

THIAGO RIGO VICENZI

COX-2 E PGE2 ESTÃO ENVOLVIDAS NA REDUÇÃO DO CRESCIMENTO
TUMORAL EM RATOS PORTADORES DE TUMOR DE WALKER 256
SUPLEMENTADOS CRONICAMENTE COM ÓLEO DE PEIXE

Monografia apresentada para obtenção
do título de Bacharel em Ciências
Biológicas, Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cláudio
Fernandes

CURITIBA

2004

Aos meus pais Ademar e Theresinha pelo amor,
atenção e presença constante em todos os
momentos, não importando a dificuldade a ser
vencida ou a alegria a ser comemorada
A minha irmã Janaína que sempre me incentivou
a seguir no caminho dos meus sonhos

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes, pela dedicação, conhecimento, incentivo, e é claro orientação.

Aos meus pais, pelo carinho, compreensão e apoio durante todos esses anos.

À minha irmã Janaína pela paciência e apoio nos momentos mais difíceis.

Aos meus amigos de longa data Eduardo M., Luiz Henrique, Márcia, Marlon, Nicholas, Rafael D., Rodolfo, Rodrigo L. e aqueles que encontrei na faculdade Carla, Carlos, Christian, Daniela, Eduardo, Gustavo, Hugo, Luciana, Thais pela amizade e por estarem sempre presentes em todos os momentos.

Aos colegas de laboratório Júlia, Nathalia, Ricardo K., Ricardo T., Loli, Sandro, Dalva, Lú, Gleisson, Rogéria, Everson e Vanessa pelo companheirismo e por proporcionarem um ambiente de trabalho bastante agradável.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| LISTA DE ABREVIATURAS | v |
| RESUMO | vi |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 ÁCIDOS GRAXOS..... | 1 |
| 1.2 ÁCIDOS GRAXOS NA DIETA..... | 4 |
| 1.3 CÂNCER..... | 5 |
| 1.4 ÁCIDOS GRAXOS E CÂNCER..... | 6 |
| 1.5 TUMOR DE WALKER 256..... | 7 |
| 2. OBJETIVOS | 8 |
| 3. METODOLOGIA | 9 |
| 3.1 ANIMAIS..... | 9 |
| 3.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL..... | 9 |
| 3.3 OBTENÇÃO E TRANSPLANTE DE CÉLULAS TUMORAIS..... | 10 |
| 3.4 DETERMINAÇÃO DO PESO DO TECIDO TUMORAL..... | 10 |
| 3.5 QUANTIFICAÇÃO DE PROSTAGLANDINAS E ₂ | 10 |
| 3.6 QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA COX-2..... | 10 |
| 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 11 |
| 4. RESULTADOS | 12 |
| 4.1 PESO TUMORAL..... | 12 |
| 4.2 CONCENTRAÇÃO DE PROSTAGLANDINAS E ₂ NO PLASMA DE RATOS PORTADORES DE TW256..... | 13 |
| 4.3 EXPRESSÃO DA COX-2 EM CÉLULAS DO TUMOR DE WALKER 256... | 14 |
| 5. DISCUSSÃO | 15 |
| 6. CONCLUSÕES | 18 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 19 |
| ANEXOS | 23 |

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – Ácido araquidônico

ALA – Ácido α -linolênico

AGPI – Ácido graxo poliinsaturado

BSA – Albumina sérica bovina

COX – Enzima ciclooxigenase

DHA – Ácido docosahexaenóico

DNA – Ácido desoxirribonucléico

EPA – Ácido eicosapentaenóico

EPM – Erro padrão médio

LA – Ácido linoléico

LOX – Enzima lipooxigenase

LTs – Leucotrienos

n-3 – Omega-3

n-6 – Omega-6

n-9 – Omega-9

PBS – Tampão fosfato salina

PGs – Prostaglandinas

PGE₂ – Prostaglandinas da série 2

PLA₂ – Enzima fosfolipase A₂

PLC – Enzima fosfolipase C

TXs – Tromboxanas

TW256 – Tumor de Walker 256

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

W – Grupo de ratos portadores de tumor que não recebeu suplementação

WP – Grupo de ratos portadores de tumor suplementados com óleo de peixe

WS – Grupo de ratos portadores de tumor suplementados com gordura de côco

RESUMO

É sabido que a incidência de câncer é menor em países costeiros onde existe um consumo maior de animais marinhos, ricos em ácidos graxos poliinsaturados da família n-3, entre eles o ácido eicosapentaenóico (C20:5n-3, EPA) e o ácido docosahexaenóico (C22:6n-3, DHA). Os mecanismos pelos quais os ácidos graxos n-3 agem para diminuir o crescimento tumoral não são bem esclarecidos. Dessa forma o trabalho tem como objetivo verificar a ação do ácido graxo n-3 em alguns dos mecanismos participantes nessa redução do crescimento tumoral, entre eles: a produção de prostaglandinas E2 no tecido tumoral e a expressão de COX-2 nas células tumorais. Para isso foram feitos experimentos com três grupos distintos de ratos Wistar, sendo que um dos grupos foi suplementado com óleo de peixe, outro suplementado com gordura de côco, e o último não recebeu suplementação, sendo esse o controle. Após 50 dias de suplementação (ratos com 70 dias) foi inoculado o tumor de Walker 256, que cresceu por 15 dias, quando os animais foram mortos para a coleta do material. Os tumores foram pesados, foi feita a quantificação da proteína COX-2 e das prostaglandinas E da série 2. Como resultado pode-se observar que o grupo suplementado com óleo de peixe apresentou tumor de menor tamanho, com índices de COX-2 e prostaglandinas E2 diminuídas, com relação aos outros dois grupos. Assim, esse trabalho mostra que a suplementação com óleo de peixe tem a capacidade de diminuir o crescimento tumoral em ratos. E entre os mecanismos que permitem essa redução estariam a diminuição da expressão da enzima ciclooxigenase-2 e a diminuição da concentração plasmática de prostaglandinas E da série 2.

1. INTRODUÇÃO

1.1 ÁCIDOS GRAXOS

Os ácidos graxos são importante fonte de energia para e durante o metabolismo e também, ponto de partida para síntese de fosfolípídeos no organismo. Os diferentes ácidos graxos encontrados nas células diferem em comprimento de suas cadeias de hidrocarboneto e no número de duplas ligações carbono-carbono (ALBERTS, 1997), proporcionando diferentes propriedades fisiológicas, químicas e nutricionais.

Os ácidos graxos podem ser saturados (nenhuma dupla ligação entre os carbonos), monoinsaturados (uma dupla ligação) ou poliinsaturados (duas ou mais duplas ligações). Entre os ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) podem se destacar três importantes famílias: n-9, n-6 e n-3. Essas famílias são classificadas de acordo com a posição da primeira dupla ligação a partir da extremidade metila da cadeia carbônica (DOMMELS et al, 2002). Assim, o ácido graxo n-3 apresenta sua primeira dupla ligação entre os carbonos três e quatro; o n-6 entre os carbonos seis e sete da cadeia hidrocarbônica; e o n-9 entre os carbonos nove e dez. A família n-3, derivada do ácido α -linolênico (ALA; 18:3n-3), tem como principais representantes os ácidos graxos eicosapentaenóico (EPA; 20:5n-3) e docosahexaenóico (DHA; 22:6n-3); e a família n-6, derivada do ácido linoléico (LA; 18:2n-6), tem como produto principal o ácido araquidônico. Os ácidos graxos das famílias n-3 e n-6 não são sintetizados por mamíferos pois estes não possuem as enzimas desaturases $\Delta 12$ e $\Delta 15$, necessárias para síntese dos ácidos graxos n-3 e n-6 (ROYNETTE, 2004), portanto devem ser providos pela dieta, sendo então chamados de essenciais (ROSE, 1999). Os AGPI n-3 podem ser encontrados em óleos de peixe, linhaça, nozes e canola, além de vegetais de folhas verdes escuras. E os ácidos graxos n-6 são encontrados em várias sementes e óleos de açafrão, soja, girassol e milho.

