

GINA BORGHETTI

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE SOBRE A EXPRESSÃO
GÊNICA DE COX-2 EM RATOS PORTADORES DE TUMOR DE WALKER 256**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

GINA BORGHETTI

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE SOBRE A EXPRESSÃO
GÊNICA DE COX-2 EM RATOS PORTADORES DE TUMOR DE WALKER 256**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, ênfase em Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes

AGRADECIMENTOS

A toda minha família pelo amor e apoio incondicional. Amo todos vocês!!

A todos meus amigos pela compreensão e carinho.

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

A todos meus novos amigos do LABMETAB, pelo auxílio em todos os experimentos, pela amizade, além do ambiente sempre muito agradável. Este trabalho é de todos: Adri, Cíntia, Dani, Dalton, Everson, Fabíola, Gleisson, Isa, Julia, Juliano, Kátia, Marcelo, Ricardo, Ricelli, Sandro e Thiago.

Agradecimento especial ao Ricardo, por estar sempre pronto a ajudar, sendo meu “anjo da guarda”.

As minhas amigas inseparáveis, Adri, Isa, Dani e Julia.

A todos do Laboratório de Matriz Celular, Laboratório de Biologia Molecular da Zoologia e Laboratório de Neurobiologia, que foram a extensão de nosso Laboratório; sem a ajuda de vocês não seria possível a realização deste trabalho.

Aos Professores Silvio Sanches Veiga, Silvio Zanata, Lia Nakao e a técnica Paula pela gentileza em permitir a utilização de seus equipamentos.

A Márcia por me ensinar a desenhar *primers* e por todas as dicas e informações valiosas durante este trabalho.

A Alessandra Antunes, pela oportunidade de aprender um pouquinho sobre expressão gênica e PCR em tempo real, por toda a paciência e disposição em ensinar uma aluna amadora em Biomol.

As professoras Adriana Mercadante, Claudia Maria Sallai e Viviane Prodócimo.

Ao professor Ricardo Fernandez Perez.

Aos funcionários do biotério por todo o auxílio com os animais.

A todos meus novos amigos que conheci neste período, que indiretamente me ajudaram. Taísa, Valéria, Fernanda, Dilza, Youssef, Chelin, Simone, Leo.....

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

A Capes-REUNI pelo auxílio financeiro.

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

MUITO OBRIGADA!

“O início da sabedoria é a admissão da própria ignorância. Todo o meu saber consiste em saber que nada sei”.

Sócrates

RESUMO

Evidências epidemiológicas e experimentais têm demonstrado o potencial farmacológico e o valor nutricional de uma dieta enriquecida com óleo de peixe. Estudos prévios do Laboratório de Metabolismo Celular, UFPR, demonstraram que o óleo de peixe, rico em AGPI n-3, é capaz de reduzir o crescimento tumoral e o grau de caquexia em ratos portadores de tumor de Walker 256. Apesar de inúmeras pesquisas sobre a eficácia dos AGPI n-3 no tratamento de doenças inflamatórias, muitos mecanismos moleculares responsáveis pelos efeitos biológicos, ainda não são completamente entendidos. Alterações na expressão gênica pode ser um importante mecanismo na qual AGPI n-3 exercem seus efeitos benéficos em condições patológicas, como o câncer. Devido à importância da expressão de COX-2 na gênese do câncer há enorme interesse em modular sua atividade, pois existem fortes evidências de sua participação na iniciação, transformação, progressão, e metástase. O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito da suplementação com óleo de peixe sobre a expressão gênica de COX-2 em ratos portadores de tumor de Walker 256. Ratos Wistar machos de 70 dias foram divididos em três grupos: alimentados com ração (W), suplementados com óleo de peixe (WP) ou gordura de coco (WS) até completarem 100 dias de vida na dose de 1g/Kg p.c. Após este período, foi inoculado uma suspensão de células de Tumor de Walker 256 contendo 3×10^7 células/mL. Após 14 dias da inoculação, os animais foram ortotansados e a massa tumoral retirada para as análises experimentais. O RNA total foi isolado do tecido tumoral e a expressão gênica foi avaliada por transcrição reversa-PCR em tempo real (RT-qPCR) utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Foi realizada validação da eficiência de amplificação dos genes alvo e controle interno, assim como do gene de referência. Os dados revelaram que a suplementação com óleo de peixe foi capaz de reduzir significativamente o peso do tumor, a síntese protéica e a expressão gênica da enzima COX-2 ($p < 0.05$) no tecido tumoral. Apesar dos mecanismos moleculares permanecerem desconhecidos, este resultado sugere que os AGPI n-3 possuem a capacidade de alterar a expressão de genes envolvidos na inflamação, participantes dos processos de carcinogênese. Além disso, estes resultados demonstram pela primeira vez que a suplementação com óleo de peixe é capaz de reduzir a expressão gênica de COX-2 no tecido tumoral em ratos portadores de Tumor de Walker 256.

Palavras chave: câncer, óleo de peixe, ciclooxygenase-2 e expressão gênica

ABSTRACT

Epidemiological and experimental evidence has shown the pharmacological potential and the nutritional value of diets enriched in fish oil. Previous research in our laboratory has shown that a diet rich in fish oil decreases the growth of Walker 256 tumors and cancer cachexia in rats. Although several studies have reported the efficacy of n-3 PUFA in inflammatory diseases, many of the molecular mechanisms responsible for the biological effects remain unknown. Alterations in the gene expression could be an important mechanism where n-3 PUFA (fish oil) applies its beneficial effects in pathological conditions, such as cancer. Due to the important role of COX-2 in cancer genesis, there is an enormous interest in its modulation because of strong evidence shown in the role of COX-2 expression with initiation, transformation invasiveness and metastasis. The objective of this study was to investigate the effects of diets supplemented with fish oil in COX-2 gene expression in Walker 256 tumor-bearing rats. Male wistar rats at 70 days old were separated into 3 groups: fed with regular chow (W) supplemented with fish oil (WP) and coconut fat (WS) (1 g/kg b.w.) until they reached 100 days of age. Then, they were inoculated with a suspension of Walker 256 ascitic tumor cells (3×10^7 ml) and after 14 days they were euthanized and the tumor mass was removed for experimental analysis. Total RNA was isolated from tumor tissues and a quantitative real-time reverse transcription (RT-qPCR) conducted to compare the relative expression using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. The efficiency of target and internal control genes as well as the design of a reference gene was validated. The data revealed that diets supplemented with fish oil resulted in a significant decrease in the tumor weight, protein and gene expression of COX-2 ($p < 0.05$) in tumor tissue. Despite the molecular mechanisms involved are not fully understood, the data suggests that fish oil may exert their effects via their capacity to regulate the expression of inflammatory genes, associated in carcinogenesis. These results demonstrate for the first time the decrease in gene expression of COX-2 in tumor tissue in Walker 256 tumor-bearing rats by fish oil.

Key words: cancer, fish oil, cyclooxygenase-2 and gene expression

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	ESTIMATIVA DOS CASOS DE CÂNCER EM 2010	12
FIGURA 2	ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS DA SERIE W6 E W3.....	14
FIGURA 3	METABOLISMO DOS AGPI N-3 E N-6.....	16
FIGURA 4	VIA DA CICLOOXIGENASE. METABOLISMO DE ÁCIDO ARAQUIDÔNICO (ARAQUIDONATO).	21
FIGURA 5	PESO DO TUMOR	38
FIGURA 6	SÍNTESE PROTÉICA DE COX-2 NO TECIDO TUMORAL.....	39
FIGURA 7	VISUALIZAÇÃO EM GEL DE POLIACRILAMIDA 8% CORADO COM NITRATO DE PRATA DO PRODUTO AMPLIFICADO DA REAÇÃO DE PCR UTILIZANDO OS PRIMERS DA COX -2 E HPRT.....	40
FIGURA 8	VISUALIZAÇÃO EM GEL DE POLIACRILAMIDA 8% CORADO COM NITRATO DE PRATA DO PRODUTO AMPLIFICADO DA REAÇÃO DE PCR UTILIZANDO OS PRIMERS DA COX-2.	41
FIGURA 9	EFEITO DO TRATAMENTO EXPERIMENTAL NA EXPRESSÃO DO CONTROLE INTERNO APLICANDO-SE O MÉTODO $2^{-\Delta CT}$	42
FIGURA10	VALIDAÇÃO DO MÉTODO $2^{-\Delta\Delta CT}$	43
FIGURA 11	CURVA DE DISSOCIAÇÃO	43
FIGURA 12	EXPRESSÃO GÊNICA DE COX-2 NO TECIDO TUMORAL.	44
QUADRO 1	VALORES DE CT PARA DETERMINAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO RELATIVA UTILIZANDO $2^{-\Delta\Delta CT}$	44

LISTA DE ABREVIATURAS

AA-ácido araquidônico
AGPI-ácidos graxos poliinsaturados
AGPI n-3-ácidos graxos poliinsaturados ômega -3
AGPI n-6-ácidos graxos poliinsaturados ômega -6
Akt- serino/treoninoquinase
AL-ácido linoléico
ALA- ácido alfa- linolênico
AP- proteína ativadora
cDNA- DNA complementar
cAMP- adenosina 3' 5' monofosfato cíclico
CT- ciclo *threshold*
COX- ciclooxigenase
CRE- elemento responsivo de cAMP
CREB- proteína ligante ao elemento responsivo
DEPC- dietilpirocarbonato
DHA- ácido docosahexaenóico
DNA- ácido desoxirribonucléico
dNTPs- desoxirribonucleosídeos trifosfatados
EBP- proteínas ligantes ao amplificador
EDTA- ácido etilenodiamino tetra-acético
EPA- ácido eicosapentaenóico
HETE- ácidos hidroxieicosatetraenóico
HPETE- ácidos hidroxiperoxieicosatetraenóico
HPRT- Hipoxantina-guanina fosforibosil-transferase
I κ B- inibidor do fator nuclear κ B
IL-interleucinas
LOX-lipooxigenase
LT-leocotrienos
LX-lipoxina
NF- κ B- fator nuclear kappa

NFIL6- fator nuclear IL6

NO- óxido nítrico

MAP- proteinoquinase ativada por mitógeno

mRNA- RNA mensageiro

PCR- reação em cadeia de polimerase

primers- iniciadores

PPAR- receptor ativado pela proliferação de peroxissomos

PPRE- elemento responsivo específico da proliferação do peroxissomos

RNA- ácido ribonucléico

RT- transcriptase reversa

RT-qPCR- transcrição reversa - PCR em tempo real quantitativo

SDC-1- sindecan

SDSPAGE- eletroforese em gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio

STAT-transdutor de sinal e ativador de transcrição

TAE- tris Acetato EDTA

TBP- proteína ligadora de TATA

TEMED- N,N,N',N'-Tetrametiletileno-diamino

TNF- fator de necrose tumoral

VEGF- fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
1.1 CÂNCER.....	12
1.2 ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS (AGPI).....	14
1.3 EFEITOS DOS AGPI N-3.....	17
1. 4 CICLOOXIGENASES (COXs).....	20
1.5 PAPEL DA COX-2 NO CÂNCER.....	22
2 OBJETIVOS	25
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	26
3.2 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS DO TUMOR DE WALKER 256	26
3.3. AVALIAÇÃO DA SÍNTESE PROTÉICA.....	27
3.3.1 Quantificação protéica	27
3.3.2 Eletroforese em gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio.....	28
3.3.3 Western-Blotting	29
3.4 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA.....	30
3.4.1 Extração de RNA total do tecido tumoral	30
3.4.2 Reação de transcrição reversa	31
3.4.3 Desenho dos iniciadores (primers).....	32
3.4.4 Reação de Cadeia de Polimerase (PCR).....	33
3.4.5 PCR em tempo real	34
3.4.6 Método $2^{-\Delta\Delta CT}$	35
3.4.7 Seleção do gene candidato a controle interno (HPRT)	36
3.4.8 Validação da Eficiência de Amplificação do Gene Alvo e Controle Interno	36
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
4 RESULTADOS	38
4.1 PESO TUMORAL.....	38
4.2 SÍNTESE PROTÉICA DE COX-2 NO TECIDO TUMORAL.....	38
4.3 OTIMIZAÇÃO DOS PRIMERS DE COX-2 E HPRT.....	39
4.4 SELEÇÃO DO CONTROLE INTERNO.....	41
4.5 EFICIÊNCIA DO GENE ALVO E DO CONTROLE INTERNO.....	42
4.6 CURVA DE DISSOCIAÇÃO.....	43
4.7 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE COX-2.....	44
5. DISCUSSÃO	45
6 CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS	53
ANEXOS.....	61

INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

Apesar da grande quantidade de pesquisas desenvolvidas durante as últimas décadas, o câncer continua sendo uma das doenças que mais matam em todo mundo (ANAND *et al.*, 2008). Em 2020, é esperado um aumento de 7,5 bilhões na população mundial, sendo previstos aproximadamente 15 milhões de casos novos e 12 milhões de mortes devido ao câncer (McCRACKEN *et al.*, 2007; ANAND *et al.*, 2008). Na maioria dos países desenvolvidos, o câncer é a segunda causa de morte depois das doenças cardiovasculares, e evidências epidemiológicas levam a uma tendência de aumento, também nos países menos desenvolvidos. (ANAND *et al.*, 2008; TORREZINI, 2008).

No Brasil, as estimativas do Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2010), para o ano de 2010, também válidas para o ano de 2011, apontam para a ocorrência de 489.270 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, serão os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e do colo do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada para a América Latina. (FIGURA 1)

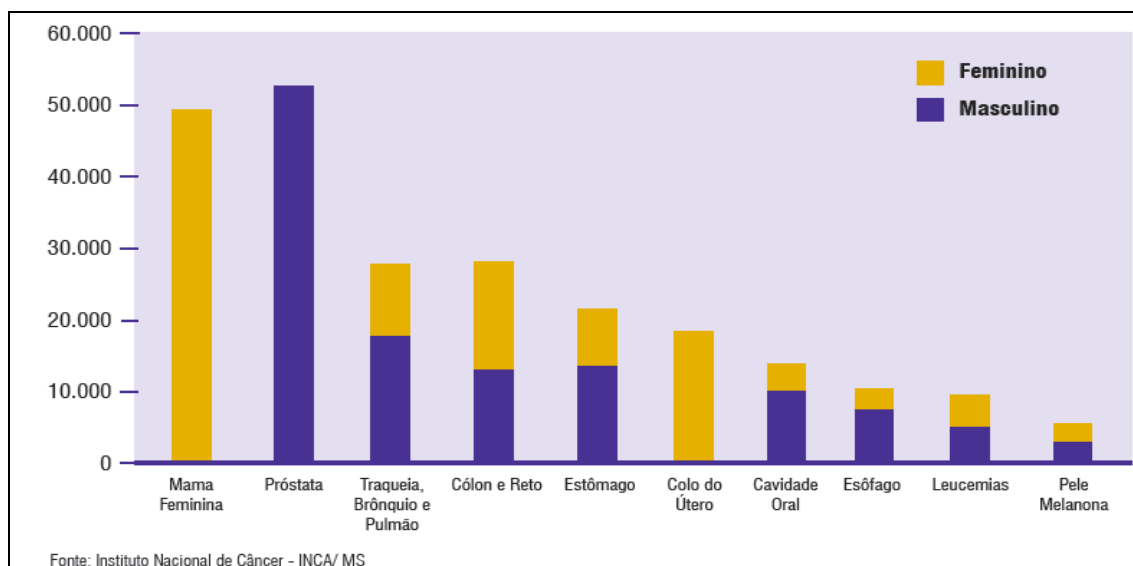


FIGURA 1 - Estimativa dos casos de câncer de maior incidência em 2010 na população brasileira.
Fonte: INCA, 2010

Câncer é o nome dado a um conjunto de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo (GARCIA *et al.*, 2007). As mutações na sequência do DNA podem produzir mudanças no padrão da expressão gênica que levam a célula ao descontrole do ciclo celular (VISSER *et al.*, 2006; GARCIA *et al.*, 2007). Estas mutações afetam duas grandes classes de genes: genes de proliferação, os proto-oncogenes e genes anti-proliferação, os genes supressores tumorais (VISSER *et al.*, 2006).

Apesar de todos os cânceres serem resultado de múltiplas mutações, sabe-se que estas são devidas a interações com o meio ambiente. Estas observações indicam que a maioria dos cânceres não é de origem hereditária e o estilo de vida influencia profundamente no seu desenvolvimento (ANAND *et al.*, 2008). Apesar dos fatores hereditários não poderem ser modificados, fatores ambientais e estilo de vida podem ser potencialmente alterados (McCRACKEN *et al.*, 2007).

