## JULIANO ANDREOLI MIYAKE

## ESTUDO MORFOLÓGICO E MOLECULAR DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NOS PROCESSOS DE INVASÃO, MIGRAÇÃO E ANGIOGÊNESE EM GLIOMAS TRATADOS COM ÁCIDO GAMA-LINOLÊNICO

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Biologia Celular e Tecidual).

São Paulo 2009

## JULIANO ANDREOLI MIYAKE

# ESTUDO MORFOLÓGICO E MOLECULAR DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NOS PROCESSOS DE INVASÃO, MIGRAÇÃO E ANGIOGÊNESE EM GLIOMAS TRATADOS COM ÁCIDO GAMA-LINOLÊNICO

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual.

Orientador: Profa. Dra. Alison Colquhoun.

São Paulo 2009

"Move- se a mão que escreve e,

tendo escrito, segue adiante;

Nem toda a tua Piedade ou teu Saber a atrairão

de volta,

para que risque sequer metade de uma linha;

Nem todas as tuas Lágrimas lavarão uma só de

suas Palavras."

Omar

Khayyam

A minha mãe, Éda, que é o meu porto seguro. Sempre me apoiou, torceu, acalentou, deu força, incentivo, muito carinho e amor sempre!

Você é tudo para mim.

Amo-te demais.

Aos meus irmãos Jó e Fá, pelo amor irrestrito, amizade, apoio e torcida. Vocês são

importantíssimos para mim, amo e me espelho em vocês.

Aos pequenos, Lucca e Clarinha, que contarão a minha história, amo vocês.

E ao meu cunhado José Carlos, que é como um irmão.

### AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço sem palavras e de forma muito especial, a minha querida orientadora, Profa. Dra. Alison Colquhoun, a quem faz jus a palavra "orientadora". Você foi mais que minha orientadora, tornou-se minha amiga, confidente, conselheira, guru. A quem devo tudo o que sei e aprendi sobre ciência e pesquisa. Alison você sabe o quanto te admiro, e o quanto me espelho em você, quando eu crescer quero ser só um pouquinho como você (rs). Obrigado por tudo, pela confiaça e paciência (muita), por todos os ensinamentos, direcionamentos, conselhos, conversas, convívio e principalmente por ter acreditado e apostado em mim.

Também com muito carinho, agradeço ao Prof. Dr. Jarbas Arruda Bauer (Tio Bauer), por ter me aceitado em seu laboratório, aberto as portas do Instituto e me apresentado a minha orientadora, além disso, por ter me ensinado tanto sobre a histologia e sobre a vida. Tio Bauer é o que almejo ser (também só um pouquinho), um exemplo de professor (Obrigado por tudo, Tibúrcio).

#### AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a Deus, pela vida e por sempre iluminar e orientar meus caminhos e pensamentos.

Aos amigos que fiz no laboratório que perduram até hoje, Ângela e Margot (minhas queridas mães postiças!!!), Priscila, Edílson, João e todos outros. Os meus "irmãozinhos" Karina, Marcel, Alexandros, Renata, Fernanda, Andrew e Janaina que sempre se dispuseram a me ajudar, me ensinaram e fizeram da rotina diária um ambiente gostoso e descontraído de trabalho e amizade.

A todos da Universidade de Bradford, Profa. Dra Anna Nicolaou, a querida Karen Massey que me ensinou tudo de espectometria e me ajudou nas horas de sufoco. Aos colegas que fiz lá, Asha, Ngozi, George, Adnan, Joe, Karl, Nasser e Anest.

A Profa. Dra. Marília, por abrir seu laboratório (estufa, centrífuga e etc), pelas sugestões e dicas e pela pessoa querida que é. Com ela é sempre risada.

A Profa. Dra. Telma Zorn, pelas conversas, ensinamentos, inúmeros cafés e convivência. E a todos os alunos do LBR, Lu Capelo e Candeloro, Camila, Carlão, Sebastian, Fernanda, Priscila, Juliane, Marcela, Ambart, Rodolfo e Karin. Em especial meu amigo, Renato, por todos os auxílios e ajudas, e principalmente pela amizade.

Ao Prof. Dr. Emer Suavinho Ferro, pelas correções, sugestões e pelo empréstimo do Vibratome.

A todos os professores do Departamento de Biologia Celular e Tecidual, Profa. Dra. Dânia, Marinilce, Maria Inês, Eugênia, Estela, Edna, Irene, Gláucia, Patrícia e Eliane, e Profs. Dr. Paulo, Vitor, Anselmo, Sérgio, Ruy e Fábio; pois em uma disciplina, palestra ou conversa informal, sempre me ensinaram algo.

As queridas, Cleusa (e toda sua família), Emilia, Fernanda e Marley por serem pessoas especiais, e sempre prestativas.

Aos colegas e amigos que conheci durante estes muitos anos no ICB, Elo, Tati, Betinha, Marcio, Luciana, Dani, Renata, Fio, Adri, Ariane, Lu, Chayrra, Érica, Viva, Fran, Carla, Letícia, Vanessa, Fernando, Alysson, Lucas, Carla, Ana, Julio, Letícia, Carol, Kely, Loreny, Márcio e tantos outros. Valeu por tudo!!!

As "meninas" da secretária, Celiana, Elo, Beth e Ana.

Ao excelente trabalho de Gaspar, Gerson, *in memorian*, e Edson do setor de microscopia eletrônica e fotografia.

A todos os funcionários do Biotério, por cuidarem tão bem dos nossos bichinhos.

A todos os funcionários do Dept., em especial, Nancy e Virgínia.

E aos amigos e parentes que nas horas boas e difíceis estavam sempre prontas para me ouvir, ajudar ou comemorar, muito obrigado à Camila (Mimi e toda família França e Silva), Ca Muller (e família), Roberta (Preti), Mia, Glorinha, Rôs (Moreno e Reis), Fê Akao, Ca Manfrinato, Breno, família Araki (Adri, Ju, Lu, Silvia, Osvaldo e Mirian), Miyake (Ale, Adri, Tu, Luci e Oswaldo) e tantos outros. Obrigado!!!

E finalmente a Capes, CNPq e FAPESP pelo suporte finaceiro.

#### RESUMO

Miyake JA. Estudo morfológico e molecular de proteínas envolvidas nos processos de invasão, migração e angiogênese em gliomas tratados com ácido gama-linolênico [tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

Os ácidos graxos vêm sendo estudados em diversas áreas da ciência, devido sua capacidade de modular diversos processos biológicos e celulares. O Sistema Nervoso Central (SNC) é responsável por controlar as funções vitais do organismo. Dentre as inúmeras patologias que podem acometer o SNC encontra-se o Glioblastoma Multiforme (GBM), um tumor cerebral de origem astrocítica com capacidade altamente invasiva, proliferativa, e de difícil tratamento. O prognóstico dessa patologia é ruim, com sobrevida de até doze meses após sua remoção cirúrgica, que é o tratamento de escolha. O alto poder invasivo das células tumorais, levam ao surgimento freqüente de outro foco tumoral, mesmo após a cirurgia, pois ha dificuldade de remover por completo as células tumorais, sendo que essas invadem o parênquima cerebral normal e não respondem a outros tipos de tratamento (como quimioterapia e radioterapia). O ácido  $\gamma$ linolênico (GLA), vem sendo estudado em diversos tipos tumorais, inclusive no GBM, pois suas ações demonstraram eficientes como um inibidor da proliferação das células tumorais e na redução da formação de novos vasos sanguíneos que nutrem o tumor. O objetivo deste estudo foi tentar compreender e verificar algumas proteínas envolvidas no processo de invasão e angiogênese do GBM. Entre as proteínas estudadas encontram-se o VEGF e seus receptores (Flt-1 e Flk-1), as enzimas MMP-2 e COX-2 e a glicoproteina de matriz extracelular, a Tenascina-C. Observou-se também o que ocorria com essas mesmas proteínas após o tratamento com o GLA em modelo in vivo. No modelo ex vivo observamos a migração das células tumorais, índice proliferativo e apoptótico. Os resultados mostraram que o GLA foi capaz de modificar a expressão e localização de algumas das proteínas aqui estudadas. O GLA mostrou ser um promissor agente terapêutico para o GBM, já que foi visto que após a utilização do GLA nesse modelo houve redução do tamanho do tumor e da densidade de microvasos.

Alem disso, redução da proliferação e da distancia da migração das células tumorais, com aumento no número de células em apoptose.

Palavras-chave: C6; Glioma; Ácido γ-linolênico (GLA); Migração; Angiogênese; Proliferação; Apoptose; Eicosanóides.

## ABSTRACT

Miyake JA. Morphological and molecular study of proteins involved in the processes of invasion, migration and angiogenesis in gliomas treated with gamma-linolenic acid [Thesis]. São Paulo: Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo; 2009.

Fatty acids have been studied in various areas of science, because of its ability to modulate some biological and cellular processes. The Central Nervous System (CNS) is responsible for controlling the body's vital functions. There are many diseases that may affect the CNS and Glioblastoma Multiforme (GBM) is one of that, a brain tumor originated by astrocytic cells with high invasiveness and proliferative characteristic and difficult treatment. The prognosis of this disease is poor, with survival of up to twelve months after the surgical. The highly invasive tumor cells, leading to the frequent appearance of another tumor focus, even after surgery, because it is difficult to remove completely the tumor cells. gamma-linolenic acid (GLA), has been studied in various tumor types, including GBM. The GLA operates in inhibiting tumor cell proliferation and reducing the formation of new blood vessels that nourish the tumor. The aim of this study was to analyze some of the proteins involved in the process of invasion and angiogenesis of GBM. Among the proteins studied are: VEGF and its receptors (Flt-1 and Flk-1), the enzymes MMP-2 and COX-2 and extracellular matrix glycoprotein, tenascin-C. Observed what happened with these proteins after treatment with the GLA model in vivo. In the ex vivo model we observed the migration of tumor cells, apoptotic and proliferative index. The results showed that the GLA was able to modify the expression and location of some of the proteins studied here. The GLA has proven to be a promising therapeutic agent for GBM, as it was seen after using of GLA in this model there was a reduction in tumor size and microvessel density. And reduction of the proliferation and migration distance of the tumor cells, with an increase in the number of apoptotic cells.

Keywords: C6; Glioma; Ácido γ-linolênico (GLA); Migration; Angiogenesis; Proliferation; Apoptosis; Eicosanoids.

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AA- Ácido Araquidônico
- ADP- Adenosina Di-Fosfato
- AKT- Proteína Quinase B
- ATP- Adenosina Tri-Fosfato
- Bak- Bcl-2 Antagonist/killer-1
- Bax- Bcl-2 associada a proteína X
- Bcl-2- célula B CLL/Limfona 2
- BHE- Barreira Hemato-Encefálica
- BrdU-Bromodesoxiuridina
- CAM molécula de adesão celular
- CDK- Cyclin Dependent-Kinase (Quinase Dependente de Ciclina)
- CDKI- Cyclin Dependent-Kinase Inhibitor (Inibidor de CDK)
- COX- Cicloxigenase
- CPT-I carnitina palmitoil transferase- I
- DAG diacilglicerol
- DHGLA ácido dihomo-y-Linolênico
- DMEM- Dulbecco's Modified Eagle's Medium
- DNA- Ácido Desoxirribonucleico
- EC célula endotelial
- EGF- Epidermal Growth Factor (Fator de Crescimento Epidermal)
- EGFR- Receptor de EGF
- ELISA- enzyme-linked immunosorbent assey (ensaio de imunoprecipitado ligado à enzima)
- EMMPRIN- Extracellular Matrix Metalloprotease Inducer (Indutor de Metaloprotease de Matriz Extracelular)
- eNOS óxido nítrico sintase endotelial
- ERK- Extracellular Signal-Regulated Kinase (Quinase Regulada por Sinal Extracelular)
- FAK- Focal Adhesion Kinase (Quinase de Adesão Focal)
- FATP- Proteína Transportadora de Ácido Graxo

- FGF- Fibroblast Growth Factor (Fator de Crescimento de Fibroblastos)
- Flk-1- receptor liver kinase
- Flt-1- fms-tyrosine kinase
- FN fibronectina
- GAG glicosaminoglicana
- GBM- Glioblastoma Multiforme
- GCMS- cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massa
- GLA- Ácido γ-Linolênico
- HA ácido hialurônico
- HAS ácido hialurônico sintase
- HEPE (ácido hidroxieicosapentaenóico
- HETE ácido hidroxieicosatetraenóico
- HIF- Hipoxia inducer-factor (fator induzido por hipóxia)
- HODE ácido hidroxioctadecadienóico
- HPETE ácido hidroxiperoxieicosatetraenoico
- HPF high power field
- HPLC cromatografia líquida de alta performance
- ICQ- Imunocitoquímica
- IHQ- Imunohistoquímica
- IL-Interleucina
- LB- Lâmina Basal
- LC-MS cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa
- LOX- Lipoxigenase
- LT- Leucotrieno

MAPK- Mitogen Activated-Protein Kinase (Proteína Quinase Ativado por Mitógeno)

- MEC- Matriz Extracelular
- MET- Microscópio Eletrônico de Transmissão
- **MMP-** Metaloprotease
- MT-MMP- Metaloprotease de Membrana
- MVP proteína major-vault
- PC pericito

PDGF- Platelet-Derivated Growth Factor (Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta)

- PG- Prostaglandina
- PGT- transportador de PG
- PI3-K- fosfatidil-inositol-3 quinase
- PIGF fator de crescimento placentário
- PLC fosfolipase C
- PPAR receptor ativador de proliferação de peroxissomo
- PUFA- Ácido Graxo Polinsaturado
- Rb retinoblastoma
- RNA- Ácido Ribonucléico
- RNAm RNA mensageiro
- ROS- Reactive Oxygen Species (Espécies Reativas de Oxigênio)
- RT-PCR- Reverse transcription-polymerase chain reaction (reaçao em cadeia da polimerase pela transcriptase reversa
- SNC- Sistema Nervoso Central
- SOD superóxido dismutase
- TGF- $\beta$  Fator de Crescimento Transformante  $\beta$
- TIMP- Tissue inhibitor Metalloprotease (Inibidor de Metaloprotease Tecidual)
- TNC- Tenascina-C
- VDAC- Voltage-dependent Anionic Channel (Canal aniônico Dependente de Voltagem)
- VE-caderina- Caderina de Endotélio Vascular
- VEGF- Fator de Crescimento de Endotélio Vascular
- WHO- World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)
- ZO- Zona de Oclusão

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Cirurgia para o implante do tumor e da bomba osmótica	89
Figura 2 - Morfologia do tumor visualizado por microscopia de luz, corado	
com H&E	90
Figura 3 - Morfologia do tumor observado por microscopia eletrônica de	
transmissão	91
Figura 4 – Imunohistoquímica para GFAP, fagócito mononuclear e	
contagem de microvasos em cortes corados por H&E	92
Figura 5 - Cromatografia a gás e espectrometria de massa	93
Figura 6 – Imunohistoquímica para MMP-2 revelado com DAB	94
Figura 7 – Imunocitoquímica para MMP-2	95
Figura 8 - Imunocitoquímica para MMP-2	96
Figura 9 – Imunohistoquímica para VEGF revelado com DAB	97
Figura 10 - Imunocitoquímica para VEGF	98
Figura 11 – Imunohistoquímica para Flt-1 revelado com DAB	99
Figura 12 - Imunocitoquímica para Flt-1	100
Figura 13 - Imunocitoquímica para Flt-1	101
Figura 14 – Imunohistoquímica para Flk-1 e TNC revelado com DAB	102
Figura 15 - Imunocitoquímica para Flk-1	103
Figura 16 - Imunocitoquímica para TNC	104
Figura 17 – Imunohistoquímica para COX-2 e BrdU revelado com DAB	105
Figura 18 - Imunocitoquímica para COX-2	106
Figura 19 – Cultivo de esferóides de C6 sobre tecido cerebral corados	
porH&E para medir a distância de migração das células tumorais	107
Figura 20 – Cultivo de esferóides de C6 sobre tecido cerebral corados por	
H&E e reação de TUNEL e razão mitose X apoptose	108
Figura 21 - ELISA para PGE <sub>2</sub>	109

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1- Representação da barreira hemato-encefálica2	25
Esquema 2 - Estrutura da TNC	37
Esquema 3 - Mecanismo da ativação da MMP-24	0
Esquema 4 - Fosforilação de Flk-1 e a transdução de sinal 4	7
Esquema 5 - Processo de angiogênese 4	8
Esquema 6 - Omega-6 3 omega-3 (PUFA) suas respectivas	
fontes e metabolitos5	50
Esquema 7 - Esquema mostrando os prostanóides e isoprotanos6	50
Esquema 8 - Mecanismo de ativação da apoptose pelas	
proteínas da família da Bcl-21	23

## LISTA DE TABELAS

Tabela A.1 – Descri	ição dos anticor	pos utilizados	 147

# SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Sistema Nervoso	21
1.2 Barreira Hemato-Encefálica	22
1.3 Câncer	25
1.4 Invasão e Migração Celular	29
1.1.4 Migração Celular	29
1.4.2 Moléculas de Adesão	30
1.4.3 Matriz Extracelular	31
1.4.4 Tenascina-c	34
1.4.5 Metaloproteases	37
1.5 Angiogênese	40
1.6 Ácidos Graxos Polinsaturados	48
1.7 A Utilização dos Pufas no Tratamento dos Gliomas	50
1.7.1 Eicosanóides	54
1.7.2 Prostanóides	54
2 OBJETIVOS	62
3 MATERIAIS E MÉTODOS	64
3.1 Cultivo de Células	64
3.2 Implante Estereotáxico das Células C6 em Ratos Wistar	64
3.3 Cromatografia a Gás Acoplada a Espectrometria de Massas (GCMS)	65
3.4 Anticorpos	65
3.5 Análises das IHQs em Microscopia de Luz	66
3.6 Análises das ICQs em MET	66
3.6.1 Pre-Embedding	68
3.6.2 Post-Embedding	69
3.7 Incorporação de Bromodesoxiuridina ao DNA Celular (BrdU)	70
3.8 Zimografia <i>in vivo</i>	70
3.9 Cultivo de Células Tumorais sobre Tecido Cerebral Fresco	71
3.10 Coloração com Hematoxilina- Eosina	72

3.11 TUNEL
3.12 ELISA PGE <sub>2</sub> (enzyme-linked immunosorbent assay)73
3.13 Análise dos Dados74
4 RESULTADOS
4.1 Morfologia77
4.2 Cromatografia a Gás Acoplada a Espectrometria de Massas
4.3 Imunohistoquímica e Imunocitoquímica80
4.3.1 MMP-2
4.3.1.1 Zimografia81
4.3.2 VEGF
4.3.3 Flt-1
4.3.4 Flk-1
4.3.5 Tenascina-C
4.3.6 COX-2
4.4 Bromodesoxiuridina (BrdU)
4.5 Ensaio de Migração87
4.6 Ensaio de Proliferação88
4.7 Ensaio de Apoptose
4.8 ELISA PGE <sub>2</sub>
5 DISCUSSÃO
5.1 Angiogênese
5.2 Apoptose
5.3 Migração/Invasão125
6 CONCLUSÃO
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS
<b>ANEXO A</b>
<b>ANEXO B</b>

# INTRODUÇÃO

## 1 INTRODUÇÃO

#### 1.1 Sistema Nervoso

O sistema nervoso central (SNC) é o sistema que integra todos os tecidos do organismo entre si e estes com o meio ambiente. O SNC, composto pelo encéfalo e pela medula espinhal, é basicamente formado por dois grupos de células: os neurônios e as células da glia. Os neurônios são constituídos de um corpo celular (também conhecido como pericário) e por seus prolongamentos, denominados dendritos e axônio, porém a sua morfologia varia de acordo com a região em que se encontra. Sua principal função é conduzir o impulso nervoso através da geração de um potencial de ação, caracterizado pela despolarização da membrana plasmática.

Antigamente as células da glia eram caracterizadas como "cola nervosa", ou seja, as células que mantinham e sustentavam os neurônios. Sabe-se hoje que as células da glia exercem outras funções que vão além da sustentação dos neurônios. Por exemplo, essas células são responsáveis pela nutrição dos neurônios, formação dos pés vasculares e da bainha de mielina ao redor dos axônios, entre outras. As células da glia também são importantes na manutenção da barreira hemato-encefálica (BHE) e podem modular a resposta sináptica das células nervosas (Bouzier-Sore et al., 2002).

As células da glia são classificadas em 4 tipos distintos: os oligodendrócitos, a microglia, as células ependimárias e os astrócitos, cada qual exercendo funções distintas. Os oligodendrócitos são responsáveis pela mielinização dos axônios no SNC, a célula da microglia é um fagócito e também secreta substâncias bioativas, como substâncias reguladoras da inflamação. As células ependimárias encontram-se revestindo os ventrículos e o canal central da medula, são responsáveis pela movimentação do liquído cérebro-espinal, e nas regiões subependimárias essas células possuem papel importante na maturação de neurônios (Hatton, 2004).

Os astrócitos são células com diversas funções no SNC, entre elas a nutrição dos neurônios, pois são responsáveis pelo transporte seletivo de glicose do sangue para estas células (Bouzier-Sore et al., 2002). Os astrócitos interagem de formas

variadas com os neurônios, através de seus pés terminais, que são extremidades dilatadas de seus inúmeros prolongamentos. Esta interação pode ocorrer em diversas regiões da célula nervosa como nos dendritos, no soma, no axônio e/ou no botão terminal. Essa relação astrócito/neurônio pode levar à ativação de receptores específicos nos astrócitos, o que culmina em uma modificação morfológica nos mesmos, resultando em novos contatos entre os neurônios, por modificações físicas ou funcionais. Em resposta a outros receptores ou a modificações no microambiente extracelular, os astrócitos podem liberar substâncias neuroativas que direta ou indiretamente podem excitar ou inibir os neurônios. Sendo assim, os astrócitos são capazes de modular a transmissão sináptica dos neurônios (Hatton, 2004). Além disso, os astrócitos estão envolvidos na manutenção da BHE, na homeostase iônica e hídrica, e no metabolismo de neurotransmissores e aminoácidos. De fato, os astrócitos são capazes de manter baixo o nível de glutamato na fenda sináptica, pois o glutamato é um aminoácido de propriedades excitatórias do cérebro. Além disso, através de bombas de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> presentes na sua membrana plasmática, os astrócitos mantêm o meio extracelular com baixos níveis de  $K^+$  (Simard e Nedergaard, 2004).

#### 1.2 Barreira Hemato-Encefálica (BHE)

O SNC é o sistema mais sensível do organismo. Devido a esse fato, grande parte dos metabólitos, das alterações químicas e iônicas no sangue e das substâncias provenientes da nossa dieta, é capaz de prejudicar o funcionamento cerebral. Cerca de 20% do oxigênio que consumimos são utilizados pelo cérebro, e, além disso, os ions Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup>, devem estar adequadamente balanceados no sistema nervoso, para que este possa exercer suas funções normais. Por isso é essencial que haja um controle entre a vascularização periférica e a do SNC, exercido pela BHE.

Ehrlich e Goldman observaram que um corante injetado na circulação sanguínea corava todos os tecidos, com exceção do SNC, e quando este era injetado no canal central da medula espinal, ocorria o contrário, ou seja, o SNC corava-se e os tecidos restante não, mostrando que havia alguma estrutura capaz de impedir a entrada/saída

de substâncias da corrente sanguínea para o cérebro e vice-versa (Hawkins e Davis, 2005).

Na BHE, os endoteliócitos possuem diversos tipos de proteínas na membrana plasmática, entre elas bombas que regulam o fluxo iônico, auxiliando a manutenção da homeostase. Também há proteínas responsáveis pela adesão célula-célula, pelo transporte celular, além da presença de receptores de superfície. Os endoteliócitos encontram-se unidos por junções oclusivas, sendo este endotélio caracterizado pela ausência de fenestração, nível reduzido de pinocitose e transporte transcelular altamente especializado (Wagner et al., 2003). Há também a presença de pericitos, membrana basal e astrócitos justapostos à membrana basal, formando os pésvasculares. Ou seja, essas células envolvem os capilares e dessa forma são capazes de selecionar o que entra e o que sai através dos vasos do SNC (Esquema 1).