O AA (n-6) e o EPA (n-3) são mobilizados das membranas celulares pela ação de enzimas fosfolipase, especialmente fosfolipase A₂ (PLA₂) e C (PLC), e

logo em seguida metabolizados pelas enzimas ciclooxygenase (COX) e lipooxygenase (LOX) em prostaglandinas (PGs), tromboxanas (TXs) e leucotrienos (LTs) (ROYNETTE, 2004), respectivamente, sendo assim precursores de eicosanóides (figura 1). Do metabolismo do EPA são gerados as prostaglandinas e tromboxanas da série 3 e leucotrienos da série 5 (CALDER, 1997). O AA gera prostaglandinas da série 2 e leucotrienos da série 4.

Existe uma competição entre os ácidos graxos n-6 e n-3 pelas enzimas desaturase e elongase, que são comuns às duas vias metabólicas. Porém existe uma preferência destas enzimas pelos ácidos graxos n-3. Dessa forma o EPA inibe competitivamente a conversão do ácido araquidônico (AA) em seus eicosanóides. Os eicosanóides produzidos pelo AA (prostaglandina E₂, tromboxana A₂ e leucotrieno B₄) podem atuar na formação de trombose, desenvolvimento de desordens inflamatórias e alérgicas, e proliferação celular (SIMOPOULOS, 1999). O consumo de n-3 aumenta a produção de metabólitos pelo EPA e reduz os níveis de AA na membrana celular e conseqüentemente diminui a produção de eicosanóides derivados do AA (CALDER, 1997), reduzindo assim, os efeitos causados por esses eicosanóides.

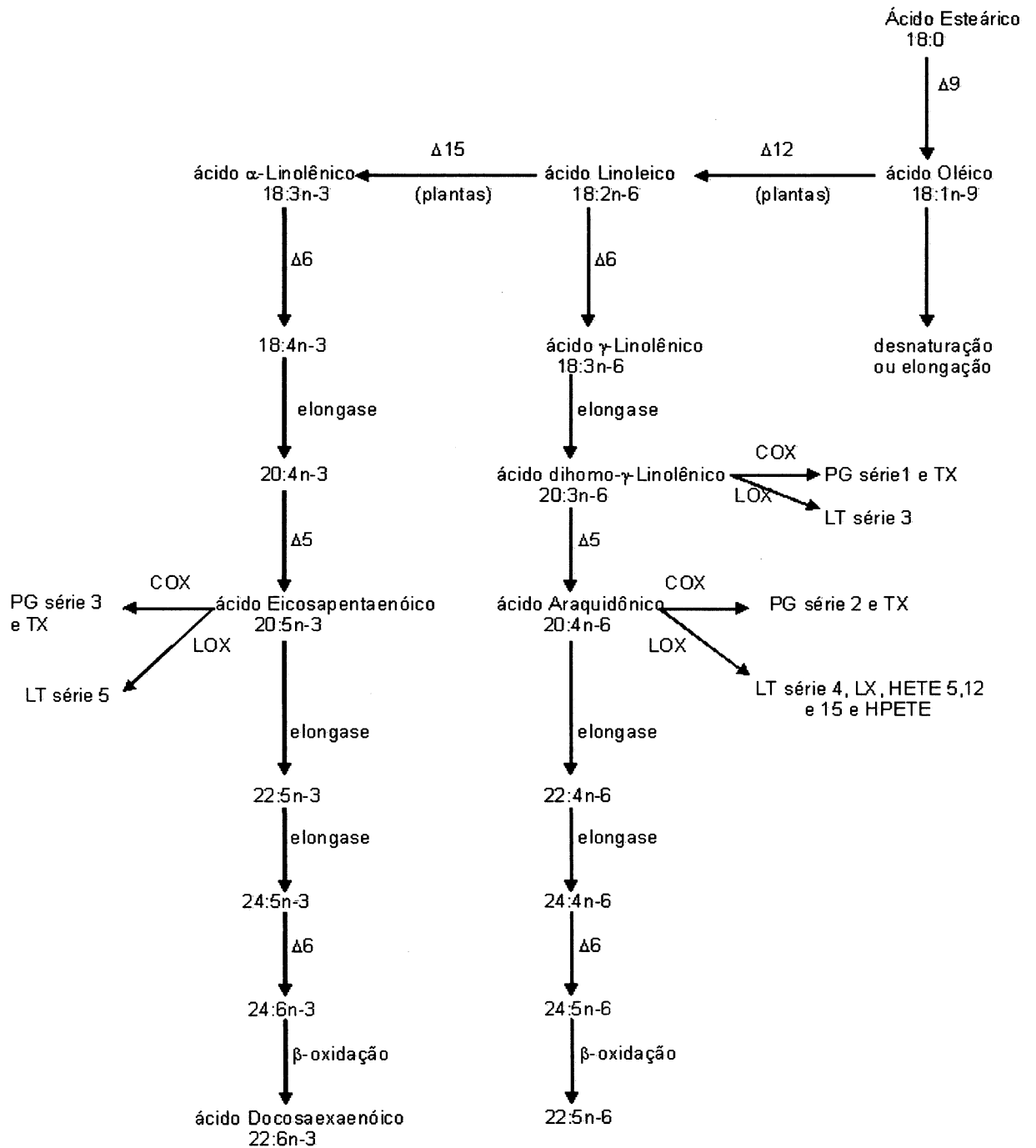


Figura 1: Metabolismo de ácidos graxos n-3 e n-6. Adaptado de CALDER (1998).

1.2 ÁCIDOS GRAXOS NA DIETA

Muitos estudos sobre o metabolismo dos ácidos graxos têm sido feitos nos últimos 20 anos. Os ácidos graxos n-3 desempenham importante papel para o crescimento e desenvolvimento dos organismos bem como, na prevenção e tratamento de doenças das coronárias, hipertensão, diabetes, doenças auto-imunes, inflamações e câncer (SIMOPOULOS, 1999).

A incidência de câncer de cólon e reto é particularmente alta em países com alta ingestão de carne vermelha e processada, tais como Canadá e Austrália, enquanto países do mediterrâneo têm menores índices destes tipos de câncer. A razão para tal achado tem sido atribuída à dieta, sendo que nesses últimos há alto consumo de frutas vegetais, peixe e óleo de oliva (NKONDJOCK et al., 2003).

Nossos ancestrais (Paleolítico) tinham dieta baseada em baixa concentração de gordura saturada, baixos níveis de gordura *trans* e maior consumo de ácidos graxos n-3 (Figura 2). A dieta ocidental atual possui concentrações baixas de ácidos graxos n-3, principalmente pelo baixo consumo de peixes (SIMOPOULOS, 1999).

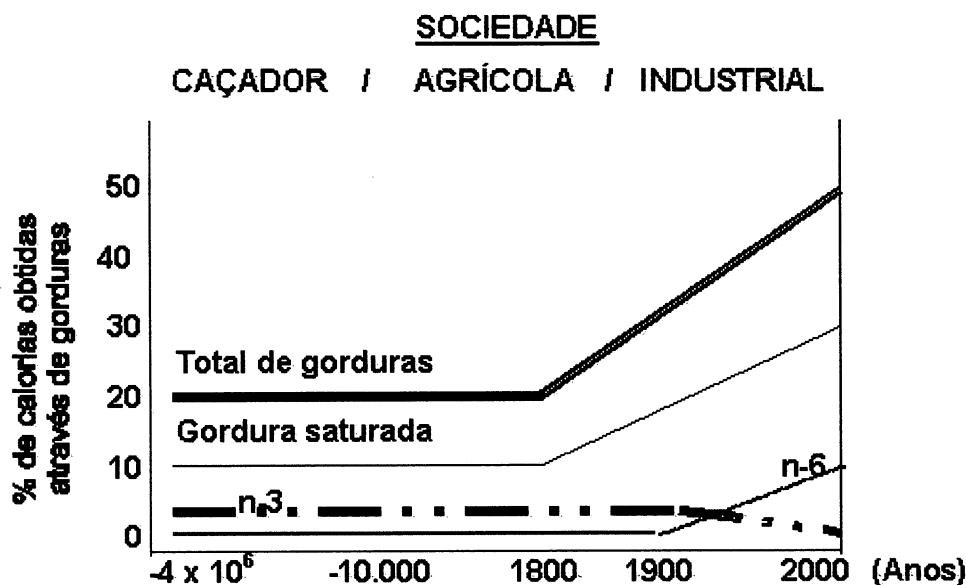


Figura 2: Perfil do consumo de gordura e ácidos graxos da espécie humana ao longo dos anos. Adaptado de SIMOPOULOS, 2002.

