration of 300 mM consistently reduced the cell viability of all the tested human cell lines, namely MCF-7, SK-BR-3, and MDA-MB-231, irrespective of the time of incubation (Fig. 1A-C). In this case, acetate presented inhibitory rates higher than 90% for the three cell lines at 96 h. In addition, this SCFA displayed a significant inhibitory effect on the MCF-7 cell viability, at 100 mM, at 48 h, and 96 h (Fig. 1A). Despite 100 mM acetate did not show any evident effect on SK-BR-3 cell viability (Fig. 1B), it significantly reduced the viability of MDA-MB-231 cells at 96 h (Fig. 1C). For the mouse invasive 4T1 breast cancer cells, acetate displayed significant inhibitory effects, when tested at the concentrations of 3, 10, and 30 mM, with maximal inhibitions close to 20%, independent of the time-point (Fig. 3A).

Considering propionate, it produced a significant increase in cell viability, according to the assessment of MCF-7, SK-BR-3, and MDA-MB-231 cell lines, when tested at 1 mM and 96 h of incubation. Conversely, when incubated at 10 and 30 mM, propionate was able to significantly decrease the viability percentages of the three human cell lines, at 96 h. At this time interval and 30-mM concentration, the maximal percentages of inhibition were 58%, 85%, and 48%, for MCF-7, SK-BR-3, MDA-MB-231 cells, respectively. For 24 h and 48 h, there was a significant reduction of MCF-7 viability, from 3 to 30 mM (Fig. 1D-F). Regardless of the tested time, propionate also lessened the viability of the mouse 4T1 cells, at the concentrations of 10 and 30 mM (Fig. 3B).

The SCFA butyrate caused a significant reduction of cell viability at 96 h when tested at 10 and 30 mM, regardless of the evaluated human breast cancer cell lineage,

with inhibition percentages around 50% for the higher concentration. For the SK-BR-3 and MDA-MB-231 cells, butyrate displayed significant inhibitory effects at the 3 mM concentration and 96 h of incubation. For the MCF-7 cell line, butyrate also produced significant inhibitory actions at 24 h and 48 h of treatment, at both 10 and 30 mM (Fig. 1G-I). Noteworthy, butyrate caused a marked reduction of the mouse 4T1 cell viability, at 3, 10, and 30 mM, from 24 h to 96 h of treatment (Fig. 3C). For this cell line, the maximal percentage of inhibition was observed at 30 mM and 48 h (about 80%). For 48 h, the estimated mean  $IC_{50}$  value (in mM; accompanied by the confidence intervals) was 7.3 (ranging from 5.9 to 8.9).

The exposure of MCF-7, SK-BR-3, and MDA-MB-231 human breast cancer cell lines to valerate produced a significant concentration- and time-dependent blocking of cell viability, with maximal inhibitions > 90%, at 30-mM concentration and 96 h of treatment. For this SCFA, we have also tested the concentration of 15 mM, which reduced the viability of MCF-7, SK-BR-3, and MDA-MB-231 cells by 78%, 38%, and 73%, respectively. At lower concentrations (0.3 to 10 mM), valerate also displayed significant inhibitory effects on MCF-7 cell viability (Fig. 1J-L). For the mouse cell line 4T1, valerate was able to significantly reduce the viability indexes at 3, 10, and 30 mM, irrespective of the time of treatment (Fig. 3D). As for valerate, the calculated  $IC_{50}$  (mM, with confidence intervals) was 9.6 (varying from 6.8 to 13.7), for the time-point of 48 h.

We also tested whether the combination of the three microbiota-derived SCFA acetate (12 mM), propionate (5 mM), and butyrate (3 mM), totaling 20 mM when combined, might produce synergistic inhibitory effects, on the viability of human or mouse cell lines, namely MCF-7 (Supplementary Fig. S1A), SK-BR-3 (Supplementary Fig. S1B), MDA-MB-231 (Supplementary Fig. S1C), or 4T1 (Supplementary Fig. S1D). Data showed a trend toward a synergistic action for this combination protocol on mouse

4T1 cell viability, but without statistical significance. A combination of valerate plus propionate (both at 1 mM) was also analyzed, but it failed to produce any significant effect in either the human MDA-MB-231 (Supplementary Fig. S1E) or the mouse 4T1 (Supplementary Fig. S1F) cells.

### 3.2. Selective FFA2 or FFA3 ligands and cell viability

Considering the ability of SCFA to activate FFA2 and FFA3 receptors, we performed a separate series of experiments to assess the effects of selective ligands, for purposes of comparison. The selective FFA2 agonist 4-CMTB was able to significantly reduce the viability of the human MDA-MB-231 cell line, at concentrations varying from 0.3 to 30  $\mu$ M, except for 3  $\mu$ M. For this cell line, the maximal inhibition was observed at 96 h, with a 30- $\mu$ M concentration (around 20%) (Fig. 2C). For the SK-BR-3 lineage, 4-CMTB produced significant inhibitory effects on cell viability at 96 h, without a clear concentration-related effect (Fig. 2B). The incubation of 4-CMTB failed to significantly alter the viability of the human MCF-7 (Fig. 2A) or the mouse 4T1 cell lines (Fig. 3E). Concerning the FFA2 antagonist CATPB, it failed to significantly modify the viability of any tested human breast cancer cell line (Fig. 2D-F), although this antagonist significantly reduced the mouse 4T1 cell viability, in concentrations ranging from 3 to 30  $\mu$ M (Fig. 3F). For this latter cell lineage, the percentages of inhibition with CATPB did not exceed 30%, irrespective of concentration or time of incubation.

For the selective FFA3 agonist AR420626 (0.1 to 30  $\mu$ M), it produced only a mild inhibition of MCF-7 cell viability (at 10  $\mu$ M; 24 h), without any additional significant differences regarding the other human breast cancer cell lines (Fig. 2G-I). Alternatively, AR420626 displayed significant blocking effects on the viability of mouse 4T1 cells, at 3, 10, and 30  $\mu$ M, mainly at 24 h of incubation, with  $\approx$ 20% of reduction (Fig. 3G). The

FFA3 antagonist  $\beta$ -hydroxybutyrate (1 to 30 mM) did not elicit any significant alteration of human (Fig. 2J-L) or mouse (Fig. 3H) breast cancer cell viability.

### 3.3. *In vitro* assessment of breast cancer cell invasiveness

Considering the low efficacy of acetate, this SCFA was not further tested in the present study. The selected SCFA butyrate, propionate, and valerate were assessed in a battery of *in vitro* assays related to invasion, adhesion, clonogenicity, and migration of the human TNBC MDA-MB-231 or the metastatic mouse 4T1 cell lines. Data depicted in Fig. 4 show that butyrate (10 mM) triggered a significant increase of MDA-MB-231 cell perimeter (panel A) and area (panel C), without modifying the cell polarity index (panel E). As for the mouse 4T1 cell lineage, butyrate also led to a significant increase of cell perimeter (Fig. 4B). The 4T1 cell areas were significantly higher in butyrate- and valerate-treated groups (both at 10 mM), with a trend toward elevation for propionate treatment (10 mM;  $P = 0.06$ ) (Fig. 4D). Finally, propionate also induced a significant increase of cell polarity in mouse 4T1 cells (Fig. 4D). It was not possible to determine the 4T1 cell polarity in butyrate- and valerate groups due to the observed morphological alterations. Representative images show the morphology of human MDA-MB-231 (Fig. 4G) and mouse 4T1 (Fig. 4H) cells, throughout the different experimental groups.

As for cell adhesion, valerate (30 mM) reduced this parameter, according to the evaluation of human MDA-MB-231 cells (Fig. 5A), whereas this same SCFA (at 3 mM) induced a significant increase in mouse 4T1 cell adhesion (Fig. 5C). There were no significant alterations of cell adhesion for butyrate or propionate (both tested at 3 to 30 mM), in either MDA-MB-231 or 4T1 cells (Fig. 5A, C). Considering that 4-CMTB elicited significant effects on MDA-MB-231 cell viability, it was also examined in the cell adhesion assay (3 to 30  $\mu$ M). However, this FFA2 agonist failed to significantly affect



the cell adhesion of either cell line (Fig. 5A, C). Representative photographs regarding the cell adhesion assay are provided in Fig. 5B and Fig. 5D, for MDA-MB-231 or 4T1 cells, respectively.

The capacity of forming colonies is a truly relevant feature of tumor cells. In the present study, butyrate triggered a significant inhibition of colony counts at the concentration of 10 and 30 mM, as for human and mouse breast cancer cell lines, namely MDA-MB-231 (Fig. 6A) and 4T1 (Fig. 6D), respectively. The incubation with propionate (3 to 30 mM) significantly diminished the colony numbers of the human MDA-MB-231 (Fig. 6A), but not the mouse 4T1 (Fig. 6D) cell line. The incubation with valerate (30 mM) also produced a significant reduction of colony numbers, for both tested cell lines (Fig. 6A, D). The inhibitory actions of SCFA on clonogenicity were confirmed by the calculation of survival fractions, for MDA-MB-231 (Fig. 6B) and 4T1 (Fig. 6E) cell lineages. Representative images showing the ability of SCFA to impair the clonogenicity of human TNBC MDA-MB-231 or the metastatic mouse 4T1 cells are provided in Fig. 6C and Fig. 6F, correspondingly.

The classical scratching assay was used to verify whether the SCFA might prevent the migration capability of MDA-MB-231 (Fig. 7A) and 4T1 (Fig. 7C) cells. Data showed that the cell gap was completely closed, irrespective of the experimental group at 48 h. For the remaining evaluated time-points (3 to 24 h), there was a mild significant inhibition of cell migration for butyrate (10 mM), regarding the mouse 4T1 cell line. No further significant effects were observed for butyrate, propionate, or valerate (all at 10 mM), in either cell lineage. Representative images for cell migration assay are provided in Fig. 7B and Fig. 7D, for the human MDA-MB-231 and the mouse 4T1 cells, respectively.

#### *3.4. In vivo assessment of SCFA effects in a mouse model of metastatic breast cancer*

Based on *in vitro* data, we decided to investigate to what extent the SCFA administration might prevent tumor invasion and metastasis, in an orthotopic model of mammary cancer induced by inoculation of 4T1 cells in female Balb/CJ mice. Firstly, we tested the effects of oral administration of butyrate (600 mg/kg) and propionate (75 mg/kg) in a therapeutic scheme of administration, dosed from day 14 to day 29 after tumor inoculation (Supplementary Figure S2A). Surprisingly, none of the tested parameters were significantly altered by either butyrate or propionate treatment (Supplementary Fig. S2B-V), despite a significant reduction in the number of lung metastasis in butyrate-treated animals (panels F and G). Considering that diet and microbiota features might influence cancer progression on a long-term basis, we decided to evaluate a preventive protocol of treatment, in which valerate (0.3 mg/kg), in addition to butyrate (600 mg/kg) and propionate (75 mg/kg), were dosed daily, beginning 21 days before the cell tumor inoculation, lasting for further 28 days, totaling 49 days of treatment (Fig. 8A). Again, the SCFA treatment failed to significantly modify the bodyweight measures, tumor or vital organ weight changes, behavioral tasks, hematological analysis, increase in tumor volume, lung metastasis, or survival rates (Fig. 8B-Y).

#### **4. Discussion and Conclusions**

The modulation of the immune system through SCFA and gut microbiota in cancer patients represents a promising strategy in cancer management [7]. Several studies have shown that SCFA affect cancer progression through different mechanisms [10, 27, 31, 33, 34]. However, studies on the impact of SCFA on breast cancer are superficial and its role remains unclear. Therefore, this study evaluated the effects of SCFA on breast cancer cells from different molecular subtypes and *in vivo*, using a mouse metastatic breast cancer model.

The SCFA propionate, butyrate, and valerate demonstrated antitumoral effects in the *in vitro* screening. On the other hand, the selective FFA2 and FFA3 ligands, besides acetate, displayed modest outcomes. Initially, we observed different responses on cell viability after treatment with propionate, butyrate, and valerate according to the cell line and these discrepancies might be due to mechanisms independent of the FFA2 and FFA3 receptors, such as the HDAC inhibitory capacity of each ligand. Among the SCFA, butyrate presented the higher efficacy [35, 36]. Our data demonstrated that treatment with acetate promoted an all-or-none pharmacological effect in human breast cancer cell lines, and concentration-dependent actions on the 4T1 mouse cell line. In gastric adenocarcinoma epithelial cell line high concentrations of acetate induced cytotoxicity, DNA fragmentation and displayed enhanced pro-inflammatory cytokines release [37].

We observed a reduction of cell viability in MDA-MB-231, SK-BR-3, and 4T1 cells when treated with the FFA2 selective synthetic agonist, 4-CMTB, but this was not observed regarding the MCF-7 cells. Previous data demonstrated that propionate treatment increased CDH1 and reduced cell proliferation through the inhibition of the ERK1/2 pathway in MDA-MB-231, triple-negative breast cancer cells, but not in the epithelial-like cells (MCF-7, luminal; or BT-474, HER2+), when the FFA2 receptor is overexpressed [38]. FFA2 is highly expressed in breast cancer cell lines compared to FFA3 [27, 39] and the invasive and triple-negative breast carcinoma tissue samples revealed that FFA3 and FFA2 expression are reduced compared to normal breast tissue samples [38]. Interestingly, CATPB, as well as other selective ligands, generally did not produce antitumor effects in breast cancer cell lines, strongly indicating that the target of these agonists might be through other mechanisms independent of FFA2 and FFA3 receptors in this breast cancer cell lines.

Morphological changes in the cells were observed after propionate, butyrate, and valerate treatments. The MDA-MB-231 cells exhibited a flattened appearance and increased size, suggesting a senescence phenotype, as observed by El Hasasna et al., after propionate exposure [40]. Moreover, butyrate and valerate treatments altered the morphology of the MDA-MB-231 and 4T1 cells, developing numerous membrane extensions. This morphology shift could suggest a dendritic process, such as observed in breast cancer cells exposed to maternal embryonic leucine-zipper kinase (MELK) inhibitor, OTSSP167 [41]. The MELK gene expression is upregulated in breast stem cells and undifferentiated tumors, classified as an indicator parameter of poor prognosis, and treatment resistance; to suggest that inhibition of this gene might be promising in the breast cancer control. A similar effect was found by Semaan et al., when MCF-7 cells were exposed to propionate or butyrate treatments was observed a post-mitotic neuron-like differentiation morphology indicating differentiated phenotype and reduce of malignant characteristics [10]. Curiously, the same SCFA induced growth arrest and differentiation of human colon cancer cells associated with histone hyperacetylation [42]. In addition, 4T1 cells displayed the same features after propionate treatment, and only butyrate increased the cell size of both cell lines.

