

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA LUIZA ALDINUCCI BUZZO

**Efeitos da suplementação com ácidos graxos poli-insaturados n-3 sobre
parâmetros celulares em linhagens de neuroblastoma**

CURITIBA

2017

ANA LUIZA ALDINUCCI BUZZO

**Efeitos da suplementação com ácidos graxos poli-insaturados n-3 sobre
parâmetros celulares em linhagens de neuroblastoma**

Trabalho apresentado como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina no curso de graduação em Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a Dr^a Katya Naliwaiko

CURITIBA

2017

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me guiar e sempre me dar força e equilíbrio nessa jornada. Por me ajudar a aprender com os percalços, por me ajudar a ser uma pessoa melhor diante de todos os desafios e a nunca desistir. Pela oportunidade de chegar até esse momento e por todo o aprendizado que tive.

Aos meus pais, João e Eliana, e ao meu irmão João Luiz, que sempre estiveram presentes e me acompanharam durante toda a graduação, me oferecendo todo o apoio sempre, que me ajudaram nos momentos de estresse e de insegurança, que me deram todo amor, carinho e compreensão. A toda minha família, tios e primos, que sempre estiveram ao meu lado e vibraram com as minhas conquistas, em especial, a minha tia Vera, que sempre foi uma segunda mãe para mim, e a minha tia Vanda, que sempre teve um imenso orgulho da profissão que escolhi. Principalmente a minha avó Annadir, que sempre esteve ao meu lado e se orgulhou de mim, sempre me incentivou e me deu forças para seguir em frente, que mesmo depois de ter partido, nunca me deixou e continua sendo um exemplo de amor, de esperança e de vida para mim.

Ao meu noivo, Jhonata Galante Cabral, que é um exemplo de calma, compreensão e serenidade para mim, que sempre acreditou no meu potencial e me incentivou, que esteve presente e ao meu lado desde o início, desde a escolha do curso e em todos os momentos difíceis na graduação, que me deu todo apoio, que sempre me compreendeu e me ajudou a levantar e a seguir em frente quando foi preciso. Que é meu amor, parceiro e amigo e que vibra com as minhas conquistas acadêmicas e profissionais, que sempre me deu todo amor, carinho, alegria e boas energias, que me ensinou tantas coisas e que faz parte dessa e de muitas outras etapas da minha vida.

A todos meus amigos, que me apoiaram, que dividiram momentos de tensão e de alegria comigo, que fizeram da graduação essa experiência incrível em minha vida. Em especial a Angélica Araújo Hillman e Rosana Gonçalves dos Santos, que estiveram por perto em todos os momentos.

À família Lacen-PR, unidade Alto da XV, que me acompanhou nesse último semestre de estágio e que me ensinou muitas coisas além de profissionalismo.

À professora Dra. Katya Naliwaiko pela orientação.

A todos os meus professores da Universidade Federal do Paraná (UFPR), que me ensinaram não só conteúdos curriculares, mas que também me ensinaram a ser uma boa profissional de área da saúde e a cumprir meu papel na sociedade.

RESUMO

O neuroblastoma humano é o tumor sólido extracranial mais frequente na infância. A alta toxicidade dos tratamentos disponíveis é capaz de piorar o prognóstico de sobrevivência dos pacientes na primeira infância, o que leva à redução da adesão aos tratamentos e gera índices de mortalidade superiores a 10%, o que limita o sucesso terapêutico. A necessidade de tratamentos alternativos e de substâncias potencialmente eficientes que apresentem efeito colateral reduzido tem sido objeto de diversos estudos e justifica a realização deste trabalho. Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos de ácidos graxos poli-insaturados n-3 componentes do óleo de peixe (principalmente ácido eicosapentaenoico – EPA - e ácido docosaexaenoico - DHA) e do óleo *Oro inca* (principalmente ácido alfa-linolênico - ALA) sobre parâmetros proliferativos, morfológicos e perfil de incorporação lipídica de células das linhagens de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) e de neuroblastoma murino (Neuro-2a). Essa abordagem representa um modelo *in vitro* para avaliação de parâmetros celulares que permitam avaliar o efeito de tais ácidos graxos sobre a capacidade proliferativa, morfologia e perfil lipídico tumoral. Para a suplementação com ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa n-3 foram escolhidos o óleo de peixe, que apresenta em sua composição altas concentrações de EPA e DHA, que são essenciais para o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC), e óleo *Oro inca*, que é constituído principalmente por ALA, o precursor da cascata de formação de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa n-3 endógena. Esses AGPIs n-3 foram escolhidos por sua função no SNC, além da conhecida atividade anti-inflamatória desses compostos. Para atingir os objetivos deste trabalho, células das linhagens SH-SY5Y e Neuro-2a foram cultivadas em meio de cultura DMEM suplementado com ácidos graxos poli-insaturados n-3 por 24, 48 e 72 horas, nas diluições 1:10, 1:20 e 1:50 em todas as metodologias utilizadas. Para o experimento de proliferação e viabilidade celular foi utilizado o indicador metabólico Alamar blue e, a partir da leitura em espectrofotômetro, foram calculadas as taxas de proliferação celular. Para o experimento de morfologia foi utilizado o método de fixação com paraformaldeído (PFA) 4% e coloração com corante cristal violeta para retirada de fotos em fotomicroscópio após o tratamento das células. Para a análise do perfil de incorporação lipídica as células foram tratadas e depois coletadas para o procedimento de extração lipídica para posterior detecção a partir da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foram avaliados os efeitos dos ácidos graxos poli-insaturados n-3 sobre proliferação celular e perfil de incorporação lipídica. Os ácidos graxos são capazes de aumentar a proliferação celular desse tipo de tumor e, através do perfil de incorporação lipídica, sugere-se que tais efeitos são decorrentes dos tratamentos com AGPIs n-3. Através do padrão proliferativo dessas células após o tratamento, sugere-se também que as vias de proliferação celular foram desviadas para vias de diferenciação celular. Dessa forma, são necessários estudos futuros que confirmem essas atividades dos AGPIs n-3 sobre esse tipo de tumor e que elucidem os mecanismos pelos quais esses efeitos ocorrem.

Palavras-chave: SH-SY5Y, Neuro-2a, óleo de peixe, *Oro inca*.

ABSTRACT

Human neuroblastoma is the most frequent extracranial solid tumor in childhood. The high toxicity of available treatments is capable of worsening the survival prognosis of patients in early childhood, which leads to the reduction to treatment adhesion and generates mortality rates higher than 10%, limiting therapeutic success. Thus, the need for alternative treatments and potentially efficient compounds that have reduced side effects has been the subject of several studies and justifies this study. The aim of this study was to evaluate the effects of n-3 polyunsaturated fatty acids components from fish oil (mainly eicosapentaenoic acid - EPA and docosahexaenoic acid - DHA) and *Oro inca* oil (mainly alpha-linolenic acid – ALA) on proliferative parameters, cell morphology and lipid profile of human neuroblastoma (SHSY-5Y) and murine neuroblastoma (Neuro-2a) cell lineages. This approach represents an *in vitro* model for evaluation of cellular parameters that allow to assess the effect of such fatty acids on the proliferative capacity and tumoral morphology. For n-3 long chain polyunsaturated fatty acids supplementation were chosen fish oil, which has in its composition high concentrations of EPA and DHA, essential for the development of the central nervous system, and *Oro inca* oil, which is mainly composed of ALA, the precursor of the endogenous long chain polyunsaturated fatty acids n-3 formation cascade. This n-3 PUFAs were chosen for their function in central nervous system besides its known anti-inflammatory activity. To achieve the goals of this study, SHSY-5Y and Neuro-2a cell lineages were cultivated in DMEM culture medium supplemented with n-3 polyunsaturated fatty acids for 24, 48 and 72 hours in 1:10, 1:20 and 1:50 dilutions in all methodologies used. For cell proliferation and viability experiment the metabolic indicator Alamar Blue was used and cell proliferation was measured in spectrophotometer. For the cell morphology cells were fixed with paraformaldehyde (PFA 4%) and stained with crystal violet dye and images were captured photomicroscope. For the lipid incorporation profile analysis cells were treated and collected for lipid extraction procedure and analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). The effect of n-3 polyunsaturated fatty acids on cell proliferation and lipid incorporation profile was evaluated. Fatty acids are able to increase the proliferation rate in this kind of tumor and the lipid incorporation profile suggest that such effects are result of n-3 PUFAs treatment. The cell proliferative pattern after treatment suggest that the cell proliferation pathways were diverted into cell differentiation pathways. Thus, further studies are needed to confirm these n-3 PUFAs activities on this kind of tumor and elucidate the mechanisms by which these effects occur.

Keywords: SH-SY5Y, Neuro-2a, fish oil, *Oro Inca*.

LISTA DE SIGLAS

AA - Ácido araquidônico

AGPIs – Ácidos graxos poli-insaturados

ALA - Ácido alfa-linolênico – α -linolênico (do inglês *alpha-linolenic acid*)

ANOVA – Análise da variância (do inglês *Analysis of variance*)

ATB – Antibiótico

BSA – Soro albumina bovina (do inglês *Bovine serum albumine*)

C8 – Coluna para Cromatografia Líquida Fase 8 (cadeia de 8 carbonos)

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês HPLC – *High performance liquid chromatograph*)

DHA – Ácido docosahexanoico

DMEM – *Dulbecco's modified eagle medium*

EPA – Ácido eicosapentaenoico

EROS - Espécies reativas de oxigênio (do inglês ROS – *Reactive oxygen species*)

LA – Ácido linoleico (do inglês *linoleic acid*)

OI – Óleo *Oro inca* (grupo experimental)

OP – Óleo de peixe (grupo experimental)

MDM2 - *Mouse double minute 2 homolog*

mTOR - *mammalian target of rapamycin*

PBS – Tampão Fosfato Salino (do inglês *Phosphate-Buffered Saline*) pH 7,4

PFA 4% – Solução Paraformaldeído 4%

SC – Só células (grupo experimental)

SFB – Soro fetal bovino

SNC – Sistema nervoso central

VEGF-A - Fator de crescimento endotelial vascular A (do inglês *Vascular endothelial growth factor A*)

LISTA DE SÍMBOLOS

M – Molar (concentração)

mL – Mililitros

mg – Miligramas

nm – Nanômetros

v/v – Razão volume/volume

Å – Angstrom

μL – Microlitros

μm - Micrômetros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVO GERAL	5
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
1.3 JUSTIFICATIVA	5
2 REVISÃO DA LITERATURA	6
3 MATERIAIS E MÉTODOS	9
3.1 CULTIVO CELULAR	10
3.2 EMULSÃO ÓLEO DE PEIXE E ÓLEO <i>Oro inca</i>	10
3.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS	12
3.4 PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE CELULAR	12
3.5 MORFOLOGIA CELULAR	13
3.6 PERFIL LIPÍDICO E CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	14
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	15
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
4.1 PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE CELULAR	15
4.2 PERFIL DE INCORPORAÇÃO LIPÍDICA E CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	23
4.3 MORFOLOGIA CELULAR.....	29
5 CONCLUSÕES	36
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

1 INTRODUÇÃO

Originado de células embrionárias multipotentes da crista neural (ROSS et al., 2015), o neuroblastoma humano é o tumor maligno extracranial sólido mais frequente na infância e, apesar da malignidade, apresenta frequentes casos de regressão espontânea. (REN et al., 2006). Entretanto, neuroblastomas respondem por 13% da mortalidade por câncer pediátrico. O desenvolvimento de metástases reduz em mais de 50% as chances de sobrevivência. (LAKOMA et al., 2015). Outro fator agravante na terapêutica de neuroblastomas é a alta toxicidade das terapias utilizadas atualmente para o tratamento desse tipo de tumor, que tem sido relacionada com a taxa de mortalidade e ao desenvolvimento de malignidades secundárias. (LAKOMA et al., 2015). Em função disso, a busca por novas terapias com menor toxicidade e elevado potencial terapêutico torna-se imprescindível e indispensável, fato que tem impulsionado novas pesquisas.

As membranas celulares neurais de mamíferos são caracterizadas pela composição lipídica única, uma vez que apresentam altas concentrações de ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs). Os principais AGPIs incorporados às membranas neuronais são o ácido eicosapentaenoico (EPA ômega-3), ácido docosahexanoico (DHA ômega-3) e o ácido araquidônico (AA ômega-6). (FAROOQUI et al., 2000). Diante disso, o AA e o DHA são os principais componentes das membranas celulares, de maneira que o AA é distribuído amplamente pelas membranas fosfolipídicas, enquanto que o DHA é encontrado em maior concentração nas células do sistema nervoso central, como os neurônios e células da glia. (BASCUÑÁN et al., 2014). Dessa forma, as altas concentrações lipídicas da composição cerebral de mamíferos são decorrentes da composição fosfolipídica das membranas celulares. (BROADHUST et al., 2002). A partir disso, sugere-se o forte papel de dieta enriquecida por AGPIs para adequado desenvolvimento do sistema nervoso (HORROCKS & FAROOQUI, 2004), uma vez que, durante o desenvolvimento e maturação do sistema nervoso central (SNC), grandes quantidades de DHA são requeridas, em especial para a síntese de novas membranas celulares. (HORROCKS & FAROOQUI, 2004). Dessa forma, além da atividade anti-inflamatória, o DHA apresenta atividade neuroprotetora e efeitos comportamentais e cognitivos. (HO et al., 2017).

Outro ponto interessante a se considerar é a função desses AGPIs na ativação e modulação de cascatas bioquímicas, regulação de canais iônicos, de enzimas e de fatores de transcrição. (ONG et al., 2015). Por ação das fosfolipases, os AGPIs esterificados em fosfolipídios de membrana podem ser mobilizados das membranas celulares para atuação na transdução de sinais em diversos tipos celulares (ONG et al., 2015), o que pode correlacioná-los com a modulação de processos na formação do SNC. (FAROOQUI & HORROCKS, 2006). Dessa forma, torna-se evidente a relação direta entre AGPIs e diversos processos celulares e sua possível ação no processo de diferenciação para a formação dos neurônios. Dessa maneira, a relação entre status lipídico nutricional e desenvolvimento de tumores malignos, como os neuroblastomas, foi o principal questionamento que corroborou na construção da hipótese estudada nesse trabalho.