Devido a estas observações, nos últimos anos, vários estudos têm sido feitos em animais e humanos para avaliar o efeito dos AGPI, em especial dos n-3, no crescimento tumoral (MUKUTMONI-NORRIS et al., 2000).

1.3 CÂNCER

O câncer é responsável pela morte de aproximadamente 4 milhões de pessoas por ano, em todo o mundo. No Brasil, o câncer é a terceira principal causa de morte (12,32% do total de óbitos), sendo superado somente pelas doenças cardiovasculares e causas externas (acidentes de trânsito, violência urbana) (BRASIL, Ministério da Saúde, 2003).

O desenvolvimento do câncer envolve dois estágios: primeiro, o início do processo causado por mutações no DNA de algumas células; segundo, a subsequente proliferação das células alteradas, para formar o tumor (BRITISH NUTRITION FOUNDATION, 1999).

O câncer é uma doença na qual células alteradas, denominadas neoplásicas, não respondem mais aos mecanismos de controle do crescimento celular e proliferam-se excessivamente, de maneira descontrolada, formando uma massa tecidual conhecida como neoplasia. A neoplasia significa “crescimento novo” (STEVENS; LOWE, 1998). Os termos neoplasia e tumor são usados como sinônimos, sendo este originário do latim, significando tumefação, isso devido ao inchaço causado pela inflamação.

Tumores podem ser divididos em dois tipos: benignos, quando o crescimento celular permanece contido em uma massa única, ou malignos, quando conseguem invadir e se desenvolver em outros tecidos, formando metástases, sendo assim definidos como câncer. Tumores malignos podem ainda ser classificados de acordo com o tipo de tecido e célula de origem; sendo os sarcomas originários de tecidos conjuntivos ou musculares, carcinomas derivados de células epiteliais, e leucemias de células hematopoiéticas (ALBERTS et al., 1997).

1.4 ÁCIDOS GRAXOS E CÂNCER

Fatores ambientais contribuem para o desenvolvimento de muitas formas de câncer. Tem sido estimado que 30% de todos os casos de câncer, são afetados pela dieta, onde dietas de gordura, quase sempre, ocupando o topo dessa relação. Em geral, dietas de gordura podem promover diversas formas de câncer indiretamente, através de seu valor calórico e nutricional. Os AGPI têm efeito adicional sobre a carcinogênese (MCENTEE & WHELAN, 2002).

O mecanismo pelo qual os AGPI n-3 atuam em pacientes e animais portadores de tumor não é conhecido. Tem sido sugerido que o óleo de peixe pode reduzir a proliferação celular e reduzir o número de alterações celulares no câncer. Em humanos, o consumo de óleo de peixe tem mostrado ser capaz de reduzir os níveis de prostaglandinas pró-inflamatórias, produzidas a partir do ácido araquidônico, bem como a proliferação de células do reto, embora estas relações ainda não estejam totalmente esclarecidas (BRITISH NUTRITION FOUNDATION, 1999).

Estudo feito por Wigmore et al. (1996), no qual pacientes com câncer pancreático receberam suplementação com óleo de peixe, mostrou que ocorreu redução da caquexia, redução do catabolismo induzido das citocinas (Ex.: IL-6) nos tecidos do hospedeiro. O papel exercido pelas citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF- α) na patogênese da caquexia no câncer, e a capacidade dos AGPI n-3 em reduzir a produção dessas citocinas, seria um possível mecanismo para ajudar a explicar tal achado.

A peroxidação lipídica também parece ser um dos possíveis mecanismos pelos quais os ácidos graxos n-3 exerceriam sua ação antitumorigênica (ROSE; CONNOLLY, 1999; TAPIERO, 2002). A peroxidação lipídica das membranas celulares, processo mediado por radicais livres, é considerada importante na manutenção da sobrevivência das células. Os radicais livres atacam os lipídeos de membrana, principalmente nas duplas ligações de seus carbonos, desintegrando a membrana celular. Uma vez que ocorre a incorporação dos ácidos graxos n-3 de cadeia longa, que apresentam maior número de duplas ligações, na membrana do

tumor, isto facilitaria a peroxidação dos lipídeos de membrana, e conseqüentemente, a redução do crescimento tumoral.

1.5 TUMOR DE WALKER 256

O tumor de Walker 256 é um carcinossarcoma que se desenvolveu espontaneamente na região da glândula mamária de uma rata grávida em 1928, no laboratório de George Walker no “John Hopkins University School of Medicine”. Nas duas primeiras gerações, o tumor de Walker cresceu satisfatoriamente em apenas alguns animais injetados. Entre 1953 e 1954 esse tumor foi transplantado em ratos por inoculação subcutânea, sendo palpável em uma semana e levando a morte dos animais em seis semanas, quando o tumor media aproximadamente cinco centímetros de diâmetro. O tumor de Walker 256 apresenta dois subtipos: tipo A, metastizante, que leva a caquexia terminal dos ratos portadores em aproximadamente 27 dias, e o tipo B, que não forma metástases e induz a caquexia precoce do portador, levando a morte em 15 dias. Essa linhagem de células tem sido utilizada em vários estudos porque é espécie-específica para ratos e facilmente transplantada (FERNANDES et al, 1994).

Por ser capaz de induzir a caquexia em um rápido intervalo de tempo, o tumor de Walker 256 tem sido extensivamente usado em estudos com câncer (TOGNI et al, 2003).

2. OBJETIVOS

Os AGPI n-3 tem mecanismo de ação desconhecido na redução do crescimento tumoral e da caquexia. Várias hipóteses têm sido levantadas, mas os mecanismos não estão totalmente esclarecidos. Dessa forma, esse trabalho tem como objetivo verificar a ação do óleo de peixe, rico em AGPI n-3, em alguns dos mecanismos aventados como participantes nessa redução do crescimento tumoral, no caso: a concentração plasmática de PGE₂ no tecido tumoral e a expressão da COX-2 nas células tumorais.

3. METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS

Para a realização dos experimentos foram utilizados 64 ratos machos da linhagem Wistar. Os ratos foram cedidos pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram submetidos a ciclo claro/escuro (12h/12h) com água e alimentação à vontade, em ambiente com temperatura controlada de $23 \pm 1^\circ\text{C}$. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Metabolismo Celular no Departamento de Fisiologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

3.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Após o desmame os animais (com 21 dias) foram divididos em 3 grupos de acordo com a dieta recebida:

- 1) Controle (W) – grupo que não recebeu a suplementação (18 ratos);
- 2) n-3 (WP) – grupo suplementado com óleo de peixe (26 ratos);
- 3) Saturado (WS) – grupo suplementado com gordura de côco (20 ratos).

A quantidade de ácido graxo fornecido ao animal foi de 1g/Kg de peso corporal, oralmente sendo utilizadas pipetas volumétricas. O óleo de peixe é líquido podendo ser fornecido sem grandes problemas, porém a gordura de côco é sólida sendo necessário seu aquecimento no aparelho de microondas por 4 minutos para que seja derretido.

