

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GINA BORGHETTI

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE SOBRE A
EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA PROLIFERAÇÃO E MORTE
CELULAR NO TUMOR DE WALKER 256**

CURITIBA

2013

GINA BORGHETTI

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE SOBRE A
EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA PROLIFERAÇÃO E MORTE
CELULAR NO TUMOR DE WALKER 256**

Tese apresentada como requisito para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular, área de concentração Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes

CURITIBA

2013

Borghetti, Gina

Efeito da suplementação com óleo de peixe sobre a expressão de proteínas envolvidas na proliferação e morte celular no Tumor de Walker 256. / Gina Borghetti. – Curitiba, 2013.

111 f.: il., color. ; 30cm.

Orientador: Luiz Cláudio Fernandes

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Ácidos graxos 2. Óleo de peixe I. Título II. Fernandes, Luiz Cláudio III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR**

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Paraná
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:

Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes
Orientador e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Prof. Dr. Erasmo Benício Santos de Moraes Trindade
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Profa. Dra. Márcia Helena Appel
Universidade Estadual de Ponta Grossa UEPG

Profa. Dra. Andréa Novais Moreno Amaral
Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUCPR

Profa. Dra. Anete Curte Ferraz
Universidade Federal do Paraná - UFPR.

E tendo como suplentes:

Profa. Dra. Olga Meiri Chaim
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Profa. Dra. Adriana Frohlich Mercadante
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Após arguir a candidata **Gina Borghetti**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Efeito da suplementação com óleo de peixe sobre a expressão de proteínas envolvidas na proliferação e morte celular no Tumor de Walker 256", são de parecer favorável à **APROVAÇÃO** da acadêmica, habilitando-a ao título de Doutora em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em Fisiologia.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora, bem como ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 05 de Dezembro de 2013

AGRADECIMENTOS

A minha família pelo amor e apoio incondicional.

Aos meus amigos pela compreensão e carinho.

Ao “Professor” pela oportunidade de fazer parte do LABMETAB, pela confiança e paciência. Agradecimento especial de alguém que o admira como pessoa e profissional.

Aos meus colegas de Laboratório pelo auxílio nos experimentos e amizade: Aldre, Cíntia, Dalton, Everson, Fabíola, Gleisson, Juliano, Katya, Marcelo, Raci, Ricardo, Rica, Ricelli, Sandro, Sérgio, Thiago.

Em especial as minhas amigas inseparáveis Adri, Dani, Júlia e Isa.

Aos amigos que conheci durante esta estadia na UFPR. Em especial: Taísa, Valéria, Fernanda, Leo, Chelin, Dilza, Bia e Luiz Eduardo.

Aos Professores Silvio Marques Zanata e Lia Sumie Nakao pela gentileza em permitir a utilização de seus equipamentos. Obrigada a todos do Laboratório!

À Alessandra Antunes, pela oportunidade de aprender um pouquinho sobre expressão gênica e PCR em tempo real, por toda a paciência e disposição.

Ao pesquisador Andrew Oliveira Silva do Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular-UFRGS pela oportunidade de compartilhar seus conhecimentos.

À Professora Flávia Alessandra Guarnier-UEL pela doação das células de Tumor de Walker 256.

Aos alunos do Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos.

À Paula Borges Bassi do Laboratório de Biologia Molecular da Zoologia.

Aos Pesquisadores do LABIM-Grupo Boticário: Alessandro Afornali e Márcio Lorencini.

Aos Professores que participaram da Semana dos Doutorandos: Daniela Parada Pavoni, Márcia Helena Appel e Anete Curte Ferraz.

Aos Professores Ricardo Fernandez Perez e Edvaldo da Silva Trindade.

À Professora Katya Naliwaiko pelas análises do HPLC.

Aos Professores Rosalvo Fogaça e Ilana Kassouf Silva.

Ao Departamento de Farmacologia.

Aos Professores membros da Banca Examinadora: Erasmo Benicio Trindade, Andréa Novais Moreno Amaral, Marcia Helena Appel, Anete Curte Ferraz, Olga Meiri Chaim e Adriana Frohlich Mercadante

Aos funcionários do Biotério e do Laboratório Central.

Ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

À Fundação *Herbarium* pela disponibilização das cápsulas de óleo de peixe.

MUITO OBRIGADA!

“What we know is a drop, what we don't know is an ocean.”

Sir Isaac Newton, 1642 –172

RESUMO

Pesquisadores estão interessados no potencial efeito antitumoral de alguns nutrientes, entre eles os ácidos graxos poliinsaturados n-3 (AGPI n-3), devido à segurança e boa aceitação como adjuvante em terapias anti-câncer. Trabalhos prévios demonstraram que a suplementação com óleo de peixe, rico em AGPI n-3 reduziu o crescimento do tumor de Walker 256 e isto foi associado, em parte à redução da taxa de proliferação celular e do aumento de morte celular por apoptose. Entretanto, poucos experimentos realizados *in vivo* evidenciam que o óleo de peixe seja capaz de alterar a expressão de proteínas envolvidas em vias de sinalização de proliferação e morte celular. Assim, neste estudo, expandimos esta informação utilizando o modelo de Tumor de Walker 256 em ratos suplementados com óleo de peixe. Ratos Wistar de 70 dias foram divididos em três grupos: alimentados com ração padrão (W); alimentados com ração padrão e suplementados com óleo de peixe (WOP) e alimentados com ração padrão e suplementados com gordura de coco (WCO) (1g/Kg peso corporal/dia) via oral. Após completarem 100 dias de vida, todos os animais sofreram inoculação subcutânea de uma suspensão de células de tumor de Walker 256 no flanco direito, contendo 1×10^8 células. Os animais continuaram sendo suplementados e ao décimo quinto dia após a inoculação do tumor, todos os animais foram ortotansados, totalizando 44 dias de suplementação. Para investigar se a suplementação com óleo de peixe tinha algum efeito sobre a expressão de proteínas relacionadas com a proliferação e morte celular no tecido tumoral foi utilizada a técnica de western blotting. Na avaliação da expressão de RNA mensageiro (mRNA) no tecido tumoral foi utilizada a metodologia de RT-qPCR. Os dados demonstraram diminuição da expressão do mRNA e proteica de PPAR γ ($p < 0.05$), diminuição da expressão proteica de HRas ($p < 0.05$) e MMP 2 ($p < 0.05$), aumento da expressão proteica de p53 ($p < 0.05$), Bcl-2 ($p < 0.05$), caspase-7 clivada ($p < 0.05$) e caspase-3 clivada ($p < 0.05$) no tecido tumoral. Estes resultados sugerem que estas proteínas parecem estar envolvidas no efeito anti-proliferativo e pró-apoptótico do óleo de peixe no tumor de Walker 256. Em conjunto, estas informações podem ser úteis para melhorar nossa compreensão e adicionar informações sobre os mecanismos moleculares da ação antitumoral do óleo de peixe, que ainda não são completamente entendidos.

Palavras-chave: óleo de peixe, expressão proteica, proliferação celular, apoptose, tumor de Walker 256.

ABSTRACT

Scientists are interested in the potential antitumor effect of some nutrients, including n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFA) because their safety and overall acceptance as adjuvants in cancer therapies. Previous research demonstrated that fish oil supplementation, rich in n-3 PUFA, has decreased the growth in Walker 256 tumor and the mechanisms that explain, in part, this process was the reduction of cell proliferation and increased of cell death by apoptosis. However, a few experiments *in vivo* have provided data that fish oil is able to alter proliferative and apoptotic proteins expression in tumor tissue. In this report we expand this information in Walker 256 tumor-bearing rats supplemented with fish oil. Male Wistar rats were separated in the following groups: fed with regular chow (W); regular chow supplemented with fish oil (WOP) or coconut fat (WCO), both at 1g/kg body weight daily, until they reached 100 days of age. Then, all the animals were inoculated subcutaneously in the right flank with a suspension of Walker 256 ascitic tumor cells (1×10^8 cells). The animals continued to be supplemented until the fifteenth day after tumor inoculation when all animals were orthotanasied, summed 44 days of supplementation. To verify whether the fish oil supplementation had effect on the expression of proteins related to the proliferation and cell death in tumor tissue, western blotting analysis was performed. The RNA (mRNA) expression in tumor tissue was analyzed by RT-qPCR methodology. Taken together, our findings suggest that the decreased expression of the messenger mRNA and protein of PPAR gamma ($p < 0.05$), decreased the protein expression of HRAS ($p < 0.05$), and MMP 2 ($p < 0.05$), increased the protein expression of p53 ($p < 0.05$), Bcl-2 ($p < 0.05$), cleaved caspase-7 ($p < 0.05$), and cleaved caspase-3 ($p < 0.05$) seem to be involved in the anti-proliferative and anti-apoptotic effect of fish oil in Walker 256 tumor. This report is useful to improve our understanding and add more information about the molecular mechanisms of fish oil effect on tumor tissue, which still are not completely understood.

Key words: fish oil, protein expression, cell proliferation, apoptosis, Walker 256 tumor.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 Imagem de microscopia de luz da forma sólida do tumor de Walker 256 transplantada em ratos _____	17
FIGURA 2 Imagem de microscopia de luz do fluído peritoneal de um rato portador de tumor ascítico de Walker 256 _____	17
FIGURA 3 Visão geral sobre vias de sinalização na apoptose _____	21
FIGURA 4 Estrutura química dos AGPIs essenciais _____	34
FIGURA 5 Vias metabólicas de dessaturação e alongamento dos AGPIs _____	35
FIGURA 6 Vias metabólicas dos AGPI n-6 e AGPI n-3 _____	37
FIGURA 7 Razão AGPI n-6/n-3 analisado por HPLC _____	59
FIGURA 8 Expressão proteica de p65 no tecido tumoral analisado por western blotting _____	60
FIGURA 9 Expressão relativa de mRNA de RelA (p65) do tecido tumoral analisado por qRT-PCR _____	60
FIGURA 10 Expressão proteica no tecido tumoral analisado por western blotting (A) p52 (B) I κ B _____	61
FIGURA 11 Expressão proteica de PPAR γ no tecido tumoral analisado por western blotting _____	62
FIGURA 12 Expressão relativa de mRNA de Ppar γ no tecido tumoral analisado por qRT-PCR _____	62

FIGURA 13 Expressão proteica de PKC no tecido tumoral analisado por western blotting _____	63
FIGURA 14 Expressão proteica de HSP 70 no tecido tumoral analisado por western blotting _____	63
FIGURA 15 Expressão proteica de HRas no tecido tumoral analisado por western blotting _____	64
FIGURA 16 Expressão proteica de MMP 2 no tecido tumoral analisado por western blotting _____	65
FIGURA 17 Expressão proteica de p53 no tecido tumoral analisado por western blotting _____	65
FIGURA 18 Razão Bcl-2/Bax no tecido tumoral analisado por western blotting _____	66
FIGURA 19 Expressão proteica no tecido tumoral analisado por western blotting. (A) caspase-7(B) caspase-3 _____	67
FIGURA 20 Expressão proteica de PARP-1 clivado no tecido tumoral analisado por western blotting _____	68
FIGURA 21 Expressão proteica de caspase-3 e PARP-1 _____	69
FIGURA 22 Porcentagem de células marcadas com 7-ADD e Anexina analisadas por Citômetro de Fluxo _____	70
FIGURA 23 Expressão proteica de (A) COX-2, (B) p65, (C) PPAR γ , (D) Bcl-2, (E) p53, (F) HRas no soro analisado por western blotting _____	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Perfil de ácidos graxos obtido por HPLC _____	45
Tabela 2 Relação de anticorpos primários _____	50
Tabela 3 Sequência de primers utilizados em qPCR _____	53
Tabela 4 Valores de eficiência (E) de cada gene avaliado _____	54

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA	ácido araquidônico
AGPI n-3	ácido graxo poliinsaturado ômega-3
AGPI n-6	ácido graxo poliinsaturado ômega-6
AL	ácido linoléico
ALA	ácido alfa-linolênico
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
cDNA	DNA complementar
CH3	grupo metila
COOH	grupo reativo carboxila
COX	ciclooxigenase
CT	ciclo <i>threshold</i>
DEPC	dietilpirocarbonato
DHA	ácido docosahexaenóico
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTPs	desoxirribonucleosídeos trifosfatados
EPA	ácido eicosapentaenóico
FDA	Food and Drug Administration
HETE	ácido hidroxieicosatetraenóico
HPETE	ácido hidroxiperoxieicosatetraenóico
HPRT	Hipoxantina-guanina fosforibosil-transferase
HRP	horseradish peroxidase
HSP	proteína de choque térmico
IAP	inibidor de apoptose
IκB	inibidor do fator nuclear κB
LOX	lipooxigenase
LT	leocotrieno
LX	lipoxina
MMP	metaloproteinase de matriz

mRNA	RNA mensageiro
NF-kB	fator nuclear kappa B
P450	enzima de citocromo
p53	proteína p53
PARP	Poli (ADP-ribose) polimerase (PARP)
PCR	reação em cadeia de polimerase
PG	prostaglandina
PI3K	fosfoinositol-3-quinase
PKC	proteína quinase C
PPAR γ	receptor ativado pela proliferação de peroxissomos gama
PPRE	elemento responsivo específico da proliferação do peroxissomos
qPCR	PCR em tempo real quantitativo
Ras	rat sarcoma viral
RelA	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A
RIPA	modified radioimmunoprecipitation buffer
RNA	ácido ribonucléico
RT	transcriptase reversa
RT-qPCR	transcrição reversa - PCR em tempo real quantitativo
RXR	receptores retinóides X
SDSPAGE	eletroforese em gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio
TEMED	N,N,N',N'Tetrametiletileno-diamino
TX	tromboxana
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	VISÃO GERAL DE CÂNCER	14
1.2	TUMOR DE WALKER 256	16
1.3	VISÃO GERAL DA MORTE CELULAR POR APOPTOSE	19
1.4	PROTEÍNAS AVALIADAS	21
1.5	BIOMARCADORES DE SORO SANGUÍNEO	33
1.6	ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS N-3 (AGPI N-3)	34
1.7	FUNÇÕES BIOLÓGICAS DE AGPI N-3 NO CÂNCER	38
2	JUSTIFICATIVA	42
3	OBJETIVOS	43
3.1	OBJETIVO GERAL	43
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
4	MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	44
4.2	MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS DO TUMOR DE WALKER 256	46
4.3	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA	47
4.4	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO RELATIVA DE RNA MENSAGEIRO	50
4.5	AVALIAÇÃO DE MORTE CELULAR	54
4.6	AVALIAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS	55
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	57
5	RESULTADOS	58
6	DISCUSSÃO	74
7	CONCLUSÃO	92
8	REFERÊNCIAS	93
9	ANEXOS	104

1 INTRODUÇÃO

1.1 VISÃO GERAL DE CÂNCER

Câncer corresponde a um conjunto de doenças caracterizadas por inúmeras alterações genômicas e/ou epigenômicas que se acumulam nas células, criando um microambiente favorável à proliferação celular descontrolada. As interações com os componentes do estroma celular em um microambiente celular distinto fazem do câncer uma doença altamente complexa, ágil e versátil (CHIN & GRAY, 2008). Alguns fenômenos são descritos como determinantes ao câncer, como a auto-suficiência das células de tumores malignos na produção de fatores de crescimento, a falta de sinais inibitórios de proliferação celular, a existência de mecanismos que evitam a morte celular, a replicação sem limites e a sustentação da angiogênese (ZITVOGEL *et al.*, 2008).

Segundo a AMERICAN CANCER SOCIETY, 2012, o câncer corresponde a um grupo de doenças caracterizadas pelo crescimento descontrolado e proliferação de células anormais. A instabilidade do genoma é uma das características do câncer e, portanto, os fatores envolvidos na detecção e na resposta aos danos no DNA estão alterados. O câncer pode ser causado por fatores externos (tabaco, organismos infecciosos, produtos químicos, radiação etc) e/ou fatores internos (mutações hereditárias, hormônios, condições imunes etc). Estes podem agir em conjunto ou em sequência para iniciar ou promover o desenvolvimento de câncer.

A manutenção normal de qualquer organismo baseia-se em replicações celulares por divisão, para substituição de células e reparo de áreas teciduais lesadas. A divisão celular inicia-se pela replicação do DNA, processo extremamente eficiente, porém passível de erro, levando a alterações no material genético. O acúmulo dessas alterações em genes relacionados com a multiplicação e sobrevivência celular podem culminar em mudanças irreversíveis, favorecendo o desenvolvimento do câncer (VALDÉS-RAMOS *et al.*, 2007). Em

condições normais, a maioria das mutações é reparada, mas quando em quantidades elevadas e incompatíveis com a sobrevivência celular, a célula é destinada a morrer por apoptose. No câncer, os danos ao DNA são persistentes e resistem aos inúmeros processos de reparo e morte celular (MORRINSON, 2012).

As alterações em vias de sinalização de proliferação celular é uma das causas mais descritas em tumores. O aumento da expressão de fatores de crescimento e mutações de seus respectivos receptores, assim como mutação/superexpressão de proteínas de transdução de sinal sustenta a proliferação celular descontrolada (REBUCCI & MICHIELS, 2013). Outro mecanismo importante, porém ainda pouco conhecida é a comunicação entre os circuitos de proliferação e viabilidade celular. Acredita-se que os sinais de proliferação celular também forneçam sinais para sobrevivência celular, prevenindo assim, a morte destas células (MASUTANI & FUJIMORI, 2013; REBUCCI & MICHIELS, 2013).

As células tumorais desenvolveram estratégias para limitar ou evitar a morte celular. Estudos têm demonstrado que a morte celular programada, como a apoptose, serve como um obstáculo ao desenvolvimento do câncer através da eliminação de células danificadas. A superexpressão de proteínas anti-apoptóticas e inativação de genes pró-apoptóticos, assim como alterações na via de sinalização de p53 são abordagens utilizadas pelo câncer, porém não são exclusivas. De fato, a maioria das terapias anti-câncer, como o uso de drogas e/ou radiações, matam as células tumorais principalmente pela indução de apoptose (REBUCCI & MICHIELS, 2013).

A interpretação do conhecimento gerado a partir do genoma de um câncer é um dos principais desafios na era pós-genômica. Apesar da falta de compreensão sobre várias funções biológicas de muitos elementos genéticos, as informações obtidas a partir de diversos estudos biológicos e clínicos podem auxiliar nas análises funcionais e converter o conhecimento em prática clínica através de biomarcadores e terapêuticas mais eficazes (CHIN & GRAY, 2008). Pesquisas sobre o câncer têm recebido atenção ao longo das últimas décadas, devido ao aumento da incidência e/ou casos diagnosticados, tornando-se assim, um problema de saúde pública. O câncer é uma doença complexa, sendo algumas malignidades de difícil tratamento, e, ao mesmo tempo apresenta

múltiplos caminhos para a investigação clínica (LEWIS *et al.*, 2013).

1.2 TUMOR DE WALKER 256

A indução de câncer em animais e o cultivo de células tumorais são abordagens importantes para investigar a dinâmica tumoral, bem como as alterações causadas no organismo portador de tumor. O tumor de Walker 256 em ratos é geralmente utilizado em pesquisas experimentais de câncer por possuir baixa ocorrência de regressão tumoral, ser facilmente transplantado e ser espécie específica para ratos (FISHER & FISHER, 1961).

O tumor de Walker 256 se desenvolveu espontaneamente na região mamária de uma rata preta albina em torno de dez meses de idade, em 1928 no Laboratório de George Walker-*Johns Hopkins University School of Medicine*. O tumor observado por Walker exibia uma estrutura tumoral definido como adenocarcinoma (tecido glandular), por isso a sua origem mamária foi altamente suspeitada (FISHER & FISHER, 1961; AGOSTINO & CLIFFTON, 1968; CHEW, 1975). A massa tumoral tinha o tamanho de uma noz, composta de um tecido granular firme com pequenos pontos de necrose, sem a presença de metástase. Seccionado, o tumor se apresentava com uma área central semi-sólida de cor branca amarelada, com material necrótico, circundado por uma zona firme de coloração branco brilhante. Em 1956, as células de Walker 256 da massa tumoral foram transferidas para a forma ascítica, que são mantidas por passagens intraperitoneais sucessivas, sendo esta, uma variação do carcinoma (AGOSTINO & CLIFFTON, 1968) (Figura 1 e 2).

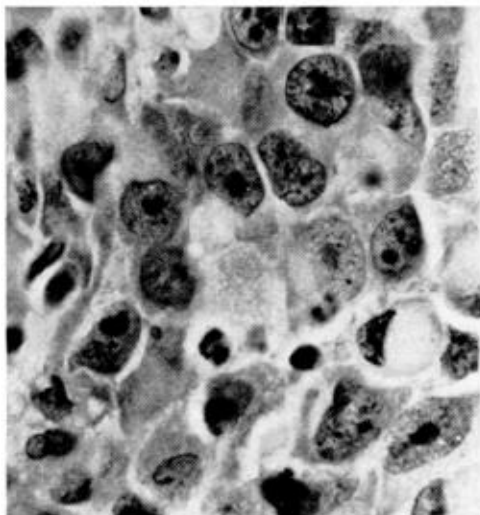


FIGURA 1 Imagem de microscopia de luz da forma sólida do tumor de Walker 256 transplantada em ratos. Visualização de células principais e células indiferenciadas coradas em hematoxilina e eosina. X 100. FONTE: AGOSTINO & CLIFFTON (1968).

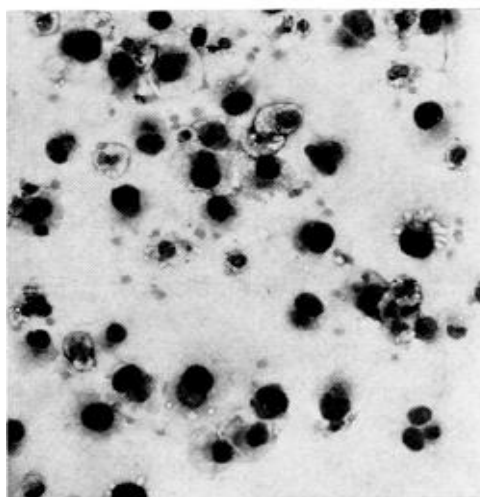


FIGURA 2 Imagem de microscopia de luz do fluido peritoneal de um rato portador de tumor ascítico de Walker 256. Visualização de células principais coradas em giemsa X 800. FONTE: AGOSTINO & CLIFFTON (1968).

Estudos em microscopia eletrônica e de transmissão indicaram que as células de tumor de Walker de origem ascítica e sólida são morfologicamente imperceptíveis. As células de fluido ascítico apresentam uma população heterogênea, porém quando estas células são cultivadas em suspensão, um único tipo celular é predominante. A eficiência de induzir a formação de tumores

sólidos a partir de células ascíticas é mais alta do que utilizar células provenientes de tumor sólido. As células provenientes do líquido ascítico são mais tumorigênicas do que quando são cultivadas em suspensão, sendo que mudanças nos antígenos de superfície dessas células provavelmente sejam responsáveis pela redução da tumorigenicidade primária (ARVELO *et al.*, 1984).

O tumor de Walker 256 pode ter sido originado como um tumor misto ou através de células troncos multipotentes se tornado em qualquer tipo celular. Análises imunofenótípicas de células de Walker 256 em cultura sugerem que sua célula de origem seja hematopoiética, o que parece ser uma célula monocitóide. Além disso, as propriedades de crescimento das células de Walker 256, na qual crescem na forma não aderente, lembram mais a cultura celular de linfóide/leucemia do que cultura de linhagem de células epiteliais, o que reforça este resultado (SIMPKINS *et al.*, 1991).

Estudos realizados com duas linhagens de células de Walker 256, obtidas a partir do American Type Culture Collection (ATCC) e Cell Resource Centre for Medical Research at Tohoku University (CRCTU) demonstraram variabilidade no perfil genético, diferenças no crescimento tumoral *in vivo* e diferenças morfológicas *in vitro*. Ambas as células foram coradas positivamente para citoqueratina 18, um marcador de células de câncer de mama. As células provenientes de CRCTU eram pequenas e cresceram de forma mais agressiva *in vivo* do que as células ATCC, que eram visivelmente maiores. Entretanto, poucos estudos foram realizados para determinar a relação entre a morfologia celular e a sua atividade tumorigênica, sendo que as características morfológicas encontradas *in vitro* apresentaram baixa correlação com a tumorigenicidade *in vivo* (LEWIS *et al.*, 2013).

As células de tumor de Walker 256 apresentam linhagens diferentes, denominadas como sensíveis (WS) e resistentes (WR) a cisplatina e clorambucil (SIMPKINS *et al.*, 1991), além de duas variantes, denominadas como metastizante (A) e não metastizante (B) (GUAITANI *et al.*, 1983). Algumas vias de inoculação podem ser utilizadas para administração das células de Walker 256, como: subcutânea, intramuscular, intraperitoneal, intracardiaca, sangüínea arterial, venosa e tecido ósseo. Na inoculação subcutânea ocorre o

desenvolvimento de tumores sólidos, firmes à palpação, encapsulados, podendo ocorrer infiltração da pele e da musculatura adjacente (GUIMARAES *et al.*, 2010).

1.3 VISÃO GERAL DA MORTE CELULAR POR APOPTOSE

A morte celular em suas diversas formas molda a essência da vida. Predominantemente, a morte celular por apoptose é de grande importância durante o desenvolvimento de um organismo, bem como na regulação do sistema imunitário. Além do envolvimento com a sobrevivência e a proliferação celular (CHAABANE *et al.*, 2013). A apoptose é uma das vias de morte celular programada, com importante envolvimento durante eventos fisiológicos e patológicos. A proliferação (mitose) é balanceada pela morte (apoptose) e um desequilíbrio a favor de um dos lados contribui para a patogênese (ULUKAYA *et al.*, 2011). Aproximadamente 10 milhões de células morrem por apoptose em um único dia em um humano adulto saudável. Este mecanismo é necessário, não só para preservar a homeostase do organismo, mas também para controlar o tamanho e a forma do tecido em diferentes estágios de desenvolvimento (CHAABANE *et al.*, 2013).

As células sofrem muitas alterações durante a apoptose. Enquanto a cromatina condensa-se, as células perdem a sua ligação com o ambiente. Ocorre arredondamento da célula, redução do volume celular, fragmentação nuclear e celular (blebbing da membrana) com posterior fragmentação celular em corpos apoptóticos e engolfamento por fagócitos. A fosfatidilserina, um fosfolípido incorporado na membrana plasmática, é exposto ao lado externo dos corpos apoptóticos, agindo como sinalizador para atrair os fagócitos e serem eficientemente fagocitados (CHAABANE *et al.*, 2013).

A apoptose é regulada por inúmeros moduladores, incluindo alguns íons (cálcio), genes (c-myc, Bcl-2, Bax, Fas), proteínas (p53, caspases, IAPs) e organelas (mitocôndria, retículo endoplasmático) (ULUKAYA *et al.*, 2011). Usualmente podem ser ativadas por duas vias principais, convergindo para a ativação de proteínas efetoras específicas de morte celular, as caspases (GRANCI *et al.*, 2010; FUKUI *et al.*, 2012).

De acordo com os modelos aceitos, existem duas vias distintas de apoptose: as que são induzidas por sinais de estresse extracelular (extrínseca) e estresse intracelular (intrínseca) (BRUNELLE & LETAI, 2009; GALLUZZI *et al.*, 2011). Apoptose extrínseca é mediada principalmente por receptores de morte (CD95, FAS, TNF etc), que proporcionam um sinal após ligação do ligante, resultando na ativação intracelular da caspase iniciadora (caspase-8) e executoras (caspase-3 e -6). Por outro lado, a apoptose intrínseca ocorre em resposta a inúmeras condições de estresse intracelular (danos no DNA, danos oxidativos) e é controlado principalmente pelos membros da família de proteínas Bcl-2 e pela mitocôndria (GALLUZZI *et al.*, 2011). Esta organela integra os estímulos de morte celular, induzindo a permeabilização mitocondrial e a consequente liberação de moléculas pró-apoptóticas no citosol (citocromo c), sendo um ponto de não retorno desta via. O citocromo c formará um complexo proteico com APAF-1 e pró-caspase-9, denominado apoptossomo. Na sequência ocorre a ativação da caspase iniciadora (caspase-9), que posteriormente ativará a caspase executora (caspase-3), assim como efetores múltiplos de morte celular, independentes de caspases (fator indutor de apoptose, endonuclease G) (GALLUZZI, 2011; ULUKAYA *et al.*, 2011) (Figura 3).