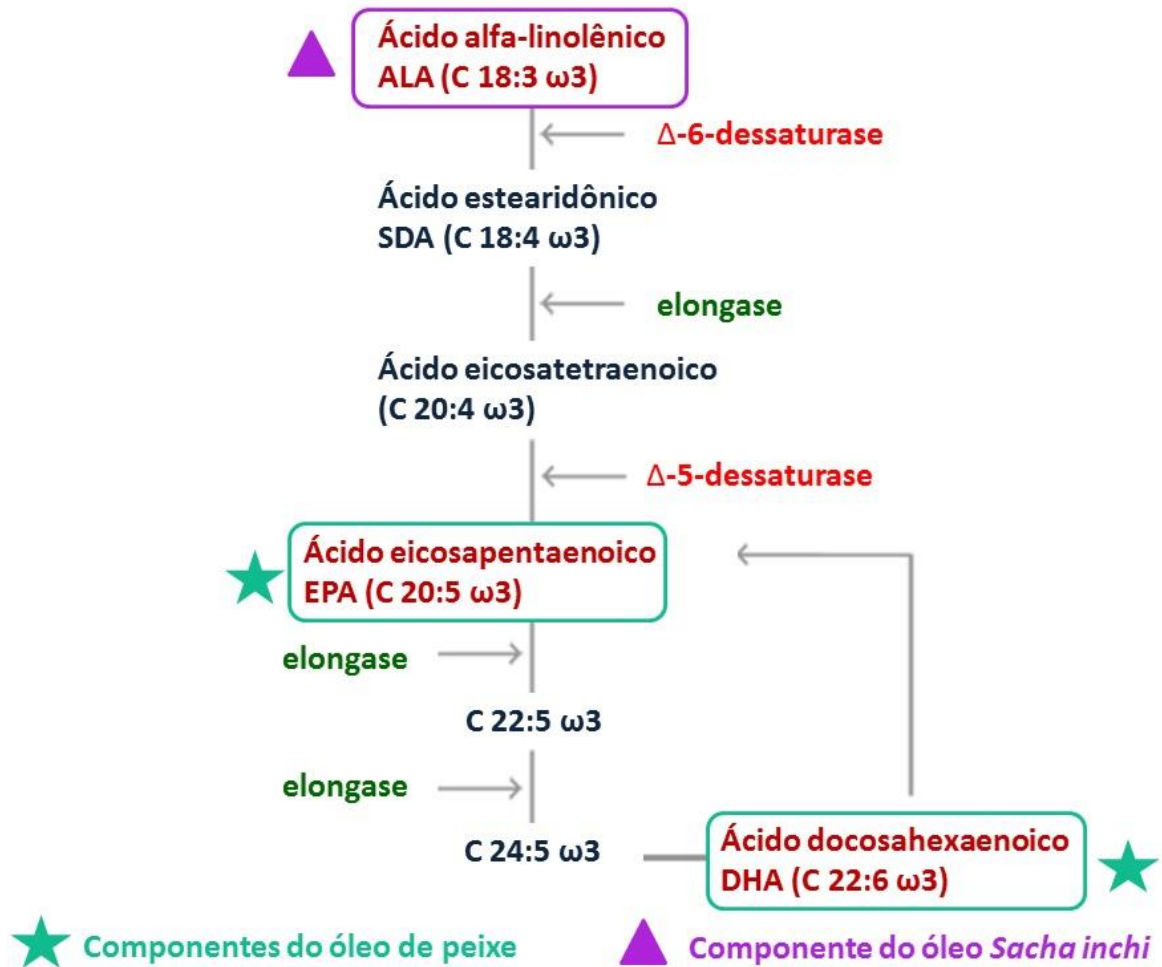
Uma vez que se incorporam às membranas celulares e em função da capacidade de atuar na transdução de sinal e em processos de transcrição gênica, tem sido sugerido que tais AGPIs possam modular a funcionalidade de diversos tecidos. A partir disso, o uso de tais compostos como alternativa terapêutica em diversas circunstâncias da saúde humana tem se mostrado um campo pertinente de estudo de maneira eficiente e relevante. Além disso, outro aspecto que deve ser considerado a respeito da ação de AGPIs n-3 (ômega-3), se refere à sua ação sobre a produção de precursores de eicosanoides (prostaglandinas e leucotrienos). Diante disso, ao produzir moléculas de baixo potencial inflamatório e de potencial de resolução, tais moléculas apresentam importante papel na regulação de vias metabólicas e de resposta inflamatória, de maneira que participam da regulação da resposta inflamatória no organismo. (BARNÉS et al., 2011). É importante ressaltar que a regulação dessa resposta se deve ao balanço entre estes AGPIs n-3 (ômega-3), que produzem moléculas de menor potencial inflamatório e até mesmo resolvinas, e AGPIs n-6 (ômega-6), que produzem moléculas de elevado potencial inflamatório advindas do metabolismo do ácido araquidônico. Diante disso, é importante ressaltar também que o AA é proveniente da conversão do precursor ácido linoleico (LA), enquanto que que EPA e DHA são produzidos através da conversão do precursor ácido α -linolênico (ALA). (BASCUÑÁN et al., 2014).

O efeito dos AGPIs n-3 sobre características tumorais tem sido objeto de diversos estudos e seus efeitos têm sido demonstrados em parte devido a

capacidade de modular a resposta inflamatória (BONATTO et al., 2011; MOCELLIN et al., 2013; SUZUMURA et al., 2016), mas também por modular proliferação e morte celular (TANAKA et al., 2017; SO et al., 2015) além de modular características fenotípicas das células tumorais, como a invasividade tumoral. (SERINI et al., 2016). Dessa forma, é possível citar diversos estudos que correlacionam a suplementação com óleo de peixe com o tratamento de diversos tipos de câncer: dentre eles, câncer de ovário (TANAKA et al., 2017), câncer de mama (SUZUMURA et al., 2016), melanoma (SERINI et al., 2016), câncer colorretal (MOCELLIN et al., 2013), tumor de Walker (IAGHER et al., 2013), Neuroblastoma (SO et al., 2015; BARNÉS et al., 2012) e atividade de neutrófilos em pacientes em tratamento com quimioterapia. (BONATTO et al., 2012). Diante disso, o objetivo deste trabalho reside na análise dos possíveis efeitos da exposição de células das linhagens de neuroblastoma a AGPIs n-3. Foram avaliadas a proliferação, morfologia celular e incorporação lipídica. Os experimentos foram conduzidos em células das linhagens SH-SY5Y (humana) e Neuro-2a (murina) a fim de identificar se há diferença nos efeitos desses AGPIs n-3 em ambas as espécies.

Nessa abordagem foram empregados dois óleos como fonte de AGPIs n-3: óleo de peixe, como fonte de EPA e DHA, e óleo *Oro inca*, obtido da prensa fria da noz peruana *sacha inchi* (*Plukenetia volubilis*, L.), como fonte de ácido α -linolênico. Dessa forma, o óleo *Oro inca* também é uma fonte rica em ω -3, uma vez que sua composição se baseia em 48,61% de ω -3 e 36,8% de ω -6. (NASCIMENTO et al., 2013). O ácido α -linolênico é a molécula precursora para todos os AGPIs n-3, a partir da cascata de produção endógena (Figura 1). A conversão de AG saturados em poli-insaturados depende da atividade de enzimas dessaturases específicas, sendo que em plantas essa conversão é realizada pelas enzimas Δ -12 e Δ -15 dessaturases, enquanto que em animais esse processo é realizado pelas enzimas Δ -6 e Δ -5 dessaturases e elongases, processo que ocorre principalmente no fígado. (INNIS, 2014; VALENZUELA et al., 2017). Diante disso, os AGs ácido linoleico (n-6) e ácido α -linolênico (n-3) são essenciais para o desenvolvimento de mamíferos, uma vez que são os precursores das cascatas enzimáticas da síntese de ácidos graxos endógena. (VALENZUELA et al., 2017).

FIGURA 1 – Cascata de produção endógena de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa n-3.



FONTE: O autor (2017).

Considerando que a dessaturação e alongação dos AGs ocorrem substancialmente pela atividade hepática, o uso de dois óleos diferentes foi elencado para identificar se os AGPIs n-3, EPA e DHA (óleo de peixe) e α -linolênico (óleo *Oro inca*) podem modular de forma diferente os eventos avaliados neste trabalho ou ainda esclarecer se nas diferentes linhagens existem mecanismos de conversão dos AGs por sistemas celulares intrínsecos empregados pelas células neurais.

1.1 OBJETIVO GERAL

Analisar os efeitos da incubação com óleo *Oro inca* ou óleo de peixe, fontes de diferentes AGPIs n-3, sobre características proliferativas, morfológicas e perfil de incorporação lipídica nas linhagens de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) e murino (Neuro-2a).

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar taxa de proliferação e viabilidade celular, parâmetros que podem sugerir modulação dos AGPIs n-3 sobre a agressividade tumoral;
- Avaliar a morfologia celular e a capacidade adesiva, parâmetros que permitem avaliar o papel desses AGPIs na redução da capacidade metastática tumoral através da contagem de prolongamentos celulares, uma vez que, quanto maior o número de prolongamentos celulares, maior a capacidade adesiva dessas células e, por conseguinte, menor a capacidade metastática;
- Avaliar o perfil de incorporação lipídica das referidas linhagens celulares e correlacioná-los com os efeitos decorrentes do tratamento com AGPIs sobre a capacidade proliferativa e as características morfológicas dessas linhagens tumorais, o que possibilita atribuir de maneira segura que tais efeitos são resultantes dos tratamentos utilizados;

1.3 JUSTIFICATIVA

Em função da agressividade do neuroblastoma humano e da taxa de prevalência desse tumor na infância (13%), a adesão dos pacientes ao tratamento convencional é um fator limitante ao sucesso terapêutico. Além disso, os efeitos colaterais dos tratamentos também são um fator muito importante e decisivo na adesão ao tratamento. A partir disso, a necessidade de identificar novas estratégias terapêuticas de fácil aplicação e reduzidos efeitos colaterais não só justifica a realização deste trabalho como também favorece o maior entendimento sobre o

comportamento tumoral destas linhagens celulares. Dessa forma, a possibilidade de utilizar AGPIs n-3 como estratégia de tratamento para esse tipo de tumor, tendo em vista a importância do papel desses compostos na composição das membranas celulares e sua relação com células do sistema nervoso central, pode representar uma alternativa clínica viável e promissora.

2 REVISÃO DA LITERATURA

De acordo com Huang e Weiss (2013), o neuroblastoma humano foi descrito em 1910 por James Wright e é assim designado devido ao fato de que tais células tumorais são associadas entre si por fibrilas, de modo que se apresentam em arranjos similares aos neuroblastos. O neuroblastoma é originado das células indiferenciadas da crista neural e é o câncer mais comum em crianças menores de um ano, sendo que cerca de 90% dos casos são diagnosticados até os cinco anos de idade. Geralmente o tumor primário localiza-se em tecidos originados do sistema nervoso simpático, medula adrenal e gânglio para-espinal. A ocorrência frequente de metástases tem sido atribuída ao fato de que esse tipo tumoral é constituído por células multipotentes que apresentam elevada capacidade migratória, fato que reduz os prognósticos de sucesso do tratamento. (HUANG e WEISS, 2013).

Com relação à agressividade do tumor, o neuroblastoma pode ser classificado em baixo, intermediário ou alto risco, sendo que os pacientes de risco baixo e intermediário apresentam cerca de 90% de chance de sobrevida, enquanto que os de alto risco apresentam apenas 50% de chance de sobrevida. Esse último tipo apresenta uma subclassificação, na qual os pacientes de muito alto risco geralmente mostram-se não responsivos à terapia. (MARIS et al., 2007 e MATTHAY et al., 2012 apud HUANG e WEISS, 2013). Dessa forma, o tratamento para estes pacientes consiste em radiação de alta intensidade, quimioterapias intensivas e de alta toxicidade, além da remoção cirúrgica da massa tumoral, mielossupressão, transplante de células tronco autólogas e imunoterapia intensiva para tratamento de manutenção. (HUANG e WEISS, 2013; WATERS et al., 2015).

Diante do exposto em relação ao neuroblastoma humano e seus aspectos epidemiológicos, é importante evidenciar que existem diversas linhas de pesquisa

que estudam e avaliam novas possibilidades de tratamento para esse tipo de câncer. Dessa forma, dentre as estratégias terapêuticas em estudo, pode-se citar mecanismos envolvidos com a biologia molecular e a regulação da expressão gênica, tratamentos alternativos e tratamentos farmacológicos combinados com tratamentos alternativos, entre outras linhas de pesquisa.

A partir disso, pode-se citar a estratégia terapêutica estudada por Lakoma e colaboradores (2015), que está relacionada com a inibição da expressão de *mouse double minute 2 homolog* (MDM2) a partir do tratamento com a molécula RG7388, também conhecida como Idanasutlin, que é um inibidor seletivo do MDM2 e antagonista do p53-MDM2. Essa estratégia se torna promissora, uma vez que o MDM2 é um repressor da atividade do p53 do tipo selvagem, logo, ao inibir o MDM2, a atividade de p53 é reestabelecida. Outro fato que corrobora com essa hipótese é o fato de que mais de 98% dos neuroblastomas diagnosticados apresenta p53 do tipo selvagem funcional. (LAKOMA et al., 2015).

Pode-se citar também o estudo realizado por Johnsen et al. (2008), que avaliou o efeito antiproliferativo de inibidores de *mammalian target of rapamycin* (mTOR) nas células de neuroblastoma humano *in vitro* e *in vivo*. Essa estratégia se mostra relevante, uma vez que o mTOR tem função importante na proliferação celular, no metabolismo e na tumorigênese, além de que proteínas que são reguladas através da sinalização por mTOR se apresentam alteradas em muitos casos de tumores humanos. Esse estudo se fundamenta no fato de que linhagens de neuroblastoma que expressam altos níveis da proteína MYCN são significativamente mais sensíveis ao tratamento com inibidores de mTOR que as que expressam níveis menores. Assim, os tumores de neuroblastoma estabilizados tratados com inibidores de mTOR *in vivo* apresentaram redução da taxa de proliferação, aumento na apoptose e inibição da angiogênese. Os resultados também demonstraram que os inibidores de mTOR realizam a diminuição da expressão gênica de ciclina D1 e da proteína MYCN *in vitro* e *in vivo*. Diante disso, os dados dos estudos apresentados pelo grupo sugerem que os inibidores de mTOR possuem eficácia terapêutica em neuroblastomas agressivos de MYCN amplificado. (JOHNSEN, et al., 2008).

Além disso, em função dos efeitos benéficos dos AGPIs n-3 (ômega-3) sobre algumas condições patológicas, tais compostos têm sido estudados como

alternativas de tratamentos para doenças inflamatórias, metabólicas, cardiovasculares, neuropsiquiátricas, neurodegenerativas e neoplasias. (CALVIELLO et al., 2013; WEYLANDT et al., 2015). Muitos trabalhos atribuem os efeitos dos AGPIs principalmente ao fato de atuarem em vias metabólicas envolvidas no processo inflamatório, modulando a produção de citocinas e mediadores lipídicos ativos que participam de algumas fases do processo inflamatório. Diante disso, deve-se ressaltar que a produção modulada de citocinas inflamatórias e mediadores lipídicos bioativos com atividade protetora constituem um ponto crucial na caracterização da patogenia de diversas doenças. Além disso, diversos estudos mostram que alguns tipos de ômega-3, como EPA e DHA, são responsáveis pela neuroproteção em células neurais. (CALVIELLO et al., 2013). Dessa forma, também é importante ressaltar que EPA e DHA são conhecidos pela sua função na produção de mediadores lipídicos anti-inflamatórios, como as protectinas e resolvinas, enquanto que o AA está relacionado à produção de prostaglandinas. (TANAKA et al., 202017).