Em 1981, foi estimado que aproximadamente 30 a 35% das mortes nos Estados Unidos, devido ao câncer, foram relacionadas com a dieta. Esta relação variou de acordo com tipo de câncer, porém os mecanismos desta interação ainda não foram totalmente elucidados (COLDITZ *et al.*, 2006; ANAND *et al.*, 2008). A relação entre dieta e incidência de câncer foi demonstrada em cânceres específicos em vários países (GARCIA *et al.*, 2007). Asiáticos têm vinte cinco vezes menor incidência de câncer de próstata e dez vezes à de câncer de mama quando comparados com indivíduos de países ocidentais. Em adição, a taxa desses cânceres aumentou substancialmente depois da migração desses asiáticos para países ocidentais (GARCIA *et al.*, 2007; McCRACKEN *et al.*, 2007).

Estudos epidemiológicos sugerem uma correlação entre ácidos graxos e aparecimento de tumores. Vários estudos demonstraram que o consumo excessivo de gorduras saturadas e de ácidos graxos poliinsaturados n-6 (AGPI n-6), e a baixa ingestão de ácidos graxos poliinsaturados n-3 (AGPI n-3), facilitam o aparecimento de doenças crônico-degenerativas, como o câncer (McENTEE; WHELAN, 2002; MUND *et al.*, 2007). Populações de regiões como do Alasca e da Groenlândia têm incidência de câncer relativamente baixa, sugerindo que o consumo de grande quantidade de AGPI n-3, presentes em animais marinhos, exerça o efeito protetor nestas populações (CURI, 2002). Estes dados são corroborados quando se avalia a incidência de câncer em

populações orientais que consomem grande quantidade de gorduras de animais marinhos, ricos em AGPI n-3 (TAPIERO *et al.*, 2002).

1.2 ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS (AGPI)

O termo ácido graxo poliinsaturado (AGPI) refere-se aos ácidos graxos cujas moléculas possuem duas ou mais duplas ligações. A denominação ω ou n diferencia os ácidos graxos em relação à posição da primeira dupla ligação contada a partir do carbono ômega (grupo metil no final da molécula) (SANT'ANA, 2004). Existem duas famílias importantes de ácidos graxos poliinsaturados: $n-6$ que apresentam a primeira dupla ligação no sexto átomo de carbono, derivado do ácido linoléico (AL) 18:2; e o $n-3$ que apresentam a primeira insaturação no terceiro átomo de carbono, derivado do ácido α -linolênico (ALA) 18:3. (FIGURA 2) Esses dois ácidos graxos não são interconversíveis, pois a enzima que converte o ácido linoléico em α -linolênico não está presente em mamíferos (ROSE; CONOLLY, 1999; CALDER, 2001).

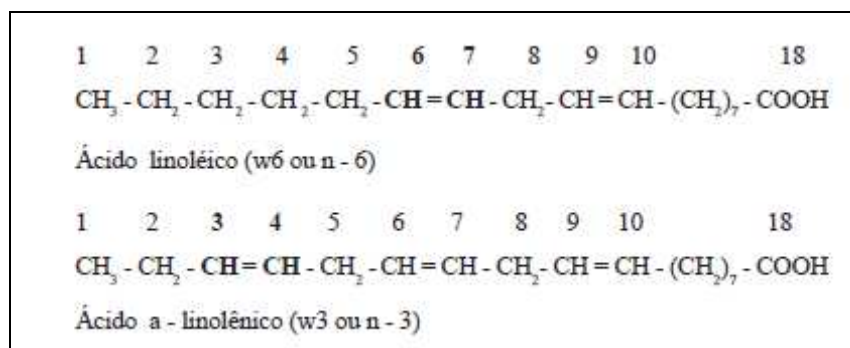


FIGURA 2 - Ácidos graxos poliinsaturados da série $\omega 6$ e $\omega 3$. Adaptado de SANT'ANA, 2004.

Os AGPI $n-3$ e $n-6$ são denominados ácidos graxos essenciais, pois não podem ser sintetizados no organismo de mamíferos pela ausência das enzimas dessaturases, sendo necessária a sua obtenção através da dieta (ROSE; CONNOLLY, 1999). Uma vez ingeridos, os ácidos graxos essenciais podem sofrer uma série de reações, como o aumento do comprimento da cadeia carbônica e grau de insaturação (CALDER, 2001). Os ácidos linoléico (AL) e α -linolênico (ALA) aumentam o número de carbonos, por meio da ação de enzimas denominadas alongases, localizadas no retículo endoplasmático das células, produzindo os ácidos graxos da série $n-6$, como o ácido

araquidônico (AA) 20:4 e da série n-3, como o ácido eicosapentaenóico (EPA) 20:5 e docosahexaenóico (DHA) 22:6 (SANT'ANA, 2004; SALA-VILA *et al.*, 2008). O ácido linoléico e α -linolênico são substratos das mesmas dessaturases, de forma que as famílias n-3 e n-6, competem entre si pelas mesmas enzimas na via metabólica (SALA-VILA *et al.*, 2008).

O ácido araquidônico (AA) e o ácido eicosapentaenóico (EPA), são precursores de eicosanóides, os quais atuam como moduladores químicos em diversos processos biológicos, como resposta inflamatória, agregação plaquetária, permeabilidade vascular e na formação de sinalizadores biológicos (ROSE; CONNOLLY, 1999). Os eicosanóides são substâncias biologicamente ativas, com meia-vida curta e que atuam localmente, desencadeando mudanças nas células ou tecidos onde foram produzidos, sendo sintetizados, preferencialmente, a partir do ácido araquidônico (LAPILLONNE *et al.*, 2003, SALA-VILA *et al.*, 2008). Estes mediadores estão envolvidos na modulação da intensidade e duração da resposta inflamatória que incluem prostaglandinas (PGs), tromboxanas (TXs), leucotrienos (LTs) e outros derivativos gerados pela ação das enzimas ciclooxigenases (COX) e lipoxigenases (LOX) (SALA-VILA *et al.*, 2008). Estas enzimas são expressas nas células epiteliais e inflamatórias, aumentando a quantidade de mediadores, dependendo da natureza, tipo celular, tempo e duração do estímulo. Como células inflamatórias tipicamente contêm altas proporções de ácido araquidônico, ele é usualmente o maior substrato da síntese de eicosanóides (ROSE; CONNOLLY, 1999; SALA-VILA *et al.*, 2008).

Devido as diferenças estruturais, há produção de eicosanóides com funções diferenciadas. Os derivados da família n-6 formam prostaglandinas e tromboxanas da série 2, leucotrienos da série 4 que apresentam forte efeito inflamatório (SALA-VILA *et al.*, 2008). Do metabolismo de n-3, a mesma enzima é capaz de produzir os mesmos eicosanóides, porém, prostaglandinas e tromboxanas da série 3 e leucotrienos da série 5, que tem menor potencial inflamatório (ROSE ; CONNOLLY, 1999; FUNAHASHI, 2008; SALA-VILA *et al.*, 2008). (FIGURA 3)

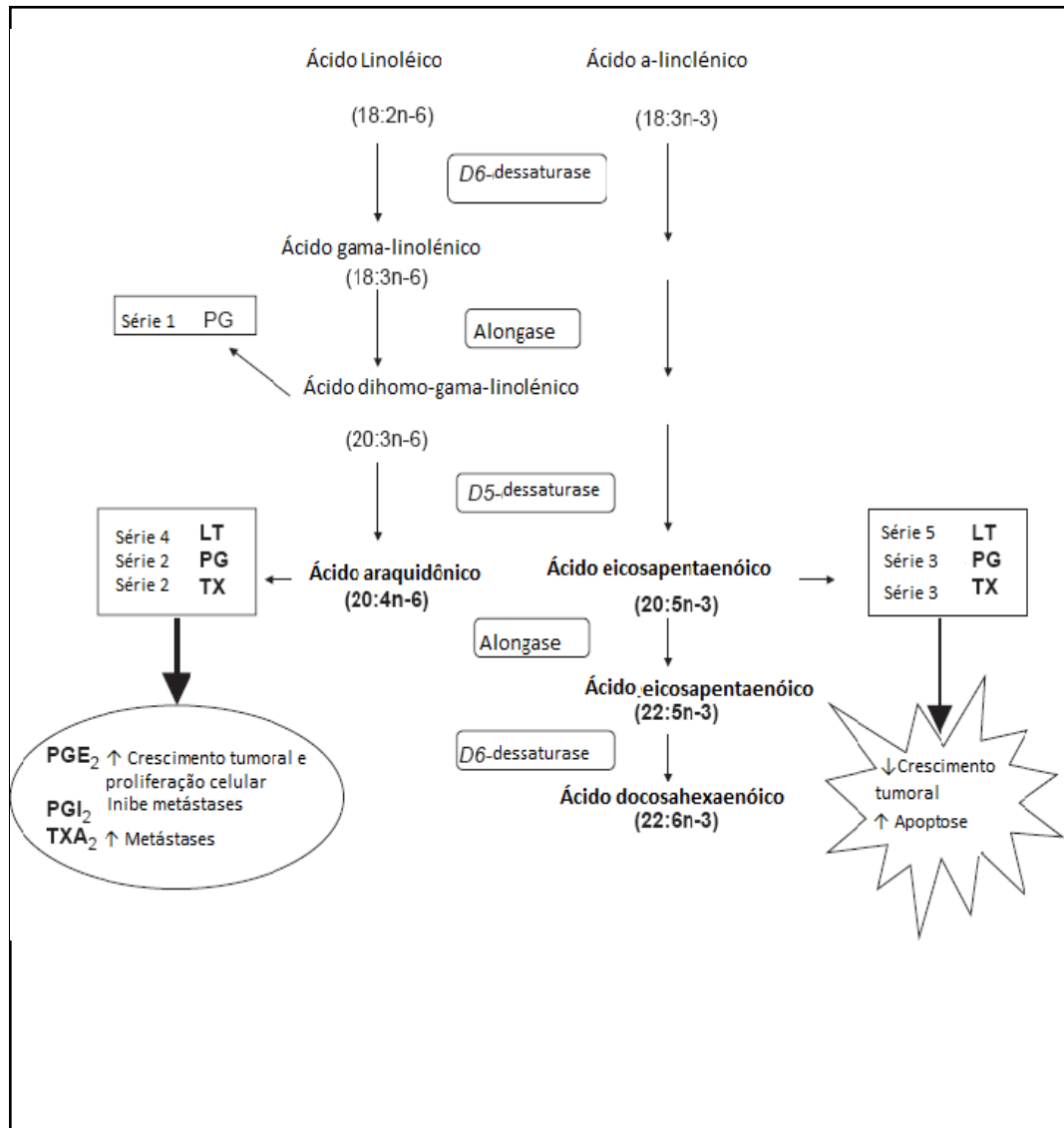


FIGURA 3 - Metabolismo dos AGPI n-3 e n-6 e seus supostos efeitos em tumores. Os AGPI podem atuar como precursores de diferentes eicosanóides, incluindo leucotrienos (LT), prostaglandinas (PG) e tromboxanas (TX). Adaptado de ROYNETTE *et al.*, 2004.

As principais fontes dos ácidos graxos n-3 são os peixes, óleo de peixe, linhaça, nozes e as folhas verdes escuras. Ácidos graxos n-3 de cadeia longa, principalmente os ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) são encontrados principalmente em óleos de peixe (HARDMAN, 2004; SALA-VILA *et al.*, 2008). Ácidos graxos n-6 compõe principalmente os óleos vegetais e sementes, como milho, girassol, soja, entre outros. (HARDMAN, 2004; SANT'ANA, 2004).

Estudos antropológicos e nutricionais indicam que a dieta humana foi alterada nos últimos 10.000 anos com maiores mudanças durante os últimos 150 anos (RIEDIGER *et al.*, 2009). Com a industrialização e desenvolvimento da tecnologia na

extração de óleos vegetais, houve aumento das calorias a partir das gorduras, principalmente do tipo saturadas e AGPI n-6 (SIMOPOULOS, 1999, 2006). O estudo evolutivo da dieta humana mostrou que a dieta de nossos ancestrais apresentava menor quantidade de gorduras saturadas e uma ingestão balanceada de ácidos graxos essenciais, com a razão n-6: n-3 de aproximadamente 1:1 (SIMOPOULOS, 2006). Atualmente, a população ocidental ingere grandes quantidades de AGPI n-6 e tem uma dieta deficiente em AGPI n-3, com a razão n-6:n-3 de aproximadamente 15:1, podendo chegar até 20:1 em alguns países (FUNAHASHI, 2008). Esta relação pode levar a uma produção desbalanceada de eicosanóides, o que tem sido associado ao desenvolvimento de inúmeras patologias inflamatórias (SIMOPOULOS, 2006; RIEDIGER *et al.*, 2009).

A partir da década de 1970, pelos estudos de DYERBERG *et al.*, 1975, os AGPI despertaram interesse, pois revelaram que populações que ingerem dietas ricas em peixes têm baixa incidência de doenças cardíacas coronarianas e infarto do miocárdio. Desde então, inúmeros estudos *in vivo* e *in vitro* tem mostrado que o AGPI n-3 estão envolvidos na redução da inflamação e participam na prevenção de certas doenças crônicas, como doenças cardiovasculares, artrite reumatóide, colites ulcerativas e desordens de pele. (CHÊNE *et al.*, 2007; SANKARAN *et al.*, 2007; FUNAHASHI, 2008; SALA-VILA *et al.*, 2008). Além dos benefícios na prevenção e no desenvolvimento do câncer (CHÊNE *et al.*, 2007; TROMBETTA *et al.*, 2007; NAGAO; YANAGITA, 2008; TANAKA *et al.*, 2008). Estes achados levaram aos profissionais de saúde a encorajar a população em geral a aumentar o consumo de n-3 (RIEDIGER *et al.*, 2009).

1.3 EFEITOS DOS AGPI n-3

É bem conhecido que os AGPI n-3 modificam a composição lipídica das membranas, alteram microdomínios envolvidos na compartimentalização, modulação e interação dos componentes de sinalização celular (MASSARO *et al.*, 2008). Os ácidos graxos liberados pelos fosfolipídios de membrana são importantes moléculas sinalizadoras (BIONDO *et al.*, 2008). Podem atuar como segundo mensageiro nas vias de transdução de sinal, assim como modular moléculas participantes das respostas celulares a sinais extracelulares (SIMOPOULOS, 2006).

Os ácidos graxos linoléico e α -linolênico e seus derivados, são importantes componentes de membranas celulares de animais e vegetais. Quando indivíduos

ingerem AGPI n-3 presentes no óleo de peixe, há substituição parcial de AGPI n-6, especialmente o ácido araquidônico (AA), nas membranas de provavelmente todas as células (SIMOPOULOS, 2002).

Muitos estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que os ácidos graxos n-3 podem reduzir a geração de prostaglandinas, derivadas do ácido araquidônico, e outros mediadores, seguido de estímulo inflamatório (CHÊNE *et al.*, 2007; REN; CHUNG, 2007; CHAPKIN, *et al.*, 2008; MASSARO *et al.*, 2008). Consumo aumentado de EPA e DHA, encontrados tipicamente no óleo de peixe, resultam no aumento das proporções desses ácidos nos fosfolipídios de membrana em células inflamatórias, competindo com AGPI n-6 como substrato. Portanto, tendo menos substratos disponíveis, haverá diminuição da síntese de eicosanóides pelas células inflamatórias (SIJBEN; CALDER, 2007). Somando a modulação dos AGPI n-3 na geração de eicosanóides, estudos recentes têm identificado um novo grupo de mediadores: as resolvinas série-E, formadas a partir de EPA por COX-2 e LOX e resolvinas série-D derivadas de DHA, que parecem exercer ações antiinflamatórias (CALDER, 2006a; SIJBEN; CALDER, 2007). Apesar de inúmeras pesquisas sobre a eficácia dos AGPI n-3, como EPA e DHA, no tratamento de doenças inflamatórias, muitos mecanismos moleculares responsáveis pelos efeitos biológicos, permanecem desconhecidos (CHAPKIN, *et al.*, 2008; SALA-VILA *et al.*, 2008; WEAVER, 2009).

Pesquisas evidenciam que ácidos graxos podem alterar a transcrição de genes específicos. Alguns dos efeitos transcricionais dos AGPI parecem ser mediados pelos eicosanóides, porém outras vias independentes também podem ser utilizadas (CALDER, 2006b; SIMOPOULOS, 2006). Sugere-se que a presença de altas concentrações de AGPI n-3 ou mudanças na razão entre n-6:n-3, podem modular a expressão de genes envolvidos no processo inflamatório. Isto ocorre através de ações diretas em vias de sinalização, na ativação de um ou mais fatores de transcrição, como fator nuclear kappa B (NFkB) e receptores ativados pela proliferação de peroxissomos (PPARs) (NASROLLAHZADEH, 2008; WEAVER, 2009). Os mecanismos que tentam explicar, em parte, os efeitos antiinflamatórios do EPA e DHA, estão relacionados com a diminuição da expressão de vários genes, incluindo NFkB, citocinas pró-inflamatórias e genes envolvidos na síntese de eicosanóides, como a enzima ciclooxigenase 2 (COX-2) (BOUWENS, 2009; CHAPKIN, 2009).