Muitas vezes diferentes tipos de morte celular ocorrem em paralelo. A detecção da atividade de uma via de morte celular não necessariamente significa que esta é a via predominante e que está levando a morte em um modelo em particular. Assim, uma análise de vários parâmetros e determinação do efeito de inibidores são sempre necessárias para revelar quais dessas vias tornam-se ativadas, e quais são as responsáveis pela morte celular (VIRÁG *et al.*, 2013). Vale a pena ressaltar que nenhuma das características morfológicas e processos associados com este tipo de morte podem ser utilizados sozinhos, como um indicador confiável de apoptose, pois algumas destas características podem se manifestar durante eventos não-apoptóticos de morte celular (GALLUZZI, 2011).

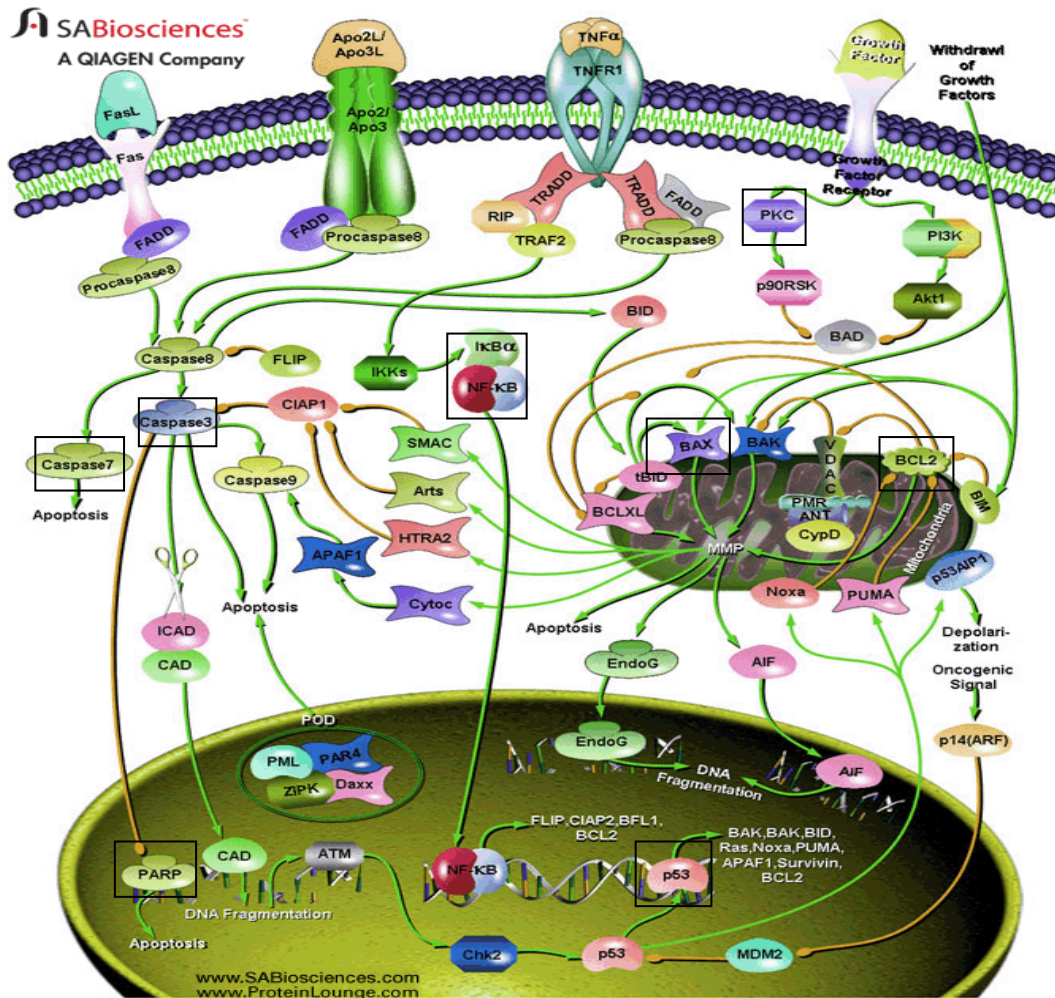


FIGURA 3 Visão geral sobre vias de sinalização na morte celular por apoptose. FONTE: SABiosciences (2013).

1.4 PROTEÍNAS AVALIADAS

As proteínas investigadas neste trabalho são descritas na literatura de câncer e fazem parte de importantes vias utilizadas pela maquinaria celular do câncer, como a proliferação e morte celular por apoptose.

1.4.1 p53

A proteína supressora de tumor p53 é também conhecida como “guardiã do genoma”, devido a sua função de monitorar a integridade do genoma. Além disso, ela pode se ligar em sequências específicas do DNA, agindo como um fator de

transcrição (ZHOU *et al.*, 2006). Análises de microarranjo revelaram que os genes regulados por p53 não se limitam apenas aqueles envolvidos no ciclo celular e apoptose. Genes associados com a reparação do DNA, transcrição, adesão celular, mobilidade celular, metabolismo e funções de membrana também podem ser afetados pela atividade de p53 (VOUSDEN & PRIVES, 2009). Alternativamente, p53 pode provocar alterações independentes de transcrição, influenciando diretamente a via mitocondrial, facilitando a apoptose celular (ZHOU *et al.*, 2006).

O equilíbrio intra e extracelular nos eventos de sinalização definem se a ativação de p53 poupará a célula ou levará à sua morte por apoptose. Na ausência de estresse celular, a proteína p53 é mantida em concentrações baixas, pela constante degradação e síntese, sem desempenhar efeito sobre o destino da célula (OREN, 2003; VOUSDEN & PRIVES, 2009).

O gene p53 é um dos que mais sofrem mutações em diversos cânceres, sendo a sua perda funcional, um dos responsáveis pela progressão tumoral (VOUSDEN & PRIVES, 2009). Apesar de fatores de transcrição regularem o gene p53, os principais mecanismos que administram a atividade de p53 parecem ser exercidos em nível de proteína, como estabilidade, modificações pós-traducionais, interações proteína-proteína (OREN, 2003; ZHOU *et al.*, 2006).

A capacidade de p53 em inibir a proliferação celular, tanto bloqueando a progressão do ciclo celular quanto promovendo a morte celular por apoptose, proporciona um mecanismo útil na diminuição do crescimento de células tumorais. Muitos modelos experimentais que investigam a função de p53 sugerem que a indução de morte celular programada é um mecanismo fundamental pelo qual a p53 suprime as células tumorais. Entretanto, novos estudos indicam que outras funções de p53 podem ser igualmente importantes para prevenir ou retardar o desenvolvimento do câncer. Atividades anti-angiogênicas, bloqueio da progressão do ciclo celular e a promoção de senescência e autofagia também parecem ser regulados por p53 (VOUSDEN & PRIVES, 2009).

1.4.2 Família Bcl-2

A família de proteínas Bcl-2 consiste em pelo menos 30 proteínas relacionadas, divididas em três subclasses com base em características estruturais e funcionais:

1. Anti-apoptóticas: Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, e Mcl-1. A proteína Bcl-2 é uma das proteínas que inibem a apoptose através da preservação da integridade da membrana mitocondrial. Além disso, ela impede a formação de dímeros formados por BAX e BAK, o que leva à liberação de moléculas apoptóticas da mitocôndria. A Bcl-2 tem a capacidade de ligar-se a proteínas pró-apoptóticas, inativando-as. Além disso, compete por sítios que seriam ocupados por estas proteínas na membrana mitocondrial, inibindo assim a apoptose. A Bcl-2 pode ainda regular a ativação de várias caspases iniciadoras e agir diretamente na inibição da liberação de citocromo c pela mitocôndria (TZIFI *et al.*, 2012).

2. Pró-apoptóticas: Bax, Bak, e Bok. Após a estimulação de apoptose, a proteína Bax, a qual está normalmente localizada no citoplasma, liga-se a membrana mitocondrial. Este é considerado o "ponto de não retorno" no processo de morte celular, uma vez que vários fatores pró-apoptóticos importantes podem ser liberados através dos poros formados, incluindo citocromo c, Smac / Diablo, e o fator de indução de apoptose (AIF). Entretanto, a indução de apoptose pode ser impedida pelo aumento da expressão de Bcl-2, uma vez que esta proteína forma heterodímeros com o Bax, prejudicando assim a sua função pró-apoptótica (ZECCHIN *et al.*, 2007).

3. BH3: incluem uma série de proteínas com domínio BH3, como BID, BIM, BIK, BAD, BMF, HRK, DIVA, NOXA e PUMA. Atuam como sensores de estresse e são organizados com base em sua capacidade de ativar ou inibir outros membros da família Bcl-2 (TZIFI *et al.*, 2012; ZHANG & SAGHATELIAN, 2013).

O equilíbrio entre as proteínas Bax e Bcl-2 é um importante fator para o balanço pró-apoptótico ou antiapoptótico na célula. A relação Bcl-2/Bax pode ser um dos fatores que influenciam a indução de apoptose, uma vez que uma baixa proporção Bcl-2/Bax pode levar à apoptose, enquanto que altas taxas podem tornar as células resistentes a estímulos apoptóticos (ZECCHIN *et al.*, 2007).

Acreditava-se apenas que o balanço entre as proteínas da família Bcl-2

poderiam determinar o destino de uma célula. Embora as proporções de proteínas anti-e pró-apoptose de fato geralmente correlacionam-se com o destino da célula, este modelo é simplista à luz de descobertas subseqüentes. A complexidade deste processo é muito maior do que se imaginava, sendo que estudos encontraram interações adicionais entre as várias vias de sinalização de morte celular além de interações adicionais entre os próprios membros da família Bcl-2. Devido a isso, a indução de morte não pode ser totalmente explicada apenas pela atividade clássica em que as proteínas anti-apoptóticas se ligam e inibem diretamente a proteínas pro-apoptóticas para controlar a liberação do citocromo c pela mitocôndria (HARDWICK & SOANE, 2013).

1.4.3 Caspases

O mecanismo de apoptose é evolutivamente conservado e executado por uma família de proteínas citoplasmáticas (proteases cisteíno-aspártica), designadas caspases. Elas são sintetizadas como zimogênios latentes (pró-caspases) e ativadas por clivagem proteolítica em sítios específicos (TZIFI *et al.*, 2012). A sua ativação é regulada essencialmente pelas proteínas da família Bcl-2. Uma vez ativadas, as caspases clivam, e assim ativam outras pró-caspases, resultando numa cascata coordenada de reações proteolíticas (TZIFI *et al.*, 2012; ULUKAYA *et al.*, 2012).

Já foram identificadas quatorze caspases, sendo que a maioria está envolvida no processo de apoptose, sendo um dos marcadores moleculares mais proeminentes deste processo. Possuem um papel importante, tanto no início (caspases iniciadoras -8 e -9) quanto na execução (caspases executoras -3, -6 e -7) do processo de apoptose (GALLUZZI *et al.*, 2012). O tipo de caspase expressa por um dado tecido pode variar, contudo sabe-se que a caspase-3 é denominada caspase universal por estar expressa em quase todos os tecidos (ULUKAYA *et al.*, 2012). Ambas as vias de apoptose (intrínseca e extrínseca) convergem para a ativação de uma caspase executora, a caspase-3 (FAN *et al.*, 2005; SANKARI *et al.*, 2013), porém a via intrínseca da apoptose pode ocorrer independente da ativação das caspases (GALLUZZI *et al.*, 2012).

As caspases iniciadoras transmitem o sinal gerado pela morte celular por

apoptose para às caspases executores, que por sua vez ativam proteínas-alvo, como as proteínas de citoesqueleto, proteína de membrana nuclear, proteínas de reparação de DNA (PARP) e, assim, determinam as características morfológicas típicas de apoptose (TZIFI *et al.*, 2012; ULUKAYA *et al.*, 2012). Um inibidor de apoptose, denominado XIAP foi identificado como a única proteína celular capaz de se ligar diretamente a caspase-3, -7 e -9 inibindo tanto a fase de iniciação quanto a de execução da apoptose. Assim, a decisão celular entre as vias pró e anti-apoptóticas é devido principalmente à regulação da atividade das caspases, XIAP e circuitos reguladores intracelulares incluindo mitocôndrias e Smac/DIABLO citosólicos. Sendo este último, conhecido como antagonista da função de XIAP, resultando em maior atividade da caspase-3 (HORNLE *et al.*, 2010).

Ainda não está claro se as caspases executoras -3 e -7 são funcionalmente redundantes. Elas são as mais semelhantes em comparação com as outras caspases e são capazes de clivar o mesmo grupo de substratos para coordenar os eventos terminais da apoptose. Além disso, ambas são ativadas durante a apoptose, independente do sinal recebido para a indução da apoptose (WALSH *et al.*, 2008).

1.4.4 PARP-1

A Poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) faz parte de uma família de proteínas com funções reguladoras desempenhando diversas funções celulares (MASUTANI & FUJIMORI, 2013). São enzimas associadas á cromatina com funções chave na estabilidade cromossomal, regulação da apoptose, divisão celular, regulação da transcrição, diferenciação e resposta celular a danos no DNA. PARPs são responsáveis pela reparação de danos sofridos ao DNA causados por estresses ambientais e erros de replicação, atuando como sensores e recrutando moléculas de reparação. Apesar dos significativos avanços na compreensão do papel de PARP na reparação do DNA, ainda não está claro se PARP pode ser regulado em todos os tipos de tumores ou se é específico a alguns subtipos celulares (OSSOVSKAYA *et al.*, 2010; VIRÁG *et al.*, 2013).

Na última década, abordagens genômicas levaram à identificação de 17

sequências de PARP no genoma humano, e uma quantidade significativa de informações estruturais e funcionais tem sido coletada por pelo menos cinco enzimas: PARP-1, PARP-2, PARP-3, PARP-4 e PARP-5. Devido à escassez ou falta de informação, atualmente a enzima mais estudada é a PARP-1, que se sobressai como um dos importantes participantes da morte celular em mamíferos. Esta é uma proteína nuclear abundante, contendo três domínios principais: um domínio N-terminal de ligação ao DNA (DBD), um domínio auto-modificado central e um domínio catalítico de C-terminal (MASUTANI & FUJIMORI, 2013; VIRÁG *et al.*, 2013).

A clivagem de PARP-1 por caspases foi um dos primeiros marcadores bioquímicos de morte celular por apoptose. Uma descoberta chave que relaciona PARP-1 a apoptose é que este pode ser substrato das caspase-3 e 7, sendo a detecção da sua clivagem amplamente utilizada como uma característica da apoptose (MASUTANI & FUJIMORI, 2013). Após sofrer vários danos no DNA e PARP-1 ser clivado ocorre a indução de morte celular por apoptose. Neste tipo de morte, a atividade de PARP-1 parece ser essencial, pois estudos utilizando inibidores de PARP foi determinante na supressão da apoptose. Entretanto, alguns estudos evidenciam a existência de vias independentes de ativação de PARP-1 na apoptose (MASUTANI & FUJIMORI, 2013; VIRÁG *et al.*, 2013) e de sua participação em outras vias de sinalização de morte celular como autofagia e necroptose (VIRÁG *et al.*, 2013).

Como muitas outras enzimas reguladoras que atuam no núcleo, PARP-1 é igualmente sujeita a ações regulatórias de efetores que podem controlar sua atividade e função. Na última década, estudos foram focados na atividade enzimática de PARP-1 relacionados aos danos sofridos ao DNA, na tentativa de elucidar os mecanismos que regulam a sua atividade e função (OSSOVSKAYA *et al.*, 2010; MASUTANI & FUJIMORI, 2013).

1.4.5 PPAR γ

Os receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPARs) são fatores de transcrição pertencentes à família de receptores nucleares. Três proteínas, codificadas por genes distintos têm sido identificadas: PPAR α , PPAR β

e PPAR γ . Estes dividem um elevado grau de homologia, porém se diferem na distribuição nos tecidos e da especificidade dos ligantes (YOUSSEF & BADR, 2011). Estão relacionados com o metabolismo lipídico, homeostase da glicose, processo inflamatório, diferenciação celular e morte celular por apoptose. Além do envolvimento em várias doenças e condições patológicas relacionados com a imunidade, inflamação, fertilidade e vários tipos de cânceres (YAO *et al.*, 2010; YOUSSEF & BADR, 2011).

Os PPARs são ligantes dependentes que regulam a expressão de genes alvos. Antes de ocorrer a ligação PPAR-ligante, os PPARs se heterodimerizam com membros de outra subfamília de receptores nucleares, os receptores retinóides X (RXR), formando o complexo PPARs-RXR. Este complexo é necessário para a ligação em sequências específicas do DNA, denominados elementos de resposta ao PPAR (PPRE) situados na região promotora de genes alvos. Após a ligação PPAR-ligante, os PPARs sofrem alterações conformacionais permitindo a liberação de co-repressores, e o recrutamento de coativadores, seguido pela ativação ou não do mecanismo transcrição (VARGA *et al.*, 2011 ; YOUSSEF & BADR, 2011). Além disso, os PPARs também podem agir como receptores intracelulares de moléculas lipídicas (VARGA *et al.*, 2011). Os ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) e certos produtos de sua oxidação são exemplos de substâncias que podem ser ligantes endógenos de PPARs (LI *et al.*, 2012). A constatação de que os ácidos graxos podem se ligar e ativar receptores nucleares, que por sua vez regulam a expressão de genes, provocou uma mudança na forma como pensamos sobre o papel dos ácidos graxos provenientes da alimentação (VARGA *et al.*, 2011)

Devido às evidências de efeitos opostos que os PPARs desempenham no câncer, não há um mecanismo unificado universalmente aceito para descrever suas ações. Portanto, apenas existem hipóteses na tentativa de explicar os efeitos observados. Na literatura encontramos dados contraditórios sobre os PPARs, como seu envolvimento na promoção e no desenvolvimento do câncer, assim como seus efeitos protetivos. Enquanto estudos relatam que a expressão destes receptores e/ou a sua ativação correlaciona-se com um resultado positivo, este processo não parece ser um fenômeno universal. Esta complexidade em suas ações pode ser devido ao tipo de célula e efeitos específicos de um órgão,

efeitos independentes dos ligantes de PPAR utilizados, fase de formação do câncer, exposição do ligante PPARs etc (YOUSSEF & BADR, 2011).

Estudos demonstram a participação de PPAR γ na carcinogênese (ESCOBAR *et al.*, 2009). O aumento da expressão de PPAR γ é frequentemente encontrado em diferentes tumores malignos. Alguns estudos sugerem seu envolvimento na progressão de câncer de próstata humano e que a família de PPARs provavelmente seja o intermediador entre dietas de ácidos graxos e crescimento tumoral prostático (ESCOBAR *et al.*, 2009). Sugere-se que a ativação de PPAR γ iniba o crescimento celular assim como tem envolvimento na diferenciação e apoptose em vários tipos de células neoplásicas. A ativação do PPAR γ por um agonista (rosiglitazona) altera a permeabilidade da membrana mitocondrial, um importante mecanismo na indução de apoptose celular, sendo este efeito bloqueado na presença de um antagonista de PPAR γ (YOUSSEF & BADR, 2011). Apesar disso a literatura demonstra resultados contraditórios do efeito dos agonistas de PPAR γ em diversos tipos de tumores (CHÊNE *et al.*, 2007; CHAPKIN *et al.*, 2009).

1.4.6 HSP 70

Entre as mudanças na atividade celular, o evento mais notável nas células sob estresse é a produção de um conjunto de proteínas conservadas denominadas proteínas de choque térmico (HSPs) (KHALIL *et al.*, 2011). Estas fazem parte de uma família de proteínas induzidas em células expostas a diferentes injúrias, permitindo a sobrevivência das células às condições de estresse. As HSPs em mamífero foram classificadas em seis famílias, de acordo com o seu tamanho molecular: Hsp 100, HSP 90, HSP 70, HSP 60, Hsp 40 e pequenas HSPs (15 a 30 kDa), incluindo HSP 27. Estas proteínas agem como chaperonas moleculares, auxiliando no enovelamento de proteínas, prevenindo a sua agregação ou a sua eliminação, se irreversivelmente danificadas (BEERE, 2004; KHALIL *et al.*, 2011)

Cada família de HSPs é composta por membros que são expressos constitutivamente, na qual são direcionadas a diferentes compartimentos celulares. A HSP 27 e HSP 70 são induzidas por diferentes estresses, sendo a

sua expressão baixa em condições fisiológicas. Além de sua localização intracelular, a HSP 70 também pode ser encontrada na membrana plasmática de células malignas e no espaço extracelular. Isso leva em conta a função dupla de HSPs: a função citoprotetora e anti-apoptótica intracelular, e a função imunogênica extracelular (KHALIL *et al.*, 2011).

Em tumores, a HSP 70 parece ser necessária para a sobrevivência celular. Sua maior expressão é provavelmente causada por condições que imitam o estresse. Poderiam atuar neutralizando as alterações conformacionais em proteínas mutantes, inibindo vias de morte de celular e inativando diretamente a proteína supressora de tumor p53 (ZUIDERWEG *et al.*, 2012). Estudos têm caracterizado diferentes HSPs em diversos tipos de tumores, que poderiam ser utilizados como biomarcadores clínicos ou alvos moleculares. Numerosos estudos investigam se a expressão aumentada de HSP pode ser, em parte, responsável pela resistência a muitos agentes anti-tumorais e quimioterápicos. Assim, de um ponto de vista farmacológico, a co-administração de inibidores de HSP em conjunto com outros agentes anti-tumorais é de grande importância na terapêutica anti-câncer (KHALIL *et al.* 2011).

1.4.7 HRas

A família de oncogenes RAS (*rat sarcoma viral*) são proteínas que se ligam a nucleotídeos de guanina, localizadas principalmente na membrana celular e são envolvidas em vias de transdução de sinal (PYLAYEVA-GUPTA *et al.*, 2011). O mecanismo básico da regulação de atividade de Ras envolve pelo menos dois tipos de proteínas (GEFs e GAPs). A Ras inativa se encontra ligada à GDP (Ras-GDP), sendo que GEFs catalisam a troca de GDP por GTP, levando a uma modificação conformacional expondo alguns domínios que podem interagir com vários efetores. Já foram identificados mais de vinte efetores de Ras, sendo que a maioria se concentra sobre a família de proteína quinase Raf (A-Raf, B-Raf e c-Raf-1) e fosfoinositol-3-quinase (PI3K), reguladores da proliferação e sobrevivência celular respectivamente (PRIOR & HANCOCK, 2012).

Quando ativada, Ras é uma das primeiras proteínas que participam de vias de transdução de sinal que podem regular a proliferação celular, diferenciação,

alterações no citoesqueleto, senescência e apoptose (PYLAYEVA-GUPTA *et al.*, 2011; PRIOR & HANCOCK, 2012). As células apresentam três isoformas de Ras: HRas, KRas e NRas, codificadas por genes distintos. Apesar do elevado grau de homologia dessas isoformas, estas não são funcionalmente redundantes. Além disso, a sua localização predominante na membrana plasmática, não significa que seja o seu local exclusivo de ação (PRIOR & HANCOCK, 2012).

Estudos indicaram que a ativação constitutiva de Ras pode ser uma das responsáveis pela proliferação celular no câncer. Além disso, aumenta a capacidade proliferativa das células por indução da transcrição de fatores de crescimento e integrinas, além interferir diretamente na morte celular através de vias de apoptose (PYLAYEVA-GUPTA *et al.*, 2011).

1.4.8 MMP-2

As metaloproteinases de matriz (MMPs) fazem parte de uma família de enzimas proteolíticas zinco-dependentes, responsáveis pela degradação de um vasto número de proteínas alvo que compõem a matriz extracelular (MEC). As MMPs são inicialmente expressas como pró-enzimas inativas, que necessitam de processamento proteolítico para liberação da enzima ativa (ROOMI *et al.*, 2008; (BOURBOULIA *et al.*, 2010). Mais de vinte MMPs são conhecidas, agindo sobre diferentes substratos, incluindo colágeno do tipo I, II, III, IV. Estes subgrupos são divididos de acordo com a sua estrutura e especificidade para o substrato. Entre as várias MMPs que foram identificadas, as gelatinases, especialmente MMP-2 (gelatinase A) e MMP-9 (gelatinase B) desempenham importante papel na degradação de colágeno IV, um dos componentes principais da MEC (ROOMI *et al.*, 2008).

A atividade proteolítica das MMPs pode ser primariamente controlada pelos inibidores de metaloproteinases teciduais (TIMPs). Estes bloqueiam a atividade das MMPs ligando-se ao sítio de zinco. Alterações no equilíbrio entre as MMPs e TIMPs têm sido identificadas em doenças como no câncer. Devido a maior degradação da matriz extracelular, as MMPs agem como facilitadoras da invasão e metástase no câncer (BREW & NAGASE, 2010).

Um dos eventos necessários para a invasão tumoral é a degradação de MEC, que atua como uma barreira à propagação das células tumorais, restringindo o crescimento e invasão tumoral. Observa-se um aumento da expressão de MMP-2 e MMP-9 em vários tumores humanos, incluindo ovário, mama, próstata e melanoma, sendo relacionadas com a invasão celular e agressividade (ROOMI *et al.*, 2008;GRANCI *et al.*, 2010).

1.4.9 NF-kB

A família de fatores de transcrição nuclear kappa B (NF-kB) é composta por cinco membros principais: RelA (p65), RelB, c-Rel, o NF-kB1 (p50/p105) e o NF-kB2 (p52/100). Estas proteínas se apresentam na forma de homo ou heterodímeros, sendo sua atividade regulada principalmente por uma família de proteínas denominada inibidores de kappa B (IKBs). A ligação de Ikb impede a translocação do complexo NF-kB para o núcleo, mantendo-o assim, em estado inativo (HAYDEN & GHOSH, 2004). Dentre as proteínas que compõem a família NF-kB, as que participam da via clássica, sob a forma de heterodímero são as proteínas p50 e RelA e da não clássica as proteínas p52 e RelB (COUPIENNE *et al.*, 2010). A via clássica pode ser ativada por citocinas próinflamatórias ou pela presença de patógenos. Nesta via, os dímeros do NF-kB, p65/p50, tornam-se ativos por meio da fosforilação do complexo quinase Ikb (IKK) e a regulação de proteínas não enzimáticas (NEMO). Após a degradação do Ikb, os dímeros do NF-kB são translocados para o núcleo. A via não clássica pode ser ativada por um grupo mais limitado de citocinas. Por meio da fosforilação de quinases (NIK), o complexo IKK torna-se ativo e promove a translocação dos dímeros do NF-kB para o núcleo (HAYDEN & GHOSH, 2004).

Algumas vias de sinalização envolvidas na inflamação também podem fornecer sinais para a sobrevivência e proliferação celular, levando à progressão tumoral. A ativação e/ou a expressão de NF-kB tem sido observada em tumores sólidos humanos, sendo resultado do microambiente inflamatório da patologia, sendo um elemento crítico entre inflamação e câncer (MORRINSON, 2012). Estudos evidenciaram que a ativação constitutiva de NF-kB está presente na maioria das células tumorais e a sua inibição pode suprimir o seu crescimento.

Portanto o NF- κ B não só regula a transcrição de proteínas inflamatórias, mas também aumenta a expressão das proteínas anti-apoptóticas (REBUCCI & MICHIELS, 2013). Sendo assim, agentes que promovem a inibição da ativação do NF- κ B tem se tornado alvos terapêuticos promissores (HAYDEN & GHOSH, 2004).

1.4.10 PKC

A família de proteína quinase C (PKC) representa um grande grupo de enzimas que podem regular a função de outras proteínas. As PKCs quando ativadas por uma variedade de sinais extracelulares, modificam a atividade de proteínas celulares, como receptores, enzimas, proteínas do citoesqueleto e fatores de transcrição. Elas são dependentes de fosfolipídeos e catalisam a transferência covalente de fosfato de ATP para os resíduos de serina e treonina de proteínas. Esta fosforilação de proteínas induz alterações conformacionais, resultando em modificação de suas propriedades funcionais. Logo, as PKCs são importantes na regulação de várias cascatas de transdução de sinal (BREITKREUTZ *et al.*, 2007; LOEGERING & LENNARTZ 2011).