As for the cell adhesion analyses, we observed that valerate treatment altered this feature in MDA-MB-231 cell line. This could be somewhat involved with the dendritic morphology, due to the high immunoreactivity for vascular cellular adhesion molecule (VCAM-1) detected in clinically aggressive lymphnode sarcoma cells with the same morphology [43]. In addition, cancer stem cells subpopulation of MDA-MB-231 cells might be transdifferentiated into different phenotypes and morphologies after undergoing cellular damage modifying its self-renewal capacity to survival mechanism [44]. Notwithstanding, SCFA butyrate has an effect namely “butyrate paradox”, which portrays

the cellular response to be dependent on the level of cellular differentiation to define tumor progression [45].

The effects of treatment with butyrate, propionate, and valerate on the reduction of clonogenic capacity and survival fraction were more pronounced in human breast cancer cells. As for the mouse cell line, the formation of new colonies capacity and survival fraction was more sensitive to butyrate and valerate only at the highest concentration tested. Likewise, Shi et al. showed that the valerate treatment suppressed the colony formation capacity of human breast cancer cell lines with a regular drug renewal [30]. Butyrate treatment in colon cancer cell lines sensitive to HDAC inhibitors reduced colony formation compared to cell lines resistant to the same inhibitors [46]. Furthermore, in Ewing sarcoma cell lines, the co-treatment of butyrate with zoledronic acid and/or chemotherapeutic agents strongly suppressed the survival fraction and mean size of the colonies [47].

The SCFA demonstrated the ability to suppress or inhibit cell migration and proliferation. These effects were observed after butyrate treatments in bladder and metastatic colorectal cancer cell lines [31–33], and the same effects were observed in human breast cancer cell lines after valerate treatment in a concentration- and time-dependent manner mediated by reduced HDAC activity [30]. Interestingly, we observed for 24 h a significant inhibitory effect regarding cell migration in the 4T1 cell line subjected to butyrate treatment, supporting the data found after treatment with the same ligand in the measurements of cell viability and colony formation.

Considering the results obtained from in vitro screening, ligands with better antitumor effects were selected to be evaluated in metastatic breast cancer model and the doses were defined based on previous studies that observed beneficial effects of selected SCFA. Firstly, butyrate modulated blood glucose homeostasis and glycogen metabolism

in diabetic animals [21], followed by propionate played a neuroprotective role in epilepsy model [20], and finally, valerate promoted radioprotection in irradiated mice [22]. Herein, the positive cellular effects produce by these SCFA were not reproduced in the systemic treatments in the orthotopic breast cancer model. Although daily oral administration of the butyrate therapeutic scheme reduced the lung metastases number in mice, the sample size was limited, and the results are preliminary. Furthermore, this treatment might have affected the metastases considering a physiological development with fewer cells, unlike primary tumors that expanded fastly due to a large amount of necrosis observed in the histological analysis through the intense proliferation of tumor cells without interaction with the host. Regarding other SCFA, recent data demonstrated that the antitumor effects of propionate in xenographic breast cancer models in mice, by implantation of JIMT-1 or MCF7 cells, inhibit tumor growth, through the inhibition of STAT3, p38 activation, and stimulation of ROS generation [27].

Currently, the SCFA have been described as modulators involved in the tumor microenvironment and tumor immunosuppressive therapy [34]. A recent study demonstrated that valerate and butyrate treatments, in safe concentrations, induced high immunostimulatory and antitumor effects of cytotoxic T lymphocytes (CTLs) and chimeric antigen receptor (CAR) T cells in syngeneic murine melanoma and pancreatic cancer models [29]. In this context, the induce of high systemic levels of butyrate and propionate in mice and patients are affect the antitumor activity of anti-CTLA-4 impairing the expansion of memory T cells and antigen-specific T lymphocytes [28]. These data, added to our study, suggest that the relationship between microbiota derived-SCFA and immune cells are essential in the involvement of the tumor microenvironment.

Antitumor effects of treatment with cisplatin combined with probiotic *Lactobacillus acidophilus*-based increased survival rate and improved inflammatory

profile in the Lewis lung cancer mouse model [48]. *Lactobacillus acidophilus* is a probiotic microorganism that produces SCFA, primarily acetate, propionate, and butyrate, through fiber food fermentation and modulates the gut microbiome [49]. Recent data suggest that the cumulative effect of butyrate and valerate can increase the capacity of SCFA on inhibition of HDACs, known to be a promising and potent target for antitumor therapy [50]. Despite the nutritional recommendation for the consumption of dietary fiber in order to reduce inflammation and be able to prolong the survival of breast cancer patients, in addition to the application of butyrate already existing in clinical trials, alternative strategies for the management of triple-negative tumors and high aggressiveness need to be improved urgently [7].

In summary, we demonstrate in this study, that the assessment of the natural ligand, butyrate showed a significant decrease of malignancy capacity across multiple analyzes against MDA-MB-231 and 4T1 cells. These anti-tumor effects are probably via mechanisms independent of FFA2 or FFA3 receptor activation, including HDAC inhibition. While SCFA did not produce significant beneficial effects in the metastatic breast cancer model, there was a reduction in lung metastases in the therapeutic scheme with butyrate, according to the evaluation of these preliminary results. It is indicated that SCFA butyrate, mainly, might be related to the progression and development of highly invasive breast cancer, and, for this, the discovery of a mechanism that mediates its beneficial effects is necessary to support the development of a promising management strategy for this tumor type.

#### **CRedit authorship contribution statement**

**Thaís C. Muradás:** Investigation, Data Curation, Visualization, Formal Analysis, Writing- Original draft preparation, Writing- Reviewing and Editing. **Fábio D. M.**

**Maito:** Visualization, Investigation, Formal Analysis, Writing- Reviewing and Editing.

**Maria M. Campos:** Conceptualization, Supervision, Validation, Formal Analysis, Resources, Funding Acquisition, Writing- Original draft preparation, Writing- Reviewing and Editing.

### **Conflict of interest**

The authors declare no competing interests.

### **Acknowledgments**

This study was financed by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES; Financial Code 001), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). T.C.M. is a PhD student receiving grants from CAPES. M.M.C. (CNPq 304042/2018-8) is a Research Career Awardee of CNPq. We would like to thank Willian Leitão Pereira for him technical assistance in histological processing and Raquel Dal Sasso Freitas, PhD for her valuable technical skill and teachings related to animal experiments

### **References**

- [1] H. Sung, J. Ferlay, R.L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, F. Bray, Global Cancer Statistics 2020 : GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries, 71 (2021) 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- [2] A. Goldhirsch, E.P. Winer, A.S. Coates, R.D. Gelber, B. Thürlimann, H.S. Panel, Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St



- Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013, (2013) 2206–2223. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdt303>.
- [3] Surveillance, Epidemiology, and End Results Program (SEER), Cancer Stat Facts: Female Breast Cancer Subtypes At a Glance Survival Statistics New Cases, (2021). <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast-subtypes.html> (accessed December 4, 2021).
- [4] R. Dent, M. Trudeau, K.I. Pritchard, W.M. Hanna, H.K. Kahn, C.A. Sawka, L.A. Lickley, E. Rawlinson, P. Sun, S.A. Narod, Triple-negative breast cancer: Clinical features and patterns of recurrence, *Clin. Cancer Res.* 13 (2007) 4429–4434. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-3045>.
- [5] American Cancer Society, Triple-negative Breast Cancer, (2021). <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/about/types-of-breast-cancer/triple-negative.html> (accessed December 4, 2021).
- [6] G. Milligan, B. Shimpukade, T. Ulven, B.D. Hudson, Complex Pharmacology of Free Fatty Acid Receptors, (2017). <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00056>.
- [7] R. Mirzaei, A. Afaghi, S. Babakhani, M.R. Sohrabi, S.R. Hosseini-Fard, K. Babolhavaeji, S. Khani Ali Akbari, R. Yousefimashouf, S. Karampoor, Role of microbiota-derived short-chain fatty acids in cancer development and prevention, *Biomed. Pharmacother.* 139 (2021) 111619. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111619>.
- [8] D.A. Costa, J.G. Nobre, M.V. Batista, C. Ribeiro, C. Calle, A. Cortes, M. Marhold, I. Negreiros, P. Borralho. M. Brito, J. Cortes, S.A. Braga, L. Costa, Human Microbiota and Breast Cancer - Is There Any Relevant Link ? - A Literature Review and New Horizons Toward Personalised Medicine, *Frontiers in microbiology.* 12, 584332 (2021). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.584332>.

- [9] E. Mikó, T. Kovács, É. Sebő, J. Tóth, T. Csonka, G. Ujlaki, A. Sipos, J. Szabó, G. Méhes, P. Bai, Microbiome-Microbial Metabolome-Cancer Cell Interactions in Breast Cancer-Familiar, but Unexplored, *Cells*, 8(4), 293 (2019) 1–33. <https://doi.org/10.3390/cells8040293>.
- [10] J. Semaan, S. El, H. José, N. Ibrahim, R. Safi, A. Ardzivian, C. El Boustany, Comparative effect of sodium butyrate and sodium propionate on proliferation, cell cycle and apoptosis in human breast cancer cells MCF-7, *Breast Cancer*. (2020). <https://doi.org/10.1007/s12282-020-01063-6>.
- [11] M.E.A. Amaral, L.R. Nery, C.E. Leite, W. Filgueira, D.A. Junior, M.M. Campos, Pre-clinical effects of metformin and aspirin on the cell lines of different breast cancer subtypes, *Investigational new drugs*. 36(5), (2018) 782–796. <https://doi.org/10.1007/s10637-018-0568-y>
- [12] S.K. Shukla, T. Gebregiworgis, V. Purohit, N. V Chaika, V. Gunda, P. Radhakrishnan, K. Mehla, I.I. Pipinos, R. Powers, F. Yu, P.K. Singh, Metabolic reprogramming induced by ketone bodies diminishes pancreatic cancer cachexia, *Cancer & metabolism*. 2 (18) (2014) 1–19. <https://doi.org/10.1186/2049-3002-2-18>.
- [13] E. Lorza-Gil, G. Kaiser, E.R. Ulven, G.M. König, F. Gerst, M.B. Oquendo, A.L. Birkenfeld, H.U. Häring, E. Kostenis, T. Ulven, S. Ullrich, FFA2 -, but not FFA3 - agonists inhibit GSIS of human pseudoislets : a comparative study with mouse islets and rat INS - 1E cells, *Sci. Rep.* (2020) 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73467-5>.
- [14] D. Mikami, M. Kobayashi, J. Uwada, T. Yazawa, K. Kamiyama, K. Nishimori, Y. Nishikawa, S. Nishikawa, S. Yokoi, T. Taniguchi, M. Iwano, AR420626, a selective agonist of GPR41/FFA3, suppresses growth of hepatocellular carcinoma cells by inducing apoptosis via HDAC inhibition, *Therapeutic advances in medical oncology*.

- 12 (2020) 1–13. <https://doi.org/10.1177/1758835920913432>
- [15] K. Zhan, X. Gong, Y. Chen, M. Jiang, T. Yang, G. Zhao, Short-chain fatty acids regulate the immune responses via G protein-coupled receptor 41 in bovine rumen epithelial cells, *Front. Immunol.* 10 (2019) 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02042>.
- [16] A. Radaic, N.E. Joo, S. Jeong, S. Yoo, N. Kotov, Y.L. Kapila, Phosphatidylserine-Gold Nanoparticles (PS-AuNP) Induce Prostate and Breast Cancer Cell Apoptosis, *Pharmaceutics*. 13(7), (2021) 1–18. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13071094>
- [17] M.L. Lamers, M.E. Almeida, M. Vicente-Manzanares, A.F. Horwitz, M.F. Santos, High Glucose-Mediated Oxidative Stress Impairs Cell Migration, *Plos One*. 6(8), (2011) 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022865>.
- [18] J. Li, D. Qiu, S. Chen, S. Cao, X. Xia, Suppression of Human Breast Cancer Cell Metastasis by Coptisine in Vitro, *Asian Pac J Cancer Prev*. 15 (14), (2014) 5747–5751. <http://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.14.5747>.
- [19] N.A.P. Franken, H.M. Rodermond, J. Stap, J. Haveman, C. Van Bree, Clonogenic assay of cells in vitro, *Nature Protocols*. 1 (2006) 2315–2319. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339>.
- [20] Y. Cheng, Q. Mai, X. Zeng, H. Wang, Y. Xiao, L. Tang, J. Li, Propionate relieves pentylenetetrazol-induced seizures, consequent mitochondrial disruption, neuron necrosis and neurological deficits in mice, *Biochem. Pharmacol.* 169 (2019) 113607. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.08.009>.
- [21] W.Q. Zhang, T.T Zhao, D.K. Gui, C.L. Gao, J.L. Gu, W.J. Gan, W. Huang, Y. Xu, H. Zhou, W.N. Chen, Z.L. Liu, Y.H Xu, Sodium Butyrate Improves Liver Glycogen Metabolism in Type 2 Diabetes Mellitus, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 67 (27) (2019). <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b02083>.

- [22] Y. Li, J. Dong, H. Xiao, S. Zhang, B. Wang, M. Cui, Gut commensal derived-valeric acid protects against radiation injuries, *Gut Microbes*. 11 (2020) 789–806. <https://doi.org/10.1080/19490976.2019.1709387>.
- [23] S. Khadge, G.M. Thiele, J. Graham, S. Timothy, R.M. Lynell, P.N. Black, C.C. Dirusso, L. Cook, J.E. Talmadge, Long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids decrease mammary tumor growth , multiorgan metastasis and enhance survival, *Clin. Exp. Metastasis*. 35(8), (2018) 797–818. <https://doi.org/10.1007/s10585-018-9941-7>.
- [24] R.D.S. Freitas, T.C. Muradás, A.P.A. Dagnino, F.L. Rost, K.M. Costa, G.T. Venturin, S. Greggio, J.C. da Costa, M.M. Campos, Targeting FFA1 and FFA4 receptors in cancer-induced cachexia, *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*. 319(5), (2020). E877–E892. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00509.2019>.
- [25] P. Wang, X. Du, M. Xiong, J. Cui, Q. Yang, W. Wang, Y. Chen, Ginsenoside Rd attenuates breast cancer metastasis implicating derepressing microRNA-18a-regulated Smad2 expression, *Scientific reports*. 6 (2016), 33709. <https://doi.org/10.1038/srep33709>.
- [26] R.C.A. Peixoto, A.L. Miranda-Vilela, J.D.S. Filho, M.L. Carneiro, R.G. Oliveira, M.O. da Silva, A.R. de Souza, S.N. Baó, Antitumor effect of free rhodium (II) citrate and rhodium (II) citrate-loaded maghemite nanoparticles on mice bearing breast cancer: a systemic toxicity assay, *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. (2015) 3325–3336. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2966-x>.
- [27] H. Park, J. Han, J.W. Park, D. Lee, K. Jang, M. Lee, K. Heo, C. Myung, Sodium propionate exerts anticancer effect in mice bearing breast cancer cell xenograft by regulating JAK2 / STAT3 / ROS / p38 MAPK signaling, *Acta Pharmacol. Sin.* (2020)

1–13. <https://doi.org/10.1038/s41401-020-00522-2>.