O fator nuclear kappa B (NFkB), é um dos fatores de transcrição que regula a expressão de genes alvos, envolvidos em processos inflamatórios, adesão celular,

apoptose, ativação do ciclo celular e carcinogênese. Quando ativado, o NF- κ B bloqueia a morte celular programada ou apoptose (HARDMAN, 2004).

Estudos demonstraram que ácidos-graxos poliinsaturados e certos produtos de sua oxidação, são capazes de se ligar e ativar os receptores ativados pela proliferação de peroxissomos (PPARs), que são receptores nucleares que regulam a expressão de genes alvos, relacionados com o metabolismo lipídico, homeostase da glicose e processos inflamatórios (CHÊNE *et al.*, 2007). Estudos *in vitro* e *in vivo* evidenciaram que os ligantes destes receptores podem ser efetivos na redução do crescimento e invasividade em várias linhagens celulares tumorais (NASROLLAHZADEH, 2008). Apesar de aparentemente não haver especificidade entre os AGPI, sugere-se que estes receptores nucleares podem contribuir com as propriedades anticancerígenas atribuídas ao DHA em conjunto com outros mecanismos mediados por ele (SIDDIQUI *et al.*, 2008).

Tem sido demonstrado que o ácido α -linolênico (ALA), EPA ou DHA reduzem a expressão gênica do fator de necrose tumoral (TNF α) e interleucina (IL-1 β) em condrócitos bovinos. Similarmente, camundongos suplementados com óleo de peixe apresentam diminuição na quantidade de mRNA de inúmeras citocinas inflamatórias, incluindo IL-1 β , IL-6, and TNF α nos rins, baço e macrófagos peritoneais. Experimentos em humanos saudáveis com dieta controlada e suplementados com óleo de peixe EPA (775 mg EPA/dia) sugerem que alterações nas razões de AGPI n-6 e n-3 provavelmente influenciam nas respostas inflamatórias. Esta capacidade deve-se em parte pela capacidade destes ácidos graxos ou de seus metabólitos regular a expressão de genes relacionados com a transdução de sinal que possam bloquear a expressão de citocinas em nível transcricional (WEAVER, 2009).

Dietas ricas em AGPI n-3 geralmente atenuam concentrações elevadas de COX-2. A participação de EPA e DHA na modulação da expressão gênica e síntese protéica de COX-2 em estudos *in vivo*, assim como *in vitro* tem sido documentados (SANKARAN *et al.*, 2007). Estudos demonstraram que a expressão do mRNA de COX-2 está reduzida em várias linhagens celulares de câncer, quando incubadas com EPA e DHA. Quando utilizado outros modelos experimentais, estes mesmos resultados foram confirmados (SANKARAN *et al.*, 2007; SIDDIQUI *et al.*, 2008). Outros estudos evidenciaram uma redução da expressão de COX-2, acompanhada pela diminuição das concentrações de PEG₂ no sobrenadante de células HT-29 cultivadas na presença de EPA ou DHA (SIDDIQUI *et al.*, 2008).

Estudos prévios em nosso laboratório demonstraram que uma dieta rica em óleo de peixe diminui o crescimento do tumor de Walker-256 em ratos, podendo inibir o metabolismo do ácido araquidônico pela COX-2, agindo na diminuição da proliferação e desenvolvimento tumoral por este mecanismo (BONATTO *et al.*, 2004; MUND *et al.*, 2007).

1. 4 CICLOOXIGENASES (COXs)

As ciclooxigenases (COXs) ou prostaglandinas H sintases, são enzimas que catalisam etapa limitante na produção de prostaglandinas (PGs) e tromboxanas (TX), a partir do ácido araquidônico (AA) presente nos fosfolipídios das membranas celulares (CHÊNE *et al.*, 2007; VISSCHER *et al.*, 2008). Existem duas principais isoformas conhecidas, a COX-1 e a COX-2, que são altamente conservadas e podem ser encontradas no lúmen do retículo endoplasmático e envelope nuclear (CHANDRASEKHARAN; SIMMONS, 2004; VISSCHER *et al.*, 2008). Em algumas situações, podem ser encontradas nos corpos lipídicos, mitocôndrias, vesículas e núcleo, porém seu envolvimento nestas estruturas ainda não está bem esclarecido (CHANDRASEKHARAN; SIMMONS, 2004). Apesar das isoformas terem aproximadamente 60% de semelhança na seqüência de aminoácidos, são derivadas de dois distintos genes localizados em dois diferentes cromossomos. Além disso, são codificadas por dois diferentes RNAs mensageiros (mRNA) de tamanhos distintos (CHANDRASEKHARAN; SIMMONS, 2004; PANDEY *et al.*, 2008). As funções exatas de COX-1 e COX -2 ainda não foram completamente elucidadas, além disso, variantes de COXs derivadas de *splicing* alternativos têm sido documentadas (CHANDRASEKHARAN; SIMMONS, 2004; PANDEY *et al.*, 2008; VISSCHER *et al.*, 2008).

O grupo de mediadores lipídicos, derivados do metabolismo enzimático do ácido araquidônico, iniciados pela COX, são denominados prostanóides, que incluem as prostaglandinas (PGs) e as tromboxanas (TXs) (CRYER; DUBOIS, 1998). Cada prostanóide age em receptores específicos ligados a proteína G da superfície celular ou em receptores nucleares como PPAR δ e γ (CHANDRASEKHARAN; SIMMONS, 2004). Devido à variedade de mediadores que podem ser sintetizados via COX, e pela capacidade destes de interagirem com diferentes receptores, os efeitos biológicos da

COX podem ser diversos e complexos, dependendo do prostanóide produzido e de sua interação com receptores (HAO; BREYER, 2008). (FIGURA 4)

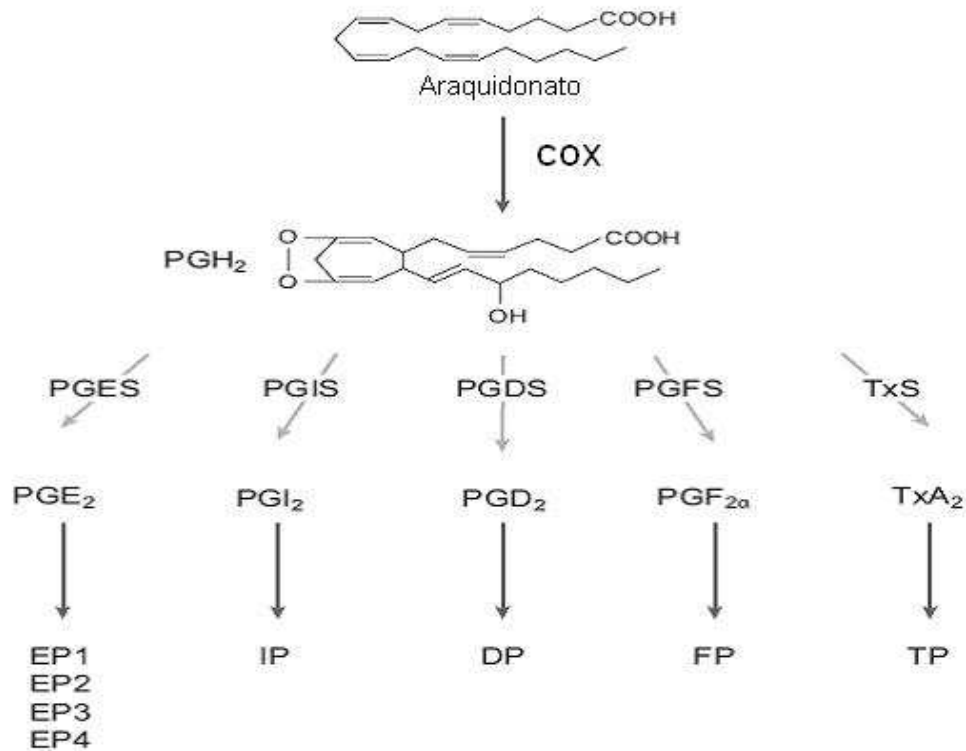


FIGURA 4 - Via da ciclooxygenase (COX). Metabolismo de ácido araquidônico (araquidonato). Primeiro COX converte o ácido araquidônico em PGH_2 , que é metabolizado em cinco prostanóides bioativos- PGE_2 , PGI_2 , PGD_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ e TxA_2 pelas suas respectivas sintases, PGES , PGIS , PGDS , PGFS , e TxS . Estes prostanóides agem em seus respectivos receptores: EP1-4 , IP , DP , FP e TP , exercendo efeitos biológicos distintos. Adaptado de HAO; BREYER, 2007.

Acreditava-se que toda a síntese de prostanóides era devida apenas a uma isoforma da COX. Por volta de 1990, foi descoberto que a COX existia em duas principais isoformas, COX-1 e COX-2 (CRYER; DUBOIS, 1998). A COX-1 é expressa constitutivamente, em uma grande variedade de tecidos, sendo responsável por concentrações fisiológicas de prostaglandinas necessárias para manutenção da homeostasia celular e agregação plaquetária (CHANDRASEKHARAN; SIMMONS, 2004). Em contraste, COX-2 é altamente induzível e normalmente está ausente nas células, porém, pode ser expressa em muitos tecidos ou células em resposta a lesões, inflamação, ativação celular, fatores de crescimento, endotoxinas de bactérias e promotores de tumor (HAN *et al.*, 2003; PATEL *et al.*, 2007 ; ZHANG *et al.*, 2007).

Alguns estudos indicam que COX-2 também possui funções constitutivas, tendo uma participação crítica no desenvolvimento dos rins, ovulação e parto, assim como importante participação na manutenção da homeostasia cardiovascular (HAO; BREYER, 2008; PATEL *et al.*, 2007). Várias observações sugerem que quando COX-1 e COX-2 são coexpressadas em células individuais, podem formar heterodímeros, que facilitam a biossíntese de prostanóides pela COX-1 (HAO; BREYER, 2008).

Estudos prévios mostraram que a COX-2 é regulada tanto em nível transcricional quanto pós-transcricional (ZHANG *et al.*, 2007). Em alguns casos, a indução de COX-2 foi primariamente devido ao aumento da estabilidade do mRNA, enquanto em outros era induzida predominantemente pela ativação transcricional, onde os fatores de transcrição envolvidos na ativação eram dependentes do tipo celular e do estímulo envolvido (ZHANG *et al.*, 2007; HARUNA *et al.*, 2008). A análise do gene da COX-2 revelaram a existência de diversos elementos regulatórios em potencial, incluindo um TATA box e sítios de ligação para os fatores de transcrição; fator nuclear kappa B (NF- κ B), fator nuclear IL6 (NF-IL6), proteína ativadora (AP-1 e AP-2), proteína ligadora de TATA (TBP) e elemento responsivo de cAMP (CRE). Variações nestes sítios de ligação podem afetar a transcrição do gene, alterando a expressão de COX-2 (CHÊNE *et al.*, 2007; REN; CHUNG, 2007; HARUNA *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2008).

1.5 PAPEL DA COX-2 NO CÂNCER

A inflamação crônica aumenta a iniciação do câncer, e várias linhas de pesquisa sugerem a participação de marcadores inflamatórios, como citocinas (TNF, IL-1, IL-6), enzimas (COX-2, LOX) e moléculas de adesão, sugerindo que a inflamação crônica esteja intimamente relacionada com as vias tumorigênicas (TORREZINI, 2008).

A COX-2 tem recebido especial atenção como potencial alvo molecular na terapia e prevenção de cânceres humanos (HASAN, 2008). Suas propriedades pró-tumorigênicas são geralmente mediadas pela geração de prostanóides, sendo a PGE₂ uma das responsáveis pela indução da proliferação celular, aumento da angiogênese, invasão e metástase (VISSER *et al.*, 2006; CHÊNE *et al.*, 2007; HASAN, 2008).

Células neoplásicas são conhecidas por modular a regulação da expressão de COX-2 durante a progressão tumoral. Por isso, terapias baseadas na inibição de COX-2 podem ser alcançadas pela regulação ou normalização de vias de sinalização, que são únicas para cada tipo celular (VISSER *et al.*, 2006). Evidências epidemiológicas e

estudos em animais e clínicos, incluindo modelos de camundongos modificados geneticamente, demonstram que a COX-2 tem participação significativa no desenvolvimento de alguns tipos de cânceres, incluindo, cólon, mama, pulmão, bexiga, pele e pâncreas (OKAMOTO *et al.*, 2003; CHÊNE *et al.*, 2007).

Acredita-se que COX-2 exerça efeitos promotores de tumor pelo aumento da sobrevivência celular e regulação de vias de sinalização envolvidas na angiogênese, inflamação e imunovigilância, contudo, moléculas importantes envolvidas na mediação destes efeitos, ainda não foram completamente elucidadas (VISSER *et al.*, 2006; REN; CHUNG, 2007; BOUZOURENE *et al.*, 2008; VISSCHER *et al.*, 2008). A expressão de COX-2 está presente em vários cânceres, e inibidores seletivos de COX-2 reprimem o crescimento de células por indução da parada do ciclo celular G0/G1 e depois geram apoptose (VISSER *et al.*, 2006). A expressão da COX-2 está relacionada a um prognóstico ruim em vários cânceres humanos, sendo estes resultados também encontrados em modelos animais (VISSER *et al.*, 2006; PANDEY *et al.*, 2008). A participação de COX-2 em câncer de cólon tem sido extensivamente estudada. Sua expressão normalmente é indetectável em células intestinais, mas aparece elevada em mais de 85% dos adenocarcinomas (SIDDIQUI *et al.*, 2008). Estudos sugerem que a COX-2 está envolvida na formação de tumores em estágios iniciais, chamado adenoma, num processo de formação adenoma-carcinoma (HARADA *et al.*, 2007). Vários estudos demonstraram que a expressão da COX-2 está elevada em neoplasia coloretal em humanos, tornando a COX-2 um alvo em potencial para quimioprevenção (BOUZOURENE *et al.*, 2008). Devido à importância da COX-2 na gênese do câncer há enorme interesse em modular sua atividade, pois existem fortes evidências de sua participação na iniciação, transformação, progressão, e metástase (PANDEY *et al.*, 2008).

Estudos prévios do Laboratório de Metabolismo Celular, UFPR, demonstraram que o óleo de peixe, rico em AGPI n-3, é capaz de reduzir o crescimento tumoral e o grau de caquexia em ratos portadores de tumor de Walker 256 (BONATTO *et al.*, 2004; PINTO *et al.*, 2004; PIZATO *et al.*, 2005; MUND *et al.*, 2007). Alterações indiretas na expressão gênica pode ser um importante mecanismo na qual AGPI n-3 exercem seus efeitos benéficos em condições patológicas, como o câncer. Utilizando algumas ferramentas de biologia molecular, objetivamos acessar informações em nível de organização biológica diferente das demais, podendo auxiliar no nosso entendimento do efeito da suplementação com óleo de peixe em ratos portadores de tumor de Walker

256. Devido à importância da expressão de COX-2 na gênese do câncer há enorme interesse em modular sua atividade, pois existem fortes evidências de sua participação na iniciação, transformação, progressão, e metástase. Apesar dos mecanismos moleculares permanecerem desconhecidos, sugere-se que os AGPI n-3 possuem a capacidade de alterar a expressão de genes envolvidos na inflamação, como o da COX-2.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo investigar o efeito da suplementação com óleo de peixe sobre a expressão gênica de COX-2 em ratos portadores de tumor de Walker 256.

2.2 Objetivos Específicos

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

- Peso do tumor.
- Síntese protéica de COX-2 no tecido tumoral.
- Expressão gênica de COX-2 no tecido tumoral.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Todos os procedimentos utilizando animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA), do Setor de Ciências Biológicas (SCB) - Universidade Federal do Paraná UFPR, certificado nº 334. (ANEXO I)

Foram utilizados ratos albinos, machos, da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), obtidos do Biotério do Setor de Ciências Biológicas, Campus Centro Politécnico, UFPR, Curitiba, Paraná. Esses animais foram mantidos em ciclo claro/escuro (12h/12h), temperatura constante ($23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) com livre acesso a água e alimento (Nuvilab-Nuvital) composto por 66% de carboidratos, 23% de proteínas, 4% de lipídios, 6% de fibras e 1% de vitaminas e minerais (PIZATO *et al*, 2005). O óleo de peixe utilizado foi doado pela Fundação *Herbarium*®. As cápsulas contêm 1g de óleo de peixe, na proporção de 0,192g de EPA e 0,124g de DHA. A gordura de coco foi adquirida no Mercado Municipal da cidade de Curitiba - PR.