Existem isoformas de PKCs que são divididas de acordo com o segundo mensageiro necessário para sua ativação, podendo ser íons cálcio, diacilglicerol e fosfatitilserina. Outra característica importante é a associação de isoformas PKC com fosfolípidos, formando complexos estáveis da membrana celular (BREITKREUTZ *et al.*, 2007). Diferentes isoformas estão envolvidas em funções essenciais, como o crescimento celular, diferenciação, apoptose, motilidade e secreção. Por isso estas enzimas têm sido relacionadas com alguns estados patológicos, incluindo câncer e doença cardiovascular (BREITKREUTZ *et al.*, 2007; LOEGERING & LENNARTZ, 2011).

O papel da PKC no câncer é complexo, pois sua ação é tecido específico e muitas vezes apresentam efeitos opostos devido ao efeito de diferentes isoformas, principalmente relacionados com o ciclo celular e morte celular por apoptose (LOEGERING & LENNARTZ, 2011). Anormalidades na função de PKC, como alterações de expressão, ativação, distribuição e fosforilação ocorrem em vários tipos de câncer. Alguns estudos evidenciam que a ativação de algumas

PKCs e a desativação de outras é fundamental para a indução da carcinogênese e progressão tumoral (BREITKREUTZ *et al.*, 2007).

1.5 BIOMARCADORES DE SORO

Os biomarcadores são biomoléculas associadas com o risco aumentado de uma doença ou servem como indicadores de processos biológicos, patológicos ou farmacológicos. Devido ao seu significado clínico, a identificação de biomarcadores no soro pode ser uma promessa, especialmente para fins de diagnóstico e prognóstico de uma doença. Um bom marcador deve apresentar alta especificidade ao efeito de interesse, refletir o efeito com acurácia e precisão, ser de fácil análise com baixo custo e possuir alta sensibilidade no fluido biológico escolhido (HEO *et al.*, 2012). O sangue como instrumento clínico tem um número de vantagens em relação a outros fluidos biológicos. Este pode ser obtido em quantidades adequadas de amostragem, contém uma variedade de proteínas circulantes, sendo relativamente acessível e de simples obtenção e processamento (ZHANG *et al.*, 2013).

A remodelação de células tumorais no processo de tumorigênese provoca alterações no padrão de expressão de proteínas e no microambiente do tumor, acompanhado de secreção de proteínas diferentes daquelas de células normais (HEO *et al.*, 2012). Análises do proteoma de soro humano poderiam contribuir para a compreensão da fisiopatologia do câncer e fornecer uma base para o reconhecimento de potenciais biomarcadores (ZHANG *et al.*, 2013). Apesar de se tornar um campo de interesse na prática clínica ainda existe dificuldades a serem superadas. Muitos estudos foram realizados na tentativa de descobrir alterações moleculares, em especial, proteínas derivadas de células tumorais presentes no sangue. Entretanto, a maioria dos marcadores proteicos não é aprovada nos ensaios clínicos. Há várias razões para isso, incluindo a curta meia-vida e baixas concentrações de proteínas tumorais no sangue, bem como a heterogeneidade de proteínas de células tumorais (HEO *et al.*, 2012).

1.6 ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS N-3 (AGPI N-3)

Os ácidos graxos são constituintes da dieta humana com funções metabólicas, estruturais e funcionais. São importantes fontes de energia, fazem parte das membranas celulares e são precursores de moléculas sinalizadoras (CALDER, 2011). Todos ácidos graxos possuem uma estrutura geral baseada em uma cadeia de hidrocarbonos, com um grupo reativo carboxila (COOH) em uma extremidade e um grupo metil (CH₃) em outra. O termo ácido graxo poliinsaturado (AGPI) refere-se aos ácidos graxos cujas moléculas possuem duas ou mais duplas ligações. A denominação ω ou n diferencia os ácidos graxos em relação à posição da primeira dupla ligação, contada a partir do grupamento metil (SALA-VILA *et al.*, 2008 ; CALDER, 2011) (Figura 4).

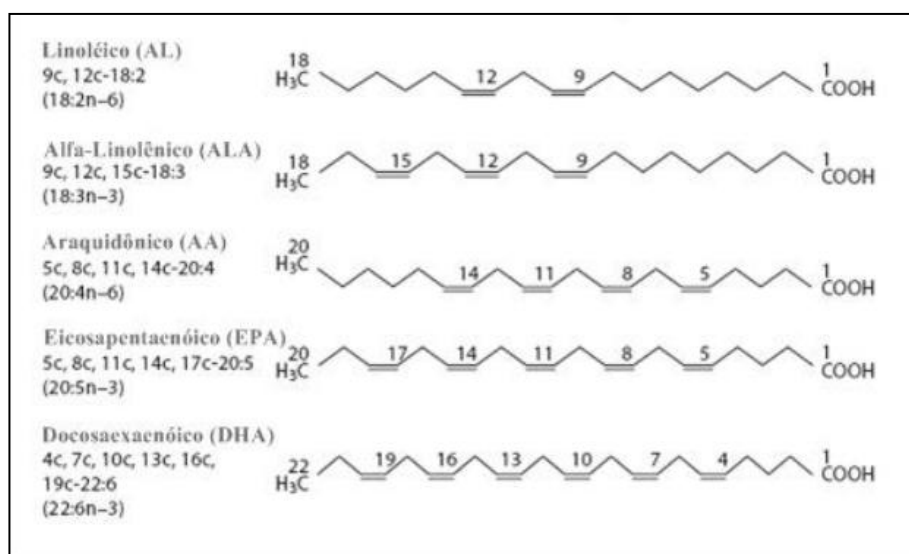


FIGURA 4 Estrutura química dos ácidos graxos poliinsaturados essenciais. Família de AGPI n-6: AL e AA e a família de AGPI n-3: ALA, EP e DHA. FONTE: SALA-VILA & CALDER (2008).

Existem duas famílias importantes de ácidos graxos poliinsaturados: AGPI n-6, derivado do ácido linolêico (AL) 18:2; e o AGPI n-3, derivado do ácido α -linolênico (ALA) 18:3 (SALA-VILA *et al.*, 2008; WILLIANS *et al.*, 2011). Estes são denominados ácidos graxos essenciais, pois não podem ser sintetizados no organismo de mamíferos, pela ausência das enzimas dessaturases, sendo

necessária a sua obtenção através da dieta (KANG & LIU, 2012). Em plantas, ALA é sintetizado a partir do AL por dessaturação, catalisada pela enzima delta15-dessaturase. Os animais não possuem esta enzima, não sendo capazes de sintetizar ALA. Entretanto, AGPI n-3 e n-6 podem ser alongados e dessaturados para formar outros ácidos graxos da mesma série de cadeia mais longa, contendo 20 e 22 carbonos, e mais insaturados (CALDER 2012a). AL e ALA são substratos das mesmas dessaturases de forma que as famílias n-3 e n-6, competem entre si pelas mesmas enzimas na via metabólica (SALA-VILA *et al.*,2008). A família AGPI n-6 é convertida em ácido araquidônico (AA 20:4) e a família AGPI n-3 em ácido eicosapentaenóico (EPA 20:5) e em ácido docosahexaenóico (DHA 22:4) (SIMOPOULOS, 2010) (Figura 5). As enzimas desta via metabólica priorizam o ALA, mas em altas concentrações de AL podem inibir a conversão do ALA em EPA e DHA, reduzindo a disponibilidade destes ácidos graxos (CALDER, 2012a). Na maioria dos mamíferos, a eficiência da conversão de ALA em EPA e DHA é relativamente baixa, principalmente na presença de altas quantidades de AL, geralmente presentes nas dietas ocidentais (SIMOPOULOS, 2010; CALVIELLO *et al.*, 2013).

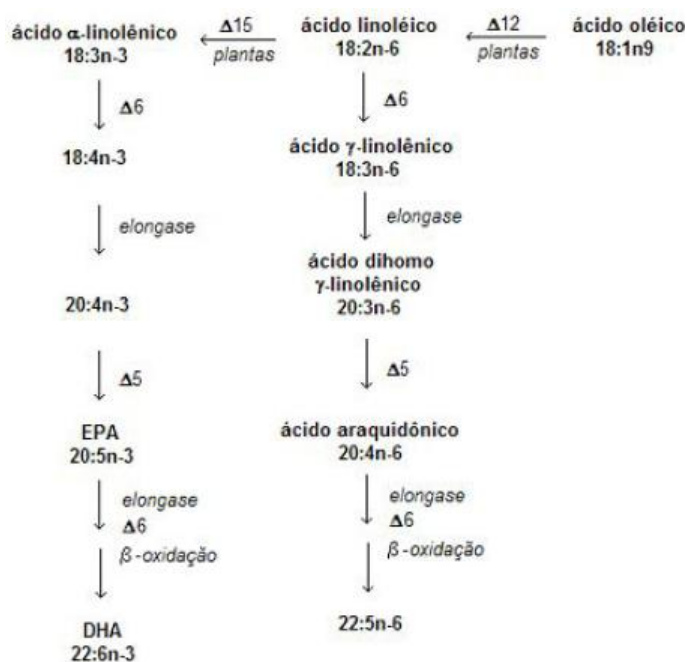


FIGURA 5 Vias metabólicas de dessaturação e alongamento dos e AGPI n-3 (ácido α-linolênico) e AGPI n-6 (ácido linoléico) em EPA, DHA e ácido araquidônico respectivamente. Participação das enzimas elongases e dessaturases Δ5, Δ6. FONTE: SIMOPOULOS (2010).

As enzimas que catalisam os passos metabólicos da digestão, absorção, transporte, dessaturação e alongamento dos AGPI n-3 e n-6 possuem afinidades pelos substratos de acordo com o comprimento da cadeia, número e localização das duplas ligações. No entanto, nenhuma destas enzimas consegue discriminar entre as estruturas formadas por AGPI n-3 e AGPI n-6, por isso a quantidade relativa destes substratos influenciará nas quantidades relativas que são acumulados nos tecidos (LANDS, 2012).

A metabolização dos AGPI ocorre no fígado, mas também em outros tecidos, aonde são formados os mediadores lipídicos (PATTERSON *et al.*, 2011). Baseado em resultados farmacocinéticos *in vivo* foi demonstrado que proteínas transportadoras estão envolvidas no transporte trans-membrana de vários ácidos graxos, sendo possível que a distribuição diferencial destas proteínas de transporte seja parcialmente responsável pela distribuição assimétrica de certos ácidos graxos nos diferentes tecidos corporais (FUKUI *et al.*, 2013).

O ácido araquidônico (AA) e o ácido eicosapentaenóico (EPA) são precursores de mediadores lipídicos chamados de eicosanóides, os quais atuam como moduladores químicos em diversos processos biológicos, como resposta inflamatória, agregação plaquetária, permeabilidade vascular e na formação de sinalizadores biológicos (STABLES & GILROY, 2011). Estes mediadores incluem prostaglandinas (PGs) e tromboxanas (TXs) gerados pelas enzimas ciclooxigenases (COXs), leucotrienos (LTs) pelas enzimas lipoxigenases e outros derivados gerados pela ação de enzimas de citocromo P450 (CALDER, 2012a). Além disso, nos últimos anos foram identificados diferentes mediadores, denominados resolvinas, gerados por EPA (série-E) e DHA (série-D) e protectinas, gerados por DHA através de vias envolvendo as enzimas COXs e LOXs (SERHAN *et al.* 2009; CALDER 2012a) (Figura 6). Devido às diferenças estruturais, há produção de eicosanóides com funções diferenciadas. Quando há ingestão de óleo de peixe, rico em EPA e DHA, há diminuição na produção de prostaglandinas (PGs) e tromboxanas (TXs) da série 2, leucotrienos (LTs) da série 4 que apresentam maior efeito inflamatório, e aumento de PGs e TXs da série 3 e LTs da série 5, que tem menor potencial inflamatório (CALDER *et al.*, 2010; SIMOPOULOS, 2010).

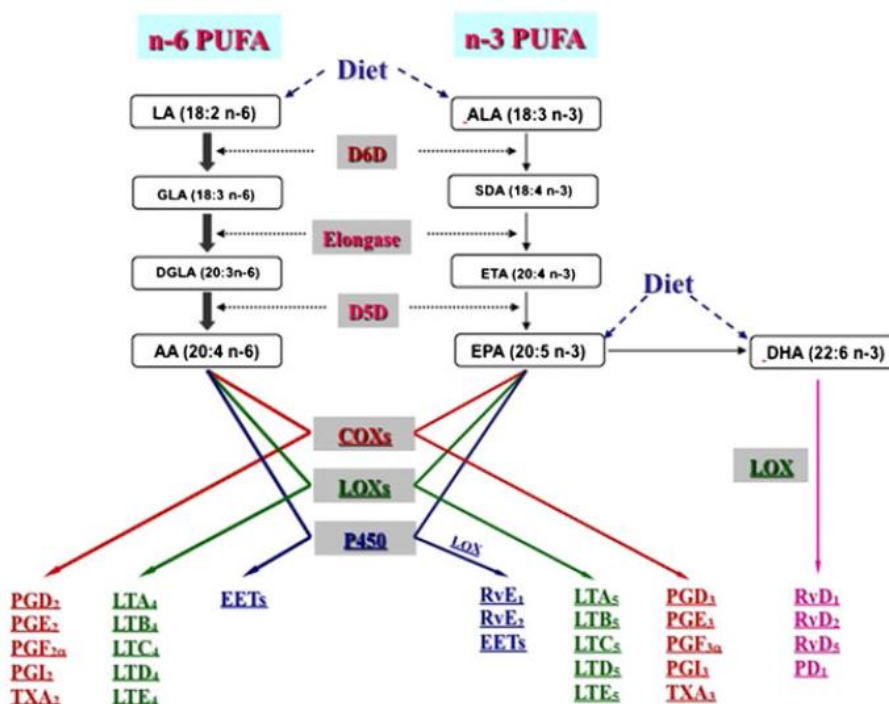


FIGURA 6 Vias metabólicas dos AGPI n-6 e AGPI n-3. As enzimas COX, LOX and P450 convertem os AGPI n-6 e n-3 em mediadores lipídicos bioativos como: PGs, LTs, TXs, EETs e Rvs. FONTE: KANG & LIU (2012).

As principais fontes dos AGPI n-3 são os peixes de águas frias, (como arenque, salmão, sardinha, cavala e atum), algas marinhas, linhaça e as folhas verdes escuras. AGPI n-3 de cadeia longa, como o EPA e o DHA são encontrados principalmente em óleo de peixe (MOLENDI-COSTI *et al.*, 2010). O óleo de peixe disponível comercialmente geralmente apresenta EPA + DHA numa proporção de aproximadamente 30% do total de lipídeos, de forma que uma cápsula contendo 1g de óleo normalmente contém aproximadamente 300 mg desses AGPI n-3 (CALDER 2012a). Sendo o consumo de AGPI n-3, sob a forma de cápsulas de óleo de peixe uma alternativa confiável, tendo como vantagem a ausência de contaminantes, sendo, portanto mais seguras (PELLICCIA *et al.*, 2012).

É importante salientar que os peixes consumidos podem apresentar variações nas quantidades de AGPI n-3 e na razão EPA/DHA. O conteúdo de AGPI n-3 é influenciado por alguns fatores como: características metabólicas do peixe, dieta, temperatura da água, estação do ano etc (CALDER, 2012 b). Por sua

vez, o AGPI n-6 é o mais consumido na dieta ocidental, composto principalmente pelos óleos vegetais utilizados no preparo de alimentos, como soja, milho e girassol (CALDER *et al.*, 2010).

Nas últimas décadas houve mudanças no padrão alimentar da população. Observa-se um aumento do consumo de ácidos graxos saturados, ácidos graxos *trans* e AGPI n-6, enquanto o consumo de AGPI n-3 foi reduzido. Com essas mudanças houve um aumento da razão AGPI n-6/n-3 na dieta, principalmente nos países ocidentais. Os valores médios encontrados variam de 10/1 a 20/1, sendo que em paralelo, observa-se um aumento da incidência de doenças com base inflamatória, como doenças cardiovasculares, artrites e câncer (CALDER, 2011; PATTERSON *et al.*, 2011). Por outro lado, considera-se a ingestão adequada de AGPI essenciais quando a razão AGPI n-6/n3 varia entre 1/1 e 4/1 (PATTERSON *et al.*, 2011).

1.7 FUNÇÕES BIOLÓGICAS DE AGPI N-3 NO CÂNCER

Estudos *in vivo* e *in vitro* indicam que os AGPI n-3 estão envolvidos na redução da inflamação e participam na prevenção de certas doenças crônicas, como doenças cardiovasculares, artrite reumatóide, síndrome metabólica e obesidade (MOLENDI-COSTI *et al.*, 2010; CALDER, 2012a), além dos benefícios na prevenção e no desenvolvimento do câncer (CORSETTO *et al.*, 2011; WILLIAMS *et al.*, 2011). Estes achados levaram aos profissionais de saúde a encorajar a população em geral a aumentar o consumo de AGPI n-3 (RIEDIGER *et al.*, 2009). Além disso, pesquisadores estão interessados no potencial efeito antitumoral de alguns nutrientes, entre eles AGPI n-3, devido à segurança e boa aceitação como adjuvante em terapias anticâncer (BIONDO *et al.*, 2008; GRANCI *et al.*, 2010).

A maioria dos fármacos utilizados no tratamento do câncer, aprovadas pelo FDA (*Food and Drug Administration*) estão associadas à elevada toxicidade. Com o objetivo de reduzir a dosagem, diferentes combinações entre elas ou com novos componentes têm sido alvo de investigações, entre eles os AGPI n-3. Porém, ainda muitos estudos precisam ser realizados para entender os mecanismos moleculares envolvidos, determinar a dose adequada a ser utilizada

e seus efeitos em modelos animais mais complexos (GRANCI *et al.*, 2010).

Em experimentos *in vitro* as células são expostas aos AGPI n-3 por pelo menos três dias, enquanto os animais com dietas enriquecidas com AGPI n-3 o tempo mínimo de suplementação é de duas semanas. Após este período, o DHA é incorporado aos fosfolípidos de membrana de muitos tecidos. Entretanto, a remoção da suplementação com AGPI n-3 resulta em uma rápida liberação de AGPI n-3 da membrana plasmática e a reversão dos efeitos induzidos por este (TURK & CHAPKIN, 2013).

A diminuição do crescimento tumoral em animais alimentados com uma dieta suplementada com óleo de peixe, não apresentou mudanças significativas do peso corporal ou outros sinais de efeitos adversos (KANG *et al.*, 2010). Além disso, estudos demonstraram que os AGPI têm pouca ou nenhuma toxicidade em células normais (FUKUI *et al.*, 2013). A literatura que descreve os efeitos dos AGPI n-3 sobre o metabolismo lipídico utiliza: óleo de peixe, DHA purificado ou uma combinação de EPA e DHA. Os óleos de peixe de diferentes origens podem conter misturas variáveis de EPA e DHA. Entretanto, se os efeitos da suplementação com AGPI n-3 são devido ao EPA, DHA ou ambos ainda precisa ser determinado (TURK & CHAPKIN, 2013).

Os benefícios gerados pelos AGPI n-3 no câncer são conhecidos, entretanto os mecanismos moleculares não são completamente entendidos. As ações dos AGPI n-3 parecem envolver múltiplos mecanismos que conectam a membrana celular, citosol e o núcleo (CALDER, 2012 b). Além disso, os efeitos incluem alterações tanto no comportamento de células tumorais (proliferação, invasão, metástase e apoptose) como no das células hospedeiras (inflamação, resposta imunológica e angiogênese) (BERQUINI, *et al.*, 2008).

Sugere-se o envolvimento de alguns mecanismos pelos quais os AGPI n-3 podem alterar o processo de carcinogênese. O mais relevante e bem estudado mecanismo de ação dos AGPI n-3 é o seu efeito supressor na produção de prostanoídes derivados de AA, particularmente a PG_2 , na qual influencia vias de inflamação, proliferação celular, apoptose e metástase (CORSETTO *et al.*, 2011).

Mudanças na composição lipídica da membrana plasmática podem afetar a sua fluidez e estrutura, podendo influenciar proteínas de membrana e moléculas de transdução de sinal. A modulação na atividade de fatores de transcrição,

expressão gênica e vias de transdução de sinais, podem levar a alterações no metabolismo, crescimento e diferenciação celular. Análises de microarranjo realizados em estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que centenas de genes envolvidos em diferentes processos biológicos, podem ser reguladas pelos AGPIs. Isto demonstra a complexidade das mudanças transcricionais induzidas diretamente ou indiretamente por esses ácidos graxos. Além disso observa-se modificações do metabolismo de estrogênio, produção de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (BERQUINI *et al.*, 2008; CORSETTO *et al.*, 2011).

Estudos evidenciam que o óleo de peixe seja capaz de reduzir a expressão de genes envolvidos em vias de sinalização do processo inflamatório, além de fatores relacionados ao estresse oxidativo, hipóxia e sinalização via fatores de transcrição, como receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPARs) e fator nuclear kappa B (NFκ-B) (BOUWENS *et al.*, 2009). Foi demonstrado que os AGPI e certos produtos de sua oxidação são capazes de se ligar e ativar todas as isoformas de PPARs (CHÊNE *et al.*, 2007; CHAPKIN *et al.*, 2009).

Alguns estudos sugerem que o efeito protetor dos AGPI n-3, esteja relacionado com a expressão do oncogene Ras, sugerindo sua utilização como adjuvante como terapia anti-Ras (ROYNETTE *et al.*, 2004; BIONDO *et al.*, 2008). Além de Ras, outros mediadores podem ser afetados, como PKC, ERK ½ e família NF-κB (BERQUINI, *et al.*, 2008). Estudos *in vitro* com algumas linhagens celulares, tratadas com DHA e EPA demonstraram diminuição da expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 e aumento da ativação de caspases. Em adição, o tratamento utilizando somente o DHA aumentou a proteína pró-apoptótica Bax (BIONDO *et al.*, 2008).

Experimentos utilizando modelo animal e cultura de células *in vitro* suportam o efeito antitumoral dos AGPI n-3 no câncer de cólon, próstata e mama, enquanto estudos clínicos em humanos têm sido menos consistentes (BIONDO *et al.*, 2008; BERQUIN *et al.*, 2008). A inclusão de AGPI n-3 na dieta *in vivo* melhora a eficácia anti-tumoral de alguns fármacos quimioterápicos em ratos portadores de tumores colorrectais. Apesar dos esforços para identificar os mecanismos pelo qual isto ocorre, a interação entre os AGPI n-3 e medicamentos quimioterápicos é complexo e, provavelmente, envolve o aumento do estresse oxidativo, a

modulação de prostaglandinas pró-inflamatória e alteração da fluidez e propriedades da membrana celular (GRANCI *et al.*, 2012). Estudos sugerem que os AGPI n-3 podem melhorar o efeito pró-apoptóticos quando utilizados em combinação com outros de fármacos anticancerígenos. Dados *in vitro* demonstraram que a combinação de DHA com o quimioterápico 5-fluorouracil ocasionou maior redução da expressão de Bcl-2 e Bcl-XL do que quando utilizados de forma isolada, sugerindo que o DHA agiu de forma sinérgica, melhorando o efeito apoptótico de 5-fluorouracil (BIONDO *et al.*, 2008).

Estudos em humanos podem restringir o emprego de diversas abordagens, fazendo com que o modelo animal e os ensaios *in vitro* tornem-se ferramentas importantes para entender os fenômenos biológicos que possam ser regulados pelos AGPI-3. Estudos epidemiológicos em humanos diferem sobre a fonte de AGPI n-3 consumidos (óleos de peixe, óleos de sementes, AGPI purificados, peixes frescos). Como a conversão de ALA em EPA e DHA em humanos é baixa, é provável que os resultados dependam do tipo de AGPI n-3 consumidos, bem como da razão de AGPI n-6/n-3 obtidos em indivíduos, fatores que são influenciados pela dieta e fatores genéticos (BERQUIN *et al.*, 2008). Além disso, pesquisas em lipidômica e metabolômica poderão proporcionar novas abordagens e técnicas para auxiliar no entendimento de muitas questões que ainda permanecem sem respostas sobre os mecanismos de ação dos AGPI n-3 no câncer (GU *et al.*, 2013).

2 JUSTIFICATIVA

Trabalhos prévios do Laboratório de Metabolismo Celular-UFPR demonstraram que a suplementação com óleo de peixe, rico em AGPI n-3, reduziu o crescimento do tumor de Walker 256 e isto foi associado, em parte, à redução da taxa de proliferação celular e do aumento de morte celular por apoptose (MUND *et al.*, 2007). Dados *in vitro*, com complexado de óleo de peixe, adicionado a cultura de células tumorais de mama e cólon humanos, corroboraram com estes resultados (BONATTO, 2008).

Pesquisas indicam que múltiplos mecanismos moleculares podem contribuir para os efeitos protetivos dos AGPI n-3 no câncer, tornando-se cada vez mais evidente sua ação pleiotrópica. A partir dessa constatação, o grande desafio é determinar e estabelecer ligações entre as inúmeras vias, na qual AGPI n-3 podem atuar (BIONDO *et al.*, 2008; CHAPKIN, *et al.*, 2008). Além disso, ainda não são conhecidos integralmente os mecanismos pelos quais os AGPI n-3 provocam estes efeitos. Poucos experimentos realizados *in vivo* evidenciam que o óleo de peixe seja capaz de alterar a expressão de proteínas envolvidas em vias de sinalização de proliferação e morte celular. Assim, neste estudo, expandimos esta informação utilizando o modelo de tumor de Walker 256 em ratos suplementados com óleo de peixe. Pela relevância do tema e escassa literatura em estudos *in vivo*, espera-se que estes resultados venham contribuir, de forma significativa, sobre o entendimento dos efeitos antitumorais dos AGPI n-3.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo investigar o efeito da suplementação com óleo de peixe, rico em AGPI n-3, sobre a expressão de proteínas envolvidas em vias de sinalização de proliferação e morte celular por apoptose no tumor de Walker 256.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar diferenças entre animais suplementados ou não quanto aos seguintes parâmetros:

- Expressão gênica de PPAR γ e RelA (p65) no tecido tumoral.
- Expressão proteica de HRas, MMP 2, p52, I κ B α , PKC, HSP 70, p53, Bcl-2, Bax, caspase-7, caspase-3, PARP-1 no tecido tumoral.
- Expressão proteica de COX-2, p65, PPAR γ , Bcl-2, p53 e HRas no soro.
- Avaliação do perfil lipídico e razão AGPI n-6/n-3 no tecido tumoral e soro.

- Identificar possíveis marcadores tumorais no soro.

- Compreender o papel de caspase-3 clivada no tumor de Walker 256 na forma ascítica e subcutânea.

- Avaliar a taxa de apoptose do tumor de Walker 256 na forma ascítica e subcutânea.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4.1.1 Animais e suplementação

Os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Todos os procedimentos utilizando animais foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA), do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. O número do Comitê de ética em experimentação animal concedido foi o CEEA 505 (Anexo 1).

Foram utilizados ratos Wistar, linhagem albina da espécie *Rattus norvegicus*, obtidos do Biotério do Setor de Ciências Biológicas, Campus Centro Politécnico, UFPR, Curitiba, Paraná. Esses animais foram mantidos em ciclo claro/escuro (12h/12h), temperatura constante ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), porcentagem de umidade relativa do ar ($50 \pm 5\%$) e com ração comercial padrão composta em macronutrientes de: 63.4% kcal de carboidratos, 25.6% kcal de proteínas e 11% kcal de lipídeos (Nuvilab CR-1, Quimtia) e água filtrada à vontade (*ad libitum*).

Os animais com 70 dias de vida foram separados aleatoriamente nos seguintes grupos experimentais: animais alimentados com ração padrão (C); ração padrão e suplementados com óleo de peixe (COP); ração padrão e suplementados com gordura de coco (CCO); portadores de Tumor de Walker 256 alimentados com ração padrão (W); portadores de Tumor de Walker 256 alimentados com ração padrão e suplementados com óleo de peixe (WOP) e portadores de tumor de Walker 256 alimentados com ração padrão e suplementados com gordura de coco (WCO).

O óleo de peixe (OP) utilizado foi elaborado a partir de extrato de ácidos graxos poliinsaturados marinhos, rico em AGPI n-3: EPA e DHA, gentilmente doado pela Herbarium Laboratório Botânico Ltda (Colombo-PR). A gordura de coco (Refino de óleos, Bahia), rica em ácidos graxos saturados, foi adquirida no Mercado Municipal (Curitiba-PR). O perfil lipídico da ração padrão, das cápsulas

de óleo de peixe e da gordura de coco, foram analisados por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) estão demonstrados na Tabela 1.