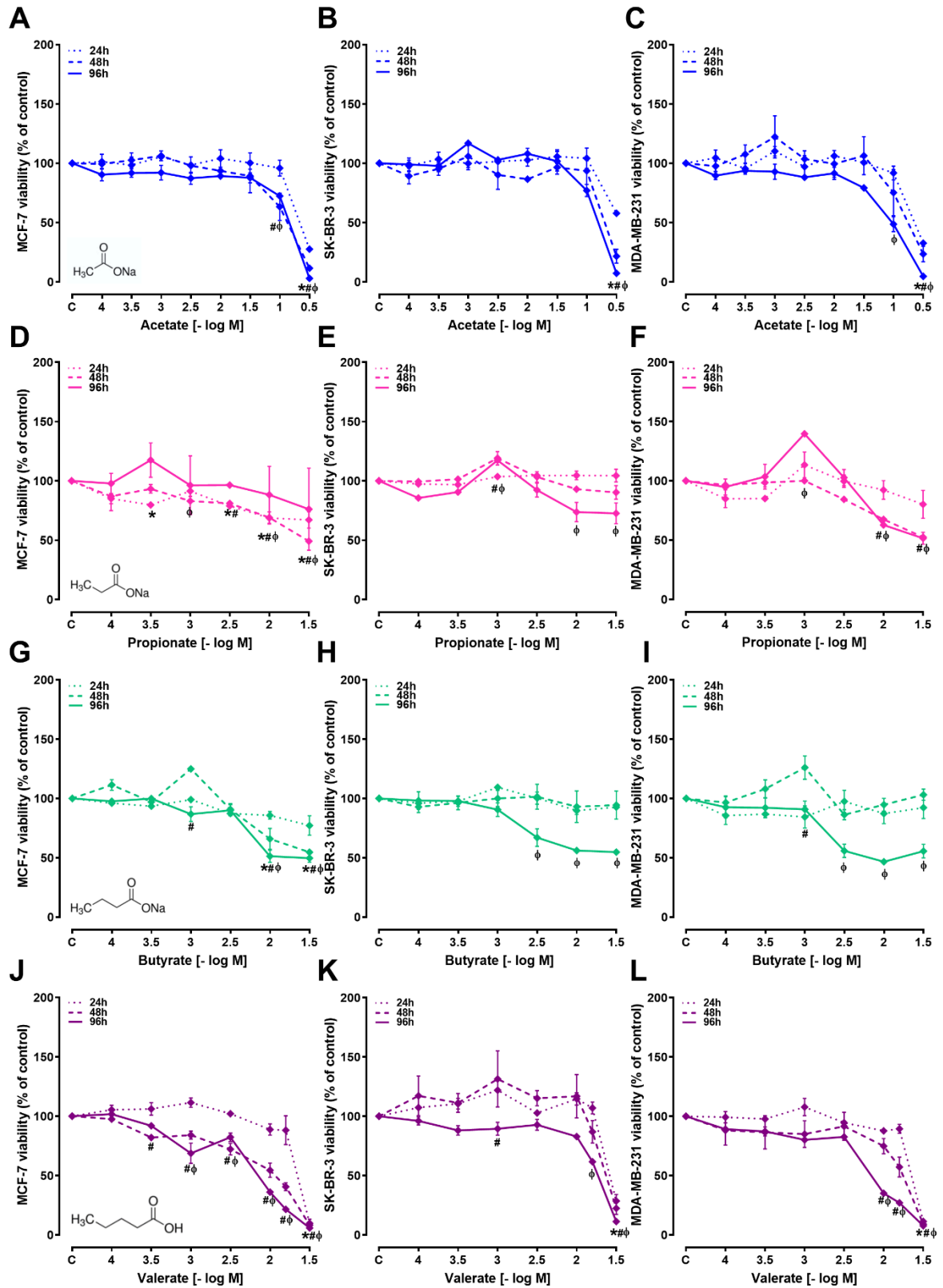
- [28] C. Coutzac, J.M. Jouniaux, A. Paci, J. Schmidt, D. Mallardo, A. Seck, V. Asvatourian, L. Cassard, P. Saulnier, L. Lacroix, P.L. Woerther, A. Vozy, M. Naigeon, L. Nebot-Bral, M. Desbois, E. Simeone, C. Mateus, L. Boselli, J. Grivel, E. Soularue, P. Lepage, F. Carbonnel, P.A. Ascierto, C. Robert, N. Chaput, Systemic short chain fatty acids limit antitumor effect of CTLA-4 blockade in hosts with cancer, *Nat. Commun.* 11 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16079-x>.
- [29] M. Luu, Z. Riester, A. Baldrich, N. Reichardt, S. Yuille, A. Buseti, M. Klein, A. Wempe, H. Leister, H. Raifer, F. Picard, K. Muhammad, K. Ohl, R. Romero, F. Fischer, C.A. Bauer, M. Huber, T.M. Gress, M. Lauth, S. Danhof, T. Bopp, T. Nerreter, I.E. Mulder, U. Steinhoff, M. Hudecek, A. Visekruna, Microbial short-chain fatty acids modulate CD8<sup>+</sup> T cell responses and improve adoptive immunotherapy for cancer, *Nat. Commun.* 12 (2021) 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24331-1>.
- [30] F. Shi, Y. Li, R. Han, A. Fu, R. Wang, O. Nusbaum, Q. Qin, X. Chen, L. Hou, Y. Zhu, Valerian and valeric acid inhibit growth of breast cancer cells possibly by mediating epigenetic modifications, *Sci. Rep.* 11 (2021) 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81620-x>.
- [31] F. Wang, H. Wu, M. Fan, R. Yu, Y. Zhang, J. Liu, X. Zhou, Y. Cai, S. Huang, Z. Hu, X. Jin, Sodium butyrate inhibits migration and induces AMPK-mTOR pathway-dependent autophagy and ROS-mediated apoptosis via the miR-139-5p/Bmi-1 axis in human bladder cancer cells, *FASEB J.* 34 (2020) 4266–4282. <https://doi.org/10.1096/fj.201902626R>.
- [32] Q. Li, C. Ding, T. Meng, W. Lu, W. Liu, H. Hao, L. Cao, Butyrate suppresses motility of colorectal cancer cells via deactivating Akt/ERK signaling in histone deacetylase dependent manner, *J. Pharmacol. Sci.* 135 (2017) 148–155.

- <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2017.11.004>.
- [33] W. Wang, D. Fang, H. Zhang, J. Xue, D. Wangchuk, J. Du, L. Jiang, Sodium butyrate selectively kills cancer cells and inhibits migration in colorectal cancer by targeting thioredoxin-1, *Onco. Targets. Ther.* 13 (2020) 4691–4704. <https://doi.org/10.2147/OTT.S235575>.
- [34] Q. Qiu, Y. Lin, Y. Ma, X. Li, J. Liang, Z. Chen, K. Liu, Exploring the Emerging Role of the Gut Microbiota and Tumor Microenvironment in Cancer Immunotherapy, *Front. Immunol.* 11 (2021) 1–15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.612202>.
- [35] L.S. Cousens, D. Gallwitz, B.M. Alberts, Different Accessibilities in Chromatin to Histone Acetylase, *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 1716–1723. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)37831-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)37831-6).
- [36] L.T. Sunkara, W. Jiang, G. Zhang, Modulation of Antimicrobial Host Defense Peptide Gene Expression by Free Fatty Acids, *Plos One.* 7 (2012). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049558>.
- [37] Y. Xia, X.L. Zhang, F. Jin, Q.X. Wang, R. Xiao, Z.H. Hao, Q.D. Gui, J. Sun, Apoptotic effect of sodium acetate on a human gastric adenocarcinoma epithelial cell line, *Genet. Mol. Res.* 15 (2016) 1–9. <https://doi.org/10.4238/gmr.15048375>.
- [38] M. Thirunavukkarasan, C. Wang, A. Rao, T. Hind, R. Teo, A.A. Siddiquee, M. Ally, I. Goghari, P. Kumar, D.R. Herr, Short-chain fatty acid receptors inhibit invasive phenotypes in breast cancer cells, *Plos One.* 12 (10) (2017) 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186334>.
- [39] T. Yonezawa, Y. Kobayashi, Y. Obara, Short-chain fatty acids induce acute phosphorylation of the p38 mitogen-activated protein kinase/heat shock protein 27 pathway via GPR43 in the MCF-7 human breast cancer cell line, *Cell. Sig.* 19 (2007) 185–193. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2006.06.004>.

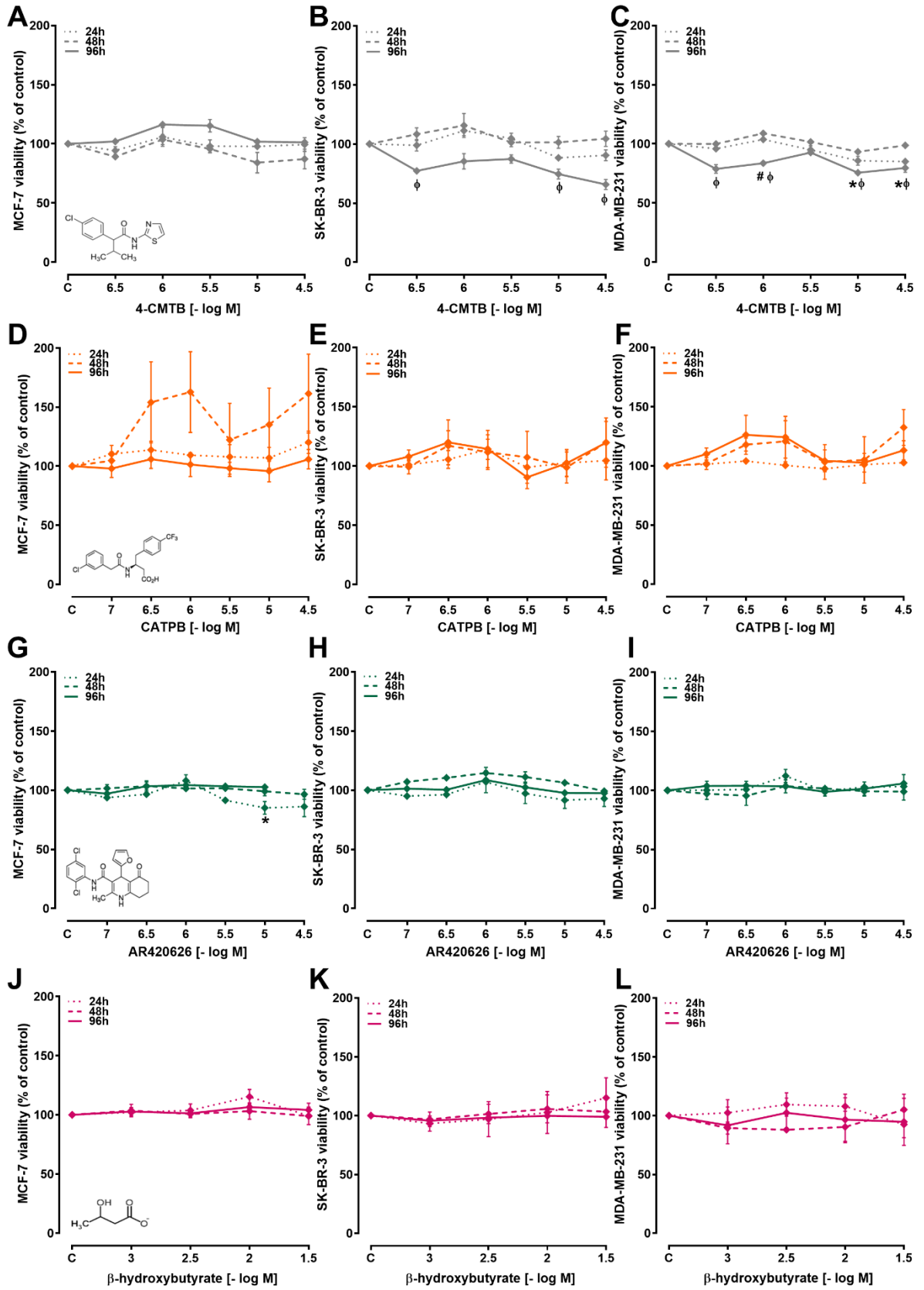
- [40] H. El Hasasna, K. Athamneh, H. Al Samri, N. Karuvantevida, Y. Al Dhaheri, S. Hisaindee, G. Ramadan, N. Al Tamimi, S. AbuQamar, A. Eid, R. Iratni, Rhus coriaria induces senescence and autophagic cell death in breast cancer cells through a mechanism involving p38 and ERK1/2 activation, *Sci. Rep.* 5 (2015). <https://doi.org/10.1038/srep13013>.
- [41] M. Simon, F. Mesmar, L. Helguero, C. Williams, Genome-wide effects of MELK-inhibitor in triple-negative breast cancer cells indicate context-dependent response with p53 as a key determinant, *Plos One.* 12 (2017) 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172832>.
- [42] B.F. Hinnebusch, S. Meng, J.T. Wu, S.Y. Archer, R.A. Hodin, The effects of short-chain fatty acids on human colon cancer cell phenotype are associated with histone hyperacetylation, *J. Nutr.* 132 (2002) 1012–1017. <https://doi.org/10.1093/jn/132.5.1012>.
- [43] D. Jones, M. Amin, N.G. Ordonez, A.B. Glassman, K.J. Hayes, L.J. Medeiros, Reticulum cell sarcoma of lymph node with mixed dendritic and fibroblastic features, *Mod. Pathol.* 14 (2001) 1059–1067. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3880436>.
- [44] T.J. Liu, B.C. Sun, X.L. Zhao, X.M. Zhao, T. Sun, Q. Gu, Z. Yao, X.Y. Dong, N. Zhao, N. Liu, CD133+ cells with cancer stem cell characteristics associates with vasculogenic mimicry in triple-negative breast cancer, *Oncogene.* 32 (2013) 544–553. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.85>.
- [45] S.H. Ryu, G.E. Kaiko, T.S. Stappenbeck, Cellular differentiation: Potential insight into butyrate paradox?, *Mol. Cell. Oncol.* 5 (2018) 1–2. <https://doi.org/10.1080/23723556.2016.1212685>.
- [46] A.J. Wilson, A.C. Chueh, L. Tögel, G.A. Corner, N. Ahmed, S. Goel, D.S. Byun, S. Nasser, M.A. Houston, M. Jhaver, H.J.M. Smartt, L.B. Murray, C. Nicholas, B.G.