Dentre as várias abordagens envolvendo células de neuroblastomas, o estudo realizado por Barnés et al. (2012), é de extrema relevância uma vez que se valeu da suplementação com ácidos graxos poli-insaturados n-3 em combinação com sunitinib, um inibidor de receptor tirosina-cinase de amplo espectro, para o tratamento de neuroblastoma. Esse estudo mostrou que a substituição de toda a dieta com óleo rico em ômega-3 levou à diminuição de 40 a 70% do crescimento do tumor, além de que induziu diferenças estatísticas significativas nas concentrações de diversos ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6 nos grupos tratados em comparação com o grupo controle. Além disso, o estudo também demonstrou que a dieta enriquecida com ácidos graxos poli-insaturados n-3 diminuiu a associação do tumor com células inflamatórias e foi capaz de induzir mudanças mitocondriais, as quais sugerem dano mitocondrial em tais células. A partir disso, o estudo realizado pelo grupo mostrou que o tratamento combinado de ácidos graxos poli-insaturados n-3 com sunitinib resultou na diminuição da proliferação tumoral e da densidade das microvesículas liberadas, sugerindo que ácidos graxos poli-insaturados n-3 apresentam importante potencial para tratamento complementar de neuroblastoma. (BARNÉS et al., 2012).

Existem evidências da relação entre a inflamação crônica e alguns tipos de câncer, sendo que, dentre eles estão o câncer de cérvix, cólon, bexiga, fígado,

esôfago, ovário, próstata e gástrico. (CALVIELLO et al., 2013; CALDER et al., 2015). A partir disso, alguns mediadores moleculares podem induzir o processo inflamatório e, simultaneamente, vias oncogênicas. (BONATTO et al., 2012; MOCELLIN et al., 2013; CALVIELLO et al., 2013). Além disso, ácidos graxos poli-insaturados n-3 apresentam forte ação anti-inflamatória, uma vez que são capazes de inibir o efeito da produção de eicosanoides de alto potencial inflamatório derivados do AA, bem como sua capacidade de modular a produção de citocinas e de espécies reativas de oxigênio (EROS). (CALVIELLO et al., 2013).

É importante ressaltar que a relação de balanço entre n-3 e n-6 é consequência da dieta moderna ocidental, que é enriquecida em ácidos graxos poli-insaturados n-6 devido as fontes de óleo vegetais. Esse fato propicia a elevação das taxas de ácido araquidônico no organismo e conseqüentemente a produção moléculas potencialmente inflamatórias, acentuando a prevalência de doenças crônica degenerativas não inflamatórias, como os diferentes tipos de câncer. (CHILTON et al., 2014). Diante disso, a razão de consumo entre ω -6 e ω -3 recomendada para a dieta humana é de 2:1 a 6:1, no entanto, na dieta típica essa razão de consumo chega a 15:1, o que contribui para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. (WANG et al., 2012).

Sabendo que os AGPIs n-3 atuam contrabalançando os mecanismos inflamatórios desencadeados por AGPIs n-6, evidencia-se o potencial nutracêutico dos AGPIs n-3, bem como a possibilidade de uso desses compostos como novos tratamentos e na melhoria de diversos parâmetros da saúde humana. Diante disso, linhagens neurais como a SH-SY5Y (neuroblastoma humano) e Neuro-2a (neuroblastoma murinho) têm representado um modelo celular importante para investigações a cerca do papel que os AGPIs exercem sobre características de células tumorais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos referentes a este trabalho foram realizados na UFPR, no Laboratório de Metabolismo Celular, Sala 107 e Sala de Cultivo Celular do Departamento de Fisiologia da UFPR, ambos situados no Departamento de Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, Centro Politécnico, UFPR, Curitiba, PR.

3.1 CULTIVO CELULAR

As células da linhagem SH-SY5Y foram cultivadas em meio DMEM com antibiótico (penicilina e estreptomicina 0,1% - ATB) e suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB) desde o descongelamento das células até o momento antecedente a realização dos experimentos, enquanto que as células da linhagem Neuro-2a foram cultivadas em meio DMEM com antibiótico (penicilina e estreptomicina, 0,1% - ATB) e suplementado com 10% de SFB até a realização dos experimentos. Para o procedimento de subcultivo, as células foram primeiramente lavadas com Tampão Fosfato Salino pH 7,4 (*Phosphate-Buffered Saline* - PBS), depois tripsinizadas (0,25%) por cerca de um minuto em incubadora 37°C e 5% de CO₂ e por fim, foram transferidas para as novas placas com meio DMEM devidamente suplementado com ATB e SFB.

3.2 EMULSÃO DE ÓLEO DE PEIXE E ÓLEO *Oro inca*

As emulsões de óleo de peixe e óleo *Oro inca* (soluções estoque) foram preparadas pela formação de um complexado de óleo em 2% de albumina bovina sérica (BSA) diluído em meio DMEM suplementado com 10% de SFB e penicilina e estreptomicina 0,1% (ATB), a uma razão de 1:10.

Primeiramente, para o preparo das emulsões foi necessário produzir a solução veículo, que consistiu na diluição de 2% de BSA em meio DMEM suplementado com 10% de SFB e 0,1% de ATB. Dessa forma, essa solução veículo foi delicadamente homogeneizada até que não restassem grumos e depois foi filtrada em seringa estéril acoplada ao filtro para seringas com membrana de 0,22µm para esterilização e acondicionadas em freezer -20°C para posterior preparo das emulsões com os óleos de tratamento. Diante disso, a solução veículo foi composta por BSA 2% para que o óleo pudesse se complexar com a albumina e realizar um equilíbrio entre moléculas ligadas à albumina e moléculas livres, para que, assim, as células pudessem recrutar os AGPIs presentes nos meios suplementados com os

tratamentos e mobilizá-las para a incorporação nas membranas. A partir disso, após o preparo da solução veículo, no dia anterior aos experimentos, foram preparadas as emulsões de óleo de peixe e óleo *Oro inca*, de maneira que foi adicionado óleo à solução veículo em uma razão de 1:10, como por exemplo, para produzir 10mL de emulsão, adicionou-se 1mL de óleo a 9mL de solução veículo com BSA 2%. As emulsões de óleo de peixe e de óleo *Oro inca* foram preparadas cada uma em seu tubo estéril devidamente identificado e posteriormente vedada com *parafilm* para a agitação. Assim, as emulsões foram mantidas sob agitação em câmara fria *overnight* (Período que equivale a 12-18 horas) para que, com a agitação a suave, os AGPIs pudessem se complexar ao BSA e, sob baixa temperatura, evitar o decaimento lipídico. As emulsões foram preparadas o mais próximo possível dos experimentos para evitar o decaimento lipídico. As diluições para os tratamentos dos grupos experimentais (soluções de trabalho 1:10, 1:20 e 1:50) foram preparadas de maneira seriada, a partir da solução estoque pela adição do volume complementar de meio DMEM com antibiótico 0,1% e 10% SFB. Dessa forma, também foram realizadas alíquotas das emulsões para os próximos experimentos que estavam programados para datas próximas, de maneira que tais alíquotas foram acondicionadas em ultra freezer -80°C para evitar o decaimento dos lipídios.

É importante ressaltar também que todos os procedimentos para o preparo das emulsões foram realizados em fluxo laminar para garantir a esterilidade dos tratamentos. Para a coleta do óleo de peixe, realizada em fluxo laminar, foram utilizadas seringas e agulhas estéreis para a extração do óleo que já vem estéril dentro das cápsulas, de maneira que as cápsulas foram limpas com álcool 70% e depois foi extraído o óleo de dentro delas e acondicionados em microtubos estéreis. Por outro lado, como o óleo *Oro inca* não vem em cápsulas estéreis, mas sim em vidros grandes, foi necessário filtrá-lo, em fluxo laminar, com seringa estéril acoplada ao filtro de seringa com membrana de 0,22µm para esterilização do óleo, que foi acondicionado em tubo estéril e posteriormente vedado com *parafilm*. Após a coleta dos óleos, eles foram guardados em ultra freezer -80°C para evitar o decaimento lipídico.

3.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para a realização dos experimentos as células foram contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas nas densidades correspondentes para as diferentes abordagens. Foram estabelecidos os seguintes grupos experimentais:

- Controle: constituído por células que foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% SFB e 0,1% penicilina e estreptomicina 0,1% (ATB);
- Controle BSA: constituído por células que foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% SFB e 0,1% ATB acrescido de 2% de BSA (da solução veículo utilizada para a composição das emulsões de tratamento) em uma diluição de 1:10. Esse grupo foi estabelecido como controle do efeito do BSA sobre comportamento celular, uma vez que os óleos foram complexados em BSA;
- OP 1:10; OP 1:20 e OP 1:50 : Esses grupos foram constituídos por células que foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% SFB e 0,1% ATB acrescido da emulsão de óleo de peixe em uma das diluições: 1:10, 1:20 e 1:50;
- OI 1:10, OI 1:20 e OI 1:0 : Esses grupos são constituídos por células que foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% SFB e 0,1% ATB acrescido da emulsão de óleo *Oro inca* em uma das diluições: 1:10, 1:20 e 1:50.

3.4 PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE CELULAR

Para avaliação de proliferação e viabilidade celular as células foram plaqueadas em placas de 96 poços na densidade de 1×10^5 células por poço (para linhagem SH-SY5Y) ou 1×10^4 células por poço (para linhagem Neuro-2a), sendo que para cada grupo foram estabelecidas 5 e 11 replicatas para cada tempo de tratamento (24, 48 e 72 horas), para a linhagem SH-SY5Y e Neuro-2a, respectivamente. Diante disso, essa diferença de densidade de células por poço e de número de replicatas por grupo se deve ao fato de que a linhagem celular SH-SY5Y apresenta características de cultivo diferentes da linhagem Neuro-2a, de maneira que a linhagem SH-SY5Y é mais sensível e demora mais tempo para expandir, características que limitam o seu uso em protocolos que exigem grandes números celulares. Após o plaqueamento as células foram acondicionadas em incubadora a 37°C e 5% de CO₂ durante 24 horas para adesão e após esse período o meio foi substituído por meio contendo os óleos complexados para os tratamentos

nas suas respectivas diluições por grupo experimental (1:10, 1:20 e 1:50) e foi adicionado o indicador metabólico Alamar Blue em uma diluição de 1:10. Para avaliação da proliferação e viabilidade celular foram realizadas leituras em 24 horas, 48 horas e 72 horas em espectrofotômetro (570nm e 600nm). Dessa forma, como um indicador metabólico, o Alamar Blue possibilita a avaliação da taxa de proliferação e da viabilidade celular através do método colorimétrico, uma vez que no início, se apresenta azul escuro (próximo ao roxo) e, com a proliferação celular e metabolização dos nutrientes do meio, se torna rosa vivo. A partir das leituras realizadas em espectrofotômetro foram realizados os cálculos para obtenção das taxas de proliferação celular. Todos os procedimentos foram realizados em fluxo laminar. Além disso, todas as leituras foram realizadas no mesmo horário em todos os dias de tratamento.

3.5 MORFOLOGIA CELULAR

Para os experimentos de morfologia celular as células foram plaqueadas em placas de 6 poços com 1×10^4 células por poço, sendo que cada grupo teve duas replicatas para cada tempo de tratamento (24, 48 e 72 horas). Para esse experimento, as células foram plaqueadas concentradas no centro de cada poço para melhorar as condições para as imagens dos experimentos. Dessa forma, as células foram plaqueadas em gotas no centro de cada poço, acondicionadas em incubadora 37°C e 5% de CO₂ por 3 a 4 horas para adesão e foi completado delicadamente o meio DMEM suplementado com 10% SFB e 0,1% ATB e, posteriormente, as células foram acondicionadas em incubadora 37°C e 5% de CO₂ novamente para adesão até completar 24 horas do plaqueamento. Após esse período, o meio foi substituído por meio contendo os óleos complexados nas suas respectivas diluições por grupo experimental. Ao final de cada período de incubação, as células foram lavadas com PBS para retirada total dos tratamentos, posteriormente foram fixadas com 1mL de solução paraformaldeído (PFA) 4% durante 10 minutos, depois da retirada do PFA 4% foram adicionados 1mL de metanol 2% durante 10 minutos em cada poço para permeabilizar as membranas celulares e, por fim, foram coradas com 1mL de solução cristal violeta em metanol (20% v/v) durante 10 minutos e lavadas delicadamente em água corrente até que não soltassem mais corante. Após a lavagem foi adicionado 1mL de PBS em cada poço

para que as células não ressecassem durante a retirada das fotos. Ao final do processo, as células foram fotografadas em microscópio de luz para a análise morfológica. Além disso, a inativação dos tratamentos e as colorações foram realizadas todas no mesmo horário em todos os dias de tratamento.

Nesse caso, para esse experimento, não há necessidade de diferença de densidade celular entre as linhagens utilizadas em função do número reduzido de células exigido para a realização do protocolo. Todos os procedimentos foram realizados em fluxo laminar, exceto a partir da etapa de fixação com PFA 4%, que não exige mais a esterilidade das células para a retirada de fotos no fotomicroscópio.

3.6 PERFIL LIPÍDICO E CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

O perfil lipídico celular foi avaliado de acordo com Naliwaiko *et al* (2004). Para esse experimento as células foram plaqueadas numa densidade de 1×10^5 células por placa P100 para que atingissem 1×10^6 células por placa até o tratamento de 72 horas. Diante disso, esse experimento não foi realizado com a linhagem SH-SY5Y em função das suas condições específicas de cultivo, de maneira que foi realizado apenas com a linhagem Neuro-2a. Após o plaqueamento as células foram acondicionadas em incubadora 37°C e CO₂ 5% para adesão à placa. Diante disso, após esse período, o meio foi substituído por meio contendo os óleos complexados nas suas respectivas diluições por grupo experimental. A partir disso, após cada tempo de tratamento as células foram lavadas com PBS (a partir dessa etapa, não precisa mais ser realizado em fluxo laminar) para retirada total do tratamento e foi adicionado 1mL de PBS em cada placa para a realização da coleta das células, que se deu a partir da manipulação delicadamente de um rodinho de células para coleta dessas amostras. Após a retirada total das células das placas com o auxílio do rodinho, foi coletado o 1mL de PBS contendo as células a transferido para um microtubo. A partir disso, as células foram centrifugadas em *spin* por 5 minutos e foi retirado o sobrenadante de PBS, restando apenas o *pellet* de células no microtubo, que foi devidamente identificado e acondicionado em ultra freezer -80°C até a

realização da extração lipídica para a detecção em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Além disso, a inativação dos tratamentos e as coletas das amostras foram realizadas todas no mesmo horário em todos os dias de tratamento. A extração lipídica das amostras celulares (1×10^6) foi realizada de acordo com o método de Folch (1957). Lipídios totais, provenientes da extração das membranas celulares foram saponificados em solução NaOH 0,5M em metanol (90% v/v), e extraídos em três lavagens de hexano, de 1mL cada, e posteriormente evaporados em fluxo de nitrogênio gasoso. Para derivatização, os ácidos graxos foram ressuspensos em 100 μ l de acetonitrila e incubados com bromometoxi-coumarina (1mg/mL), a 60°C durante 15 minutos, para possibilitar a detecção em cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC). Os ácidos graxos derivatizados foram injetados em cromatógrafo líquido Varian Pró-Star e separados em coluna de sílica C8, com partícula interna de 5 μ m de poro de saída de 100Å. A eluição aconteceu pela injeção de fase móvel em gradiente isocrático de acetonitrila e água (77/23 – v/v). Uma vez eluídos, os ácidos graxos foram detectados em detector de fluorescência, com excitação em 325nm e emissão em 398nm.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Dados foram expressos como média \pm EPM de três experimentos independentes, submetidos a Análise de Variância (ANOVA) seguido de pós-teste de Tukey. Tratamento estatístico e elaboração dos gráficos foram desenvolvidos pelo emprego do *software* GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA.). Foram considerados estatisticamente significativas, diferença com $p \leq 0.05$.