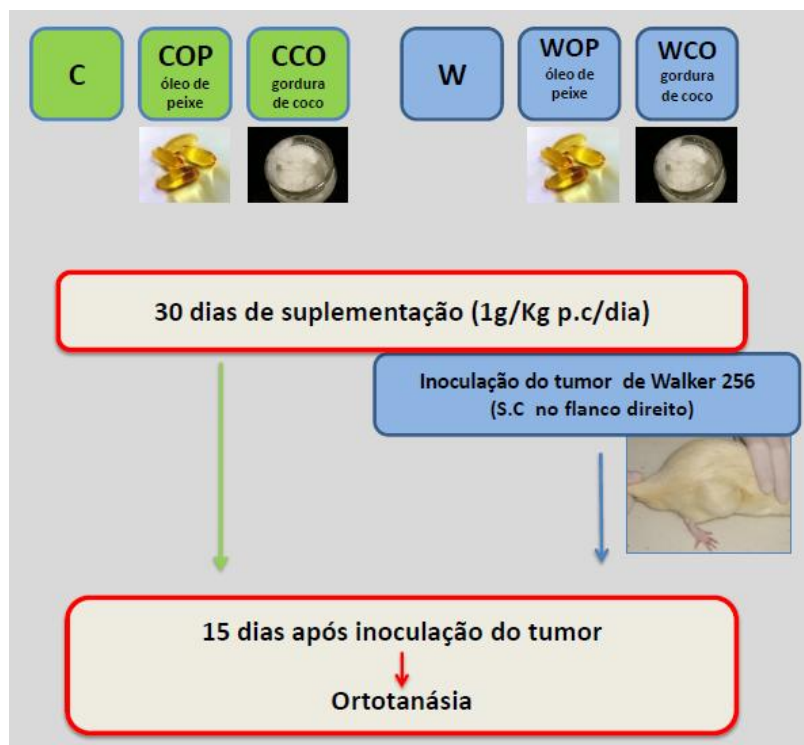
Tabela 1 Perfil de ácidos graxos (g/100g de ácidos graxos totais) obtido por HPLC da ração padrão, cápsulas de óleo de peixe e gordura de coco. Os valores correspondem a média \pm EPM (n= 2 em duplicata).

Ácidos graxos	Ração (Nuvilab CR-1)	Óleo de peixe (Herbarium)	Gordura de coco (Refino de óleos)
Láurico (12:0)	1.3 \pm 0.3	4.8 \pm 0.1	45.3 \pm 3.1
Mirístico (14:0)	-	9.9 \pm 0.1	17.0 \pm 0.9
Palmítico (16:0)	13.7 \pm 0.9	15.0 \pm 0.2	25.0 \pm 4.8
Esteárico (18:0)	2.4 \pm 0.3	1.9 \pm 0.1	1.9 \pm 0.2
Palmitoléico (16:1n-7)	-	1.7 \pm 1.6	-
Oléico (18:1n-9)	20.0 \pm 0.1	10.6 \pm 0.1	7.9 \pm 0.2
Linoléico (18:2n-6)	56.0 \pm 0.8	11.6 \pm 0.1	2.0 \pm 0.2
Linolênico (18:3n-3)	6.0 \pm 0.6	-	0.9 \pm 0.1
Araquidônico (20:4n-6)	0.3 \pm 0.2	0.7 \pm 0.1	-
EPA (20:5n-3)	0.2 \pm 0.1	23.9 \pm 0.6	-
DHA (22:6n-3)	-	19.8 \pm 0.8	-

O peso corporal dos animais foi avaliado a cada dois dias, no período matutino em balança digital (Urano UDI). Os grupos receberam suas respectivas suplementações (1g/Kg peso corporal/dia), via oral através de micropipeta até completarem 100 dias de vida. Os grupos sem suplementação (C e W) receberam o mesmo volume com água filtrada. Após este período, os animais dos grupos portadores de tumor de Walker 256 (W, WOP e WCO) sofreram inoculação subcutânea no flanco direito de uma suspensão de células do tumor de Walker 256 contendo 1×10^8 células. Os animais continuaram sendo suplementados como descrito acima e ao décimo quinto dia, após a inoculação do tumor, todos os animais foram ortotaniados (totalizando 44 dias de suplementação). Amostras de tecido tumoral e soro foram removidos, aliquotados e armazenados em Ultrafreezer para realização dos experimentos. Antes de serem armazenados, os tumores de Walker 256 dos grupos experimentais foram pesados em balança digital (Denver Instrument XL410) e

separados em fragmentos, com o cuidado de sempre extrair a mesma porção do tecido para as futuras análises, excluindo-se as porções com presença de necrose e de tecido não tumoral.

Representação esquemática do desenho experimental utilizado neste trabalho:



4.2 MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS DO TUMOR DE WALKER 256

As células do Tumor de Walker 256 foram mantidas em nosso laboratório como tumor intraperitoneal ascítico. A matriz utilizada é do tipo B, não metastizante, cedida pela Professora Flávia A. Guarnier (Universidade Estadual de Londrina). Ratos adultos receberam uma injeção intraperitoneal de uma suspensão de células, contendo 1×10^5 células do tumor de Walker 256. Após aproximadamente 6-7 dias, quando constatada a ascite, os animais foram ortotanasiados e receberam uma injeção de 3 mL de tampão fosfato salina (PBS) com heparina (1:120) em suas cavidades abdominais, com posterior massagem desta região. Em seguida, por laparotomia mediana, retirou-se da cavidade abdominal o fluido contendo as células tumorais. A contagem do número de células tumorais e a porcentagem de células viáveis foram realizadas, utilizando-

se a câmara de Neubauer na presença de azul de trypan 1%. As passagens semanais foram realizadas sucessivamente até a utilização de células tumorais para inoculação subcutânea.

4.3 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA

O método de western blotting é utilizado com o objetivo de identificar e quantificar proteínas específicas. A técnica foi desenvolvida por dois laboratórios de forma independente: Towbin, 1979 e Burnette, 1981, sendo a partir deste último que o método foi denominado western blotting. Basicamente é empregada a eletroforese em gel para separação das proteínas, que são posteriormente transferidas para uma membrana e detectadas pelo uso de anticorpos específicos para proteína alvo (JENSEN, 2012)

4.3.1 Preparação das amostras

Amostras de tecido tumoral foram fragmentadas mecanicamente com o auxílio de um homogeneizador (Tecnal TE) em tampão de lise RIPA (*modified radioimmunoprecipitation buffer*), acrescido de inibidores de proteases e fosfatases (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich) na proporção de 100mg:700 μ L. Amostras de soro foram lisadas diretamente em tampão RIPA na proporção de 350 μ L:350 μ L. Para o experimento utilizando as células do tumor de Walker 256 do líquido ascítico, estas foram isoladas como descrito na seção 4.2, lavadas em PBS e em seguida lisadas diretamente em tampão RIPA na proporção de 10⁶ células:700 μ L. Para os ensaios envolvendo células de tumor de Walker 256 na forma ascítica (T0), tecido tumoral de Walker 256 com 4 dias de crescimento subcutâneo (T4), tecido tumoral de Walker 256 com 6 dias de crescimento subcutâneo (T6) e tecido tumoral de Walker 256 com 8 dias de crescimento subcutâneo (T8) foram utilizadas amostras frescas de animais controle, excluindo a etapa de armazenamento em Ultrafreezer.

Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 17949g (Eppendorf 5810 R) e o sobrenadante coletado para quantificação da concentração de

proteínas totais de cada amostra, através do método colorimétrico de Bradford (BRADFORD, 1976).

4.3.2 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na presença de dodecilssulfato de sódio (SDS-PAGE)

Após a quantificação proteica de cada amostra, foi realizada diluição da mesma utilizando tampão de amostra Laemmli (Bio-Rad, 2000a) de forma a deixar todas as amostras com a mesma concentração protéica ($3 \mu\text{g}/\mu\text{L}$). O tampão Laemmli contém SDS para desnaturar a proteína e fornecer carga negativa constante de forma que todas fiquem com a mesma carga na amostra. Sendo a carga negativa proporcional ao tamanho da proteína, e estas estando em uma estrutura linear, a separação das proteínas no gel será de acordo com sua massa molecular (MOORE, 2009). Primeiramente foi preparado um gel de empilhamento de 4%, permitindo que todas as proteínas migrem com a mesma velocidade até o gel de separação, que variou de acordo com a massa molecular da proteína avaliada (8 a 15%). Após a aplicação de amostras (35 a 45 μg de proteína por canaleta), marcador de massa molecular (Color burst Markers, Sigma-Aldrich) e controle positivo quando necessário, o gel foi submetido a uma voltagem constante de 100 a 160 V em tampão de corrida (BIO-RAD, 2000a) utilizando o aparato de eletroforese (Mini PROTEN Tetra Cell, Bio-Rad).

4.3.3 Transferência e detecção de proteínas

Após a separação das proteínas em SDS-PAGE, as proteínas foram eletrotransferidas em tanque (Mini Trans Blot, Bio-Rad) para uma membrana de nitrocelulose de $0.45 \mu\text{m}$ (Sigma-Aldrich), sob uma voltagem constante (100 V por 1 hora) em gelo, contendo o tampão de transferência Towbin com SDS (Bio-Rad, 2000^b). Posteriormente a membrana foi corada com o vermelho Ponceau S 1% (MOORE, 2009) para visualização da presença de bandas de proteínas formadas na própria membrana. Esta foi lavada e bloqueada por 1 hora em temperatura ambiente em tampão de TBST-5%, contendo leite desnatado em pó (Molico, Nestlé) para evitar que anticorpos liguem-se inespecificamente. Em

seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo primário (Tabela 2), o qual se liga à proteína que está sendo analisada, em tampão de bloqueio TBST-3% por 3 horas sob agitação em temperatura ambiente ou a *overnight* a 4^oC. A membrana, após lavagens com TBST foi incubada com anticorpo secundário conjugado, ligado a uma enzima HRP (*horseradish peroxidase*) (Santa Cruz Biotechnology), em tampão de bloqueio TBST-3% por 1 hora sob agitação, em temperatura ambiente. Após as lavagens, houve adição de substrato quimioluminescente (West Pico Sigma-Aldrich) na membrana, para visualização em filme Kodak para radiografia, o sinal correspondente a proteína em questão.

As imagens das bandas correspondentes à reação positiva foram avaliadas por densitometria com auxílio do software *Image J* (National Institute of Health, Bethesda). Posteriormente, a membrana passou pelo processo de stripping (NaOH 1M) e foi reincubada com o anticorpo anti- β -actina, utilizado como controle de quantidade de proteína aplicado em cada canaleta do gel de eletroforese. Para normalização dos dados de soro foi utilizado a densitometria das bandas de proteínas formadas na membrana corada com Ponceau, adaptado de WELINDER & EKBLAD, 2010. Foram realizados ensaios utilizando amostras de tecido tumoral para verificar a validade deste método, adaptando-o ao corante Ponceau.

Tabela 2 Relação de anticorpos primários utilizados nos ensaios de western blotting.

Anticorpo primário	Tamanho (kDa)	% gel de separação	Concentração	Fabricante
Anti- PPAR γ	67	10	1:800	Santa Cruz
Anti- p65	65	10	1:1500	Santa Cruz
Anti-p52	52	10	1:1500	Santa Cruz
Anti-IkB	40	12	1:1500	Santa Cruz
Anti-HRas	21	12	1:1500	Santa Cruz
Anti-p53	53	10	1:1000	Santa Cruz
Anti MMP 2	72	10	1:500	Santa Cruz
Anti-tPKC	80	8	1:800	Santa Cruz
Anti-BAX	23	12	1:1500	Santa Cruz
Anti-Bcl-2	26	12	1:1500	Santa Cruz
Anti- β actina	43	8 a 15	1:2000	Santa Cruz
Anti-HSP 70	70	10	1:2000	Sigma
Anti-Caspase-7	35	12	1:1000	Cell Signal
Anti-Caspase-7 clivada	18	15	1:1000	Cell Signal
Anti-Caspase-3	35	12	1:1000	Cell Signal
Anti-Caspase-3 clivada	17/19	15	1:1000	Cell Signal
Anti-PARP-1	116	8	1:1000	Cell Signal
Anti-PARP-1 clivado	89	8	1:1000	Cell Signal

4.4 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO RELATIVA DE RNA MENSAGEIRO

4.4.1 Isolamento de RNA total do tecido tumoral

Amostras de aproximadamente 100mg de tecido tumoral foram fragmentadas mecanicamente em 1 mL do reagente TRizol (Invitrogen) com o auxílio de um homogeneizador (Tecnal TE 103). O RNA total do tecido tumoral foi isolado segundo as instruções do fabricante de TRizol. O reagente consiste em uma solução monofásica de fenol e guanidina-isotiocianato, que deriva da melhoria do método de isolamento de RNA desenvolvido por CHOMCZYNSKI & SACCHI, 1987. A adição do clorofórmio, seguida de centrifugação (Eppendorf centrifuge 5810R), separa a solução em três fases: inferior/orgânica, interfase e superior/aquosa. Os ácidos nucléicos permanecem na fase aquosa. Depois da transferência da fase aquosa para um novo tubo, o RNA total foi recuperado por precipitação com álcool isopropílico (PA) após-

centrifugação. Após- lavagem com etanol 75% e centrifugação, o RNA total foi ressuspendido em água MilliQ autoclavada: preparada com Dietil pirocarbonato DEPC 0.01% (Sigma-Aldrich). Amostras de tecido tumoral que foram utilizadas nesta pesquisa apresentam alto teor proteico, grande quantidade de matriz extracelular e consistência elástica. Foi necessária uma centrifugação adicional, anterior à adição de clorofórmio, na tentativa de uma purificação das amostras. Para verificar a pureza e concentração do RNA total (para estimar sua concentração em ng/ μ L) uma alíquota de cada amostra foi submetida a leitura de absorbância em espectrofotômetro (NanoDrop, ND-1000) a 260nm. A análise de pureza do RNA leva em consideração a razão entre 260 nm e 280 nm, que é o comprimento de onda definido para leitura de proteínas e afins e 260nm e a 230nm, que é o comprimento de onda para leitura de compostos orgânicos. Para resultados satisfatórios é desejável que o valor de ambas razões estejam próximas a 2.0. Somente as amostras com razão 260/280 e 260/230 acima de 1.90 foram utilizadas. Para análise de integridade do RNA, uma alíquota de cada amostra foi submetida à eletroforese em gel de agarose 0.8%, corado em solução de brometo de etídio e posteriormente visualizado diretamente em transiluminador de Ultra Violeta. A visualização de duas bandas no gel, que correspondem à subunidade maior (28S) e menor (18S) do RNA ribossomal, determina a integridade do material isolado.

4.4.2 Reação de transcrição reversa (RT)

Amostras de RNA total (500ng) foram submetidas à reação de transcrição reversa utilizando o kit *ImProm-I Reverse Transcription System* (Promega), para ensaios de reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real. Para a síntese da primeira fita de DNA complementar (cDNA) foi preparada uma solução contendo os seguintes reagentes: Tampão *Improm II 1X*, $MgCl_2$, dNTPs, RNasin, Enzima Transcriptase Reversa (RT) *Improm II* e *primer* OligodT, para um volume final de 20 μ L. As condições de termociclagem (Eppendorf *MASTERCYCLER gradient*) para formação de cDNA foram: 10 minutos a 25°C para anelamento do OligodT; 30 minutos a 48°C para extensão e 5 minutos a 95°C para inativação da enzima RT. Um controle

negativo, sem a adição da enzima Transcriptase Reversa (RT) foi adicionado, para excluir contaminação por DNA (Qiagen, 2007).

4.4.3 Desenho dos iniciadores (*primers*)

Os *primers* utilizados nos ensaios de PCR em tempo real, para amplificação dos fragmentos de DNA complementar (cDNA), foram obtidos com base na seqüência de cada gene, depositada no *GeneBank*, www.ncbi.nih.gov, com auxílio do software *PRIMER 3* <http://frodo.wi.mit.edu/>. Através do software *CLUSTAL* as seqüências foram alinhadas para ser definido o segmento mais conservado para desenho. O conjunto de *primers* foi analisado com auxílio do software *OligoAnalyser* www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html, buscando-se, quando possível, condições de baixa energia (ΔG) para formação de dímeros, heterodímeros e grampos nas reações de PCR. Para identificação de regiões da seqüência que apresentam alto grau de homologia com outras partes do genoma foi utilizado *BLAST* <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>.

Os estudos de quantificação relativa em PCR em tempo real exigem conjuntos de *primers* e sondas com condições específicas, sendo assim, *primers* que foram utilizados em ensaios de PCR tradicional nem sempre é recomendado, pois os critérios de desenho para PCR em tempo real podem não ter sido utilizados. Sendo assim, os *primers* utilizados neste trabalho seguiram algumas condições como: desenhos entre éxons, tamanho de produto de PCR menor que 150 pb e temperatura de anelamento próximo de 60°C. Após escolha dos *primers*, estes foram sintetizados pela Prodímol Biotecnológica (Tabela 3).

Tabela 3 Sequência de primers utilizados nos ensaios de qPCR.

Nome do gene	(pb)	Sequência de primers
Hypoxanthine phosphoribosyltransferase1 (Hprt) (gene referência)	116	5'CAGGCCAGACTTTGTTGGAT3' (forward) 5'TCCACTTTTCGCTGATGACAC3' (reverse)
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (Ppar γ) (gene alvo)	119	5'GCCCTTTGGTGACTTTATGG3' (forward) 5'GGCGGTCTCCACTGAGAATA3' (reverse)
V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (RelA) (gene alvo)	145	5'ACTTGCCAGACACAGACGAT3' (forward) 5'GGGTTTCAGTTGGTCCATTG3' (reverse)

4.4.4 PCR em tempo real quantitativo (qPCR)

O desenvolvimento de PCR em tempo real resultou da complementação da técnica de PCR com tecnologia de fluoróforos, óptica e informática. Esta tecnologia prevê a detecção do produto de amplificação à medida que vai sendo formado, ao contrário do método original. É esta propriedade de permitir avaliação da reação de PCR em sua fase exponencial que qualifica a PCR em tempo real como metodologia quantitativa. O procedimento utilizado para estimar a quantidade relativa das concentrações de RNA mensageiro, comparando com a expressão do gene de referência, foi baseado na detecção em tempo real do produto de PCR utilizando o corante *SYBR Green* (Applied Biosystems, 2004). A reação de qPCR foi realizada utilizando *SYBR Green PCR Master Mix* (Qiagen) primers (0.3 μ M) e cDNA (5ng/ μ L). As reações foram realizadas em triplicata, utilizando *72-striputubes* (Qiagen), com volume final de 10 μ L. Controles negativos foram adicionados

para excluir amplificações não específicas. As condições de termociclagem foram: 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de (95°C por 15 segundos, 60°C por 15 segundos e 72°C por 15 segundos). Foi utilizada a plataforma tecnológica Corbett Rotor-Gene 3000 (Qiagen). Amplificações de produtos inespecíficos foram excluídas pela análise da curva de dissociação de produtos de PCR (Qiagen, 2007). Os métodos para quantificação relativa de expressão gênica permitem quantificar diferenças no nível de expressão de um gene específico entre as várias amostras. Nesta pesquisa foi utilizado o método CT comparativo, também conhecido como $2^{-\Delta\Delta CT}$, em que a produção de dados é expressa como uma diferença numérica dos níveis de expressão do gene estudado (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008; BUSTIN *et al.*, 2009).

Foi realizada previamente, a validação do gene de referência (Hprt), segundo SCHMITTGEN & LIVAK (2008) (Anexo 2) para verificar alterações significativas de sua expressão, devido ao tratamento experimental. Segundo BUSTIN *et al* (2009) a normalização utilizando um gene de referência não é aceitável, a não ser que haja evidências que confirmem sua estabilidade sob condições experimentais e o método utilizado descrito. Além disso, foram obtidos, através de reações utilizando curvas padrões, os valores de eficiência (E) para cada gene avaliado (Tabela 4).

Tabela 4 Valores de eficiência (E) de cada gene avaliado.

Gene	Slope	R	R ²	$E=10^{(1/slope)} - 1$
Hprt (ref)	-3.344	0.953	0.964	0.99
RelA (alvo)	-3.375	0.968	0.963	0.98
Ppary (alvo)	-3.275	0.992	0.985	1.02

4.5 AVALIAÇÃO DE MORTE CELULAR

A Anexina é uma proteína capaz de se ligar especificamente a fosfatidilserina, um fosfolípídeo da monocamada interna da membrana plasmática celular que no processo de apoptose é translocado para a monocamada externa.

A anexina V conjugada com uma molécula fluorescente (FITC) é utilizada como meio de detecção de células com a fosfatidilserina externalizada, sendo um sinal do processo de apoptose. O 7-AAD é um marcador que exclui células não viáveis. Por ser impermeável á membrana plasmática, não consegue penetrar em membrana plasmática integra característica de células viáveis. Através de leitura em citômetro de fluxo, as células mortas são identificadas pela marcação positiva de 7-AAD e 7-AAD;Anexina V, enquanto células em apoptose são positivamente marcadas por Anexin V.

As células ascíticas do Tumor de Walker 256 foram isoladas como descrito na seção 4.2. O tecido tumoral de 4 dias de crescimento foi isolado, fragmentado em PBS com auxílio de tesoura e filtrado em papel filtro. Depois de isoladas, as células tumorais do liquido ascítico e do tecido tumoral foram lavadas 2x com PBS filtrado gelado e ressuspensas (10^5 células) em tampão de ligação (Hepes 0.1M e pH 7,4, NaCl 1.4 M e CaCl_2 25mM) contendo FITC Anexina V (BD Pharmingen) 1:500 e 7-AAD (eBioscience) 1:500. Posteriormente as amostras foram incubadas por 20 minutos e levadas para detecção de fluorescência celular no Citômetro de Fluxo (BD FACSCalibur). A marcação com FITC foi visualizada no detector FL1 e a marcação com 7-AAD, no detector FL3 do citômetro. O software utilizado para a aquisição dos dados foi o Cell Quest™ e para a análise de dados, o software Weasel (The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research). Os resultados estão demonstrados em porcentagem, considerando o número total de células analisadas de 100%.

4.6 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS

4.6.1 Extração lipídica

A extração lipídica das amostras foi realizada conforme FOLCH *et al.* (1956). Amostras de 70 mg de tecido tumoral foram fragmentadas mecanicamente com auxílio de homogeneizador (Tecnal TE) diretamente em 1,33mL de solvente extrator (composto de metanol:clorofórmio, na proporção de 1:2). Amostras de 200 μ L de soro sanguíneo e 30 μ L de óleo de peixe e gordura de coco foram adicionadas diretamente em 1,33mL de solvente extrator. A esta

mistura foi adicionado 240µL de metanol e o material foi então centrifugado (Eppendorf 5810R) a 3220 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de vidro e foram adicionados 480µL de clorofórmio e 410µL de água ultrapura e o sistema bifásico formado foi submetido à intensa agitação. Após 10 minutos para a reconstituição espontânea do sistema bifásico, o sobrenadante (aquoso) foi removido com o auxílio de micropipeta. Adicionou-se 1mL de solução de Folch (metanol 48.98%; água ultrapura 47.96%; clorofórmio 3.06%; MgCl₂ 0.01%; CaCl₂ 0.02%; NaCl 0.37%) por três vezes e após a última retirada do sobrenadante, as amostras (infranadante) foram submetidas à secagem em nitrogênio gasoso em banho-maria à 37°C.

4.6.2 Saponificação dos extratos lipídicos

Os extratos lipídicos obtidos foram ressuspensos em 100µL de metanol e saponificados com 2mL de solução alcalina em metanol (hidróxido de sódio 0.5M em metanol a 90%) por 2 horas em banho-maria à 37°C, sob agitação (BEYER E JENSEN, 1989; NISHIYAMA-NARUKE, *et al.*, 1998). Após este período, as amostras foram acidificadas pela adição de 1,5mL de ácido clorídrico 1M. Os ácidos graxos livres em solução foram extraídos três vezes com 1mL de hexano. O solvente foi evaporado em nitrogênio gasoso em banho-maria à 37°C.

4.6.3 Derivatização dos ácidos graxos

A reação de derivatização dos ácidos graxos foi baseada no método descrito por ABUSHUFA *et al* (1994). Nesta etapa são empregados dois reagentes que permitem que as amostras sejam detectadas através de detector de fluorescência. O reagente A consiste em 4-bromometil-7-metoxi coumarina (BMMC) (Sigma-Aldrich), fluoróforo, solubilizado em acetonitrila. O reagente B consiste na mistura de 18-crown-6-ether (Fluka), catalisador da reação da amostra com o fluoróforo, carbonato de potássio, água ultrapura e acetonitrila. As amostras contendo os ácidos graxos a serem derivatizados foram reconstituídas em 200µL de acetonitrila e agitadas mecanicamente. Posteriormente foram adicionados 200µL do reagente A e 200µL do reagente B e agitadas novamente.

As amostras foram mantidas em estufa a 60°C por 15 minutos e em seguida transferidas para tubos apropriados para injeção em HPLC (High-Performance Liquid Chromatography).

Para a determinação dos ácidos graxos no HPLC (Varian), pelo detector de fluorescência, foram realizadas injeções de 50µL dos derivados diluídos. Os compostos foram separados e detectados fluorimetricamente com excitação a 325nm e emissão a 398nm. Quanto à fase móvel, foi realizado gradiente binário com acetonitrila e água iniciando com a proporção de 77 : 23% (acetonitrila: água) e finalizando com 90 : 10%, totalizando 55 minutos. O software para integração e registro de dados foi o Star 6.2 Chromatography Workstation. Os seguintes ácidos graxos foram utilizados como padrões: ácido láurico (C12:0), ácido mirístico (C14:0), ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoléico (C16:1n-7), ácido esteárico (C18:0), ácido oléico (C18:1n-9), ácido linoléico (C18:2n-6), ácido linolênico (C18:3n-3), ácido araquidônico (C20:4n-6), ácido eicosapentaenóico (C20:5n-3) e ácido docosahexaenóico (C22:6n-3).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) dos grupos experimentais. Previamente foi utilizado o software GraphPadQuickCalcs para analisar a existência de valores *outliers*. Em seguida os dados passaram pelo teste de normalidade: D'Agostin & Pearson para número de amostras maiores que sete e Shapiro-Wilk para menores que sete. A análise estatística utilizada foi: teste "*t*" de Student para avaliação da expressão relativa de mRNA, análise de variância de uma via com pós-teste de Tukey para avaliação da expressão proteica e perfil de ácidos graxos do tecido tumoral e análise de variância de duas vias com o pós-teste de Bonferroni para avaliação da expressão proteica e perfil de ácidos graxos do soro sanguíneo. Diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significantes para $p < 0.05$. As análises e os gráficos foram realizados com o auxílio do software GraphPad Prism (GraphPad Prism versão 5.00 para Windows).

5 RESULTADOS

5.1 RAZÃO DE AGPI N-6/N-3 NO TECIDO TUMORAL E SORO

Para a avaliação do incremento de AGPI n-3 pela suplementação com óleo de peixe foi utilizada a razão AGPI n-6 (AL+AA) /n-3 (ALA+EPA+DHA) no tecido tumoral e circulante no soro dos animais (g/100g de ácidos graxos totais). Os grupos experimentais analisados foram: portadores de Tumor de Walker 256 alimentados com ração padrão (W); portadores de Tumor de Walker 256 alimentados com ração padrão e suplementados com óleo de peixe (WOP) e portadores de tumor de Walker 256 alimentados com ração padrão e suplementados com gordura de coco (WCO). Para avaliação da razão de AGPI n-6/n-3 no soro, não estão presentes os grupos suplementados com gordura de coco (CCO e WCO).

De acordo com a Figura 7A é possível perceber que o grupo suplementado com óleo de peixe (WOP) teve redução da razão AGPI n-6/n-3 em duas vezes ($p < 0.05$) no tecido tumoral, quando comparado ao grupo W ($W 12.25 \pm 0.70$ vs. $WOP 5.32 \pm 0.21$ vs. $WCO 10.4 \pm 1.4$). O mesmo perfil de redução foi encontrado quando avaliamos o soro dos grupos suplementados com óleo de peixe (COP e WOP). Na Figura 7B demonstra diminuição da razão AGPI n-6/n-3 do grupo alimentado com ração padrão e suplementados com óleo de peixe (COP) de duas vezes ($p < 0.05$) quando comparado ao do grupo de animais alimentados com ração padrão (C) e de três vezes ($p < 0.05$) do grupo WOP quando comparado ao W ($C 8.26 \pm 0.91$, $COP 4.22 \pm 0.62$, $W 10.00 \pm 0.65$, $WOP 3.15 \pm 0.22$).