- Heerdt, D. Arango, L.H. Augenlicht, J.M. Mariadason, Apoptotic sensitivity of colon cancer cells to histone deacetylase inhibitors is mediated by an Sp1/Sp3-activated transcriptional program involving immediate-early gene induction, *Cancer Res.* 70 (2010) 609–620. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2327>.
- [47] M.P. Dos Santos, C.B. De Farias, R. Roesler, A.L. Brunetto, A.L. Abujamra, In vitro antitumor effect of sodium butyrate and zoledronic acid combined with traditional chemotherapeutic drugs: A paradigm of synergistic molecular targeting in the treatment of Ewing sarcoma, *Oncol. Rep.* 31 (2014) 955–968. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2907>.
- [48] Q.F. Gui, H.F. Lu, C.X. Zhang, Z.R. Xu, Y.M. Yang, Well-balanced commensal microbiota contributes to anti-cancer response in a lung cancer mouse model, *Genet. Mol. Res.* 14 (2015) 5642–5651. <https://doi.org/10.4238/2015.May.25.16>.
- [49] P. Markowiak-Kopeć, K. Śliżewska, The effect of probiotics on the production of short-chain fatty acids by human intestinal microbiome, *Nutrients.* 12 (2020). <https://doi.org/10.3390/nu12041107>.
- [50] S. Yuille, N. Reichardt, S. Panda, H. Dunbar, I.E. Mulder, Human gut bacteria as potent class I histone deacetylase inhibitors in vitro through production of butyric acid and valeric acid, *Plos One.* 13 (2018) 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201073>.

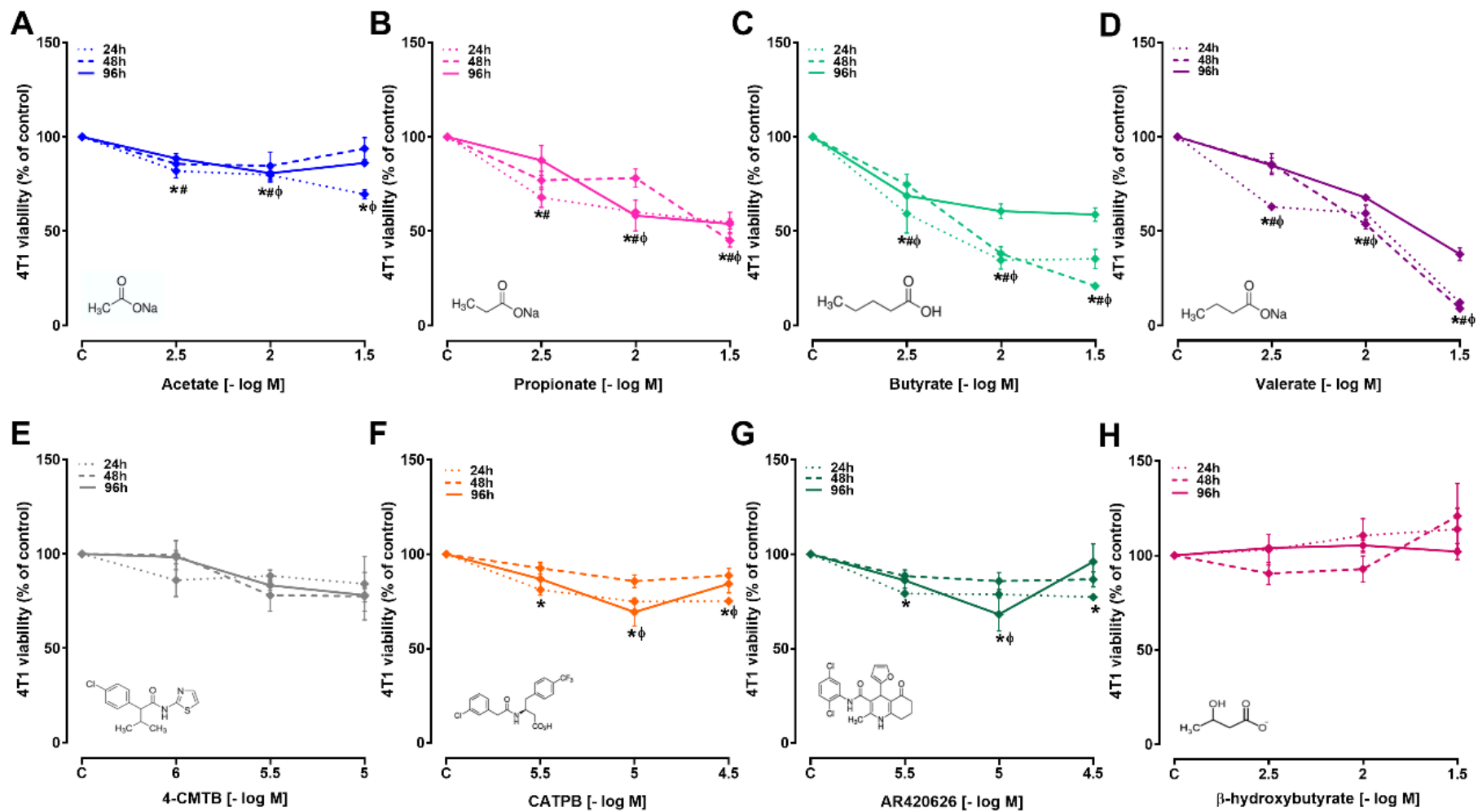




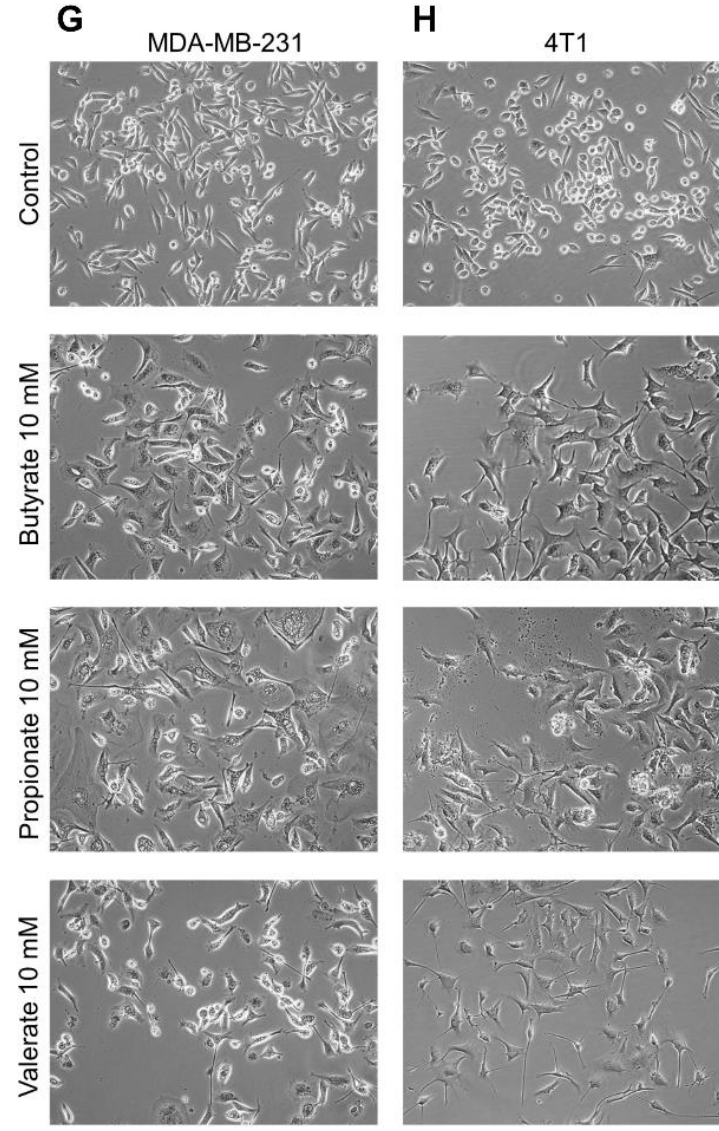
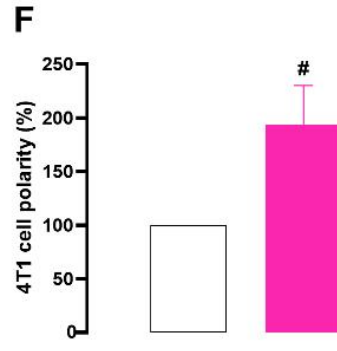
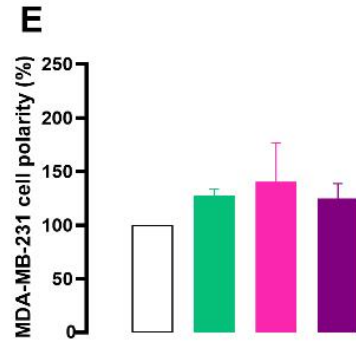
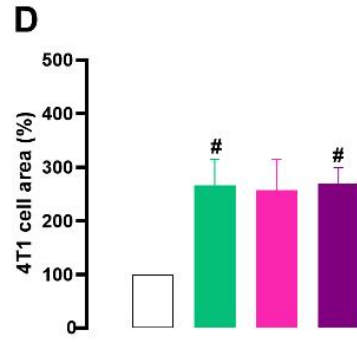
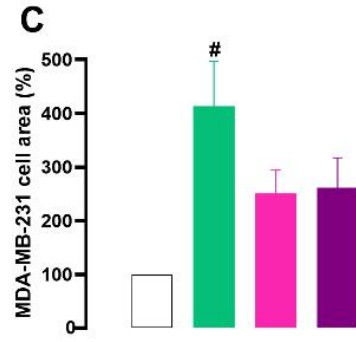
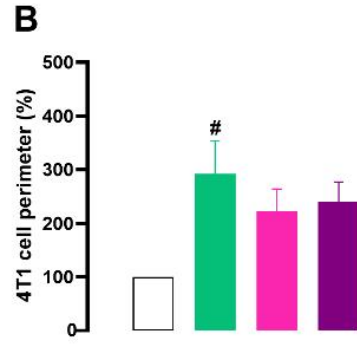
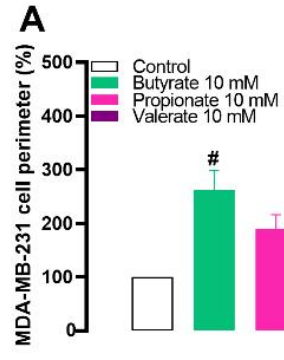
**Fig. 1.** Concentration and time-related in vitro effects of increasing concentrations of the short-chain fatty acids (SCFA) acetate (0.1-300 mM; A, B, C), propionate (0.1-30 mM; D, E, F), butyrate (0.1-30 mM; G, H, I) or valerate (0.1-30 mM; J, K, L) on the viability of MCF-7 (A, D, G, J), SK-BR-3 (B, E, H, K), or MDA-MB-231 (C, F, I, L) human breast cancer cell lineages. Each point represents the mean of 2-4 independent experiments and the line indicates the SEM. The results were analyzed by two-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test, considering treatment and time as variables. \*, #,  $\Phi$  P < 0.05 when comparing treated vs. control group, at 24 h, 48 h, or 96 h incubation, respectively. The chemical structures of each SCFA are provided inside panels A, D, G, and J.



**Fig. 2.** Concentration and time-related in vitro effects of increasing concentrations of the selective FFA2 and FFA3 agonists 4-CMTB (0.3-30  $\mu$ M; A, B, C) and AR420626 (0.1-30  $\mu$ M; G, H, I), or the FFA2 and FFA3 antagonists CATPB (0.1-30  $\mu$ M; D, E, F) and  $\beta$ -hydroxybutyrate (1-30 mM; J, K, L), respectively, on the viability of MCF-7 (A, D, G, J), SK-BR-3 (B, E, H, K), or MDA-MB-231 (C, F, I, L) human breast cancer cell lineages. Each point represents the mean of 2-4 independent experiments and the line indicates the SEM. The results were analyzed by two-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test, considering treatment and time as variables. \*, #,  $\Phi$  P < 0.05 when comparing treated vs. control group, at 24 h, 48 h, or 96 h incubation, respectively. The chemical structures of the agonists and antagonists are provided inside panels A, D, G, and J.

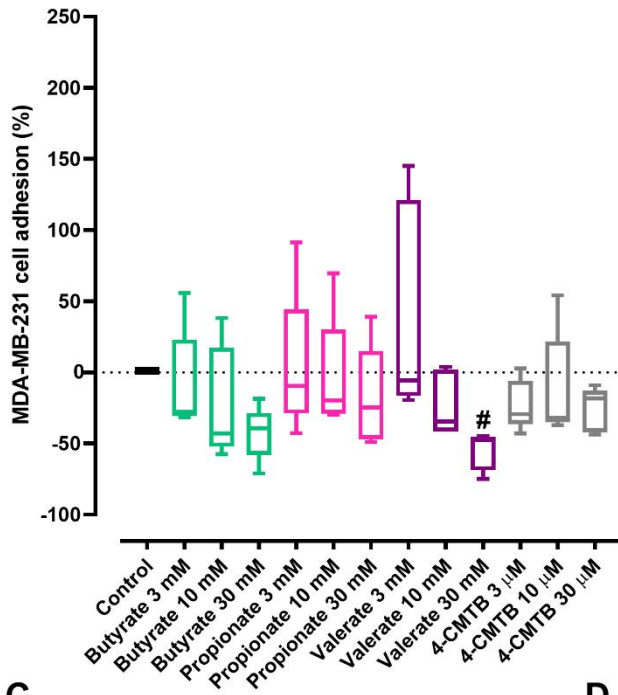
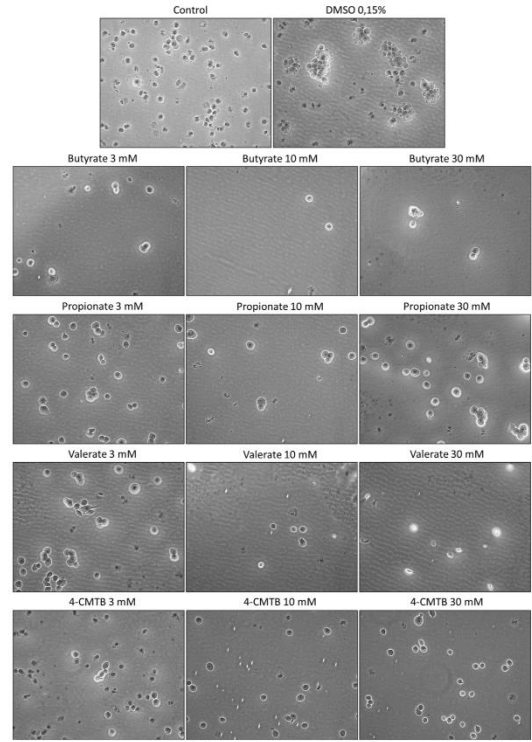
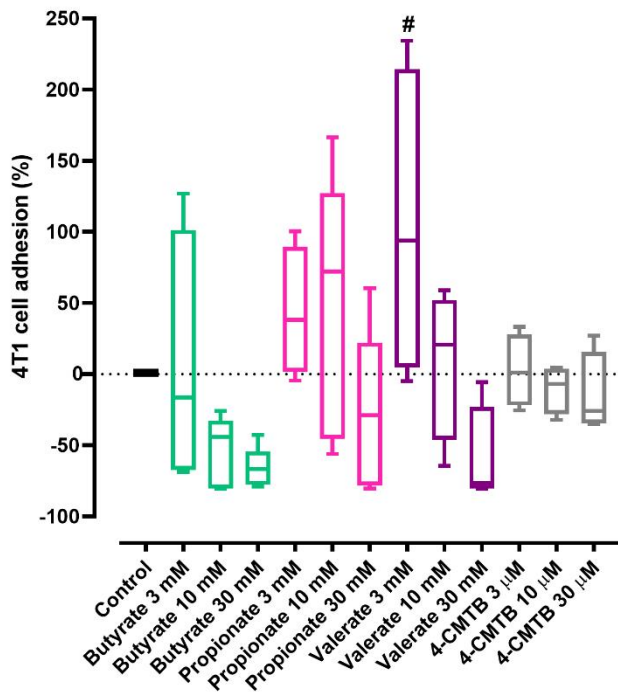
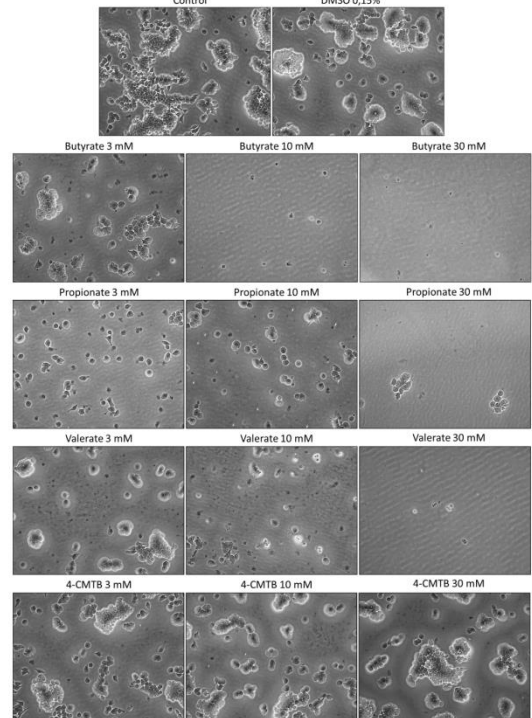