Outra característica importante dos endoteliócitos na BHE é que os mesmos encontram-se unidos por junções aderentes. Os endoteliócitos possuem moléculas de adesão denominadas VE-caderinas, uma proteína Ca<sup>2+</sup> dependente que interage de forma homofílica com a célula adjacente. O domínio citoplasmático da VE-caderina ligase à catenina e placoglobina, e estas se ligam à actina, actinina e vinculina. A vinculina é o elo entre a VE-caderina e os filamentos de actina, estabilizando a junção aderente. As junções oclusivas são formadas pelas proteínas claudina e ocludina, que se ligam de forma homofilica e se fixam ao citoesqueleto através das proteínas ZO (Hawkins e Davis, 2005). Essas junções celulares são de extrema importância para a manutenção da BHE, pois impedem que haja tráfego de qualquer substância por entre as células endoteliais. Adicionalmente, as funções dessas junções celulares são também importantes para outros processos. Por exemplo, a presença dessas junções inibe o crescimento e a proliferação da célula endotelial e previne que a mesma entre em processo de apoptose (Dejana, 2004). Como as junções celulares bloqueiam a passagem intercelular das substâncias presentes no sangue para o SNC e vice-versa, os endoteliócitos possuem um mecanismo altamente específico e selecionado de transporte, que é denominado transporte transcelular.

O transporte transcelular consiste na difusão ou pinocitose de algumas substâncias pela célula endotelial, e só depois de atravessar o seu citoplasma e a

lâmina basal (LB) que envolve os endoteliócitos, é que chegam ao SNC. Algumas substâncias são capazes de penetrar na célula endotelial, porem são devolvidas ao sangue sem que alcancem o SNC. As proteínas responsáveis por essa seleção são as p-glicoproteínas. Essas proteínas têm como função excretar para o sangue novamente o que entrou na célula endotelial, mas que não deve chegar até o SNC. Um dos motivos que dificultam o tratamento e a passagem de drogas para o SNC é a presença dessas proteínas no endoteliócito. Por isso, há uma grande dificuldade no tratamento de tumores que acometem o SNC (Lu e Shervington, 2008).

Em processos patológicos, há uma desregulação de algumas proteínas envolvidas na manutenção da BHE. Acredita-se que uma das causas seja a presença de fatores inflamatórios, hipóxia e estresse, levando ao rearranjo das junções celulares e expressão de proteínas envolvidas na angiogênese, como o VEGF e o seu receptor Flt-1 (Doolittle et al., 2005). Os pericitos parecem estar mais envolvidos com o controle do fluxo sanguíneo do que com a BHE propriamente dita, já que essas células não circundam completamente os endoteliócitos, e possuem proteínas contrácteis. Outro importante elemento presente na BHE é a MEC, encontrada na lâmina basal. A perda dessa membrana leva ao rompimento da BHE (Hawkins e Davis, 2005).



Esquema 1- Representação da barreira hemato-encefálica: corte transversal mostra o lúmen do vaso, com célula endotelial (EC), pericito (PC) na região abluminal do endoteliócito, envolvido por lâmina basal (LB). Todo o complexo é envolvido pelos astrócitos (AC) formando os pés-vasculares. Adaptado de Hawkins e Davis, 2005.

#### 1.3 Câncer

Os tecidos biológicos se comportam como uma sociedade extremamente organizada, onde as células realizam suas funções específicas de acordo com as necessidades do seu microambiente. Para que haja um controle adequado na organização, função, sobrevivência e multiplicação dessas células, diversas proteínas, receptores e mediadores químicos estão envolvidos nos processos normais das células, sendo de extrema importância o equilíbrio na expressão e atividade destes fatores. Quando esta homeostasia é abalada, por fatores externos ou por alguma desregulação interna, a célula perde o controle e se modifica, tornando-se distinta da célula normal. Neoplasia significa um "crescimento novo", ou seja, uma massa de células que cresce desordenadamente e de forma anormal.

O câncer resulta do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas na célula de origem. Em estágios iniciais da doença, esses desequilíbrios são causados principalmente por agentes tóxicos ambientais, e após sucessivas mutações essa célula é capaz, de forma autônoma, de proliferar e migrar, formando o tecido tumoral (Stratton et al., 2009).

No Brasil a estimativa de casos de câncer em 2008 foi de 466 mil novos pacientes com algum tipo de câncer. Muitos deles são possíveis de cura e em cerca de metade dos casos, os pacientes chegam ao óbito (World Health Organization, WHO). A doença pode ser explicada, de forma simplificada, em três estágios: (i) a iniciação, onde uma célula fica exposta a um agente carcinogênico capaz de modificar seu DNA. Neste estágio, porém, não há diferença visível entre a célula normal e a célula aberrante. A célula modificada permanece indetectável e pode se manter assim por um longo período; (ii) o segundo estágio é a fase de promoção da doença, devido à capacidade da célula aberrante sobreviver e proliferar. Neste estágio a célula responde facilmente aos estímulos mitogênicos e/ou torna-se insensível aos estímulos anti-mitogênicos, acumulando assim diversas alterações genéticas; (iii) o último estágio é denominado fase de progressão, no qual a célula aberrante se prolifera de maneira descontrolada, o que culmina na formação de uma massa de células modificadas, com diversas alterações genéticas, bioquímicas e funcionais (Marks et al., 2000).

Os tumores no Sistema Nervoso Central (SNC) chegam a quase 2% das neoplasias malignas que acometem o homem. Sua incidência é de 3 a 4 casos a cada 100.000 habitantes, por ano na Europa e nos Estados Unidos. Aproximadamente metade destes casos tem a sua origem nas células da glia (Katterman e Ranson, 1995). Os gliomas são neoplasias originadas de astrócitos e/ou oligodendrócitos. Acredita-se que os gliomas se desenvolvam a partir de células da glia e células do neuroectoderma no embrião, sendo assim, as células tumorais possuem alto poder migratório e proliferativo, semelhante às células embrionárias (Tonn et al., 1999). A Organização Mundial da Saúde (WHO, 2007) classifica os gliomas em diferentes graus, de acordo com suas características celulares e sua capacidade de invasão. O grau I é a forma "benigna" do tumor, o grau II possui baixa capacidade invasiva, o grau III já é um tumor com características malignas e o grau IV, denominado glioblastoma multiforme (GBM), é a forma mais agressiva destes tumores. Dentre os tumores que acometem o SNC o glioblastoma multiforme é o mais freqüente (12-15%) das neoplasias intracraniais, oriundo de células astrociticas diferenciadas. Suas características são a atipia nuclear, pleomorfismo celular, alto poder proliferativo e atividade mitótica, proliferação endotelial e trombose vascular, além da presença de focos de necrose celular (Louis et al., 2001, WHO, 2007).

Sua histopatologia é bastante variada, como o nome sugere, devido ao seu grande pleomorfismo celular. Alguns gliomas apresentam-se como células multinucleadas gigantes e podem ser ricamente celularizados. Seu diagnóstico histopatológico é melhor caracterizado pelo tecido do que pela morfologia celular, e este diagnóstico diferencial se dá pela alta vascularização, áreas necróticas e intensa atividade mitótica (WHO, 2007).

Cefaléia e papiledema são os principais sintomas dos GBMs, sendo muitas vezes decorrentes do aumento da pressão intracraniana. Crises epiléticas, náuseas e distúrbios de personalidade são outros sintomas comuns de pacientes portadores de GBM (Katterman e Ranson, 1995). Devido ao alto poder infiltrativo, algumas células neoplásicas são capazes de invadir o tecido normal, o que faz com que o tratamento cirúrgico e sua total remoção sejam praticamente impossíveis, levando a uma sobrevida

máxima de aproximadamente seis a doze meses após a cirurgia (Tonn et al., 1999; Ulrich et al., 2009).

O GBM é um tumor resistente à radioterapia por varios motivos, primeiro porque o GBM é um tumor com muitas áreas hipóxicas e essas células são resistentes a radioterapia; segundo, as células tumorais possuem alta capacidade de reparação no DNA; terceiro, na radioterapia, as células-alvo são as que se encontram na fase G2/M, e no GBM as células apresentam-se em diversos estágios do ciclo celular e não apenas na fase G2/M (Benouaich-Amiel et al., 2005). Outro fato importante é que a radioterapia é um tratamento focal, e o GBM por sua natureza invasiva possui células em regiões bem distantes do foco tumoral, fazendo com que essas células não sejam atingidas pela radiação. Além disso, a dose de radiação necessária para que as células tumorais morram, acaba afetando também as células normais.

Além disso, o GBM também é resistente à quimioterapia por expressar diversas proteínas como as p-glicoproteínas e a proteína major-vault (MVP) na membrana plasmática, além de proteínas anti-apoptoticas, como Bcl-2, no citoplasma. Adicionalmente, a presença da BHE dificulta a passagem de drogas para o tecido nervoso. A soma desses fatores cria um ambiente celular quimioresistente, o que leva a quimioterapia a ficar em segundo plano no tratamento dos GBMs (Lu e Shervington, 2008).

Metástases originadas de tumores gliais são dificilmente encontradas, devido ao baixo índice de sobrevida do paciente (0,1 a 0,5%). Quando metastatizados são provavelmente decorrentes da manipulação cirúrgica (Schweitzer et al., 2001). Tumores secundários podem ainda difundir-se, através das fibras mielinizadas, para outras regiões do cérebro, como o corpo caloso, a comissura anterior e o fórnix (Kleihues et al., 1995).

Histologicamente, o GBM apresenta células pobremente diferenciadas (fusiformes, circulares ou pleomórficas) e, ocasionalmente, células gigantes multinucleadas, com grande atividade mitótica e retículo endoplasmático rugoso aumentado (Katterman e Ranson, 1995). Além disso, estes tumores apresentam abundante proliferação vascular e áreas de necrose.

Os gliomas apresentam mutações no gene *p*53 no cromossomo 11 (supressor de atividade tumoral), e amplificação do gene do *EGFR* (Receptor do Fator de Crescimento Epidermal) (Louis et al., 2001). Os GBMs que possuem mutação no gene p53 incidem principalmente em pacientes adultos jovens, apresentando células gigantes, provenientes de uma progressão maligna de astrocitoma de grau de anaplasia (desdiferenciação celular) mais baixo (Parsons et al., 2008). Estes tipos de GBMs são denominados glioblastomas secundários (Schweitzer et al., 2001). Contudo, existem GBMs que não são decorrentes de astrocitomas de graus baixos. Em geral eles apresentam uma amplificação do gene *EGFR* e/ou perda do cromossomo 10, além de alterações nos genes responsáveis pelo ciclo celular, como o p53 e Rb (Franco-Hernandez et al., 2007). Este último tipo de GBM é denominado primário ou *de novo*, sendo o de ocorrência mais comum (Louis et al., 2002; Parsons et al., 2008).

1.4 Invasão e Migração Celular

## 1.4.1 Migração Celular

A migração de uma célula consiste de um processo multifatorial, dependente de interações célula-matriz extracelular (MEC), célula-célula, e processos que ocorrem no interior da célula, os quais iniciam e mantêm a movimentação da mesma. A migração celular é um processo normal em algumas células, como por exemplo, do sistema imunológico, e também é característica de processos fisiológicos, como o desenvolvimento embrionário e a cicatrização. A motilidade celular é um processo celular extremamente controlado, porém nas células tumorais ocorre perda do controle celular, da síntese de componentes de MEC que atuam na movimentação da célula, e das vias de sinalização que possibilitam a migração celular (Demuth e Berens, 2004).

O processo de deslocamento celular pode ser dividido, de forma resumida, em três partes:

-a célula desenvolve extensões na sua região frontal ou borda anterior;

-as extensões aderem à superfície sobre a qual a célula está se deslocando;

- o restante da célula arrasta-se para frente, tracionando os pontos de ancoragem.

Os três processos supracitados envolvem os filamentos de actina, mas de maneiras diferentes. Em fibroblastos, por exemplo, o processo migratório inicia-se com a polimerização da actina na borda anterior da célula, o que forma extensões citoplasmáticas denominadas lamelipódios. Assim como os lamelipódios, as células podem formar "braços" finos e rígidos, chamados filopódios. Os lamelipódios e filopódios consistem em estruturas móveis e exploratórias que se formam e se retraem com grande velocidade. Presume-se que ambos sejam gerados por um crescimento local rápido dos filamentos de actina que, por sua vez, estão ancorados a proteínas especificas da membrana plasmática. O balanço de polimerização e despolimerização dos filamentos de actina é responsável pelas mudanças conformacionais da membrana citoplasmática (Hagihara et al., 1999).

Quando os lamelipódios e os filopódios tocam em um trecho de superfície favorável, aderem-se a ele via diferentes proteínas transmembrana, entre elas, as integrinas. As integrinas podem ligar-se às moléculas na MEC ou à superfície de outra célula, formando contatos focais. Enquanto isso, na face intracelular da membrana da célula migratória, as integrinas ligam-se com proteínas adaptadoras que fazem a sua ligação com os filamentos de actina, criando no interior da célula uma ancoragem forte para o citoesqueleto. Através dos filamentos de actina e, também por outros processos que ocorrem no meio intracelular, a célula é capaz de rearranjar estes filamentos, gerando força de tração necessária para arrastar o corpo celular para frente.

A migração celular nas células tumorais é realizada através de adesões pontuais, ricas em filamentos de actina. O termo mais recente utilizado para essas estruturas são podossomos e invadipodia (no caso de células tumorais). Estas estruturas permitem que a célula se fixe à MEC, degrade a mesma e promova espaço suficiente no qual a célula possa invadir o tecido. Além disso, a degradação da MEC libera citocinas e fatores de crescimento, culminando na ativação de diversas moléculas de sinalização intracelular, e estimulando a proliferação, a degradação da MEC, e a movimentação celular, entre outros processos (Linder, 2007).

Nos gliomas, o processo invasivo caracteriza-se pela perda da adesão célulacélula, em seguida pela formação de contatos celulares com a MEC e células vizinhas, degradação e remodelação da MEC, e invasão da célula tumoral no tecido nervoso normal (Stylli et al., 2008)

1.4.2 Moléculas de Adesão

As células da glia estão unidas por junções aderentes, constituídas por moléculas denominadas n-caderinas. Estas possuem um domínio hidrofóbico, presente no interior da membrana plasmática e 4 sítios de ligação externa, os quais se ligam com outras moléculas de n-caderina, promovendo firme adesão entre as células. Estas moléculas transmembrana adesivas interagem entre si de forma homofílica em um processo dependente de Ca<sup>2+</sup>. Durante o processo migratório, esta ligação deve ser rompida para que ocorra o desprendimento das células, e assim esta seja capaz de migrar. Esta proteína parece ser capaz de inibir a invasão e a metástase tumoral, pois aparentemente o potencial metastático das células é inversamente proporcional à expressão de n-caderinas. Em gliomas, podemos verificar também que a baixa expressão de n-caderinas está relacionada com o aumento da capacidade invasiva das células tumorais (Perego et al., 2002).

A adesão célula-MEC ocorre principalmente pela família das integrinas. Estas são moléculas de superfície constituídas por heterodímeros localizados na membrana plasmática da célula, formados por uma subunidade  $\alpha$  e uma  $\beta$ , que se combinam de diferentes maneiras, podendo se ligar a diversas proteínas da MEC e também da célula através das CAMs (molécula de adesão celular) (Novak e Kaye, 2000; Demuth e Berens, 2004). Além disso, são proteínas que, ao interagirem com o seu ligante específico, podem desencadear uma cascata de sinalização intracelular, promovendo a proliferação e a migração, entre outros fenômenos celulares (Ng et al., 1999). As integrinas possuem ligação com moléculas adaptadoras do citoesqueleto, sendo importantes para a formação de contatos focais da célula com a MEC, estágio essencial para a movimentação da célula (Demuth e Berens, 2004).

Convém ressaltar que a manutenção das junções celulares é fisiologicamente importante, dado que o comprometimento destes contatos consiste numa etapa importante para o desencadeamento do processo de invasão tumoral. Essa baixa adesividade das células tumorais com outras células e/ou com a matriz extracelular, somada à sua alta motilidade celular, auxilia o processo migratório que se inicia com a perda da adesão intercelular. Sem este contato intercelular, a célula tumoral encontrase "livre" e consegue migrar e invadir o tecido subjacente. Normalmente, um dos fatores que cessa o crescimento celular é a presença de contato entre células iguais. No caso de células tumorais, esta interrupção no crescimento não ocorre, acarretando desordem no crescimento e na multiplicação celular.

### 1.4.3 Matriz Extracelular

As células do nosso organismo estão envolvidas em uma rede macromolecular complexa, denominada MEC, que não é apenas uma estrutura física e estática que circunda as células. A MEC é capaz de orientar e interagir com diversas funções celulares através de receptores presentes na membrana plasmática e dessa forma controlar a morfologia, a diferenciação celular a até mesmo a homeostasia do tecido.

No SNC, a MEC apresenta-se bastante peculiar e difere, em muitos aspectos, da MEC dos demais tecidos. Essa MEC é sintetizada pelas células presentes no SNC e se modifica de acordo com o desenvolvimento neurológico, idade, função neuronal e processos patológicos. No cérebro normal, a MEC é encontrada principalmente na membrana basal presente na interface com os vasos sanguíneos e na glia limitante externa, estima-se que essa MEC seja cerca de 20% do volume total do tecido nervoso (Zamecnik, 2005). A membrana basal é rica em colágeno IV, laminina, fibronectina e vitronectina. No entanto, pesquisadores ainda questionam a presença de fibronectina e vitronectina como constituintes da membrana basal no cérebro. A limitante externa da glia, que cobre a superfície do cérebro e separa a glia e as estruturas cerebrais da piamáter, também é composta por elementos da MEC como os colágenos I, III e IV, fibronectina, laminina e proteoglicanos. A membrana basal dos vasos contém

proteoglicanos ricos em heparam sulfato, colágeno I e IV, fibronectina, laminina e entactina (Bellail et al., 2004).

Contudo, a MEC do cérebro não está confinada apenas a essas estruturas anatômicas. No parênguima cerebral a MEC é composta principalmente por glicosaminoglicanos (GAGs), como o ácido hialurônico (HA), o condroitim sulfato, o heparam sulfato e o queratam sulfato (Goldbrunner et al., 1999). HA é um polímero linear, formado por repetições de N-acetilglicosamina e ácido glucurônico não sulfatado, sendo um polímero hidrodinâmico (atrai água) de alta densidade e que promove fluidez e maleabilidade na MEC, criando assim espaços hidratados (Lynn et al., 2001), abundantes no cérebro. Esta GAG é produzida pela HAS (sintetase de hialuronan) e o bloqueio desta proteína diminui a síntese de HA e, conseqüentemente, a proliferação, a angiogênese e o crescimento tumoral (Toole et al., 2002). De fato, alguns estudos in vitro demonstraram que o aumento de HA na composição da matriz aumenta a capacidade migratória das células tumorais. Acredita-se que a interação célula-HA aumente a produção de proteases, como as metaloproteases (Radotra et al., 1997; Park et al., 2008). A hialuronidase, enzima que degrada HA, ao metabolizá-lo, libera moléculas de oligossacarídeos de estimular angiogênese capazes а е consequentemente o crescimento tumoral (Toole et al., 2002).

Os demais GAGs presentes no cérebro estão ligados covalentemente ao eixo protéico de um proteoglicano. Os GAGs são compostos polissacarídeos nãoramificados, formados pela repetição de unidades dissacarídicas, uma unidade aminoose (N-acetilglicosamina ou N-acetilgalactosamina), geralmente sulfatada, e outra unidade, um ácido urônico (glicurônico ou idurônico). Os GAGs no cérebro controlam diferentes eventos morfogenéticos em diferentes períodos do desenvolvimento do SNC. Por exemplo, o condroitim e o queratam sulfato, quando associados, formam uma barreira para o alongamento axonal. Já o queratam normalmente torna a MEC permissível à migração e quando ligado à laminina, forma um substrato não migratório. Os proteoglicanos são capazes de interagir com diversas moléculas, como fatores de crescimento, e promover processos biológicos como a migração, invasão quando se ligam à receptores de membrana presentes na célula, como as integrinas (Treasurywala e Berens, 1998).

A laminina é uma glicoproteína heterotrimérica, formada por cadeias  $\alpha$ ,  $\beta \in \gamma$ , em forma de cruz, confinada à lâmina basal no SNC normal. A laminina serve de ancoragem para células e outros componentes da lâmina basal, sendo importante para manutenção da estrutura e integridade dos tecidos. A laminina pode se ligar às células através das integrinas, e assim ativar diversas vias de sinalização intracelular, modulando a adesão e a migração celular (Tzu et al., 2008).

A fibronectina é uma molécula assimétrica composta por duas subunidades capazes de se ligar a vários componentes da MEC. A sua ligação com as células ocorre através da integrina, podendo dessa forma modular o espalhamento celular, a migração, a adesão e a diferenciação celular (Clark et al., 2003).

Os colágenos pertencem a uma família de glicoproteínas constituídas por três cadeias α polipeptídicas, organizadas em tripla hélice. Os colágenos podem ser fibrilares, associados a fibrilas ou de ancoragem. Estas moléculas são capazes de interagirem com diversos componentes da MEC, além de atuarem na comunicação celular e em processos biológicos importantes, tais quais: proliferação, diferenciação e migração celular (Culav et al., 1999).

O GBM é capaz de sintetizar sua própria MEC, segundo Zamecnik, 2005, estimase que aproximadamente 48% do volume total do tumor é formado por MEC. A MEC sintetizada nessa patologia mimetiza os elementos de matriz presentes durante o desenvolvimento do cérebro, que é uma matriz altamente permissível à migração, pois nesse período há uma alta formação de vasos sanguíneos, e migração de células precursoras nervosas e gliais, devido ao crescimento do cérebro e o estabelecimento de sinapses neuronais (Bellail, 2004). As células tumorais são também capazes de induzir as células normais do SNC a sintetizar elementos de matriz que a torne mais permissível à migração (Goldbrunner et al., 1998, 1999). As regiões cerebrais que ocorrem freqüente migração de células tumorais são a limitante externa da glia, o espaço subependimal, os tratos de fibras mielinizadas e na lâmina basal dos vasos. Essa preferência das células tumorais por migrar nessas regiões tem como causa a presença de elementos específicos da MEC capazes de regular processos celulares, tais como a proliferação, sinalização celular, degradação da MEC, adesão à MEC e invasão celular (Goldbrunner et al., 1998; Novak e Kaye, 2000; Bökel e Brown, 2002).

A migração e invasão pelo tecido adjacente ocorrem não apenas devido à presença de MEC, mas também de outras moléculas. Uma explicação detalhada requer a compreensão das funções de cada uma dessas moléculas.

#### 1.4.4 Tenascina-C

A tenascina-C (TNC) é uma glicoproteína de matriz hexamérica, a qual possui domínios anti-adesivos adesivos. Suas ações sobre as células são paradoxais, pois de acordo com o tipo de receptor e de célula, ou de acordo com o tipo de ligação com outro componente de matriz, a TNC promove diferentes processos celulares, como estímulo à migração ou inibição do espalhamento celular, por exemplo (Jones e Jones, 2000). A TNC está presente durante a embriogênese no sistema nervoso central, porém ausente no tecido adulto normal (exceto em regiões de migração celular e neurogênese secundária). A TNC é sintetizada no cérebro por astrócitos, neurônios e células endoteliais. Esta glicoproteína é formada por repetidos domínios semelhantes ao EGF, fibrinogênio e fibronectina (Esquema 2). Estudo de Phillips et al. (1998) mostrou que o domínio fibronectina é o mais envolvido com a migração e a manutenção do contato célula-MEC. Além disso, a TNC promove algumas atividades celulares importantes como, por exemplo, ligam-se a integrinas e ativam as FAKs (quinase de adesão focal) (Zagzag et al., 2002), dessa forma participando da adesão, migração (Grumet et al., 1994) e proliferação celular através da ativação de diferentes vias de sinalização intracelular, como a via Erk/MAP quinase. Podem ligar-se a outros receptores de superfície celular, como as moléculas de adesão celular (CAMs), a família das imunoglobulinas, anexina II, entre outros. Adicionalmente, interagem com diversos componentes da MEC, como a fibronectina, proteoglicanos e outras proteínas, como a enzima MMP, modulando diferentes ações celulares (Jones e Jones, 2000). Acredita-se que a TNC seja capaz de estimular a angiogênese e suprimir o sistema imune, pois foi observada sua co-localização no cérebro com VEGF, MMPs. A presença da TNC faz com que a célula endotelial torne-se alongada, semelhante à estrutura tubular dos vasos (Cowan et al., 2000; Zagzag e Capo, 2002).