O experimento contou com 54 animais utilizados em três experimentos independentes. Os animais com 70 dias de vida foram separados aleatoriamente em três grupos, de acordo com o tipo de suplementação: grupo alimentado com ração (W), grupo suplementado com óleo de peixe (WP) ou gordura de coco (WS). Estes grupos receberam suas respectivas suplementações (1g/Kg p.c.) diariamente, via oral através de micropipeta até completarem 100 dias. Após este período, todos os animais sofreram inoculação subcutânea no flanco direito, de 1 mL de suspensão de células do tumor de Walker 256, contendo 3×10^7 células/mL. Os animais continuaram sendo suplementados como descrito acima até serem ortotansados ao décimo quarto dia após a inoculação do tumor, completando 43 dias de suplementação. Durante o experimento, os animais foram pesados a cada três dias no período da manhã, em uma balança (Urano UDI 10000/1). Após serem ortotansados, a massa tumoral de cada animal foi retirada e pesada em balança digital (Denver Instrument XL-410), previamente aferida. Amostras de tecido tumoral foram removidas para realização de todos os experimentos.

3.2 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS DO TUMOR DE WALKER 256

A indução de câncer em animais e o cultivo de células neoplásicas são abordagens importantes para se investigar a dinâmica tumoral, bem como as alterações

causadas no organismo portador de tumor. Um dos modelos experimentais mais utilizados em ratos Wistar é o Tumor de Walker 256. Este tumor foi identificado por George Walker em 1928, no John's Hopkins University School of Medicine, em glândulas mamárias de uma rata prenha. O tumor de Walker 256 é caracterizado como carcinossarcoma apresentando 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. Desde sua descoberta em 1928, essa linhagem tumoral tem sido amplamente utilizada em estudos antineoplásicos e de caquexia induzida pelo tumor, por ser espécie-específica para ratos e facilmente transplantada (FERNANDES, 1995). Neste experimento foram utilizados matrizes com o tumor de Walker 256, tipo B, cedidos pelo Professor Rui Curi, USP em 1989 e, desde então mantidos pelo Laboratório de Metabolismo Celular da UFPR.

Uma suspensão de 3×10^7 células do tumor de Walker 256 tipo B (1mL) foi injetada intraperitonealmente em um rato macho da linhagem Wistar adulto. Após um período de aproximadamente cinco dias, quando constatado a ascite, o animal foi ortotansiado e injetado 10 mL de solução salina 0,9% em sua cavidade abdominal. Em seguida, seu abdômen foi massageado e, através de laparotomia mediana, retirou-se da cavidade abdominal, com pipeta Pasteur, de plástico, o fluído contendo as células tumorais. A contagem do número de células tumorais foi realizada através do uso de câmara de Neubauer na presença de azul de trypan, 10g/L. Da ascite obtida, o mesmo número de células foi inoculado no flanco direito, via subcutânea nos animais em experimento.

3.3. AVALIAÇÃO DA SÍNTESE PROTÉICA

3.3.1 Quantificação protéica

Amostras de 100mg do tecido tumoral foram fragmentadas mecanicamente com o auxílio de um homogeneizador (BOSCH® GGS27 25000 rpm/min) em tampão de lise (Tris base 100mM, EDTA 10mM, SDS 1%, Fluoreto de Sódio 100mM, Pirofosfato de Sódio 10mM, Ortovanadato de Sódio 10mM) na proporção de 1:7, centrifugados durante 5 minutos a 17949 g (Eppendorf centrifugue® 5810 R) e o sobrenadante coletado para a quantificação protéica utilizando o método de Bradford (BRADFORD, 1976). A técnica baseia-se na ligação do corante Coomassie Blue G-250 à proteína resultando em

coloração azul, a qual pode ser detectada em comprimento de onda de 595 nm. A concentração de proteínas das amostras foi calculada com base em curva padrão de proteína conhecida (Albumina Sérica Bovina). As amostras foram diluídas 10 vezes para não extrapolar a curva padrão e plaqueadas com solução de Bradford em quadruplicata em placas de 96 poços, sendo a leitura realizada em espectrofotômetro (TECAN® infinite M 200).

O cálculo da concentração protéica de cada amostra foi feito a partir da equação da reta ($y=ax+b$), sendo que y = absorvância e x = concentração de proteína. O valor de x encontrado foi multiplicado pela diluição da amostra para se obter a concentração de proteína da amostra em $\mu\text{g/mL}$.

Após quantificação protéica das amostras, foi realizada diluição das mesmas utilizando tampão de Laemmli 5X (Tris HCl 0,5M, SDS 10%, bromofenol blue 0,5%, glicerol, β -mercaptoetanol 5%) de forma a deixar todas as amostras com a mesma concentração protéica de 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. O tampão Laemmli contém SDS (dodecil sulfato de sódio) para desnaturar a proteína e prover carga negativa constante de forma que todas fiquem com a mesma carga na amostra; glicerol para dar à amostra densidade maior do que o tampão de corrida e β -mercaptoetanol (agente redutor) para desfazer pontes dissulfeto da estrutura protéica, possibilitando a separação da amostra em subunidades.

3.3.2 Eletroforese em gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE)

Este método baseia-se na migração das proteínas quando submetidas a um campo elétrico. Essa migração pode ser feita baseada na massa molecular, carga, formato ou interações com outras moléculas. Em 1970, Laemmli descreveu o método SDS-PAGE, pelo qual a migração das proteínas dá-se, principalmente, em virtude de sua massa molecular (LAEMMLI, 1960). Isso é feito pela utilização do detergente SDS que é carregado negativamente e liga-se a regiões hidrofóbicas das proteínas. Esse processo resulta em desnaturação protéica, resultando em longas cadeias de polipeptídeos e conseqüentemente na neutralização protéica. Como várias moléculas de SDS ligam-se à mesma proteína, haverá a atribuição de carga negativa, e quando submetidas a um campo elétrico migrarão para o pólo positivo. Para isso, é utilizado um gel de poliacrilamida, o qual é preparado a 4%, em que a sua concentração e a diferença de pH permitem que todas as proteínas migrem com a mesma velocidade no

início da corrida. Ao atingir o gel de separação a migração continua na dependência da massa molecular de cada proteína. Neste gel, a porcentagem de acrilamida foi de 12%, adequado para separar as proteínas; COX-2 (82kDa) e Actina (43kDa). A polimerização desta mistura iniciou-se pela adição de persulfato de amônio (APS 10%) e TEMED. Posteriormente o gel foi submetido a uma voltagem constante de 200 V por aproximadamente 50 minutos utilizando o aparato de eletroforese (BIO-RAD® Mini PROTEN). Esta separação é importante para posterior identificação das proteínas de interesse por “Western Blotting”.

3.3.3 Western-Blotting

O método Western Blotting foi descrito por TOWBIN, 1979 e baseia-se na identificação de proteínas específicas pelo uso de anticorpos mono ou policlonais. Após a separação das proteínas em SDS-PAGE, as proteínas foram eletrotransferidas (BIO-RAD® Semi-dry transfer cell) para uma membrana de nitrocelulose (BIO-RAD® TRANS-BLOT) durante aproximadamente 1 hora sob uma voltagem constante de 25 V ($5,5 \text{ mA/cm}^2$), contendo tampão de Transferência Bjerrum and Schafer-Nielsen (48 mM Tris, 39 mM glicina, 10% SDS e 20% metanol) previamente resfriado a 4°C . A membrana foi bloqueada por 1 hora à temperatura ambiente com tampão de bloqueio TBST (NaCl 4M, TrisHCl 1M, 0,05% Tween 20) contendo 5% de leite desnatado em pó (Molico, Nestlé) para evitar que anticorpos liguem-se, inespecificamente, em regiões da membrana em que não há proteínas. Posteriormente, a membrana foi incubada com o anticorpo primário (*Santa Cruz® Biotechnology*), diluídos na proporção de 1:800 o qual se ligará à proteína que está sendo analisada em tampão de bloqueio 3% a 4°C por 14 horas sob agitação. As membranas, após lavagens com TBST, foram incubadas com anticorpo secundário conjugado diluído na proporção de 1:4000 em tampão de bloqueio 3% por 2 horas à temperatura ambiente. O uso de um conjugado; anticorpo secundário específico para o anticorpo primário ligado a uma enzima HRP (horseradish peroxidase) (*Pierce®*) foi realizado a fim de visualizar a interação antígeno-anticorpo. Pela adição de substrato quimioluminescente (*West Pico Sigma®*) ($0,1 \text{ mL/cm}^2$) pode-se observar em filme Kodak® para radiografia, o sinal correspondente a proteína em questão. A densidade das bandas foi avaliada por densitometria (software Image J®), em relação à densidade da banda de um controle interno (actina).

3.4 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

3.4.1 Extração de RNA total do tecido tumoral

3.4.1.1 Preparação do Tecido

Amostras frescas de aproximadamente 100mg de tecido tumoral foram fragmentadas mecanicamente em 1mL do reagente TRizol (*Invitrogen*®) com o auxílio de um homogeneizador (Tecnal® TE 103 10.000-33.000 rpm). Após a preparação do tecido, as amostras foram armazenadas a - 80°C para posterior extração do RNA.

3.4.1.2 Extração de RNA

O RNA total do tecido tumoral foi isolado segundo as instruções do fabricante (TRIZOL *Invitrogen*®). O reagente consiste em uma solução monofásica de fenol e guanidina-isotiocianato, que deriva da melhoria do método de isolamento de RNA desenvolvido por CHOMCZYNSKI & SACCHI, 1987. Durante a homogeneização da amostra, o TRIZOL mantém a integridade do RNA enquanto rompe as células e dissolve os componentes celulares. A adição do clorofórmio, seguida de centrifugação a 12000 g (Eppendorf centrifuge® 5810 R) por 15 minutos a 4°C, separa a solução em três fases: inferior/orgânica, interfase e superior/aquosa. Os ácidos nucleicos permanecem exclusivamente na fase aquosa. Depois da transferência da fase aquosa para um novo tubo, o RNA total foi recuperado por precipitação com álcool isopropílico (PA) após centrifugação de 12000 g por 10 minutos a 4°C. Após lavagem com etanol 75% e centrifugação de 7500 g por 5 minutos a 4°C, o RNA total foi ressuscitado em água MilliQ autoclavada: preparada com DEPC 0,01% (Diethyl Policarbonato) e armazenado a uma temperatura de -80°C em alíquotas.

Amostras de tecido tumoral utilizadas nesta pesquisa apresentam alto teor protéico, grande quantidade de matriz extracelular e consistência elástica. Mesmo com a utilização de um homogeneizador, não ocorreu a total fragmentação do tecido, sendo necessária uma centrifugação adicional, de 12000 g por 15 minutos a 4°C, anterior a adição de clorofórmio, na tentativa de uma purificação melhor das amostras.

Para verificar a pureza e concentração do RNA total, uma alíquota de 2µL de cada amostra foi submetida a leitura de absorbância em espectrofotômetro (NanoDrop, ND-1000) a 260nm, para estimar sua concentração em ng/µL. A análise da pureza do RNA leva em consideração a razão entre a leitura da amostra na absorbância a 260 nm e a 280 nm, que é o comprimento de onda definido para leitura de proteínas e afins e 260nm e a 230nm, que é o comprimento de onda para leitura de compostos orgânicos. Para resultados satisfatórios em PCR em tempo real é desejável que o valor de ambas razões estejam próximas a 2,0. Todas as amostras que obtiveram razão inferior a esta, na leitura de 260nm/280nm, foram submetidas a uma correção de valores de concentrações de RNA total (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Somente as amostras com razão 260/280 e 260/230 acima de 1,90 foram utilizadas.

Para análise da integridade do RNA, uma alíquota de 4 µL de cada amostra foi submetida à eletroforese em gel de agarose a 0,8% com Tampão TAE 1X (Tris Acetato EDTA). O gel foi submetido a 75V por aproximadamente 40 minutos, corado em solução de brometo de etídio 0,5ug/mL e posteriormente visualizado diretamente em transiluminador de Ultra Violeta. A visualização de duas bandas no gel, que correspondem à subunidade maior (28S) e menor (18S) do RNA ribossomal, comprova a integridade do material isolado.

A qualidade da extração de RNA é extremamente importante, sendo esta etapa crítica para os passos subseqüentes, principalmente nas reações de PCR em tempo real. (APPLIED BIOSYSTEMS, 2006; QUIAGEN, 2009).

3.4.2 Reação de transcrição reversa

Amostras de RNA total foram submetidas à reação de transcrição reversa utilizando o kit ImProm-II *Reverse Transcription System*, (Promega®). Para a síntese da primeira fita de DNA complementar (cDNA) partiu-se da concentração de 500ng de RNA total. Foi preparada uma solução com os reagentes e suas respectivas concentrações finais: Tampão Improm II 1X, MgCl₂ (5,5mM), dNTPs (0,5mM cada), RNasin (0,4 u/µL), Enzima Transcriptase Reversa (RT) Improm II e *primer* OligodT (2,5µM), complementar à cauda poli-A, característico do mRNA. As condições de termociclagem (eppendorf MASTERCYCLER® gradient) para formação de cDNA foram: 10 minutos a 25°C para anelamento do OLigodT; 30 minutos a 48°C para extensão e 5 minutos a 95°C para inativação da enzima RT. O volume final da reação foi de 20 µL.

Para o armazenamento foram feitas alíquotas, as quais permaneceram a -20°C até a realização de ensaios de Reação de Cadeia de Polimerase (PCR). Um controle negativo, sem a adição da enzima Transcriptase Reversa (RT) foi adicionado, para excluir contaminação por DNA (QUIAGEN, 2007).

3.4.3 Desenho dos iniciadores (*primers*)

Os *primers* utilizados para amplificação dos fragmentos de DNA complementar (cDNA) específicos para cada RNA mensageiro (mRNA) foram desenhados com base na seqüência de cada gene obtida no *GeneBank*, www.ncbi.nih.gov, com auxílio do software *PRIMER 3* <http://frodo.wi.mit.edu/>. Através do software *CLUSTAL* www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html, as seqüências foram alinhadas para que fosse definido o segmento mais conservado para desenho. O conjunto de *primers* foi analisado com auxílio do software *OligoAnalyser* www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html, buscando-se, quando possível, condições de baixa energia (ΔG) para formação de dímeros, heterodímeros e grampos nas reações de PCR. Para identificação de regiões da seqüência que apresentavam alto grau de homologia com outras partes do genoma foi utilizado um banco de dados apropriado denominado BLAST <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>. Após escolha dos *primers*, estes foram sintetizados pela *Prodimol*®. O mesmo conjunto de primers foi utilizado para as etapas de PCR e PCR em tempo real.

Os estudos de quantificação relativa em PCR em tempo real exigem conjuntos de *primers* e sondas com condições específicas, sendo assim, o uso de *primers* que foram utilizados em ensaios de PCR tradicional nem sempre é recomendado, pois os critérios de desenho para PCR em tempo real podem não ter sido utilizados. O desenho entre éxons, tamanho de produto de PCR menor que 150 pb, temperatura de anelamento próximo de 60°C , são algumas condições específicas que precisam ser consideradas para os *primers* de PCR em tempo real (QUIAGEN, 2007; QUIAGEN, 2009).

Foram desenhados pares de *primers* específicos para ciclooxigenase-2 (COX-2), além dos genes do fator nuclear kappa B (NFk-B) e receptor ativado pela proliferação de peroxissomos (PPAR γ), para estudos futuros. Para análise de quantificação relativa em PCR em tempo real é necessário utilizar um gene como controle interno. Nesta pesquisa, foi utilizado como candidato o HPRT, (Hipoxantina-guanina fosforibosil-transferase), enzima que catalisa uma etapa importante na biossíntese de purinas. A

seqüência dos *primers* para HPRT foi gentilmente cedida pelo laboratório de Neurobiologia-UFPR. As seqüências de *primers* com seus respectivos tamanhos de produto de PCR em pares de bases (pb) estão apresentados a seguir:

5'ATCAGGTCATCGGTGGAGAG3' (COX-2 *forward*)

5'GCACCAGACCAAAGACTTCC3' (COX-2 *reverse*)

126pb

5'CAGGCCAGACTTTGTTGGAT3' (HPRT *forward*)

5'TCCACTTTCGCTGATGACAC'3 (HPRT *reverse*)

116pb

3.4.4 Reação de Cadeia de Polimerase (PCR)

A técnica de PCR permite a amplificação *in vitro* do DNA/cDNA para a formação de grandes quantidades de uma seqüência específica. Para que isso seja possível é necessário, além do material genético em questão, um par de *primers* (*forward* e *reverse*), que são oligonucleotídeos na forma de cadeia simples, que delimitam o tamanho do segmento a ser amplificado, quantidades adequadas de nucleotídeos livres (dNTPs) e uma DNA polimerase. Há uma especificidade na cópia de segmentos específicos pela introdução do conceito de *primer* e na utilização de uma DNA polimerase termoestável. A PCR consiste na repetição cíclica de três etapas: desnaturação, anelamento dos *primers* e extensão da fita pela DNA Polimerase. Para que essas etapas aconteçam de maneira adequada, programou-se o termociclador (Eppendorf MASTERCYCLER® gradient) com as temperaturas ótimas para cada uma dessas etapas (APPLIED BIOSYSTEMS, 2005).