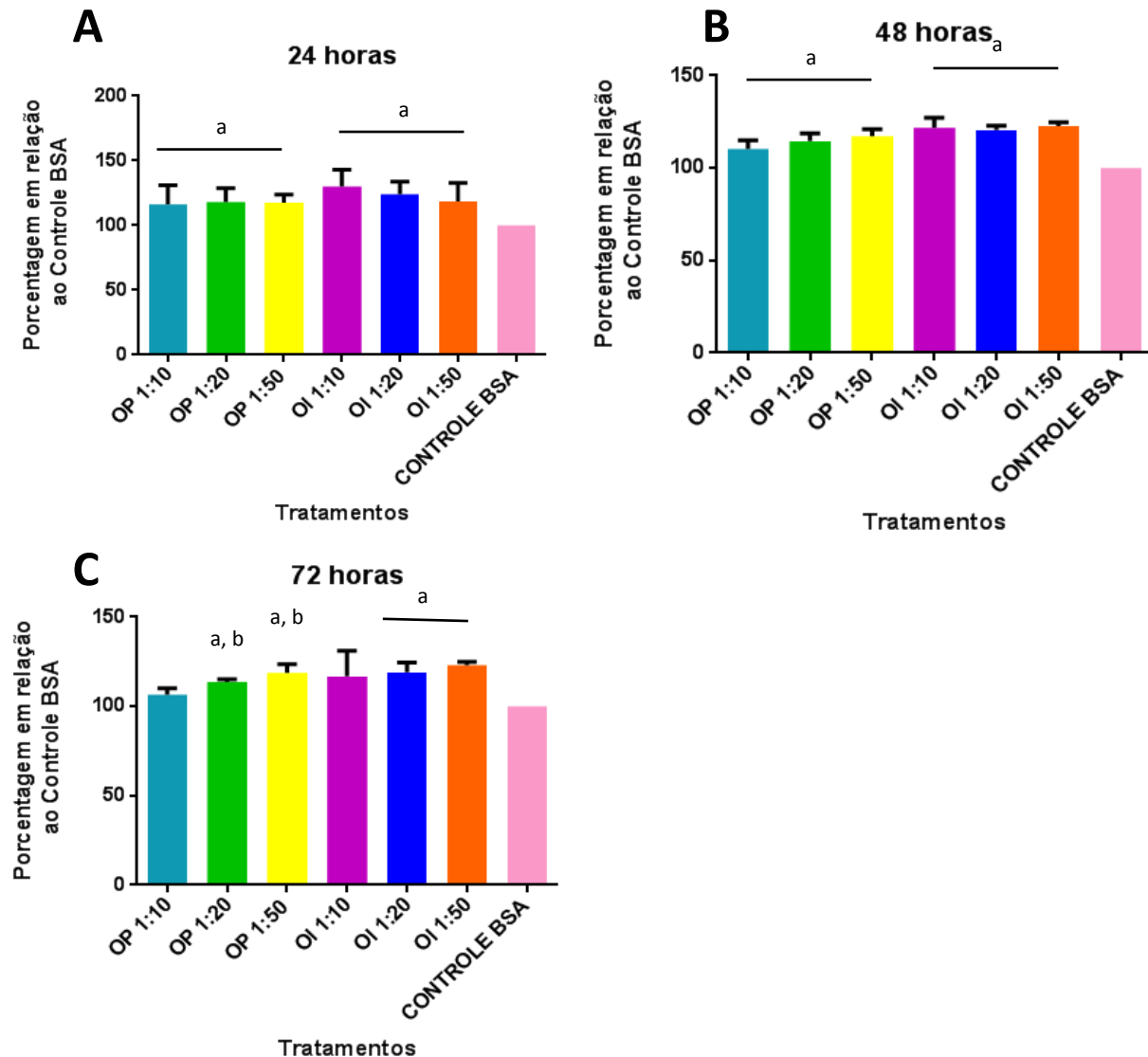
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE CELULAR

De acordo com os dados obtidos nos experimentos de proliferação e viabilidade celular, realizados com o método de absorbância em 570nm e 600nm

com o indicador metabólico Alamar Blue, os AGPIs n-3 provenientes tanto do óleo de peixe quanto do óleo *Oro inca* são capazes de modular proliferação celular das linhagens celulares estudadas. Os resultados apresentados na Figura 2 revelam que na linhagem Neuro-2a ocorreu aumento da proliferação no grupo OP 1:10 quando comparado ao controle BSA nas primeiras 24 horas (16,4%) e que esse aumento se torna menos pronunciado ao longo do tempo de exposição para 10,3 % em 48 horas e 6,5% em 72 horas de tratamento, o que sugere que ao longo do tempo a funcionalidade das vias de proliferação podem ter sido mobilizadas para diferenciação celular, uma vez que a taxa de proliferação celular deixa de aumentar progressivamente em função do tempo de tratamento. No grupo OP 1:20 foi observado um efeito semelhante, com aumento da taxa de proliferação celular de 18,1% em 24 horas, 14,6% em 48 horas e 13,6% em 72 horas quando comparados ao grupo controle BSA, enquanto que no grupo OP 1:50 houve aumento da taxa de proliferação de 17,6% em 24 horas, 17,3% em 48 horas e 18,7% em 72 horas, quando comparados ao grupo controle BSA, de maneira que mostra um *boom* de crescimento sem nenhuma redução da taxa de proliferação celular ao longo do tempo de tratamento. Dessa forma, sugere-se que o óleo de peixe é capaz de modular a proliferação celular e pode estar relacionado à indução de processos de diferenciação celular após tratamento com AGPIs durante 72 horas na linhagem Neuro-2a, principalmente na concentração de 1:10 (10%).

FIGURA 2: Proliferação e viabilidade celular da linhagem Neuro-2a após tratamento com emulsão de óleo de peixe e de óleo *Oro inca* durante 24 (A), 48 (B) e 72 (C) horas.



Dados representam médias \pm EPM para três experimentos independentes. a vs Controle BSA; b vs OP 1:10.

FONTE: O autor (2017).

Os efeitos do tratamento com óleo de peixe e com óleo *Oro inca* são semelhantes na linhagem Neuro-2a, sendo que os efeitos do tratamento com óleo *Oro inca* parecem mais pujantes. Pode-se observar que, quando comparados com o controle BSA, o grupo OI 1:10 também sofre modulação das vias de proliferação e diferenciação celular pelo comportamento semelhante ao tratamento com óleo de peixe. A taxa de proliferação do grupo OI 1:10 foi 30,1% maior em 24 horas, 21,8% em 48 horas e 16,9% em 72 horas e o grupo OI 1:20 apresentou aumento da taxa de proliferação celular de 24% em 24 horas, 20,6% em 48 horas e 19,2% em 72

horas quando comparados ao controle BSA. Curiosamente, de maneira contrária, o grupo OI 1:50 apresentou aumento de 18,6% na proliferação nas primeiras 24 horas com aumento em 48 horas (22,7%) e em 72 horas (23%), o que sugere que nessa diluição o óleo *Oro inca* deve atuar somente sobre as vias de proliferação celular, o que provoca o *boom* de crescimento sem que ocorra nenhum evento de desaceleração da proliferação celular ao longo do tempo de tratamento.

De acordo com a literatura, os AGPIs n-3 são capazes de regular o desenvolvimento cerebral por neuroproteção e, sugere-se que esse efeito ocorre de maneiras diferentes em cada linhagem celular, de maneira que podem envolver regulação da apoptose, do estresse oxidativo e da própria diferenciação celular. (CALVIELLO et al., 2013). Assim, os dados de proliferação celular encontrados para a linhagem Neuro-2a na abordagem desse estudo podem estar relacionados à neuroproteção decorrente da incorporação de DHA na membrana celular, de maneira que os AGPIs advindos do tratamento não induzem redução da taxa de proliferação celular ou morte celular, mas sim aumento da taxa de proliferação celular e uma possível diferenciação celular. Deve-se ressaltar que o aumento da taxa de proliferação dessa linhagem celular, bem como a possível indução da diferenciação celular decorrente do tempo de tratamento podem ser resultantes desse papel neuromodulador do DHA, especialmente na linhagem N2a (CALVIELLO et al., (2013), e do importante papel do DHA na composição das membranas celulares e do próprio tecido cerebral, uma vez que esse AG é essencial para o desenvolvimento do SNC e é requerido em grandes quantidades nos estágios iniciais do desenvolvimento. (FAROOQUI et al., 2000; BROADHUST et al., 2002; HORROCKS & FAROOQUI, 2004). Dessa forma, são necessários estudos futuros que confirmem a indução de diferenciação celular e, caso se seja confirmado, que verifiquem quais os efeitos e importância desse processo no prognóstico de tratamento desse tipo de tumor.

Com relação à linhagem SHSY-5Y (Figura 3), foi identificado o aumento mais pronunciado da taxa de proliferação nas primeiras 24 horas e menor taxa de aumento em 48 e 72 horas em todas as diluições de óleo de peixe empregadas (OP 1:10, OP 1:20 e OP 1:50). Para a diluição 1:10, detectou-se aumento da taxa de proliferação celular de 15,7% em 24 horas, 14,45% em 48 horas e 13,65% em 72 horas. Para a diluição OP 1:20 o aumento da taxa de proliferação celular foi de

26,05% em 24 horas, 22,5% em 48 horas e 20,35% em 72 horas. Por fim, a diluição OP 1:50 apresentou aumento da taxa de proliferação mais expressivo: 36,95% em 24 horas, 29,4% em 48 horas e 26,14% em 72 horas. De maneira semelhante, o tratamento com óleo *Oro inca* também induz o aumento da taxa de proliferação celular na linhagem SHSY-5Y, mas de forma mais pronunciada. No grupo OI 1:10 a taxa de proliferação celular foi a mais elevada, quando comparado às demais diluições, alcançando 42,65% em 24 horas, 32,65% em 48 horas e 27,15% em 72 horas. No grupo OI 1:20 a taxa de proliferação celular sofreu aumento de 38,15% em 24 horas, 33,3% em 48 horas e 28,6% em 72 horas. Curiosamente a incubação com a diluição OI 1:50 produziu aumento da taxa de proliferação quando comparado ao controle BSA, mas não de forma tempo dependente (30,35% em 24 horas, 32% em 48 horas e 31% em 72 horas).

Além disso, estudos apontam que EPA e DHA apresentam inúmeros mecanismos no tratamento contra o câncer (MOCELLIN et al., 2013), de maneira que tais efeitos não estão relacionados apenas com a atividade anti-inflamatória desses AGs, mas também com a inibição da progressão de alguns tipos de tumor, o que os torna mais sensíveis a diversos tipos de drogas utilizadas no tratamento contra o câncer e à radioterapia. (CALVIELLO et al., 2013; MOCELLIN et al., 2013). A partir disso, estudos demonstram também que esses AGs apresentam atividade imunomodulatória (MOCELLIN et al., 2013) e que podem modificar o perfil de ácidos graxos de diversos tipos celulares, dentre eles, das células inflamatórias e das células imunes. (BONATTO et al., 2012). Dessa forma, apesar de ser divergente aos resultados encontrados nesse estudo, existem evidências na literatura de que os AGPIs n-3 empregados nesse estudo são capazes de reduzir o crescimento tumoral em células de neuroblastoma humano, conforme mostrado no estudo de Barnés e colaboradores (2011). No referido estudo, DHA e AA apresentaram atividade relacionada à diminuição da proliferação tumoral, de forma dose-dependente. Diante disso, é preciso considerar algumas diferenças entre os estudos: foi desenvolvido com células de neuroblastoma humano (SK-N-SH) de linhagem diferente da utilizada nesse estudo (SH-SY5Y) e a fonte de AGPIs n-3 utilizada foi uma fonte vegetal (óleo de coco), o que deve acarretar no aumento da disponibilidade de ALA. Nesse mesmo estudo foi relatado também o efeito do tratamento com sunitinib associado à suplementação alimentar com AGPIs n-3 e a redução de 40-70% do crescimento

tumoral. (BARNÉS et al., 2011). Diante disso, deve-se considerar as diferenças intrínsecas ao modelo celular *in vitro* e o modelo *in vivo*, além das particularidades de cada linhagem celular e da fonte de AG utilizada para a suplementação.

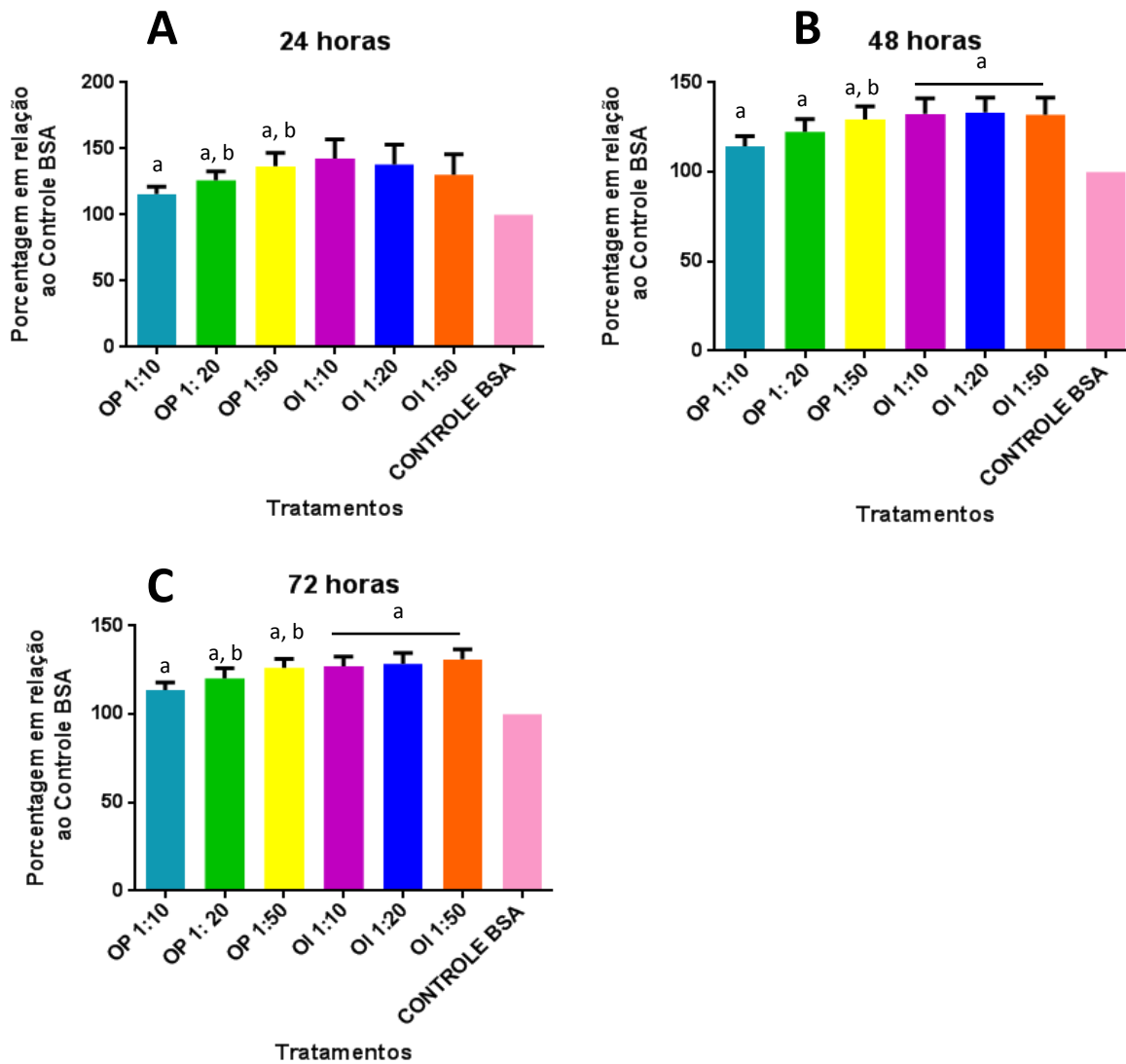
A partir disso, também pode-se citar o estudo realizado por So e colaboradores, que realizaram o tratamento de células de neuroblastoma humano da linhagem LA-N-1 com os AGPIs EPA, DHA e ALA. Nesse estudo, foi demonstrado que tais AGPIs são capazes de reduzir o crescimento tumoral, sendo que EPA e DHA apresentam efeito mais pronunciado nessa linhagem que o ALA. Dessa forma, nesse estudo foi demonstrado também que esses AGPIs atuam sobre o ciclo celular e são capazes de induzir apoptose na linhagem celular estudada. Dessa forma, os autores sugerem que EPA e DHA são potentes agentes anti-tumorais e que podem ser utilizados como adjuvantes no tratamento de neuroblastoma humano. (SO et al., 2015). Diante disso, é importante ressaltar que a divergência dos resultados do estudo de So e colaboradores e dos resultados desse estudo podem estar relacionados à fonte de suplementação, diferença de linhagens celulares e diferença de metodologia empregada, bem como a diferença dos parâmetros analisados. Dessa forma, deve-se ressaltar a necessidade de realização de estudos futuros que confirmem os resultados encontrados nesse trabalho e que elucidem quais são e por quais mecanismos ocorrem esses efeitos.