Para compreender essa paradoxal ação adesiva/anti-adesiva, acredita-se que o sindecam-4 (um proteoglicano de membrana rico em heparam sulfato), junto à integrina  $\alpha 5\beta 1$ , auxilie o espalhamento celular quando se liga a TNC. Entretanto, quando a TNC está presente em um substrato rico em fibronectina, essas glicoproteínas interagem entre si, mascarando o sitio de ligação da TNC ao sindecam, impedindo dessa forma que a célula se espalhe (Salmivirta et al., 1991).

No GBM, A TNC está presente nas bordas do tumor (Treasurywala e Berens, 1998) em diferentes densidades e acredita-se que esteja relacionada com a permissividade da MEC. Estudos *in vitro* com células de glioma (NCH37, NCH82 e NCH89), utilizando anticorpo para tenascina-C em meio de cultura, mostrou que houve diminuição de cerca de 35% da taxa de proliferação e migração das células (Mend et al., 2002). Em carcinoma de endométrio humano, verificou-se através da microscopia eletrônica, que a TNC se localiza entre as células epiteliais e o estroma associado às fibras colágenas, não sendo encontrada nas áreas distantes da lâmina basal. Estes dados sugerem que a TNC esteja envolvida com a proliferação e a invasão das células tumorais (Wick et al., 2002).

Em um estudo com 32 pacientes portadores de GBM (Kim et al., 2002), verificou-se a presença de TNC através da técnica de imunohistoquímica. Tanto em vasos como em células de glioma, a sua expressão aumentava de acordo com o grau de malignidade do tumor. Além disso, acredita-se que seja uma proteína importante na angiogênese tumoral, cuja secreção pode ser realizada pelas células tumorais e endoteliais. A ação angiogênica parece estar relacionada com a ligação tenascina - integrina, que ativa a FAK e esta, por sua vez, é capaz de modular a síntese do VEGF (fator de crescimento para endotélio vascular) (Zagzag et al., 2002).

A TNC contém domínios semelhantes ao EGF (fator de crescimento epidermal), por isso, acredita-se que essa glicoproteína seja capaz de agir diretamente na proliferação das células, alterando a adesão celular ao substrato e facilitando a sua migração (Lange et al., 2008). Devido à presença de sítios de ligação para células endoteliais, acredita-se que essa glicoproteína module a proliferação, a adesão e a migração dos endoteliócitos. É possível que, tanto as células tumorais quanto as endoteliais, cooperem na remodelação e degradação da MEC. Sendo assim, sua atividade facilitaria a invasão celular e a angiogênese (Kim et al., 2000).

Estudos *in vitro* mostram uma forte correlação da TNC com a invasão celular tridimensional, sendo a presença de TNC no meio extracelular característica de um microambiente permissivo à migração da célula tumoral. Ainda podemos citar a forte relação entre a TNC e a síntese de MMPs (por exemplo, a MT1-MMP), o que aumentaria a capacidade invasiva da célula tumoral (Sarkar et al., 2006).

Em estudo anterior com gliomas humanos, utilizou-se um anticorpo radioativo para TNC injetado no local onde foi removido o tumor. Verificou-se que de acordo com a dose, houve aumento na sobrevida média do paciente de 61,4 semanas, em comparação com o grupo controle que era tratado com radio/quimioterapia, cuja sobrevida era de 25 semanas. A toxicidade do anticorpo é ausente ou mínima para os tecidos próximos à sua área de administração, incluindo o endotélio (Reardon et al., 2002).



Esquema 2 - Estrutura da TNC: (A) modelo da estrutura hexamerica (B) representação esquemática de um polipeptideo individual de TNC. TA é a região onde os polipetideos se unem para formar a estrutura hexamerica. Em seguida, há 13 repetições EGFL (tipo fator de crescimento epidermal) (oval), em seguida a parte retangular são os domínios FN-III (fibronectina). Na região C-terminal uma região fibrinogênio (esfera). Adaptado de Jones e Jones, 2000.
#### 1.4.5 Metaloproteases

As metaloproteases (MMPs) são enzimas de ação proteolítica que degradam componentes da MEC, como o colágeno, a fibronectina, laminina, elementos da membrana basal e os proteoglicanos. Também são capazes de degradar receptores e desorganizar as junções celulares, facilitando a migração celular. Portanto, exerce papel fundamental na invasão e migração das células tumorais. Além disso, durante o processo de quebra e digestão de componentes da MEC, como a laminina e o colágeno-IV, ocorre a exposição de sítios cripticos, capazes de ligar-se a receptores de membrana e exercer papel na sinalização intracelular. A degradação da MEC pode também liberar fatores de crescimento, e esses serem utilizados pelas células ao redor, como um estímulo para a migração, a proliferação e sinalização celular (Egeblad e Werb, 2002)

Há mais de 20 tipos de MMPs descritas e a maioria é secretada como zimogênio (sob a forma de pró-enzima inativa). Elas possuem um átomo de  $Zn^{2+}$  no seu sítio ativo (Chintala et al., 1999) e a sua atividade é controlada por outras moléculas ativadoras e inibidoras. As MMPs de membrana (MT-MMP) são proteínas transmembrana que, ao se ligarem à MMP, ativa seu sítio de fosforilação (Belien et al., 1999). As TIMPs (inibidores teciduais de MMP), e a  $\alpha$ -2 macroglobulina possuem um papel inibitório sobre a atividade das MMPs (Lampert et al., 1998).

A MMP de maior interesse nesse estudo é a gelatinase A, conhecida também como metaloprotease-2 (MMP-2), capaz de clivar colágenos I, IV e V, elastina, proteoglicanos e a laminina. A MMP-2 é secretada numa forma inativa, denominada como pró-enzima, e para a sua ativação é necessário que ocorra a quebra proteolítica e a exposição do domínio catalítico da enzima. A MMP-2 é ativada no meio extracelular através da formação de um complexo multiproteico com a MT1-MMP (conhecida também por MMP-14) e a TIMP-2. A TIMP-2 se liga à MT1-MMP e a MMP-2, sendo esta interação a causa da mudança conformacional na molécula, que quebra a interação cisteína-Zn, deixando o Zn livre para participar da catálise (Deryugina et al., 1998; Chintala et al., 1999). A forma ativa da MMP-2 é liberada no meio extracelular e essa enzima inicia a degradação da MEC (Nishida et al., 2008) (Esquema 3). A MT1-

MMP não tem função apenas ativadora da MMP-2, mas possui função catalítica, capaz de degradar fibronectina, vitronectina, laminina, tenascina, proteoglicanos e colágeno, entre outros componentes de MEC. Além disso, tem capacidade de internalizar TIMP para degradação da mesma, entre outras funções de sinalização intracelular (Fillmore et al., 2001).

No GBM, ocorre um aumento na expressão de MMP-2 (Komatsu et al., 2004) e também de MT1-MMP, sugerindo aumento nas suas atividades enzimáticas. Contudo, a expressão de seu inibidor, o TIMP-2, encontra-se nas mesmas concentrações do tecido nervoso normal (Belien et al., 1999). O balanço entre estes compostos determina uma maior ou menor atividade das MMPs. No GBM, acredita-se que este balanço é perdido, tanto que são encontrados altos níveis de MMPs (Lampert et al., 1998; Komatsu et al., 2004), e níveis ideais de TIMP-2 para a ativação da MMP-2, porém em baixa concentração para promover efetiva inibição da mesma (Nishida et al., 2008).

E importante dizer que em tumores com alta capacidade invasiva, observa-se que na região onde as células estão invadindo o tecido normal, há um aumento da expressão de MMPs, porém estas enzimas não são expressas somente pelas células tumorais (Takahashi et al., 2002). As células do sistema imunológico, endoteliócitos e as demais células presentes no tecido subjacente ao tumor são estimuladas por fatores inflamatórios, produzidos pelas células tumorais e imunológicas e também estimulados pela proteína denominada EMMPRIN (proteína indutora de metaloprotease de matriz extracelular), que modula a síntese de MMPs pelas células que circundam o tumor. Outro fato importante é que a degradação da MEC libera diversos fatores de crescimento, incluindo o VEGF (Chang e Werb 2001; Tang et al., 2005).

Por esse motivo, as MMPs são importantes para a angiogênese, pois degradam a membrana basal ao redor dos vasos e a MEC, "abrindo" um espaço para a invasão das células endoteliais e a formação de novos vasos, e a liberação do VEGF ao meio extracelular promove a proliferação e a migração das células endoteliais, culminando no surgimento de novos vasos sanguíneos. Por sua vez, o aporte sanguíneo de nutrientes é um importante fator para o crescimento e o desenvolvimento do tumor. Relatos de outros estudos evidenciaram que, no caso do GBM, a alta capacidade angiogênica desse tumor não está relacionada somente com o crescimento tumoral, mas sim com a

37

alta capacidade invasiva, já que as células tumorais utilizam a membrana basal dos vasos sanguíneos como substrato para migração (Farin et al., 2006). Adicionalmente, como já foi descrito, o parênquima cerebral normal possue reduzida MEC quando comparado aos demais tecidos (Zamecnik, 2005).



Esquema 3 - Mecanismo da ativação da MMP-2: (a) MT1-MMP na membrana da célula, age como um receptor para TIMP-2. A TIMP-2 se liga via região N-terminal ao sitio de ligação da MT1-MMP, este complexo atua como um receptor para a MMP-2 inativa (pró-MMP-2). A região C-terminal da TIMP-2 se liga a região N-terminal da pró-MMP-2. Uma outra MT1-MMP livre cliva o pró-peptideo e ativa a MMP-2. Neste caso deve haver uma concentração baixa de TIMP-2, importante para a ativação da pró-MMP-2. (b) quando a TIMP-2 encontra-se em altas concentrações, esta se liga em várias MT1-MMP, impedindo a clivagem da pró-MMP-2 e sua posterior ativação. Adapatado de Lefleur, 2003.

#### 1.5 Angiogênese

Sabemos que o crescimento de alguns tumores é dependente da gênese de novos vasos para a manutenção do suprimento sanguíneo, que leva os nutrientes e o oxigênio e remove os metabólitos das células. Os capilares sanguíneos normais apresentam-se como um túbulo envolto por lâmina basal (LB). Na angiogênese, foi verificado o brotamento deste túbulo, mostrando que há a formação de um novo vaso através da ramificação do mesmo (Jin et al., 2001). Na microscopia eletrônica, estes passos são evidenciados de forma mais detalhada. Após dois dias, observa-se a presença de macrófagos, fibrilas e eritrócitos, e a divisão celular de fibroblastos, células endoteliais (CE) e pericitos. A LB pode estar ausente, fragmentada ou em múltiplas camadas abaixo das CEs. A dilatação do vaso mãe marca o início da angiogênese (Paku e Paweletz, 1991). As CEs migram com extensões paralelas, conectadas nas extremidades e sempre ligadas ao vaso mãe. Estas migrações são livres de LB. A substância fundamental é depositada ao redor do vaso neoformado, exceto pela sua extremidade, que permanece ausente nesta região. O lúmen do vaso no terceiro dia começa a surgir e ao redor de alguns capilares, a LB começa a se formar. Neste ponto, os pericitos também estão presentes.

A alteração na LB ao redor do vaso mãe poderá interferir indiretamente na diferenciação, proliferação e migração da CE, dado que, pesquisas confirmam que diferentes fatores de crescimento são depositados nesta região da LB durante o processo angiogênico. Portanto, a consistência da MEC parece ser capaz de interferir na angiogênese (Kallure, 2003). As MMPs contribuem para alterar a consistência da MEC ao redor da área onde brotam os novos vasos. Diferentes componentes da LB induzem a formação do lúmen. O colágeno intersticial, por sua vez, é capaz de influenciar na proliferação das CEs (Paku e Paweletz, 1991). É comum visualizarmos uma dilatação do lúmen do capilar separado por uma ponte citoplasmática, mostrando o brotamento do novo vaso (Feng et al., 2000).

O VEGF (fator de crescimento de endotélio vascular) é uma glicoproteína contendo duas cadeias polipeptídicas idênticas, ligadas por pontes dissulfeto, e é capaz de induzir a permeabilidade vascular associada ao tumor (Mentlein et al., 2004). O

VEGF é ligante de heparam sulfato, podendo ficar ligado a este glicosaminoglicano (GAG) na MEC. Quando esta matriz é degradada, são liberados fragmentos bioativos do VEGF (Ferrara, 2004), que agem em inúmeros processos biológicos, como o estímulo à proliferação e à migração de células endoteliais, o aumento da permeabilidade do capilar, deposição de fibrina e formação de estroma. Além disso, estimula a ligação de linfócitos ao endotélio do tumor, e exerce efeito quimiotático para monócitos (Stefanik et al., 2001). O VEGF também permite a formação de vasos fenestrados (Ferrara, 2004), como ocorre, por exemplo, quando cultivadas com células de adenocarcinoma de pulmão *in vitro*. De fato, uma exposição crônica deste fator de crescimento faz com que, além do crescimento de novos vasos, estes apresentem fenestrações, o que é anormal no pulmão (Jin et al., 2001).

Já sabemos que a expressão de VEGF em tumores e principalmente em GBM é alta nas adjacências das áreas necróticas. A elevada expressão desta molécula está relacionada com o grau de malignidade tumoral. Edema cerebral vasogênico é uma complicação comum em pacientes com tumores cerebrais, podendo levá-lo ao óbito. O VEGF parece estar envolvido na abertura dos vasos endoteliais, ao promover fenestrações dos mesmos, e no aumento da permeabilidade vascular via src, um oncogene envolvido com diversos processos celulares, como proliferação, invasão e angiogenese (Groot e Milano, 2009). Além das células tumorais expressarem o VEGF, elas também estimulam as células normais do hospedeiro a produzirem e liberarem para o meio extracelular o VEGF, intensificando a atividade proliferativa, migratória e invasiva das células endoteliais. Os GBMs sintetizam abundantes quantidades de VEGF, motivo pelo qual este tipo tumoral é bastante vascularizado. De fato, acredita-se que o VEGF seja capaz de induzir a migração e a proliferação de células da glia (Mentlein et al., 2004).

A regulação da expressão de VEGF está relacionada à concentração de O<sub>2</sub>. Quando o gás oxigênio (O<sub>2</sub>) está baixo, este não hidroxila HIF-1 (fator induzido por hipóxia), fazendo com que o HIF-1 se ligue a elementos específicos, os quais aumentam a transcrição gênica de VEGF. Alguns tumores, como o GBM, inibem a síntese de PTEN, um supressor tumoral que regula negativamente o PI3-K (fosfatidilinositol-3 quinase)/AKT, resultando no aumento da ativação de HIF-1. Sabemos que vários fatores de crescimento como o Fator de Crescimento Transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), o Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta (PDGF), o Fator de Crescimento de Fibroblastos (FGF) e citocinas provenientes dos processos inflamatórios, como Interleucina-1 (IL-1) e IL-6, induzem a expressão de VEGF. Assim como alguns hormônios, também a Prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), produto da metabolização do Ácido Araquidônico (AA) pela Cicloxigenase-2 (COX), estimula o seu receptor de superfície EP2 e induz a produção de VEGF e a angiogênese (Ferrara, 2004).

O estímulo angiogênico proveniente do VEGF necessita de uma ligação ao seu receptor que culmina com a proliferação dos endoteliócitos. O VEGF, além de induzir a proliferação dos endoteliócitos para formação de novos vasos, é importante para a manutenção dos mesmos, pois previne a apoptose dos endoteliócitos via PI3-K/AKT e induz a expressão de fatores anti-apoptóticos, como Bcl-2. Possui também efeitos sobre células hematopoiéticas, como a formação de colônias maduras de granulócito-macrófago. Estudos *in vitro* demonstraram a inibição do desenvolvimento de células dendríticas, reafirmando a hipótese de que o VEGF auxilia o crescimento dos tumores e permite que os mesmo escapem do sistema imune (Ferrara, 2004).

Os receptores de VEGF são do tipo tirosina quinase, contendo sete domínios extracelulares do tipo imunoglobulina (IG), um domínio transmembrana hidrofóbico e um domínio tirosina quinase intracelular, interrompido por um domínio com uma quinase inserida (Jansen et al., 2004). A ligação do receptor ao VEGF induz a autofosforilação dos resíduos de tirosina e em seguida a fosforilação de outras proteínas intracelulares, como por exemplo, a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e a PI3-K. Ambos os seus receptores são expressos por endoteliócitos. Alguns outros tipos celulares específicos, inclusive algumas células tumorais, também expressam estes receptores, porém em menores quantidades (Mentlein et al., 2004). O FIk-1 (VEGFR2) parece ter uma alta afinidade por VEGF, levando ao aumento da permeabilidade vascular e à angiogênese. O FIt-1 (VEGFR1) foi encontrado em capilares adjacentes à epiderme, lâmina própria gastrintestinal, capilares do SNC, e também nas arteríolas, vênulas e sinusóides linfáticos. Pela distribuição deste receptor, parece que este se localiza nos pericitos e/ou no lado abluminal das células endoteliais dos vasos sanguíneos. O FIk-1 está localizado semelhantemente ao FIt-1, adjacentes aos epitélios e no sistema

41

linfático, porém ausente no SNC normal (Witmer et al., 2002). Em células de glioma da linhagem C6, foi visto um aumento na expressão de VEGF, e de seus receptores Flt-1 e Flk-1 quando comparado com o tecido nervoso normal (Stefanik et al., 2001).

Flt-1 e Flk-1 são expressos por células progenitoras hematopoiéticas e células precursoras de endoteliócitos, respectivamente. O Flk-1 tem atividade quinase intrínseca forte, sendo o maior mediador de sinalização dos endoteliócitos. O VEGF ativa a cascata de sinalização para proliferação, sobrevivência e quimiotaxia dos endoteliócitos. Parece que estas sinalizações iniciadas através da ligação do VEGF com Flk-1 estão em associação com proteínas adesivas de superfície celular, como a integrina  $\alpha_v\beta_3$  e a VE-caderina. O rompimento desta interação previne que os endoteliócitos respondam aos sinais de sobrevivência resultando numa baixa taxa de angiogênese (Jansen et al., 2004).

O Flt-1 apresenta fraca autofosforilação da tirosina e não parece possuir função sinalizadora, porém função inibidora, a fim de evitar que o VEGF se ligue a Flk-1. Por isso, pode ser considerado um regulador da atividade proliferativa dos endoteliócitos. Há outra hipótese em que alguns autores acreditam que o Flt-1 amplifica a ação proliferativa proveniente da sinalização via Flk-1, pois em estudos com PIGF (fator de crescimento de placenta), quando este se liga a Flt-1, ocorre a transfosforilação de Flk-1, levando à angiogênese (Ferrara, 2004). Em animais com deleção do gene do flt-1, os animais não chegam a nascer e apresentam alta taxa de proliferação de vasos, os quais se encontram desorganizados e morfologicamente alterados (Kerber et al., 2008; Fischer et al., 2008). Este receptor também foi encontrado em uma forma solúvel (Flt-1<sub>s</sub>) no meio extracelular. Parece que o Flt-1<sub>s</sub> está relacionado com o controle da atividade do VEGF. Sabemos que a expressão de VEGF esta intimamente relacionada com o grau de malignidade tumoral, pois é de suma importância a angiogênese no desenvolvimento de tumores e sua invasão no tecido normal. Esta forma secretada e solúvel de Flt-1 consiste em domínios Ig como no Flt-1 transmembrana com uma extensão COOH terminal contendo 31 aminoácidos derivados da seqüência de íntrons do gene de Flt-1. A afinidade deste receptor ao VEGF é dez vezes maior que o Flt-1 de membrana, porém dezenove vezes menor que a afinidade de Flk-1 (Lamszus et al., 2003).

Em GBMs, podemos verificar que há um grande aumento na expressão, tanto de VEGF como de seu receptor Flt-1<sub>s</sub> (solúvel), em comparação com tumores gliais de menor malignidade. As duas formas de Flt-1 estão relacionadas com a hipóxia, assim como o VEGF. O resultado deste estudo parece contraditório, pois Flt-1<sub>s</sub>, em tumores de alto grau de malignidade, aparece como um inibidor da atividade de VEGF. Entretanto, os resultados mostram que este aumento de Flt-1<sub>s</sub> é de doze vezes e o aumento de VEGF de trinta vezes, quando comparado aos tumores de graus mais baixos de malignidade. Em GBMs, este receptor é expresso não somente pelos endoteliócitos, mas também pelas células tumorais. O Flt-1<sub>s</sub> parece que age impedindo a ligação de VEGF com a célula endotelial, levando à inibição da angiogênese. O aumento de Flt-1<sub>s</sub> deve ser interpretado como um mecanismo de retroalimentação negativa. Uma hipótese para isto é que o Flt-1<sub>s</sub> age, não como um inibidor, mas como uma forma de balanço da angiogênese. Ora libera o fator de crescimento, ora impede que este se ligue na superfície dos endoteliócitos. Outra hipótese é que o complexo Flt-1<sub>s</sub> - heparam sulfato - VEGF mantém esta molécula estável e impede sua degradação pelas proteases ao liberar o fator de crescimento no microambiente, quando necessário (Lamszus et al., 2003). Em estudos utilizando inibidores de Flt-1, houve uma redução da angiogênese e da migração de células endoteliais, e consequentemente redução do tumor (câncer de cólon) (Bae et al., 2005; Fischer et al., 2008).

Nos endoteliócitos, o Flk-1 quando ligado ao VEGF causa desfosforilação da tirosina, resultando em sinais mitogênico, de sobrevivência e quimiotático. A fosforilação leva a uma cascata de reações que fosforila fosfolipase C, PI3-K, ras e src. Parece que VEGF leva à ativação de PI3-K/AKT em uma via dependente de integrinas, aumentando a adesão e migração das células, além do efeito anti-apoptótico (PI3-K, AKT). Este sinal anti-apoptótico deve ser proveniente de Flt-1. A ativação de Flk-1 também está envolvida com o crescimento dos endoteliócitos via sinalização de Raf-Mek-ERK (Ferrara, 2004) (Esquema 4).

Durante o processo de angiogênese, algumas enzimas são fundamentais para que este processo ocorra. São as enzimas pertencentes à família das metaloproteases (MMP) (Mentlein et al., 2004). Estudos de análises de culturas de células endoteliais de cérebro humano *in vitro* mostraram a correlação entre Flk-1 e o nível de MMP-2 secretado no meio, no qual, a utilização de um inibidor deste receptor específico de VEGF levou a uma menor expressão de MMP-2 pelos endoteliócitos na forma pró-ativa e inexistente na forma ativa. Em ensaio tridimensional de cultura destas células endoteliais com células de GBM, utilizando este mesmo inibidor, foi evidenciada menor migração das células endoteliais e redução da expressão de MMP-2. Acredita-se que a inibição do receptor FIk-1 leva à inibição de cascatas de sinalização celular, modificando a expressão de genes relacionados com a motilidade celular e a angiogênese (Wagner et al., 2003). Há também o papel dessas enzimas em degradar a MEC e dessa forma liberar fatores de crescimento como o VEGF, assim estimulando o processo angiogênico em diversos tumores (Esquema 5). No GBM, por exemplo, a MMP-2 é produzida não somente pelas células endoteliais, porém por todas as células próximas ao tumor (Chang e Werb, 2001)

O grau de malignidade dos astrocitomas está associado também com o aumento da expressão de VEGF e Flk-1. Tanto o Flt-1, quanto o Flk-1, foram visualizados em células endoteliais e Flk-1 é freqüentemente observado em endotélio tumoral, formando estruturas glomerulares (Yao et al., 2001; Kerber et al., 2008).