A partir de cDNAs (500ng) obtidos foi realizada reação de PCR com ciclos de amplificação específico para cada gene. Os reagentes (*Fermentas*®) utilizados nas reações de PCR e suas respectivas concentrações finais foram: dNTPs (0,2 mM cada), MgCl₂ (1,5 mM), *primers* (0,5µM cada), *Taq* DNA Polimerase (0,025u/µL) e Tampão 1 x . O volume final da reação foi de 20 µL.

A maioria das reações de PCR foi realizada com a seguinte programação: desnaturação de 94 °C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de, (desnaturação 94 °C por 30 segundos; anelamento dos *primers* COX-2 e HPRT 60,5 °C por 30 segundos; extensão de 72 °C por 40 segundos), seguidos de extensão a 72 °C por 10 minuto e

hold de 4 °C. Para cada par de *primers*, as condições de termociclagem foram otimizadas.

Após reação em PCR, os produtos foram analisados por eletroforese em gel de Poliacrilamida 8% com Tampão TAE 1X (Tris Acetato EDTA). O gel foi submetido a uma voltagem constante de 100 V por aproximadamente 45 minutos e posteriormente revelado pela técnica de Nitrato de Prata 10%.

3.4.5 PCR em tempo real

A metodologia de PCR tradicional necessita de uma fase de detecção após o término da reação de amplificação, a visualização em gel. Além disso, a detecção ao final da reação limita a capacidade de diferenciar a quantidade inicial de alvos moleculares presentes em cada reação. O desenvolvimento da PCR em tempo real resultou da complementação da técnica de PCR com tecnologia de fluoróforos, óptica e informática. Esta tecnologia prevê a detecção do produto de amplificação à medida em que vai sendo formado, ao contrário do método original. É esta propriedade de permitir avaliação da reação de PCR em sua fase exponencial que qualifica a PCR em tempo real como metodologia quantitativa. Este sistema informa se está ocorrendo amplificação da molécula alvo e quantifica esta amplificação, uma vez que o software do sistema correlaciona a intensidade do sinal com a quantidade de produto amplificado formado. O procedimento utilizado para estimar a quantidade relativa das concentrações de RNA mensageiro do gene, comparando com a expressão do gene normalizador (controle interno), foi baseado na detecção em tempo real do produto de PCR utilizando o corante *SYBR Green*. Como o *SYBR Green I* se liga a todo DNA dupla-fita, o resultado é um aumento na intensidade da fluorescência proporcional à quantidade de produto gerado pela PCR (APPLIED BIOSYSTEMS, 2005).

A reação foi realizada utilizando os seguintes reagentes com suas concentrações finais: *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems®) em um volume correspondente a 50% do volume final, *primers* (0,3µM) e cDNA (5ng/µl). As reações foram realizadas em triplicata, com volume final de 10 µl. Utilizando a plataforma tecnológica Corbett Rotor-Gene 3000 (Corbett Life Sciences®) as condições de termociclagem foram: 95°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de (95°C por 15 segundos, 60°C por 15 segundos e 72°C por 30 segundos). As reações de PCR utilizadas para análise dos dados apresentaram eficiências próximas de um.

Amplificações de produtos inespecíficos foram excluídas pela análise da curva de dissociação dos produtos de PCR. A curva de dissociação é um gráfico que demonstra dados de dissociação do produto de PCR. Alterações na fluorescência são plotadas em relação à temperatura (de 60 °C a 90 °C) sendo que estas mudanças são devido à interação do corante com a dupla fita de DNA (QUIAGEN, 2007). Para minimizar possíveis variações de massa entre as amostras, é amplificado simultaneamente ao gene de interesse (alvo-COX-2), um gene normalizador (controle interno-HPRT). O gene normalizador é um gene expresso em concentrações relativamente constantes entre as diferentes células e tecidos de um organismo, em todos os estágios do desenvolvimento, sem alterações significativas pelos tratamentos experimentais. (APPLIED BIOSYSTEMS, 2006).

3.4.6 Método $2^{-\Delta\Delta CT}$

Os métodos para quantificação relativa de expressão gênica permitem quantificar diferenças no nível de expressão de um gene específico entre as várias amostras. O método CT comparativo, também conhecido como $2^{-\Delta\Delta CT}$, é amplamente utilizado pelos pesquisadores (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008). A produção de dados é expressa como uma diferença numérica dos níveis de expressão do gene estudado. A amostra empregada como base para resultados comparativos denomina-se calibrador, que representa uma vez (1X), que equivale ao valor basal de expressão gênica da célula, e todas as outras quantidades são expressos como uma diferença de número de vezes em relação ao calibrador (APPLIED BIOSYSTEMS, 2005; SCHMITTGEN; LIVAK, 2008). Nesta pesquisa, o grupo alimentado com ração (W), (grupo não tratado) foi utilizado como calibrador. O método é baseado no valor resultante da diferença entre o valor de amplificação (CT) do gene alvo (COX-2) menos o do controle interno (HPRT) da amostra tratada e a diferença do CT alvo - CT controle interno da amostra denominada calibrador. Fornecendo um valor de $\Delta\Delta CT$ [(CT alvo- CT controle interno) amostra tratada - (CT alvo - CT controle interno) calibrador]. A análise quantitativa relativa é dada pelo valor de $2^{-\Delta\Delta CT}$. Assim, os dados podem ser interpretados como a expressão do gene alvo relativo ao controle interno na amostra tratada comparado ao calibrador (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

Alguns passos importantes devem ser seguidos no delineamento experimental para análise da expressão gênica através do método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Desenhos experimentais inadequados podem levar a resultados inconsistentes, comprometendo a confiabilidade

da pesquisa (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; SCHMITTGEN; LIVAK, 2008; BUSTIN *et al.*, 2009).

1. Selecionar e validar um gene de controle interno, para determinar se sua expressão não é afetada pelo tratamento experimental;
2. Realizar a validação do gene alvo e do controle interno para assegurar que suas eficiências sejam similares;
3. Apresentar cada amostra separadamente, calculando a média dos resultados após o cálculo de $2^{-\Delta\Delta CT}$.

3.4.7 Seleção do gene candidato a controle interno (HPRT)

O controle interno adequado é aquele que mesmo em condições experimentais, não apresenta alterações significativas de sua expressão entre os grupos controle e submetidos à intervenção (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008; BUSTIN *et al.*, 2009). Contudo, se a expressão do gene for alterada, os resultados obtidos podem estar incorretos, sugerindo que esta variabilidade possa afetar de maneira significativa os resultados de uma pesquisa (DHEDA *et al.*, 2005). Para determinação do efeito do tratamento na expressão do gene candidato (HPRT), foi aplicado o método $2^{-\Delta CT}$. Este método pode ser utilizado para analisar dados de expressão gênica relativa, quando apenas um gene está sendo avaliado (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). O valor resultante da diferença entre o valor de amplificação (CT) do gene HPRT, fornece um valor de ΔCT (CT grupo tratado - CT grupo não tratado).

3.4.8 Validação da Eficiência de Amplificação do Gene Alvo e Controle Interno

Para que o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ seja validado, deve-se assumir que a eficiência de amplificação do gene alvo (COX-2) e a eficiência de amplificação do controle interno (HPRT) devem ser aproximadamente iguais. (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008). A amostra no experimento de validação deve expressar ambos os genes, alvo e controle interno (QIAGEN, 2009). A avaliação das eficiências relativas de amplificação é alcançada pela corrida de curvas obtidas através de reações de PCR feitas a partir de diluições seriadas de cDNA do calibrador, que significa a amostra utilizada como a base para resultados comparativos (grupo W). Para determinar se as reações de amplificação apresentaram a

mesma eficiência, foi observado como o ΔCT (CT alvo - CT controle interno) variou com a diluição do calibrador. Estes valores são representados em gráfico de regressão linear. Se as eficiências das duas reações forem equivalentes, os valores de ΔCT permanecem relativamente constantes e o gráfico apresenta um *slope* menor que 0,1 (QIAGEN, 2009).

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) dos grupos experimentais. A análise estatística utilizada foi a análise de variância de uma via (ANOVA), seguida de pós-teste de Bonferroni para um nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Os dados da validação da eficiência de amplificação do gene alvo e controle interno foram apresentados em Regressão Linear. O software utilizado foi GraphPad Prism®.

4 RESULTADOS

4.1 PESO TUMORAL

Na FIGURA 5 estão apresentados os dados de peso (g) do tumor dos animais alimentados com ração (W), suplementados com óleo de peixe (WP) ou com gordura de coco (WS). O peso do tumor no grupo W foi de $13,18 \pm 1,58$, e no grupo WP de $5,40 \pm 0,88$, o qual foi 2,44 vezes menor ($p < 0,05$). A suplementação com gordura de coco leva a um peso tumoral de $11,93 \pm 1,75$, o qual foi similar ao do grupo alimentado com ração (W) e 2,21 vezes maior que o do grupo suplementado com óleo de peixe ($p < 0,05$).

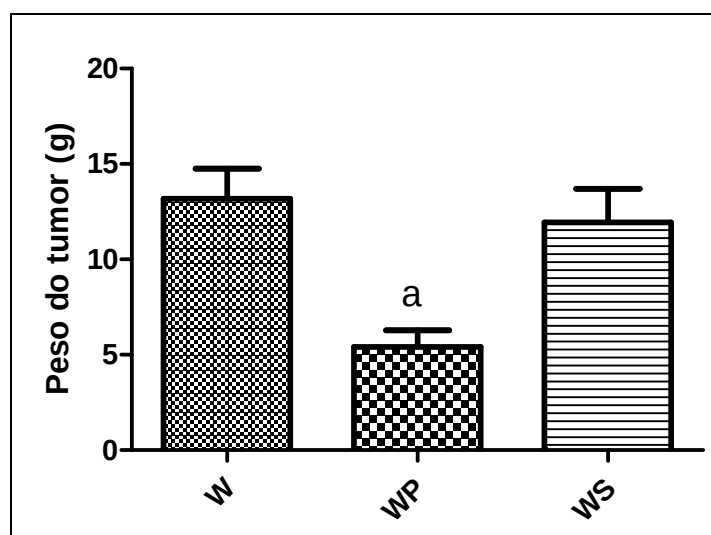


FIGURA 5 - Peso (g) do tumor obtido nos grupos alimentados com ração (W) $n=13$, suplementado com óleo de peixe (WP) $n=16$ ou com gordura de coco (WS) $n=17$. Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM, a $p < 0,05$ vs. W e WS. Os dados são representativos de três experimentos independentes.

4.2 SÍNTESE PROTÉICA DE COX-2 NO TECIDO TUMORAL

Na FIGURA 6 estão apresentados os dados da síntese protéica de COX-2, no tecido tumoral dos animais alimentados com ração (W), suplementados com óleo de peixe (WP) ou com gordura de coco (WS). A suplementação com óleo de peixe reduziu significativamente a síntese de COX-2 no tecido tumoral em 1,76 vezes quando comparada à do grupo W ($p < 0,05$) e 1,65 vezes à do grupo WS. Em adição, a suplementação com gordura de coco (WS), não alterou de forma significativa o padrão

da síntese de COX-2 quando comparada à do grupo alimentado com ração (W). Os valores foram normalizados utilizando a actina como controle interno.

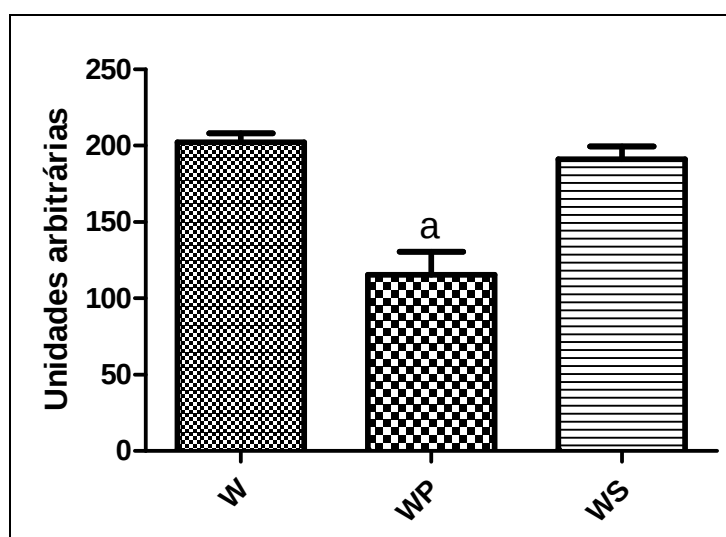
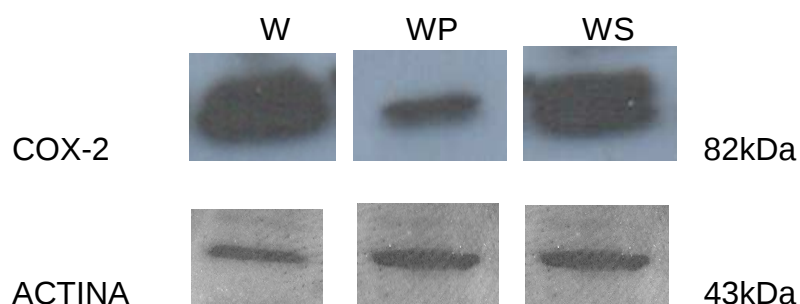


FIGURA 6 - Síntese protéica de COX-2 no tecido tumoral obtido nos grupos alimentados com ração (W) n=7, suplementado com óleo de peixe (WP) n=6 ou com gordura de coco (WS) n=6. Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM, a $p < 0,05$ vs. W e WS. Os dados são representativos de três experimentos independentes.

4.3 OTIMIZAÇÃO DOS PRIMERS DE COX-2 E HPRT

Antes de utilizarmos as amostras de tecido tumoral, foram realizados alguns experimentos com amostras de tecido neuronal de ratos, para verificação dos *primers*. Foram realizadas reações com gradiente de temperatura variando entre 50°C e 63°C, sendo a de 60,5 °C selecionada como temperatura de anelamento.

Além disso, foram testadas outras condições de termociclagem como, tempo e número de ciclos, até chegar a valores ideais.

Na FIGURA 7, pode-se confirmar a funcionabilidade dos *primers* em uma mesma reação de PCR, utilizando como temperatura de anelamento 60,5°C. A presença de uma banda específica de 126pb (COX-2) e 116pb (HPRT) demonstra que houve amplificação do produto de PCR. A ausência de bandas extras indica a amplificação de um produto específico, sem contaminação ou formação de dímeros de *primers* na reação.

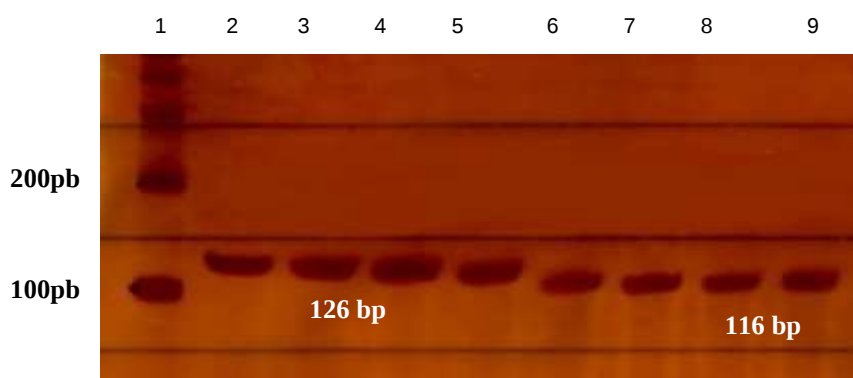


FIGURA 7 - Visualização em gel de poliacrilamida 8% corado com Nitrato de Prata do produto amplificado da reação de PCR utilizando os *primers* da COX -2 e HPRT. Na coluna 1- marcador de massa molecular (100pb DNA ladder plus) em pares de bases (pb). Da coluna 2 a 5- amostras de cDNA (100 ng) de tecido neuronal de ratos com *primers* da COX-2. Coluna 6 a 9 - amostras de cDNA (100 ng) de tecido neuronal de ratos com *primers* do HPRT. Todas as amostras apresentaram amplificação do produto: COX-2 (126pb) Coluna 2 a 5 e HPRT (116pb) coluna 6 a 9.