Dessa forma, também pode-se citar o estudo realizado por Polavarapu e colaboradores, que avaliaram os efeitos do tratamento com AGPIs e seus metabólitos (prostaglandinas e leucotrienos) sobre células de neuroblastoma humano (IMR-32) e seus efeitos em combinação com a bleomicina. Segundo dados do grupo, o tratamento com AGPIs n-3 levou ao aumento da inibição do crescimento induzida pela bleomicina na linhagem de neuroblastoma estudada. O grupo demonstrou também que o tratamento com AGPIs, dentre eles ALA, EPA e DHA, são capazes de reduzir a proliferação celular na linhagem IMR-32 de neuroblastoma humano em 24 horas de tratamento. A partir disso, os autores enfatizam também a importância do uso de AGPIs como adjuvantes para o tratamento de diversos tipos de câncer, uma vez que resultados de diversos grupos de pesquisa mostram que os AGPIs são capazes de potencializar os efeitos dos tratamentos contra diversos tipos de câncer. (POLAVAPARU et al., 2014).

Células tumorais são conhecidamente células com elevada taxa de proliferação celular, de forma que diversos estudos têm abordado o efeito de AGPIs n-3 sobre características de células tumorais. Iagher e colaboradores (2013), demonstraram a atividade antitumoral e de anti-caquexia do óleo de peixe e do óleo de fígado de tubarão, ambos ricos em AGPIs n-3, sobre a proliferação de células do Tumor de Walker 256. Nesse estudo o óleo de peixe induziu redução da taxa de crescimento tumoral mais efetivamente que o óleo de fígado de tubarão (IAGHER et al., 2013). Curiosamente nossos resultados sugerem o efeito proliferativo inicial com elevações menos pronunciadas e mais lentas ao longo do tempo. Dessa maneira, deve-se considerar também que os diferentes efeitos da suplementação com AGPIs n-3 se devem aos diferentes tipos celulares, suas origens, estágios de diferenciação celular e composição das membranas, bem como do tecido que compõem. Nesse sentido, uma vez que nossos resultados divergem da literatura quanto à taxa de proliferação celular após o tratamento com AGPIs, podemos sugerir que a diferença no efeito dos AGPIs n-3 sobre linhagens de células tumorais pode ser resultado da maturidade das células empregadas e pelo fato de que durante o desenvolvimento cerebral as células do SNC apresentam relativa necessidade de AGPIs para composição do tecido cerebral, tornando o DHA um AG de papel essencial para o desenvolvimento do SNC, bem como da diferenciação celular.

Diante de todos os dados encontrados nesse estudo e dos dados existentes na literatura acerca do tema, é necessário realizar estudos futuros que elucidem quais são os efeitos do tratamento com AGPIs n-3 sobre células neurais e quais os mecanismos envolvidos nesses efeitos. Dessa maneira, sugere-se uma análise mais aprofundada dos efeitos desses compostos nas células neurais e em tumores originados de células neurais em função do papel essencial dos AGPIs n-3 na formação e funcionalidade do SNC.

FIGURA 3: Proliferação e viabilidade celular da linhagem SH-SY5Y após tratamento com emulsão de óleo de peixe e de óleo *Oro inca* durante 24 (A), 48 (B) e 72 (C) horas.



Dados representam médias \pm EPM para três experimentos independentes. a vs Controle BSA, b vs OP1:10.

FONTE: O autor (2017).

4.2 PERFIL DE INCORPORAÇÃO LIPÍDICA E CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Para uma correlação segura entre os efeitos encontrados e a incorporação dos ácidos graxos nas membranas celulares, o perfil lipídico foi analisado. Em função de características da linhagem celular SH-SY5Y que dificultam o seu cultivo *in vitro*, como a proliferação lenta, torna-se menos viável o uso de amostras com grandes números celulares, como o exigido no experimento de incorporação lipídica e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Em função disso, como as respostas à suplementação com AGPIs das duas linhagens de neuroblastoma estudadas são semelhantes nos experimentos de proliferação e viabilidade celular, a linhagem Neuro-2a substitui a linhagem SH-SY5Y e foi utilizada para representar os dados.

De acordo com as tabelas abaixo, a incorporação lipídica na linhagem Neuro-2a sugere que os efeitos observados nos experimentos de proliferação e viabilidade celular podem ser decorrentes do tratamento com os AGPIs n-3 advindos dos óleos de peixe (Tabela 1) e *Oro inca* (Tabela 2).

A detecção de concentrações mais elevadas de AGPIs n-3 nas primeiras 24 horas, quando comparado ao controle BSA, revela que a forma como a emulsão foi preparada constituiu uma abordagem eficiente na transferência de AGPIs em meio aquoso. No decorrer de 48 e 72 horas pode-se perceber o decaimento nas concentrações de AGPIs n-3, quando comparados às concentrações em 24h. Esta observação sugere que realmente ocorreu mobilização dos AGPIs das membranas para atuação enquanto mediadores intracelulares, uma vez que estes dados podem ser correlacionados com o aumento da proliferação celular no mesmo período.

A partir disso, nas amostras incubadas com óleo de peixe pode-se observar que a taxa de incorporação de EPA é mais alta em 24 horas e decai em 48 e 72 horas, o que sugere a mobilização desse AGPI para a conversão em DHA para posterior utilização como mediador celular. Além disso, nessas amostras a incorporação de DHA aumenta em 48 horas e decai em 72 horas, o que também corrobora com a hipótese da conversão de EPA em DHA para utilização pelas células. Dessa forma, o decaimento progressivo de EPA ao longo do tempo de tratamento e o aumento de DHA em 48 horas e o subsequente decaimento em 72 horas confirmam que os AGPIs n-3 provenientes do tratamento foram mobilizados

pelas células e utilizados como mediadores intracelulares, de maneira que pode-se atribuir os resultados dos experimentos de proliferação e viabilidade celular à incorporação e metabolização desses AGPIs pelas células.

De maneira semelhante, ocorreu o aumento da concentração de EPA e DHA com o passar do tempo nas amostras incubadas com óleo *Oro inca*, o que sugere que a linhagem Neuro-2a pode apresentar mecanismos de conversão do ácido graxo essencial ALA em EPA e DHA. Diante disso, é possível observar que a taxa de incorporação de ALA atinge um platô em 48 horas e decai em 72 horas, o que sugere que esse composto foi mobilizado pelas células e utilizado por mecanismos intracelulares em cascatas de proliferação celular ou convertido em EPA e DHA pela cascata de dessaturação e alongação endógena. Diante disso, a taxa de incorporação de EPA, detectada apenas a partir de 48 horas sugere a conversão de ALA em EPA. Da mesma forma, a detecção de DHA sugere a conversão do EPA em DHA para utilização em mecanismos celulares. Em função disso, sugere-se que as células da linhagem Neuro-2a pode apresentar mecanismos intrínsecos de conversão de ALA em EPA e DHA para mobilização e uso em mecanismos celulares, de maneira que pode-se atribuir os resultados dos experimentos de proliferação e viabilidade celular à incorporação e metabolização desses AGPIs pelas células. Dessa forma, deve-se considerar que ALA não é apontado como ácido graxo determinante do desenvolvimento do SNC, diferente do que é postulado para EPA e DHA. Dessa forma, a atividade hepática é essencial para a conversão desses AGs no organismo, uma vez que o fígado responde pela conversão majoritária desses compostos, além de que a atividade das enzimas Δ -6 e Δ -5 dessaturases é regulada por hormônios, principalmente pela regulação positiva mediada por insulina. (VALENZUELA et al., 2017). A partir disso, também é importante considerar que a enzima Δ -6 dessaturase é a enzima limitante do processo de conversão de AGs endógena e que a redução da atividade tanto da enzima Δ -6 quanto da Δ -5 dessaturase esta relacionada a algumas patologias humanas. (VALENZUELA et al., 2017). Além disso, como a cascata de dessaturação e alongação de AGPIs endógena ocorre no fígado e nos astrócitos no SNC, torna-se necessário verificar quais são os possíveis mecanismos pelos quais o ALA pode ser convertido em EPA e DHA nessas células.

Dessa forma, de acordo com a literatura, o óleo *Oro inca* apresenta composição proteica (27 a 33%) e oleosa (35 a 60%), tendo em vista que 48,61% da

fração oleosa é composta por ω -3 e 36,8% é composta por ω -6. Além disso, 50% do ω -3 presente no óleo *Oro inca* é de ALA e 35% é de LA. (WANG et al., 2012). Diante disso, esse óleo tem sido relacionado ao tratamento de hipercolesterolemia, no entanto, ainda não existem estudos aprofundados que correlacionem esse óleo ao tratamento de outras patologias. (NASCIMENTO et al., 2013). A partir disso, evidencia-se a necessidade de investigar quais os reais efeitos e o potencial terapêutico do óleo *Oro inca* em outras patologias, sejam elas relacionadas ao câncer ou não. Nesse caso, os resultados obtidos nesse estudo acerca da atividade do óleo *Oro inca* no tratamento de neuroblastoma humano se mostram importantíssimos para corroborar com a elucidação dos efeitos decorrentes do uso desse óleo.

A partir disso, os resultados da CLAE encontrados nesse trabalho mostram que a suplementação nas concentrações de 1:10, 1:20 e 1:50 são suficientes para alterar o perfil de incorporação lipídica da linhagem Neuro-2a e para induzir efeitos sobre a proliferação celular nessa linhagem tumoral. A partir disso, como outros estudos sugerem, a incorporação de ácidos graxos com insaturações pode estar relacionada com os mecanismos de ação desses compostos na resposta inflamatória e modulação do sistema imune. (MOCELLIN et al., 2013).

Dessa forma, também pode-se citar o estudo realizado por Iagher e colaboradores, que analisaram os efeitos do tratamento de ratos portadores de tumor de Walker 256 com óleo de peixe e óleo de fígado de tubarão. Dessa forma, a partir dos resultados obtidos pelo grupo é possível atribuir os efeitos de anti-caquexia e de redução do crescimento tumoral aos tratamentos com AGPIs, uma vez que os perfis de incorporação lipídica dos grupos de tratamento confirmam que tais compostos foram mobilizados pelas células tumorais e utilizados por vias e mecanismos celulares. (IAGHER et al., 2013).

Além disso, também é possível citar o estudo de Bonatto e colaboradores, que investigaram os efeitos do tratamento com óleo de peixe sobre a atividade do sistema imune de pacientes com câncer que realizaram tratamento com quimioterapia. Dessa forma, como os quimioterápicos reduzem a atividade do sistema imune e, por consequência, expõem os pacientes que fazem esse tipo de tratamento ao risco de infecções, o tratamento com óleo de peixe após a quimioterapia pode estar relacionado à melhora do prognóstico dos pacientes

tratados. Diante disso, nesse trabalho os dados de incorporação lipídica das células polimorfonucleadas após o tratamento com óleo de peixe mostram que os efeitos encontrados estão relacionados com a suplementação com AGPIs. Também é possível observar que após oito semanas de tratamento, a taxa de incorporação de EPA e DHA aumentou significativamente, enquanto que a taxa de incorporação de ácido araquidônico diminuiu significativamente, o que mostra a mobilização e a atividade desses AGPIs no tratamento desses pacientes. (BONATTO et al., 2011).

A partir disso, também é possível citar o estudo de Valenzuela e colaboradores, que avaliaram o perfil lipídico do leite materno de mulheres que receberam suplementação com ALA durante a gestação. Nesse estudo foi enfatizada a importância da suplementação com AGPIs n-3 durante a gestação, uma vez que esses compostos são essenciais para o desenvolvimento embrionário e formação do SNC. Dessa maneira, o grupo utilizou o óleo de Chia (*Salvia hispanica L.*) para a suplementação das gestantes, tendo em vista que esse óleo apresenta elevada concentração (60 a 65%) de ALA em sua composição. Diante disso, o grupo também enfatizou a importância do EPA na produção de eicosanoides, que apresentam atividade anti-inflamatória e efeitos regulatórios sobre a atividade do endotélio vascular, e do DHA, que é transportado pela placenta durante a gestação e é direcionado para o desenvolvimento do SNC, de maneira que esta relacionado com a funcionalidade cerebral e do tecido visual (VALENZUELA et al., 2015) e proteção do sistema nervoso central e periférico. (VALENZUELA et al., 2017). Os resultados de cromatografia gasosa encontrados pelos pesquisadores mostraram que a suplementação com óleo de chia foi capaz de alterar o perfil lipídico eritrocitário das gestantes, de maneira que a incorporação de EPA, DHA e ALA aumentou após a suplementação. Dessa forma, a suplementação com AGPIs n-3, nesse caso com ALA, o precursor da cascata de dessaturação e alongação endógena de AGPIs n-3, proporciona incorporação de maiores quantidades desses compostos, que são essenciais para o desenvolvimento embrionário e formação do SNC. (VALENZUELA et al., 2015).

TABELA 1: Perfil de incorporação lipídica em células da linhagem Neuro-2a após incubação com emulsão de óleo de peixe (OP).