O parênquima cerebral é pouco permissível à migração de células de glioma, dada a pequena presença de substratos permissíveis à migração/invasão. Por esse motivo, a célula de glioma aparentemente utiliza a lâmina basal dos vasos como um "trilho" para a migração. Nesse caso, a angiogênese tem um papel importante não só como fonte de nutrientes, mas principalmente como meio de crescimento, ancoragem e migração celular (Vajkoczy et al., 1999; Farin et al., 2006).



Esquema 4 - Fosforilação de Flk-1 e a transdução de sinal: Domínios intracelulares da dimerização e ativação do Flk-1. As diferentes regiões do receptor que são fosforiladas desencadeiam uma resposta celular diferente (seta continua) indicadas pelas caixas azuis. Algumas vias ainda não se sabem ao certo como são ativadas (setas interrompidas). DAG, diacilglicerol; EC célula endotelial;eNOS, oxido nítrico sintase endotelial; FAK, quinase de adesão focal; HSP27, proteína heat-shock 27; MAPK, proteína quinase ativadora de mitógeno; MEK, MAPK e ERK quinase; PI3K, fosfatidil-3-inositol quinase; PKC, proteína quinase C; PLCγ, fosfolipase C-γ; TSAd, adaptador específico de célula T. Adaptado de Olsson et al., 2006.



Esquema 5 - Processo de angiogênese: (a) a partir de um vaso pré-existente, e sob influencia de fatores de crescimento e metaloproteases (MMP) provenientes das células próximas, a lâmina basal ao redor do vaso é degradada e os endoteliócitos se proliferam. (b) a lâmina basal inicilamente provisória, torna-se madura ao redor do vaso recém formado. A MMP é fator essencial para a angiogênese. VEGF, fator de crescimento de endotélio vascular; bFGF, fator de crescimento de fibroblasto; PDGF, fator de crescimento de rescimento de plaquetas; VBM, lâmina basal vascular. Adaptado de Kallure R, 2003.

#### 1.6 Ácidos Graxos Polinsaturados (PUFAs)

Os PUFAs são ácidos carboxílicos de cadeia longa (de 18 a 24 carbonos), com duas ou mais insaturações (ligação dupla). Os ácidos graxos são importantes fontes de energia, na forma de triglicérides, e substratos para a biossíntese de fosfolípides e colesterol. Estes são insolúveis em meio aquoso e são carregados no plasma pela albumina (McArthur et al., 1999). Os ácidos graxos são capazes de penetrar na célula por difusão ou por transportadores de membrana (FATP- proteína transportadora de ácido graxo). Os PUFAs, ao entrarem na célula, sofrem o processo de elongação e passam a ser constituintes da membrana fosfolipídica, ou podem ser utilizados como fonte energética através da sua metabolização pelas mitocôndrias e peroxissomos.

Neste estudo, focamos no ácido  $\gamma$ -linolênico (C18:3) (GLA), um ácido graxo que faz parte do grupo conhecido como  $\omega$ -6, devido a sua primeira insaturação estar localizada no C6 contado a partir do grupo metil. Os PUFAs vêm sendo estudados devido a importantes funções que estes são capazes de exercer sob diversos processos celulares envolvidos na apoptose, transcrição gênica, transformação celular, proliferação e modulação da resposta inflamatória (Leaver et al., 2002a, 2002b; Das, 2006; Colquhoun et al., 2009).

O tecido nervoso, em particular, é rico em ácido araquidônico e ácido docosahexaenóico, presente nas membranas fosfolipidicas. No cérebro, apesar da grande necessidade desse tecido por PUFAs, ainda não se sabe ao certo como este atravessa a BHE. Há controversos estudos que dizem que os ácidos graxos são carreados no plasma através da albumina e difundem na membrana plasmática dos endoteliócitos (Hamilton e Brunaldi, 2007). Por outro lado, outros pesquisadores dizem que os ácidos graxos apenas se difundem para o cérebro na presença de transportadores específicos presentes na membrana plasmática dos endoteliócitos e dos astrócitos (Qi et al., 2002). Na presença de grandes quantidades de acido y linolênico (GLA), a célula é capaz de elongá-lo, adicionando dois carbonos pela ação da enzima  $\Delta 5$ -desaturase, tornando-se assim o ácido Dihomo- $\gamma$ -linolênico (DHGLA- C20:3) (Yehuda et al., 2005). Devido à competição pela mesma enzima que elonga DHGLA para AA, grande parte do GLA permanece como DHGLA na célula (Fan e Chapkin 1998). Por isso a célula, na presença de grandes quantidades desse ácido graxo, é capaz de metabolizar o GLA, formando DHGLA e mantê-lo no meio intracelular. Os PUFAs podem agir como segundos mensageiros intracelulares, e dessa forma modular a sinalização e a proliferação celular, a transcrição de genes e a morte celular. Os PUFAs também podem alterar a síntese de lípides bioativos (como os eicosanóides) e consequentemente, modular a resposta inflamatória (Pham et al., 2006; Das, 2006) (Esquema 6).



- Esquema 6 Omega-6 3 omega-3 (PUFA) suas respectivas fontes e metabolitos. Após o consumo, os PUFAs podem ser metabolizados em compostos ativos envolvidos na inflamação. Os possíveis efeitos na inflamação estão listados na caixa inferior. IFN- $\gamma$ , interferon- $\gamma$ ; IL-2, interleucina-2; NF $\kappa$ B, fator nuclear  $\kappa$  B; PGE2; prostaglandina E2; PPAR $\gamma$ , receptor ativado de proliferação de peroxissomo  $\gamma$ ; TNF, fator de necrose tumoral; TNF $\beta$ , fator de crescimento transformador  $\beta$ . Adaptado de Mehta, 2009.
- 1.7 A Utilização dos Pufas no Tratamento de Gliomas

Baseado nos fatos relatados acima, os PUFAs passaram a ser um importante foco de estudos correlacionando a sua ingestão com algumas patologias, nas quais o sistema imunológico está envolvido, como o câncer.

Em todos os tipos de tumores que acometem o homem, o tratamento é sempre baseado no balanço entre morte e proliferação das células tumorais, ou seja, os tratamentos visam a diminuir ou preferencialmente inibir a proliferação das células tumorais, aumentar o número de células que entram em processo de morte celular e dessa forma controlar o crescimento tumoral, causando o mínimo, ou nenhum dano às células normais. No caso dos gliomas, diversos estudos observaram que os PUFAs eram capazes de induzirem a apoptose, a inibição da proliferação das células tumorais e a angiogênese (Leaver et al., 2002; Benadiba et al., 2009; Miyake et al., 2009). Os mecanismos de ação desses ácidos graxos sobre as células e o metabolismo das mesmas, têm sido alvo de estudos nas últimas décadas, na tentativa de compreender como as células tumorais sobrevivem em diferentes condições de oxigênio, suporte sanguíneo, exposição hormonal e na presença de células do sistema imunológico. Visando a utilização dos ácidos graxos, como um novo tratamento, diversos resultados mostraram que esses são capazes de modular e modificar o metabolismo das células tumorais.

As células tumorais possuem um fenótipo enzimático bastante limitado e apresentam deficiência no número de mitocôndrias e defeitos na cadeia de transporte de elétrons para produção energética. Devido a esse fato, sua principal via energética é a glicólise aeróbia (Podo, 1999; Colquhoun, 2002; Ramos e Colquhoun, 2003; Elstrom et al., 2004). Um dos motivos da existência de diversos estudos utilizando PUFAs no tratamento de alguns tumores é devido à dificuldade que as células tumorais possuem em lidar com altas taxas de lípides intracelulares, o que desencadeia diversas reações, como algumas alterações no metabolismo celular, que acarretam na célula altas concentrações de espécies reativas de oxigênio (ROS), além da ativação de mecanismos pró-apoptóticos e a redução na síntese de lípides bioativos (Hrelia et al., 1996; Vartak et al., 1998; Shono et al., 2001; Cao e Prescott, 2002). Como foi observado no trabalho de mestrado de Karina L. Ramos (Ramos, 2002; Ramos e Colquhoun, 2003), a suplementação com os PUFAs (os ácidos y-linolênico e eicosapentaenóico) em cultivo de células C6 in vitro não apenas modulou o metabolismo das células, como também reduziu em 30% a capacidade migratória das mesmas.

O cérebro é um tecido rico em PUFAs e estes são encontrados incorporados nas membranas plasmáticas das células sob a forma de fosfolípides. A manutenção de exatas quantidades de PUFAs no tecido cerebral é de suma importância, pois as membranas plasmáticas das células possuem um papel essencial na transmissão sináptica, e essas membranas estão em constante renovação (Nathoo et al., 2004).

É interessante ressaltar que as ações dos PUFAs sobre diferentes mecanismos celulares ainda são discutidas e acredita-se que os PUFAs sejam capazes de modificar a permeabilidade e a fluidez da membrana plasmática, de interferir no metabolismo mitocondrial e de induzir a peroxidação lipídica. Além disso, estes ácidos graxos também são capazes de alterar a expressão gênica de algumas proteínas, podendo levar a uma diminuição da capacidade migratória e invasiva de células tumorais, induzindo até mesmo sua apoptose (Colquhoun et al., 2009).

Outras ações dos PUFAs relacionam-se com a apoptose, o aumento na produção de ROS e na metabolização do AA. Os PUFAs podem modificar também vários processos celulares, como a angiogênese, a sinalização celular, a alteração na expressão de proteínas, entre outros. Porém, o mecanismo específico destes fenômenos ainda é desconhecido.

No caso da apoptose, foi observado que em carcinosarcoma (Walker 256) os PUFAs foram capazes de modular a atividade da CPT-I (carnitina palmitoiltransferase-I), influenciando assim a oxidação de ácidos graxos, que por sua vez, pode interferir na capacidade proliferativa e até mesmo no processo apoptótico tumoral (Colquhoun e Schumacher, 2001; Colquhoun, 2002).

Em gliomas (36B10) cultivados *in vitro* e tratados com GLA, as células utilizaram o GLA para formar DHGLA e AA, mostrando que estas células têm alta capacidade de elongar e dessaturar o GLA. Enzimas anti-oxidativas, como a superóxido dismutase (SOD), catalase e glutationa peroxidase, são os primeiros mecanismos celulares para "eliminar" radicais livres nas células normais. Porem, nas células de glioma foi observado que há uma quantidade diminuída destas enzimas (Vartak et al., 1997).

Em estudo feito com implante de células de glioma C6 no cérebro de ratos, após 8 dias da cirurgia o GLA foi injetado diretamente sobre o tumor através de bombas de infusão. Em alguns ratos, apenas era injetada solução salina, e posteriormente eram tratados com GLA. Mínimas alterações histológicas foram verificadas no tecido circundante, como uma reação inflamatória decorrente do trauma, o que não causou injúria ao tecido normal. Nos ratos com glioma que foram tratados com GLA, foi observado que havia células onde a cromatina e o núcleo encontravam-se condensados, uma característica do processo apoptótico (Leaver et al., 2002a).

O fato de o GLA ser seletivamente tóxico para as células tumorais e não para os astrócitos (Jiang et al., 1998) chama a atenção para este ácido graxo. Esta ação seletiva deve-se à reduzida proteção que as células tumorais apresentam contra a peroxidação lipídica e/ou formação de radicais livres (Vartak et al., 1998). Os PUFAs também auxiliam na sensibilização das células de glioma a outras terapias, incluindo quimioterapia e radioterapia (Vartak et al., 1997; Preuss et al., 2000).

Em experimentos utilizando cachorros com gliomas, foi injetado 1mg/dia de GLA durante 10 dias no local onde se encontrava o tumor, e verificou-se que ocorreu indução à necrose das células tumorais e endoteliais e a degeneração cística do tumor. No mesmo trabalho, foi injetado 0,25 mg/dia deste PUFA em cachorros normais durante 6 dias, e notou-se que não houve mudança nas células (Das et al., 1995). Em outro experimento, o mesmo grupo de autores injetou 1mg/dia de GLA no local de remoção do tumor em humanos, após 10 dias da cirurgia e durante 10 dias consecutivos. Dos seis pacientes que receberam o tratamento, três tinham cateter implantado no crânio. Nos outros três, o GLA era injetado diariamente em condições estéreis, procedimento monitorizado por tomografia computadorizada. Os resultados mostraram que houve aumento na sobrevida média dos pacientes de 6 meses para 2 anos, independente da técnica utilizada (Das, 2004). Estes estudos evidenciam que o GLA é capaz de aumentar a sobrevida dos pacientes com glioma, podendo ser assim utilizado como um tratamento adjunto.

Outro aspecto interessante desse ácido graxo é a capacidade de diminuir a angiogênese tumoral. Em estudos com pacientes diagnosticados com glioma, cateteres foram implantados na cavidade deixada após a cirurgia de remoção do tumor. O GLA foi injetado numa concentração de 1mg/dia, por 7 dias consecutivos, e os pacientes eram monitorados através de exames de ressonância magnética e tomografia computadorizada. Verificou-se uma redução de até 60% no contraste, sugerindo uma ação anti-tumoral e anti-angiogênica. A sobrevida estimada para estes pacientes era de 4-6 semanas, pois estavam em estágio final da doença, sem possibilidade de terapia

51

coadjuvante como radio/quimioterapia. Após o tratamento com GLA, alguns pacientes viveram mais de 4 meses, sem alteração no quadro psicológico (Bakshi et al., 2003).

Como descrito acima, os PUFAs são capazes de modificar diversos processos celulares, inclusive modificar ou modular a resposta do sistema imunológico. De fato, o suprimento de PUFAs é capaz de alterar a composição da membrana fosfolipídica, pois é incorporado nas mesmas. Os PUFAs, ao serem metabolizados, são capazes de alterar a síntese de eicosanóides. Os produtos da metabolização dos PUFAs são importantes mediadores inflamatórios e estão envolvidos em diversos processos celulares como a proliferação celular, o estímulo angiogênico e migratório, a síntese de fatores de crescimento, entre outros (Naidu et al., 1992; Leaver at al., 2002a,b; Das, 2006; Miyake et al., 2009).

#### 1.7.1 Eicosanóides

Os eicosanóides pertencem a uma família de compostos lipídicos ativos de vinte carbonos, oriundos da metabolização de alguns ácidos graxos, como AA, EPA, GLA, entre outros PUFAs. Esses mediadores são capazes de promover a sobrevivência, a proliferação e a motilidade celular. São capazes de modular a angiogênese, a adesão celular, a permeabilidade vascular e a inflamação. Acredita-se que a sua produção possa estar relacionada com a transformação celular e a promoção do câncer (Nathoo et al., 2004).

Nos mamíferos, os eicosanóides são sintetizados por todos os tipos celulares, e quando ligados aos seus receptores desencadeiam cascatas de sinalização intracelular, como a liberação de um segundo mensageiro que pode ser AMPc, diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5 trifosfato. A partir daí, uma gama de processos celulares pode ocorrer, dependendo do tipo de complexo ligante-receptor que foi estimulado (Marks et al., 2000).

O mediador lipídico sintetizado a partir do PUFA depende da enzima que o metabolizou e de qual ácido graxo é originado (Esquemas 7, 8). A síntese dos prostanóides, por sua vez, dá-se a partir da enzima ciclooxigenase; Os ácidos hidroxieicosatetraenóicos (HETEs) e leucotrienos são metabolizados pelas

lipooxigenases; E os hidroxi-eicosanóides a partir da enzima P450 monooxigenase (Marks et al., 2000). Esses mediadores lipídicos estão associados à resposta inflamatória do tecido, mediante injuria, trauma e/ou patologia, desde o início da inflamação até a formação do tecido tumoral. Há relatos que mostram a associação de inflamação crônica com o câncer, sendo alguns exemplos: a hepatite B, a presença de *Helicobacter pylori* e a pancreatite crônica estão relacionadas com o aumento do risco de aparecimento de câncer no fígado, no trato gastrointestinal e no pâncreas, respectivamente (Furstenberger et al., 2006).

Devido a essa correlação entre eicosanóides e câncer, surgiram alguns estudos que mostraram que a síntese de eicosanóides e leucotrienos tem papel importante na proliferação e metástase, estimulando ou inibindo esses processos na célula tumoral. Na presença do ácido dihomo-γ-linolênico (DHGLA), substrato para a biossíntese de prostaglandinas (PGs), verificou-se que, tanto o GLA quanto outros PUFAs aumentaram a síntese de prostaglandinas em células tumorais (Vartak et al., 1998), o que evidencia que esses ácidos graxos são capazes de modificar a síntese desses compostos lipídicos.

#### 1.7.2 Prostanóides

Os prostanóides são um grupo de lipídios bioativos provenientes da metabolização dos PUFAs pelas ciclooxigenases. O primeiro passo para a síntese de prostaglandinas (PGs) é a hidrólise de fosfolipídios da membrana plasmática para produzir araquidonato livre, em uma reação catalisada pela fosfolipase A<sub>2</sub> (secretada ou citoplasmática). Em seguida, o araquidonato livre é oxigenado pela ciclooxigenase e produz uma substância instável intermediária, a PGG<sub>2</sub> (Wang et al., 2007), a qual rapidamente é convertida em PGH<sub>2</sub>. A PGH<sub>2</sub> serve como substrato para diversas enzimas denominadas PG sintases, responsáveis pela produção das PGs (D<sub>2</sub>, E<sub>2</sub>, F<sub>2α</sub> e  $I_2$  – também conhecida como prostaciclina), e tromboxano sintase (TXA<sub>2</sub>) (Hinz e Brune, 2002). Após a síntese, a maioria dos eicosanóides é liberada pela célula (pelo transportador de prostaglandinas - PGT) e atuam em receptores específicos presentes na superfície celular e/ou em receptores nucleares (Esquema 7). Os receptores de

membrana pertencem à família de receptores acoplados à proteína G e são designados PR (receptor de prostaglandina), e seu nome varia de acordo com o tipo de PG a que é capaz de se ligar. A primeira letra é proveniente da família da PG ligante desse receptor. Por exemplo, DPR é receptor da PGD, EPR é receptor da PGE, e o mesmo raciocínio segue para os outros receptores, como FPR (PGF), IPR (PGI) e TPR (TXA).

A PGE<sub>2</sub> é o metabólito mais frequente produzido através da COX-2 e está presente em diversos tipos tumorais. Os receptores EPR, que se ligam às PGEs são de uma família de receptores subdividida em 4 subtipos, denominadas EP1 – EP4. EP1 e EP4 têm menor afinidade pela PGE<sub>2</sub>, e EP2 e EP3 possuem alta afinidade pela mesma (Wang et al., 2007). O EP1 está localizado no envelope nuclear de alguns tipos celulares, e encontra-se acoplado à proteína G. Quando EP1 é ativado através da fosfolipase C (PLC) ocorre a mobilização do cálcio intracelular e isso leva à modificação em diversos processos celulares, como estimulo proliferativo via EGFR (Zhang et al., 2007). O EP2 e o EP4 estão acoplados também à proteína Gs (estimuladora), mas sua sinalização se faz através da elevação do AMPc e posterior ativação da proteína Gi (inibidora) através da inibição da enzima adenilato ciclase (Loffler et al., 2008).

A ativação de EP2 e EP4 leva à translocação da β-catenina ao núcleo que promove a ativação de genes como ciclina D1, c-myc, COX-2 e EGR-1 (do inglês *early growth response factor*), este último por sua vez estimula a transcrição de TNF-beta, ciclina D1 e PGE<sub>2</sub> sintase. A PGE<sub>2</sub> estimula também a sinalização de EGFR (receptor para fator de crescimento epidermal), um potente fator de crescimento que atua na resposta proliferativa, migratória e modula a apoptose nas células tumorais (Telliez et al., 2006). Sabemos que a PGE<sub>2</sub> é capaz de estimular diversos processos celulares como a angiogênese, migração e invasão celular, em diversas linhagens tumorais como de próstata, colon e mama (Attiga et al., 2000; Sheng et al., 2003).

A PGE<sub>2</sub> é capaz de aumentar a expressão de MMP-2 e CD44, aumentando a invasão celular através da degradação da matriz extracelular e interferindo na adesão célula-matriz, assim permitindo que a célula possa migrar de maneira mais eficiente (Telliez et al., 2006). A inibição da COX-2 e a diminuição da PGE<sub>2</sub> em tumores de

próstata promovem uma invasão menos eficiente e migração reduzida das células, provavelmente devido à redução da síntese de MMP-2 (Attiga et al., 2000). Em tumores de mama, a inibição da COX-2 causa uma drástica redução da MMP-2, diminuindo a viabilidade das células tumorais e reduzindo a migração celular (Larkins et al., 2006). Além disso, a PGE<sub>2</sub> estimula a síntese de fatores de crescimento envolvidos na angiogênese (VEGF), via EGFR-MAPK, via GTPases (CDC42 e RAC), e desta forma auxilia na migração, no espalhamento da célula endotelial e na formação da estrutura tubular dos vasos (Cao e Prescott, 2002).

Acredita-se que a ligação da PGE<sub>2</sub> ao receptor EP1 é capaz de transativar o receptor de EGF via Src, que posteriormente levaria à sinalização da via AKT. A estimulação do EGFR pode causar aumento da ativação de MMPs, o que leva a uma maior invasão celular e ao aumento de MMP, importante no processo de angiogênese. A estimulação desse receptor também leva a uma maior migração e proliferação das células tumorais (Buchanan et al., 2003). Experimentos com células tumorais estimuladas com PGE<sub>2</sub> mostraram aumento da ativação da via Akt/PKB que está envolvida na motilidade celular e na organização da actina, processos relacionados à migração celular. Sheng et al (2003) observaram esse fenômeno em cultura de células de tumor de cólon, no qual as células apresentavam morfologia sugestiva de células em processo de migração. Esse fenômeno foi explicado pelo aumento da fosforilação de AKT/PKB.

Outra molécula estudada e que também sofre influência dos prostanóides é a tenascina-C. Alvarez-Dolado et al. (1999) verificaram em cultivo de C6 que a presença de PGD<sub>2</sub> foi capaz de alterar a expressão do RNAm da TNC nessas células tumorais. As células foram incubadas com PGD<sub>2</sub>, e observou-se que a expressão do RNAm da TNC havia diminuído, e também havia um menor crescimento das células tumorais. Os mecanismos para esses resultados ainda são obscuros, mas esses efeitos sobre a inibição da proliferação celular foram observados em outros tipos de câncer, como câncer de ovário e leucemia (Su et al., 2003; Chen et al., 2005).

Podemos perceber que os prostanóides estão envolvidos em diversos processos celulares, e parece haver uma correlação desses com os receptores de VEGF Flt-1 e Flk-1. Aparentemente, estes receptores interferem na síntese e na liberação da PGI<sub>2</sub>

(He et al., 1999), como observado por Neagoe et al. (2005), no qual a presença de VEGF-A em cultura de células endoteliais de aorta bovina (BAEC) era capaz de induzir a síntese de PGI<sub>2</sub> (mediu-se o metabólito estável de PGI<sub>2</sub>, o 6-keto PGF<sub>1α</sub>). Acredita-se que essa estimulação ocorra via receptores FIt-1 e FIk-1. A transfosforilação dos receptores de VEGF ocorre em tirosinas específicas que desencadeiam uma cascata de sinalização mediada por MAPK e PLA<sub>2</sub> citosólica, a qual culmina na ativação da PGI<sub>2</sub> sintase. Porém, este estudo (Neagoe et al., 2005) mostra que, quando os receptores FIt-1 ou FIk-1 se ligam ao VEGF de forma homodimérica, não ocorre aumento na síntese de PGI<sub>2</sub>.

A PGE<sub>2</sub> é capaz de modular a expressão de NF-kB e Mcl-1, via PI3K/AKT. Isso leva a uma diminuição de proteínas como da família Bad e Bcl-2 que inibem a apoptose e promovem a sobrevivência celular. A expressão de muitas proteínas anti-apoptóticas diminui a expressão das proteínas pró-apoptóticas, e esse desbalanço ocorre com frequência nas células tumorais, levando à diminuição na taxa de apoptose (Telliez et al., 2006).