**Fig. 3.** Concentration and time-related in vitro effects of different concentrations of the short-chain fatty acids (SCFA) acetate (A), propionate (B), butyrate (C), or valerate (D), all tested at 3-30 mM, on the viability of the mouse mammary gland cell line 4T1. Effects of the selective FFA2 and FFA3 agonists 4-CMTB (1-10  $\mu$ M; E) and AR420626 (3-30  $\mu$ M; G), or the FFA2 and FFA3 antagonists CATPB (3-30  $\mu$ M; F) and  $\beta$ -hydroxybutyrate (3-30 mM; H), respectively, on the viability of the mouse mammary gland cell line 4T1. Each point represents the mean of 2-4 independent experiments and the line indicates the SEM. The results were analyzed by two-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test, considering treatment and time as variables. \*, #,  $\Phi$  P < 0.05 when comparing treated vs. control group, at 24 h, 48 h, or 96 h incubation, respectively. The chemical structures of each SCFA are provided inside each corresponding panel.

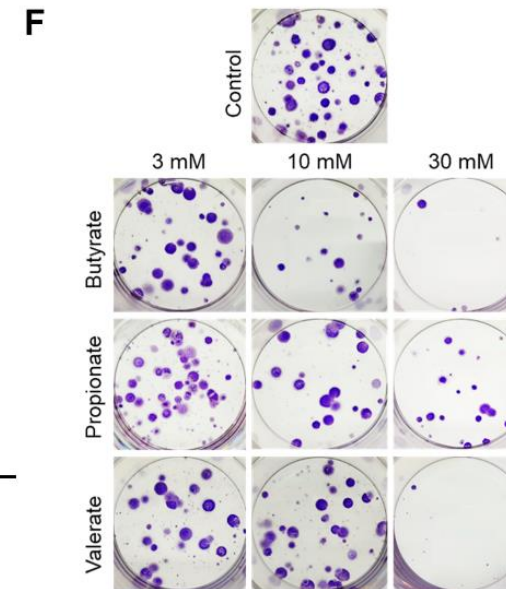
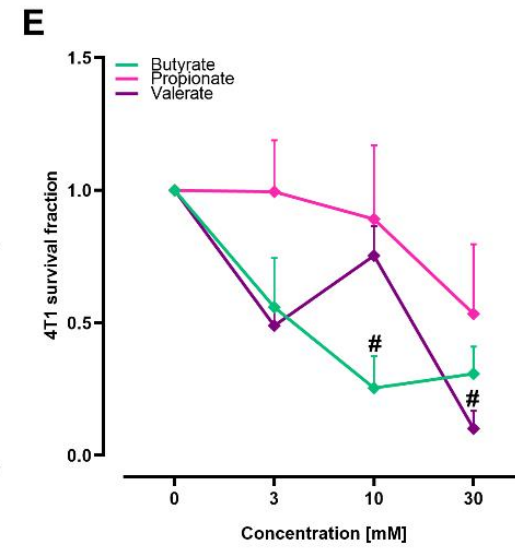
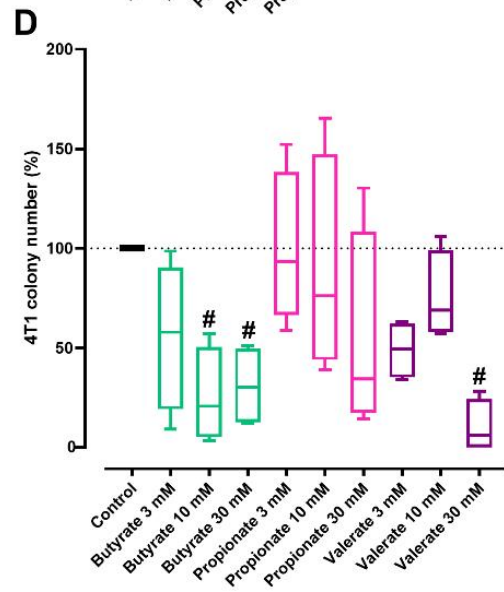
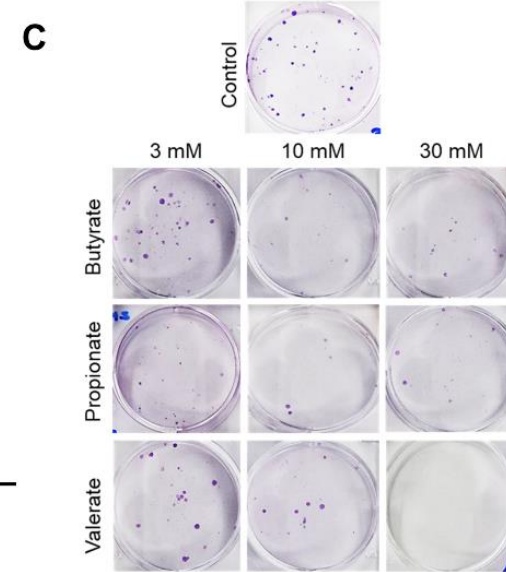
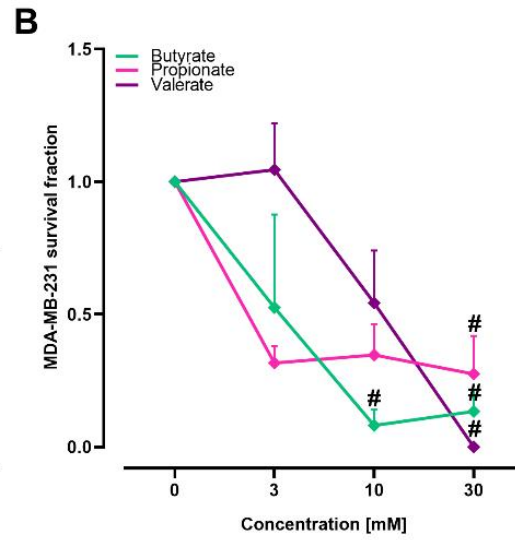
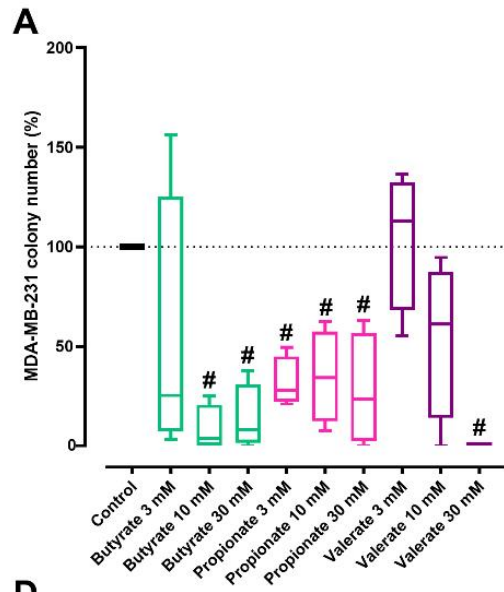


**Fig. 4.** Semi-quantitative analysis regarding the morphological changes of the human MDA-MB-231 (A, C, E) or the mouse 4T1 (B, D, F) breast cancer cell lines after exposure to the SCFA, butyrate, propionate, or valerate, all tested at 10 mM. Data shows the alterations of the perimeter (A, B), the area (C, D), and the cell polarity (E, F). Each column represents the mean of 3 independent experiments and the line indicates the SEM. The results were analyzed by one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test, except for the panel f, for which an unpaired Student t-test was performed. #  $P < 0.05$  when comparing treated vs. control group, at 48 h of incubation. Representative images showing the morphology of MDA-MB-231 (G) or 4T1 (H) cells in control or treatment groups.

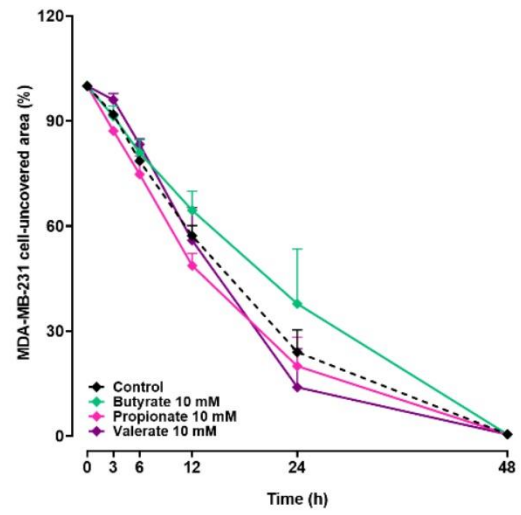
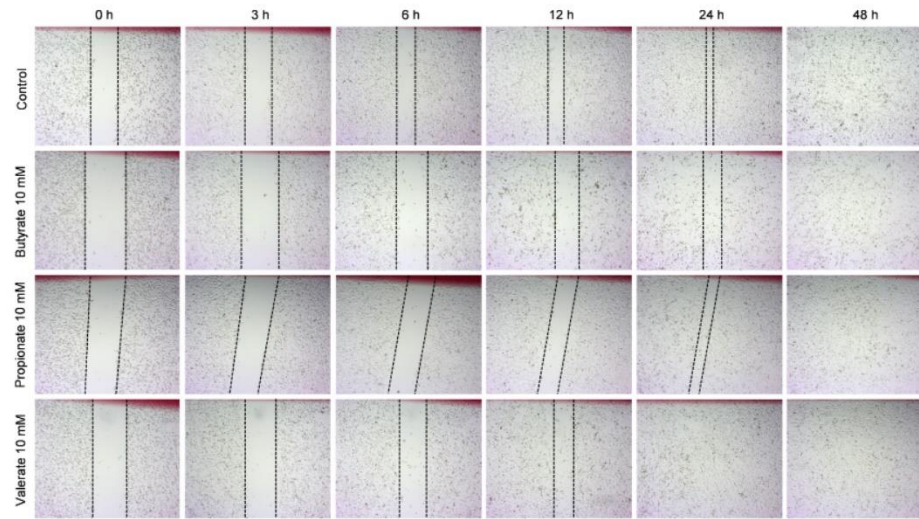
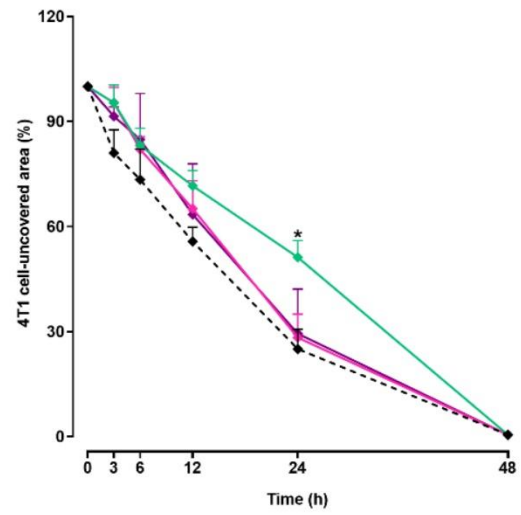
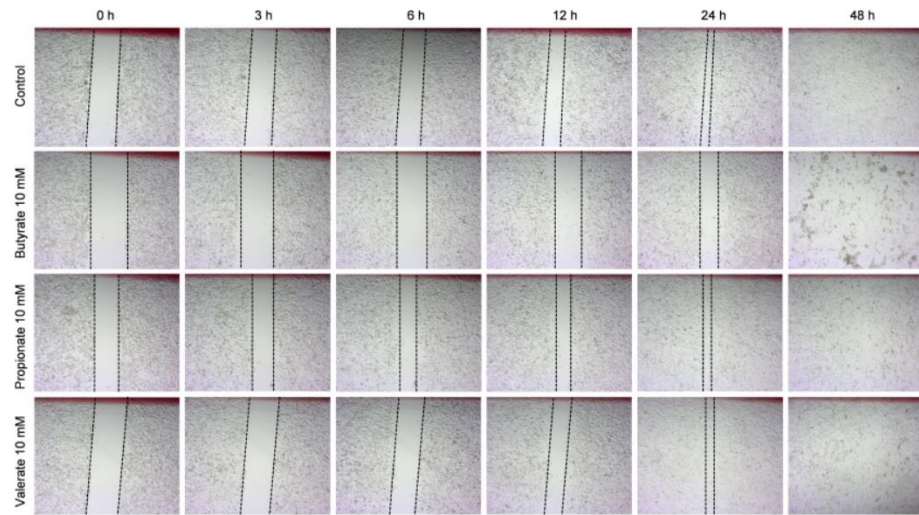


**A****B****C****D**

**Fig. 5.** Assessment of adhesion of the human MDA-MB-231 (A) or the mouse 4T1 (C) breast cancer cells after incubation with butyrate (3-30 mM), propionate (3-30 mM), valerate (3-30 mM), or the selective FFA2 agonist 4-CMTB (3-30  $\mu$ M), for 48 h. The box plots show the median of 4–5 independent experiments with the upper and lower quartiles, whereas the whiskers indicate the maximal and the minimal values. The results were analyzed by one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test. #P < 0.05 when comparing treated vs. control group. Representative images showing the morphology of MDA-MB-231 (B) or 4T1 (D) cells in control or treatment groups.