Após a otimização das condições de termociclagem em PCR convencional, foram utilizados *primers* nas amostras de cDNA de tecido tumoral. Como as amostras apresentaram alta concentração de RNA total (acima de 1µg/µL), partiu-se de 500ng de cDNA. Pode-se visualizar na FIGURA 8, a presença de uma banda específica, indicando que houve a amplificação do gene da COX-2 (126pb). A reação de PCR utilizando os *primers* do HPRT em tecido tumoral também apresentou uma banda específica (116pb), indicando amplificação (dados não apresentados).

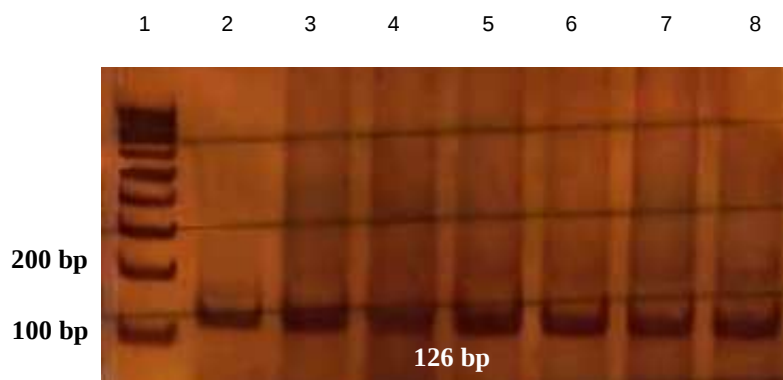


FIGURA 8 - Visualização em gel de poliacrilamida 8% corado com Nitrato de Prata do produto amplificado da reação de PCR utilizando os primers da COX-2. Na coluna 1- marcador de massa molecular (100pb DNA ladder plus) em pares de bases (pb); Coluna 2- tecido neuronal (100ng). Amostras de cDNA (500ng) do tecido tumoral: Coluna 3 e 4- grupo controle sem suplementação (W); Coluna 5 e 6- grupo suplementado com gordura de coco (WS); Coluna 7 e 8- grupo suplementado com óleo de peixe (WP). Todas as amostras apresentaram uma banda de 126pb, indicando que houve amplificação do gene específico de COX-2.

4.4 SELEÇÃO DO CONTROLE INTERNO PARA AS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Na FIGURA 9 está representado a quantidade relativa de cDNA (50ng) na reação de PCR em tempo real utilizando o gene HPRT. Os dados estão representados pela equação $2^{-\Delta CT}$, onde ΔCT (CT grupo tratado - CT grupo não tratado). Apesar de um aumento da expressão de HPRT no grupo tratado com óleo de peixe (WP) ou com gordura de coco (WS) quando comparado a do grupo não tratado (W), não houve diferença significativa entre os grupos, $p=0,1940$. Isto torna este gene adequado para utilização como controle interno nesta pesquisa.

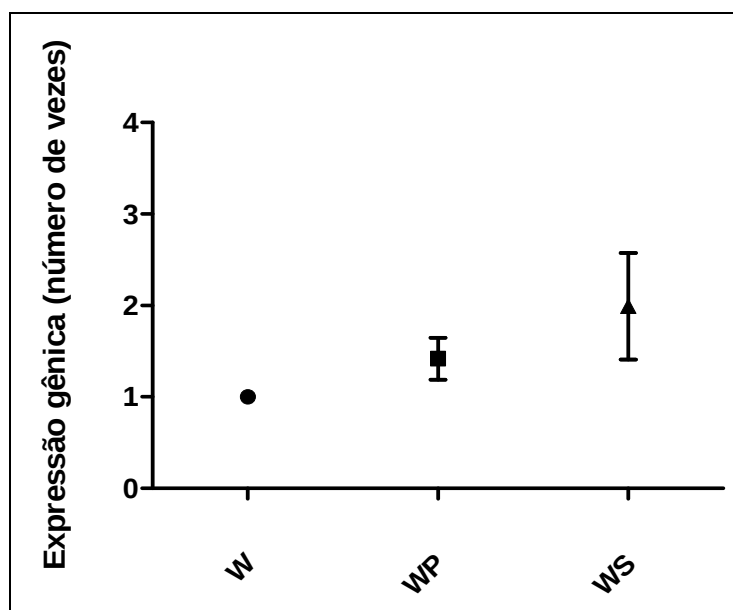


FIGURA 9 - Efeito do tratamento experimental na expressão do gene candidato a controle interno (HPRT) aplicando-se o método $2^{-\Delta CT}$. Reação em PCR em tempo real utilizando amostras de cDNA (50ng) em triplicata. Nos grupos não tratado (W) n=4, tratado com óleo de peixe (WP) n=5 ou com gordura de coco (WS) n=5, não houve alteração significativa na expressão do gene HPRT entre os grupos. Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM, com valor de $p=0,1940$. Os dados são representativos de três experimentos independentes.

4.5 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO GENE ALVO (COX-2) E DO CONTROLE INTERNO (HPRT)

Para que o cálculo de $2^{-\Delta\Delta CT}$ seja válido, a eficiência de amplificação do gene alvo e do controle interno devem ser aproximadamente equivalentes (SCHMITTGEN et al., 2000; SCHMITTGEN; LIVAK, 2008; BUSTIN et al., 2009). Na FIGURA 10 estão os resultados da reação de PCR em tempo real, na qual foi construída uma curva de diluição na ordem de 5 X. Foi utilizado um *pool* de cDNA do grupo alimentado com ração (W) denominado calibrador, correspondendo a uma faixa de concentração entre 20 ng a 1,25 ng. A reação foi realizada em triplicatas para os genes alvo (COX-2) e controle interno (HPRT). O valor encontrado do *slope* da curva foi de 0,04983, significando eficiências similares entre os genes.

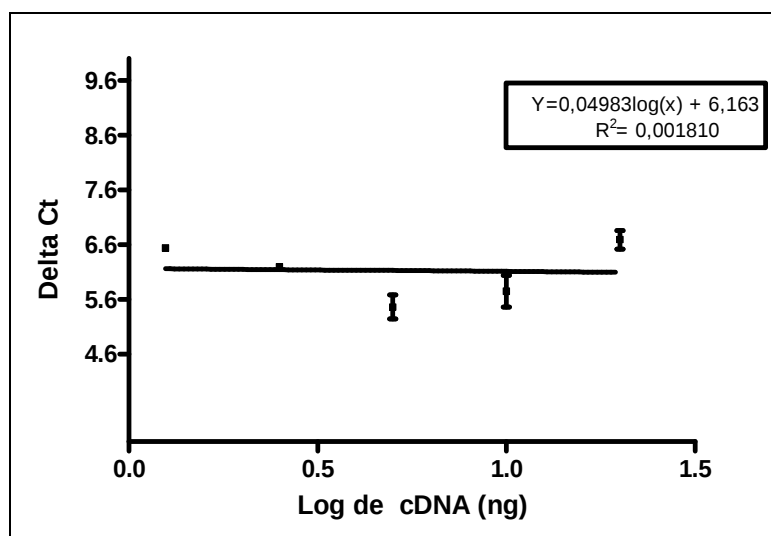


FIGURA 10 - Validação do método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Valores de ΔCT foram determinados para o gene alvo (COX-2) e do controle interno (HPRT). As diferenças nos valores de ΔCT foram plotados em relação ao log da quantidade de cDNA (20ng a 1,25ng) de tecido tumoral do grupo calibrador (W) n=4 em triplicata. Os dados foram submetidos a análise de regressão linear, na qual diferenças na eficiência de PCR foram determinadas pelo cálculo de *slope* da curva. O valor de *slope* encontrado de 0,04983 indica que os genes possuem eficiências semelhantes. Validação para PCR em tempo real (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

4.6 CURVA DE DISSOCIAÇÃO

A FIGURA 11 representa a curva de dissociação do produto amplificado de PCR em tempo real obtido a partir dos *primers* de COX-2. A curva avaliou a dissociação da dupla fita de DNA com o aumento gradativo da temperatura de 60 °C a 90 °C. A especificidade do produto amplificado foi verificada pela presença de uma única temperatura de dissociação. A curva de dissociação a partir dos *primers* de HPRT demonstrou a mesma especificidade. (dados não apresentados)

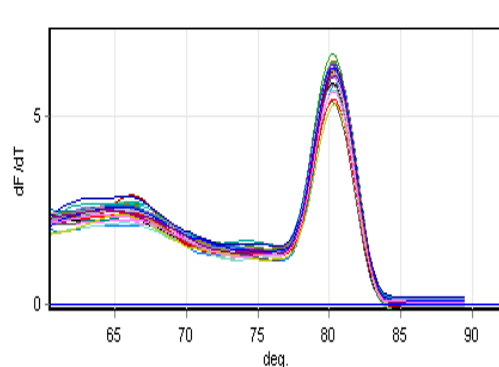


FIGURA 11 - Curva de dissociação para verificação da especificidade do produto formado por PCR em tempo real a partir dos *primers* correspondente ao gene da COX-2.

4.7 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE COX-2

Após etapas de validação e a exclusão de produtos inespecíficos pela análise da curva de dissociação, estão representados na FIGURA 12, os dados de expressão gênica de COX-2 no tecido tumoral, dos animais suplementados com óleo de peixe (WP) ou com gordura de coco (WS), após cálculo de $2^{-\Delta\Delta CT}$. A suplementação com óleo de peixe reduziu significativamente a expressão gênica de COX-2 no tecido tumoral em $5,06 \pm 1,09$ vezes ($p < 0,05$) e com gordura de coco aumentou significativamente a expressão em $11,77 \pm 1,23$ vezes ($p < 0,05$) quando comparada a do grupo calibrador (W), (não apresentado no gráfico) que representa uma vez (1X).

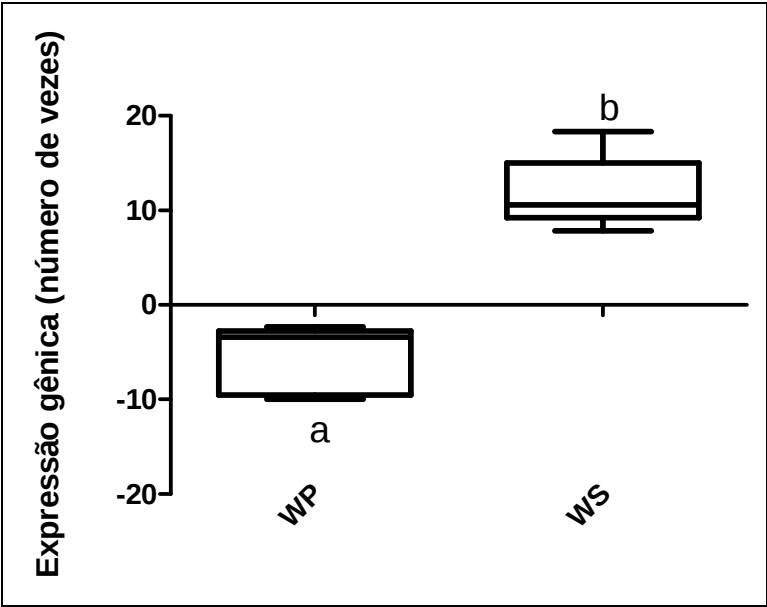


FIGURA 12- Expressão gênica de COX-2 no tecido tumoral obtidos nos grupos suplementado com óleo de peixe (WP) n=9 ou com gordura de coco (WS) n=9. Reação em PCR em tempo real utilizando amostras de cDNA (50ng) em triplicata para os genes de COX-2 e HPRT. Dados expressos como $2^{-\Delta\Delta CT}$ demonstrando redução da expressão gênica de COX-2 no grupo WP e aumento no grupo WS quando comparada a do grupo calibrador, (W) n=8. Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM, a $p < 0,05$ vs. W e WS; b $p < 0,05$ vs. W. Os dados são representativos de três experimentos independentes.

QUADRO 1 - Valores da média de CT de três experimentos independentes para determinação da quantificação relativa utilizando $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Grupo	CT COX-2	CT HPRT
W (1X)	27,55 $\pm$ 3,41	22,74 $\pm$ 2,68
WP	28,82 $\pm$ 3,06	21,86 $\pm$ 2,23
WS	27,43 $\pm$ 1,83	25,54 $\pm$ 3,78

5. DISCUSSÃO

Inúmeras pesquisas têm demonstrado que AGPI n-3 estão envolvidos na redução da inflamação e participam na prevenção de certas doenças crônicas, como doenças cardiovasculares, artrite reumatóide, colites ulcerativas, distúrbios de pele, além dos benefícios na prevenção e desenvolvimento do câncer (CHÊNE *et al.*, 2007; TROMBETTA *et al.*, 2007; NAGAO;YANAGITA, 2008; SALA-VILA *et al.*, 2008; TANAKA *et al.*, 2008). Estudos epidemiológicos, clínicos e experimentais evidenciam o potencial farmacológico e o valor nutricional de uma dieta enriquecida com óleo de peixe. Tem sido proposto que os efeitos benéficos para a saúde se devem a vários mecanismos de ação que ainda não são completamente entendidos. Entre os mecanismos relatados há as alterações estruturais e funcionais de membrana, metabolismo de eicosanóides, expressão gênica e formação de produtos de peroxidação lipídica (CHAPKIN *et al.*, 2008).

Tem sido hipotetizado que alterações na razão da ingestão de ácidos graxos n-6:n-3 na dieta ocidental pode ser responsável, em parte, pelo aumento do risco e incidência de numerosas doenças de caráter inflamatório (SIMOPOULOS, 2006). Esta relação pode levar a uma produção desbalanceada de eicosanóides, o que tem sido associado ao desenvolvimento de inúmeras patologias inflamatórias (FUNAHASHI, 2008; RIEDIGER *et al.*, 2009; WEAVER *et al.*, 2009). Além disso, são importantes determinantes de saúde, pois ambos ácidos graxos podem influenciar na expressão gênica (SIMOPOULOS, 2006).

Em 1863 foi descrito a relação entre processo inflamatório e câncer, quando se observou infiltrado de leucócitos em tecido neoplásico. Atualmente se aceita que a inflamação crônica seja um fator de predisposição para muitos cânceres (SPENCER *et al.*, 2009). A inflamação é caracterizada pela produção de citocinas inflamatórias, eicosanóides derivados do ácido araquidônico, espécies reativas de oxigênio e moléculas de adesão (CALDER, 2006a; TULL *et al.*, 2009). Além disso, fatores como prostaglandina E₂ (PGE₂), óxido nítrico (NO), COX-2 e fator nuclear kappa B (NFkB) tem participação em cascatas de inflamação e angiogênese (SPENCER *et al.*, 2009).

Estudos prévios do Laboratório de Metabolismo Celular, UFPR, demonstraram que o óleo de peixe, rico em AGPI n-3, é capaz de reduzir o crescimento tumoral e o grau de caquexia em ratos portadores de tumor de Walker 256. Estes efeitos incluem alterações nas propriedades das células tumorais como proliferação, apoptose, aumento

da taxa de peroxidação lipídica, ativação das células de defesa do organismo e a redução da síntese de COX-2 e PGE₂ plasmática (BONATTO *et al.*, 2004; PINTO *et al.*, 2004; PIZATO *et al.*, 2005; MUND *et al.*, 2007).

Modelos experimentais utilizando pequenos animais demonstram que dietas enriquecidas com AGPI n-3 possuem efeitos inibitórios na síntese de COX-2 e PGE₂ plasmática (SPENCER *et al.*, 2009). Ratos alimentados com AGPI n-3 com posterior indução de tumor de cólon apresentaram diminuição na incidência de tumor, além da redução significativa da quantidade de COX-1 e COX-2 (SPENCER *et al.*, 2009). Segundo MUND *et al.*, 2007, a redução do crescimento tumoral pode estar relacionada à modulação negativa da síntese protéica de COX-2, a qual é produzida em altas taxas no tecido tumoral. Este trabalho demonstrou redução do crescimento tumoral no grupo suplementado com óleo de peixe (WP), o qual foi 2,44 vezes menor quando comparado ao do grupo alimentado com ração (W). (FIGURA 5). Os resultados de nosso grupo de pesquisa têm demonstrado que o óleo de peixe tem a habilidade de reduzir o crescimento tumoral (PIZATO *et al.*, 2005; MUND *et al.*, 2007). Os dados obtidos com o grupo óleo de peixe vêm corroborar esses achados prévios. O grupo suplementado com gordura de coco, que é uma gordura saturada (WS), manteve o crescimento tumoral semelhante ao observado para o grupo alimentado com ração (W) e foi 2,21 vezes maior que o do grupo suplementado com óleo de peixe. Estudos indicam que uma dieta rica em gordura saturada mantém a proliferação tumoral, entretanto, já foi demonstrada a sua capacidade de elevar o crescimento tumoral e a síntese protéica de COX-2 (MUND *et al.*, 2007). A suplementação de animais com gordura saturada pode promover o agravamento do estado caquético, o que já foi verificado em ratos portadores de tumor de Walker 256 (PIZATO *et al.*, 2005; MUND *et al.*, 2007).