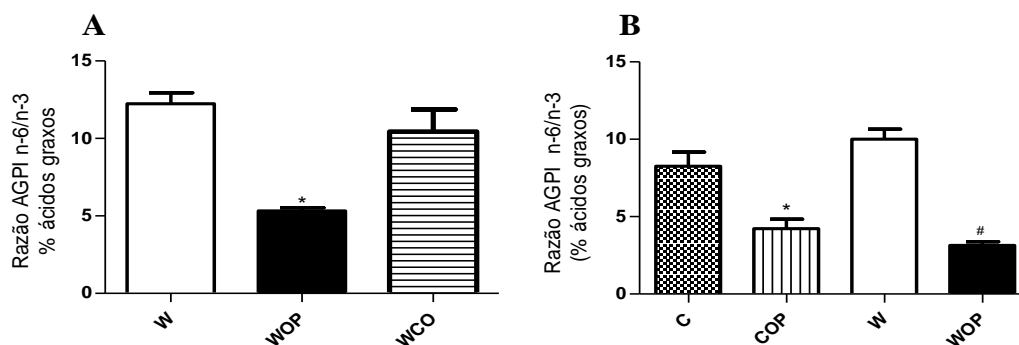


FIGURA 7 Razão de AGPI n-6/n-3 (g/100g de ácidos graxos totais) analisado por HPLC. **(A)** Amostras de tecido tumoral dos grupos portadores de tumor de Walker 256 (W) e portadores de tumor de Walker suplementados com óleo de peixe (WOP) e gordura de coco (WCO) n= 7. Os valores estão apresentados como média \pm EPM One-way ANOVA seguido de Tukey teste * $p < 0.05$ vs. W e WCO. **(B)** Amostras de soro dos grupos controle (C), controle suplementados com óleo de peixe (COP), portadores de tumor de Walker 256 (W) e portadores de tumor de Walker suplementados com óleo de peixe (WOP) n=3. Os valores estão apresentados como média \pm EPM. Two-way ANOVA seguido de teste Bonferroni * $p < 0.05$ vs. C #, $p < 0.05$ vs. W.

5. 2. EXPRESSÃO PROTEICA NO TECIDO TUMORAL

Para investigar se a suplementação com óleo de peixe teve algum efeito sobre a expressão de proteínas relacionadas com a proliferação e morte celular no tecido tumoral foi utilizada a técnica de western blotting. Os grupos experimentais analisados foram: animais portadores de Tumor de Walker 256 alimentados com ração padrão (W); portadores de Tumor de Walker 256 alimentados com ração padrão e suplementados com óleo de peixe (WOP) e portadores de tumor de Walker 256 alimentados com ração padrão e suplementados com gordura de coco (WCO). Na investigação de RelA (p65) e PPAR γ também foi analisada a expressão relativa do RNA mensageiro no tecido tumoral, utilizando a metodologia de qRT-PCR, estando ausente o grupo WCO.

Iniciamos a investigação pelas proteínas RelA (p65), p52 e I κ B, que fazem parte da família NF- κ B. Na Figura 8 estão apresentados os dados da expressão proteica de p65 no tecido tumoral, pelo qual não houve diferença estatística entre os grupos (W 1.05 ± 0.02 vs. WOP 1.00 ± 0.02 vs. WCO 1.01 ± 0.07). A expressão relativa de mRNA de Rel A (p65) no tecido tumoral demonstrou

redução de 21 % ($p < 0.05$) no grupo suplementado com óleo de peixe (WOP), quando comparada à do grupo W ($W 1.04 \pm 0.02$ vs. WOP 0.82 ± 0.04) (Figura 9).

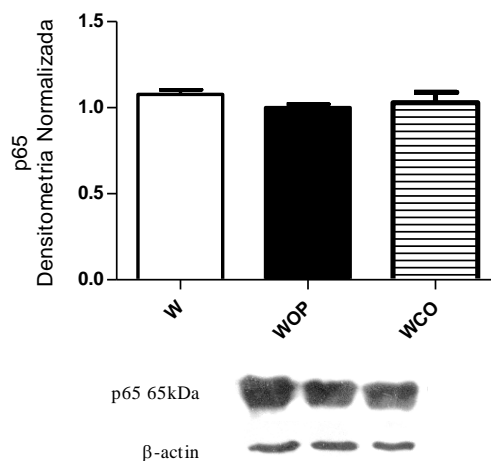


FIGURA 8 Expressão proteica de p65 no tecido tumoral analisado por western blotting. Anti- β -actin foi utilizado como controle de quantidade de proteína para normalização dos dados ($n = 7$). As bandas resultantes foram analisadas e quantificadas pelo software Image J[®]. Os dados estão apresentados como média \pm EPM obtidos dos grupos portadores de tumor de Walker 256 (W) e portadores de tumor de Walker suplementados com óleo de peixe (WOP) e gordura de coco (WCO). One-way ANOVA seguido de Teste Tukey.

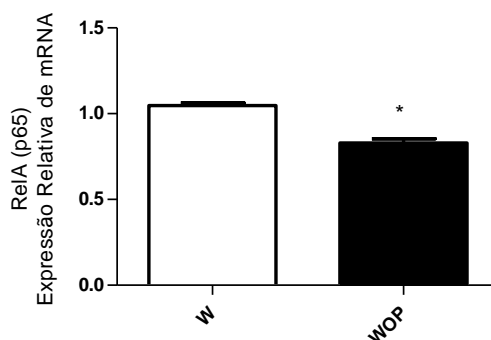


FIGURA 9 Expressão relativa de mRNA de RelA (p65) do tecido tumoral analisado por qRT-PCR. O gene de referência Hprt foi utilizado para normalização dos dados. Estes estão apresentados como média \pm EPM após $2^{-\Delta\Delta CT}$, obtidos dos grupos portadores de tumor de Walker 256 (W) e portadores de tumor de Walker 256 suplementados com óleo de peixe (WOP) $n = 8$. Teste "t" de Student * $p < 0.05$ vs. W.

Nas Figuras 10 A e B estão apresentados os dados referentes à expressão proteica de p52 e I κ B, respectivamente. A suplementação com óleo de peixe ou gordura de coco não modificou a expressão dessas proteínas no tecido tumoral,

sendo similar à do grupo W. p52 (W 1.18 ± 0.05 vs. WOP 1.16 ± 0.04 vs. WCO 1.15 ± 0.11) e I κ B (W 1.04 ± 0.02 vs. WOP 0.97 ± 0.02 vs. WCO 0.94 ± 0.05).

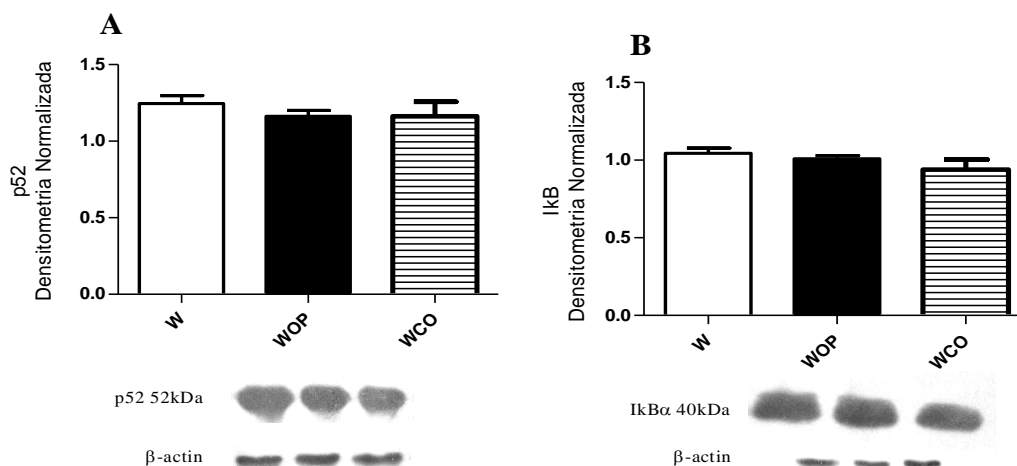


FIGURA 10 Expressão proteica no tecido tumoral analisado por western blotting. **(A)** p52 (n= 5), **(B)** I κ B (n= 5). Anti- β -actin foi utilizado como controle de quantidade de proteína para normalização dos dados. As bandas resultantes foram analisadas e quantificadas pelo software Image J[®]. Os dados estão apresentados como média \pm EPM obtidos dos grupos portadores de tumor de Walker 256 (W) e portadores de tumor de Walker suplementados com óleo de peixe (WOP) e gordura de coco (WCO). One-way ANOVA seguido de Teste Tukey.

Na Figura 11 estão apresentados os dados da expressão proteica de PPAR γ no tecido tumoral. Observou-se uma redução de 18 % ($p < 0.05$) no grupo suplementado com óleo de peixe (WOP), quando comparado à do grupo W (W 1.01 ± 0.02 vs. WOP 0.83 ± 0.03 vs. WCO 1.00 ± 0.07). Sendo que não houve diferença estatística entre os grupos WCO e W. Quando avaliado a expressão relativa de mRNA de PPAR γ no tecido tumoral, a redução foi de 52 % ($p < 0.05$) no grupo suplementado com óleo de peixe (WOP) quando comparada à do grupo W (W 1.08 ± 0.02 vs. WOP 0.52 ± 0.08), como demonstrado na Figura 12.

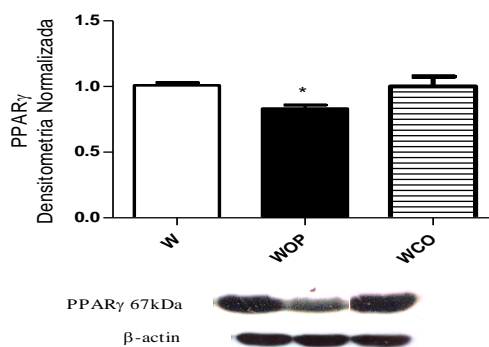


FIGURA 11 Expressão proteica de PPAR γ no tecido tumoral analisado por western blotting. Anti- β -actin foi utilizado como controle de quantidade de proteína para normalização dos dados (n= 8). As bandas resultantes foram analisadas e quantificadas pelo software Image J[®]. Os dados estão apresentados como média \pm EPM obtidos dos grupos portadores de tumor de Walker 256 (W) e portadores de tumor de Walker suplementados com óleo de peixe (WOP) e gordura de coco (WCO). One-way ANOVA seguido de Teste Tukey * $p < 0.05$ vs. W e WCO.

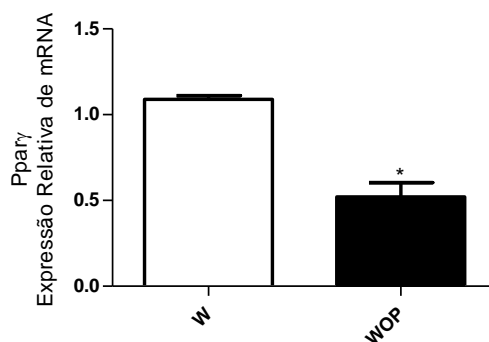


FIGURA 12 Expressão relativa de mRNA de Ppar γ no tecido tumoral analisado por qRT-PCR. O gene de referência Hprt foi utilizado para normalização dos dados. Estes estão apresentados como média \pm EPM após- $2^{-\Delta\Delta CT}$, obtidos dos grupos portadores de tumor de Walker 256 (W) e portadores de tumor de Walker 256 suplementados com óleo de peixe (WOP) n= 8. Teste t de Student * $p < 0.05$ vs. W

Na Figura 13 estão apresentados os dados referentes a expressão proteica de PKC no tecido tumoral. A suplementação com óleo de peixe ou gordura de coco não modificou a expressão dessa proteína no tecido tumoral, sendo similar à do grupo W. (W 1.03 ± 0.04 vs. WOP 1.00 ± 0.03 vs. WCO 1.01 ± 0.05).

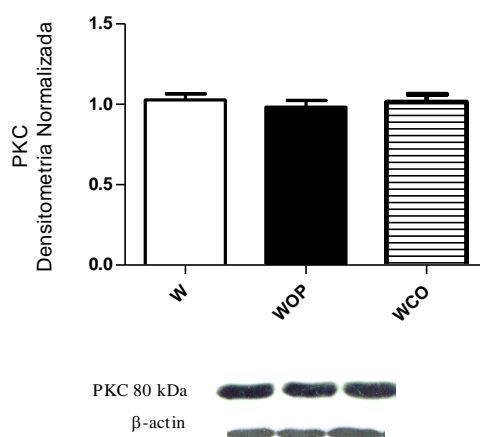


FIGURA 13 Expressão proteica de PKC no tecido tumoral analisado por western blotting. Anti- β -actin foi utilizado como controle de quantidade de proteína para normalização dos dados (n=7). As bandas resultantes foram analisadas e quantificadas pelo software Image J[®]. Os dados estão apresentados como média \pm EPM obtidos dos grupos portadores de tumor de Walker 256 (W) e portadores de tumor de Walker suplementados com óleo de peixe (WOP) e gordura de coco (WCO). One-way ANOVA seguido de Teste Tukey.

Na Figura 14 estão apresentados os dados referentes a expressão proteica de HSP 70 no tecido tumoral. A suplementação com óleo de peixe ou gordura de coco também não modificou a expressão de HSP 70, sendo similar à do grupo W (W 1.07 ± 0.04 vs. WOP 1.12 ± 0.03 vs. WCO 1.13 ± 0.03).

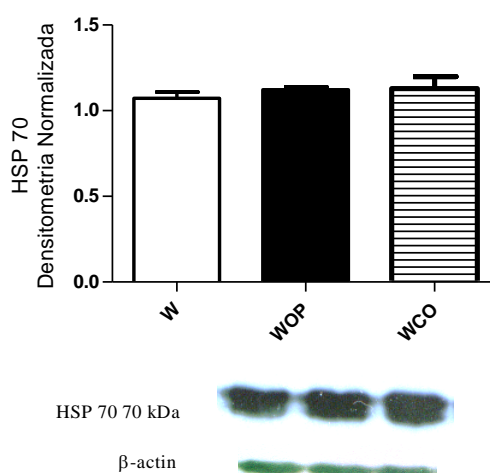


FIGURA 14 Expressão proteica de HSP70 no tecido tumoral analisado por western blotting. Anti- β -actin foi utilizado como controle de quantidade de proteína para normalização dos dados (n=8). As bandas resultantes foram analisadas e quantificadas pelo software Image J[®]. Os dados estão apresentados como média \pm EPM obtidos dos grupos portadores de tumor de Walker 256 (W) e portadores de tumor de Walker suplementados com óleo de peixe (WOP) e gordura de coco (WCO). One-way ANOVA seguido de Teste Tukey.

Na Figura 15 estão apresentados os dados da expressão proteica de HRas no tecido tumoral. A suplementação com óleo de peixe (WOP) reduziu a expressão de HRas em 19.6 % e ($p < 0.05$) quando comparada à do grupo W e WCO. Não houve diferença estatística entre os grupos WCO e W (W 1.02 ± 0.02 vs. WOP 0.82 ± 0.23 vs. WCO 1.06 ± 0.03).

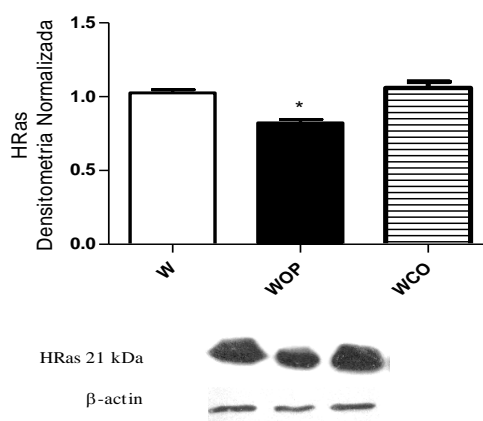


FIGURA 15 Expressão proteica de HRas no tecido tumoral analisado por western blotting. Anti- β -actin foi utilizado como controle de quantidade de proteína para normalização dos dados ($n = 8$). As bandas resultantes foram analisadas e quantificadas pelo software Image J[®]. Os dados estão apresentados como média \pm EPM obtidos dos grupos portadores de tumor de Walker 256 (W) e portadores de tumor de Walker suplementados com óleo de peixe (WOP) e gordura de coco (WCO). One-way ANOVA seguido de Teste Tukey * $p < 0.05$ vs. W e WCO.

A suplementação com óleo de peixe (WOP) também diminuiu em 20% ($p < 0.05$) a expressão proteica de MMP 2 no tecido tumoral quando comparada à do grupo W e WCO. Porém, não houve diferença estatística entre os grupos WCO e W (W 1.02 ± 0.08 vs. WOP 0.80 ± 0.03 vs. WCO 1.00 ± 0.03). (Figura 16)

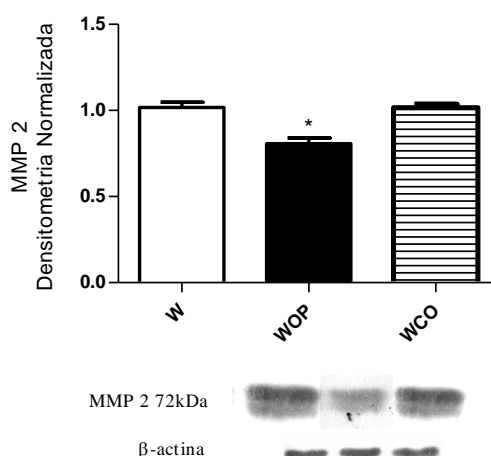


FIGURA 16 Expressão proteica de MMP 2 no tecido tumoral analisado por western blotting. Anti- β -actin foi utilizado como controle de quantidade de proteína para normalização dos dados ($n= 8$). As bandas resultantes foram analisadas e quantificadas pelo software Image J[®]. Os dados estão apresentados como média \pm EPM obtidos dos grupos portadores de tumor de Walker 256 (W) e portadores de tumor de Walker suplementados com óleo de peixe (WOP) e gordura de coco (WCO). One-way ANOVA seguido de Teste Tukey * $p < 0.05$ vs. W e WCO.

Na Figura 17 estão apresentados os dados da expressão proteica de p53 no tecido tumoral. A suplementação com óleo de peixe no grupo WOP aumentou a sua expressão em 29 % ($p < 0.05$) quando comparada à do grupo W e WCO. Contudo, não houve diferença estatística entre os grupos WCO e W (W 0.86 ± 0.04 vs. WOP 1.11 ± 0.04 vs. WCO 0.91 ± 0.04)

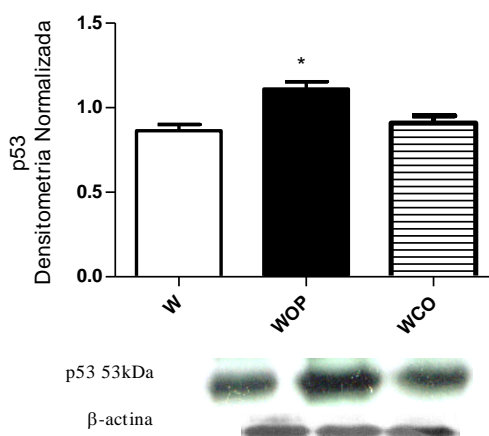


FIGURA 17 Expressão proteica de p53 no tecido tumoral analisado por western blotting. Anti- β -actin foi utilizado como controle de quantidade de proteína para normalização dos dados ($n= 9$). As bandas resultantes foram analisadas e quantificadas pelo software Image J[®]. Os dados estão apresentados como média \pm EPM obtidos dos grupos portadores de tumor de Walker 256 (W) e portadores de tumor de Walker suplementados com óleo de peixe (WOP) e gordura de coco (WCO). One-way ANOVA seguido de Teste Tukey * $p < 0.05$ vs. W e WCO.

Quando avaliamos a razão Bax e Bcl-2, verificamos que a suplementação com óleo de peixe não alterou de forma significativa a expressão proteica de Bax no grupo WOP no tecido tumoral, quando comparado à do grupo W e WCO. Entretanto foi capaz de alterar a razão Bcl-2/Bax pela redução da expressão proteica de Bcl-2 no tecido tumoral no grupo WOP. A razão Bcl-2/Bax diminuiu 20.3% ($p < 0.05$) no grupo suplementado com óleo de peixe (WOP) quando comparado ao grupo W e WCO. Não houve diferença estatística entre os grupos WCO e W (W 1.13 ± 0.03 vs. WOP 0.90 ± 0.03 vs. WCO 1.09 ± 0.03), como demonstrado na Figura 18.

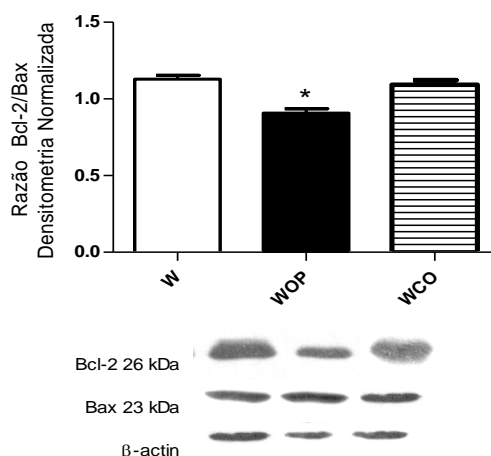


FIGURA 18 Razão Bcl-2/Bax no tecido tumoral analisado por western blotting. Anti- β -actin foi utilizado como controle de quantidade de proteína para normalização dos dados ($n = 8$). As bandas resultantes foram analisadas e quantificadas pelo software Image J[®]. Os dados estão apresentados como média \pm EPM obtidos dos grupos portadores de tumor de Walker 256 (W) e portadores de tumor de Walker suplementados com óleo de peixe (WOP) e gordura de coco (WCO). One-way ANOVA seguido de Teste Tukey * $p < 0.05$ vs. W e WCO.

Nas Figuras 19 A e B estão apresentados os dados referentes à expressão proteica de caspase-7, caspase-7 clivada (forma ativa) (W 0.98 ± 0.01 vs. WOP 1.19 ± 0.03 vs. WCO 0.99 ± 0.03) e caspase-3 clivada (forma ativa) (W 0.92 ± 0.02 vs. WOP 1.16 ± 0.04 vs. WCO 0.94 ± 0.02), respectivamente. A suplementação com óleo de peixe foi capaz de aumentar a expressão da forma clivada de caspase-7 em 21.4% ($p < 0.05$) e da forma clivada de caspase-3 em 26% ($p < 0.05$), no grupo WOP quando comparada à do grupo W e WCO.

Entretanto não houve diferença estatística entre os grupos WCO e W. Observou-se uma predominância do fragmento clivado de caspase-7 (18kDa) em relação à caspase-7 (35kDa) (Figura A). Porém, não foi detectada a presença de pró-caspase-3 (Figura B) em nenhum dos grupos experimentais, o que foi confirmado com a utilização de controles positivos (fígado e hepatoma) (dados não demonstrados).

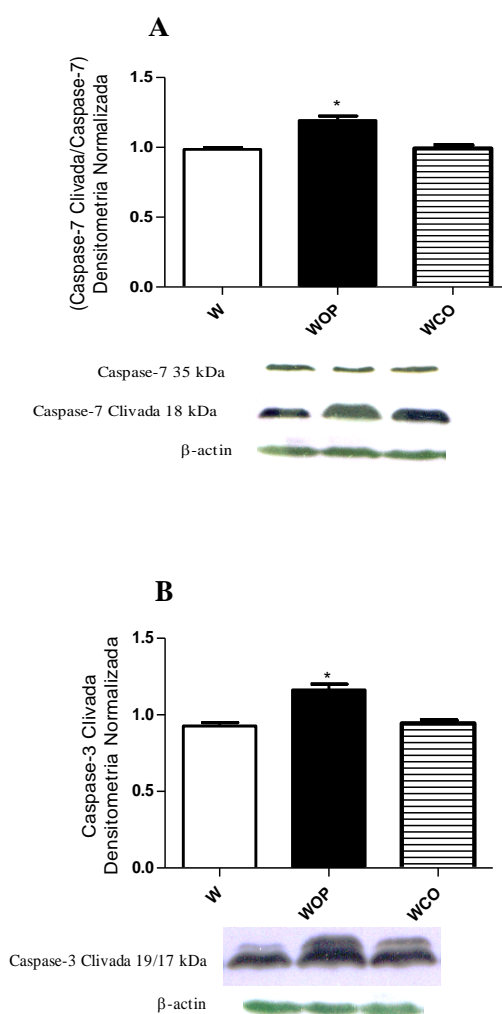


FIGURA 19 Expressão proteica no tecido tumoral analisado por western blotting. **(A)** caspase - 7 (n= 7), **(B)** caspase-3 (n= 7). Anti- β -actin foi utilizado como controle de quantidade de proteína para normalização dos dados. As bandas resultantes foram analisadas e quantificadas pelo software Image J[®]. Os dados estão apresentados como média \pm EPM obtidos dos grupos portadores de tumor de Walker 256 (W) e portadores de tumor de Walker suplementados com óleo de peixe (WOP) e gordura de coco (WCO). One-way ANOVA seguido de Teste Tukey * $p < 0.05$ vs. W e WCO.

A Figura 20 demonstra o resultado da expressão proteica de PARP-1 e PARP-1 clivado (forma ativa) no tecido tumoral. A suplementação com óleo de peixe ou gordura de coco não modificou a expressão de PARP-1, sendo similar à do grupo W (W 1.03 ± 0.02 vs. WOP 1.08 ± 0.03 vs. WCO 1.04 ± 0.05). Além disso, como ocorreu com a caspase-7, observou-se uma predominância da forma clivada de PARP-1 (89 kDa) nos três grupos experimentais.

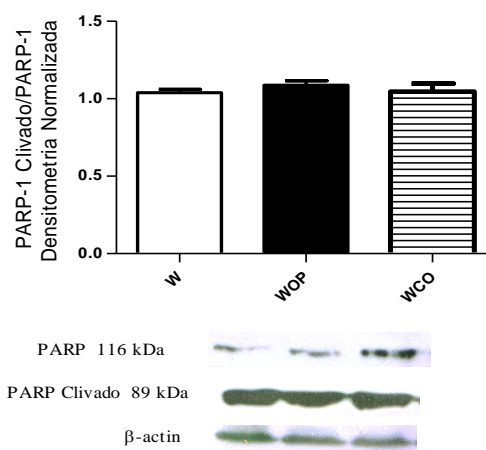


FIGURA 20 Expressão proteica de PARP-1 clivado no tecido tumoral analisado por western blotting. Anti- β -actin foi utilizado como controle de quantidade de proteína para normalização dos dados (n= 7). As bandas resultantes foram analisadas e quantificadas pelo software Image J[®]. Os dados estão apresentados como média \pm EPM obtidos dos grupos portadores de tumor de Walker 256 (W) e portadores de tumor de Walker suplementados com óleo de peixe (WOP) e gordura de coco (WCO). One-way ANOVA seguido de Teste Tukey.

Para melhor entender os resultados obtidos sobre a expressão de caspase-3 e PARP-1, investigamos a expressão dessas proteínas na forma ascítica e a fase inicial do crescimento subcutâneo do tumor de Walker 256. Na Figura 21 estão apresentados os dados da expressão proteica de caspase-3, caspase-3 clivada, PARP-1 e PARP-1 clivado dos grupos: células de tumor de Walker 256 na forma ascítica (54 μ g de proteína) (T0), tecido tumoral de Walker 256 com 4 dias de crescimento subcutâneo (45 μ g de proteína) (T4), tecido tumoral de Walker 256 com 6 dias de crescimento subcutâneo (45 μ g de proteína) (T6) e tecido tumoral de Walker 256 com 8 dias de crescimento subcutâneo (45 μ g de proteína) (T8). Os dados apresentados são qualitativos e demonstraram uma

prevalência da forma clivada de caspase-3 e PARP no grupo T0. A expressão proteica de pró-caspase-3, que não fora detectada no tumor de Walker 256 com 15 dias de crescimento subcutâneo (dados não demonstrados) surgiu nas fases iniciais de crescimento do tumor de Walker 256 (grupos T4, T6 e T8).