Estes grupos receberam suas rações até completarem 70 dias (50 dias de suplementação), então foi inoculado, subcutaneamente, no flanco direito, suspensão de células do tumor de Walker 256, contendo 2×10^7 células/mL. No 14º dia após a inoculação do tumor, todos os animais foram ortotansados com o uso de guilhotina e o sangue coletado utilizando-se funil, e o tecido tumoral removido. Vale ressaltar que a coleta do tecido tumoral é extremamente fácil, uma vez que se apresenta de forma bastante diferenciada, quase sem infiltrações.

3.3 OBTENÇÃO E TRANSPLANTE DE CÉLULAS TUMORAIS

Em um animal portador do tumor ascítico de Walker 256 foi injetado 10 mL de solução salina 0,9% e em seguida, este foi sacrificado por deslocamento cervical. A cavidade abdominal foi aberta e todo o seu conteúdo ascítico coletado. Uma alíquota desta suspensão foi diluída 1:100 e após a contagem de células em câmara de Neubauer, com corante "Trypan Blue", 1 mL desta suspensão (contendo 2×10^7 células) foi injetado subcutaneamente em cada um dos animais (FERNANDES et al., 1991).

3.4 DETERMINAÇÃO DO PESO DO TECIDO TUMORAL

Após serem sacrificados, a massa tumoral dos ratos foi retirada e pesada em balança digital (Denver Instrument XL-410) previamente aferida.

3.5 QUANTIFICAÇÃO DE PROSTAGLANDINAS E₂

A determinação da concentração plasmática da prostaglandina E₂ foi realizada por Kit para ELISA, seguindo-se as instruções do fabricante, Cayman Chemical – USA.

3.6 QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA COX-2

Inicialmente foi feita a quantificação protéica das amostras. A quantificação de proteína das amostras tumorais foram mensuradas pelo método de Bradford (1976), sendo que esse método consiste na diluição das amostras em reagente de Bradford (100 mg de coomassie blue G, 50 mL de etanol 95%, 100 mL de ácido fosfórico 85%, e água até 1000 mL). Foram diluídos 10 µl da amostra na proporção 1:10 em PBS, sendo analisadas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 595 nm. Após a leitura, a quantidade foi calculada substituindo os

valores obtidos em curva padrão de proteína conhecida (o correto é utilizar uma proteína padrão mais próxima da amostra em questão).

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida SDS na porcentagem de 7,5 por cerca de 2 horas (300V, 25 mA). Após a corrida a membrana foi submetida à transferência para membrana de nitrocelulose e a identificação da proteína por “Western Blotting”. As bandas foram analisadas por densitometria, utilizando-se “Scion Image”

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos em médias \pm erro padrão da média dos grupos experimentais, e submetidos a análise de variância de uma via (ANOVA) seguido de pós-teste de Tukey, com nível de significância para $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 PESO TUMORAL

O peso médio dos tumores nos animais do grupo W foi de 15,33, no WS de 21,46 e no WP de 7,82 (Figura 3). A suplementação com óleo de peixe foi capaz de reduzir a taxa de crescimento tumoral ($p < 0,001$) quando comparada à do W e WS. Em contrapartida, o grupo WS apresentou taxa de crescimento um pouco maior quando comparada à do W ($p < 0,001$).

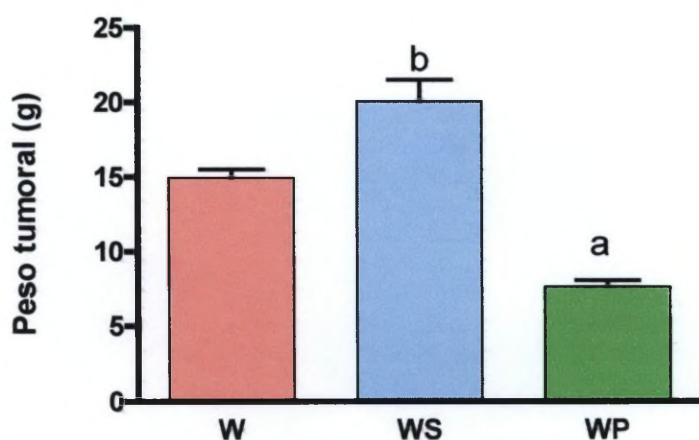


Figura 3: Peso, em gramas, da massa tumoral obtida dos ratos não-suplementados (W), ratos suplementados com gordura de coco (WS) ou óleo de peixe (WP). Os dados estão apresentados como média \pm EPM de 18 animais do grupo W, 20 do grupo WS e 26 animais do grupo WP.

a $p < 0,001$ quando comparado aos grupos W e WS; b $p < 0,001$ quando comparado ao grupo W.

4.2 CONCENTRAÇÃO DE PROSTAGLANDINAS E₂ NO PLASMA DE RATOS PORTADORES DE TW256.

Ratos portadores de tumor de Walker 256, que receberam suplementação com gordura de coco, não apresentaram alteração na concentração plasmática de PGE₂ (Figura 4) quando comparados àqueles que não receberam suplementação (W). Entretanto, o grupo suplementado com óleo de peixe (WP), a concentração de prostaglandinas estava reduzida significativamente (2,2 vezes) quando comparada às do grupo W e WS ($p < 0,05$).

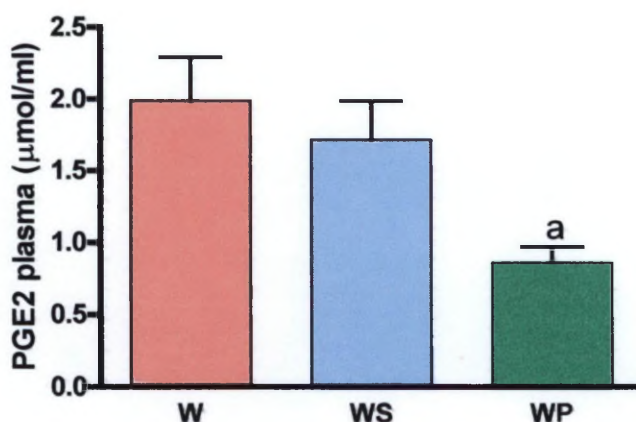


Figura 4: Concentração de PGE₂ (µmol/mL) no plasma de ratos portadores de tumor de Walker 256 dos grupos sem suplementação (W), e suplementados cronicamente com gordura de coco (WS) ou óleo de peixe (WP). Os dados representam a média \pm EPM de 6 animais por grupo.

^a $p < 0,05$ quando comparado com o grupo W e WS.

4.3 EXPRESSÃO DA COX-2 EM CÉLULAS DO TUMOR DE WALKER 256

A expressão da COX-2 no tecido tumoral de ratos que receberam suplementação crônica com óleo de peixe estava reduzida em 2,2 vezes quando comparada à dos grupos W e WS ($p < 0,01$). Em contrapartida, os ratos suplementados com gordura saturada, aumentaram a expressão de COX-2, comparando-se com a do W, em 1,3 vezes.