Uma das causas dos altos níveis de prostanóides em células tumorais ocorre pela atividade da enzima COX-2, responsável pela metabolização de AA. A COX-2 esta superexpressa em diversos tumores e estimula a angiogênese e a inflamação, a invasão celular, a mitose e a produção de citocinas e fatores de crescimento (Shono et al., 2001). Há vários estudos que demonstram a relação entre altos níveis de COX-2 com a transformação de células tumorais, angiogênese, modulação da resposta imunológica, invasão celular e metástase (Trifan e Hla, 2003). Esses efeitos supracitados correlacionam o aumento da COX-2 com o aumento da expressão de MMP-2, a diminuição de caderinas (Cao e Prescott, 2002), o aumento na expressão de VEGF (Perdiki et al., 2007), entre outros.

Através de imunohistoquímica, verificou-se que em cérebro humano normal há presença de COX-2 nos neurônios, mas esta está ausente nas células da glia e do endotélio. Já na presença do glioma, a COX-2 está presente nas células tumorais (Joki et al., 2000) e nos vasos que nutrem o tumor. Por isso, acredita-se que esta enzima esteja em intima relação com a angiogênese (Dohadwala et al., 2001).

56

As áreas de necrose levam à hipóxia, o que aumenta os níveis de HIF-1 e junto com esse, parece ocorrer um estimulo para a síntese de COX-2. Por esse motivo, acredita-se que haja uma relação íntima da COX-2 com a angiogênese, já que a presença de altos níveis de HIF-1 na célula está em associação com a síntese de VEGF (Trifan e Hla, 2003).

Na revisão de Cao e Prescott (2002), observou-se que ao utilizarem um antiinflamatório não esteróide como tratamento de diversas linhagens celulares de câncer (mama, próstata, cólon e glioma) ocorreu aumento do AA intracelular, causando indução da caspase-3, aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial e acúmulo de ceramida, outro indutor de apoptose. Houve também diminuição da síntese de PGE<sub>2</sub> e da atividade da bcl-2 (proteína anti-apoptótica). Existem evidências de que a presença de COX-2 e PGE<sub>2</sub> aumenta a síntese de DNA, a proliferação e o crescimento de células normais e tumorais, através da ativação da proteína G, o que causa um aumento na expressão de EGF. A PGE<sub>2</sub> é indutora também do aumento da expressão de COX-2, servindo como feedback positivo para sua síntese (Matsuo et al., 2001). Um outro estudo com gliomas humanos mostrou uma forte relação com a expressão de COX-2 e o grau de malignidade do tumor, ou seja, quanto maior a expressão de COX-2, pior o prognóstico do paciente (Shono et al., 2001).

Como descrito anteriormente, há uma intima relação entre os PUFAs e as enzimas envolvidas na sua metabolização. O GLA , assim como o AA, é substrato dessa enzima. Por simples competição com a COX-2, o GLA é capaz de modificar a síntese dos prostanóides. O GLA, após ser elongado e dessaturado, origina o DHGLA, o qual compete com o AA. Quando DHGLA é metabolizado pela COX-2, forma PGE<sub>1</sub> (Masoodi e Nicolaou, 2006), que possui efeitos semelhantes à PGE<sub>2</sub>, porém menos eficiente. A PGE<sub>1</sub>, aparentemente, não apresenta efeito mitogênico, sua atividade é mais branda na indução da inflamação e menos agressiva que a PGE<sub>2</sub>, além de ter ação diminuta como mediador químico e como indutor no aumento da expressão de COX-2 (Hrelia et al., 1996).

Como foi visto, os prostanóides estão envolvidos em diversos processos celulares. Nos gliomas, a alta capacidade proliferativa, angiogênica e invasiva, e a sua resistência aos tratamentos convencionais, dificultam um prognóstico

satisfatório dessa patologia. Foi observado que as células de glioma na presença do GLA reduzem sua taxa proliferativa e migratória, aumenta o número de células em apoptose, e induzem a diminuição da angiogênese. Uma das hipóteses que tentam explicar essas mudanças é a modificação da síntese dos prostanóides, através da presença do GLA (Pham et al., 2006; Das, 2006).



Esquema 7 - Esquema mostrando os prostanóides e isoprostanos derivados do ácido araquidônico (AA), ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido dihomo-γ-linoleico (DHGLA) via ciclooxigenase (COX) ou radical livre catalisado. Adaptado de Masoodi e Nicolaou, 2006.

# **OBJETIVOS**

## **2 OBJETIVOS**

Avaliar no modelo *in vivo* de glioma de rato (C6) o grupo controle e o grupo taratdo com o ácido  $\gamma$ -linolênico:

- 1- a morfologia do tumor
- 2- a expressão do VEGF e seus receptores (Flt-1 e Flk-1)
- 3- a expressão das enzimas COX-2 e MMP-2
- 4- a expressão da Tenascina-C
- 5- a composição lipídica e a incorporação do GLA no tumor
  - Avaliar no modelo de esferóides de células C6 sobre tecido cerebral

fresco após o tratamento com ácido γ-linolênico:

- 6- a proliferação e apoptose das células tumorais
- 7- a distância de migração das células tumorais
- 8- a síntese de  $PGE_2$  in vitro

# **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### 3.1 Cultivo de Células

As células C6 de glioma de ratos foram obtidas no ATCC e mantidas congeladas em nitrogênio líquido em meio suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 20% de glicerol. Após serem descongeladas foram cultivadas em Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) com 10% de SFB e antibióticos (penicilina - 50 U/ml / estreptomicina – 50  $\mu$ g/ml) e deixadas em estufa à 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar.

#### 3.2 Implante Estereotáxico das Células C6 em Ratos Wistar

Os ratos Wistar foram anestesiados via intra-muscular com quetamina:xilazina (10 mg:1,5 mg/100 g de peso corporal). O osso craniano foi perfurado com broca odontológica e injetadas  $5 \times 10^5$  células C6 (em um volume máximo de 5 ul) esteriotáxicamente no Striatum esquerdo dos animais. As coordenadas da injeção são: Antero-posterior +0.48 mm (bregma), médio-lateral, 3 mm, dorso-ventral 5.4 mm. O tempo de crescimento do tumor foi de 14 dias. Após este período os animais foram anestesiados novamente, e implantado no seu dorso a bomba osmótica (Figura 1). Os animais foram divididos em dois grupos: GLA (ácido y-linolênico) que infunde uma concentração de 5 mM 0.5 µl/h e outro grupo CSF (liguor artificial) que contém 150 mM Na<sup>+</sup>, 3,0 mM K<sup>+</sup>, 1,4 mM Ca<sup>2+</sup>, 0,8 mM Mg<sup>2+</sup>, 1,0 mM P, 155 mM Cl<sup>-</sup> e 150 mg/L de albumina. Após o tratamento de 14 dias dias os animais foram anestesiados e sacrificados por perfusão transcardiaca; os animais usados para IHQs foram perfundidos com uma solução de formaldeído 4% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2) e os animais usados para MET foram perfundidos com uma solução de formaldeído 4% e diferentes concentrações de glutaraldeído (0 a 0,5%) em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2). Para as análises dos eicosanóides os animais foram anestesiados e removidos os tumores, com o auxílio de um microscópio cirúrgico, e congelados em N<sub>2</sub>. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (protocolo número 116/08).

#### 3.3 Cromatografia a Gás Acoplada a Espectrometria de Massas (GCMS)

Os animais foram sacrificados por dose letal de anestésico e seus tumores foram removidos por dissecção sob lupa microscópica. Os grupos CSF e GLA foram analisados após a implantação do tumor e tratamento por 14 dias. Para a extração dos lípides seguiu-se o método de Folch (1957), utilizando butil-hidroxitolueno (0,1%). Os ácidos graxos foram metilados utilizando o ácido sulfúrico/metanol (Kitson et al., 1996), e separados em colunas DB-23 no cromatografo a gás sobre injeção de 220 °C, e interface coluna-espectrometro de massa 250 °C, carreados por gás hélio (99,99%) no aparelho Shimadzu GCMS QP5050. As temperaturas foram 150 °C por 2 minutos após a injeção. Em seguida a temperatura sobe a 200 °C sendo 10 °C/min; 230 °C sendo 1,3 °C/min; 250 °C a 10 °C/min. Os ácidos graxos individualmente foram identificados por espectrometria de massas e tempo de retenção, à partir do uso dos padrões. O ácido heptadecanóico (17:0) foi utilizado como padrão interno das amostras e para curva de calibração, enquanto o ácido heneicosanóico (21:0) foi utilizado como padrão externo.

#### 3.4 Anticorpos

Os anticorpos policionais usados neste trabalho são: MMP-2 (8B4) obtido em cabra, VEGF (C1) obtido em camundongo, VEGF (A20) obtido em coelho, Flt-1 (C17) obtido em coelho, Flk-1 (C1158) obtido em coelho, COX-2 (H62) obtido em coelho, BrdU (IIB5) obtido em camundongo, GFAP (C19) obtido em cabra e mono nuclear phagocyte obtido em camundongo.

Todos os anticorpos primários usados neste trabalho foram obtidos da Santa Cruz Biotechnology com excessão do mono nuclear phagocyte (BD Biosciences). Os anticorpos secundários biotinilados (anti-cabra, anti-coelho e anti-camundongo) usados para as análises das IHQs em microscopia de luz foram obtidos em burro (Santa Cruz biotechnology). As IHQs em microscopia de luz usaremos ainda streptavidina biotinilada conjugada com HRP (horseradish peroxidase) – Amershan Biosciences. Os anticorpos secundários usados para as análises IHQs em MET são: goat anti-mouse conjugado com partícula de ouro (10nm) e goat anti-rabbit conjugado com partícula de ouro (15nm). Ambos foram obtidos da Electron Microscopy Science (Tabela 1).

#### 3.5 Análises das IHQs em Microscopia de Luz

Para os cortes em congelação os encéfalos foram crioprotegidos em sacarose 20% (em tampão fosfato 0,1 M – pH 7,2) "overnight". Os cérebros foram cortados em um micrótomo de congelação (Leica SM 2000R) e montados sobre lâminas gelatinizadas. As lâminas montadas com criocortes foram hidratadas por 40 minutos. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado por 30 min com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2%) em metanol/H<sub>2</sub>O (1:1) seguido por lavagens em PBS. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi feito com uma solução 2% BSA, 2% do soro do animal onde foi feito o anticorpo secundário em PBS – Triton X-100 (0,2%). Os cortes foram incubados "overnight" com os respectivos anticorpos primários (MMP-2 1:100, VEGF 1:200, Flt-1 e flk-1 1:100 e COX-2 1:200) diluídos em PBS-Triton 0,2% à temperatura ambiente. Após este tempo, as lâminas foram lavadas 3 vezes (PBS) e em seguida, incubadas por 90 min com o anticorpo secundário biotinilado (concentrações entre 1:500 e 1:1000) e então novamente lavadas com PBS e PBS-Triton 0,2%. Segue-se a incubação com um complexo streptavidina-biotinilada horseradish peroxidase (numa concentração entre 1:100 e 1:200 por 60 minutos) e novas lavagens antes da revelação das lâminas com 3,3'- diaminobenzidina (DAB) 40 mg/100 ml + 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%. Após a revelação com DAB foi realizado a intensificação da reação IHQ em uma solução de ósmio (0,04% por 30 minutos) e contra-coradas (núcleos) com metil-green 0,1%, desidratadas e montadas com Permount<sup>®</sup>.

#### 3.6 Análises das ICQs em MET

Foram efetuadas diversas técnicas de imunocitoquímica até chegarmos em uma técnica em que todas as moléculas de escolha fossem observadas tanto no tumor *per se*, quanto após o tratamento proposto. Abaixo encontram-se as diversas técnicas realizadas:

Free-floating: Após a perfusão, os encéfalos foram extraídos e o material foi pósfixado por 3 horas na mesma solução de perfusão à 4 °C. Em seguida, foram feitos cortes de 50 μm em um Vibratome serie 1000 em PBS 0,02 M, pH 7,4. Após a obtenção dos cortes, os mesmos foram lavados 3 vezes por 5 minutos em PBS 0,02 M, pH 7,4. e a imunocitoquíca foi então realizadas em placas contendo 24 wells, durante todo o processo os cortes foram manipulados com pincel. Foram utilizadas diversas concentrações de glutaraldeído, 2%, 1%, 0,5% e 0,2%. Algumas moléculas marcaram outras não. Além das diversas concentrações de glutaraldeído o tipo de revelação também foi variado, entre o DAB, intensificação pela prata e anticorpo secundário conjugado com ouro.

Freeze-cracking: uma outra tentativa realizada foi a técnica de freeze-cracking, na qual foi adicionado a etapa de congelação dos cortes, que consiste em colocar o espécime em crioprotetor (25% sacarose, 6% glicerol em tampão P(K) 0,05 M) 'overnight', após esse período o material foi cortado em vibratomo (30 μm) e imerso em nitrogênio líquido, colocado em PBS e posterior a esse processo fez-se a imunocitoquímica dos cortes idêntica a técnica previamente descrita; o free-floting. A intenção de utilizar esse técnica foi devido a ausência de marcação para as moléculas que se encontravam no espaço intra-celular, após seu congelamento, pensou-se que essa etapa aumentaria a permeabilidade da célula ao anticorpo.

Ao final de tantas tentativas frustradas, foi decidido excluir as moléculas intracelulares do projeto inicial, porém surgiu um outro problema. Após o tratamento dos animais com o GLA, não era possível obter um corte uniforme dos cérebros dos animais, o tumor se desprendia do resto do cérebro normal, e ao final da imunocitoquímica não havia mais tumor para ser analisado. Foi resolvido então começar tudo de novo, ou seja, padronizar todos os anticorpos novamente em uma técnica de possível realização em todos os grupos que seriam analisados. A técnica de escolha foi a imunocitoquímica post-embedding. Mesmo nessa técnica as moléculas intra-celulares não eram evidenciadas, iniciou-se novamente modificações no protocolo para tentar marcá-las, inclusive as modificações nas concentrações de glutaraldeído, porém, apenas quando foi eliminado o mesmo, houve imunomarcação intra-celular. Devido a todos esses percalços a técnica de escolha foi a imunocitoquímica postembbeding, com fixador 4% de formaldeído em tampão P (K) 0,1 M (pH 7,2). Apesar da morfologia não ser boa, o que seria muito interessante observar cortes com uma ótima fixação para microscopia eletrônica; o principal objetivo era visualizar a real localização intra-celular e extra-celular das moléculas analisadas.

65

#### 3.6.1 Pre-Embedding

Após a perfusão os encéfalos foram extraídos e o material foi pós-fixado 3 horas na mesma solução de perfusão à 4 °C. Em seguida foram feitos cortes de 50 µm em um Vibratome serie 1000 em PBS 0,02 M, pH 7,4. Após a obtenção dos cortes, os mesmos foram lavados 3 vezes por 5 minutos em PBS 0,02M, pH 7,4. Toda a reação IHQ em MET foi realizada pelo método de "free-floating". Em alguns espécimes foram aplicados a técnica de 'freeze-cracking', no qual consiste de colocar o material em crioprotetor (25% sacarose, 6% glicerol em tampão P(K) 0,05 M) 'overnight', após esse período o material foi imerso em nitrogênio líquido e colocado em PBS, posterior a isso foram cortados em vibratomo e seguiram para a ICQ.

O bloqueio dos aldeídos do fixador foi feito com solução de PBS com glicina a 0,1 M, pH 7,2, por 10'. Os cortes foram lavados 3 vezes em PBS 0,02 M, pH 7,4, por 5'. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi feito com o soro do animal doador do anticorpo secundário a 5% em PBS 0,2% Triton, 0,02 M, pH 7,4 por 1 hora.

Os cortes foram colocados em contato com o anticorpo primário (MMP-2, VEGF, Flt-1 e Flk-1) "overnight" em PBS 0,2% triton, 0,02 M, pH 7,4 (1:200) à temperatura ambiente. Após o período de incubação, foram feitas 4 lavagens em PBS 0,2% Triton, 0,02 M, pH 7,4 por 10' cada. Em seguida, incubou-se os cortes com os anticorpos secundários conjugados com ouro (1:50) em PBS 0,2% Triton, 0,02 M, pH 7,4 por 1 hora e 30'. Os cortes foram lavados em PBS 0,02 M, pH 7,4 por 10' cada. O material foi pós-fixado novamente em solução de formaldeído 4% e glutaraldeído 2% em PBS 0,02 M, pH 7,4 por 10', e lavados 2 vezes em PBS 0,02 M, pH 7,4 por 5'. Após a conclusão da imunohistoquímica os cortes foram re-fixados em tetróxido de ósmio 1%, pH 7,4 por 1 hora e desidratados em gradiente de etanol. Foram então infiltrados em resina Epon 812 (Electron Microscopy Science, Inc) e polimerizados a 60°C por 16 horas sobre lamínulas plásticas. Os cortes foram colocados em formas de silicone, preenchidos com a mesma resina Epon 812 e polimerizadas a 60 °C por 16 horas. A lamínula foi removida por imersão em nitrogênio líquido. O bloco foi cortado em micrótomo com lâmina de diamante, coletado em grade de "200-mesh" e contrastado com acetato de

uranila e citrato de chumbo. Os cortes foram visualizados em microscopio eletrônico Jeol (JEM 1010).

#### 3.6.2 Post-Embedding

Os animais foram anestesiados, em seguida, perfundidos pela técnica transcardíaca com solução de formaldeído 4% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2). Após a pós-fixação do material na mesma solução fixadora por 3 horas, o material foi desidratado através de gradiente de etanol e posterior infiltração na resina LR/White: álcool absoluto por 1 hora (1:1) à 4 ºC. Após esse período o material continuou ser infiltrado com 2 banhos "overnight" de resina à 4ºC. Em seguida, o material foi incluído em resina LR/White em cápsulas de gelatina e levado para estufa à 37 °C por 72 horas. Após a polimerização da resina foram feitos cortes semi-finos em micrótomo e o material trimado até atingir o tecido tumoral. Em seguida foi feito o corte ultrafino com lâmina de diamante. O material foi colocado em telas de Au para evitar precipitação de partículas de Au do anticorpo secundário. Para a imunocitoquímica o material foi hidratado em H<sub>2</sub>O destilada por 5'. Em seguida, fez-se o bloqueio dos aldeídos com glicina 0,02 M em TBS (pH 7,3) por 15'. Lavaram-se as telas com TBS (pH 7,3) por 3 vezes de 5' e fez-se o bloqueio dos sítios inespecíficos por 30' com soro do animal doador do anticorpo secundário (1:1), 1% de BSA, NaN<sub>3</sub> 0,05% em TBS (pH 7,3). Após decorrido o tempo de incubação, o material foi incubado com o anticorpo primário (1:50), 0,6% de BSA, NaN<sub>3</sub> 0,05% em TBS (pH 7,3) "overnight" à 4 °C. Após esse tempo, o material foi lavado 5 vezes por 5' cada banho em TBS (pH 7,3) e 1 lavagem de 5' em TBS (pH 8,0) para seguir o processo imunocitoquímica. A incubação do anticorpo secundário (1:10) foi feita por 2 horas com 0,6% de BSA, NaN<sub>3</sub> 0,05% em TBS (pH 8,0) à temperatura ambiente. Posteriormente, o material foi lavado 1 vez por 5' em TBS (pH 8,0) e 4 vezes por 5' em TBS (pH 7,3). Foi feito em seguida a fixação da reação com 2,5% de glutaraldeido em TBS (pH 7,3) e lavado por 3 vezes de 3' cada lavagem. Após as telas estarem secas, foi feito a contrastação do material com acetato de uranila 2% e citrato de chumbo. O material foi visualizado no microscópio eletrônico JEOL (JEM1010).

3.7 Incorporação de Bromodesoxiuridina ao DNA celular (BrdU)

Para estudo de proliferação/reparação de DNA foi feita a incorporação de BrdU. A BrdU é um análogo da timidina, que pode ser utilizado como um marcador de células em síntese (fase S) que posteriormente pode ser visualizado através de imunohistoquimica convencional.

Seguindo a técnica de Guo et al. (2003) injetamos 100mg/kg de BrdU intraperitoneal em ratos Wistar 90 minutos antes da perfusão trancardiaca com formaldeído 4% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2). Os animais foram divididos em 2 grupos, controle com CSF e GLA. Os encéfalos foram crioprotegidos em sacarose 20% (em tampão fosfato 0,1 M – pH 7,2) "overnight". Os cérebros foram cortados em um micrótomo de congelação (Leica SM 2000R) e montados sobre lâminas gelatinizadas. Seguiu-se o protocolo de IHQ utilizado nos outros estudos de microscopia de luz citados anteriormente, porem adicionou-se uma etapa seguindo o trabalho de Ngwenya et al., 2005, que consiste na utilização de HCI 2 M em 0,5% Triton após o bloqueio da peroxidase endógena, para que ocorra a abertura da fita dupla de DNA e o anticorpo primario possa ligar-se a BrdU.

#### 3.8 Zimografia in vivo

Para a análise da atividade da MMP-2 e MMP-9 foi realizada a técnica de zimografia (Clark, I.M, 2000, Hawkes et al., 2001) que consiste na separação eletroforética de proteínas desnaturadas em gel de poliacrilamida 7,5% contendo 1 mg/ml de gelatina (substrato da MMP-2). As enzimas são renaturadas e incubadas para agir na degradação da gelatina. O material biológico utilizado foi o tumor fresco e seu correspondente contra-lateral do hemisfério cerebral oposto. Ambos espécimes foram homogenizados em tampão PBS 1% Triton. A quantidade de amostra foi de 10 e 20µl em tampão Tris-HCI 0,125 M, 4% SDS, 20% glicerol e 0,04 % bromofenol azul em pH 6,8. As amostras foram corridas a 200 mV por 1 hora em tampão Tris-HCI 0,25 M glicina 1,92 M, 1% SDS em pH 8,3 à 4 °C. Em seguida o gel foi lavado 2 vezes por 15 min. em 2,5% Triton, em seguida, H<sub>2</sub>O e colocado em tampão Tris-HCI 0,05 M, CaCl<sub>2</sub> 5

mM, 0,02% NaN<sub>3</sub> em pH 8,8 para que a enzima possa agir na degradação da gelatina, o gel foi colocado em estufa à 37 °C por 18 horas. Ao gel controle foi adicionado EDTA 5 mM para inibir a atividade enzimática de MMP-2. Após o período em estufa, o gel foi corado com 0,1% Coomassie Blue em metanol, ácido acético e água (4,5:1:4,5) por 2 horas. Em seguida o gel foi colocado na solução metanol, ácido acético e água para descorar.

#### 3.9 Cultivo de Células Tumorais sobre Tecido Cerebral Fresco

Foi observado no trabalho de mestrado de Karina Lawrence Ramos, que após a utilização de GLA em cultivo de células C6, havia redução na migração das células. Nos estudos in vivo, utilizando cortes histológicos do tumor, foi difícil observar se havia mesmo essa redução da migração das células tumorais. Devido ao tumor crescer de forma heterogênea, e os cortes obtidos serem de diferentes regiões do tumor. Foi decidido então utilizar a cultura de células novamente, porém sobre o tecido cerebral, já que o matrigel é rico em colágeno e o tecido nervoso normal não é. Utilizando o tecido nervoso fresco, tentou-se mimetizar o microambiente tumoral in vivo, e dessa forma analisar a migração das células tumorais.

Foi feito o cultivo de células C6 em frascos de  $25 \text{cm}^3$ , em DMEM, 10% SFB em estufa a 37 °C com 10% CO<sub>2</sub>, após o crescimento exponencial das células cerca de 80% do frasco, elas foram raspadas e contadas em câmara de Neubauer. Em placas de Petri foram colocados 10 µl do meio de cultivo contendo 5 X 10<sup>4</sup> células, a placa foi deixada na estufa de forma que o peso das células pela gravidade formam esferóides de células. Esses esferóides foram deixados por 24h. Após esse período os ratos foram anestesiados com quetamina:xilazina (10 mg:1,5 mg/100 g de peso corporal) intraperitoneal, removeu-se o encéfalo dentro de fluxo de ar com material esterilizado, para evitar contaminação. Os encéfalos foram cortados com lâminas no sentido dorsoventral, formando fatias de cérebro fresco que imediatamente foram colocados em poços estéreis contendo membrana millicell 0,4 µm 30 mm em 1 ml DMEM com 10% SFB. Após uma hora foram colocados os esferóides sobre os encéfalos por 24 horas. Após esse período de 24 horas, o meio foi removido e colocado DMEM enriquecido

com GLA 150 µM ou BSA 10% como controle. Após dois dias de tratamento os cérebros foram removidos e fixados em formaldeído 4% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2) overnight, e desidratados com gradiente de etanol. Após a desidratação do material, estes foram incluídos em parafina e cortados em microtomo Leica (RM2145) e corados com hematoxilina-eosina (H&E). Os cortes foram analisados em microscópio de luz Nikon Optiphot-2, as imagens coletadas foram aleatórias para contagem de células em processo de mitose. Outra região analisada foi a borda dos esferóides e a distância das células que migraram na direção oposta ao esferóide de células tumorais.