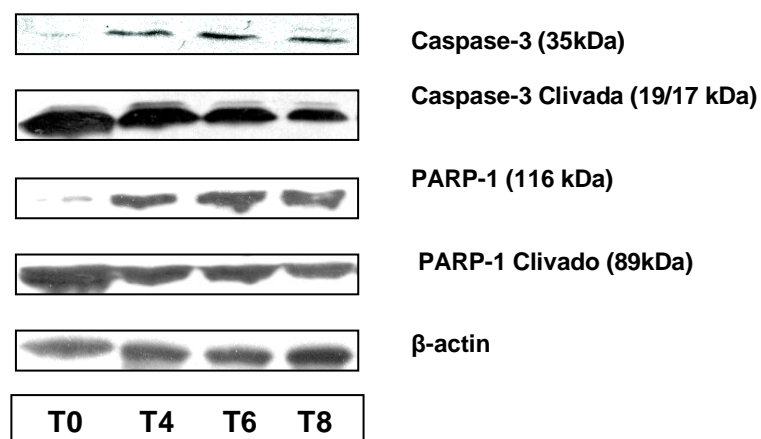


FIGURA 21 Expressão proteica de células do tumor de Walker na forma ascítica (54µg de proteína) (T0), tecido tumoral com 4 dias de crescimento subcutâneo (45µg de proteína) (T4), tecido tumoral com 6 dias de crescimento subcutâneo (45µg de proteína) (T6) e tecido tumoral com 8 dias de crescimento subcutâneo (45µg de proteína) (T8). Dados qualitativos analisados por western blotting.

Devido a presença da forma clivada de caspase-3 e PARP-1 no tumor de Walker 256, utilizamos a metodologia de Citometria de Fluxo para verificar o perfil destas células quando marcadas com Anexina V, um marcador de morte celular por apoptose. Na Figura 22 A verificamos que a maior parte das células tumorais de Walker 256 do líquido ascítico (grupo T0) estão apresentadas no quadrante inferior esquerdo (7AAD-/Anexina-), indicativo de células viáveis (86%) e 7.01% se apresentam no quadrante inferior direito (7AAD-/Anexina+), indicativo de apoptose. Quando avaliado as células de Walker 256 do tecido tumoral com 4 dias de crescimento subcutâneo (grupo T4) (Figura 22 B) observa-se que 47.26% das células estão no quadrante inferior esquerdo, indicativo de células viáveis e que 49.05% das células estão no quadrante inferior direito (7AAD-/Anexina+), indicativo de morte celular por apoptose.

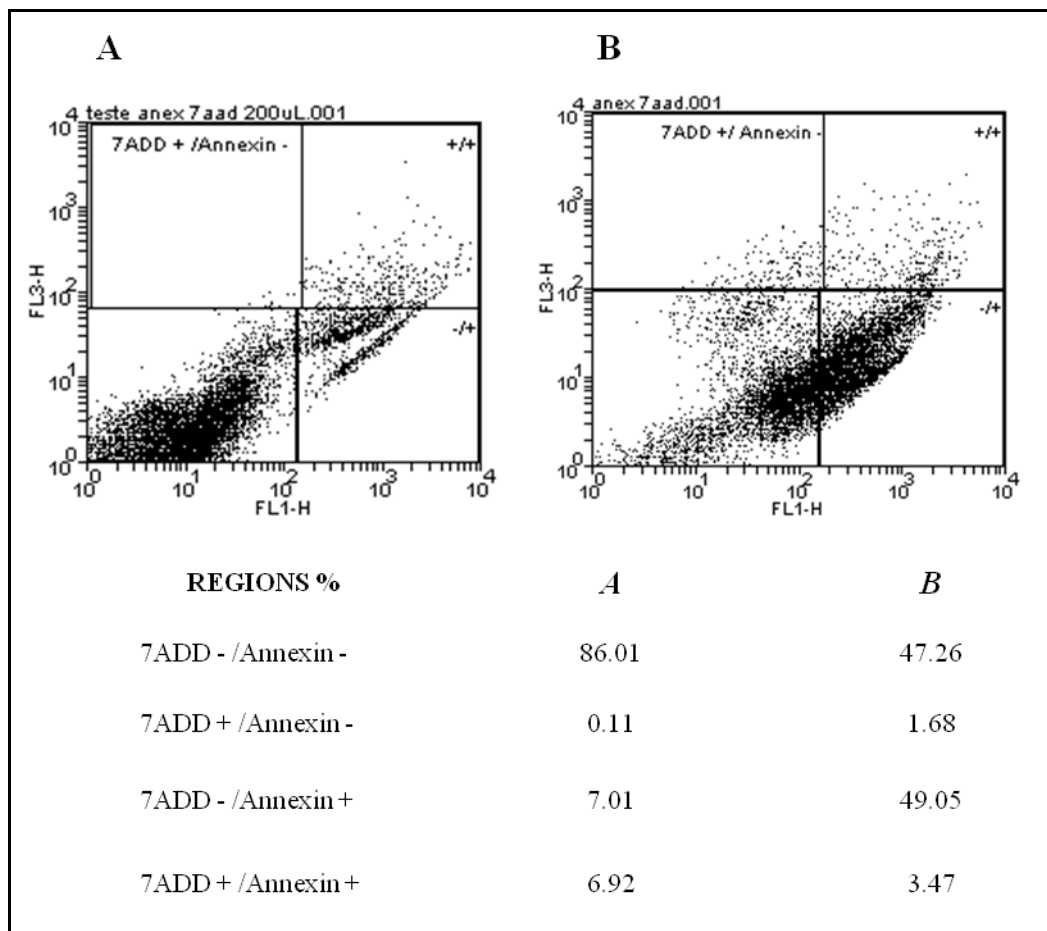
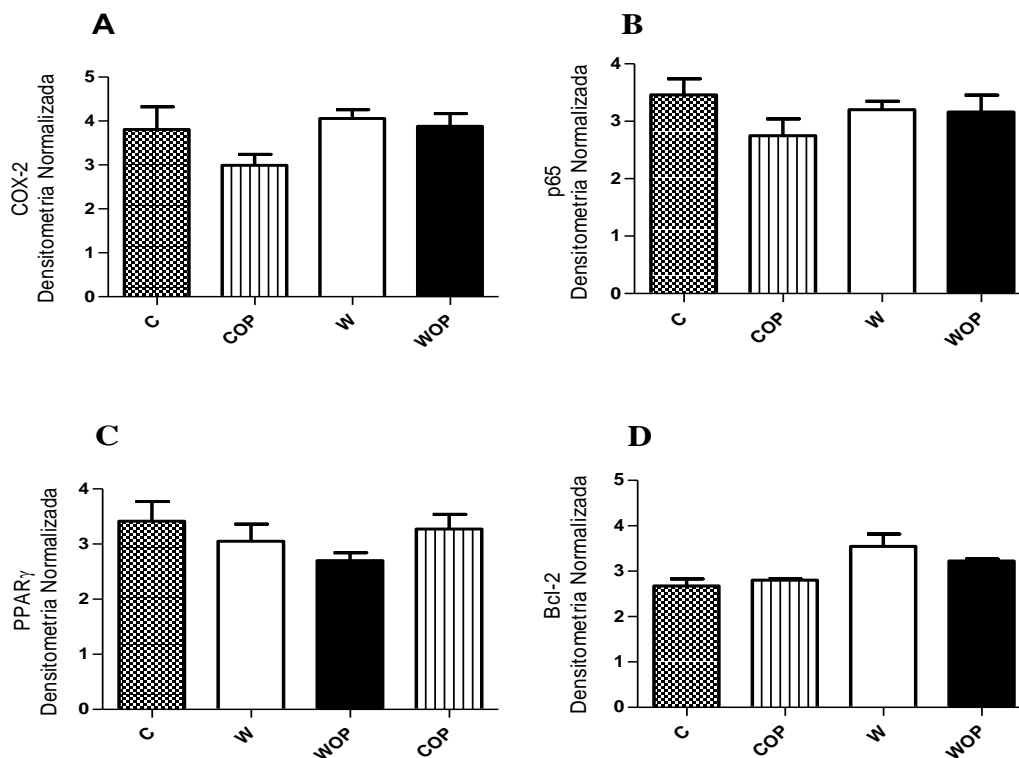


FIGURA 22 Porcentagem de células marcadas com 7ADD e Anexina analisadas por Citômetro de Fluxo. (A) células do tumor de Walker na forma ascítica (B) tecido tumoral com 4 dias de crescimento subcutâneo. Os resultados estão demonstrados em porcentagem, considerando o número total de células analisadas de 100%.

5.3 EXPRESSÃO PROTEICA NO SORO

Ainda utilizando a técnica de western blotting, investigamos se a suplementação com óleo de peixe e/ou a presença de tumor de Walker 256 alterava a expressão das proteínas COX-2, p65, PPAR γ , Bcl-2, p53 e HRas no soro. Como mostrado na Figura 23, a suplementação com óleo de peixe dos grupos controle suplementados com óleo de peixe (COP) e portadores de Tumor de Walker 256 suplementados com óleo de peixe (WOP) não foi capaz de modificar a expressão de (A) COX-2 (C 3.81 ± 0.52 , COP 3.00 ± 0.25 , W 4.06 ± 0.20 , WOP 3.89 ± 0.30), (B) p65 (C 3.46 ± 0.28 , COP 2.75 ± 0.30 , W 3.20 ± 0.14 , WOP 3.16 ± 0.30), (C) PPAR γ (C 3.42 ± 0.35 COP 3.27 ± 0.26 , W 3.05 ± 0.31 ,

WOP 2.705 ± 0.14), (D) Bcl-2 (C 2.67 ± 0.15 , COP 2.80 ± 0.02 , W 3.54 ± 0.27 , WOP 3.22 ± 0.04), (E) p53 (C 2.67 ± 0.15 , COP 2.80 ± 0.02 , W 3.54 ± 0.27 , WOP 3.22 ± 0.04), (F) Hras (C 3.76 ± 0.56 , COP 3.38 ± 0.17 , W 3.50 ± 0.57 , WOP 3.50 ± 0.13), sendo similares à dos grupos C e W. Além desses grupos foram analisados os grupos suplementados com gordura de coco (CCO e WCO), que também apresentaram resultados similares aos dos grupos C e W (dados não demonstrados). A expressão da proteína HSP 70 não foi detectada no soro de nenhum grupo experimental, sendo isto confirmado pelo uso de um controle positivo (dados não demonstrados).



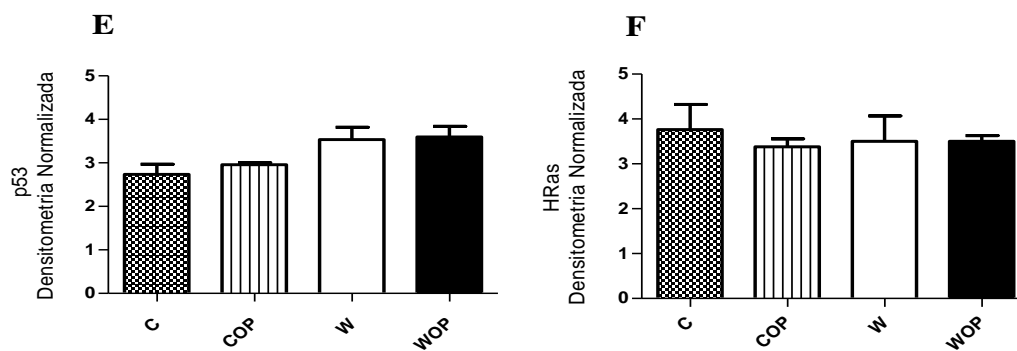


FIGURA 23 Expressão proteica no soro analisado por western blotting. Membrana corada foi utilizada como controle de quantidade de proteína para normalização dos dados. As bandas resultantes foram analisadas e quantificadas pelo software Image J[®]. (A) COX-2, (B) p65, (C) PPAR γ , (D) Bcl-2, (E) p53, (F) HRas. Os dados estão apresentados como média \pm EPM obtidos dos grupos controle (C), controle suplementados com óleo de peixe (COP), portadores de tumor de Walker 256 (W) e portadores de tumor de Walker suplementados com óleo de peixe (WOP) (n=4). Two-way ANOVA seguido de Teste Bonferroni.

Representação esquemática do efeito da suplementação com óleo de peixe sobre a expressão de proteínas no tecido tumoral:

Proteína	Função avaliada	Efeito do óleo de peixe
p65	proliferação,sobrevivência	—
p52	proliferação,sobrevivência	—
IkB α	inibidor de NF-kB	—
PPAR γ	crescimento, apoptose	↓
PKC	proliferação	—
HSP 70	sobrevivência, anti-apoptótico	—
HRas	proliferação	↓
MMP 2	crescimento, angiogênese	↓
p53	pró-apoptótico	↑
Bcl-2	anti-apoptótico	↓
Bax	pró-apoptótico	—
caspase-7	pró-apoptótico	↑
caspase-3	pró-apoptótico	↑
PARP-1	pró-apoptótico	—

6 DISCUSSÃO

Trabalhos prévios do Laboratório de Metabolismo Celular-UFPR demonstraram que a suplementação com óleo de peixe reduziu o crescimento tumoral em ratos portadores de tumor de Walker 256 (MUND *et al.*, 2007; AIKAWA *et al.*, 2008; COELHO *et al.*, 2012) (Anexo 3). Este resultado foi devido, em parte, pela redução da taxa de proliferação celular e do aumento de morte celular por apoptose das células tumorais (MUND *et al.*, 2007). A partir destes dados, procurou-se investigar proteínas que poderiam estar envolvidas em vias de sinalização de proliferação e morte celular por apoptose. Para expandimos estas informações, utilizamos o tumor de Walker 256 em ratos suplementados com óleo de peixe. As proteínas investigadas neste trabalho foram selecionadas pela importância funcional e por fazerem parte de importantes vias utilizadas pela maquinaria celular do câncer, na qual os AGPI n-3 poderiam estar atuando. Apesar dos mecanismos moleculares ainda serem desconhecidos, nossos dados sugerem que as proteínas PPAR γ , HRas, MMP 2, p53, Bcl-2, caspase-7 e caspase-3, mas não NF-kB, PKC, HSP 70, Bax e PARP-1 parecem estar envolvidas no efeito anti-proliferativo e pró-apoptótico do óleo de peixe no tumor de Walker 256.

Metodologias que estudam proteínas, como western blotting, nos permite saber se e quando o produto de um gene está sendo expresso, além de avaliar a sua expressão relativa. Isto se torna relevante, pois enquanto o genoma de um organismo permanece relativamente estável ao longo da sua vida, o seu conjunto de proteínas pode ser variável e dinâmico. Esta técnica é uma importante ferramenta utilizada com objetivo de identificar e/ou quantificar proteínas específicas, a partir de uma mistura complexa de proteínas, sendo amplamente aceita na comunidade científica.

A suplementação com óleo de peixe altera a composição de vários ácidos graxos em tecidos e soro do animal, com aumento de EPA e DHA, juntamente com uma redução de AA. As proporções de AGPI n-3 e n-6 acumulados em nossas células e tecidos refletem quantitativamente na maneira de como nos alimentamos (LANDS, 2012), sendo que a suplementação crônica com óleo de

peixe leva a incorporação dos ácidos graxos nas membranas celulares, podendo assim, influenciar nas respostas biológicas (SENKAL, 2005).

Estudos sugerem que o aumento na razão AGPI n-6/n-3, principalmente na dieta ocidental, podem ser responsáveis, em parte, pelo aumento da incidência e risco de doenças com base inflamatória. Os mecanismos que tentam explicar a relação entre os índices alterados de AGPIs e o aumento do processo inflamatório são baseados em alterações de moléculas que fazem parte da transdução de sinal e efetores importantes, que podem levar até a alteração na expressão gênica (WEAVER *et al.*, 2009). Ainda não se pode afirmar que os efeitos anti-tumorais dos AGPI n-3 sejam devido a valores mais elevados de AGPI n-3, valores mais reduzidos de AGPI n-6 ou pela alteração na razão AGPI n-6/n-3. Entretanto, estudos em animais e humanos sugerem que a razão AGPI n-6/n-3 parece ser mais importante do que a quantidade absoluta de AGPI n-3. Estudo utilizando um modelo de câncer de próstata em ratos mostrou que a razão AGPI n-6/n-3 inferior a 5/1 foi eficaz em retardar a progressão tumoral (GU *et al.*, 2013)

O incremento de AGPI n-3 nos grupos suplementados com óleo de peixe foi capaz de provocar alterações na razão AGPI n-6/n-3, sendo um importante marcador para avaliar o predomínio de AGPI n-6 *versus* n-3. Como esperado, os grupos que receberam a suplementação com óleo de peixe (1g/Kg/dia) durante 44 dias tiveram redução da razão AGPI n-6/ n-3 tanto no tecido tumoral quanto no soro (Figura 7). Estas observações podem ser de relevância clínica, pois tem sido demonstrado que a razão AGPI n-6/n3 pode ser um importante marcador, relacionando o risco de câncer em relação à ingestão de ácidos graxos (MORIN *et al.*, 2013). Entretanto, vale a pena ressaltar que as concentrações de AGPIs não são apenas dependentes da dieta, mas também são influenciados por variações genéticas e podem ser específicos para tecidos e espécie. Sendo que isto pode explicar, em parte, as diferentes respostas aos AGPI n-3 observados em várias condições experimentais, principalmente em humanos (PELLICCIA *et al.*, 2012).

Uma série de mediadores moleculares pode ser capaz de provocar inflamação e simultaneamente induzir oncogenes, incluindo alguns eicosanóides bioativos originados pela conversão metabólica de AA, espécies reativas de

oxigênio ou nitrogênio e citocinas. Estas moléculas são produzidas tanto pelas células inflamatórias, presentes no microambiente em torno dos tumores e pelas células tumorais principais (CALVIELLO *et al.*, 2013). Estudos sobre a suplementação com óleo de peixe em humanos saudáveis indicam que mudanças na razão AGPI n-6/n-3 seja capaz de influenciar as respostas inflamatórias (WEAVER *et al.*, 2009). Os AGPIs podem ser mobilizados das membranas celulares e, uma vez livres no citosol têm a capacidade de regular diversas proteínas que fazem parte de cascatas de transdução de sinal não só de inflamação, mas relacionadas com a proliferação celular e apoptose. Como estas vias geralmente estão alteradas no câncer, os AGPI n-3 poderiam estar atuando em algumas dessas proteínas, alterando sua funcionalidade.

Sugere-se que o óleo de peixe reduza a expressão de genes envolvidos em vias de sinalização relacionada com processo inflamatório, estresse oxidativo, hipóxia e sinalização via fatores de transcrição, como receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPARs) e fator nuclear kappa B (NFk-B) (BOUWENS *et al.*, 2009). Evidências epidemiológicas mostraram que aproximadamente 25% de todos os cânceres humanos estejam associados com inflamação e/ou infecção crônica. (MORRINSON, 2012). Algumas vias de sinalização que fazem parte do processo inflamatório e que estão associadas ao câncer já foram identificadas, entretanto a interconexão entre inflamação e câncer ainda não está completamente esclarecida (CALVIELLO *et al.*, 2013).

Algumas vias de inflamação também podem fornecer sinais para a sobrevivência e proliferação celular, levando à progressão tumoral. A ativação e/ou expressão de membros da família NF-kB parece ser um elemento importante de ligação entre a inflamação e o câncer (MORRINSON, 2012). Neste estudo não encontramos diferença estatística na expressão de importantes proteínas da família NF-kB no tecido tumoral (Figura 8 e 10). Entretanto, a expressão do mRNA de p65 foi reduzida no tumor de Walker 256 no grupo suplementado com óleo de peixe (Figura 9). Acreditamos que a capacidade dos AGPI n-3 em alterar a expressão de genes seja um importante mecanismo, que pode explicar em parte, seus efeitos benéficos no câncer. Porém, neste caso, não houve efeito na expressão proteica de p65, que é o produto de seu gene.

Estabelecer uma relação entre os genes presentes nas células e as funções desempenhadas pelas proteínas codificadas por eles ainda é um desafio. Por isso, são necessários estudos de proteínas, uma vez que estas são componentes centrais de funções biológicas e importantes candidatas a alvos farmacológicos e marcadores biológicos de diagnóstico. Sabe-se que métodos de quantificação de proteínas, como western blotting ou imunohistoquímica nem sempre equivalem com os dados obtidos da quantificação de mRNA, pois esta variabilidade do que é fornecido pelo código genético pode ser resultado de complexos mecanismos de controle da expressão gênica (BUSTIN *et al.*, 2009).

As alterações na expressão de mRNA nem sempre tem uma correlação com o fenômeno biológico estudado. As pesquisas de como ou por que um gene está sendo expresso, em determinada situação, exige-se não apenas conhecimentos sobre os transcritos e seus produtos, mas também interações com o produto de outros genes. O que torna claro a complexidade na dinâmica da regulação das redes gênicas. Por isso futuros estudos em genômica associados com a proteômica devem ser projetados para se ter uma visão geral dos efeitos dos AGPI n-3 no tumor de Walker 256.

Sabe-se que o complexo NF- κ B tem um papel central na inflamação e é conhecido por ser expresso constitutivamente em tumores. Ele é regulado negativamente nas células em repouso através de interações covalentes com as proteínas inibidoras da família I κ B, conferindo assim à estabilização citosólica do complexo I κ B/NF- κ B, diminuindo a sua translocação para o núcleo (MORIN *et al.*, 2013). Como não avaliamos esta interação e a sua translocação para o núcleo, não descartamos a hipótese de redução de sua atividade pelos AGPI-3, já que estes possuem a capacidade de reduzir o ambiente inflamatório no tumor de Walker 256.

Além da proteína NF- κ B p65, fomos verificar se os AGPI n-3 teriam efeito na expressão do mRNA de PPAR γ no tecido tumoral, já que a família de PPARs provavelmente seja a intermediadora entre dietas de ácidos graxos e crescimento tumoral (ESCOBAR *et al.*, 2009). Estudos demonstraram que a regulação de PPAR γ poderia estar envolvida no metabolismo lipídico, incluindo a dos AGPIs. Acredita-se que a redução de PPARs leva a um acúmulo de produtos de lipólise,

resultando em geração de espécies reativas de oxigênio, seguido de disfunção mitocondrial e posterior apoptose (WANG *et al.*, 2013). Um possível mecanismo que os anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) induzem apoptose em células normais e neoplásicas, envolve a via de PPARs. A presença de PPARs em células de câncer colorrectal promoveram a proliferação celular, e os AINEs induziram a apoptose nestas células suprimindo PPARs (WU, 2010). Além disso, o silenciamento de PPARs em linhas celulares gastrointestinais reduziu a viabilidade celular, sugerindo que o aumento da expressão de PPAR γ pode induzir a tumorigênese (FUCCI *et al.*, 2012).

Quando avaliado a expressão relativa de mRNA e proteica de PPAR γ no tecido tumoral, observou-se que o óleo de peixe foi capaz de reduzir a expressão de ambos no tecido tumoral. Apesar dos resultados demonstrarem redução no grupo suplementado com óleo de peixe, observou-se diferenças entre os valores de mRNA e concentrações de proteínas de PPAR γ no tecido tumoral (Figuras 11 e 12). Sabe-se que a regulação gênica, o processo pelo qual a produção e degradação de produtos de genes são controladas na célula, é um mecanismo de controle fundamental na biologia. Ela abrange uma variedade de mecanismos celulares incluindo a ativação de fatores de transcrição, alteração de estruturas da cromatina e funções de regulação do processamento de RNA pós-transcricional além de mudanças pós-traducionais (KRAUS & HOTTIGER, 2013). Devido a estes mecanismos, a quantidade de proteína expressa não é necessariamente proporcional a quantidade correspondente de seu RNA mensageiro.

Estudos sugerem que a ativação de PPAR γ em uma variedade de células tumorais conduz à inibição de crescimento, redução da capacidade de invasão e redução da produção de citocinas pró-inflamatórias. Entretanto foi relatado que a ativação sistêmica de PPARs parece ser pró- tumorigênico em algumas situações experimentais *in vitro* e em modelos *in vivo* (LI *et al.*, 2012). Os PPARs podem ser ativados via ligantes provenientes de moléculas lipídicas, como os AGPI n-3 e seus derivados. Entretanto, neste estudo não foi possível relacionar o resultado de expressão proteica com a atividade de PPARs. Nós sugerimos uma ligação entre a diminuição da expressão de PPAR γ no tecido tumoral com a redução do tumor de Walker 256 no grupo suplementado com óleo de peixe, porém não podemos afirmar que este resultado esteja relacionado com a sua ativação.

Futuros estudos devem ser delineados para análises funcionais de PPARs, com a utilização de classes de inibidores, agonistas/antagonistas, ligantes de PPARy, além da investigação de outros genes e proteínas relacionadas com as vias de PPARs, para um melhor entendimento sobre a dinâmica das interações entre PPARy, AGPI n-3 e câncer.

Outro alvo importante dos AGPI n-3 é a família de proteínas PKC, envolvidas na regulação da proliferação celular e apoptose. No câncer de cólon esta proteína é superexpressa, sendo que a sua expressão foi diminuída no cólon de ratos suplementados com óleo de peixe (ROYNETTE *et al.*, 2004). Entretanto, neste trabalho não encontramos diferença estatística entre os grupos na expressão proteica de PKC (Figura 13) no tecido tumoral.

A atividade anti-tumoral exercida pelos AGPI n-3 pode ser resultado da redução da proliferação celular, do aumento da taxa de apoptose ou de ambos. Por isso, é provável que os AGPI n-3, presentes no óleo de peixe, atuem sobre proteínas envolvidas no desenvolvimento tumoral, com ações pró-apoptóticas e anti-proliferativas.

A HRas foi selecionada para ser investigada, pois juntamente com a KRas são as mais relevantes e estudadas no câncer pelo seu potencial proliferativo. Além disso, a família Ras é um dos alvos moleculares estudados e a literatura evidencia que os AGPI n-3 podem alterar sua expressão/ativação. A via de transdução de sinal Ras/Raf/MEK/ERK é uma das principais cascatas de sinais proliferativos e de sobrevivência celular (COLLETT *et al.*, 2001). Concentrações elevadas de Ras são frequentemente associadas com a proliferação celular anormal, sendo que cerca de um terço dos casos de câncer apresentam alterações na expressão ou estado de ativação de um ou mais de seus componentes (DHILLON *et al.*, 2007). Além disso, a ativação da via constitutiva de HRas já é suficiente para converter as células de mama humanas com características não invasivas para um fenótipo mais maligno (LEE *et al.*, 2006).

A alta frequência de mutações/superexpressão de Ras em adenomas e adenocarcinomas em modelo humano e animal estimula o desenvolvimento do tumor de cólon. Estes efeitos biológicos podem ser devidos a efetores de Ras que induzem ciclina D1 e COX-2, resultando em hiperproliferação (CHAPKIN *et*

al.,2008). Evidências apontam que Ras pode estimular a fosfolipase A2 (PLA2), a qual catalisa a hidrólise de ácido araquidônico (AA), liberando-o para ser convertido em PGE₂ pela enzima COX-2. A substituição de AA, por DHA e EPA na membrana celular, poderia estar influenciando na diminuição da expressão e concentração da forma ativa de Ras (COLLETT *et al.*, 2001).

MUND (2007) sugere que os AGPI n-3 poderiam exercer seus efeitos, tanto na proliferação quanto na morte celular por apoptose, através da redução da síntese de PGE₂ pela COX-2. Assim, a diminuição da expressão de HRas (Figura 15) no tecido tumoral no grupo suplementado com óleo de peixe poderia estar relacionado, em parte, com a diminuição do ambiente inflamatório. Isto ocorre pela diminuição da disponibilidade de AA pela membrana celular, o que reduziria os sinais de proliferação celular. O grupo suplementado com óleo de peixe apresentou redução da quantidade de AA no tecido tumoral, assim como aumento de EPA e DHA (redução na razão AGPI n-6/n-3), o que poderiam ter resultado na diminuição da expressão de HRas no tecido tumoral. Este resultado é o mesmo observado em células epiteliais de cólon tratadas com DHA (COLLETT *et al.*, 2001), corroborando com dados da literatura que correlacionaram a diminuição da expressão de HRas com o efeito anti-proliferativo dos AGPI n-3.

Outro mecanismo sugerido para a regulação de HRas pelos AGPI n-3 é a interação entre membranas celulares e proteínas sinalizadoras, permitindo certo controle sobre processos biológicos. As membranas plasmáticas possuem uma região denominada *lipid rafts*, composta principalmente por colesterol e esfingolipídeos, sendo que proteínas importantes na transdução de sinal, como a HRas, estão localizadas nestes domínios (CHAPKIN *et al.*, 2008). As vias de sinalização que se originam nos *lipid rafts* podem mediar uma variedade de atividades celulares pró-tumorigênicas, sendo estas constantemente ativadas no câncer (TURK & CHAPKIN, 2013).