	24h				48h				72h			
	Controle BSA	OP 1:10	OP1:20	OP1:50	Controle BSA	OP 1:10	OP1:20	OP1:50	Controle BSA	OP 1:10	OP1:20	OP1:50
EPA	ND	10,752 ^a	1,750 ^b	1,726	ND	9,219 ^a	3,278 ^{a,b}	1,831	ND	8,677 ^a	3,926 ^{a,b}	2,143
DHA	2,624	5,749	3,340 ^b	3,290 ^b	0,325	12,465 ^a	7,030 ^{a,b}	0,310	ND	2,968 ^a	7,638 ^{a,b}	5,712
MIRISTICO	11,805	12,874	14,183	15,888	13,525	12,069	10,456	5,755 ^{a,b,c}	4,529	12,569	14,479	9,996
ARAQUIDÔNICO	10,488	11,462	3,296 ^{a,b}	2,407 ^{a,b}	9,521	13,200	11,413	14,709	7,764	13,810 ^a	15,008 ^a	8,471
LINOLEICO	1,129	1,013	8,748 ^{a,b}	7,194 ^{a,b}	1,562	5,694 ^{a,b}	4,575	5,142	6,380	2,919	5,404 ^b	6,605
PALMITICO	40,856	35,066	42,594	36,834	28,527	28,624	33,904	21,749	34,159	21,184	28,476	27,866
OLEICO	20,800	22,869	8,996 ^{a,b}	10,735	21,982	21,622	8,927	27,209	37,234	21,056 ^a	14,918 ^a	16,303 ^a
ESTEARICO	12,298	0,214 ^a	17,093	16,387	34,559	17,107 ^a	20,417 ^{a,b}	20,296 ^{a,b}	9,933	16,816 ^a	21,151 ^a	21,904 ^a

Dados representam g de AG/100g de lipídios totais, ^a vs. Controle BSA; ^b vs. OP1:10; ^c vs. OP1:20. Detecção realizada pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

FONTE: O autor (2017).

TABELA 2: Perfil de incorporação lipídica em células da linhagem Neuro-2a após incubação com emulsão de óleo *Oro inca* (OI).

	24h				48h				72h			
	Controle BSA	OI 1:10	OI1:20	OI1:50	Controle BSA	OI 1:10	OI1:20	OI1:50	Controle BSA	OI 1:10	OI1:20	OI1:50
EPA	ND	ND	ND	N	ND	4,970 ^a	2,483 ^a	1,496 ^a	ND	ND	ND	ND
A-LINOLENICO	ND	14,371 ^a	2,998 ^{a,b}	3,156 ^{a,b}	ND	32,949 ^a	6,479 ^{a,b}	5,214 ^{a,b}	ND	6,316 ^a	1,822 ^{a,b}	1,570 ^{a,b}
DHA	0,624	ND	ND	3,979894 ^a	0,325	3,747 ^a	3,249 ^a	2,297 ^a	ND	ND	3,791 ^{a,b}	3,406 ^{a,b}
MIRISTICO	11,805	4,391 ^a	8,120	9,131	3,525	5,189	6,081	6,170	4,529	6,289 ^{a,b}	7,013 ^{a,b}	10,412 ^{a,b,c}
ARAQUIDÔNICO	10,488	ND	3,206 ^{a,b}	9,834 ^b	9,521	6,681	12,058 ^{a,b}	11,980 ^{a,b}	7,764	7,365	10,245 ^{a,b}	17,037 ^{a,b,c}
LINOLEICO	1,129	15,738 ^a	17,143 ^a	13,737 ^a	1,562	16,266 ^a	25,946 ^{a,b}	16,872 ^{a,c}	6,380	14,425 ^a	13,159 ^a	13,645 ^a
PALMITICO	40,856	42,071	30,270	23,601	28,527	9,717 ^a	33,399 ^b	25,444	34,159	25,253 ^a	27,810 ^a	21,527 ^a
OLEICO	20,800	18,622	20,627	22,352	21,982	13,842 ^a	23,075	16,961	37,234	15,930 ^a	13,992 ^a	17,516 ^a
ESTEARICO	12,298	4,807 ^a	13,635	14,209	14,559	6,638 ^a	14,442	13,565	9,933	14,422 ^a	15,167 ^a	16,457 ^a

Dados representam g de AG/100g de lipídios totais, ^a vs. Controle BSA; ^b vs. OP1:10; ^c vs. OP1:20. Detecção realizada pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

FONTE: O autor (2017).

4.3 MORFOLOGIA CELULAR

Os experimentos de morfologia celular foram realizados, no entanto, as células não responderam da maneira esperada à metodologia proposta, de maneira que o protocolo para esse experimento precisa ser reavaliado e padronizado para que possa refletir de forma creditável as respostas morfológicas das células ao tratamento com os AGPIs.

Foram realizados quatro experimentos independentes com densidades celulares diferentes com a linhagem Neuro-2a, no entanto, em todos eles houveram perdas celulares e alterações de comportamento celular que impossibilitaram a análise fidedigna dos resultados obtidos. A partir disso, foram realizados experimentos com 1×10^4 células por poço (1° experimento), 1×10^3 células por poço (2° experimento) e 5×10^3 células por poço (3° e 4° experimentos) de acordo com a metodologia descrita. O segundo experimento foi descartado sem o registro das imagens por perda total de células dos poços de tratamento. Em função disso, como em todos os testes realizados ocorreu a indução de picos de proliferação celular e posterior morte celular em diversos grupos de tratamento, foi possível concluir que o método de plaqueamento com células concentradas no centro dos poços da placa de 6 poços não foi satisfatório nem eficaz, de maneira que sugerimos que esse experimento deve ser realizado com plaqueamento uniforme das células em toda a área do poço. Dessa forma seria possível excluir o fator estressante que induziu a morte celular nesse experimento e possibilitaria a análise confiável e segura dos efeitos dos AGPIs n-3 na morfologia celular dessas linhagens.

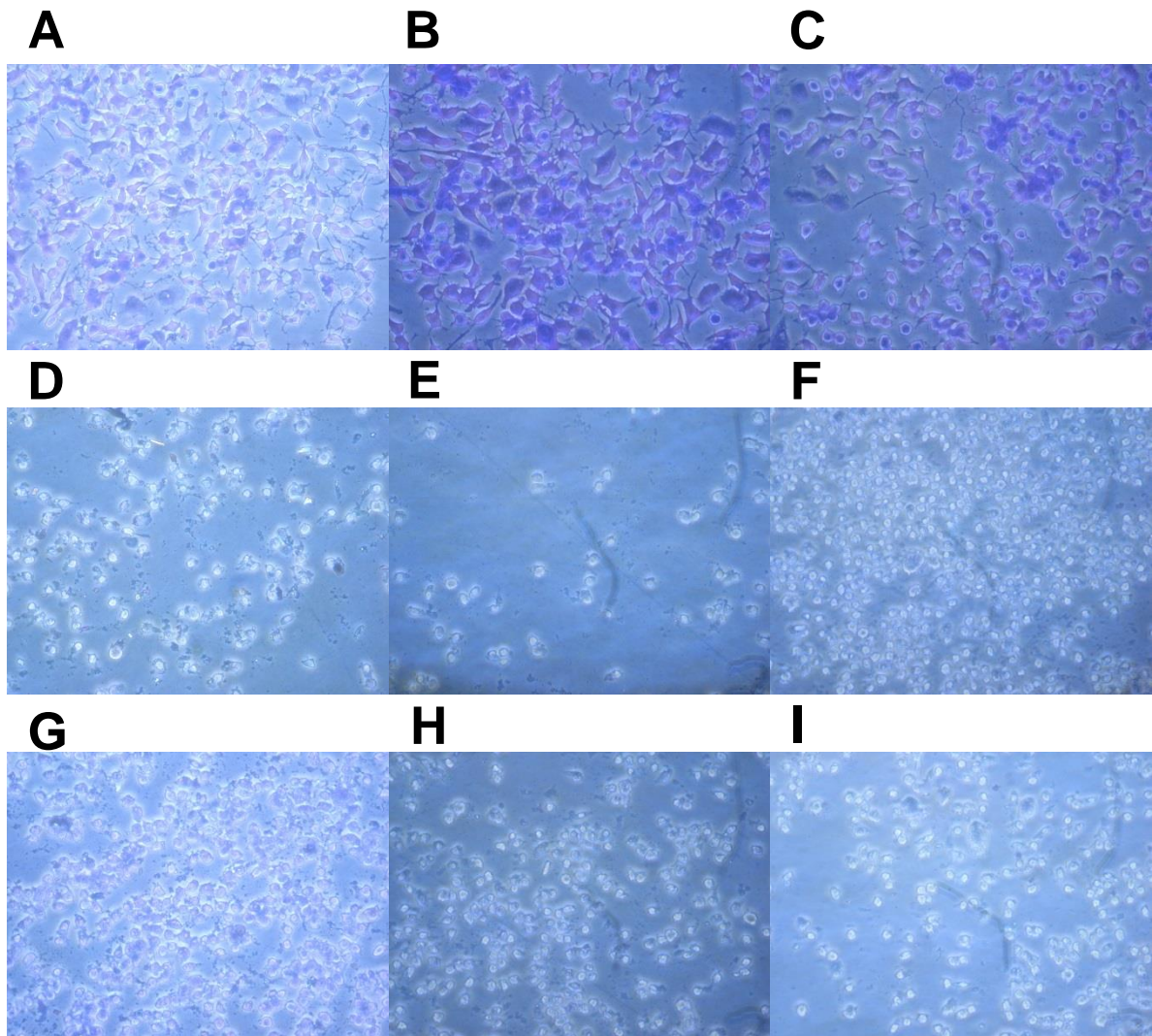


FIGURA 4: Fotos dos experimentos de morfologia realizados com a linhagem Neuro-2a, grupo experimental Controle (só células) durante 24, 48 e 72 horas. A, D e G representam, respectivamente, 24, 48 e 72 horas no primeiro experimento. B, E e H representam, respectivamente, 24, 48 e 72 horas no terceiro experimento. C, F e I representam, respectivamente, 24, 48 e 72 horas no quarto experimento.

FONTE: O autor (2017).

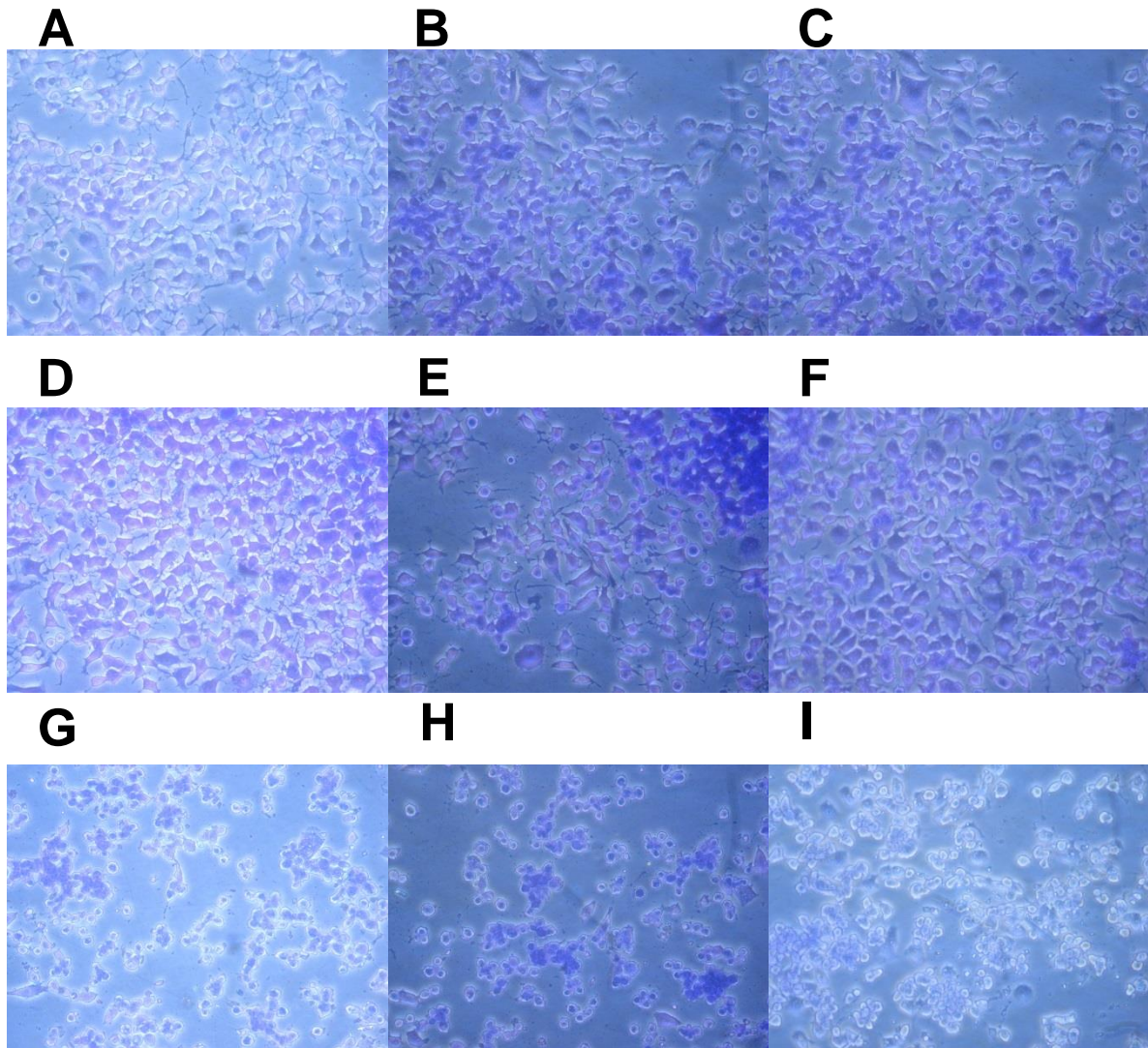


FIGURA 5: Fotos dos experimentos de morfologia realizados com a linhagem Neuro-2a, grupo experimental Controle BSA durante 24, 48 e 72 horas. A, D e G representam, respectivamente, 24, 48 e 72 horas no primeiro experimento. B, E e H representam, respectivamente, 24, 48 e 72 horas no terceiro experimento. C, F e I representam, respectivamente, 24, 48 e 72 horas no quarto experimento.

FONTE: O autor (2017).