#### 3.10 Coloração com Hematoxilina- Eosina

As lâminas foram colocadas em xilol por 30 minutas a 60 °C, depois 20 minutos em xilol temperatura ambiente (TA) para remoção da parafina e hidratadas em gradiente de etanol. Em seguida, as lâminas foram colocadas em água corrente, 2 minutos na hematoxilina, lavadas em água corrente por 2 minutos, lavadas em diferenciador (álcool-ácido). Em seguida, colocadas na água corrente por 5 minutos e coradas na eosina por 2 minutos. Por fim as lâminas foram lavadas em 100% etanol 3 vezes e colocadas em três banhos de xilol, montadas com resina Permount e protegidas com lamínulas.

#### 3.11 TUNEL

Para analise de células em apoptose foi utilizado o kit da Calbiochem "TdTfragEL DNA fragmentation detection", que marca a região fragmentada do DNA celular em núcleo apoptotico, podendo ser utilizado em cortes incluídos em parafina ou criocorte. Nesse kit o terminal desoxinucleotidil transferase (TdT) liga-se ao final do DNA fragmentado em apoptose 3`-OH que depois foi evidenciado com reação de estreptavidina-HRP/ DAB. As lâminas foram desparafinizadas (no caso de lâminas incluídas em parafina) e hidratadas (incluídas em parafina ou criocorte), as proteínas (histonas) foram digeridas com proteinase K 20  $\mu$ g/ml em tampão Tris 10 mM (pH 8,0) por 20 min. Em seguida, os cortes foram lavados em TBS e incubados em 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Metanol (1:10) por 5 minutos para o bloqueio da peroxidase endógena, lavados em TBS e colocados em tampão para equilibrar a reação por 10 minutos (1 M cacodilato de sodio, 0,15 M Tris, 1,5 ml/ml BSA, 3,75 mM CoCl2 (pH 6,6). Em seguida as laminas foram incubadas em TdT (marcador de DNA fragmentado) + enzima TdT por 90 minutos a 37 °C. Após o período de incubação a reação foi bloqueada com um tampão 0,5 EDTA (pH 8,0) por 5 minutos e, em seguida, os cortes foram lavados em TBS. Os cortes foram incubados com BSA (4%) e estreptavidina conjugado com peroxidase por 30 minutos. Em seguida os cortes foram lavados em TBS e revelados com DAB e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/uréia por 10 minutos. As lâminas foram contra-coradas com metil verde, desidratadas e montadas com Permount. Os cortes foram analisados e contados em microscópio de luz Nikon Optiphot-2.

#### 3.12 ELISA PGE<sub>2</sub> (enzyme-linked immunosorbent assay)

Para este ensaio foi utilizado o kit da Cayman Biochemical PGE<sub>2</sub>- monoclonal. Este ensaio é baseado na competição entre a PGE<sub>2</sub> e a PGE<sub>2</sub> conjugada a acetilcolinesterase (AchE). A PGE<sub>2</sub> compete com a AchE para se ligar ao anticorpo monoclonal (anti-PGE<sub>2</sub>) presente no poço. Após a lavagem do poço, para remover o reagente que não se ligou ao anticorpo, adiciona-se uma solução (Ellman) que contem o substrato para AchE. Essa reação colorimétrica é medida por absorbância e de acordo com a quantidade de AchE reagido podemos determinar a concentração de PGE<sub>2</sub> presente na amostra, através de uma curva padrão. Utilizamos meio de cultura de células C6 (2 X 10<sup>4</sup> células por frasco de 25cm<sup>2</sup>) tratadas com BSA (10%) como grupo controle, tratadas com GLA em duas concentrações 75  $\mu$ M e 150  $\mu$ M, e um grupo no qual foi adicionado ionóforo de Ca<sup>2+</sup> (A23187) 1  $\mu$ M que tem função de estimular a produção de PGs. Pois o aumento de Ca<sup>2+</sup>, no interior da célula, aumenta a atividade das fosfolipases, dessa forma, aumenta a liberação de AA da membrana plasmática. O AA livre permite a enzima COX de metabolizá-lo e produzir PGs.

3.13 Análise dos Dados
Todos os dados obtidos nos ensaios de migração, proliferação e apoptose estão apresentados como media ± erro padrão (SE). Os resultados foram submetidos a analise de variância seguida de teste-t não pareado ou one-way ANOVA. As diferenças foram consideradas significantes com p<0,05.

Os resultados provenientes do ensaio de zimografia foram analisados por densitometria de acordo com a intensidade das bandas presentes no gel.

Os dados de imunohistoquímica foram coletados pelo software Image-Pro-Plus e analisados no próprio programa. Nas moléculas que tiveram grande diferença na marcação imunohistoquímica, entre o grupo tratado e controle, foi feito uma mascara no qual marcava a quantidade da área de imunoreação. Sendo assim, foi possível comparar os grupos entre si, algumas moléculas tiveram uma marcação bastante heterogênea dificultando essa comparação.

# RESULTADOS

#### 4 RESULTADOS

## 4.1 Morfologia

Os resultados serão apresentados divididos em 3 grupos distintos:

O primeiro grupo analisado foi o grupo de animais no qual foram injetadas células tumorais C6 no striatum dos ratos, e assim permaneceram por um período de 28 dias (CON). No segundo grupo (CSF), os animais foram tratados durante 14 dias com fluido cerebroespinhal artificial, no qual foram colocadas as bombas osmóticas, após 14 dias da cirurgia de implantação do tumor, sendo este um dos grupos controle do tratamento proposto. O terceiro grupo (GLA), também de animais tratados, porém com ácido  $\gamma$ -linolênico (5 mM), por um período de quatorze dias.

Nos resultados de análise morfológica dos diversos grupos, foram observadas características peculiares em cada grupo. No G1, relatamos na microscopia de luz que o tumor é capaz de desenvolver-se no período proposto de 28 dias, e dessa forma ser utilizado como um típico modelo de GBM de ratos. Sendo assim, o GBM já maduro apresentava as características típicas do tumor, ou seja, células atípicas, intensa proliferação celular e vascular, áreas de necrose com células em paliçada, característico de processo necrótico e bordas difusas infiltrativas. As células tumorais migravam ativamente através das fibras de mielina e sobre a membrana basal dos capilares e vasos sanguíneos (Figuras 2A e B).

Quando o grupo CON foi analisado por MET, observamos que o GBM é um tumor rico em células. As mesmas apresentam características de células proliferativas: pequenas, pouca quantidade de citoplasma, abundante reticulo endoplasmático rugoso, ribossomas livres e núcleo bastante desenvolvido, ocupando grande parte do corpo celular. Em diversas células tumorais pôde-se observar abundância de pseudópodes, o que sugere alta atividade migratória.

A MEC do tumor é abundante quando comparada com o tecido nervoso normal. De fato, neste é difícil a visualização da MEC, mesmo em MET, no qual só conseguimos visualizar os componentes celulares, ou seja, os neurônios e as células da glia. No tumor, a MEC distingue-se nitidamente em dois tipos, fibrilar e não-fibrilar, e encontra-se ao redor das células e vasos tumorais. Esses resultados mostram a alta capacidade de produção/indução de elementos da MEC pelas células tumorais e/ou endoteliais.

Como já descrito, o GBM utiliza a membrana basal dos vasos para migração de suas células, sendo importante não apenas para nutrição e sim para a invasão tumoral. Prova disso é que observamos facilmente uma grande quantidade de células tumorais próximas aos vasos, além de um grande número de capilares sanguíneos no interior da massa tumoral e, mesmo assim, grandes áreas de necrose. Tais dados nos levam a crer que mesmo com a alta angiogenese, ocorre necrose em algumas regiões do tumor devido ao alto poder proliferativo das células tumorais (Figuras 3A e B).

No grupo CSF, o tumor encontra-se semelhante ao grupo CON, tanto na microscopia de luz (Figura 2C e D) quanto na MET (Figura 3C e D), ou seja, rico em células tumorais. Estas células apresentam-se com características proliferativas e migratórias como citadas acima. Na MEC podemos observar a presença de componentes fibrilares e não fibrilares. Os vasos sanguíneos do tumor apresentam-se íntegros, geralmente há células tumorais ancoradas nos mesmo, e há presença de focos de necrose.

No grupo GLA, encontramos resultados morfológicos bastante distinto dos outros grupos. Quando visualizado em microscopia de luz, observamos redução no tamanho da massa tumoral e um grande número de células picnóticas. Havia áreas vazias, sem presença de células. Observou-se também grande quantidade de células do sistema imunológico e reduzido tamanho do tumor quando comparado com os outros grupos (Figuras 2D e E).

Na MET, observamos que a quantidade de células foi drasticamente reduzida, sendo de difícil localização. Havia um grande número de células em processo de apoptose, nas quais foram identificados núcleo picnótico, ausência de organelas celulares e membranas em "blebbing". A MEC já não era vista em abundância, como no grupo CON, e seu componente fibrilar estava reduzido (Figuras 3E e F). O número de vasos também se encontrava reduzido, com presença de alguns capilares, muitos deles com uma morfologia alterada. De fato, havia alteração na estrutura dos vasos, mostrando abertura/espaço e áreas de desunião entre as células. Estes dados nos

75

levam a crer que houve rompimento da BHE, pois havia hemácias extravazadas na MEC tumoral. Por fim, foi evidenciado que havia aumento no número de focos necróticos quando comparados ao grupo CON.

Através de reação de imunohistoquímica para GFAP (glial fibrilary acid protein), uma proteína que marca astrócitos, foi possivel medir a área do tumor, devido a presença da cicatriz glial que circunda o tecido tumoral (Figura 4A). Essa reação do organismo fez com que fosse possível medir a área tumoral no sentido dorso-ventral. E a partir do número de cortes seriados do grupo CSF e GLA foi possível calcular a extensão rostral-caudal do tumor. O tamanho do tumor entre os grupos CSF (10,87 mm<sup>2</sup> ± 0,89) e GLA (2,72 mm<sup>2</sup> ± 0,32) houve redução de 75% p≤0,0001. Já a extensão (rostral-caudal) do tumor no grupo CSF (2,19 mm ± 0,08) e o grupo GLA (1,38 mm ± 0,19) teve redução da extensão de 38% p≤0,001 (Figura 4B).

. O cálculo do volume aproximado do tumor foi feito seguindo a fórmula de volume tumoral esferóide (Horowitz et al., 1969) V = d1 x d2 x d3 x $\pi$ /6 que evidenciou que após o tratamento com GLA houve uma redução de 85% do volume do tumor, em relação com grupo controle (CSF 12.60 mm<sup>3</sup> versus GLA 1.97 mm<sup>3</sup>) p≤0,0001.

Em relação à angiogenese, os resultados analisados mostraram uma redução conspícua da densidade de microvasos no grupo CSF (9,77  $\pm$  0,20) e o grupo GLA (5,45  $\pm$  0,23) de 44% após o tratamento com GLA p≤0,0001 (Figura 4D-F). Para esta análise, foram considerados microvasos aqueles que apresentavam diâmetro de até 14 µm, segundo Pistolesi et al. (2004).

Para comprovar qual o tipo celular encontrado em abundância em diversos cortes histológicos, foram realizadas imunohistoquímicas para imunomarcar fagócito mononuclear de rato, o que comprovou a presença de células do sistema imunológico inflitrada no tecido tumoral (Figura 4C).

# 4.2 Cromatografia a Gás Acoplada a Espectrometria de Massas

Para determinar se havia a incorporação do GLA pelas células presentes no tumor foram utilizados tumores do grupo CSF e GLA. Os resultados obtidos foram que, o GLA foi incorporado pelas células, pois o grupo CSF não pode ser observado a

presença desse ácido graxo e após o tratamento de 14 dias, havia o ácido  $\gamma$ -linolênico (0,63% ± 0,03). Devido o processo de elongação e saturaçao do GLA, no grupo CSF havia 1,25% ± 0,35 do ácido docosapentaenóico (22:5,  $\omega$ -6) e após o tratamento observamos o aumento desse ácido graxo (3,54% ± 0,83) p≤0,0001 (Figura 20A e B).

4.3 Imunohistoquímica e Imunocitoquímica

## 4.3.1 MMP-2

Em microscopia de luz o MMP-2 foi fortemente expresso em todos os animais do grupo CON e sua expressão foi encontrada principalmente no tumor e em células de glioma em sítios distantes do tumor. Essa expressão foi particularmente alta nas células de glioma que migravam pelos vasos peritumorais. Além disso, o padrão de marcação de MMP-2 apresentou uma particularidade, sua expressão pode ser observada tanto na superfície das células, quanto na MEC que as circundava (Figuras 4A-D).

Nas análises em MET, a MMP-2 mostrou-se imunomarcada nas proximidades da superfície celular, na MEC que circunda essas estruturas. Na MEC encontra-se associada à matriz fibrilar e não fibrilar (Figuras 7A e B). A MMP-2 também foi observada na própria superfície das células de glioma e tanto nas proximidades quanto na superfície dos endoteliócitos dos vasos peritumorais. O que sugere a produção e liberação dessa enzima pelas células tumorais e pelos endoteliocitos (Figura 8).

Segundo analises feitas com RNA-m (Miyake et al., 2009, Anexo B), há redução da expressão do RNA-m de MMP-2 após o tratamento com GLA de  $35 \pm 6,8\%$  p≤0,001. Esses dados foram confirmados com a zimografia.

# 4.3.1.1 Zimografia

Para confirmar a presença da MMP-2 na forma ativa, foi feito o ensaio de zimografia com extrato de tumores de rato controle e tratados com GLA. Os resultados da zimografia confirmaram que o GBM in vivo mostrou ter atividade de MMP-2, e ausência de MMP-9, pois se houvesse seria evidenciado no mesmo gel. Esse resultado

corrobora com os resultados do doutorado do Marcel Benadiba e da Karina Lawrence Ramos, em experimentos feitos no laboratório com expressão de RNA-m (RT-PCR) e por imunodetecção da proteína (por imunohistoquímica), no qual não havia a expressão de MMP-9 no modelo de GBM C6. Os géis foram analisados por densitometria e o grupo CSF (122,90  $\pm$  2,26) comparado ao grupo GLA (83,81  $\pm$  9,24) houve redução de 32  $\pm$  8,5% p≤0,004 da atividade proteolítica da MMP-2 detectado pela zimografia (Figura 6E).

# 4.3.2 VEGF

O VEGF foi intensamente expresso no modelo C6 in vivo no CON. Observou-se uma forte marcação principalmente na região das células em paliçadas e nas bordas do tumor, sítio de alta neoangiogênese. Uma forte expressão de VEGF também foi encontrada nas áreas de necrose dos tumores. A expressão de VEGF também foi intensa nos vasos tumorais e em vasos de tecido normal adjacente ao tumor. A expressão deste fator de crescimento endotelial nas adjacências do tumor, principalmente na predita cicatriz glial, sugere uma ação do VEGF muito além dos limites do tumor. Em todos os animais foi observada uma forte marcação em todo o tecido normal que circundava o tumor. Já no tecido normal do hemisfério cerebral que não recebeu o tumor a expressão de VEGF foi muito mais fraca.

No grupo CSF observamos intensa marcação de VEGF distribuídos por toda a área tumoral, algumas células do sistema imunológico também encontram-se imunomarcadas, e também células endoteliais. Áreas da MEC apresentam-se imunoreativas a VEGF e em algumas regiões onde observamos intensa proliferação celular podemos distinguir área imunomarcadas (Figura 9A e B). No grupo GLA tratado, observamos reduzida área de marcação para o VEGF quando comparados os grupos CSF (3,67  $\mu$ m<sup>2</sup> ± 627) e GLA (1,14  $\mu$ m<sup>2</sup> ± 239). Essa redução da área de imunomarcação foi de 71 ± 16% p≤0,01, dados confirmados com a redução do RNA-m de 38 ± 5,8% p≤0,001 (Miyake et al., 2009, Anexo B) (Figura 9B-F). Porém a imunomarcação segue o padrão semelhante ao grupo CSF, ou seja, células

imunomarcadas nas áreas de borda do tumor, algumas células endoteliais, grande quantidade de células do sistema imunológico fortemente marcadas e areas da MEC.

Quando visualizado na MET o padrão de marcação foi semelhante a microscopia de luz. O VEGF foi observado próximo às regiões necróticas, vasos e na MEC tumoral. Essas áreas de necrose foram alvos para a localização do VEGF, em geral as células de glioma próximas às células necróticas eram as mais imunomarcadas para VEGF. Também foi evidenciado a imunolocalização de VEGF na superfície das células endoteliais constituintes dos vasos tumorais e nas regiões de sua proximidade. O VEGF também foi observado na superfície das próprias células de glioma. A MEC apresentouse como um arcabouço para o VEGF, dado que esse foi imunomarcado associado tanto a provável matriz amorfa que circunda o tumor, quanto a matriz fibrilar constituída pelas fibrilas de colágeno (Figura 10A-C).

#### 4.3.3 Flt-1

O Flt-1, tanto o receptor quanto o Flt-1<sub>s</sub>, por sua vez foi fortemente imunomarcado no centro e na borda do glioma no grupo CON, mas a sua expressão em sítios de alta proliferação foi fracamente observada. Tanto os vasos peritumorais, quanto os vasos normais foram fortemente imunomarcados para Flt-1. A região de cicatriz glial, por sua vez, apresentou imunodetecção bem mais fraca do que no tumor e no tecido normal adjacente a esse. O Flt-1 foi imunomarcado na MEC, o que mostra a presença desse receptor também na forma solúvel no GBM. Foi observado também esse receptor na superfície das próprias células tumorais, o que nos faz sugerir que o próprio fator de crescimento para endotélio vascular, possa estar auxiliando ou até mesmo sendo um estimulante para o crescimento das células tumorais.

O grupo CSF apresentou imunomarcação para este receptor nas células tumorais em diferentes áreas do tumor, algumas regiões de intensa proliferação celular, áreas de borda tumoral e células do sistema imunológico também apresentaram imunomarcação. Alguns endoteliócitos apresentaram forte imunomarcação para o Flt-1, e na MEC havia marcação para esse receptor na forma solúvel (Figuras 11A e B).

79

O grupo GLA mostrou redução da área de imunomarcação de Flt-1 entre os grupos CSF (5,19  $\mu$ m<sup>2</sup> ± 4,77) e GLA (2,25  $\mu$ m<sup>2</sup> ± 3,11). Com redução de 57 ± 5,8% p≤0,01 da área imunomarcada. Esses dados foram confirmados pela redução do seu RNA-m em 77 ± 16% p≤0,001 (Miyake et al.,2009, Anexo 2), porém a sua localização permaneceu semelhante ao grupo CSF (Figura 11D-F).

Em MET o Flt-1 foi observado na superficie das células endoteliais dos vasos peritumorais (Figura 12 e 13A), como esperado, porém observou-se a sua imunomarcação na superfície da célula tumoral. O mesmo receptor também pôde ser imunodetectado na matriz extracelular do tecido tumoral. E este fato evidenciou a presença também da forma solúvel desse receptor no modelo de glioma estudado. Esse receptor solúvel na MEC estava associado com a matriz fibrilar (Figura 13B).

4.3.4 Flk-1

O receptor Flk-1, analisado através da microscopia de luz no grupo CON, foi imunodetectado tanto nas células de glioma da região central do tumor, guanto na sua borda. Apesar de os vasos peritumorais expressarem pouco o Flk-1, os vasos do tecidos normal apresentaram uma expressão muito diminuída desse receptor. Um fato interessante foi que na região da cicatriz glial a imunomarcação de Flk-1 foi heterogênea e, em algumas regiões, muito fraca; contrastando fortemente com a expressão tumoral. Além disso, a imunomarcação de Flk-1 foi muito fraca tanto no tecido normal adjacente ao tumor, quanto no tecido normal do encéfalo dos animais analisados (Figura 14A). Nos grupos CSF (1,73  $\mu$ m<sup>2</sup> ± 1,2) e GLA (1,43  $\mu$ m<sup>2</sup> ± 88,2) p≤0,115, não houve alteração na marcação de Flk-1 quando comparados entre si (Figura 14D). A imunomaracação para Flk-1 foi evidenciada em algumas células tumorais marcadas de forma bem distribuída por toda a área tumoral. Muitas células do sistema imunológico apresentaram imunoreação para o Flk-1 e alguns endoteliócitos. O Flk-1 foi observado em algumas células tumorais próximas aos vasos sanguineos. O que sugere uma relação entre Flk-1 com a migração dessas células pela lamina basal dos vasos (Figura 14B).

Quando observado no MET, o Flk-1 foi localizado na superfície de algumas células de glioma e também, como esperado, na superfície de algumas células endoteliais do tumor (Figura 15). A imunomarcação de Flk-1 foi de difícil localização e sua presença não pode ser observada na matriz extracelular tumoral.

## 4.3.5 Tenascina-C

Na TNC no grupo CON, foi evidente a sua marcação de forma bastante heterogênea e não seguiu um padrão específico em regiões do tumor. Algumas células encontram-se marcadas de forma pericelular, podendo ser encontrado este padrão de marcação nas bordas do tumor, mas também em regiões mais profundas. Na MEC também foi vista uma marcação para a TNC de forma difusa (Figura 14E). Algumas células endoteliais presentes na massa tumoral apresentaram-se imunomarcadas para TNC. No grupo CSF o padrão de marcação foi semelhante ao grupo CON, as regiões mais imunomarcadas foram nas bordas do tumor, e ausência de marcação em regiões de intensa proliferação celular e no tecido normal quando analisado as células, já na MEC a imunomarcação para TNC encontra-se difusa.

Já no grupo GLA a imunomarcação para a TNC apresenta-se de maneira difusa e heterogênea, porém nitidamente mais fraca e em menor número de células quando comparado ao grupo CSF, algumas células tumorais apresentam-se marcadas, e também células do sistema imunológico. Algumas células endoteliais também se encontram imunomarcadas. As regiões de borda do tumor são as áreas celulares mais imunorreativas. Na MEC a imunomarcação apresenta-se difusa (Figura 14F).

Quando a TNC foi analisada pela MET pôde-se visualizar as partículas de ouro, próximas à membrana plasmática de algumas células tumorais. Estas partículas se encontravam no citoplasma e também na matriz pericelular, sugerindo que a síntese dessa glicoproteína é feita pela célula tumoral. Já na MEC, a TNC encontrou-se difusa associada, ora à MEC fibrilar, ora à não-fibrilar, o que nos levou a crer que essa glicoproteina realmente pode se associar a outras moléculas da MEC. As células endoteliais também apresentaram TNC próxima à sua membrana plasmática, mas este padrão foi observado apenas em algumas células. Como na MET a área analisada é bastante pequena, em conjunto com o baixo número de células endoteliais que expressam a TNC, ao contrário do que foi evidenciado na microscopia de luz, não foi possivel visualizar imunomarcação para TNC em células endoteliais, ou próximos a essa (Figura 16).

## 4.3.6 COX-2

A cicloxigenase-2 teve sua imunomarcação semelhante ao VEGF no grupo CON, quando visto na microscopia de luz. Uma forte marcação foi observada nas células em paliçada, ou seja, na região que circunda a área necrótica. Nas áreas de intensa proliferação celular e intensa angiogênese também foi encontrada essa enzima, porém de forma mais moderada. Pôde-se observar um grande número de células tumorais com intensa imunomarcação na região perinuclear. Alguns vasos tumorais apresentaram imunomarcação para a COX-2. Algumas células do tecido nervoso normal apresentavam imunomarcação para COX-2, pois no sistema nervoso a COX-2 é constitutiva, e essa enzima foi imunomarcada em algumas células nervosas normais no tecido próximo ao tumor (Hoffmann, 2000).