Sugere-se que EPA possa contribuir para a apoptose celular, principalmente pela diminuição das concentrações de AA nas membranas celulares, o que indica a sua influência na produção de segundos mensageiros e metabólitos derivados de AGPIs. Enquanto isso, o DHA pode alterar as propriedades biofísicas dos *lipid rafts*, diminuindo o teor de colesterol e, provavelmente, fazendo uma redistribuição de proteínas importantes, tais como

RAS. Contudo, futuras pesquisas serão decisivas para avaliação dessas hipóteses (CORSETTO *et al.*, 2012). Sabe-se que os AGPIs possuem a capacidade de alterar diretamente a dinâmica das membranas celulares, podendo interferir na regulação de Ras, entretanto ainda são pouco conhecidos os mecanismos envolvidos (TURK *et al.*, 2012). Embora o mecanismo (s) responsável (is) por estas observações ainda não foi elucidada, é provável que classes distintas de AGPIs possam alterar a estrutura da membrana, influenciando a interação das proteínas Ras com domínios específicos dentro da membrana plasmática (COLLETT *et al.*, 2001).

A formação de novos vasos sanguíneos, denominado angiogênese, é um passo importante para o crescimento tumoral. O tumor necessita de uma demanda de oxigênio e nutrientes via vasos sanguíneos, sendo sua inibição uma das estratégias terapêuticas utilizadas na clínica (GRANCI *et al.*, 2010). Um dos eventos iniciais da angiogênese é a degradação da matriz extracelular por proteases específicas, as metaloproteinases (MMPs). Estudos demonstraram uma correlação positiva entre o aumento de MMPs e progressão tumoral, sendo um potencial alvo terapêutico (ROOMI *et al.*, 2010). Apesar de existirem cinco principais classes de MMPs, o interesse é em relação à MMP 2 e 9, que clivam colágeno IV, um dos principais componentes de matriz extracelular. Nosso resultado demonstrou a capacidade do óleo de peixe em reduzir a expressão de MMP 2 (Figura 16). Como a via de sinalização de Ras está envolvida na proliferação tumoral e pode ser um importante indutor da expressão de MMPs; e o óleo de peixe possui a capacidade de diminuir a expressão de HRas; a redução da expressão proteica de MMP 2 pode ser uma consequência da redução de Ras. Outra hipótese encontrada na literatura estaria relacionada com a capacidade dos AGPI n-3 em diminuir a expressão de genes alvo de β -catenina, como MMPs e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), levando a efeitos anti-proliferativos (GRANCI *et al.*, 2010).

A indução de oncogênes, como HRas ou silenciamento de genes supressores de tumor, como a p53 têm sido relacionados como fatores pró-angiogênicos (GRANCI *et al.*, 2010). Estudos demonstraram que a expressão de HRas induziu alterações fenotípicas malignas, em parte pelo aumento da

expressão de MMPs em células WB (células epiteliais de fígado), sugerindo que a indução de MMPs por HRas pode ser exercida de uma forma específica para cada tipo de tecido e célula (LEE *et al.*, 2006).

Além de serem responsáveis pela degradação de membrana basal, as MMP 2, também estão envolvidas na liberação de fatores de crescimento que aumentam o crescimento tumoral e agressividade (ROOMI *et al.*, 2010). Apesar de usarmos a linhagem de tumor de Walker 256 não metastizante, este tumor apresenta crescimento rápido, necessitando do processo de angiogênese para a sustentação da sua progressão tumoral. Por outro lado, não podemos descartar o potencial invasivo das células de tumor de Walker 256, pois não estudamos a dinâmica do tumor em longo prazo, pela busca de possíveis tumores secundários no corpo do rato, o que teoricamente não ocorre com este modelo.

Em condições fisiológicas normais, as MMPs são sintetizadas e secretadas como pró-enzimas, que posteriormente são ativadas. As concentrações de MMP nos tecidos saudáveis são baixas ou indetectáveis. Entretanto, a sua expressão é aumentada na maioria dos tumores, sugerindo que aumentos de MMP no tecido tumoral estão associados com o potencial invasivo e metastático dessas células (PEREIRA *et al.*, 2005). Neste estudo não avaliamos a ativação de MMPs, isto é, a quantificação do produto clivado de MMP 2. Entretanto, quando avaliamos a capacidade anti-proliferativa e anti-inflamatória dos AGPI n-3 na redução do crescimento tumoral, acreditamos que a redução da MMP 2, mesmo na forma de pró-enzima, possa estar envolvida, juntamente com HRas nos efeitos anti-proliferativos dos AGPI n-3 no tumor de Walker 256.

Acredita-se que a maioria dos fármacos utilizados na quimioterapia eliminam as células tumorais pela indução ou aumento da apoptose. Agentes com a capacidade de aumentar a expressão de proteínas pró-apoptóticas e/ou diminuir a expressão de proteínas antiapoptóticas podem ser promissoras como adjuvantes no tratamento padrão utilizado (BIONDO *et al.*, 2008). Segundo FUKUI *et al* (2012), o principal mecanismo anti-tumoral dos AGPI n-3 em câncer pancreático humano tanto *in vitro quanto in vivo* parece ser a indução de morte celular por apoptose. Baseado em dados prévios de MUND *et al.*, (2007), na qual,

o grupo suplementado com óleo de peixe apresentou maior taxa de apoptose das células do tumor de Walker 256 do que à do grupo sem suplementação, investigamos algumas proteínas envolvidas neste processo. Geralmente no câncer, as proteínas que inibem a morte celular podem estar mais expressas, enquanto as que induzem a morte celular podem estar menos expressas. O propósito desta etapa do trabalho foi verificar se os AGPI n-3 alteravam a expressão de proteínas chaves nas vias de morte celular por apoptose.

A proteína p53, envolvida na morte celular por apoptose, tem atraído muita atenção nos últimos anos, principalmente como potencial alvo terapêutico nas terapias anti-câncer (WACHTERID *et al.*, 2013). A p53 pode regular alvos a jusante por meio de mecanismos dependentes e independentes de transcrição, podendo atuar diretamente em proteínas específicas, alterando a estabilidade, localização intracelular e/ou atividade destas (RAHMAN-ROBLICK *et al.*, 2006). Foi demonstrado que o aumento da expressão proteica de p53, induzida por DHA, cineticamente correlaciona-se com a clivagem de caspase-9 e caspase-3 (ZAND *et al.*, 2007). Entretanto, DHA foi incapaz de aumentar a expressão proteica de p53 em células de Ramos, apesar da sua capacidade de induzir apoptose nesta linhagem celular. Isto é um indicativo de que a dependência de p53 na indução de apoptose por DHA é específica para cada tipo celular (ZAND *et al.*, 2007).

Nossos dados sugerem o envolvimento de p53 na indução de apoptose no tumor de Walker 256. A suplementação com óleo de peixe foi capaz de aumentar a expressão da proteína p53 no tumor de Walker 256 (Figura 17). Entretanto, o mecanismo exato pelo qual essa interação ocorre ainda não foi esclarecido. Nós também verificamos que a expressão de Bcl-2, uma proteína anti-apoptótica, está inversamente relacionada com a expressão de p53, indicando que o aumento da p53 pode diminuir a proteína Bcl -2, estando de acordo com alguns estudos em tumores (BASU *et al.*, 1998) (Figura 18).

A p53 pode atuar pós-traducionalmente e ativar diretamente a maquinaria apoptótica em nível mitocondrial. Análises moleculares sugerem que não apenas a ativação de p53, mas a sua expressão também podem influenciar a indução de morte celular (WACHTER *et al.*, 2013). As células em apoptose apresentam co-

localização de p53 com a Bcl2, Bcl -XL e Bak. Além disso, p53 citoplasmática também pode induzir a morte celular pela ativação direta de Bax (CHAABANE *et al.*, 2013). É possível que o DHA possa induzir várias vias que conduzem à apoptose e, em particular, a via que envolve Bax, o que foi descrita utilizando a linhagem celular HL60 (BLANCKAERT *et al.*, 2010). Isto sugere uma ligação entre a expressão da proteína p53 com membros da família Bcl-2. Neste estudo não houve alteração na expressão de Bax (Figura 18), sugerindo que os efeitos dos AGPI n-3 neste modelo experimental estejam mais relacionados com as proteínas p53 e Bcl-2 do que com Bax. Alguns resultados podem ser divergentes dos encontrados na literatura, pois diferentes células tumorais podem exibir distintos padrões de expressão de genes e proteínas, resultando no envolvimento de diferentes vias em resposta a exposição dos AGPI n-3. Além disso, o tipo de AGPIs, bem como a concentração utilizada e o tempo de exposição pode influenciar o resultado dos estudos (MORIN *et al.*, 2013).

Pesquisas demonstraram que em muitos tipos de câncer, a expressão de Bcl-2 está elevada, favorecendo a proliferação celular e o crescimento tumoral. No presente estudo, o grupo suplementado com óleo de peixe foi capaz de reduzir a expressão desta proteína corroborando com dados encontrados na literatura (BIONDO *et al.*, 2008; CHAPKIN *et al.* 2008; HABERMANN *et al.*, 2010) e em estudos *in vitro*, utilizando células de tumor de Walker 256 (OLIVEIRA, 2006). Os mecanismos pelos quais os AGPI n-3 desencadeiam a apoptose nas células tumorais ainda não são claros, porém o aumento do estresse oxidativo, as alterações de fluidez e propriedades da membrana celular e de organelas como a mitocôndria, pela incorporação dos AGPI n-3 também podem estar envolvidas.

A atividade antiapoptótica da Bcl-2 é antagonizada pela Bax, a qual é capaz de formar heterodímeros. Assim, a razão Bax/Bcl-2 pode ser um fator de propensão para as células entrarem em apoptose e ser utilizado como um marcador de prognóstico em certas doenças. Em adição, o entendimento desses mecanismos de indução de apoptose pode levar ao desenvolvimento de novas estratégias anti-câncer (FIANDALO; KYPRIANOU, 2012). Apesar de não serem detectadas alterações na expressão de Bax, uma proteína pró-apoptótica, a razão Bcl-2/Bax foi menor no grupo de suplementado com óleo de peixe (Figura 18), demonstrando um equilíbrio favorável para a indução de apoptose. Sugere-se que

concentrações reduzidas de Bcl-2, juntamente com concentrações normais de Bax podem ser suficientes para alterar o balanço a favor da apoptose. Dados isolados de Bcl-2 e Bax não são satisfatórios para se afirmar a indução de apoptose. Além disso, essas proteínas foram isoladas do tecido tumoral total e não separadas da fração mitocondrial, o que seria mais adequado, já que estes heterodímeros são formados na membrana mitocondrial durante a apoptose.

As alterações na membrana plasmática, disfunções das mitocôndrias, ativação das caspases e modificações no DNA são algumas características utilizadas como base em estudos de detecção da apoptose (SANKARI *et al.*, 2013). Porém, nenhuma das características morfológicas e/ou processos associados com a apoptose podem ser utilizados de forma isolada, como um indicador confiável de morte celular. Alguns dos traços morfológicos e bioquímicos podem se manifestar durante eventos não apoptóticos. Por exemplo, a permeabilização da membrana mitocondrial pode ocorrer tanto na apoptose quanto na necrose programada. Por outro lado, nem todas as características morfológicas e funcionais se manifestam em todos os eventos de apoptose, como a não participação de caspases em alguns casos (GALLUZZI *et al.*, 2011).

Para suportar a hipótese dos efeitos pró-apoptóticos dos AGPI n-3, investigamos se moléculas a jusantes desta via: as caspases executoras, também poderiam estar envolvidas.

Existem três caminhos que podem levar a ativação de caspases na apoptose: a via intrínseca, a via extrínseca ou a via dependente dos receptores de morte, conhecida como via menos intrínseca que inclui a participação do retículo endoplasmático. A principal caspase iniciadora que participa da via intrínseca é a caspase-9 e da via extrínseca é caspases-8, sendo que ambas convergem para a clivagem de caspase-3 (SANKARI *et al.*, 2013).

Como mecanismo de proteção contra ativação indevida, as caspases são sintetizadas na forma de precursores inativos (pro-caspases), necessitando de clivagem para iniciar sua ativação. Por isso, para estudar a ativação das caspases, deve-se avaliar o (os) fragmentos clivados. As caspases -7 e caspase-3 possuem o mesmo substrato clivado, o PARP-1, sendo sua clivagem um passo importante no processo de apoptose (SOLDANI *et al.*, 2001). A presença do

produto de clivagem de PARP-1 indica apoptose, ao contrário de necrose e/ou processo inflamatório durante a morte celular (DEKOJ *et al.*, 2007).

Encontramos aumento da atividade de caspase -7 e caspase-3 no tumor de Walker 256 no grupo suplementado com óleo de peixe, quando comparado ao não suplementado (Figura 19), indicando que o aumento da taxa de apoptose pelo óleo de peixe demonstrado por MUND *et al.*, 2007 foi induzida pelo aumento da ativação das caspases-7 e -3, sendo um evento caspase dependente. Juntos, estes resultados suportam os efeitos pró-apoptóticos dos AGPI n-3 no tumor de Walker 256. Apesar de não avaliarmos as caspases iniciadoras 9 e 8, nós não descartamos que ambas as vias passam estar envolvidas e por final, ativando a caspase-3.

Quando observado os fragmentos clivados de caspase-3 no grupo suplementado com óleo de peixe (WOP), o fragmento maior (19 kDa) está mais proeminente neste grupo, principalmente quando comparado a do grupo controle W. Na literatura alguns estudos sugerem que o fragmento principal nos eventos de apoptose seja o fragmento de 17kDa (PAULSEN *et al.*, 2008), porém pouco se sabe sobre o fragmento de 19 kDa neste processo. Durante a morte celular por apoptose a clivagem de PARP-1 por caspases produz dois fragmentos: um fragmento menor (24 kDa), que retém os domínios de ligação de PARP-1 no DNA e um maior (89 kDa), que a sua detecção é geralmente considerado como um indicativo para apoptose (SOLDANI *et al.*, 2001). Quando avaliamos a expressão proteica de PARP-1 clivado não encontramos diferença significativa entre os grupos experimentais (Figura 20). Além disso, foram detectados ambos fragmentos (24 e 89 kDa), em todos os grupos experimentais, sendo que o fragmento menor também não apresentou diferença estatística (dados não demonstrados). Apesar de PARP-1 ser o substrato mais conhecido da caspase-3, talvez outros, também importantes na via de apoptose, possa ser diferencialmente ativado pelos AGPI n-3.

Tomados em conjunto, os nossos resultados sugerem que a proteína p53, o Bcl -2 e as caspases -7 e caspase -3, mas não Bax e PARP-1 parecem estar envolvidos no processo de apoptose de células do tumor de Walker 256 induzidos pelo óleo de peixe.

Quando analisamos o padrão de expressão de caspase-7, caspase-3 e PARP-1 no tecido tumoral observamos: a predominância da expressão do fragmento clivado de caspase-7 em relação a caspase-7 e do fragmento clivado de PARP-1 em relação a PARP-1 e a ausência da expressão de pró-caspase-3 nos grupos experimentais. Na literatura, encontramos estudos com linhagem celular de pâncreas, na qual o EPA foi capaz ativar caspase-3 e que EPA e DHA juntos induziram a apoptose pela ativação de caspases em células de câncer da mama humano (BIONDO *et al.*, 2008). Além disso, o tratamento de células HL-60 com EPA resultou em clivagem de caspases 3, 6, 8 e 9 (KANG *et al.*, 2010) e que o DHA foi capaz de clivar PARP-1 em adenomas de cólon e células de adenocarcinoma (HABERMANN *et al.*, 2010). Porém quando observamos nossos resultados, encontramos ativação de caspases e PARP-1 também no grupo controle (W). Os questionamentos que surgiram a partir destes resultados foram: Será que existe uma ativação basal dessas proteínas nas células de tumor de Walker 256? Em qual momento a pró-caspase-3 está sendo expressa? Será que existem outras funções, além do envolvimento na apoptose? A passagem da forma ascítica para a forma sólida do tumor de Walker teria alguma influência no comportamento dessas células?

Apesar de não ser o foco deste trabalho, fomos compreender melhor os resultados obtidos sobre a expressão de caspase-3 e PARP-1. Investigamos a expressão destas proteínas nas células de tumor de Walker 256 no líquido ascítico (intraperitoneal) e nos primeiros dias de crescimento sólido (subcutâneo). Curiosamente, também verificamos uma prevalência da expressão proteica da forma clivada de caspase-3 e PARP-1 na forma ascítica do tumor de Walker 256. Enquanto a expressão proteica de caspase-3, que não fora detectada no tumor de Walker 256 com 15 dias de crescimento subcutâneo, estava presente nas fases iniciais de seu crescimento do tumoral (Figura 21). Entretanto, cerca de 86% das células do líquido ascítico do tumor de Walker 256 estavam viáveis (Figura 22 A). Enquanto as células de Walker 256 do tecido tumoral com 4 dias de crescimento subcutâneo apresentaram 47% viáveis e 49% indicando apoptose (Figura 22B). As células do tumor de Walker 256 no líquido ascítico não

mostraram aumento da ligação com anexina V, sugerindo que as alterações de membrana celular durante a morte celular não ocorrem nestas células. Sendo assim, a ativação de caspase-3 e PARP-1 não conduziram estas células tumorais à morte celular. Então, sugerimos que a ativação de caspase-3 e PARP-1 estejam relacionadas com funções não apoptóticas das células do líquido ascítico do tumor de Walker 256. Apesar da existência de outros tipos celulares no líquido ascítico, acreditamos que estes efeitos sejam principalmente das células tumorais. Enquanto isso, a forma subcutânea apresentou uma taxa de morte celular por apoptose no quarto dia de crescimento subcutâneo do tumor de Walker 256. Assim, sugerimos que a ativação de caspase-3 e PARP-1 podem ser correlacionadas com a ocorrência de apoptose na forma sólida do tumor de Walker 256, talvez por que uma das características deste tumor seja o crescimento rápido. Contudo, há necessidade de maiores investigações para se afirmar esta hipótese.

Na literatura encontram-se alguns relatos de funções não apoptóticas da presença de caspases e PARP-1 ativados. As funções das caspases incluem a participação na hematopoiese (eritropoiese, diferenciação de linfócitos e maturação de plaquetas) e na regulação da plasticidade sináptica neuronal em potenciais de longa duração (CHAITANYA *et al.*, 2010). Células de melanoma não apoptóticas, apresentando caspase-3 clivada influenciou a agressividade do tumor, contribuindo para a migração e a invasão dessas células *in vitro* (LIU *et al.*, 2013). Estudos com inibidores da atividade da PARP-1 demonstraram a sua ligação com a sobrevivência celular (SCHREIBER *et al.*, 2006).

Um dos grandes obstáculos para a interpretação precisa de dados funcionais derivados de linhagens de células tumorais é a falta de clareza sobre as alterações genéticas que essas células carregam. O genótipo de um sistema seja uma linhagem celular, um modelo animal, pode ditar o comportamento de células tumorais, podendo modificar a sua resposta quando manipulados. Apesar da obtenção de tumores originais, não há duas linhagens de células tumorais iguais. Além disso, há a preocupação de que as aberrações cromossômicas podem ser ganhas ou perdidas durante as passagens prolongadas em cultura celular (CHIN & GRAY, 2008).

Estudos devem ser realizados para verificar se o ambiente em que as células de tumor de Walker 256 são mantidas pode interferir no seu comportamento e se as transformações da forma ascítica para a forma sólida deste tumor alteram suas propriedades biológicas. Além disso, futuros experimentos precisarão confirmar se existe uma relação entre a ativação de caspase-3 e PARP-1 com o comportamento agressivo e proliferativo das células de Tumor de Walker provenientes do líquido ascítico ou a exploração de outras funções não apoptóticas neste modelo experimental.

Outra hipótese levantada seria um comportamento semelhante ao que ocorre na proliferação celular induzida pela ativação de linfócitos T. Em células T humanas em proliferação, as caspases -3 e -7 clivadas podem interagir com proteínas inibidoras de apoptose, como as XIAPs. Porém isto não ocorre quando as células estão em apoptose, quando os inibidores de XIAP, como Smac/Diablo são liberados pela mitocôndria (PAULSEN *et al.*, 2008). A estimulação *in vivo* e *in vitro* de células T apresentou elevada atividade de caspase-3, o que levou a clivagem de PARP-1 em células vivas. Porém, não levou a fragmentação de DNA nuclear, como ocorre a jusante da ativação de caspases na via apoptótica. Apesar das caspases poderem interagir com alguns substratos, como PARP-1, estes poderiam ser mantidos longe de outros substratos relacionados com a morte celular (WILHELM *et al.*, 1998).

A relação entre morte e proliferação celular pode ser um dos principais mecanismos de homeostase explorado pelos tumores para auto-preservação. (HUANG *et al.*, 2010). Uma das hipóteses seria as alterações genéticas e moleculares associadas com a transformação maligna da célula. O equilíbrio entre as funções apoptóticas e não apoptóticas de caspase-3 ainda é pouco compreendido. Se a caspase-3 precisa clivar outros substratos para promover a motilidade celular do tumor ou se outras caspases além de caspase-3 possuem estas mesmas características ainda precisa ser investigado (LIU *et al.*, 2013).

Após verificar que a expressão de algumas proteínas foi alterada no tecido tumoral no grupo suplementado com óleo de peixe, decidimos investigar se isto também ocorria no soro desses animais. Além disso, buscamos identificar se essas proteínas poderiam ser utilizadas como biomarcadores tumorais. Como um

marcador tumoral pode ser produzido pelo próprio tumor ou pelo organismo, em resposta à presença do tumor, exploramos se o tumor de Walker 256 apresentava essas características. Estudos prévios demonstraram que ratos portadores do tumor de Walker 256, quando suplementados com óleo de peixe apresentaram menores concentrações de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e a IL-6 (SCHIESSEL, 2011), assim como PGE₂ (MUND *et al.*, 2007) circulantes no soro sanguíneo. Além disso, a razão AGPI n-6/n3 estava reduzida nos grupos que receberam suplementação com óleo de peixe. Quando investigamos se a suplementação com óleo de peixe e/ou a presença de tumor de Walker 256 alterava a expressão das proteínas COX-2, p65, PPAR γ , Bcl-2, p53 e HRas e HSP 70 no soro, não encontramos diferença estatística em nenhuma das proteínas analisadas entre os grupos experimentais (Figura 23).

A busca de biomarcadores neste estudo iniciou com a investigação da proteína HSP 70, já que a literatura sugeria que a sua presença elevada no meio extracelular (eHSP 70) estava relacionada a processos inflamatórios intensos, sendo associado a severidade ou o estágio de várias doenças, incluindo doenças cardíacas e sepse (HECK, 2011). Portanto, alterações na razão eHSP70/HSP70 poderia ser utilizada como um possível biomarcador no câncer. Quando avaliamos a expressão da proteína no tecido tumoral não encontramos diferença estatística entre os grupos (Figura 14). Para analisar a eHSP70, investigamos a sua expressão no soro dos animais, simulando o meio extracelular. Porém não detectamos a presença de eHSP70 no soro de nenhum grupo experimental, utilizando a técnica de western blotting (dados não demonstrados). Futuros experimentos *in vitro*, avaliação de outras doenças ou a utilização de outras técnicas para o estudo de proteínas podem ser realizados para estudar este possível biomarcador, já que não encontramos esta informação neste modelo experimental utilizando a técnica de western blotting.

Nenhum modelo experimental pode representar plenamente as respostas a determinado tratamento. Isto é em parte devido às diferenças no ambiente biológico, da diversidade biológica, genômica e epigenômica encontrado em diferentes tumores (CHIN & GRAY, 2008). Muito de nosso entendimento sobre a biologia de células tumorais, incluindo aspectos de regulação gênica e

sinalização celular veio de estudos realizados em estudos *in vitro*. Por isso, nem sempre se podem expandir estas informações para os tumores que crescem em microambientes mais complexos do que o de uma placa de cultivo (CALVIELLO *et al.*, 2013). Apesar de cada modelo apresentar pontos fortes e fracos, a utilização de experimentos com roedores é de grande importância. Apesar das limitações de qualquer modelo, as informações geradas oferecem dados importantes na qual auxiliam a construir um retrato geral e verdadeiro do câncer (CHIN & GRAY, 2008).

Os resultados deste estudo, em combinação com as atividades anti-inflamatórias conhecidas dos AGPI n-3, podem explicar, em parte, os efeitos anti-tumorais do óleo de peixe no tumor de Walker 256 *in vivo*. Estes resultados suportam a existência de um mecanismo anti-proliferativo e pró-apoptótico neste modelo experimental utilizando a suplementação com óleo de peixe.

7 CONCLUSÃO

O efeito anti-proliferativo e pró-apoptótico do óleo de peixe no tumor de Walker 256 está relacionado com:

↓ expressão das proteínas PPAR γ , Hras, MMP2;

↑ expressão das proteínas p53, Bcl-2, caspase-7 e caspase-3;

Mas parece não envolver:

— expressão das proteínas p65, p52, I κ B α , PKC, HSP 70, Bax, PARP-1.

Além disso, demonstramos que a redução da razão AGPI n-6/n-3 no tecido tumoral e/ou soro está associado com os efeitos antitumorais do óleo de peixe, que ainda não são completamente entendidos. Entretanto, no presente trabalho, não foi possível identificar marcadores tumorais no soro, sendo necessária a investigação de outras proteínas em potencial.

A partir desta pesquisa, questionamentos surgiram e algumas hipóteses foram sugeridas. Sendo assim, acreditamos que a continuidade deste trabalho seja essencial para que possamos melhorar nossa compreensão e adicionar informações sobre os mecanismos moleculares dos AGPI n-3 no câncer.

8 REFERÊNCIAS

- ABUSHUFA, R.; REED, P.; WEINKOVE, C.; Fatty acids erythrocytes measured by isocratic HPLC. **Clinical chemistry**, v. 40, n. 9, p. 1707-1712, 1994.
- AGOSTINO, D.; CLIFFTON, E.E. The Growth and Transplantability of the Carcinosarcoma of Walker 256 in the Ascitic Form. **Experientia**, v.24, n.2, p. 166-168, 1968.
- AIKAWA, J. *et al.* Glucose metabolism by lymphocytes, macrophages, and tumor cells from Walker 256 tumor-bearing rats supplemented with fish oil for one generation. **Cell biochemistry and function**, v.26, p.874–880, 2008.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer facts and figures, 2012.
- ANAND, P. *et al.* Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. **Pharmaceutical research**, v.10, p.1007-1095, 2008.
- APPLIED BIOSYSTEMS. **Real-Time PCR Systems-Chemistry Guide**, Applied Biosystems Fast Real-Time PCR System and 7300/7500 Real-Time PCR Systems, 2004.
- ARVELO, F. Establishment and characterization of cell lines from the Walker carcinoma 256 able to grow in suspension culture and deficient in thymidine kinase. **In vitro**, v. 20, n. 7, p.549-565, 1984.
- BASU, A.; HALDAR, S. The relationship between Bcl-2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death. **Molecular human reproduction**, v.4, n.12, p. 1099-1199, 1998.
- BEERE, H.M. The stress of dying': the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. **Journal of cell science**, v. 117, p. 2641-2651, 2004.
- BERQUIN, I.M. *et al.* Multi-targeted Therapy of Cancer by Omega-3 Fatty Acids. **Cancer letters**, v.269, n. 2, p. 363-377, 2008.
- BERSTAD, P. *et al.* Fatty Acids in Habitual Diet, Plasma Phospholipids, and Tumour and Normal Colonic Biopsies in Young Colorectal Cancer Patients. **Journal of oncology**, Article ID 254801, 2012.
- BEYER, R.S.; JENSEN, L.S. Overestimation of the cholesterol content of eggs. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.39, p.917-920, 1989.
- BIONDO, P.D. *et al.* The potential for treatment with dietary long-chain polyunsaturated n-3 fatty acids during chemotherapy. **Journal of nutritional biochemistry**, v.19, p.787-796, 2008.
- BIO-RAD. **Mini PROTEAN Tetra Cell**. USA, 2000. Instruction Manual. Catalog Numbers: 165-8000/8001.

BIO-RAD. **Trans-Blot SD Eletroctrophoretic Transfer Cell**. USA, 2000. Instruction Manual. Catalog Number: 170-3940.