A expressão de COX-2 é inibida pelos glicocorticóides em nível de transcrição e tradução, enquanto esses agentes parecem ter pouco efeito sobre COX-1. Enquanto COX-2 é geralmente indetectável em tecido intestinal normal, aumento de mRNA ou proteína de COX-2 estão presentes em estágios iniciais de câncer, denominados pólipos adenomatoso (CRYER; DUBOIS, 1998). COX-2 é altamente expressa em tecido tumoral, indicando aumento da capacidade de produzir prostaglandinas (PGs) na presença de ácido araquidônico. PGE₂ é considerada promotora tumoral, pois sua inibição diminui a formação de tumor em vários modelos animais (SPENCER *et al.*, 2009; ROYNETTE *et al.*, 2003). Animais portadores de tumor de Walker 256 suplementados com óleo de peixe apresentaram redução significativa na concentração

plasmática de PGE₂ (MUND *et al.*, 2007). Sugere-se que este resultado esteja relacionado com a redução da síntese de COX-2, bem como pela competição provocada pelo aumento da concentração de EPA na membrana das células tumorais em relação ao AA (MUND *et al.*, 2007). Neste trabalho avaliamos a síntese da enzima COX-2 no tecido tumoral, mas não PGE₂ plasmática, contudo acreditamos que também esteja reduzida, conforme demonstrado por MUND *et al.*, 2007.

Os AGPI n-3 de cadeia longa presentes no óleo de peixe podem atuar de forma direta, substituindo o ácido araquidônico, como substrato para eicosanóides das séries 2 e 4 e aumentando a produção de resolvinas antiinflamatórias, e indiretamente, pela alteração da expressão de genes pela ativação de fatores de transcrição (CALDER, 2006b; DE MELLO *et al.*, 2009). Os mecanismos que tentam explicar, em parte, os efeitos antiinflamatórios do EPA e DHA, estão relacionados com a diminuição da expressão de vários genes, incluindo citocinas pró-inflamatórias e genes envolvidos na síntese de eicosanóides (BOUWENS, 2009; CHAPKIN, 2009). Através de ações em vias de sinalização, os AGPI n-3 podem atuar na ativação de um ou mais fatores de transcrição, como fator nuclear kappa B (NFkB) e receptores ativados pela proliferação de peroxissomos (PPARs) (NASROLLAHZADEH, 2008; CHAPKIN *et al.*, 2009; WEAVER, 2009). Estes dados evidenciam que alterações na expressão gênica, provavelmente pode ser um importante mecanismo na qual AGPI n-3 exercem seus efeitos em condições patológicas (WEAVER *et al.*, 2009).

O efeito da suplementação com óleo de peixe na expressão de genes relacionados com a inflamação tem sido abordado em um número limitado de estudos (CALDER, 2006b). Experimentos em humanos saudáveis, suplementados com óleo de peixe, sugerem que alterações nas concentrações de AGPI n-6 e n-3 provavelmente influenciam nas respostas inflamatórias. Esta capacidade deve-se em parte pela capacidade destes ácidos graxos ou de seus metabólitos regular a expressão de genes relacionados com as vias de transdução de sinal (SMITH, 2005; WEAVER, 2009). A inclusão de óleo de peixe na dieta de camundongos com doença autoimune reduziu o mRNA de fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucinas, IL-1 e IL-6 nos rins. Adição de EPA e DHA em cultura de condrócitos bovino diminuiu significativamente a expressão gênica de COX-2, TNF α e IL-1 α (CALDER, 2006b). EPA e DHA reduzem a expressão de fator de crescimento endotelial de vasos (VEGF), COX-2 e PGE₂ em células HT-29 cultivadas *in vitro* (SPENCER *et al.*, 2009). Em outro estudo, AGPI n-3 aumentou a expressão gênica de sindecan (SDC-1), que pode agir como molécula supressora de

tumor pela inibição do crescimento celular e indução da apoptose. Uma das seqüências regulatórias da região promotora de SDC-1 é reconhecida por membros de uma família de receptores hormonais, incluindo PPARs (SUN, 2008). Análises de microarranjo de monócitos coletados de sujeitos que receberam EPA e DHA demonstraram alterações em 1040 genes. Observou-se diminuição na expressão de genes envolvidos em vias de sinalização relacionada com processo inflamatório, como síntese de eicosanóides, sinalização de interleucinas e proteinoquinas ativadas por mitógenos (MAP quinases), além de fatores relacionados ao estresse oxidativo, hipóxia, sistema cardiovascular e sinalização via PPARs e NFκ-B (BOUWENS *et al.*, 2009).

Tem sido proposto que os AGPI n-3 podem exercer seus efeitos sobre a expressão de genes inflamatórios através de ações nas vias de sinalização intracelulares, induzindo a ativação de um ou mais fatores de transcrição, como NFκ-B (CHAPKIN *et al.*, 2009). Estudos evidenciaram que AGPI n-3 podem diminuir a atividade de NFκ-B e que EPA pode interromper sua ativação via TNF-α em cultura de células pancreáticas. Similarmente, EPA ou óleo de peixe diminuíram a expressão de NFκ-B em cultura de monócitos humanos (SANKARAN *et al.*, 2007). Os mecanismos pelo qual AGPI n-3 altera a atividade de NFκ-B, ainda não foram totalmente elucidados, entretanto, sugere-se que estes ácidos graxos modulam sua sinalização através da ativação de serino/treoninoquinase (Akt), fator de necrose tumoral (TNFα), fosfolipase C e fosforização de inibidor do fator nuclear κB (IκB) (BIONDO *et al.*, 2008).

Os receptores ativados pela proliferação de peroxissomos (PPARs) são membros de uma superfamília de receptores nucleares que regulam a expressão de genes alvos, ligando-se a elementos responsivos específicos da proliferação do peroxissomo (PPREs) (CHÊNE *et al.*, 2007). Os PPARs podem ser a chave para a regulação do metabolismo de lipídios, e associado com genes que afetam a ação da insulina e processos inflamatórios (CHÊNE *et al.*, 2007; HARUNA *et al.*, 2008). Estudos demonstram que ácidos-graxos poliinsaturados e certos produtos de sua oxidação são capazes de se ligar e ativar todas as isoformas de PPARs (PPARα, PPARγ e PPARβ) (LARSSON *et al.*, 2004; HARUNA *et al.*, 2008). A expressão gênica de COX-2 pode ser induzida pelos ligantes de PPARγ, mediado via PPRE, na região promotora de COX-2. A literatura demonstra resultados contraditórios do efeito dos agonistas de PPARγ; há diminuição da expressão de COX-2 em células, como câncer de mama e macrófagos. Entretanto, ocorre aumento da expressão de COX-2 em monócitos, células epiteliais, fibroblastos sinoviais e células de câncer de cólon (HAN *et al.*, 2003). Estas divergências

são atribuídas a diferenças nos mecanismos de ativação de PPAR γ . O recrutamento de co-fatores é necessário para ativação ou inibição da transcrição de genes selecionados. A natureza desses ligantes pode induzir o recrutamento de diferentes complexos de co-ativadores e co-repressores que podem levar a resultados opostos (HAN *et al.*, 2003; CHÊNE *et al.*, 2007; CHAPKIN *et al.*, 2009).

Sugere-se que os efeitos quimioprotetores dos AGPI n-3 também se deve a sua capacidade de modular a expressão de micro RNAs (miRNAs), uma classe de RNA endógenos que apresentam potencial regulatório. Foi demonstrado que dietas enriquecida com AGPI n-3 pode modular a expressão de miRNAs em ratos portadores de câncer de cólon. Apesar da biologia dos miRNAs ainda ser pouco entendida, já estão sendo relacionadas a diversos processos biológicos como diferenciação, proliferação celular e apoptose (DAVIDSON *et al.*, 2009).

A análise da região promotora de COX-2 revela a existência de diversos elementos regulatórios em potencial, que podem afetar a transcrição do gene, alterando a expressão de COX-2 (SIVARAMAKRISHNAN; DEVARAJ, 2009). Pesquisas têm demonstrado que a expressão de COX-2 pode ser modulada por fatores de transcrição que parecem ser específicos para cada célula. Por exemplo, a expressão de COX-2 no fígado e em macrófagos é regulada por membros de proteínas ligantes ao amplificador (EBP), enquanto em cultura glomerular são regulados principalmente por NF κ -B (SANKARAN *et al.*, 2007). Alguns fatores transcricionais estudados em células- β pancreáticas podem regular a atividade promotora de COX-2. A proteína ligante ao elemento responsivo (CREB) e o transdutor de sinal e ativador de transcrição (STAT1) podem ser alvos em potencial para a prevenção de danos causados por PGE $_2$ além de terapias anticâncer (ZHANG *et al.*, 2007).

Quando se avalia a expressão gênica, a etapa prévia de padronização e validação é crítica (BUSTIN *et al.*, 2009). Alguns passos importantes devem ser seguidos no delineamento experimental para análise da expressão gênica através do método $2^{-\Delta\Delta CT}$. A seleção e validação de um controle interno, para determinar se a sua expressão não é afetada pelo tratamento experimental; a validação do gene alvo e do controle interno para assegurar que suas eficiências sejam similares e a apresentação de cada amostra separadamente, calculando a média dos resultados após o cálculo de $2^{-\Delta\Delta CT}$. Desenhos experimentais inadequados podem levar a resultados inconsistentes, comprometendo a confiabilidade da pesquisa (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; SCHMITTGEN; LIVAK, 2008; BUSTIN *et al.*, 2009). A falta de práticas rigorosas pode

produzir conclusões errôneas, apresentando variações de dados, até mesmo resultados contraditórios em publicações. Falsos positivos ou resultados negativos podem comprometer toda uma pesquisa com implicações desastrosas, principalmente quando empregada em aplicações clínicas (BUSTIN *et al.*, 2009). O método $2^{-\Delta\Delta CT}$ é freqüentemente utilizado para avaliar a expressão gênica relativa sem nenhuma referência sobre a eficiência de amplificação de ambos os genes. Além disso, um número significativo de publicações normaliza seus dados, empregando um controle interno não-validado (BUSTIN *et al.*, 2009). Este trabalho se preocupou em seguir todas as fases de otimização, padronização e validação do protocolo experimental, desde o desenho e funcionalidade dos *primers* (FIGURA 7 e 8) até as validações em PCR em tempo real (FIGURA 9 e 10). A maior parte do tempo deste estudo foi destinada a estas etapas com o objetivo de obter dados consistentes e confiáveis.

A expressão gênica de COX-2 no tecido tumoral do grupo suplementado com óleo de peixe (WP) está diminuída significativamente 5,06 vezes, entretanto, a diminuição da síntese protéica de COX-2 no tecido tumoral foi de 1,76 vezes. O grupo suplementado com gordura de coco (WS) apresentou aumento significativo de 11,77 vezes da expressão gênica de COX-2, porém a síntese protéica não apresentou alteração significativa (FIGURA 6 e 12). Os resultados de nosso grupo de pesquisa demonstraram que o óleo de peixe tem a habilidade de reduzir a síntese protéica de COX-2 no tecido tumoral, além da redução de sua atividade, através da qual induz a formação de prostaglandinas, como a PGE₂ (MUND *et al.*, 2007). Os dados obtidos neste trabalho com o grupo óleo de peixe vêm corroborar com esses dados bem como outros da literatura.

É bem estabelecido a falta de concordância entre valores de mRNA e concentrações de proteínas. Em ambos grupos, a detecção de mRNA de COX-2 no tecido tumoral foi diferente da mensagem traduzida em proteína. Métodos de quantificação de proteínas, como Western Blotting ou imunohistoquímica nem sempre equivalem com os dados obtidos da quantificação de mRNA. Esta variabilidade do que é fornecido pelo código genético é o resultado de complexos mecanismos de controle da expressão gênica (BUSTIN *et al.*, 2009). Todas as etapas da expressão gênica, da mensagem contida no DNA até a proteína, podem ser controladas (CRYER; DUBOIS, 1998; BUSTIN *et al.*, 2009). Para a maioria dos genes, o controle transcricional é prevalente, porém, outros controles podem atuar desde o RNA até a tradução em proteínas. Para muitos genes, os controles pós-transcricionais são decisivos para

modulação da quantidade de produto originado. Estudos preliminares sugerem que a COX-2 é regulada tanto em nível transcricional quanto pós-transcricional. Em alguns casos, a indução de COX-2 é primariamente devido ao aumento da estabilidade de mRNA, enquanto em outras situações são induzidas predominantemente pela ativação transcricional (ZHANG *et al.*, 2007).

Estudos indicam que múltiplos mecanismos moleculares podem contribuir para os efeitos protetivos dos AGPI n-3 no câncer, tornando-se cada vez mais evidente sua ação pleiotrópica. A partir dessa constatação, o grande desafio será determinar e estabelecer ligações entre as inúmeras vias, na qual AGPI n-3 podem atuar (BIONDO *et al.*, 2008 ; CHAPKIN, *et al.*, 2008). A forma que os AGPI n-3 podem modular os mRNAs, influenciando as vias de sinalização e apresentando potencial regulatório, ainda não está estabelecido. Este trabalho sugere que AGPI n-3 possui a capacidade de alterar a expressão de genes inflamatórios como COX-2, envolvida nos processos de carcinogênese. Apesar dos mecanismos moleculares permanecerem desconhecidos, este pode ser um importante mecanismo na qual AGPI n-3 exercem seus efeitos benéficos no câncer. Além disso, estes resultados demonstram pela primeira vez que a suplementação com óleo de peixe é capaz de reduzir a expressão gênica de COX-2 no tecido tumoral em ratos portadores de Tumor de Walker 256.

6 CONCLUSÃO

A suplementação com 1g/Kg p.c. de óleo de peixe em ratos portadores de Tumor de Walker 256 foi capaz de:

- Reduzir o peso tumoral;
- Reduzir a síntese protéica de COX-2 no tecido tumoral;
- Reduzir a expressão gênica de COX-2 no tecido tumoral.

REFERÊNCIAS

- ANAND, P.; KUNNUMAKARA, A.B.; SUNDARAM, C.; HARIKUMAR, K.B.; THARAKAN, S.T.; SUNG, B.; AGGARWAL, B.B. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. **Pharmaceutical Research**, v.10, p.1007-1095, 2008.
- APPLIED BIOSYSTEMS. **Real-Time PCR Systems-Chemistry Guide**, Applied Biosystems Fast Real-Time PCR System and 7300/7500 Real-Time PCR Systems, 2005.
- APPLIED BIOSYSTEMS. **SYBR Green PCR Master Mix and RT-PCR Reagents-Protocol**, Applied Biosystems Fast Real-Time System, 2006.
- BIONDO, P.D.; BRINDLEY, D.N.; SAWYER, M.B.; FIEL, C.J. The potential for treatment with dietary long-chain polyunsaturated n-3 fatty acids during chemotherapy. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.19, p.787-796, 2008.
- BONATTO, S.J.R.; FOLADOR, A.; AIKAWA, J.; YAMAZAKI, R.; OLIVEIRA, H.P., VECCHI, R.; CURI, R.; CALDER, P.C.; FERNANDES, L.C. Lifelong exposure to dietary fish oil alters macrophage responses in Walker 256 tumor-bearing rats. **Cellular immunology**, v. 231, p. 56-62, 2004.
- BOUZOURENE, H.; YAN, P.; SANDMEIER, D.; ZOUHAIR, A.; MATTER, M.; VUILLEUMIER, H.; COUCKE, P. The role of COX-2 in rectal cancer treated with preoperative radiotherapy. **Virchows Arch**, v. 452, p. 499-505, 2008.
- BOUWENS, M.; REST, O.; DELLSCHAFT, N.; BROMHAAR, M.G.; GROOT, L.; GELEIJNSE, J.M.; MULLER, M.; AFMAN, L.A. Fish-oil supplementation induces antiinflammatory gene expression profiles in human blood mononuclear cells. **Journal of Clinical Nutrition**, v. 90, p. 1-10, 2009.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.G.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, W.; SHIPLEY, G.L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWERT, C.T. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.
- CALDER, P.C. The effect of dietary fatty acids on the immune response and susceptibility to infection. **Nutrition, Immunity and Infection in Infants and Children**, v. 45, p. 137-172, 2001.
- CALDER, P.C. n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.83, n.6, p. S1505-1519S, 2006a.
- CALDER, P.C. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.75, n.3, p.197-202, 2006b.