No grupo CSF observou-se imunomarcação para a enzima COX-2 em células tumorais e endoteliais de forma heterogênea e em áreas diversas do tumor, como nas áreas de borda e areas de intensa proliferação celular (Figura 17A), além de células do sistema imunológico. Em áreas de tecido nervoso normal, algumas células foram imunomarcadas para a COX-2

No grupo GLA, o padrão de marcação é semelhante ao grupo CSF, ou seja, células tumorais e endoteliais imunomarcadas, porém parece haver maior quantidade de células do sistema imunológico, as quais apresentam forte imunoreação a COX-2. As áreas de borda do tumor não são tão imunoreativas quando comparado com o grupo CSF, o mesmo ocorre com as áreas de intensa proliferação celular (Figura 17C e D). Há mudança na expressão de COX-2 visivel, porém bastante heterogênea, dificultando assim a quantificação dessa enzima. Dado esse que corrobora com analises feitas no RNA-m de COX-2, pelo aluno de doutorado Marcel Benadiba. No tecido normal, podemos encontrar regiões imunorreativas fora da área tumoral.

A imunolocalização da COX-2 em MET observada em algumas células tumorais, em regiões semelhantes às citadas na microscopia de luz, ou seja, próximo às regiões necróticas, alguns endoteliócitos, algumas células no interior da massa tumoral e do sistema imunológico. O padrão de imunomarcação da COX-2 segue o que já foi descrita por outros autores (Morita et al., 1995; Grewal et al., 2005), a enzima se encontra no retículo endoplasmático rugoso, e na membrana nuclear externa e interna das células tumorais, endoteliais e/ou algumas células nervosas normais, em geral, estudos mostram que uma co-localização da enzima COX-2 com a fosfolipase A<sub>2</sub> (Figura 18).

## 4.5 Bromodesoxiuridina (BrdU)

Foram utilizadas lâminas dos animais do grupo CON e GLA que sofreram incorporação de BrdU ao seu DNA, e posterior reação imunohistoquímica para BrdU. As imagens coletadas foram de diversas regiões do tumor e contadas as células marcadas na região nuclear. Os resultados foram que o grupo CON teve 56,6 células marcadas por campo, enquanto o grupo tratado com GLA tinha 36,5 células, sendo assim, houve uma redução de 31,9% p≤0,0001 (Figura 17E-F).

# 4.6 Ensaio de Migração

Com os resultados das imunohistoquímicas e imunocitoquímicas, somado aos resultados dos trabalhos *in vitro* de outros alunos do laboratório, foi decidido utilizar uma outra técnica de cultivo para analisar a capacidade do GLA de inibir a migração da células tumorais sobre o substrato cerebral. Foram feitos esferóides de células tumorais C6 e estes cultivados sobre tecido cerebral fresco (Del Duca et al., 2004). Esta técnica foi escolhida para tentar mimetizar o microambiente *in vivo*, no qual sabemos que a MEC pode influenciar alguns processos celulares, e dessa forma verificar se ocorriam diferenças na migração das células tumorais após o tratamento com GLA.

O grupo CON teve uma média de migração de 147,56  $\mu$ m, enquanto as células após serem tratadas com GLA migravam em média 100,4  $\mu$ m, ou seja, houve uma

redução de 32% p≤0,001. Aproveitamos e contamos o número de células que estavam migrando, e não encontramos diferenças significativas quando comparado o grupo CSF (63,6 ± 11) com o GLA (55,8 ± 4,4) (Figura 19).

## 4.7 Ensaio de Proliferação

Devido ao número de células em proliferação observado após a coloração do H&E, foi decidido contar essas células no grupo CSF com o GLA, e comparar com o número de células em processo de apoptose. As mesmas laminas analisadas para o ensaio de migração foram utilizadas para contar o número de células tumorais em processo de mitose. Foi considerado célula em proliferação as quais se encontravam em estágio de prófase, metáfase, anáfase ou telófase. Os resultados obtidos foram: grupo CON (16,4 cél. ± 0,6) quando comparado ao grupo GLA (9,9 cél. ± 0,5) houve uma redução de 39,5% p≤0,0005 no número de células em processo de mitose (Figura 20A-C).

# 4.8 Ensaio de Apoptose

Para os resultados obtidos no ensaio de apoptose, utilizamos o kit da Calbiochem. Nos cortes oriundos também de esferóides de células C6 sobre tecido cerebral de ratos ex vivo foram realizadas as reações de TUNEL, as imagens foram coletadas em áreas aleatórias utilizando o mesmo software (Image Pro-Plus) e contado o número de células reativas após a utilização do Kit. Os resultados foram: grupo CON (104 cél.  $\pm$  1,1) e grupo GLA (151 cél.  $\pm$  2,1) um aumento de 44,7% (p = 0,001) no número de células em apoptose (Figura 19D-F).

4.9 ELISA PGE<sub>2</sub>

O kit de ELISA para PGE<sub>2</sub>, detectou que *in vitro* que todos os grupos, a PGE<sub>2</sub>, é sintetizada pelas células tumorais C6. O grupo COM apresentou 1,91pg/µl  $\pm$  0,34 de PGE<sub>2</sub>. Após o tratamento com o GLA nas diferentes concentrações mostrou um

aumento da sintese da PGE<sub>2</sub>, GLA 75  $\mu$ M (18,95 pg/ $\mu$ l ± 0,29) e GLA 150  $\mu$ M (35,15 pg/ $\mu$ l ± 0,70). No grupo utilizado o ionóforo de Ca<sup>2+</sup> (A23187) havia 20,51 pg/ $\mu$ l ± 1,19 de PGE<sub>2</sub>. Cabe aqui dizer que o kit utilizado não distingue os tipos de PGEs que são sintetizados pela célula entre a PGE<sub>1</sub>, a PGE<sub>2</sub> e a PGE<sub>3</sub> (Figura 21).



Figura 1 – Cirurgia para o Implante das células tumorais e da bomba osmótica – (A) Animal posicionado na mesa esteriotáxica, com incisão na pele do animal. (B) Localização do sítio de injeção. (C) Injeção das células tumorais. (D) Bomba osmótica contendo o GLA. (E) Colocação da bomba osmótica no dorso do animal. (F) A cânula da bomba osmótica na posição correspondente ao local onde foi injetado as células tumorais.







Figura 2 - Morfologia do tumor visualizado por microscopia de luz, corado com H&E - (A e B) Tumor grupo COM (n = 12), observe a presença de área necrótica, intensa proliferação celular e vascular. (C e D) Tumor grupo CSF (n = 12), com grande quantidade de células, vasos semelhante ao grupo CON. (E e F) Tumor grupo GLA (n = 12), observe que a quantidade de células encontra-se bem reduzida quando comparado com os outros grupos, exceto por uma pequena área próxima ao tecido nervoso normal (setas). Barra de escala 100 μm.



- Figura 3 Morfologia do tumor observado por microscopia eletrônica de transmissão - (A e B) Tumor grupo COM (n = 6), observar o número de células tumorais, a presença de células próximas a vasos sanguíneos e MEC. As células tumorais apresentam núcleo com abundante eucromatina, pouco citoplasma, características de célula em intensa atividade (C e D). Tumor grupo CSF (n = 8), observe a semelhança no número de células tumorais e morfologia semelhante ao grupo CON e presença de vasos sanguíneos. (E e F) Tumor grupo GLA (n = 8), apresenta-se com reduzido número de células tumorais, com características de célula em processo de apoptose (blebbing). Presença de células de morfologia diferente quando comparado aos outros grupos, os vasos apresentam alteração morfológica e espaços vazios em seu citoplasma. As escalas encontram-se nas micrografias.











Figura 4 – Imunohistoquímica para GFAP, fagócito mononuclear e contagem de microvasos em cortes corados por H&E - (A) imunohistoquímica para GFAP (n = 12), o que possibilitou delimitar a área do tumor. (B) Gráfico mostrando a área (mm<sup>2</sup>) e a distância rostro-caudal do tumor entre os grupos CSF e GLA (n = 12), com redução de 75% e 38% respectivamente. (C) Imunohistoquímica para macrófago (n = 12), mostrando a grande quantidade dessas células no tumor dop grupo GLA. (D) Grupo CSF e (E) grupo GLA, corados por H&E para contagem da densidade de microvasos (n = 10). (F) Gráfico mostrando a densidade de microvasos entre os grupos CSF e GLA, para análise estatística foi utilizado o teste-t de estudante p≤0,05. As escalas encontram-se nas figuras.



Figura 5 - Cromatografia a gás e espectrometria de massa – (A e B) perfil lipídico do tumor comparação entre o grupo CSF e GLA (n=12), observar que o GLA (18:3) foi incorporado pelas células após o tratamento com GLA, e ocorre o aumento do ácido docosapentaenóico (22:5) pela elongação e saturação do GLA. Para análise estatística foi utilizado o teste-t de estudante p≤0,05.





Figura 6 – Imunohistoquímica para MMP-2 revelado com DAB – (A) Grupo CSF Observe que a imunomarcação encontra-se por todo o tumor, algumas células tumorais estão mais imunomarcadas, e há imunomarcação em células endoteliais (seta). (B e C) Grupo GLA, observe a reduzida imunomarcação comparado ao grupo CSF, porém há algumas células tumorais e endoteliais imunomarcadas para MMP-2. (D) controle negativo. (E) Gráfico mostrando a atividade proteolítica da MMP-2, observada por zimografia entre os grupos CSF e GLA (n = 11). Para a análise estatística foi utilizado o teste-t de estudante p≤0,05. Barra de escala 50 µm (D) 100 µm.



Figura 7 – Imunocitoquímica para MMP-2 – (A) Observar que a MMP-2 encontra-se associada a matriz extracelular, fibrilar e não fibrilar (seta azul). (B) Imunolocalização da enzima na MEC e próximo à membrana plasmática da célula tumoral (seta vermelha). Barra de escala 200nm. (n = 16).



Figura 8 - Imunocitoquímica para MMP-2 – Observar uma célula tumoral utilizando a lâmina basal para migrar, pode-se visualizar a presença da MMP-2 próxima à membrana plasmática da célula tumoral, e também no endoteliócito (seta vermelha). Barra de escala 200nm. (n=16).









Figura 9 – Imunohistoquímica para VEGF revelado com DAB – (A e B) Grupo CSF observe a intensa marcação próxima aos vasos sanguíneos, próximo a áreas de intensa proliferação celular e nas áreas próximas ao tecido normal. (C e D) Grupo GLA, marcação reduzida quando comparada ao grupo CSF, porém há imunomarcação em regiões próxima a vasos e a células tumorais. (E) controle negativo da reação. (F) Gráfico mostrando a área (μm²) de marcação entre os grupos CSF e GLA (n = 20), para análise estatística foi utilizado o teste-t de estudante p≤0,05. Barra de escala 50μm. (n = 16).



Figura 10 - Imunocitoquímica para VEGF – (A) O VEGF encontra-se na proximidade da membrana plasmática de um endoteliócito (seta azul) e de uma célula tumoral, (B e C) e associado à matriz extracelular (seta vermelha). Barra de escala 200nm. (n = 16).







Figura 11 – Imunohistoquímica para FIt-1 revelado com DAB – (A e B) Grupo CSF, observe a imunomarcação do FIt-1 distribuida pelo tumor, exceto em áreas de intensa proliferação celular. Algumas células tumorais encontram-se fortemente marcadas e também células endoteliais. (C e D) Grupo GLA mostra reduzida imunomarcação para FIt-1 quando comparado ao grupo CSF. Poucas células encontram-se imunomarcadas, e também é possível observar essa imunoreação em células endoteliais. (E) controle negativo. (F) Gráfico mostrando a área (μm<sup>2</sup>) de marcação entre os grupos CSF e GLA (n = 11), para análise estatística foi utilizado o teste-t de estudante p≤0,05. Barra de escala 50 μm.



Figura 12 - Imunocitoquímica para FIt-1 – A micrografia mostra a presença do receptor FIt-1 no endoteliócito e próximo a sua membrana plasmática (seta azul) e sua imunolocalização na matriz extracelular (seta vermelha). Barra de escala 200nm. (n=10).



Figura 13 - Imunocitoquímica para FIt-1 – (A) O FIt-1 encontra-se próximo a membrana plasmática do endoteliócito (seta azul), (B) e associado à matriz extracelular, confirmando a presença desse receptor na sua forma solúvel (FIt-1<sub>s</sub>) (seta vermelha). As escalas encontram-se nas micrografias. (n = 10).












Figura 14 – Imunohistoquímica para FIk-1 e TNC revelado com DAB - (A e B) Observe a imunomarcação para FIk-1 em algumas células tumorais e células endoteliais, não houve diferença na imunoreação entre os grupos. (C) Controle negativo da imunohistoquímica para FIk-1. (D) Gráfico mostrando a área de marcação de FIk-1 (n = 12). (E e F) Imunohistoquímica para TNC (n = 30), observe algumas células tumorais imunomarcadas próximo ao tecido normal e à vasos sanguíneos (seta aberta). Algumas células imunomarcadas em áreas de intensa proliferação células (seta aberta). (G) Controle negativo da imunohistoquímica para TNC. Barra de escala 50 μm.



Figura 15 - Imunocitoquímica para Flk-1 – (A) O receptor Flk-1 encontra-se imunomarcado na membrana plasmática do endoteliócito (B) e na mesma região da célula tumoral (seta azul). Barra de escala 200 nm. (n = 10).



**Figura 16 - Imunocitoquímica para TNC** – (A e B) A TNC pode ser observada na matriz extracelular, próxima a célula tumoral (seta azul). Barra de escala 200nm. (n = 12).







Figura 17 – Imunohistoquímica para COX-2 e BrdU revelado com DAB – (A) Imunohistoquímica para COX-2 (n = 12), grupo CSF, observe células tumorais e endoteliais imunomarcadas, em uma área próxima ao tecido normal há um grupo de células com intensa imunomarcação (seta). (B e C) Grupo GLA, imunomarcação fraca para COX-2, observa-se que há imunomarcação, apenas em algumas células tumorais e células endoteliais (setas). (D) controle negativo. (E) Imunohistoquímica para BrdU (n = 16) revelado com DAB, observe a marcação nuclear. (F) Gráfico mostrando o número de células imunomarcadas entre os grupos CSF e GLA, para análise estatística foi utilizado o teste-t de estudante p≤0,05.





Figura 18 - Imunocitoquímica para COX-2 – (A) Observar que a enzima esta presente no citoplasma da célula tumoral, próximo ao núcleo e no retículo endoplasmático (seta azul) (B) e também o endoteliócito expressa a COX-2 (seta azul). (n = 8).



Figura 19 – Cultivo de esferóides de C6 sobre tecido cerebral corados por H&E para medir a distância de migração das células tumorais – (A) Grupo CON e (B) grupo GLA. (C) Esquema de como foi feito o experimento e a medida da distância a partir da borda do tumor. (D) Comparação entre os grupos controle e GLA, em ralação ao número de células migrando (n = 24). (E) Gráfico mostrando a distancia (μ) de migração das células tumorais à partir da borda do esferóide grupo CON e (F) grupo GLA, (G) comparação entre os grupos (n = 24). Para análise estatística foi utilizado o teste-t de estudante p≤0,05.



Figura 20 – Cultivo de esferóides de C6 sobre tecido cerebral corados por H&E e reação de TUNEL e razão mitose X apoptose – (A) células em mitose grupo CON e (B) grupo GLA. (C) Gráfico mostrando o número de células tumorais em processo de mitose entre os grupos CON e GLA (n = 24). (D) Reação de TUNEL no grupo CON e (E) grupo GLA. (F) Gráfico mostrando o número de células tumorais em apoptose entre os grupos CON e GLA (n = 36). (G) Razão mitose X apoptose entre os grupos CON e GLA (n = 65). Para análise estatística foi utilizado o teste-t de estudante p≤0,05.



Figura 21 - ELISA para PGE2 - ELISA pra PGE2 *in vitro* após o tratamento com GLA nas diferentes concentrações e utilizando o ionóforo de Ca2+ (A23184). Obeserve que houve aumento da liberação da PGE2 em todos os grupos. Para análise estatística foi utiliza do o teste-t de estudante p≤0,05.

## DISCUSSÃO

### **5 DISCUSSÃO**

#### 5.1 Angiogênese

O prognóstico de pacientes com GBM está intimamente relacionado com a invasão das células tumorais (Binder e Berger, 2002). Para que as células sejam capazes de invadir o tecido normal do hospedeiro são necessários fatores permissivos a este evento biológico, entre eles encontram-se: a composição da matriz extracelular, a presença de receptores específicos localizados na membrana plasmática das células, e a síntese de diversos tipos de proteínas, incluindo fatores de crescimento, proteínas envolvidas na sinalização intracelular, enzimas, entre outros.

Outro aspecto que podemos evidenciar neste tipo de tumor é o seu rápido crescimento devido à proliferação das células tumorais, a qual leva à formação de áreas necróticas nas regiões onde os vasos sanguíneos não estão presentes. De fato, as células tumorais necessitam de nutrientes provenientes do sangue. Sabemos que a baixa quantidade de  $O_2$  inibe a hidroxilação de HIF-1 (fator induzido por hipóxia), um heterodímero constituído de duas partes, HIF-1 $\alpha$  e HIF- $\beta$ . Na falta de  $O_2$ , o HIF-1 $\alpha$  não é ubiquitinizado e se liga a elementos responsivos de hipóxia, que são promotores de diversos genes, entre eles o gene do VEGF (Harris, 2002; Jansen et al., 2004). Tal fato explicaria a forte marcação encontrada para o VEGF nas áreas necróticas do modelo de GBM aqui descrito.

A maior expressão de VEGF, no nosso modelo, foi encontrada em regiões perinecróticas formadas pelas células em paliçada, como foi descrito por outros autores em astrocitoma maligno humano (Plate et al., 1992; Plate et al., 1994; Brat et al., 2004). Neste contexto, as análises dos resultados obtidos em MET mostraram que a expressão de VEGF estava associada às células endoteliais, sendo que sua imunomarcação pôde ser observada, como esperado, na superfície destas células (Mentlein at al., 2004). O VEGF também foi imunolocalizado na matriz extracelular desses tumores, próximo aos componentes fibrilares e aos componentes não fibrilares dessa matriz. Como revisado por lazzo e San Antonio (2001), o VEGF pode ser sequestrado por componentes da matriz, como por exemplo, proteoglicanos de heparam sulfato, que são capazes de agir liberando gradativamente o VEGF ao meio extracelular. Outro fato interessante ressaltado pelos autores é que as vias de sinalização ativadas por VEGF são dependentes de heparam sulfato. Além de ter sido localizado na superfície das células endoteliais, o VEGF também foi imunomarcado na superfície das células de GBM. Podemos sugerir três hipóteses para este padrão de marcação: (i) o VEGF estaria sendo produzido e secretado pela célula tumoral para exercer seu papel em células endoteliais adjacentes; (ii) o VEGF poderia estar associado a um proteoglicano de heparam sulfato pericelular; (iii) este fator de crescimento poderia estar associado à membrana da célula tumoral por um receptor específico, o que conotaria um papel desse fator de crescimento sobre as células tumorais.

Segundo Plate et al. (1992, 1995), células que expressam VEGF poderiam ter uma vantagem em seu crescimento, pois a ligação do VEGF ao seu receptor gera uma sinalização intracelular. Como foram observadas nos resultados, as células tumorais foram capazes de expressar VEGF e seus receptores (Flt-1 e Flk-1) na sua membrana plasmática. Este fato nos leva a crer que poderia haver uma sinalização intracelular nas células de glioma, provenientes da ligação do VEGF aos seus receptores. Dessa forma, o VEGF estaria estimulando a proliferação, a migração e a invasão da célula tumoral, assim como ocorre com os endoteliócitos (Olsson et al., 2006; Ruoslahti, 2002).

Os receptores de VEGF Flk-1 e Flt-1 têm sido analisados em outros trabalhos, e correlacionados com o grau de malignidade dos tumores cerebrais. Como mostrado nos resultados, o receptor Flk-1 foi uniformemente imunomarcado no tumor estudado, e sua expressão também pôde ser observada nos vasos peritumorais. Por outro lado, a expressão de Flk-1 nos vasos normais e no tecido normal circundante ao tumor foi muito diminuída quando comparados com o tumor, o que corrobora outros trabalhos que mostram a regulação negativa da expressão desse receptor no tecido cerebral normal adulto (Yao et al., 2001). As análises do GBM estudado através da MET por sua vez mostraram que, não apenas as células endoteliais expressaram esse receptor em sua superfícíe, mas também as próprias células C6. Yao et al. (2001) relacionaram o aumento da expressão de Flk-1 com uma baixa sobrevida dos pacientes, sobretudo em tumores que expressavam altos níveis de VEGF e Flk-1 concomitantemente.

Já o Flt-1 foi amplamente encontrado nas células de glioma dos tumores analisados e sua expressão também foi muito forte nos vasos peritumorais, o que conota um papel importante desse receptor no processo angiogênico. Plate et al. (1994), analisando a expressão de Flt-1 por hibridização *in situ* em tumores humanos, observaram a presença desses receptores apenas nas células endoteliais e não tumorais. Por outro lado, outros pesquisadores evidenciaram a expressão do RNAm e/ou proteína de Flt-1 em células tumorais (Graeven et al., 1999; Boocock et al., 1995; Zhang et al., 2002). No nosso estudo, o Flt-1 foi fortemente expresso no tecido normal circundante ao tumor, e em MET, esse receptores "endoteliais" também em células tumorais, como câncer de mama e de próstata (Price et al., 2001; Jackson et al., 2002). Nossos dados mostram que as células tumorais C6 são capazes de expressar ambos os receptores de VEGF, e dessa forma, poderiam tirar proveito das vias de sinalização induzidas por esse fator de crescimento para estimular sua própria proliferação.

Enquanto o papel de Flk-1 na proliferação endotelial e na permeabilidade vascular é frequentemente abordado, o papel de Flt-1 é menos conhecido. Esse último pode estar presente, tanto na forma solúvel, como na forma transmembrana e essas variantes são resultados do splicing alternativo do RNAm que os codifica (Ferrara et al., 2003). Apesar de apresentar dez vezes mais afinidade pelo VEGF que o Flk-1, o Flt-1 apresenta dez vezes menos atividade tirosina quinase. Assim a maior parte da atividade biológica de VEGF seria mediada por Flk-1 (Ferrara e Davis-Smyth, 1997). Alguns trabalhos sugerem que o Flt-1 solúvel desempenharia papel inibitório ao sequestrar o VEGF, controlando assim a sua disponibilidade para outros receptores (Ferrara, 2004). Além disso, o Flt-1 pode heterodimerizar com o Flk-1, inibindo a sua autofosforilação e a consequente sinalização intracelular (Kendall at al., 1996).

A expressão do Flt-1 pode parecer paradoxal, mas Lamszus et al. (2003) mostraram que em astrocitomas humanos a expressão de Flt-1 solúvel apresentava uma forte correlação tanto com a densidade dos vasos, quanto com a sobrevida dos pacientes. Os autores sugeriram que o Flt-1 não teria, necessariamente, uma ação inibitória na angiogênese de GBMs por três motivos: (1) A sua ação inibitória estaria

relacionada com o balanço das expressões de VEGF *versus* Ftl-1 solúvel; (2) O Flt-1 solúvel poderia se ligar ao VEGF, protegendo-o da degradação pela via das proteases, (3) O receptor poderia ser expresso pelas próprias células tumorais (o que não foi evidenciado por Lamszus et al., 2003) e agir diferencialmente na regulação da angiogênese desses tumores. Como foi observado nos resultados desse trabalho, as células tumorais expressam o Flt-1, e quando ligado ao VEGF pode ativar o HIF-1 $\alpha$ , agindo como um regulador autócrino para transcrição de VEGF e outras proteínas importantes na angiogênese (Das et al., 2005; Kerber et al., 2008;).