BLANCKAERT, V. *et al.* Docosaheaxaenoic acid intake decreases proliferation, increases apoptosis and decreases the invasive potential of the human breast carcinoma cell line MDA-MB-231. **International journal of oncology**, v.36, p. 737-742, 2010.

BONATTO, S.J.R. Efeito da suplementação com óleo de peixe, durante oito semanas, sobre o sistema imunitário inato de pacientes, pós remoção tumoral e efeito in vitro sobre células tumorais. Tese, UFPR, Curitiba, 2008.

BORGHETTI, G. Efeito da suplementação com óleo de peixe sobre a expressão gênica de COX-2 em ratos portadores de tumor de Walker 256. Dissertação, UFPR, Curitiba, 2010.

BOURBOULIA, D. *et al.*, Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. **Seminars in cancer biology**, v. 20, p. 161-168, 2010.

BOUWENS, M. *et al.* Fish-oil supplementation induces antiinflammatory gene expression profiles in human blood mononuclear cells. **Journal of clinical nutrition**, v. 90, p. 1-10, 2009.

BRADFORD, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BREITKREUTZ, D. Protein kinase C family: On the crossroads of cell signaling in skin and tumor epithelium. **Journal of cancer research and clinical oncology**, 2007. DOI 10.1007/s00432-007-0280-3.

BREW, K.; NAGASE, H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1803, p. 55–71, 2010.

BRUNELLE, J.K.; LETAI, A. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. **Journal of cell science**, v. 122, p.437-441, 2009.

BURNETTE, W.N. Western Blotting: Electrophoretic Transfer of Proteins from Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gels to Unmodified Nitrocellulose and Radiographic Detection with Antibody and Radioiodinated Protein A. **Analytical biochemistry**, v.112, p. 195-203, 1981.

BUSTIN, S.A. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.

CALDER, P.C. *et al.* Essential fats for future health. Proceedings of the 9th unilever nutrition symposium. **European journal of clinical nutrition**, v. 64, S1–S13, 2010.

CALDER, P.C. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: 1Nutrition or pharmacology? **British journal of clinical pharmacology**, p.1-43, 2012a.

CALDER, P.C. Mechanisms of Action of (n-3) Fatty Acids. **The journal of nutrition**, 593S-599S, 2012 b.

CALDER, P.C. Fatty acids and inflammation: The cutting edge between food and pharma. **European journal of pharmacology**, v.668, p.S50–S58, 2011.

CALVIELLO, G. *et al.* Experimental Evidence of ω -3 Polyunsaturated Fatty Acid Modulation of Inflammatory Cytokines and Bioactive Lipid Mediators: Their Potential Role in Inflammatory, Neurodegenerative, and Neoplastic Diseases. **BioMed research international**, Article ID 743171, 2013.

CHAABANE, W. *et al.* Autophagy, Apoptosis, Mitoptosis and Necrosis: Interdependence Between Those Pathways and Effects on Cancer. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, v. 61, p. 43–58, 2013.

CHAITANYA, G.V. *et al.* PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration, **Cell communication and signaling**, v.8, n. 31 p.1-11, 2010.

CHAPKIN, R.S. *et al.* Mechanisms by which docosahexaenoic acid and related fatty acids reduce colon cancer risk and inflammatory disorders of the intestine. **Chemistry and physics of lipids**, v. 153, p. 14-23, 2008.

CHAPKIN, R.S. *et al.* Dietary docosahexaenoic and eicosapentaenoic acid: Emerging mediators of inflammation. **Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids**, v. 81, n. 1, p. 1-96, 2009.

CHARLOTTE WELINDER, C.; EKBLAD, L. Coomassie Staining as Loading Control in Western Blot Analysis. **Journal of proteome research**, v. 10, p. 1416-1419, 2010.

CHEN, E. The Fine Structure of Walker 256 Carcinoma Cells. **Experientia**, v.32, n. 9, p. 1192-1194, 1976.

CHÊNE, G. *et al.* n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids induce the expression of COX-2 via PPAR γ activation in human keratinocyte HaCaT cells. **Molecular and cell biology of lipids**, v.1771, n. 5, p. 576-589, 2007.

CHIN, L.; GRAY, J.W. Translating insights from the cancer genome into clinical practice. **Nature**, v.452, n.3, p. 553- 563, 2008.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical biochemistry**, v.162, p.156-159, 1987.

COELHO, I. *et al.* Fish Oil Supplementation Reduces Cachexia and Tumor Growth While Improving Renal Function in Tumor-Bearing Rats, **Lipids**, v. 47, p. 1031-1041, 2012.

COLLETT, E.D. *et al.* n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids differentially modulate oncogenic Ras activation in colonocytes. *American journal of physiology*. **Cell physiology**, v.280, n. 5, p. 1066- 1075, 2001.

CORSETTO, P.A. *et al.* Effects of n-3 PUFAs on breast cancer cells through their incorporation in plasma membrane. **Lipids in health and disease**, v. 10:73, 2011.

CORSETTO, P.A. *et al.* Chemical-Physical Changes in Cell Membrane Microdomains of Breast Cancer Cells After Omega-3 PUFA Incorporation. **Cell biochemistry and biophysics**, v.64, p. 45-59, 2012.

COUPIENNE, I.; PIETTE, J.; BONTEMS, S. How to Monitor NF- κ B Activation After Photodynamic Therapy Photodynamic Therapy. **Methods in molecular biology**, v. 635, p. 70-95, 2010.

DEKOJ, T. *et al.* G2/M Cell-Cycle Arrest and Apoptosis by n-3 Fatty Acids in a Pancreatic Cancer Model. **Journal of surgical research**, v.139, p. 106–112, 2007.

DHILLON, A.S. *et al.* MAP kinase signalling pathways in cancer. **Oncogene**, v. 26, p. 3279-3290, 2007.

ESCOBAR, E.L.O.; GOMES-MARCONDES, C.C.; CARVALHO, H.F. Dietary Fatty Acid Quality Affects PPAR γ Levels and Prostate Growth. **The prostate**, v. 69, p. 548-558, 2009.

FAN, T.J. *et al.* Caspase Family Proteases and Apoptosis. **Acta biochimica et biophysica sinica**, v.37, n. 11, p.719–727, 2005.

FIANDALO, M.V.; KYPRIANOU, N. Caspase control: protagonists of cancer cell apoptosis. **Experimental oncology**, v.34, n.3, p.165-175, 2012.

FISHER, E. R.; FISHER, B. Electron Microscopic, Histologic, and Histochemical Features of the Walker Carcinoma. **Cancer research**, v.21, p. 527-531, 1961.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for isolation and purification of total lipid from animal tissue. **Journal of biological chemistry**, v. 226, p. 497-509, 1956.

FUCCI A. *et al.* The Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in the Esophageal, Gastric, and Colorectal Cancer. **PPAR Research**, Article ID 242498, 2012.

FUKUI, M. *et al.* EPA, an Omega-3 Fatty Acid, Induces Apoptosis in Human Pancreatic Cancer Cells: Role of ROS Accumulation, Caspase-8 Activation, and Autophagy Induction. **Journal of cellular biochemistry**, v. 114, p. 192–203, 2013.

GALLUZZI, L. *et al.* Cell death signaling and anticancer therapy. **Frontiers in oncology**, v.1, n.5, p.1-18, 2011.

GALLUZZI, L.; KEPPAND, O.; KROEMER, G. Caspase-3 and prostaglandins

signal for tumor regrowth in cancer therapy. **Oncogene**, v.31, p. 2805-2808, 2012.

GORDY, C.; HE, W. The crosstalk between autophagy and apoptosis: where does this lead? **Protein cell**, v.3, n. 1, p. 17–27, 2012.

GRANCI, V; DUPERTUIS, V.Y; PICHARD, C. Angiogenesis as a potential target of pharmaconutrients in cancer therapy. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, v.13, p.417-422, 2010.

GRANCI, V. *et al.* Colon cancer cell chemosensitisation by fish oil emulsion involves apoptotic mitochondria pathway. **British journal of nutrition**, v. 109, p. 1188–1195, 2013.

GU, Z. *et al.* Mechanisms of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Prostate Cancer Prevention. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2013. DOI: dx.doi.org/10.1155/2013/824563

GUAITANI, A. *et al.* Two lines of Walker carcinoma 256: their peculiarities and different interactions with the host. **Tumori**, v.1, p.1-9, 1983.

GUIMARAES, F. *et al.*, Tumor Growth Characteristics of the Walker 256 AR Tumor, a Regressive Variant of the Rat Walker 256 A tumor. **Brazilian archives of biology and technology**, v.53, n. 5, p. 1101-1108, 2010.

HABERMAN, N. *et al.* Fish fatty acids alter markers of apoptosis in colorectal adenoma and adenocarcinoma cell lines but fish consumption has no impact on apoptosis-induction ex vivo. **Apoptosis**, v. 15, p. 621-630, 2010.

HARDWICK, J.M.; SOANE, L. Multiple Functions of BCL-2 Family Proteins. **Cold spring harbor perspective in biology**, 5:a008722, 2013.

HAYDEN, M.S.; GHOSH, S. Signaling to NF- κ B. **Genes development**, v.18, p. 2195-2224, 2004.

HAYSLIP, J.; MONTERO, A. Tumor suppressor gene methylation in follicular lymphoma: a comprehensive review. **Molecular cancer**, v.5, n. 44 p.1-7, 2006.

HECK, T.G. Razão entre o conteúdo extracelular e intracelular do HSP70 como um sinal de alerta imunológico e marcador de intensidade de exercício, UFRGS, Porto Alegre, 2011.

HEO, C.K, YOUNG.; BAHK, Y.Y.; CHO, E.W. Tumor-associated autoantibodies as diagnostic and prognostic biomarkers. **BMB reports**, 2012, <http://dx.doi.org/10.5483/BMBRep.2012.45.12.236>.

HORNLE, M. *et al.* Caspase-3 cleaves XIAP in a positive feedback loop to sensitize melanoma cells to TRAIL-induced apoptosis. **Oncogene**, p.1-13, 2010.

HUANG, Q. *et al.* Caspase 3 mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy. **Nature medicine**, v. 17, n.7, p. 860-867, 2011.

JENSEN ,E. The Basics of Western Blotting. **The anatomical record**, v. 295, p. 369–371, 2012.

KANG, K.S. *et al.* Docosahexaenoic Acid Induces Apoptosis in MCF-7 Cells In Vitro and In Vivo via Reactive Oxygen Species Formation and Caspase 8 Activation. **PLoS ONE**, v.5, n.4, p. 1-13, 2010.

KANG, J.X.; LIU, A. The role of the tissue omega-6/omega-3 fatty acid ratio in regulating tumor angiogenesis. **Cancer metastasis review**, 2012. DOI 10.1007/s10555-012-9401-9.

KASSEM, A.A. Dietary (n-6:n-3) Fatty Acids Alter Plasma and Tissue Fatty Acid Composition in Pregnant Sprague Dawley Rats. **The scientific world journal**, Article ID 851437, 2012.

KEPP, O. *et al.* Cell death assays for drug discovery. **Nature reviews**, v. 10, p. 221-236, 2011.

KHALIL. A.A. *et al.* Heat shock proteins in oncology: Diagnostic biomarkers or therapeutic targets? **Biochimica et biophysica acta**, v. 1816, p. 89–104, 2011.

KRAUS, W.L.; HOTTIGER, M.O. PARP-1 and gene regulation: Progress and puzzles. **Molecular aspects of medicine**, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2013.01.005>

KROEMER, G. *et al.* Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. **Cell death differentiation**, v.16, n.1, p. 3-11, 2009.

LANDS, B. Consequences of Essential Fatty Acids. **Nutrients**, v.4, p.1338-1357, 2012.

LEE, K.W. *et al.* H-Ras selectively up-regulates MMP-9 and COX-2 through activation of ERK1/2 and NF- κ B: An implication for invasive phenotype in rat liver epithelial cells. **International journal of cancer**, v. 119, p. 1767-1775, 2006.

LEWIS, K.M. *et al.* Characterisation of Walker 256 breast carcinoma cells from two tumour cell banks as assessed using two models of secondary brain tumours. **Cancer cell international**, v.13, n. 5 p.1-12, 2013.

LI, H. *et al.* Anti- and Protumorigenic Effects of PPAR γ in Lung Cancer Progression: A Double-Edged Sword. **PPAR research**, p.1-12, 2012.

LIU,Y *et al.* Basal caspase-3 activity promotes migration, invasion, and vasculogenic mimicry formation of melanoma cells. **Melanoma research** DOI: 10.1097/CMR.0b013e3283625498, 2013.

LOEGERING, D.J.; LENNARTZ, M.R. Protein Kinase C and Toll-Like Receptor Signaling. **Enzyme research**, Article ID 537821, 2011.

MASUTANI, M.; FUJIMORI, H. Poly (ADP-ribosyl)ation in carcinogenesis. **Molecular aspects of medicine**, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2013.05.003>.

MEDARDE, A.F.; SANTOS, E. Ras in Cancer and Developmental Diseases. **Genes & cancer**, v. 2, n. 3, p. 344-358, 2011.

MOLENDI-COSTE, O.; LEGRY, V.; LECLERCQ, I.A. Why and How Meet n-3 PUFA Dietary Recommendations? *Gastroenterology Research and Practice*, 2011. **Gastroenterology research and practice**, Article ID 364040, 2011.

MOORE, C. Introduction to Western Blotting. **AbD Serotec manual**, 2009.

MORIN, C.; ROUSSEAU, E.; FORTIN, S. ANTI proliferative effects of a new docosapentaenoic acid monoacylglyceride in colorectal carcinoma cell. **Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids**, v. 89, p. 203-213, 2013.

MORRISON, W. B. Inflammation and cancer: a comparative view. **Journal of veterinary internal medicine**, v.16, n.1, p.18-31, 2012.

MUND, R.C. *et al.* Decreased tumor growth in Walker 256 tumor-bearing rats chronically supplemented with fish oil involves COX-2 and PGE2 reduction associated with apoptosis and increased peroxidation. **Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids**, v. 76, n.2, p.113-120, 2007.

NARAYANAN, K. *et al.* Docosahexaenoic acid in combination with celecoxib modulates HSP70 and p53 proteins in prostate cancer cells. **Internacional journal of cancer**, v.119, p.1586-1598, 2006.

NISHIYAMA-NARUKE, A. *et al.* HPLC determination of underivatized fatty acids saponified at 37°C analysis of fatty acids in oils and tissues. **Analytical letters**, v.31, n.14, p.2565-2576, 1998.

OLIVEIRA, H.H. Cultivo de células ascíticas do tumor de Walker 256 na presença de óleo de peixe-BSA complexado. Dissertação, UFPR, Curitiba, 2010.

OLSSON, M.; ZHIVOTOVSKY, B. Caspases and cancer. **Cell death and differentiation**, v.18, p.1441–1449, 2011.

OREN, M. Decision making by p53: life, death and cancer. **Cell death and differentiation**, v.10, p.431-442, 2003.

OSSOVSKAYA, V. *et al.* Upregulation of Poly (ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP1) in Triple-Negative Breast Cancer and Other Primary Human Tumor Types. **Genes & cancer**, v. 1, n. 8, p. 812-821, 2010.

PATTERSON, E. *et al.* Health Implications of High Dietary Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids. **Journal of nutrition and metabolism**, Article ID 539426, 2012.

PAULSEN, M. *et al.* Interaction with XIAP prevents full caspase-3/-7 activation in proliferating human T lymphocytes. **European journal of immunology**, v. 38, p. 1979–1987, 2008.

PELLICCIA, F. *et al.* Current evidence and future perspectives on n-3 PUFAs, **International Journal of Cardiology**, 2013. doi: 10.1016/j.ijcard.2013.06.044

PEREIRA, A.C. *et al.* O papel das MMP-2 e -9 no desenvolvimento do carcinoma epidermóide. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52, n. 3, p. 257-262, 2006.

PRIORA, I.A.; HANCOCK, J.F. Ras trafficking, localization and compartmentalized signaling. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 23, p. 145-153, 2012.

PYLAYEVA-GUPTA, Y.P.; GRABOCKA, E.; SAGI, D. B. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. **Nature reviews**, v.11, p. 761-774, 2011.

QIAGEN. Fast, quantitative, real-time PCR and two-step RT-PCR using SYBR Green I. **QuantiFast™ SYBR® Green PCR handbook**, 2007.

RAHMAN-ROBLICK, R.R. p53 targets identified by protein expression profiling. **Proceedings of the national academy of sciences**, v.104 n.13, p. 5401-5406, 2007.

REBUCCI, M.; MICHIELS, C. Molecular aspects of cancer cell resistance to chemotherapy. **Biochemical pharmacology**, v. 85, p.1219-1226, 2013.

REITER, L.; KOLSTO, A.; PIEHLER, A.P. Reference genes for quantitative, reverse-transcription PCR in *Bacillus cereus* group strains throughout the bacterial life cycle. **Journal of microbiological methods**, v. 86, p. 210-217, 2011.

RIEDIGER, N.D.; OTHMAN, R.A.; SUH, M. A Systemic Review of the Roles of n-3 Fatty Acids in Health and Disease. **Journal of the american dietetic association**, v.109, p. 668-679, 2009.

ROOMI, M.W. *et al.* In vitro modulation of MMP-2 and MMP-9 in human cervical and ovarian cancer cell lines by cytokines, inducers and inhibitors. **Oncology reports**, v. 23, p. 605-614, 2010.

ROYNETTE, C.E. *et al.* n-3 polyunsaturated fatty acids and colon cancer prevention. **Clinical nutrition**, v. 23, p.139- 151, 2004.

SALA-VILA, A.; MILES, E.A.; CALDER, P.C. Fatty acid composition abnormalities in atopic disease: evidence explored and role in the disease process examined. **Clinical and experimental allergy**, v. 38, p. 1432–1450, 2008.

SANKARI, S.L. *et al.* Apoptosis in Cancer - An Update. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v.13, n.10, p. 4873-4878, 2013.

SCHIESSEL, D.L. Ácido graxo alfa-linolênico causa o mesmo efeito que seus derivados de cadeia longa em ratos portadores de tumor de Walker 256? Investigação antitumoral e imunitária, UFPR, Curitiba, 2011.

SCHMITTGEN, T.D.; LIVAK, K.J. Analyzing real-time PCR data by comparative Ct method. **Nature protocols**, v.3, n. 6, p. 1101-1108, 2008.

SCHUMANN, J.; FUHRMANN, H. Impairment of NF-kappa B activity by unsaturated fatty acids. **International immunopharmacology**, v.10, n.8, p. 978-84, 2010.

SENKAL, M. *et al.* Preoperative oral supplementation with long-chain Omega-3 fatty acids beneficially alters phospholipid fatty acid patterns in liver, gut mucosa, and tumor tissue. **Journal of parenteral and enteral nutrition**, v.29, n.4, p. 236-240, 2005.

SERHAN, C.N. *et al.* Maresins: novel macrophage mediators with potent anti-inflammatory and pro-resolving actions. **Journal of experimental medicine**, v.206, n. 1, p. 15-23, 2009.

SHENG, H. *et al.* Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. **Cancer research**, v.58, n. 2, p. 362-366, 1998.

SIMOPOULOS, A.P. Genetic variants in the metabolism of omega-6 and omega-3 fatty acids: their role in the determination of nutritional requirements and chronic disease risk. **Experimental biology and medicine**, v. 235, p. 585-795, 2010.

SIMPKINS, H. A Morphological and Phenotypic Analysis of Walker 256 Cells. **Cancer research**, v. 5, p. 1334-1338, 1991.

SOLDANI, C. *et al.* Two-color fluorescence detection of Poly (ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP-1) cleavage and DNA strand breaks in etoposide-induced apoptotic cells. **European journal of histochemistry**, v. 45, p. 389-392, 2001.

STABLES, M.J.; GILROY, D.W. Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution, **Progress in lipid research**, v. 50, p. 35–51, 2011.

TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the national academy sciences USA**, v.76, p. 4350-4354, 1979.

TROMBETTA, A. *et al.* Arachidonic and docosahexaenoic acids reduce the growth of A549 human lung-tumor cells increasing lipid peroxidation and PPARs. **Chemico biological interactions**, v. 165, p. 239-250, 2007.

TURK, H.F.; CHAPKIN, R.S. Membrane lipid raft organization is uniquely modified by n-3 polyunsaturated fatty acids. **Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids**, v. 88, p. 43-47, 2013.

TURK, H.F.; BARHOUMI, R.; CHAPKIN, R.S. Alteration of EGFR Spatiotemporal Dynamics Suppresses Signal Transduction. **PLoS ONE**, v.7, n.6, p. 1-18, 2012.

TZIFI, F. *et al.* The Role of BCL-2 Family of Apoptosis Regulator Proteins in Acute and Chronic Leukemias. **Advances in hematology**, Article ID 524308, 2012.

- ULUKAYA, E.; ACILAN, C.; YILMAZ, Y. Apoptosis: why and how does it occur in biology? **Cell biochemistry and function**, v. 29, p. 468-480, 2011.
- VALDÉS-RAMOS, R.; BENÍTEZ-ARCINIEGA, A. D. Nutrition and immunity in cancer. **British journal of nutrition**, v.98, n.1, p.127-132, 2007.
- VARGA, T.; CZIMMERER, Z.; NAGY, L. PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation. **Biochimica et biophysica acta**, v. 8, p.1007-1022, 2011.
- VIRÁG, L. *et al.* Poly (ADP-ribose) signaling in cell death. **Molecular aspects of medicine**, 2013 <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2013.01.007>.
- VOUSDEN, K.H.; PRIVES, C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. **Cell**, v.137, p. 413-431, 2009.
- WACHTER, F. *et al.* Impact of the p53 status of tumor cells on extrinsic and intrinsic apoptosis signaling. **Cell communication and signaling**, v.11, n. 27, p. 1-10, 2013.
- WALSH, J.G. Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 105, n.35, p. 12815–12819, 2008.
- WANG, X. *et al.* Inhibitory effect of oleanolic acid on hepatocellular carcinoma via ERK-p53-mediated cell cycle arrest and mitochondrial-dependent apoptosis. **Carcinogenesis**, p.7-37, 2013.
- WEAVER, K.L. *et al.* Effect of Dietary Fatty Acids on Inflammatory Gene Expression in Healthy Humans. **The journal of biological chemistry**, v.284, n. 23, p. 400-407, 2009.
- WEN, X. *et al.* Caspase-mediated programmed cell death pathways as potential therapeutic targets in cancer. **Cell proliferation**, v.45, p. 217–224, 2005.
- WILHELM, S.; WAGNER, H.; HÄCKER, G. Activation of caspase-3-like enzymes in nonapoptotic T cells. **European Journal of Immunology**, v.28, p. 891-900, 1998.
- WILLIAMS, C.D. *et al.* A high ratio of dietary n-6/n-3 polyunsaturated fatty acids is associated with increased risk of prostate cancer. **Nutrition research**, v.31, p. 1-8, 2011.
- WU, KK. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Protect against Apoptosis via 14-3-3. **PPAR research**, Article ID 417646, 2010.
- YAO, L. *et al.* Upregulation of PPAR γ in Tissue with Gastric Carcinoma. **Hybridoma**, v.29, n.4, 2010.
- YOUSSEF, J.; BADR, M. Peroxisome proliferator-activated receptors and cancer: challenges and opportunities. **British journal of pharmacology**, v.164, p. 68–82, 2011.

ZAND, H. *et al.* Involvement of PPAR- α and p53 in DHA-induced apoptosis in Reh cells. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 304, p.71–77, 2007.

ZECCHIN, K.G. *et al.* High Bcl-2/Bax ratio in Walker tumor cells protects mitochondria but does not prevent H₂O₂-induced apoptosis via calcineurin pathways. **Journal bioenergetics and biomembranes**, v.39, p. 186-194, 2007.

ZHANG, A. *et al.* Serum Proteomics in Biomedical Research: A Systematic Review. **Applied biochemistry and biotechnology**, v.170, p. 774-786, 2013.

ZHANG, T.; SAGHATELIAN, A. Emerging roles of lipids in BCL-2 family-regulated Apoptosis. **Biochimica et biophysica acta**, v.183, n. 10, p. 1542-54, 2013.

ZHOU, J. *et al.* Tumor hypoxia and cancer progression. **Cancer letters**, v. 237, p.10–21, 2006.

ZITVOGEL, L. *et al.* The anticancer immune response: indispensable for therapeutic success? **Journal of clinical investigation**, v.118, n.6, p.1991-2001, 2008.

ZUIDERWEG, E.R.P. *et al.* Allostery in the Hsp70 Chaperone Proteins in skin and tumor epithelium. **Journal of cancer research and clinical oncology**, 2007. DOI 10.1007/s00432-007-0280-3.

ANEXOS

Anexo 1



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
 Setor de Ciências Biológicas
 Comitê de Ética em Experimentação Animal
 (CEEA)



Nº 505

CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEEA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEEA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".


PROCESSO: 23075.047889/2010-09

APROVADO: 14/12/2010 – R.O. 11/2010

TÍTULO: Efeito da suplementação com óleo de peixe sobre a expressão gênica em ratos portadores de tumor de Walker 256

AUTORES: Luiz Cláudio Fernandes, Gina Borghetti, Adriana Yamaguchi, Danielle Pequeto, Isabela Coelho

DEPARTAMENTO: Fisiologia


 Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio
 Coordenador do CEEA

Anexo 2

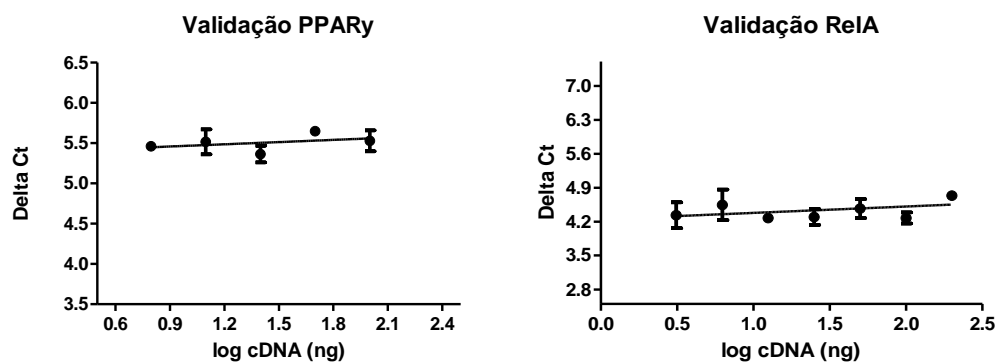


Figura 1 Validação do método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Valores de ΔCT foram determinados para o genes alvos (PPAR γ e RelA) e do gene referencia (HPRT). As diferenças nos valores de ΔCT foram plotados em relação ao log da quantidade de cDNA (PPAR γ 50ng a 0.08ng) (RelA 20ng a 0.3ng) de tecido tumoral do grupo controle (calibrador) (W) n=4 em triplicata. Os dados foram submetidos a análise de regressão linear, na qual diferenças na eficiência de PCR foram determinadas pelo cálculo de *slope* da curva. O valor de *slope* encontrado foi de 0.05 para o PPAR γ e de 0.06 para RelA, indicando que os genes possuem eficiências semelhantes ($slope < 0.1$). Validação para PCR em tempo real (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Anexo 3

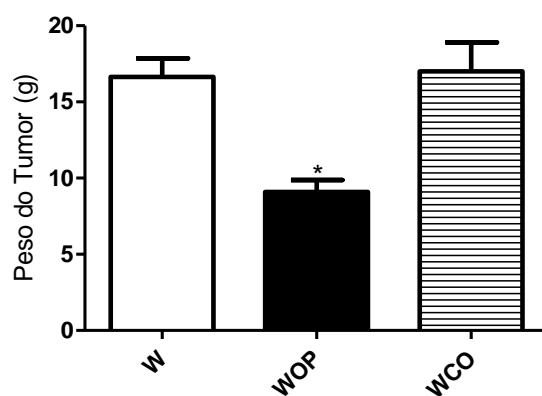


Figura 2 Peso do tumor (g) obtido dos grupos portadores de tumor de Walker 256 (W) n= 10, portadores de tumor de Walker 256 suplementados com óleo de peixe (WOP) n= 14 e gordura de coco (WCO) n= 12. (W 16.7 ± 1.21 vs. WOP 9.02 ± 0.80 vs. WCO 17.4 ± 1.90) Os valores estão apresentados como média ± EPM. One-way ANOVA seguido de Tukey teste * p< 0.05 vs. W e WCO.