CHANDRASEKHARAN, N.V.; SIMMONS, D.L. The cyclooxygenases. **Genome Biology**, v.5, n. 9, p.230-241, 2004.

CHAPKIN, R.S.; SEO, J.; McMURRAY, D.N.; LUPTON, J.R. Mechanisms by which docosahexaenoic acid and related fatty acids reduce colon cancer risk and inflammatory disorders of the intestine. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 153, p. 14-23, 2008.

CHAPKIN, R.S.; KIM, W.; LUPTON, J.R.; McMURRAY, D.N. Dietary docosahexaenoic and eicosapentaenoic acid: Emerging mediators of inflammation. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 81, n. 1, p. 1-96, 2009.

CHÊNE, G.; DUBOURDEAU, M.; BALARD, P.; ESCOUBET-LOZACH, L.; ORFILA, C.; BERRY, A.; BERNAD, J.; ARIES, M.F.; CHARVERON, M.; PIPY, B. n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids induce the expression of COX-2 via PPAR γ activation in human keratinocyte HaCaT cells. **Molecular and Cell Biology of Lipids**, v.1771, n. 5, p. 576-589, 2007.

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

COLDITZ, G. A.; SELLERS, T. A.; TRAPIDO, E. Epidemiology-identifying the causes and preventability of cancer? **Nature Reviews**, v. 6, p.75-86, 2006.

CRYER, B.; DUBOIS, A. The advent of highly selective inhibitors of cyclooxygenase. **Prostaglandins and other Lipid Mediators**, v. 56, p. 341-359, 1998.

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

DAVIDSON, L.A.; WANG, N.; SHAH, M.S.; LUPTON, J.R.; IVANOV, I.; CHAPKIN, R. n-3 Polyunsaturated fatty acids modulate carcinogen-directed non-coding microRNA signatures in rat colon. **Carcinogenesis**, v.30, n.12, p.2077-2084, 2009.

DE MELLO, V.D.F.; ERKKILA, A.T.; SCHWAB, U.S.; PULKKINEN, L.; KOLEHMAINEN, M.; ATALAY, M.; MUSSALO, H.; LANKINEN, M.; ORESIC, M.; LEHTO, S.; UUSITUPA, M. The effect of fatty or lean fish intake on inflammatory gene expression in peripheral blood mononuclear cells of patients with coronary heart disease. **European Journal Nutrition**, v.48, p. 447-455, 2009.

DHEDA, K.; HUGGETT, J.; CHANG, J.S.; KIM, L.U.; BUSTIN, S.A.; JOHNSON, M.A.; ROOK, G.A.W.; ZULMA, A. The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization. **Analytical Biochemistry**, v. 344, p. 141-143, 2005.

DYERBERG, J.; BANG, H.O.; HJORNE, N. Fatty acids composition of the plasma lipids in Greenland Eskimos. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 28, p. 958-966, 1975.

FERNANDES, L.C. Alterações Metabólicas causadas pelo tumor de Walker 256 no músculo esquelético, linfócitos e macrófagos de ratos. Tese de Doutorado, USP, São Paulo, 1995.

FUNAHASHI, H. Opposing Effects of n-6 and n-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Pancreatic Cancer Growth. **Pancreas**, v. 36, p. 353-362, 2008.

GARCIA M, JEMAL A, WARD EM, CENTER MM, HAO Y, SIEGEL RL, THUN MJ. Global Cancer Facts & Figures. American Cancer Society, 2007.

HAN, S.; INOUE, H.; FLOWERS, L.C.; SIDELL, N. Control of COX-2 Gene Expression through Peroxisome Proliferator-Activated Receptor in Human Cervical Cancer Cells, **Clinical Cancer Research**, v. 9, p. 4627-4635, 2003.

HAO, C.; BREYER, M.D. Physiological regulation of prostaglandins in kidney. **Annual Review of Physiology**, v. 70, p. 357-377, 2008.

HARADA, K.; HIGAKI, S.; AMANO, A.; HASHIMOTO, K.; HASHIMOTO, S.; GONDO, T.; SAKAIDA, S. Reduced COX-2 expression and a reduced number of pericryptal myofibroblasts are associated with depressed adenoma of the colon. **Oncology Reports**, v. 17, p.1353-1358, 2007.

HARDMAN, W. E. (n-3) Fatty Acids and Cancer Therapy. **Journal of Nutrition**, v.134, n.12, p. 3427S-3430S, 2004.

HARUNA, H.; SHIMIZU, T.; OHTSUKA, Y.; YARITA, Y.; FUJII, Y.; KUDO, T.; YAMASHIRO, Y. Expression of COX-1, COX-2, and PPAR in the gastric mucosa of children with Helicobacter pylori infection. **Pediatrics International**, v. 50, p.1-6, 2008.

HASAN, S. Expression Analysis of the Prostaglandin E2 Production Pathway in Human Pancreatic Cancers. **Pancreas**, v. 37, n.2, p.121-127, 2008.

INCA. Estimativa 2010. Disponível em: <www.inca.gov.br/estimativa/2010> acesso em: 28. jan.2010.

LAEMMLI U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. **Nature**, v. 227, p. 680-85, 1970.

LAPILLONNE, A.; CLARKE, S.; HEIRD, W. Plausible mechanisms for effects of long chain polyunsaturated fatty acids on growth. **Journal of Pediatricians**, v.143, p.9-16, 2003.

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. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.79, p. 935-945, 2004.

LIVAK, K ; SHCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

MASSARO, M.; SCODITTI.; CARLUCCIO, M.A.; MONTINARI, M.R.; CATERINA, R. Omega-3 fatty acids, inflammation and angiogenesis: nutrigenomic effects as an explanation for anti-atherogenic and anti-inflammatory effects of fish and fish oils. **Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics**, v.1,p.4-23, 2008.

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

McCRACKEN,M.; OLSEN, M.; CHEN, M.S.; JEMAL, A.; THUN, M.; COKKINIDES; DEAPEN, D.; WARD, E. Chinese, filipino, vietnamese, korean, and japanese ethnicities cancer incidence, mortality, and associated risk factors among asian americans. **Cancer Journal of Clinicians**, v. 57, p. 190-205, 2007.

MUND, R.C.; PIZZATO, N.; BONATTO, S.; NUNES, E.; VICENZI, T.; TANHOFFER, T.; OLIVEIRA, H.P.; CURI, R.; CALDER, P.C.; FERNANDES, L.C. Decreased tumor growth in Walker 256 tumor-bearing rats chronically supplemented with fish oil involves COX-2 and PGE2 reduction associated with apoptosis and increased peroxidation. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 76, n.2, p.113-120, 2007.

NAGAO, K.; YANAGITA, T. Bioactive lipids in metabolic syndrome. **Progress in Lipids Research**, v.47, p. 127-146, 2008.

NASROLLAHZADEH, J. The influence of feeding linoleic, gamma-linolenic and docosahexaenoic acid rich oils on rat brain tumor fatty acids composition and fatty acid binding protein 7 mRNA expression. **Lipids in Health and Disease**, v.7, p. 34-45, 2008.

NOSJEAN, O.; BOUTIN, J.A. Natural ligands of PPAR γ : are prostaglandin J2 derivatives really playing the part? **Cellular Signalling**, v. 14, p. 573-583, 2002.

OKAMOTO, T.; HARA, A.; HINO, O. Down-regulation of cyclooxygenase-2 expression but up-regulation of cyclooxygenase-1 in renal carcinomas of the Eker (TSC2 gene mutant) rat model. **Cancer Science**, v. 94, p. 22-25, 2003.

OYESANYA, R.A.; LEE, P.Z.; WU, J.; CHEN, J.; SONG, Y.; MUKHERJEE, A.; DENT, P.; KORDULA, T.; ZHOU, H.; FANG, X. Transcriptional and post-transcriptional mechanisms for lysophosphatidic acid-induced cyclooxygenase-2 expression in ovarian cancer cells. **FASEB Journal**, v. 22, p. 1-23, 2008.

PANDEY,M.; PRAKASH,O.; SANTHI, W.S.; SOUMITHRAN,C.S.; PILLAI,R.M. Overexpression of COX-2 gene in oral cancer is independent of stage of disease and degree of differentiation. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 37, n. 4, p. 379-383, 2008.

PATEL, N.S.A.; CUZZOCREA, S.; COLLINO, M.; CHATERJEE, P.K.; MAZZON, E.; BRITTI, D.; YAQOOB, M.M.; THIEMERMANN,C. The role of cyclooxygenase-2 in the rodent kidney following ischaemia/reperfusion injury in vivo. **European Journal of Pharmacology**, v. 562, n. 1, p. 148-154, 2007.

PINTO J.R.; FOLADOR, A.; BONATTO, S.J.R.; AIKAWA, J.; YAMAZAKI, R.K.; PIZATO, N.; FACIN, M.; GROHS, H.; OLIVEIRA, H.H.P.; NALIWAICO, 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 tumor growth and cachexia in Walker 256 tumor-bearing Rat. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 15, p.358-365, 2004.

PIZATO, N.; BONATTO, S.J.R.; YAMAZAKI, R.K.; AIKAWA, J.; NOGATA, C.; MUND, R.C.; NUNES, E.A.; PICONCELLI, M.; NALIWAICO, K.; CURI, R.; CALDER, P.C.; FERNANDES, L.C. Ratio of n-6 to n-3 fatty acids in the diet affects tumor growth and cachexia in Walker 256 Tumor-bearing rats. **Nutrition and Cancer**, v.53, p. 194-201, 2005.

QIAGEN. Critical Factors for Successful Real-Time PCR. **Real-Time PCR Brochure Sample & Assay Technologies**, 2009.

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

REN, J.; CHUNG, S.H. Anti-inflammatory effect of r-linolenic acid and its mode of action through the inhibition of nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase gene expression via NF-KB and mitogen-activated protein kinase pathways. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p. 5073-5080, 2007.

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

ROSE, D.P.; CONNOLLY, 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 Nutrition**, v. 23, p.139-151, 2004.

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

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning: Laboratory Manual**, 3 ed., CSHL PRESS, Londres, 2001.

SANKARAN, D.; LU, J; OGBORN, M.R.; AUKEMA, H.M. COX-2 expression in cystic kidneys is dependent on dietary n-3 fatty acid composition. **Journal of Nutritional Biochemistry**,v. 18,n.12, p. 806-812, 2007.

SANT'ANA, L.S. Biochemical mechanisms involved in the Omega fatty acids digestion, absorption and metabolism. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**, v.17, n. 4, p. 211-216, 2004.

SCHMITTGEN, T.D.; ZAKRAJSEK, B.A.; MILLS, A.G.; GORN, V.; REED, MW. Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction to Study mRNA Decay:

Comparison of Endpoint and Real-Time Methods. **Analytical Biochemistry**, v. 285, p. 194 - 204, 2000.

SCHMITTGEN, T.D.; LIVAK, K. Analyzing real-time PCR data by the comparative Ct method. **Nature Protocols**, v.3, n. 6, p. 1101-1107, 2008

SIDDIQUI, R.A.; HARVEYA, K.; STILLWELL, W. Anticancer properties of oxidation products of docosahexaenoic acid. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.153, p. 47-56, 2008.

SIJBEN, J.W.C.; CALDER, P.C. Differential immunomodulation with long-chain n-3 PUFA in health and chronic disease. **Proceedings of Human Nutrition Society**, v.66, p.237-259, 2007.

SIMOPOULOS, A.P. Essential fatty acids in health and chronic disease. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 56, n. 70 5, p. 60S-9S, 1999.

SIMOPOULOS, A.P. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 21, n. 6, p. 495-505, 2002.

SIMOPOULOS, A.P. Omega-3 fatty acids and cancer. **Indoor and Built Environment**, v.12, p. 370-405, 2003.

SIMOPOULOS, A.P. Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.60, n. 9, p. 502-507, 2006.

SIVARAMAKRISHNAN, V; DEVARAJ, S.N. Morin regulates the expression of NF-kB-p65, COX-2 and matrix metalloproteinases in diethylnitrosamine induced rat hepatocellular carcinoma. **Chemico-Biological Interactions** v.180, p. 353-359, 2009.

SMITH, W.L. Cyclooxygenases, peroxide tone and the allure of fish oil. **Current Opinion in Cell Biology**, v.17, p. 174-182, 2005.

SPENCER, L; MANN, C; METCALFE, M; WEBB, M.B, POLLARD, C; SPENCER, D; BERRY, D; DENNISON, A. The effect of omega-3 FAs on tumour angiogenesis and their therapeutic potential. **European Journal Of Cancer**, v. 45, p. 2077- 2086, 2009.

SUN, H; BERQUIN, I.M OWENS, R.T, O'FLAHERTY, J; EDWARDS, I.J. Activated Receptor Mediated Up-regulation of Syndecan-1 by n-3 Fatty Acids Promotes Apoptosis of Human Breast Cancer Cells, **Cancer Res** 2008; v.68, n. 8, p. 2912-2919, 2008.

SZYMCZAK, M.; MURRAY, M.; PETROVIC, N. Modulation of angiogenesis by n-3 polyunsaturated fatty acids is mediated by cyclooxygenases. **Blood**, v. 111, p. 3514-3521, 2008.

TANAKA, Y.; GOTO, K.; MATSUMOTO, Y.; UEOKA, R. Remarkably high inhibitory effects of docosahexaenoic acid incorporated into hybrid liposomes on the growth of tumor cells along with apoptosis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 359, p. 264- 271, 2008.

TAPIERO, H.; NGUYEN BA, G.; COUVREUR, P.; TEW, K.D. Polyunsaturated fatty acids and eicosanoids in human health and pathologies. **Biomedicin Pharmacotherapy**, v. 56, p. 215-222, 2002.

TORREZINI, T.; ATHANAZIO, D.A. Cancer immunosurveillance and immunoediting: clinical implications and therapeutic potential. *Imunovigilância e Imunoedição de Neoplasias*. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 54, n. 1, p. 63-77, 2008.

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

TROMBETTA, A.; MAGGIORA, M.; MARTINASSO, G.; COTOGNI, P.; CANUTO, R.A.; MUZIO, G. Arachidonic and docosahexaenoic acids reduce the growth of A549 human lung-tumor cells increasing lipid peroxidation and PPARs. **Chemico-Biological Interactions**, v. 165, p. 239-250, 2007.

TULL, S.P.; YATES, C.M.; MASKREY, B.H.; O'DONNELL, V.O.; MADDEN, J.; GRIMBLE, R.F.; CALDER, C.; NASH, G.B.; RAINGER, G.E. Omega-3 fatty acids and inflammation: Novel interactions reveal a new step in neutrophil recruitment. **PLoS Biology**, v.7, n.8, p. 1-11, 2009.

VISSCHER, D.W.; PANKRATZ.; SANTISTEBAN, M.; REYNOLDS, C.; RISTIMAKI, R.; VIERKANT, R.A.; LINGLE, W.L.; FROST, M.H.; HARMANN, L.C. Association between cyclooxygenase-2 expression in atypical hyperplasia and risk of breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v.100, n. 6, p. 421-427, 2008.

VISSER, K, E.; EICHTEN, A.; COUSSENS, L.M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. **Nature Reviews**, v.6, p. 25-37, 2006.

WANG, X.; COLBY, J.L.; YANG, P.; FISCHER, M.; NEWMAN, A.; KLEIN, R. The resistance to the tumor suppressive effects of COX inhibitors and COX-2 gene disruption in TRAMP mice is associated with the loss of COX expression in prostate tissue. **Carcinogenesis**, v. 29, n. 1, p. 120-128, 2008.

WEAVER, K.L. Effect of Dietary Fatty Acids on Inflammatory Gene Expression in Healthy Humans. **The Journal of Biological Chemistry**, v.284, n. 23, p. 400-407, 2009.

ZHANG, X.; ZHANG, J.; YANG, X.; HAN, X. Several transcription factors regulate COX-2 gene expression in pancreatic b-cells. **Molecular Biology**, v.34, p.199-206, 2007.

ANEXOS

ANEXO 1- Certificado do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA)



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



Nº 334

CERTIFICADO

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

CERTIFICATION

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

PROCESSO: 23075.049393/2008-47

APROVADO:

18/11/2008 – R.O. 10/2008

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

AUTORES: Luiz Cláudio Fernandes, Gina Borghetti, Marcelo Duarte dos Santos, Marcelo Kryczyc, Ricardo Yamazaki, Isabela Coelho

DEPARTAMENTO: Fisiologia

Prof.ª Dr.ª Ana Maria C. Filadelfi
Coordenadora do CEEA

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)