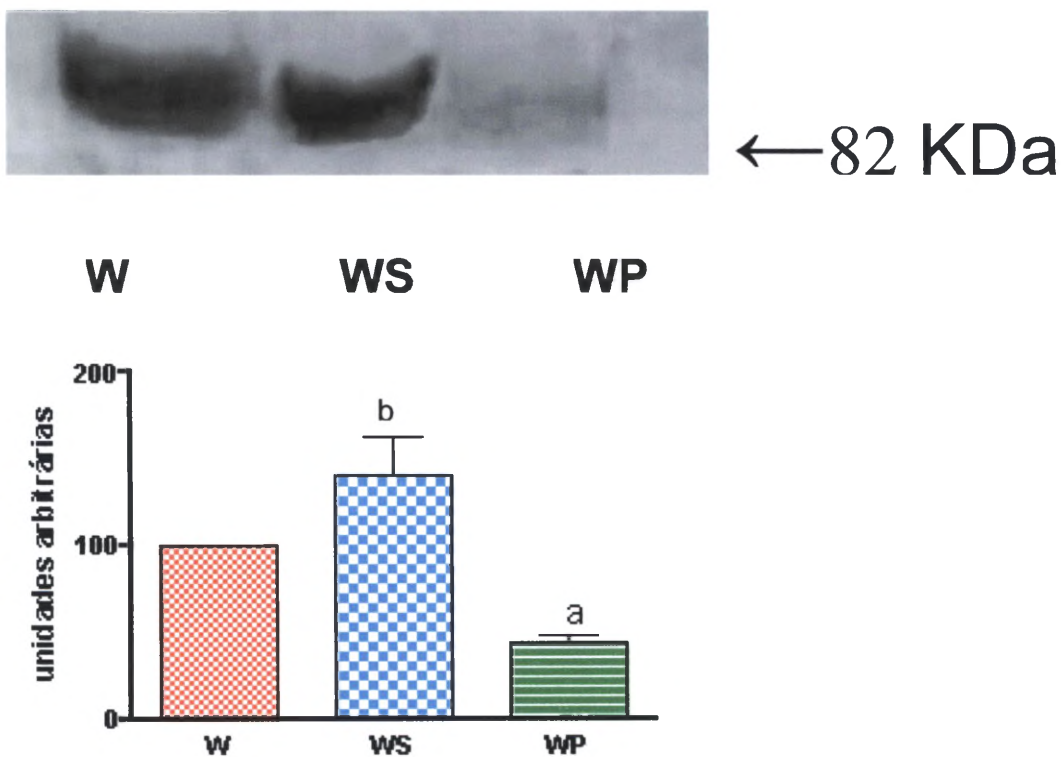


Figura 5: Expressão de COX-2 no tecido tumoral de ratos não suplementados (W), suplementados com gordura de coco (WS) ou óleo de peixe (WP). Os dados estão apresentados como média \pm EPM de unidades arbitrárias. a $p < 0,01$ quando comparado ao grupo W e WS; b $p < 0,001$ quando comparado ao grupo W.

5. DISCUSSÃO

O aparecimento de câncer está associado a diversos fatores ambientais, entre eles a dieta, responsável por cerca de 30% de todos os casos de câncer. O consumo excessivo de gorduras saturadas (KUSHI e GIOVANUCCI, 2002) e ácidos graxos n-6 e baixa ingestão de ácidos graxos n-3, tem sido mostrado facilitarem o aparecimento de doenças cardiovasculares e câncer (McENTEE, et al., 2002).

Países do mediterrâneo têm menores índices de câncer quando comparados com outros países ocidentais, em que se observa maior consumo de carne vermelha e processada. A razão para tal achado de menor incidência tem sido atribuída a dieta, na qual há alto consumo de frutas vegetais, peixe e óleo de oliva (NKONDJOCK et al., 2003). Analisando-se o padrão de dieta de nossos ancestrais (2 milhões de anos atrás), observa-se maior consumo de folhas, grãos e animais marinhos, ricos em ácidos graxos poliinsaturados n-3 (SIMOPOULOS, 2002). Em contrapartida, a partir da revolução industrial, passou-se a consumir mais gorduras saturadas e óleos de grãos que contém n-6, além de se reduzir o consumo de n-3, sendo isso relacionado ao aparecimento de várias patologias (ROSE e CONNOLY, 1997). Devido a estas observações, nos últimos anos, vários estudos têm sido feitos em animais e humanos para avaliar o efeito dos AGPI, em especial dos n-3, no crescimento tumoral (MUKUTMONI-NORRIS et al., 2000).

Neste trabalho demonstramos redução na taxa de crescimento tumoral (figura 3) nos animais suplementados com o óleo de peixe, corroborando as observações de menor incidência de câncer em populações de japoneses e esquimós, que consomem grandes quantidades de gorduras de animais marinhos, ricos em n-3 (TAPIERO et al, 2002; ROYNETTE et al, 2004). Porém os mecanismos de ação dos ácidos graxos n-3 não são totalmente esclarecidos. Sugere-se que esses ácidos graxos possam estar agindo de forma a aumentar a apoptose, ou ainda, podem estar ligados a uma redução da proliferação celular, bem como num aumento da peroxidação lipídica exercendo ação antitumorigênica (ROSE e CONNOLY, 1999; TAPIERO, 2002), oxidando membranas das células

tumorais. Esses mecanismos podem estar ocorrendo separadamente, ou então, ocorrem concomitantemente, auxiliando-se mutuamente na redução do crescimento do tumor.

Um mecanismo que poderia promover a redução do crescimento tumoral seria a modulação pela enzima ciclooxigenase-2 (COX-2), a qual é expressa em altos níveis em tecidos tumorais, quando comparado com à dos tecidos saudáveis adjacentes (ROYNETTE et al, 2004). A relação entre o aumento da expressão da COX-2 e o câncer tem sido relatada em diversos trabalhos, como nos cânceres de mama, cólon e próstata (WANG et al, 2004; DEMPKE et al, 2001), tanto em animais como em humanos.

A expressão da COX-2 apresentou-se diminuída nos ratos suplementados com óleo de peixe (figura 5), quando comparada à dos grupos controle (W) e suplementado com gordura de côco (WS). Existe grande interesse em saber-se como ocorre a modulação da COX-2, uma vez que é capaz de promover angiogênese e crescimento tumoral (BOUDREAU et al, 2001), sendo assim, vários trabalhos estudaram o efeito da inibição dessa enzima (LLOR et al, 2003; NIXON et al, 2003; LU et al, 2002). O uso, em longo prazo, de inibidores da ciclooxigenase em humanos fez com que ocorresse decréscimo em até 50% no risco de câncer colorretal (WANG, 2004). Tem sido demonstrado que existe uma ação da enzima COX-2 na regulação da apoptose celular. IÑIGUEZ et al (2003), mostraram que inibidores da COX-2 podem bloquear a apoptose em vários tecidos. Já no trabalho de PINTO Jr et al (2004) foi mostrado que a suplementação com óleo de peixe associado a inibidores da COX-2 reduziram o crescimento tumoral, potencializando seu efeito.

A concentração plasmática de prostaglandinas E da série 2 estava significativamente reduzida no grupo que recebeu suplementação com óleo de peixe quando comparada à dos grupos sem suplementação e suplementado com gordura de côco (Figura 4). Uma possível explicação para isso seria que o óleo de peixe suprime o crescimento tumoral por reduzir a atividade da COX-2, sendo que esta induz a formação de prostaglandinas associadas a carcinogênese. Dessa forma o ácido eicosapentaenóico (ácido graxo n-3) impediria a formação do ácido

araquidônico (AA) por competir pelas enzimas ciclooxigenase e lipooxigenase (TOGNI et al, 2003), diminuindo a formação de eicosanóides pró-tumorigênicos provenientes do AA, em especial as prostaglandinas E da série 2 (CURI et al, 2002). Evidências apontam que inibidores que tem como alvo receptores de prostaglandinas provenientes da COX-2 poderiam ser mais eficazes no combate ao câncer, causando menos efeitos colaterais que inibidores seletivos para COX-2 (WANG, 2004). DOMMELS et al (2002) discutiram em seu trabalho a relação dos ácidos graxos n-3 e n-6 em câncer de cólon, relatando que os ácidos graxos n-3 reduziram o crescimento tumoral por promoverem a inibição na produção de PGE₂ derivadas do ácido araquidônico. Isso deve-se ao fato de que os ácidos graxos n-3 possuem a habilidade de se incorporarem na membrana celular e utilizar a enzima COX-2 para produzir prostaglandinas E da série 3, diminuindo, assim, os níveis de prostaglandinas E da série 2 (PGE₂).