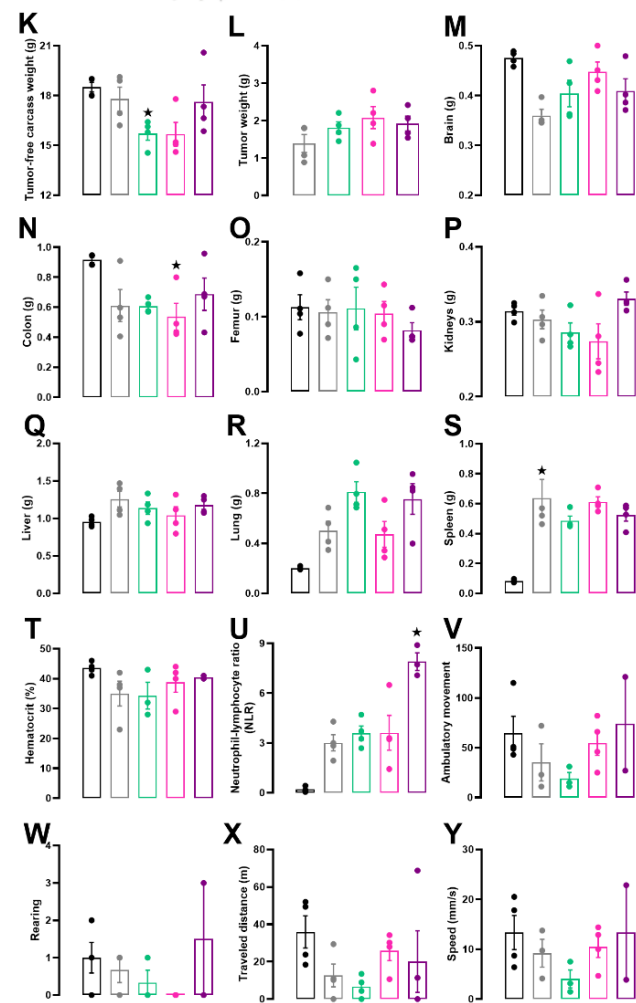
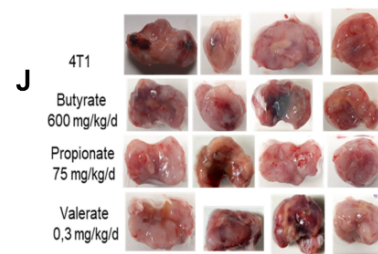
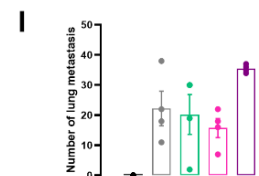
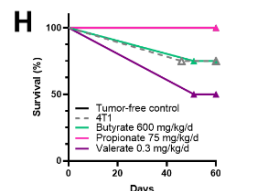
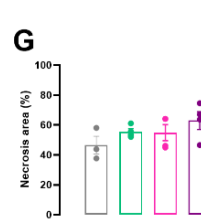
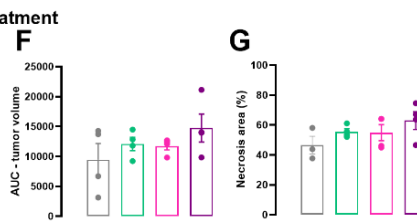
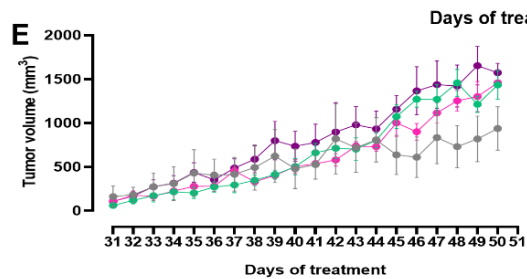
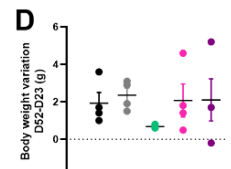
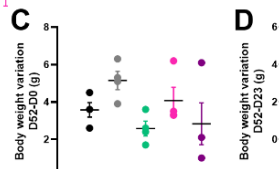
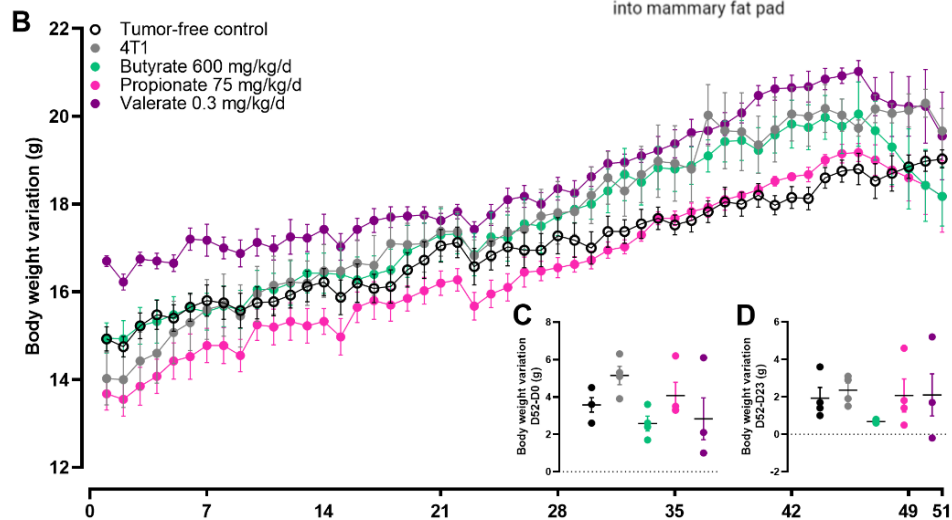
**Fig. 6.** Examination of colony formation of the human MDA-MB-231 (A, B) or the mouse 4T1 (D, E) breast cancer cells after incubation with butyrate, propionate, or valerate, all tested at 3-30 mM, according to the evaluation of colony numbers (A, D) and survival fraction (B, E). The box plots show the median of 3 independent experiments with the upper and lower quartiles, whereas the whiskers indicate the maximal and the minimal values (A, D). Each point represents the mean of 3 independent experiments and the line indicates the SEM (B, E). The results were analyzed by one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test. #  $P < 0.05$  when comparing treated vs. control group. Representative images showing the colony formation of MDA-MB-231 (C) or 4T1 (F) cells in control or treatment groups.

**A****B****C****D**

**Fig. 7.** Time-course for cell migration, measured as the cell-uncovered area, of the human MDA-MB-231 (A) or the mouse 4T1 (C) breast cancer cells after incubation with butyrate, propionate, or valerate, all tested at 10 mM. Each point represents the mean of 3 independent experiments and the line indicates the SEM. The results were analyzed by two-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test, considering treatment and time as variables. \*  $P < 0.05$  when comparing treated vs. control group. Representative images showing the time-related cell migration of MDA-MB-231 (B) or 4T1 (D) cells in control or treatment groups. At 48 h, it is not possible to observe any cell-uncovered area.

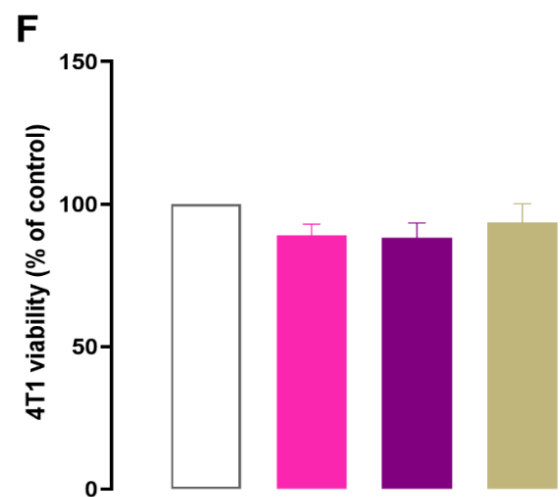
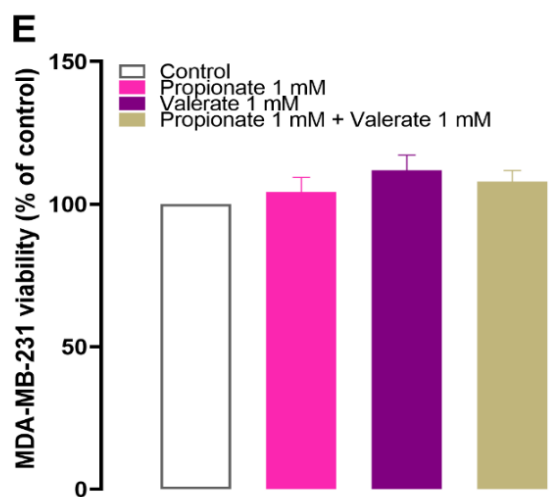
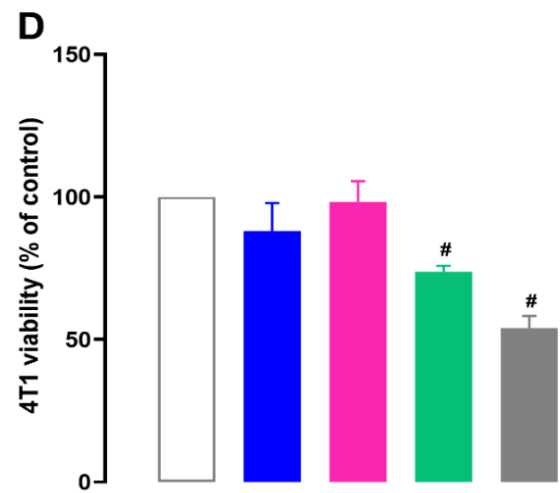
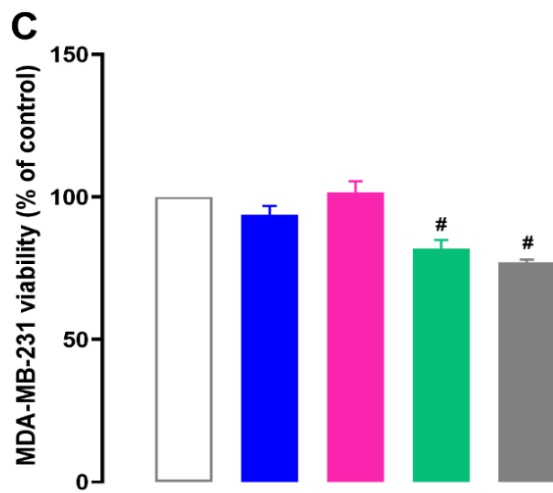
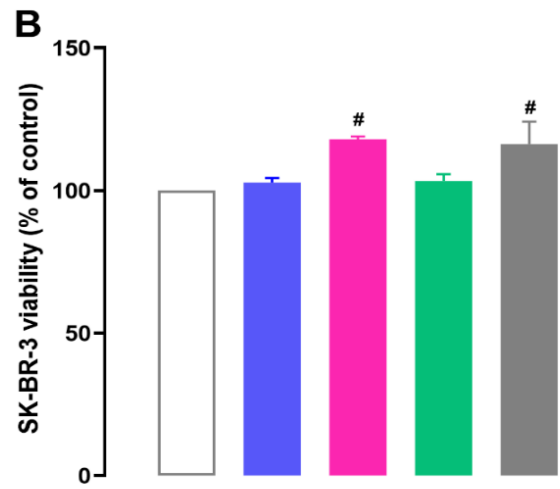
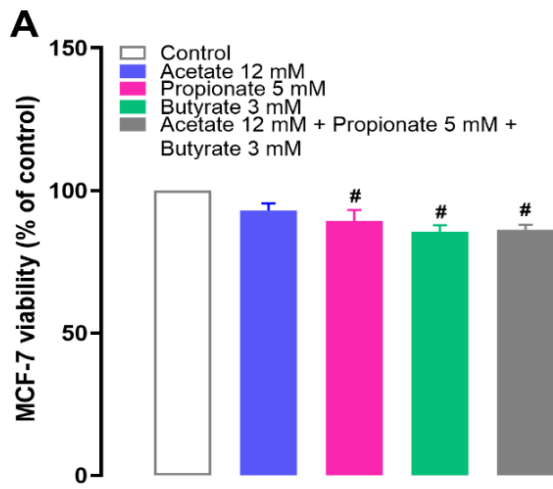