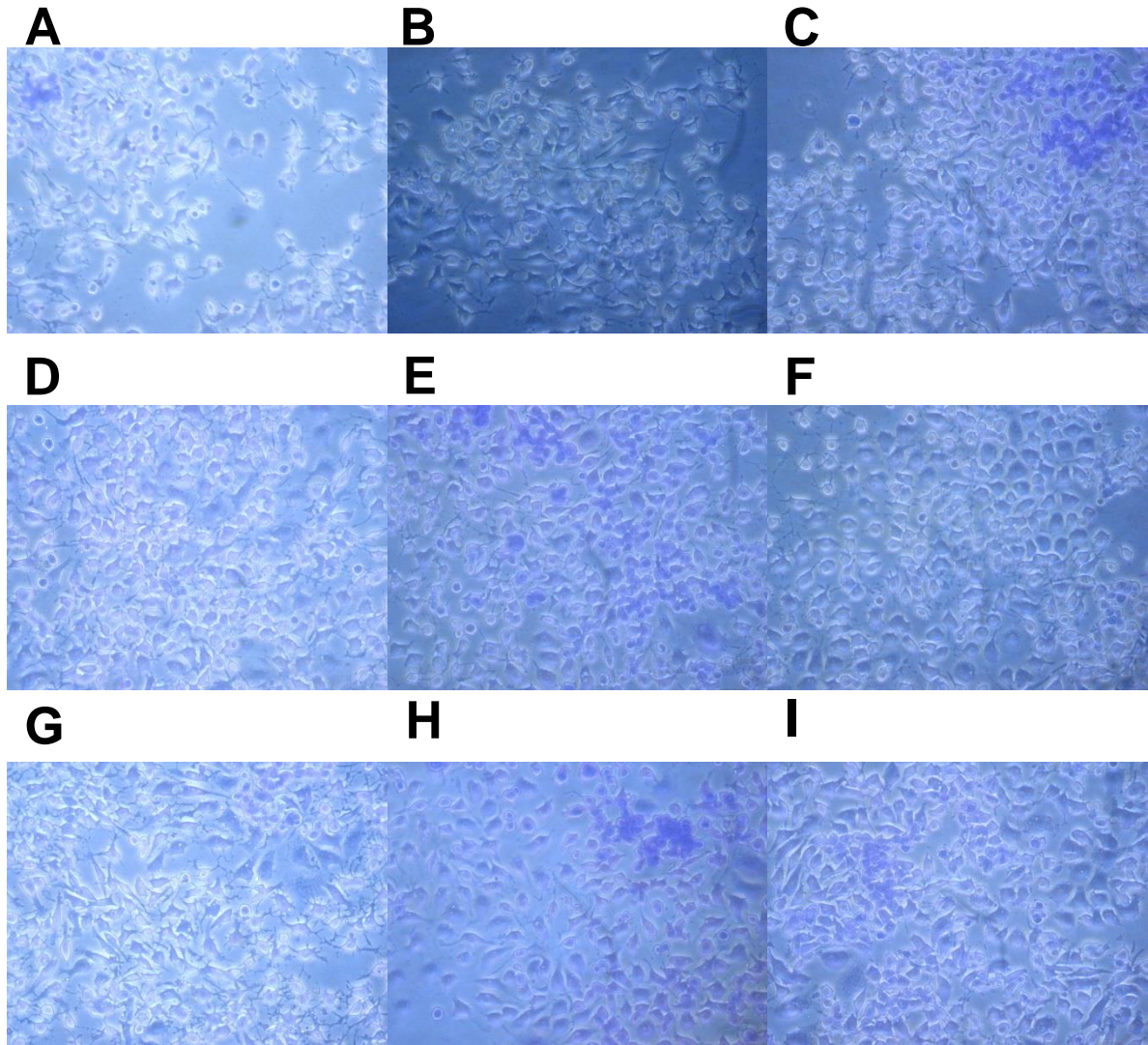


FIGURA 6: Fotos dos experimentos de morfologia realizados com a linhagem Neuro-2a, grupo experimental OP 1:10 durante 24, 48 e 72 horas. A, D e G representam, respectivamente, 24, 48 e 72 horas no primeiro experimento. B, E e H representam, respectivamente, 24, 48 e 72 horas no terceiro experimento. C, F e I representam, respectivamente, 24, 48 e 72 horas no quarto experimento.

FONTE: O autor (2017).

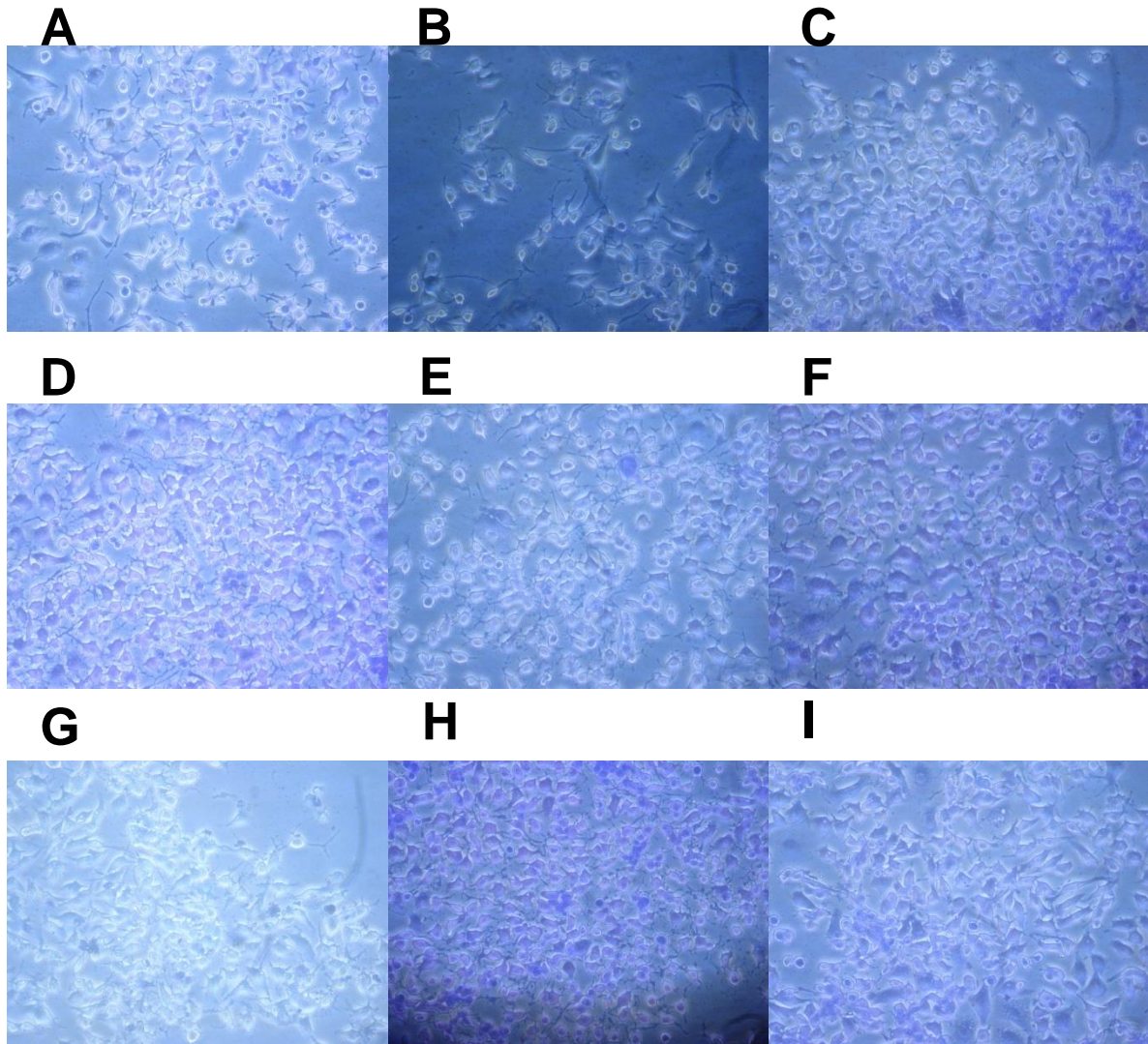


FIGURA 7: Fotos dos experimentos de morfologia realizados com a linhagem Neuro-2a, grupo experimental OP 1:20 durante 24, 48 e 72 horas. A, D e G representam, respectivamente, 24, 48 e 72 horas no primeiro experimento. B, E e H representam, respectivamente, 24, 48 e 72 horas no terceiro experimento. C, F e I representam, respectivamente, 24, 48 e 72 horas no quarto experimento.

FONTE: O autor (2017).

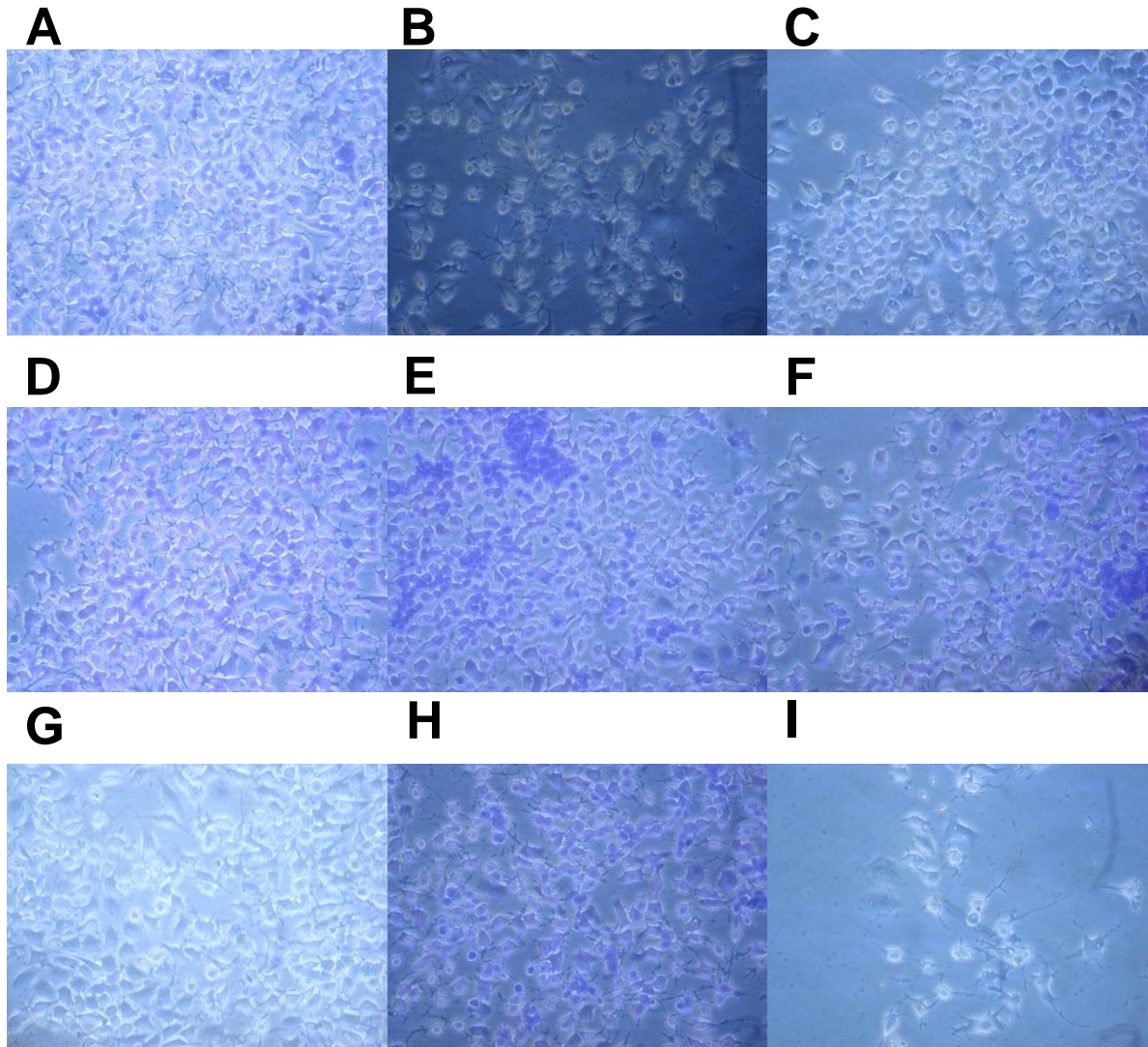


FIGURA 8: Fotos dos experimentos de morfologia realizados com a linhagem Neuro-2a, grupo experimental OP 1:50 durante 24, 48 e 72 horas. A, D e G representam, respectivamente, 24, 48 e 72 horas no primeiro experimento. B, E e H representam, respectivamente, 24, 48 e 72 horas no terceiro experimento. C, F e I representam, respectivamente, 24, 48 e 72 horas no quarto experimento.

FONTE: O autor (2017).

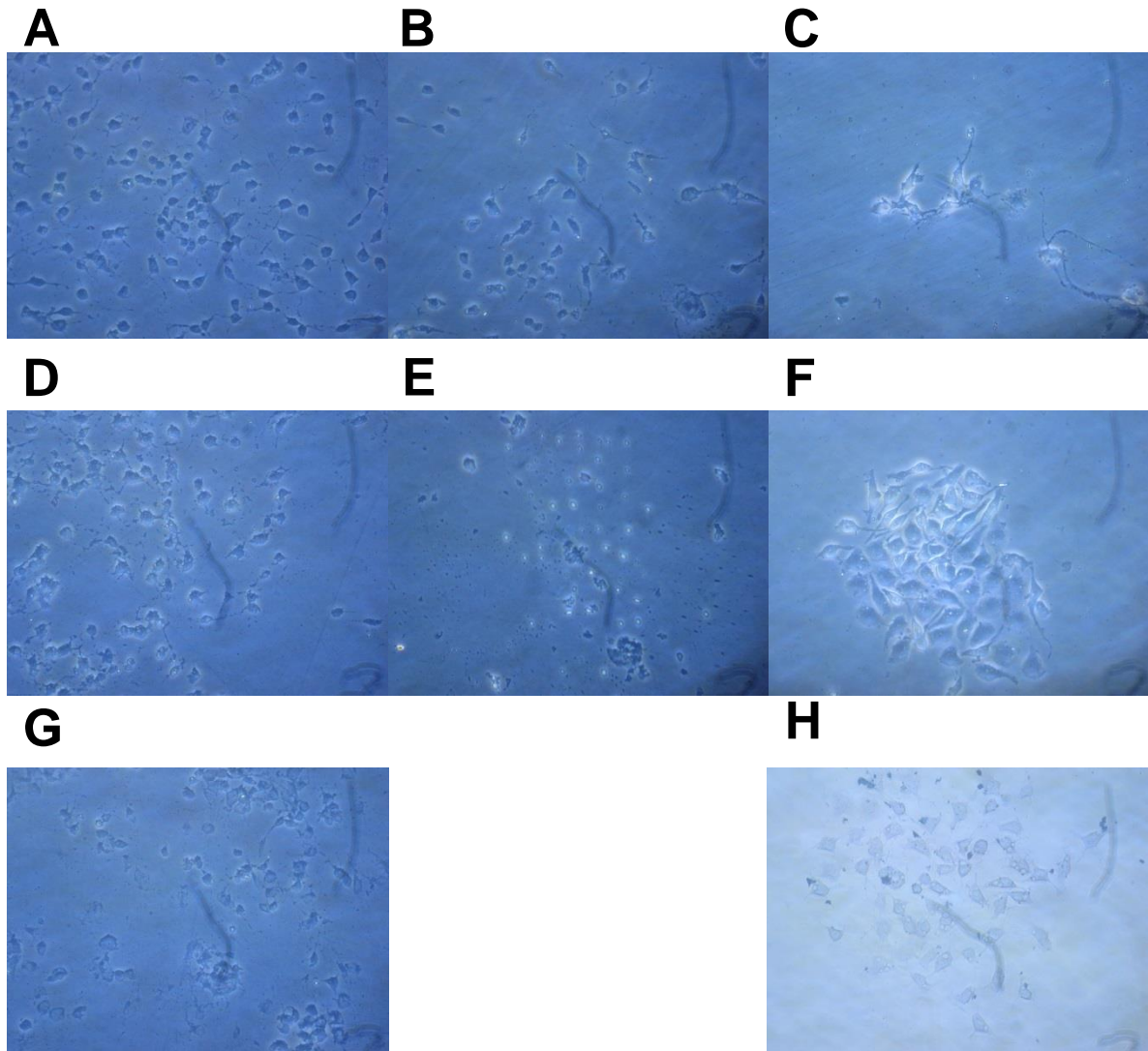


FIGURA 9: Fotos dos experimentos de morfologia realizados com a linhagem Neuro-2a, grupos experimentais OI 1:10, 1:20 e 1:50 durante 24, 48 e 72 horas. A, B e C representam, respectivamente, o grupo experimental OI 1:10 nos tempos de tratamento de 24, 48 e 72 horas no quarto experimento. D, E e F representam, respectivamente, o grupo experimental OI 1:20 nos tempos de tratamento de 24, 48 e 72 horas no quarto experimento. G e H representam, respectivamente, o grupo experimental OI 1:50 nos tempos de tratamento de 24 e 72 horas no quarto experimento.