As PGE₂ estavam aumentadas no tecido tumoral, promovendo inibição da apoptose, fazendo com que ocorra promoção da proliferação das células tumorais (SUMITANI et al, 2001). JONES et al (1999) afirmou que células de carcinoma de cólon em humanos cultivadas na presença de PGE₂ in vitro, geraram aumento nos níveis da proteína Bcl-2 que é anti-apoptótica. Dessa forma, as PGE₂ estariam associadas a inibição da apoptose, promovendo o crescimento tumoral. Além disso, as PGE₂ servem de mediadoras para o processo de angiogênese, processo fundamental no desenvolvimento tumoral.

Foi proposto no trabalho de CALVIELLO et al (2004) uma possível utilização terapêutica dos ácidos graxos n-3 como componentes anti-angiogênicos em terapia para o câncer de cólon, uma vez que esses AGPI se mostraram capazes de reduzir o crescimento tumoral e os níveis de COX-2, de prostaglandinas E da série 2 e do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).

6. CONCLUSÕES

Assim, esse trabalho mostra que a suplementação com óleo de peixe tem a capacidade de diminuir o crescimento tumoral em ratos da linhagem Wistar. E entre os mecanismos que permitem essa redução estariam a diminuição da expressão da enzima ciclooxigenase-2 e a diminuição da concentração plasmática de prostaglandinas E da série 2.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 3ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Fundamentos da Biologia Celular: Uma Introdução à Biologia Molecular da Célula**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1999.

ASTORG, P. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids and prostate cancer risk: a review of epidemiological and experimental evidence. **Cancer Causes and Control**, v. 15, p. 367-386, 2004.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 142, p. 79-83, 1976.

BOUDREAU, M.D.; SOHN, K.H.; RHEE, S.H.; LEE, S.W.; HUNT, J.D.; HWANG, D.H.. Suppression of tumor cell growth both in nude mice and in culture by n-3 polyunsaturated fatty acid. **Cancer Research**, v. 61, p. 1386-91, 2001.

CALDER, P.C. n-3 polyunsaturated fatty acids as pharmacologic agents: a fishy tale? **Nutrition**, EUA, v. 11, n. 11/12, p. 1002-1004, 1997.

CALVIELLO, G.; NICUOLO, F.; GRAGNOLI, S.; PICCIONI, E.; SERINI, S.; MAGGIANO, N.; TRINGALI, G.; NAVARRA, P.; RANELLETTI, F. O.; PALOZZA, P. n-3 PUFAs reduce VEGF expression in human colon cancer cells modulating the COX-2/ PGE₂ induced ERK-1 and -2 and HIF-1 α induction pathway. **Carcinogenesis Advanced Access**, p. 1-23, 2004.

CURI, R; POMPÉIA, C, MIYASAKA, C.K.; PROCÓPIO, J. **Entendendo a Gordura: os ácidos graxos**. Editora Manole, São Paulo, 2002.

DEMPKE, W.; RIE, C.; GROTHEY, A.; SCHMOLL, H. J. Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? **Journal of Cancer Research Clinical Oncology**, v.127, p.411-417, 2001.

DIAS, D. S.; COELHO, M. V. Purificação dos principais polipeptídeos, P160 e P54, de uma fração ATPase de cérebro de rato. **Horizonte científico** (online), 2004.

DOMMELS, Y.E.M.; ALINK, G.M.; BLADEREN, P.J.; OMMEN, B. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids and colorectal carcinogenesis: results from cultured colon cells, animal models and human studies. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 12, p. 233-244, 2002.

DOMMELS, Y.E.M.; HARING, M.M.G.; KEESTRA, N.G.M.; ALINK, G.M.; BLADEREN, P.J.; OMMEN, B. The role of cyclooxygenase in n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acid mediated effects on cell proliferation, PGE₂ synthesis and cytotoxicity in human colorectal carcinoma cell lines. **Carcinogenesis**, v.24, p.385-392, 2003.

FERNANDES,L.C; CARPINELLI,A.R; HELL,N.S; CURI,R. Improvement of cancer cachexia and decrease of Walker 256 tumor growth by insulin administration in rats. **Cancer Therapy and Control** 1:259-68, 1991.

FERNANDES, L.C.; MARQUES DA COSTA, M.M.; CURI, R. Metabolism of glucose, glutamine and pyruvate in lymphocytes from Walker 256 tumor bearing rats. **Braz. J. Biol. Res.**, v. 27, p. 2539-2543,. 1994.

GURR, M.; GARROW, J.S.; JAMES, W.P.T; Fats. **Human nutrition and Diabetics**. Churchill Livingston, London, p. 77-102, 1996.

IÑIGUEZ, M.A.; RODRÍGUEZ, A.; VOLPERT, O.V.; FRESNO, M.; REDONDO, J.M. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target in angiogenesis. **Trends Mol Med.**, v.2, p. 73-8, 2003.

JHO, D.H.; COLE, S.M.; LEE, E.M.; ESPAT, J. Role of omega-3 fatty-acid supplementation in inflammatory and malignancy. **Integrative Cancer Therapies**, v. 3(2), p. 98-111, 2004.

JONES, P.A.; LEA, L.J.; PENDLINGTON, R.V. Investigation of the potential of conjugated Linoleic acid (CLA) to cause Peroxisome proliferation in Rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, p. 1119-1125, 1999.

KIM, K.H.; PARK, H.S. Dietary supplementation of conjugated linoleic acid reduces colon tumor incidence in DMH-treated rats by increasing apoptosis with modulation of biomarkers. **Nutrition**, v. 19, p. 772-777, 2003.

KUSHI, L. and GIOVANNUCCI, E. Dietary fat and cancer. **The American Journal of Medicine**, v. 113, p. 63-70, 2002.

LARSSON, S.C.; KUMLIN, M.; INGELMAN-SUNDBERG, M.; WOLK, A. Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. **Am. J. Clin. Nutr**, v. 79, p. 935-945, 2004.

LIN, J.; ZHANG, S.M.; COOK, N.R.; LEE, I.; BURING, J.E. Dietary Fat and Fatty Acids and Risk of Colorectal Cancer in Women. **American Journal of Epidemiology**, v.160(10), p. 1011-1022, 2004.

LLOR, X.; PONS, E.; ROCA, A.; ALVAREZ, M.; MAÑE,J.; FERNANDEZ, F.; GASSULL, M. A.. The effects of fish oil, olive oil, oleic acid and linoleic acid on colorectal neoplastic processes. **Clinical nutrition**, v. 22(1), p. 71-79, 2003.

LU, S.; ZHANG, X.; BADAWI, A.F.; SOHEMY, A.; ARCHER, M.C. Cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib promotion of mammary tumorigenesis in rats fed a high diet rich in n-6 polyunsaturated fatty acids. **Cancer Letters**, v. 184, p. 7-12, 2002.

MCENTEE, M. F.; WHELAN, J. Dietary polyunsaturated fatty acids and colorectal neoplasia. **Biomed Pharmacother**, v.56, p. 380-387, 2002.

MUKUTMONI-NORRIS, M.; HUBBARD, N. E.; ERICKSON, K. L. Modulation of murine mammary tumour vasculature by dietary n-3 fatty acids en fish oil. **Cancer Letters**, v.150, p.101-109, 2000.

NIXON, J.B; KAMITANI, H.; BAEK, S.J.; ELING, T.E. Evaluation of eicosanoids and NSAIDs as PPAR γ ligands in colorectal carcinoma cells. **Prostaglandins, Lekotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 68, p. 323-330, 2003.

NKONDJOCK, A.; SHATENSTEIN, B.; MAISONNEUVE, P; GHADIRIAN, P. Specific fatty acids and human colorectal cancer: an overview. **Cancer Detection and Prevention**, v.27, p.55-66, 2003.