**A** 4T1-BALB/c Experimental Metastasis Model - Pre-tumor treatment



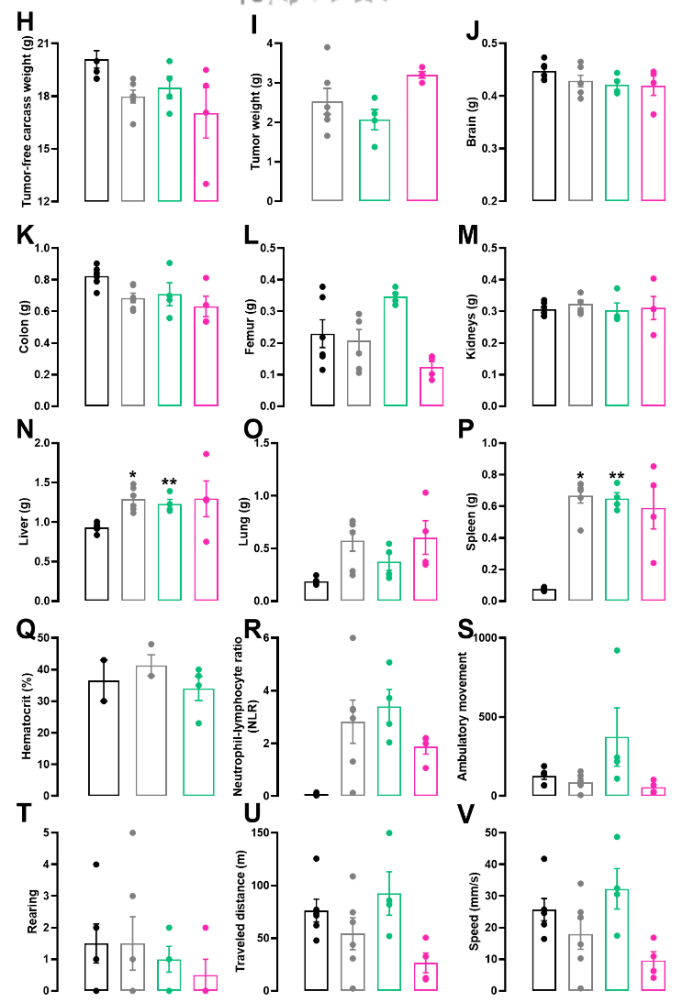
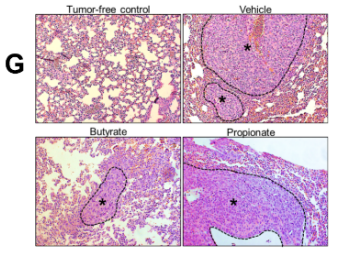
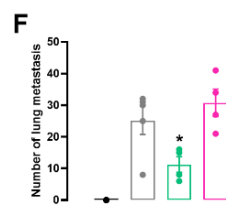
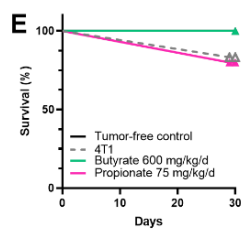
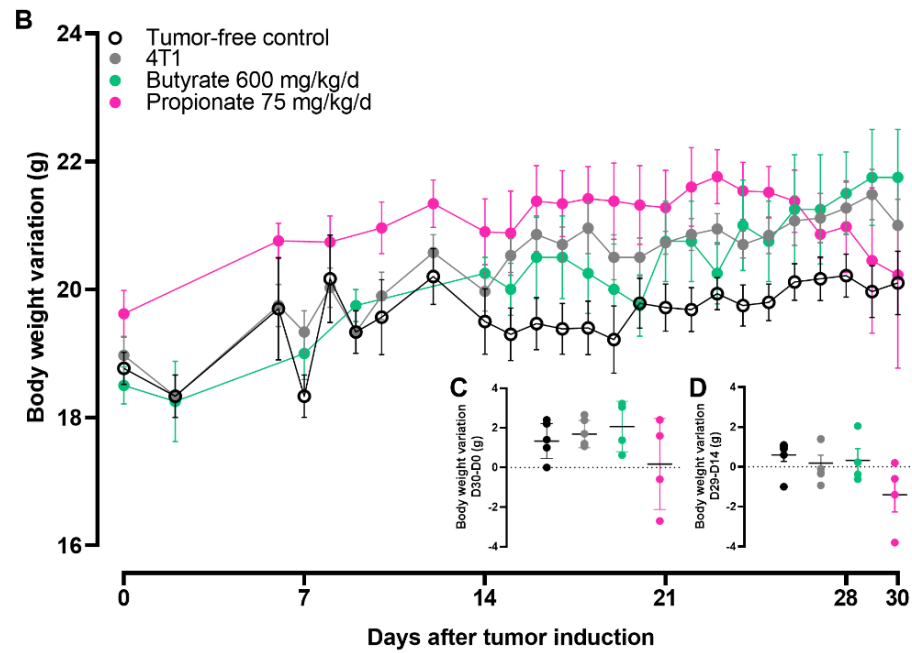
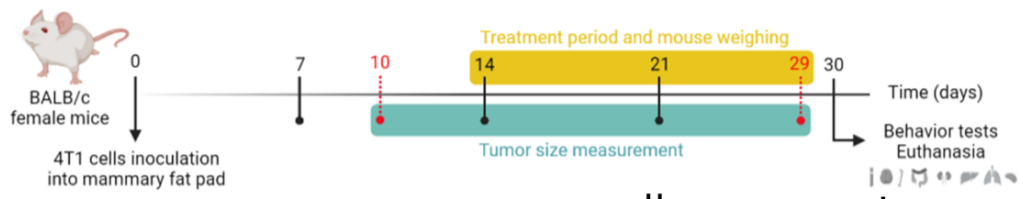
**Fig. 8.** Effects of oral long-term administration of SCFA, namely butyrate (600 mg/kg/day), propionate (75 mg/kg/day), or valerate (0.3 mg/kg/day) on the mouse model of metastatic breast cancer induced by 4T1 cell inoculation. (A) Timeline for this experimental protocol; the yellow bar shows the duration of treatment with the SCFA. The tumor was induced at 21 days, and the behavioral tasks were performed on day 51. The tumor volume was measured from day 31 to 51, as indicated by the blue-colored bar. Euthanasia and sample collection were performed on the 52<sup>nd</sup> experimental day. Bodyweight variation (in g) of the control and treated groups was measured continuously through the entire experimental time (B); as the difference between final (day 52) and initial weight (C); or the difference between days 52 and 23 (D). In vivo tumor volume assessment (in mm<sup>3</sup>) (E), accompanied by the area under the curve (AUC; F). Analysis of tumor necrosis areas (G). A survival curve is depicted in panel H. The number of lung metastasis is provided in (I), accompanied by images regarding the gross evaluation of lung metastasis (J). Appraisal of the different experimental groups regarding the weight of tumor carcass (K), tumor volume (L), brain (M), colon (N), femur (O), kidneys (P), liver (Q), lungs (R), spleen (S). Measurement of hematocrit (T) or neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) (U). General locomotor activity was measured as ambulatory movement (V), rearing (W), traveled distance (X), and speed (Y). Each point or column represents the mean of 3-4 animals and the line indicates the SEM. The results were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test, except for the time-course data for which a repeated-measures ANOVA followed by Tukey's multi-comparison test was used. \*,\* P < 0.05 when comparing treated vs. tumor-free or 4T1control groups.





**Supplementary Fig. 1.** In vitro effects of a combination of acetate (12 mM), propionate (5 mM) plus butyrate (3 M), on the viability of the human MCF-7 (A), SK-BR-3 (B), and MDA-MB-231 (C), or the mouse 4T1 (D) breast cancer cells, after 48 h of incubation. Effects of propionate plus valerate (both at 1 mM) on cell viability of MDA-MB-231 (E), or 4T1 (F) breast cancer cells after 48 h. Each column represents the mean of 3 independent experiments and the line indicates the SEM. The results were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. #P < 0.05 when comparing treated vs. control group.

**A** 4T1-BALB/c Experimental Metastasis Model - Post-tumor treatment



**Supplementary Fig 2.** Effects of oral short-term administration of SCFA, namely butyrate (600 mg/kg/day), propionate (75 mg/kg/day), or valerate (0.3 mg/kg/day) on the mouse model of metastatic breast cancer induced by 4T1 cell inoculation. (A) Timeline for this experimental protocol; the yellow bar shows the duration of treatment with the SCFA. The tumor was induced on day 0, and the behavioral tasks and euthanasia were performed on day 30. Bodyweight variation (in g) of the control and treated groups measured continuously through the entire experimental time (B); as the difference between final (day 30) and initial weight (C); or the difference between days 29 and 14 (D). A survival curve is depicted in panel E. The number of lung metastasis is provided in (F). Representative histological images of lung metastasis are shown in G. Evaluation of the different experimental groups regarding the weight of tumor carcass (H), tumor volume (I), brain (J), colon (K), femur (L), kidneys (M), liver (N), lungs (O), spleen (P). Measurement of hematocrit (Q) or neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) (R). General locomotor activity was measured as ambulatory movement (S), rearing (T), traveled distance (U), and speed (V). Each point or column represents the mean of 3-4 animals and the line indicates the SEM. The results were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test, except for the time-course data for which a repeated-measures ANOVA followed by Tukey's multi-comparison test was used. \* $P < 0.05$  when comparing treated vs. 4T1 control groups.

## Considerações finais

A ideia dessa tese iniciou a partir do projeto de doutorado da colega Dra. Raquel Dal Sasso Freitas, o qual abordava o papel dos ácidos graxos de cadeia longa em um modelo de caquexia induzida por câncer em camundongos. Tão logo eu pensei: E os ácidos graxos de cadeia curta (SCFA)? Qual será o envolvimento deles no câncer de mama? Não imaginava o grande desafio que estava por vir, uma vez que os estudos encontrados na literatura acerca dessa correlação eram extremamente escassos. Então descobrimos que os receptores FFA2 e FFA3, apresentavam significativa diferença de expressão nos tecidos de mama normais em relação aos tecidos com tumor, assim como em linhagens celulares normais e tumorais de mama. Além disso, os ligantes sintéticos, agonistas e antagonistas, ainda estavam sendo descritos e a literatura apresentava controvérsias sobre o papel farmacológico dos que já estavam estabelecidos. A escolha pelo modelo de câncer de mama ortotópico metastático foi mais apropriada conforme os padrões encontrados na clínica, diante da semelhança do modelo ao estágio IV de câncer de mama humano e pelas limitações que um modelo xenográfico poderia apresentar devido à imunossupressão basal do animal.

Primeiramente, a variação dos efeitos dos SCFA nos modelos *in vitro* e *in vivo* poderia ser explicado através das diferenças de afinidade dos SCFA pelos seus receptores conforme a variação entre as espécies. No entanto, a resposta baixa ou nula aos tratamentos dos ligantes seletivos pelas linhagens celulares, assim como a provável alteração da microbiota dos animais com tumor, evidencia a possibilidade de que os efeitos dos SCFA são mediados por outros mecanismos, como os inibidores de HDAC e modulação do sistema imune. Os principais achados desse trabalho direcionam para estes mecanismos. As alterações morfológicas das células, geralmente relacionadas com a diferenciação celular, a qual é uma das funções dos SCFA pode estar associada à hiperacetilação de histonas. A redução da capacidade clonogênica e da viabilidade celular podem estar relacionadas à sensibilidade aos inibidores de HDAC e à fragmentação de DNA, respectivamente.

As diferentes abordagens terapêuticas com os SCFA aplicadas no modelo animal de câncer de mama metastático não demonstraram efeitos antitumorais nessa análise preliminar, exceto pela redução das metástases pulmonares após o tratamento com butirato no protocolo terapêutico. Estudos recentes observaram efeitos antitumorais e imunostimulatórios de linfócitos T citotóxicos (CTL) e células T com receptor de

antígeno quimérico (CAR-T) após exposição a SCFA em modelos de câncer em camundongos. Por outro lado, altos níveis de SCFA bloquearam a atividade antitumoral de anti-CTLA-4 interferindo na expansão clonal e resposta imune.

Portanto, foi demonstrado que os SCFA, principalmente o butirato, podem estar envolvidos na progressão do câncer de mama altamente invasivo e se faz necessária a compreensão e identificação desses mecanismos para poder definir uma alternativa terapêutica eficaz contra esse tipo de tumor.

## Produção científica e apresentações de trabalhos

- 1: **MURADÁS, T. C.** Câncer de Mama, além do rosa. Palestra de outubro da Comissão Interna de Prevenção de Acidentes (CIPA), Porto Alegre, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2019.
- 2: **MURADÁS, T. C.**; CAMPOS, M.M. Estudo *in vitro* dos efeitos de ácidos graxos de cadeia curta no câncer de mama. In: Research Day, Porto Alegre, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2019.
- 3: **MURADÁS, T. C.**; CAMPOS, M. M. Modulation of short-chain free fatty acid receptors FFA2 and FFA3 in breast cancer cells. In: 51st Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2019, Maceió. Annals of the 51st Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2019. Menção Honrosa - Melhores Painéis - Cancer Pharmacology, Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica.
- 4: RODRIGUES-JUNIOR, V.; SPEROTTO, N. D. M.; **MURADÁS, T.**; ABBADI, B. L.; MACCHI, F. S.; BERGO, P. F.; FREITAS, T. F.; VILLELA, A. D.; CAMPOS, M. M.; BASSO, LUIZ A. Effects of quinoxaline-derived chalcones on multi-drug resistant Mycobacterium tuberculosis and genotoxicity investigation. In: II Latin American Congress of Clinical and Laboratorial Toxicology, 2018, Porto Alegre. Annals of the II Latin American Congress of Clinical and Laboratorial Toxicology, 2018.
- 5: BERGO, P. F.; **MURADÁS, T.**; SPEROTTO, N. D.; FREITAS, T. F.; CAMPOS, M. M.; BASSO, LUIZ A.; RODRIGUES-JUNIOR, V. Acute oral toxicity assessment of a quinoxaline-derived chalcone, an anti-tuberculosis drug candidate in mice. In: II Latin American Congress of Clinical and Laboratorial Toxicology, 2018, Porto Alegre. Annals of the II Latin American Congress of Clinical and Laboratorial Toxicology, 2018.
- 6: RODRIGUES-JUNIOR, V., ABBADI, B. L.; MACCHI, F. S.; **MURADÁS, THAÍS C.**; VILLELA, A. D.; CAMPOS, MARIA MARTHA; BASSO, LUIZ A. Avaliação da atividade de chalconas quinoxalínicas em cepas de Mycobacterium tuberculosis resistentes a múltiplos fármacos. In: 54º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical - MedTrop 2018, 2018, Olinda. Anais do 54º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical - MedTrop 2018, 2018.

- 7: FREITAS, R. D. S.; **MURADÁS, T. C.**; DAGNINO, A. P. A.; GREGGIO, S.; VENTURIN, G. T.; COSTA, J. C.; CAMPOS, M. M. Benefits of the FFA1 and FFA4 receptors modulation in a pre-clinical model of cancer-associated cachexia. In: 51st Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2019, Maceió. Annals of the 51st Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2019.
- 8: FREITAS, RAQUEL D. S.; **MURADÁS, THAÍS C.**; DAGNINO, ANA PAULA A.; ROST, FERNANDA L.; COSTA, KESIANE M.; VENTURIN, GIANINA T.; GREGGIO, SAMUEL; DA COSTA, JADERSON C.; CAMPOS, MARIA M. Targeting FFA1 and FFA4 receptors in cancer-induced cachexia. *AJP: ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM (ONLINE)*, v. 319, p. E877-E892, 2020.
- 9: KUNRATH, M. F.; **MURADÁS, T. C.**; PENHA, N.; CAMPOS, M. M. Innovative surfaces and alloys for dental implants: What about biointerface-safety concerns? *DENTAL MATERIALS*, v. 37 (10), p. 1447-1462, 2021.