FONTE: O autor (2017).

De acordo com as fotos mostradas acima, não foi possível analisar da maneira adequada o comportamento das células da linhagem Neuro-2a após o tratamento com AGPIs n-3 em função da morte celular causada pelo estresse celular, que foi induzido pela forma de plaqueamento utilizada na metodologia. A partir disso, as fotos acima ilustram a realização do experimento apesar do erro na metodologia, sendo que tais imagens não puderam ser utilizadas para análise morfológica em função da impossibilidade de medida e mensuração dos prolongamentos celulares. Dessa forma, os resultados mais comprometidos foram os dos grupos de tratamento do óleo *Oro inca*, que apresentaram maior taxa de morte celular em função da maior taxa de proliferação celular, tanto que não foi possível tirar fotos de todas as replicatas nem de todos os testes realizados (primeiro, terceiro e quarto experimento), conforme esta mostrado na Figura 9, que não mostra a foto do grupo experimental OI 1:50 em 48 horas de tratamento, uma vez que não foi possível registrar a foto com nitidez pela escassez de células no poço de tratamento.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse trabalho permitem sugerir a participação dos AGPIs n-3 provenientes do óleo de peixe (EPA e DHA) e do óleo *Oro inca* (ALA) na regulação de vias de proliferação celular, uma vez que induzem o aumento da taxa de proliferação celular nas linhagens de neuroblastoma estudadas. Além disso, através da análise do perfil de proliferação celular, que não se mostra linear ao longo do tempo de tratamento, sugere-se também que tais ácidos graxos podem ter redirecionado as vias de proliferação celular para vias de diferenciação celular nessas linhagens. Entretanto, são necessários estudos futuros que confirmem se realmente ocorre essa diferenciação celular, qual o estágio dessa possível diferenciação e quais são os efeitos desse processo no prognóstico do tratamento.

Diante disso, apesar do aumento da taxa de proliferação celular, é importante avaliar a possibilidade da diferenciação celular tumoral induzida pelo tratamento com AGPIs n-3, uma vez que, caso seja confirmada uma diferenciação celular que indique menor agressividade tumoral e menor capacidade metastática dessas células, tais resultados indicariam uma melhora no prognóstico de tratamento para

os pacientes. Dessa forma, seria imprescindível confirmar a indução dessa diferenciação celular, elucidar por quais mecanismos esse processo ocorre e quais são os efeitos reais desses tratamentos sobre o estágio de diferenciação dessas células tumorais. A partir disso, sugere-se que a confirmação desses resultados e a compreensão mais aprofundada dos efeitos desses compostos para o tratamento do neuroblastoma humano não se fundamenta apenas na atividade desses AGPIs no organismo, mas também pela não invasividade do tratamento e pela ausência de efeitos colaterais severos para os pacientes.

Dessa forma, os efeitos do tratamento do neuroblastoma humano com AGPIs n-3 se mostram relevantes e podem estar relacionados à melhora de prognóstico do tratamento desse tipo de tumor. Além disso, sugere-se também a necessidade de estudos que elucidem os efeitos do ALA no tratamento de neuroblastoma humano e que verifiquem o papel desse composto na formação do SNC e como ocorre a conversão desse precursor, pela cascata de dessaturação e alongação endógena de AGPIs n-3, em EPA e DHA por tais células, conforme sugerem os resultados obtidos nesse estudo. A partir disso, ainda são necessários estudos adicionais que confirmem esses efeitos através da elucidação dos mecanismos pelos quais tais efeitos ocorrem nas referidas linhagens celulares e estudos que avaliem os efeitos desses tratamentos em modelos *in vivo*.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARNÉS, C.M.; PROX, D.; CHRISTISON-LAGAY, E.A.; LE, H.D.; SHORT, S.; CASSIOLA, F.; PANIGRAHY, D.; CHAPONIS, D.; BUTTERFIELD, C.; NEHRA, D.; FALLON, E.M.; KIERAN, M.; FOLKMAN, J.; PUDER, M. Inhibition of neuroblastoma cell proliferation with omega-3 fatty acids and treatment of a murine model of human neuroblastoma using a diet enriched with omega-3 fatty acids in combination with sunitinib. **Pediatric Research**, v. 71, n.2, p. 168-178, 2012.

BASCUÑÁN, K.A.; VALENZUELA, R.; CHAMORRO, R.; VALENCIA, A.; BARRERA, C.; PUIGRREDON, C.; SANDOVAL, J.; VALENZUELA, A. Polyunsaturated fatty acid composition of maternal diet and erythrocyte phospholipid status in Chilean pregnant women. **Nutrients**, 6, p.4918-4934, 2014.

BONATTO, S.J.; OLIVEIRA, H.H.; NUNES, E.A.; PEQUITO, D.; IAGHER, F.; COELHO, I.; NALIWAIKO, K.; KRYCZYK, M.; BRITO, G.A.; REPKA, J.; SABÓIA, L.V.; FUKUJIMA, G.; CALDER, P.C.; FERNANDES, L.C. Fish oil supplementation improves neutrophil function during cancer chemotherapy. **Lipids**, v. 47, p. 383-389, 2012.

BROADHURST, C.L.; WANG, Y.; CRAWFORD, M.A.; CUNNANE, S.C.; PARKINTONG, J.E.; SCHIMIDT, W.F. Brain-specific lipids from marine, lacustrine, or terrestrial food resources: potential impact on early African Homo sapiens. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v.131, n.4, p.653-673, 2002.

CALDER, P.C. Functional Roles of Fatty Acids and Their Effects on Human Health. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 39, 2015.

CALVIELLO, G.; SU, H.; WEYLANDT, K.H.; FASANO, E.; SERINI, S.; CITTADINI, A. 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. Hindawi Publishing Corporation. **Biomed Research International**, 2013, v.2013.

CHILTON, F.H.; MURPHY, R.C.; WILSON, B.A.; SERGEANT, S.; AINSWORTH, H.; SEEDS, M.C.; MATHIAS, R.A. Diet-Gene Interactions and PUFA Metabolism: A Potential Contributor to Health Disparities and Human Diseases. **Nutrients**, v.6, p. 1993-2022, 2014.

FAROOQUI, A.A.; HORROCKS, L.A.; FAROOQUI, T. Glycerophospholipids in brain: their metabolism, incorporation into membranes, function, and involvement in neurological disorders. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.106, p.1-29, 2000.

FAROOQUI, A.A.; HORROCKS, L.A. Phospholipase A2-generated lipid mediators in the brain: the good, the bad, and the ugly. **Neuroscientist**, v. 12, n.3, p. 245- 60. Review. 2006.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G.H.S. A simple method for isolation 128 and purification of total lipid from animal tissue. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, p. 497-509, 1957.

HO, C.F-Y; BON, C.P-E; NG, Y-K; HERR, D.R.; WU, J-S; LIN, T-N; ONG, W-Y. Expression of DHA-metabolizing enzyme alox15 is regulated by selective histone acetylation in neuroblastoma cells. **Neurochemical Research**, 2017.

HORROCKS, L.A.; FAROOQUI, A.A. Docosahexaenoic acid in the diet: its importance in maintenance and restoration of neural membrane function. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 70, n.4, p:361-372, 2004.

HUANG, M. AND WEISS, W.A. Neuroblastoma and MYCN. **Cold Spring Harb Perspect Med** 2013;3:a014415.

IAGHER, F.; BELO, S.R.B.; SOUZA, W.M.; NUNES, J.R.; NALIWAIKO, K.; SASSAKI, G.L.; BONATTO, S.J.R.; OLIVEIRA, H.H.P.; BRITO, G.A.P.; LIMA, C.; KRYCZYK, M.; SOUZA, C.F.; STEFFANI, J.A.; NUNES, E.A.; FERNANDES, L.C. Antitumor and anti-cachectic effects of shark liver oil and fish oil : comparison between independent or associative chronic supplementation in Walker 256 tumor-bearing rats. **Lipids in Health in Disease**, 12: 146, 2013.

INNIS, S.M. Omega-3 Fatty Acid Biochemistry: Perspectives from Human Nutrition. **Military Medicine**, V.179, p: 82-87, 2014.

JOHNSEN, JI.; SEGERSTRÖM, L.; ORREGO, A.; ELFMAN, L.; HENRIKSSON, M.; KÅGEDAL, B.; EKSBORG, S.; SVEINBJÖRNSSON, B.; KOGNER, P. Inhibitors of mammalian target of rapamycin downregulate MYCN protein expression and inhibit neuroblastoma growth *in vitro* and *in vivo*. **Oncogene** (2008), v. 27, p. 2910-2922.

LAKOMA, A.; BARBIERI, E.; AGARWAL, S.; JACKSON, J.; CHEN, Z.; KIM, Y.; McVAY, M.; SHOHET, JM.; KIM, ES. The MDM2 small-molecule inhibitor RG7388 leads to potent tumor inhibition in p53 wild-type neuroblastoma. **Cell Death Discovery** (2015) 1.

MOCELLIN, M.C.; PASTORE E SILVA, J.A.; CAMARGO, C.Q.; FABRE, M.E.; GEVAERD, S.; NALIWAIKO, K.; MORENO, Y.M.; NUNES, E.A.; TRINDADE, E.B. Fish oil decreases C-reactive protein/albumin ratio improving nutritional prognosis

and plasma fatty acid profile in colorectal cancer patients. **Lipids**, v. 48, p. 879-888, 2013.

NALIWAIKO, K.; FONSECA, R.V.; ARAUJO, R.L.F.; CASTILHO, J.C.; OLIVEIRA, B.H.; BELLISSIMO, M.I.; MARTINS, E.F.; ANDREATINI, R.; CURI, R.; FERNANDES, L.C.; FERRAZ, A.C. Fish oil and nervous system: a new potetial antidepressant? **Nutritional Neuroscience**, v.7, n.2, p.91-99, 2004.

NASCIMENTO, A.K.L.; MELO-SILVEIRA, R.F.; DANTAS-SANTOS, N.; FERNANDES, J.M.; ZUCOLOTTI, S.M.; ROCHA, H.A.O.; SCORTECCI, K.C. Antioxidant and antiproliferative activities of leaf extracts from *Plukenetia volubilis* Linneo (Euphorbiaceae). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v.2013, 2013.

ONG, W.Y.; FAROOQUI, T.; KOKOTOS, G.; FAROOQUI, A.A. Synthetic and Natural Inhibitors of Phospholipases A2: Their Importance for Understanding and Treatment of Neurological Disorders. **ACS Chem Neuroscience**, 2015.

POLAVARAPU, S.; MANI, A.M.; GUNDALA, N.K.V.; HARI, A.D.; BATHINA, S.; DAS, U.N. Effect of Polyunsaturated Fatty Acids and Their Metabolites on Bleomycin-Induced Cytotoxic Action on Human Neuroblastoma Cells *In Vitro*. **PLoS ONE** 9(12): e114766. doi:10.1371/journal.pone.0114766, 2014.

ROSS, R.A.; WALTON, J.D.; HAN, D.; GUO, H.; CHEUNG, N.V. A distinct gene expression signature characterizes human neuroblastoma cancer stem cells. **Stem Cell Research** (2015), v. 15, p. 419-426.

REN, Y.; CHAN, H.M.; FAN, J.; XIE, Y.; CHEN, YX.; LI, W.; JIANG, GP.; LIU, Q.; MEINHARDT, A.; TAM, PKH. Inhibition of tumor growth and metastasis *in vitro* and *in vivo* by targeting macrophage migration inhibitory factor in human neuroblastoma. **Oncogene** (2006), v. 25, p. 3501-3508.

SERINI, S.; ZINZI, A.; VASCONCELOS, R.O.; FASANO, E.; RIILLO, M.G.; CELLENO, L.; TROMBINO, S.; CASSANO, R.; CALVIELLO, G. Role of β -catenin signaling in the anti-invasive effect of the omega-3 fatty acid DHA in human melanoma cells. **Journal od Dermatological Science**, 84, p.149-159, 2016.

SO, W.W.; LIU, W.N.; LEUNG, K.N. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Trigger Cell Cycle Arrest and Induce in Human Neuroblastoma LA-N-1 Cells. **Nutrients**, 7 (8): p. 6956-6973, 2015.

SUZUMURA, D.N.; SCHLEDER, J.C.; APPEL, M.H.; NALIWAIKO, K.; TANHOFFER, R.; FERNANDES, L.C. Fish oil supplementation enhances pulmonary strength and endurance in women undergoing chemotherapy. **Nutrition and Cancer**, v. 68, 2016.

TANAKA, A.; YAMAMOTO, A.; MUROTA, K.; TSUJIUCHI, T.; IWAMORI, M.; FUKUSHIMA, N. Polyunsaturated fatty acids induce ovarian cancer cell death through ROS-dependent MAP kinase activation. **Biochemical and Biophysical Research Communications – Elsevier**, 493, p. 468-473, 2017.

VALENZUELA, R.; BASCUÑÁN, K.A.; CHAMORRO, R.; BARRERA, C.; SANDOVAL, J.; PUIGRREDON, C.; PARRAGUEZ, G.; ORELLANA, P.; GONZALEZ, V.; VALENZUELA, A. Modification of Docosahexaenoic Acid Composition of Milk from Nursing Women Who Received Alpha Linolenic Acid from Chia Oil during Gestation and Nursing. **Nutrients**, v.7, p.6405-6424, 2015.

VALENZUELA, R.; ECHEVERRIA, F.; ORTIZ, M.; RINCÓN-CERVERA, M.A.; ESPINOSA, A.; HERNANDEZ-RODAS, M.C.; ILLESCA, P.; VALENZUELA, A.; VIDELA, L.A. Hydroxytyrosol prevents reduction in liver activity of Δ -5 and Δ -6 desaturases, oxidative stress, and depletion in long chain polyunsaturated fatty acid content in different tissues of high-fat diet fed mice. **Lipids in Health and Disease**, 16:64, 2017.

WANG, X.; XU, R.; WANG, R.; LIU, A. Transcriptome analysis of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds at two developmental stages. **BMC Genomics**, 13:716, 2012.

WATERS, A.M.; STEWART, J.E.; ATIGADDA, V.R.; MROCZEK-MUSULMAN, E.; MUCCIO, D.D.; GRUBBS, C.J.; BEIERLE, E.A. Preclinical Evaluation of a Novel RXR Agonist for the Treatment of Neuroblastoma. **Molecular Cancer Therapeutics**, v.14, p.1559-1569, 2015.

WEYLANDT, K.H.; SERINI, S.; CHEN, Y.Q.; SU, H.; LIM, K.; CITTADINI, A.; CALVIELLO, G. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids: The Way Forward in Times of Mixed Evidence. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.