PINTO, J.A.; FOLADOR, A.; BONATO, S.J.; AIKAWA, J.; YAMAZAKI, R.K.; PIZATO, N.; FACIN, M.; GROHS, H.; OLIVEIRA, H.H.; NALIWAIKO, K.; FERRAZ, A.C.; NISHIYAMA, A.; FERNANDEZ, R.; CURI, R.; FERNANDES, L.C. Fish oil supplementation in F1 generation associated with naproxen, clenbuterol and insulin administration reduce tumora growth and cachexia in Walker 256 tumor-bearing rats. **The Journal of nutritional Biochemistry**, v.15, p. 358-365, 2004.

RAMOS, E.J.B.; MIDDLETON, F.A.; LAVIANO, A.; SATO, T.; ROMANOVA, I.; DAS, U.N.; CHEN, C.; QI, Y.; MEGUID, M.M. Effects os n-3 fatty acid supplementation on tumor-bearing rats. **Journal of American College of Surgeons**, v. 199 (5), p.716-723, 2004.

ROSE, D.P.; CONOLLY, J.M. Dietary fat and breast cancer metastasis by human tumor xenografts. **Breast Cancer Research** , v. 46, p. 225-237, 1997.

ROSE, D. P.; CONNOLY, J. M. Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 83, p. 217-244, 1999.

ROYNETTE, C.E.; CALDER, P.C.; DUPERTUIS, Y.M.; PICHARD, C. N-3 polyunsaturated fatty acids and colon cancer prevention. **Clinical Nutritional**, v.23, p. 139- 151, 2004.

SIMOPOULOS, A. P. Essential fatty acids in health and chronic disease. **American Journal of Clinic Nutrition**, EUA, v. 70, p. 560S-569S, 1999.

SIMOPOULOS, A.P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 00, 2002.

STEVENS, A.; LOWE, J. **Patologia**. 2ed. São Paulo: Manole, 1998.

SUMITANI, K.; KAMIJO, R.; TOYOSHIMA, T.; NAKANISHI, Y.; TAKIZAWA, K.; HATORI, M.; NAGUMO, M. Specific inhibition of cyclooxygenase-2 results in inhibition of proliferation of oral cancer cell lines via suppression of prostaglandin E₂ production. **Journal of Oral Pathology Medical**, v. 30, p.41-47, 2001.

TAPIERO, H.; BA, G. N.; COUVREUR, P.; TEW, K. D. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies. **Biomed Pharmacother**, 2002.

TOGNI, V.; OTA, C. C. C.; FOLADOR, A.; TCHAIKOVSKI, O.; AIKAWA, J.; YAMAZAKI, R. K.; FREITAS, F. A.; LONGO, R.; MARTINS, E. F.; CALDER, P. C.; CURI, R.; FERNANDES, L. C. Cancer Cachexia and Tumour Growth Reduction in Walker 256 Tumor-Bearing Rats Supplemented With N-3 Polyunsaturated Fatty Acids for One Generation. **Nutrition and Cancer**, v. 46, p. 52-58, 2003.

WAHLE, K.W.J.; HEYS, S.D. Cell signal mechanisms, conjugated linoléico acids (CLAs) and anti-tumorigenesis. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 67(2-3), p. 183-186, 2002.

WANG, D.; WANG, H.; SHI, Q.; KATKURI, S.; WALHI, W.; DESVERGNE, B.; DAS, S. K.; DEY, S. K.; DUBOIS, R. N. Prostaglandin E₂ promotes colorectal adenoma growth via transactivation of the nuclear peroxisome proliferator – activated receptor δ . **Cancer Cell**, v. 6, p. 285-295, 2004.

YAMAKI, T.; ENDOH, K.; MYIAHARA, M.; NAGAMINE, I.; HUONG, N. T. T.; SAKURAI, H.; POKORNY, J.; YANO, T. Prostaglandina E₂ activates Src signaling in lung adenocarcinoma cell via EP3. **Cancer Letters**, v. 214, p.115-120, 2004.

n-3 Fatty acids and health. **British Nutrition Foundation**, Londres, 1999, 45 p.

ANEXOS

DOSAGEM PROTÉICA PELO MÉTODO DE BRADFORD

- Homogeneizar o músculo ou tumor em tampão de lise na proporção 1:7 (P/V) com o auxílio de um homogeneizador Politron (2500 /min) ou no caso de células isoladas utilizar o sonicador.
- Centrifugar por 5 minutos a 13000 rpm, coletando o sobrenadante. A concentração da proteína da amostra desconhecida é calculada com base em uma curva padrão de uma proteína conhecida (o correto é utilizar uma proteína padrão mais próxima da amostra em questão). A curva padrão tem uma linearidade entre as concentrações de 20 a 150 µg de proteínas por 100 ml da amostra (as amostras podem ser lidas até 800 µg/mL. obs: acima deste valor diluir a amostra).

Preparo da solução de Bradford:

- Pesar 100mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 e colocar num balão volumétrico de 1000 mL.
- Dissolver o corante com 50 mL de etanol 95% (47,5 mL + 2,5 mL). A solução deve ficar azul. Agitar para diluir bem o Coomassie.
- Adicionar 100 mL de ácido fosfórico 85% (85 mL + 15 mL). A solução deve ficar vermelho vinho.
- Completar o volume para 1000 mL com água MQ.
- Transferir a solução em garrafa escura (obs: lavar a garrafa 3x antes de transferir, com a própria solução).

O corante é estável a 4° C por até 6 meses.

Preparo da curva padrão:

- Pesa-se 10 mg de albumina sérica bovina (BSA) e dilui-se em 10 ml de água destilada;
- Lê-se no espectrofotômetro a 280 nm, contra referência de água destilada;

- Dividi-se a densidade ótica por 0.66 (fator de correção para concentração) e tem-se a concentração da solução-mãe em mg/ml;
Obs.: a densidade ótica deve estar entre 0.1 e 0.8; caso seja menor que 0.1 e maior que 0.8, adicionar mais BSA ou água destilada, respectivamente.
- Faz-se a diluição da "solução-mãe" de BSA para a curva padrão, com valores decrescentes de albumina para um volume total de 500 µl;
- Prepara-se uma bateria de 21 tubos, coloca-se 1 ml da solução de Bradford mais 20 µl de cada diluição em cada tubo (faz-se em duplicata para cada diluição); no tubo branco, coloca-se 1 ml da solução de Bradford mais 20 µl de água destilada;
Obs.: antes de usar a solução de Bradford, agitar bem; transferir o volume que será usado em um béquer e descartar a sobra.

| Diluição | Solução-mãe (µL) | Água MQ (µL) | Conc. (µg/mL) |
|----------|------------------|--------------|---------------|
| 1:1 | 500 | 0 | 1000 |
| 1: 1.25 | 400 | 100 | 800 |
| 1: 1.66 | 300 | 200 | 600 |
| 1: 2 | 250 | 250 | 500 |
| 1: 2.5 | 200 | 300 | 400 |
| 1: 4 | 125 | 375 | 250 |
| 1: 5 | 100 | 400 | 200 |
| 1: 10 | 50 | 450 | 100 |
| 1: 20 | 25 | 475 | 50 |
| 1: 50 | 10 | 490 | 20 |

TABELA 1: Diluições da solução-mãe utilizada no método de Bradford.

- Agitam-se os tubos e ler no espectrofotômetro a 595 nm, contra referência do tubo branco.
Obs.: a leitura deve ser imediata após a adição das diluições, pois as

proteínas ficam estáveis por pouco tempo; deixar os tubos e as cubetas utilizados de molho logo após o uso, pois a solução de Bradford pode manchá-las.

- Monta-se o gráfico da curva padrão (concentração de BSA em $\mu\text{g/ml}$ x densidade ótica) e acha-se a equação da reta ($y = ax + b$, sabendo que $a =$ coeficiente angular $= \text{tg } \alpha = (y_2 - y_1) : (x_2 - x_1)$ e $b =$ coeficiente linear = ponto do eixo da ordenada por onde a reta passa).

Obs: Utilizar o programa swift - quantification

- A partir dos valores de DO (y) é possível calcular a concentração da amostra, isolando-se o x . Este valor deve ser multiplicado pela diluição para se obter a concentração de proteína da amostra em $\mu\text{g/ml}$.