## Referências

- Al-Hajj, Muhammad et al. 2003. "Prospective Identification of Tumorigenic Breast Cancer Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(7): 3983–88.
- Aztopal, Nazlıhan et al. 2018. "Valproic Acid, a Histone Deacetylase Inhibitor, Induces Apoptosis in Breast Cancer Stem Cells." *Chemico-Biological Interactions* 280(November 2017): 51–58.
- Basu, Sandip et al. 2008. "Comparison of Triple-Negative and Estrogen Receptor-Positive/Progesterone Receptor-Positive/HER2-Negative Breast Carcinoma Using Quantitative Fluorine-18 Fluorodeoxyglucose/Positron Emission Tomography Imaging Parameters: A Potentially Useful Method for D." *Cancer* 112(5): 995–1000.
- Bertolini, Francesco. 2013. "Adipose Tissue and Breast Cancer Progression : A Link between Metabolism and Cancer." *The Breast* 22: S48–49.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.breast.2013.07.009>.
- Bindels, L. B. et al. 2012. "Gut Microbiota-Derived Propionate Reduces Cancer Cell Proliferation in the Liver." *British Journal of Cancer* 107(8): 1337–44.
- Bindels, Laure B, Evelyne M Dewulf, and Nathalie M Delzenne. 2013. "Relevance and Therapeutic Prospects." *Trends in Pharmacological Sciences* 34(4): 226–32.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2013.02.002>.
- Binotto, Monique, and Gilberto Schwartsmann. 2020. "Health-Related Quality of Life of Breast Cancer Patients : Integrative Literature Review." 66(1).
- Blair, Cindy K et al. "Obesity and Survival among a Cohort of Breast Cancer Patients Is Partially Mediated by Tumor Characteristics." *npj Breast Cancer*: 1–7.  
<http://dx.doi.org/10.1038/s41523-019-0128-4>.
- Brown, Andrew J et al. 2003. "The Orphan G Protein-Coupled Receptors GPR41 and GPR43 Are Activated by Propionate and Other Short Chain Carboxylic Acids \* with GIRK G Protein-Regulated Potassium Channels In." 278(13): 11312–19.
- Burguin, Anna, Caroline Diorio, and Francine Durocher. 2021. "Breast Cancer Treatments: Updates and New Challenges." *Journal of Personalized Medicine* 11(8).
- Burnett, G T, D C Weathersby, T E Taylor, and T A Bremner. 2008. "Regulation of Inflammation- and Angiogenesis-Related Gene Expression in Breast Cancer Cells and Co-Cultured Macrophages." *Anticancer Res* 28(4B): 2093–99.
- Chan, Yuk Wah, Franky Leung Chan, Xiya Wang, and Suk Ying Tsang. 2020. "Adipose - Derived Stem Cells and Cancer Cells Fuse to Generate Cancer Stem Cell - like Cells with Increased Tumorigenicity." (January): 6794–6807.
- Chen, Wenjing, Andrew D Hoffmann, Huiping Liu, and Xia Liu. 2018. "Organotropism : New Insights into Molecular Mechanisms of Breast Cancer Metastasis." *npj Precision Oncology* (October 2017).  
<http://dx.doi.org/10.1038/s41698-018-0047-0>.
- Choi, Junjeong, Jones Gyamfi, Haerin Jang, and Ja Seung Koo. 2018. "The Role of Tumor-Associated Macrophage in Breast Cancer Biology." *Histology and Histopathology*.
- Edfalk, Sara, and Helena Edlund. 2008. "Gpr40 Is Expressed in Enteroendocrine Cells and Mediates Free Fatty Acid Stimulation of Incretin Secretion." 57(September).
- Esposito, Vittoria D et al. 2020. "Mammary Adipose Tissue Control of Breast Cancer Progression : Impact of Obesity and Diabetes." 10(August): 1–8.
- Goldhirsch, A et al. 2013. "Personalizing the Treatment of Women with Early Breast Cancer : Highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary

- Therapy of Early Breast Cancer 2013.” (March): 2206–23.
- Gonçalves, Pedro, Inês Gregório, and Fátima Martel. 2020. “The Short-Chain Fatty Acid Butyrate Is a Substrate of Breast Cancer Resistance Protein.” : 984–94.
- Gong, Yue et al. 2017. “Impact of Molecular Subtypes on Metastatic Breast Cancer Patients: A SEER Population-Based Study.” *Scientific Reports* 7(March): 1–10. <http://dx.doi.org/10.1038/srep45411>.
- Hopkins, Mandi M, and Kathryn E Meier. “Free Fatty Acid Receptors and Cancer : From Nutrition to Pharmacology.”
- Hudson, Brian D. et al. 2012. “Extracellular Ionic Locks Determine Variation in Constitutive Activity and Ligand Potency between Species Orthologs of the Free Fatty Acid Receptors FFA2 and FFA3.” *Journal of Biological Chemistry* 287(49): 41195–209.
- Hudson, Brian D et al. 2013. “Defining the Molecular Basis for the First Potent and Selective Orthosteric Agonists of the FFA2 Free Fatty Acid Receptor \*.” 288(24): 17296–312.
- Iacoviello, Licia, Marialaura Bonaccio, Giovanni De Gaetano, and Maria Benedetta. 2020. “Seminars in Cancer Biology Epidemiology of Breast Cancer , a Paradigm of the ‘ Common Soil ’ Hypothesis.” *Seminars in Cancer Biology* (February): 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.02.010>.
- Kim, Chang H. 2017. “Microbiota or Short-Chain Fatty Acids : Which Regulates Diabetes ?” *Nature Publishing Group* 15(2): 88–91. <http://dx.doi.org/10.1038/cmi.2017.57>.
- Kim, Myung H et al. 2013. “Short-Chain Fatty Acids Activate GPR41 and GPR43 on Intestinal Epithelial Cells to Promote Inflammatory Responses in Mice.” *Gastroenterology* 145(2): 396-406.e10. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2013.04.056>.
- Kimura, I. et al. 2011. “Short-Chain Fatty Acids and Ketones Directly Regulate Sympathetic Nervous System via G Protein-Coupled Receptor 41 (GPR41).” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(19): 8030–35. <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1016088108>.
- Kimura, Ikuo et al. 2011. “Short-Chain Fatty Acids and Ketones Directly Regulate Sympathetic Nervous System via G Protein-Coupled.” 41.
- Kimura, Ikuo, Atsuhiko Ichimura, Ryuji Ohue-Kitano, and Miki Igarashi. 2020. “Free Fatty Acid Receptors in Health and Disease.” *Physiological Reviews* 100(1): 171–210.
- Lam, S. W., C. R. Jimenez, and E. Boven. 2014. “Breast Cancer Classification by Proteomic Technologies: Current State of Knowledge.” *Cancer Treatment Reviews* 40(1): 129–38.
- Larionova, Irina et al. 2020. “Tumor-Associated Macrophages in Human Breast , Colorectal , Lung , Ovarian and Prostate Cancers.” 10(October): 1–34.
- Lazar, Veronica et al. 2018. “Aspects of Gut Microbiota and Immune System Interactions in Infectious Diseases, Immunopathology, and Cancer.” *Frontiers in Immunology* 9(August): 1–18. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.01830/full>.
- Liang, Yiran, Hanwen Zhang, Xiaojin Song, and Qifeng Yang. 2020. “Seminars in Cancer Biology Metastatic Heterogeneity of Breast Cancer : Molecular Mechanism and Potential Therapeutic Targets.” *Seminars in Cancer Biology* 60(August 2019): 14–27. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.08.012>.
- Maldonado, Rylee et al. 2021. “ $\beta$  - Hydroxybutyrate Does Not Alter the Effects of Glucose Deprivation on Breast Cancer Cells.” : 1–13.

- Mårtensson, Jonas et al. 2018. "Neutrophil Priming That Turns Natural FFA2R Agonists into Potent Activators of the Superoxide Generating NADPH-Oxidase." *Journal of Leukocyte Biology* (August): 1–16.  
<http://doi.wiley.com/10.1002/JLB.2A0318-130RR>.
- Maruyama, Takuo, and Shingo Yamamoto. 2012. "Apoptosis of Bladder Cancer by Sodium Butyrate and Cisplatin." : 288–95.
- Matsuya-ogawa, Madoka et al. 2019. "Oncoprotective Effects of Short-Chain Fatty Acids on Uterine Cervical Neoplasia Oncoprotective Effects of Short-Chain Fatty Acids on Uterine Cervical Neoplasia." *Nutrition and Cancer* 0(0): 1–8.  
<https://doi.org/10.1080/01635581.2019.1578388>.
- Milligan, Graeme, Bharat Shimpukade, Trond Ulven, and Brian D Hudson. 2017. "Complex Pharmacology of Free Fatty Acid Receptors."
- Milligan, Graeme, Leigh A Stoddart, and Nicola J Smith. 2009. "THEMED ISSUE : GPCR REVIEW Agonism and Allosterism : The Pharmacology of the Free Fatty Acid Receptors FFA2 and FFA3 Abbreviations :": 146–53.
- Mirzaei, Rasoul et al. 2021. "Role of Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids in Cancer Development and Prevention." *Biomedicine and Pharmacotherapy* 139: 111619. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111619>.
- Miyamoto, Junki et al. 2016. "Nutritional Signaling via Free Fatty Acid Receptors." 2: 1–12.
- Namour, Florence et al. 2016. "Safety, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of GLPG0974, a Potent and Selective FFA2 Antagonist, in Healthy Male Subjects." *British Journal of Clinical Pharmacology*: 139–48.
- Neves, Ana Luisa et al. 2015. "The Microbiome and Its Pharmacological Targets: Therapeutic Avenues in Cardiometabolic Diseases." *Current Opinion in Pharmacology* 25: 36–44.
- Nilsson, Niclas E, Knut Kotarsky, and Christer Owman. 2003. "Identification of a Free Fatty Acid Receptor, FFA 2 R, Expressed on Leukocytes and Activated by Short-Chain Fatty Acids €." 303: 1047–52.
- Obeid, Elias, Rita Nanda, Yang Xin Fu, and Olufunmilayo I. Olopade. 2013. "The Role of Tumor-Associated Macrophages in Breast Cancer Progression (Review)." *International Journal of Oncology*.
- Ortiz-masia, Dolores, and Maria Dolores Barrachina. 2020. "Metabolite Sensing GPCRs : Promising Therapeutic Targets for Cancer Treatment ?": 1–33.
- Oshiro, Chiya et al. 2015. "PIK3CA Mutations in Serum DNA Are Predictive of Recurrence in Primary Breast Cancer Patients." *Breast Cancer Research and Treatment*.
- Park, Hyun-soo et al. 2020. "Sodium Propionate Exerts Anticancer Effect in Mice Bearing Breast Cancer Cell Xenograft by Regulating JAK2 / STAT3 / ROS / P38 MAPK Signaling." *Acta Pharmacologica Sinica* (August): 1–13.  
<http://dx.doi.org/10.1038/s41401-020-00522-2>.
- Pindiprolu, S.K.S.S., P.T. Krishnamurthy, and P.K. Chintamaneni. 2018. "Pharmacological Targets of Breast Cancer Stem Cells: A Review." *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 391(5): 463–79.
- Pizzonero, Mathieu et al. 2014. "Discovery and Optimization of an Azetidine Chemical Series as a Free Fatty Acid Receptor 2 (FFA2) Antagonist: From Hit to Clinic." *Journal of Medicinal Chemistry* 57(23): 10044–57.
- Poul, Emmanuel Le et al. 2003. "Functional Characterization of Human Receptors for Short Chain Fatty Acids and Their Role in Polymorphonuclear Cell Activation \*." 278(28): 25481–89.

- Press, David J et al. 2017. “De Novo Metastasis in Breast Cancer : Occurrence and Overall Survival Stratified by Molecular Subtype.” *Clinical & Experimental Metastasis* 34(8): 457–65. <http://dx.doi.org/10.1007/s10585-017-9871-9>.
- Scully, Olivia Jane, Boon-Huat Bay, George Yip, and Yingnan Yu. 2012. “Breast Cancer Metastasis.” *Cancer genomics & proteomics* 9(5): 311–20.
- Shima, Hidetaka, Akimitsu Yamada, Takashi Ishikawa, and Itaru Endo. 2017. “Are Breast Cancer Stem Cells the Key to Resolving Clinical Issues in Breast Cancer Therapy?” *Gland Surgery* 6(1): 82–88. <http://gs.amegroups.com/article/view/11453/13733>.
- Sousa, Bárbara, Ana Sofia Ribeiro, and Joana Paredes. 2019. “Heterogeneity and Plasticity of Breast Cancer Stem Cells.” : 83–103.
- Sung, Hyuna et al. 2021. “Global Cancer Statistics 2020 : GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries.” 71(3): 209–49.
- Takahashi, Ryou-u et al. 2011. “Cancer Stem Cells in Breast Cancer.” *Cancers* 3(4): 1311–28.
- Tang, Yong et al. 2011. “G-Protein-Coupled Receptor for Short-Chain Fatty Acids Suppresses Colon Cancer.” *International Journal of Cancer* 128(4): 847–56.
- Thirunavukkarasan, Madhumathi et al. 2017. “Short-Chain Fatty Acid Receptors Inhibit Invasive Phenotypes in Breast Cancer Cells.” : 1–16.
- Tobin, N. P. et al. 2015. “Molecular Subtype and Tumor Characteristics of Breast Cancer Metastases as Assessed by Gene Expression Significantly Influence Patient Post-Relapse Survival.” *Annals of Oncology* 26(1): 81–88.
- Tsang, Julia Y S, and Gary M Tse. 2020. “Molecular Classification of Breast Cancer.” 27(1).
- Valla, Marit et al. 2016. “Molecular Subtypes of Breast Cancer : Long-Term Incidence Trends and Prognostic Differences.” : 1625–35.
- Vinolo, Marco A R et al. 2011. “SCFAs Induce Mouse Neutrophil Chemotaxis through the GPR43 Receptor.” 6(6).
- Wang, Guangwen et al. 2020. “Crossm The G Protein-Coupled Receptor FFAR2 Promotes.” 94(2): 1–21.
- Ward, Rebecca et al. 2015. “Monocytes and Macrophages, Implications for Breast Cancer Migration and Stem Cell-like Activity and Treatment.” *Oncotarget* 6(16): 14687–99. <http://www.oncotarget.com/fulltext/4189>.
- Won, Y.-J., V. B. Lu, H. L. Puhl, and S. R. Ikeda. 2013. “-Hydroxybutyrate Modulates N-Type Calcium Channels in Rat Sympathetic Neurons by Acting as an Agonist for the G-Protein-Coupled Receptor FFA3.” *Journal of Neuroscience* 33(49): 19314–25. <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.3102-13.2013>.
- Yang, Hong et al. 2020. “Impact of Molecular Subtypes on Metastatic Behavior and Overall Survival in Patients with Metastatic Breast Cancer : A Single - Center Study Combined with a Large Cohort Study Based on the Surveillance , Epidemiology and End Results Database.”
- Yin, Li, Jiang Jie Duan, Xiu Wu Bian, and Shi Cang Yu. 2020. “Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtyping and Treatment Progress.” *Breast Cancer Research* 22(1): 1–13.
- Yonezawa, Tomo et al. 2009. “Regulatory Peptides Short-Chain Fatty Acid Signaling Pathways in Bovine Mammary Epithelial Cells ☆.” *Regulatory Peptides* 153(1–3): 30–36. <http://dx.doi.org/10.1016/j.regpep.2008.11.012>.
- . 2013. “Free Fatty Acids-Sensing G Protein-Coupled Receptors in Drug Targeting and Therapeutics.” : 3855–71.

- Yonezawa, Tomo, Yosuke Kobayashi, and Yoshiaki Obara. 2007. "Short-Chain Fatty Acids Induce Acute Phosphorylation of the P38 Mitogen-Activated Protein Kinase / Heat Shock Protein 27 Pathway via GPR43 in the MCF-7 Human Breast Cancer Cell Line." 19: 185–93.
- Zhong, Xiaoming et al. 2020. "Circulating Tumor Cells in Cancer Patients: Developments and Clinical Applications for Immunotherapy." *Molecular Cancer* 19(1): 1–12.

## Anexo A: Aprovação Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – PUCRS)



### SIPESQ Sistema de Pesquisas da PUCRS

Código SIPESQ: 9011

Porto Alegre, 11 de dezembro de 2018

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "PAPEL DOS RECEPTORES DE ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA NA PROGRESSÃO DO CÂNCER DE MAMA" coordenado por MARIA MARTHA A C A M P O S .

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está autorizada a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Duração do Projeto: 11/12/2018 - 11/06/2020

Nº de Animais	Espécie
384	Camundongo
Total de Animais: 384	

Atenciosamente,

Comissão de Ética no Uso de Animais(CEUA)



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
Pró-Reitoria de Graduação  
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar  
Porto Alegre - RS - Brasil  
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564  
E-mail: [prograd@pucrs.br](mailto:prograd@pucrs.br)  
Site: [www.pucrs.br](http://www.pucrs.br)