Determinação protéica:

- Para a determinação protéica, pipetar 20 μL da amostra em 1 mL da solução de Bradford. Observar a coloração do tubo, caso ela esteja em tom de azul mais intenso que o seu tubo padrão ($\sim 1000\mu\text{g/mL}$), a amostra deve ser diluída.
- Prepara-se uma bateria de tubos (em duplicata para cada amostra mais o tubo branco);
- Coloca-se 1 ml da solução de Bradford em cada tubo + 20 μl de cada amostra; no tubo branco coloca-se 1 ml da solução mais 20 μl do tampão de lise (na qual a amostra foi preparada);
- Lê-se no espectrofotômetro a 595 nm, contra referência do branco;

Obs.: as densidades óticas devem ficar entre 0 e 1 que é a faixa de sensibilidade da curva padrão.

- Utiliza-se da equação da reta para o cálculo da concentração protéica de cada amostra [sabendo que $y =$ densidade ótica, $x =$ concentração da amostra e sendo $y = ax + b$]. A partir dos valores de DO (y) é possível calcular a concentração da amostra, isolando-se o x . Este valor deve ser multiplicado pela diluição para se obter a concentração de proteína da amostra em $\mu\text{g/ml}$.

ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA “SDS-PAGE”

Após a quantificação protéica das amostras, a amostra foi diluída com tampão Laemmli 1:2 de forma que a concentração final fique entre 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ e 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (concentração necessária para a eletroforese); é importante que todas as amostras fiquem em uma concentração protéica única para que isso não interfira na análise das suas bandas. Pipetar de 20 a 50 μL em cada poço.

Preparo do gel de SDS – Poliacrilamida:

- Monta-se a base de vidro com separadores, tomando cuidado para evitar regiões passíveis de vazamento (colocar um pouco de vaselina ou parafilme nos separadores); coloca-se o pente e marca-se cerca de 1 cm abaixo do mesmo; retira-se o pente;
- Em um béquer, prepara-se o gel de separação na porcentagem desejada e coloca-se entre as placas, até a marca (trabalhar com certa velocidade já que, após a adição do persulfato de amônio e do TEMED, a reação de polimerização já se inicia);
- Adiciona-se uma camada de álcool isoamílico ou isobutílico (cerca de meio cm) para a retirada de bolhas, nivelamento do gel e isolamento do gel do ar aguarda-se a polimerização por 30 min;
- Lava-se a superfície do gel com água destilada 3 vezes e seca-la com uma pedaço de papel-filtro (cuidar para não danificá-la);
- Prepara-se o gel de empilhamento e coloca-se sobre o gel de corrida; adiciona-se o pente e aguarda-se a polimerização;
- Retira-se o pente, coloca-se o gel na cuba de eletroforese e lavam-se os poços com água e/ou tampão de corrida.

Corrida das amostras:

Colocam-se as amostras (20 a 100 μg de proteína) e o marcador nos lanes, enche-se a cuba com tampão e inicia-se a corrida a 300 v, 25-50 mA, por 3-5 h.

“WESTERN BLOTTING”

Montagem do gel de empilhamento de transferência:

- Após a corrida eletroforética, retira-se um dos vidros com auxílio de espátula, retira-se o gel de empilhamento e recorta-se um dos cantos para dar idéia de orientação;
Obs.: usar luvas para evitar manchas com gordura e proteínas da pele.
 - Equilibra-se o gel em tampão de transferência por 10 min para permitir que ele aumente ou encolha antes do contato com a membrana de nitrocelulose e para remover o excesso de sais de tampão e detergentes;
 - Recorta-se a membrana de nitrocelulose e dois papéis-filtro do tamanho do gel, com máximo 0,5 cm maior (material excedente pode dobrar durante a transferência, gerando um curto circuito);
 - Pré-umedece-se a membrana de nitrocelulose em água destilada, cuidando para não formar bolhas (mergulhar uma das bordas e submergir lentamente);
 - Mergulha-se a membrana de nitrocelulose em tampão de transferência por 2-5 min;
 - Umedecem-se os dois papéis-filtro em tampão de transferência;
 - Monta-se o “stack” de transferência seguido os passos:
 - Centraliza-se uma camada de esponja sobre o lado catódico do módulo (preto);
 - Coloca-se um dos papéis-filtro sobre a esponja;
 - Posiciona-se o gel equilibrado sobre o papel-filtro; umedece-se a superfície do gel com gotas de tampão de transferência;
 - Coloca-se membrana de nitrocelulose sobre o gel; não reposicionar a membrana após ela entrar em contato com o gel (há transferência de proteínas pelo simples contato);
 - Coloca-se o outro papel-filtro sobre a membrana de nitrocelulose;
 - Colocam-se mais 2 camadas de esponjas sobre o papel-filtro;
- Obs.: um segundo “stack” de transferência pode ser executado entre estas

outras duas camadas de esponjas.

- Verifica-se a posição do "stack" de transferência que deve estar centralizado sobre a placa de eletrodo (nenhuma camada deve ser "beliscada" quando o módulo for fechado) e fecha-se o módulo.

Eletrotransferência de proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose:

- Entorna-se 300-350 ml de tampão de transferência dentro do módulo; bate-se de leve o jogo de blotting para expulsar quaisquer bolhas de ar das esponjas;
- Posiciona-se o módulo no tanque com os "plugs" voltados ao centro;
- Adiciona-se 1,7 litros de água deionizada a 4° C no tanque;
- Coloca-se a tampa de segurança sobre o tanque;
- Inicia-se a eletrotransferência a 25 V e 300-400 mA por 1-2 hrs;
- Após a eletrotransferência, retira-se o módulo do tanque e joga-se fora o tampão de transferência; marca-se cada membrana, caso sejam feitas duas, e indica-se o lado das amostras; suspende-se a membrana com uma pinça e deixa-se secar ao ar.

Bloqueio de sítios não específicos:

- Incuba-se a membrana com tampão de bloqueio por 30 min a 1 hr (2 horas) à temperatura ambiente com agitação ou *overnight* a 4-8° C.
- Incubação com o primeiro anticorpo: anti-IRS-1, anti-IRS-2, PI-3K e GLUT-4 incuba-se a membrana em solução de incubação com anticorpo primário (anti-IRS-1, anti-IRS-2, anti-PI-3K e anti-GLUT-4) na diluição de 1:500, com volume suficiente para cobrir a membrana de nitrocelulose por 30' a 1 hr (3 horas) com agitação ou *overnight* a 4-8° C;
- Lava-se a membrana com tampão de lavagem 3 vezes de 10 min com agitação e volumes de tampão apropriados (suficientes para cobrir completamente a membrana de nitrocelulose).

Incubação com o anticorpo secundário conjugado ao HRP:

- Incuba-se a membrana em solução de incubação contendo o anticorpo secundário conjugado ao HRP na diluição 1:2500 ou 1:1000, por 30' a 1 hr (3 horas) à temperatura ambiente com agitação ou *overnight*;
- Lava-se a membrana com tampão de lavagem 3 vezes de 10 min com agitação e volumes de tampão apropriados.

Incubação com o substrato quimioluminescente/acentuador:

- Incuba-se a membrana em solução de trabalho por 5 min com agitação; usa-se volume suficiente para cobrir completamente a membrana;
- Remove-se a membrana da solução de trabalho e deixa-se que o excesso da solução escorra dela; coloca-se um protetor de membrana, tal como um protetor plástico, sobre a membrana de nitrocelulose e retira-se quaisquer bolhas de ar.

Revelação:

- Coloca-se a membrana em cassete, sobrepô-la com um filme e expô-la por um comprimento de tempo apropriado (uma primeira exposição de 30 s é recomendada e, conforme resultado, acerta-se o tempo de exposição inicial);
- Revela-se o filme.