Sabe-se que o processo angiogênico presente no GBM é importante não só para a nutrição das células tumorais, mas também para a migração das mesmas. Isso pôde ser observado em diversas micrografias apresentadas nos resultados desse trabalho, já que as células tumorais utilizam a lâmina basal dos vasos para migrar (Farin et al., 2006).

No modelo de estudo aqui apresentado observamos que a localização de VEGF e MMP-2, encontram-se nas mesmas áreas, mostrando a relação entre a degradação da MEC e a posterior invasão das células tumorais no tecido adjacente, e próximo a capilares sanguíneos. De fato, no processo de angiogênese é necessário que ocorra degradação da MEC e da lâmina basal que envolve os vasos sanguíneos. Há trabalhos que correlacionam a expressão de MMP-2 com aumento da síntese de VEGF. Um dos mecanismos que estariam envolvidos nesse aumento de MMP-2 e VEGF seria através da atividade dupla de MT1-MMP. Este seria capaz de ativar a MMP-2 e aumentar a expressão de VEGF (Manuat et al., 2003). Outros estudos observaram que os endoteliócitos, quando cultivados com células de glioma em situações de hipoxia, induziam a expressão de MMP-2, posteriormente secretada no meio, e a inibição de caspases, diminuindo o número de células em apoptose, via HIF (Ezhilarasan et al., 2007).

Como mostram os resultados, a MMP-2 apresentou distribuição difusa, ora na matriz extracelular, próxima aos endoteliócitos ou à massa tumoral, ora próxima à membrana plasmática de ambas as células. Cabe aqui lembrar que para a MMP-2 tornar-se ativa, é necessária a sua ligação a TIMP-2 e a MT1-MMP, ou à integrina  $\alpha_v\beta_3$ , o que explicaria a presença da MMP-2 próxima da membrana plasmática das células

tumorais e endoteliais, como observado nesse estudo e em outros (Bjorklund e Kovuinen, 2005; Skuli et al., 2009).

Outros trabalhos mostram altas concentrações de TIMP-2 no glioma, um dado que seria contraditório, já que este inibe a ação da MMP-2. Porém, deve haver um desbalanço na quantidade de MMP-2 e TIMP-2 para que ocorra o seu efeito inibitório (Figueira et al., 2009; Chang e Werb, 2001). No caso dos gliomas, há um aumento de ambas, porém muito maior de MMP-2, pois o tumor, além de promover a síntese da enzima, é capaz de estimular as células do hospedeiro (principalmente os astrócitos reativos que circundam o tumor) a produzir ainda mais MMP-2 (Takahashi et al., 2002).

Observamos a expressão de MMP-2 na MEC e nas áreas próximas ao tecido cerebral normal. Acreditamos que as células tumorais, por estarem próximas das células normais, seriam capazes de induzir a síntese de MMP-2 nas células normais, via proteína indutora de MMPs, denominada EMMPRIN (extracelular matrix metalloproteases inducer) (Chang e Werb, 2001), que encontra-se aumentada em gliomas quando comparada com o tecido nervoso normal (Sameshima et al., 2000).

Como já foi descrito, a TNC é capaz de induzir o brotamento de células endoteliais, e dessa forma aumentar a migração e o espalhamento destas células. Esse processo pode estar relacionado com a perda da adesão focal das células endoteliais (Behrem et al., 2005). Esse fenômeno poderia estar relacionado com o aumento da síntese de TNC e de MMP-2, observado por Ruiz et al. (2004). A relação da TNC com a angiogênese poderia ser explicada de seguinte forma: a TNC promoveria a motilidade das células endoteliais e auxiliaria na degradação da MEC, inclusive da lâmina basal dos vasos sanguíneos, através da indução da síntese de MMP-2 (Leins et al., 2003). Além disso, a TNC possui sítios de ligação com capacidade adesiva/antiadesiva, modulando assim a agregação dos endoteliócitos via integrina  $\alpha_v\beta_3$  (Skuli et al., 2009). Nos GBMs, as regiões onde a MEC perivascular é rica em TNC apresentam evidências de aumento da angiogenêse local (Behrem et al., 2005). Além disso, a TNC foi encontrada em locais de neoformação vascular na embriogênese do SNC, aumentando a migração de outros tipos celulares, devido a suas características antiadesivas e por

91

estimulação de genes relacionados com as MMPs (Zagzag et al., 2002; Ruiz et al., 2004).

A expressão de VEGF, de TNC e da MMP-2 nesse estudo nos faz acreditar que estas moléculas estejam envolvidas com o crescimento e a invasão tumoral, através da síntese de enzimas, fatores de crescimento, além dos estímulos proliferativo e invasivo das células tumorais e endoteliais. Os resultados mostram que estas moléculas podem estar envolvidas com a angiogênese e com a migração das células tumorais pela lâmina basal dos próprios vasos neoformados, correlacionando as mesmas a um prognóstico desfavorável.

O grupo tratado com GLA, em relação ao grupo CSF, mostrou que houve uma diminuição de VEGF, Flt-1 e MMP-2, e isso explicaria a diminuição da densidade de microvasos encontrados após o tratamento, observada nos nossos resultados. Já se sabe que o GLA é capaz de inibir a angiogênese (Cai et al., 1999a,1999b), porém o mecanismo exato permanece obscuro. Observamos que houve, na presença de GLA, diminuição do receptor Flt-1, o qual tem sido descrito como um "protetor" da degradação de VEGF (Lamszus et al., 2003). Sendo assim, no nosso modelo, após o tratamento com GLA, o VEGF poderia estar sendo degradado mais rapidamente, e dessa forma diminuindo sua ação sobre a angiogênese tumoral. Além disso, a diminuição das proteínas VEGF e Flt-1, após o tratamento com GLA, poderia estar reduzindo a ativação de HIF-1 $\alpha$ , e dessa forma inibindo a transcrição de VEGF (Das et al., 2005). Foi observado nos presentes resultados que houve uma diminuição de MMP-2 e VEGF após o tratamento com GLA. Como já foi descrito, um dos mecanismos para tal seria através do desbalanço entre MMP-2 e VEGF, pois acredita-se que um estimula a síntese do outro (Manuat et al., 2003; Ezhilarasan et al., 2007).

O GLA foi capaz de modificar a expressão de diversas moléculas envolvidas no ciclo celular, quando comparadas com sua expressão no grupo CSF. Entre elas, houve diminuição das proteínas ERK-1 e ERK-2, que são proteínas intracelulares da família das MAPK. Essas proteínas estão envolvidas na sinalização do VEGF com o seu receptor. A diminuição das proteínas, VEGF, ERK-1 e ERK-2 sugere que o GLA module a proliferação das células tumorais e/ou endoteliais que ocorre durante a angiogenêse (Miyake et al., 2009).

Além da diminuição da vascularização do tumor, também ocorreu uma drástica alteração da morfologia dos vasos, pois o GLA é capaz de alterar a expressão de moléculas envolvidas na formação de complexos de adesão célula-célula, como por exemplo, o aumento da expressão de ocludina e VE-caderinas (Jiang et al., 1998; Cai et al.,1999b). Como visto em estudo de Jiang et al. (1998) utilizando células endoteliais humanas (ECV 304), as caderinas e as ocludinas, quando aumentadas, dificultam o processo de migração celular. Também foi observado um aumento na expressão de ocludinas em cultura de células endoteliais de cérebro após o tratamento com GLA (Yamagata et al., 2003). Devido a este fato, acredita-se que as células endoteliais estariam presas umas às outras, estando assim impedidas de migrarem e formarem um novo vaso (Jiang et al., 1998; Yamagata et al., 2003).

Por outro lado, Cai et al. (1999b) verificaram que após o tratamento com GLA havia uma diminuição na expressão de VE-caderina, quando comparado ao controle. A queda na expressão destas proteínas envolvidas na adesão célula-célula leva a uma desorganização dos vasos, com posterior morte das células endoteliais, pois as células endoteliais necessitam de contato célula-célula e quando este contato é perdido, a célula entra em processo de apoptose (Dejana E, 2004). O que sugere um dos mecanismos do GLA na diminuição da angiogênese.

Um outro fato para explicar a diminuição dos vasos no GBM tratado com GLA é que este ácido graxo é capaz de induzir apoptose também nos endoteliócitos. Acreditase que isso ocorra devido ao acúmulo de espécies reativas de O<sub>2</sub>, que levaria a liberação do citocromo c, e assim desencadearia a cascata apoptótica da célula, levando a sua morte programada (Artwohl et al., 2004).

O HIF-1 $\alpha$ , como já foi dito, está envolvido com a hipóxia local e dessa forma quando não hidroxilado pelo O<sub>2</sub>, se liga ao HIF-1 $\beta$ , que transloca para o núcleo e ativa a transcrição de genes, como o VEGF e MMP-2. O aumento do VEGF aumenta o estímulo para a proliferação e a migração do endoteliócitos, e assim, a formação de novos vasos sanguíneos. Após o tratamento com GLA, observamos que ocorreu aumento da proteina p53 e diminuição de VEGF em relação ao grupo CSF (Miyake et al., 2009). O p53, um supressor tumoral, é capaz de aumentar a degradação por ubiquitinação de HIF-1 $\alpha$ , via proteina Mdm2 (murine double minute 2) (Ravi et al.,

2000). Sendo assim, acredita-se que esse seja um dos mecanismos que o GLA utilize para diminuir a expressão de VEGF e MMP-2, quer seja pelas células tumorais e/ou pelas células endoteliais.

Outras moléculas que estão envolvidas com angiogênese também tiveram alteração na sua expressão após tratamento com o GLA, como a MMP-2 e a COX-2. A COX-2 estimula a síntese de prostanóides e estes, quando se ligam aos seus receptores específicos, podem estimular à síntese de VEGF, de MMP-2, de proteínas envolvidas na inibição da apoptose, entre outras.

Outra maneira de compreender essa redução na angiogênese é através da via dos eicosanóides, que são capazes de modular a expressão de COX-2 e MMP-2 (Dohadwala et al., 2001; Telliez et al., 2006). O acúmulo de GLA na célula levaria a uma diminuição da PGE<sub>2</sub> e esta, quando acoplada ao seu receptor, desencadeia inúmeras ações intracelulares, e por via autócrina induz a sua própria síntese. O GLA em altas concentrações na célula é elongado para ácido dihomo- $\gamma$ -linolênico (20:3), e esse quando metabolizado pelas enzimas da família das COXs produz PGE1, a qual apresenta reduzido efeito inflamatório (Das, 2006). A PGE<sub>1</sub> por ser menos agressiva e apresentar menor capacidade quimiotática e mitogênica que a PGE<sub>2</sub> (Hrelia et al., 1996). Esse poderia ser uma das maneiras que o GLA estaria influenciando a redução da vascularização do tumor pela diminuição da PGE<sub>2</sub>, apesar sos resultados aqui apresentados mostrou in vitro que a presença do GLA aumentou a sintese de PGE<sub>2</sub>. Uma explicação para esse fato, que parece contraditório, é devido o kit utilizado, que não diferencia os tres tipos de PGE. Por isso, acredita-se que o aumento observado da PGE após o tratamento com GLA nas duas diferentes concentrações, seja um aumento de PGE<sub>1</sub>, após a incorporação do GLA pelas células tumorais.

#### 5.2 Apoptose

Durante o desenvolvimento e ao longo da vida do individuo, a divisão celular é um evento de extrema importância para diversos processos biológicos, como o crescimento, a cicatrização, entre outros. A divisão da célula deve seguir uma seqüência de eventos que são sistematicamante controlados. O ciclo celular segue uma ordem de acontecimentos intracelulares, os quais se iniciam com a síntese de proteínas (fase G1) e de DNA (fase S). Após esse processo, a célula entra na fase de mitose (fase M), na qual ocorre a separação das cromátides filhas, originando duas células. Entre essas duas fases encontram-se as fases G1 e G2 (conhecidas como "gap"), importantes para o controle do ciclo celular (Van den Heuvel, 2005).

Uma famíla de enzimas bastante estudadas é a das quinases dependentes de ciclina (CDKs). A CDK é um monômero inativo que ao se ligar com as ciclinas tornamse proteínas chaves, importantes na passagem de G1 para S, e de G2 para M. As CDKs atuam como catalizadores que estimulam a célula a passar para a fase seguinte do ciclo celular. Porém, as células sintetizam proteínas que são capazes de inibir a ação das CDKs, chamadas de CDKIs (inibidor de quinase dependente de cliclina), controlando, dessa forma, o ciclo celular (Park e Lee, 2003).

O ciclo celular é um processo complexo, que pode ser resumido em: fase G1, na qual ocorre o aumento na síntese de Ciclina-D, que se associa a Cdk4 ou Cdk6. Este complexo é um sinal para a passagem do ciclo para a fase S, na qual ocorrerá a duplicação do DNA. Na fase S ocorre a ativação do complexo Ciclina-E com Cdk2, o qual fosforila a proteína retinoblastoma (pRb). O pRb fosforilado libera um fator de transcrição E2F (1 e 2), que é a chave para a sintese de DNA (Stevens e Fields, 2002) e de ciclina B.

Com o aumento de ciclina B na célula, esta molécula forma um complexo com Cdk1. O complexo ciclina B-Cdk1 é fosforilado e a célula entra na fase M, que resultará na divisão celular, originando duas células filhas. O controle do ciclo celular envolve a proteólise e a transcrição de proteínas diversas. No caso de algum problema envolvido com o ciclo celular, onde não há condições de reparo do DNA ou da célula, esta entra em um processo de morte celular programada, também conhecido como apoptose (Steinbach e Weller, 2004; Bras et al., 2005).

A checagem da replicação correta do DNA e a verificação das diversas proteínas envolvidas nesse processo ocorrem entre as fases S e M. Dentre as proteínas responsáveis por essa checagem, encontra-se a proteína p53. A p53 é responsável pela verificação do DNA. Se este apresenta alguma quebra ou erro, a célula inicia o processo de apoptose, e por isso é conhecida como uma proteína supressora tumoral.

Em diversos tipos de câncer o seu gene encontra-se mutado ou ausente (Parsons et al., 2008; Duan et al., 2009; Kumar et al., 2009).

No câncer ocorrem diversas alterações na transcrição e síntese das proteínas envolvidas na progressão, inibição e checagem do ciclo celular (Duan et al., 2009; Kumar et al., 2009; Parsons et al., 2008). Com inúmeras alterações genéticas, a célula tumoral consegue "escapar" dos mecanismos de checagem e apoptose. Isso faz com que a célula tumoral seja capaz de continuar o ciclo celular e originar células com inúmeras alterações genéticas.

Como foi observado nos resultados, o tumor apresenta grande quantidade de células tumorais e MEC, quando observado pela microscopia de luz e eletrônica (Figura 2 e 3). Após o tratamento com GLA, as micrografias mostraram um aumento significativo no número de células em processo de apoptose. Este dado foi complementado pelos ensaios de TUNEL *in vitro*, e *in vivo* com a imunohistoquímica de BrdU, no qual observou uma redução no número de células tumorais na fase S após o tratamento com GLA.

O GLA foi capaz de aumentar o número de células tumorais em processo de apoptose (Bell et al., 1999). Este fato se confirma pela morfologia das células observadas ao MET, ou seja, núcleo celular picnótico com cromatina condensada, célula diminuta e presença de "blebbing" na membrana plasmática (Adbel Wahal et al., 2009). Como pôde ser observado nas imagens, havia uma grande quantidade de macrófagos (Zubkov et al., 2000), que são recrutados para remover os restos celulares. Os mecanismos de ação do GLA sobre a apoptose ainda não estão elucidados, porém acredita-se que esteja envolvido com diversas vias de sinalização, reparação de DNA, alterações na composição das membranas lipidicas, formação de ROS, entre outras (Leaver et al., 2002; Ramos e Colquhoun, 2003; Colquhoun et al., 2009; Benadiba et al., 2009; Miyake et al., 2009).

Quando a célula incorpora altas concentrações de GLA, esse ácido graxo é utilizado para a formação de membranas, em um primeiro estágio. A mitocôndria também sofre modificação na sua composição estrutural. Sabe-se que a mitocôndria é importante para diversos mecanismos celulares, como a formação de ATP, metabolismo de lipídes e também está intimamente relacionada com o processo de

96

apoptose. A mitocôndria é uma organela formada por duas membranas fosfolipídicas, uma externa lisa e outra interna que se dobra formando estrururas, chamadas cristas (Bras et al., 2005). Dentre as inúmeras proteínas presentes na mitocôndria, gostaria de chamar a atenção para as proteínas da família Bcl-2 (como Bax e Bak) e citocromo c.

Na presença de GLA, ocorre uma alteração no potencial da membrana mitocondrial, e isso leva a uma alteração na permeabilidade desta membrana. O extravasamento de proteínas da família Bcl-2 e citocromo c para o citosol ativa a via das caspases que culmina na morte da célula (Colquhoun e Schumacher, 2001; Benadiba et al., 2009). As proteínas da família Bcl-2 são divididas em pró-apoptoticas e anti-apoptoticas. Bcl-2-associada a proteina X (Bax) e Bcl-2 antagonist/killer-1 (Bak) são proteínas pró-apoptoticas presentes na membrana externa da mitocondria. Quando a célula sofre algum estresse ou injúria ou alguma modificação na estrutura da mitocôndria, como por exemplo, alteração no seu potencial de membrana, ocorre a ativação de Bax e Bak, e isso gera abertura de poros na membrana mitocondrial externa através da homo-oligomerização dessas proteínas. Em seguida ocorre a liberação de proteínas mitocondriais envolvidas com a ativação da via das caspases, como o citocromo c e Smac (segundo ativador de caspases derivado de mitocondria) para o citoplásma da célula, desencadeia o processo de morte da célula (Brunelle e Letai, 2009) (Esquema 9).



Esquema 8 - Mecanismo de ativação da apoptose pelas proteínas da família da Bcl-2. O quadro amarelo mostra os estímulos apoptóticos; o quadro verde, mostra os ativadores de Bax e Bak; o quadro azul mostra os estimuladores de Bax e Bak. A ligação dos ativadores a Bax e Bak causa a oligomerização das proteínas, formando um poro no qual ocorre a liberação do o citocromo c. Adaptado de brunelle e Letai, 2009.

Outro mecanismo em que o GLA está envolvido com a apoptose é através da formação de ROS (espécies reativas de oxigênio), sendo os mais comuns o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), o íon superoxido (O2<sup>-</sup>), e o radical hidroxila (OH<sup>-</sup>) (Seifried et al., 2007). A principal fonte de superóxido em uma célula é proveniente da cadeia respiratória da mitocôndria (Susnow et al., 2009). A célula tumoral produz poucas quantidades de ATP através da respiração celular. Sua principal via energética é proveniente da glicólise aeróbica (Grandemange et al., 2009). A enzima responsável pela metabolização da glicose para glicose-6-fosfato é a hexoquinase, que nas células tumorais encontra-se na membrana externa da mitocôndria, associada com a VDAC (canal aniônico voltagem dependente) (Ramos e Colquhoun, 2003). Na presença de GLA, devido à alteração na composição lipidica das membranas plasmáticas, ocorre uma alteração de diversas vias energéticas para a obtenção de ATP, já que as

membranas e as proteínas associadas a essa não se encontram mais nos seus sítios corretos. Além disso, após a incorporação de grandes quantidades de GLA na célula, ocorrem modificações nos complexos I, III e IV (diminuição de NADH, citocromo c oxiredutase e citocromo c oxidase) da cadeia respiratória da mitocôndria e aumento na liberação de ROS (Colquhoun e Schumacher, 2001; Schönfeld e Wojtczak, 2008).

Em células de gliomas tratados com GLA é fato que ocorre aumento da produção de ROS e uma das vias é através da peroxidação lipídica nos peroxissomos (Colquhoun e Schumacher, 2001). Como observado por Leaver et al. (1999), as células de glioma produzem quantidades pequenas de enzimas anti-oxidativas, e o aumento de ROS no interior da célula leva a uma reação em cadeia que oxida o GLA e isso gera mais ROS. O ROS é capaz de oxidar os aminoácidos das proteínas e causar quebra de DNA, principalmente quando encontrado em altas taxas na célula (Zhang et al., 2009), levando à morte celular.

Outro fato importante é que o aumento de p53 parece estar relacionado com o aumento de ROS, como observado por Johnson et al. (1996). Miyake et al. (2009) observaram que, na presença de GLA, o GBM de rato expressava maior quantidade de p53, quando comparado ao grupo controle. Sabemos que em diversos tumores esse supressor tumoral encontra-se em baixos níveis. A presença do GLA pode levar ao aumento de p53, e uma das hipóteses para que isso ocorra seria via ROS. Sendo assim, o aumento de ROS e de p53, após o tratamento com GLA, poderia ser um dos mecanismos para explicar a apoptose das células e diminuição do tumor e dos vasos tumorais (Johnson et al., 1996; Lebedeva et al., 2009; Miyake et al., 2009). O GLA foi capaz de induzir a apoptose nas células tumorais, porém os mecanismos ainda não foram esclarecidos e devem ser estudados.

#### 5.3 Migração/invasão

Uma das principais dificuldades de cura do GBM é a alta reincidência dos tumores após a cirurgia, pois as células tumorais possuem alta capacidade invasiva. Como já foi descrito, as células invasivas migram principalmente pelas estruturas mielinizadas do cérebro e pela lâmina basal dos vasos sanguíneos. Como discutido

acima, a redução da angiogênese levaria a uma redução de substrato (membrana basal) para a migração das células tumorais. Além disso, através da observação das células sobre o tecido cerebral fresco (*ex vivo*), foi verificado que, após o tratamento com o GLA, houve redução da distância de migração das células.

Uma das explicações para essa redução é a diminuição da expressão de MMP-2. Como sabemos, a MMP-2 é importante para degradação da MEC e dessa forma possibilita que as células possam invadir o tecido normal. A utilização de inibidores de MMPs através da infusão de TIMP-1 e TIMP-2 em gliomas de rato *in vivo* (via bombas osmóticas no cérebro), mostrou uma redução no tamanho do tumor, com destruição e degeneração de vasos (Takahashi et al., 2002). Além disso, a inibição da MMP-2 é capaz de diminuir o volume do tumor cerebral e a invasão das células tumorais (Lampert et al., 1998). Figueira et al. (2009) observaram que, em tumores de mama de características metastáticas e invasivas, havia uma maior expressão de MMP-2, o que evidencia que a expressão desta enzima de degradação da MEC está relacionada com a capacidade invasiva das células tumorais. Desta forma, o GLA estaria diminuindo a migração das células tumorais por diminuir a expressão de MMP-2, observado no presente estudo pela expressão protéica e pela zimografia.

Uma possível explicação para a diminuição da MMP-2 é através da ação das enzimas COX-2 e PGE<sub>2</sub>, como descrito anteriormente. A PGE<sub>2</sub> está relacionada com a expressão de MMP-2 na endometriose, via COX-2, levando ao aumento da invasão das células endometrióticas. Isso foi observado utilizando inibidores de COX-2 (RNAi) e os dados mostraram diminuição da síntese de PGE<sub>2</sub> e MMP-2 (Banu et al., 2008). A inibição da COX-2 e a diminuição da PGE<sub>2</sub> em tumores de próstata e mama mostraram reduzida invasão e migração das células, e uma das causas atribuídas foi a redução da síntese de MMP-2 (Attiga et al., 2000; Larkins et al., 2006).

Por isso a diminuição da COX-2, no nosso modelo de estudo, pode estar envolvida, de uma forma indireta, com a redução da capacidade migratória das células após a utilização do GLA.

A reincidência do tumor após a cirurgia é freqüente e as células que migram no parênquima normal que são responsáveis pela formação do tumor após a ressecção cirúrgica. A possibilidade de minimizar a distância que as células tumorais migram pelo tecido nervoso normal faz com que o GLA seja um interessante tratamento, uma vez que foi observada diminuição da capacidade invasiva das células tumorais.

## CONCLUSÃO

### 6 CONCLUSÃO

De acordo com as diversas análises feitas neste trabalho foi concluído que:

O modelo C6 de glioma de rato apresentou características morfológicas do glioblastoma multiforme como: alta capacidade proliferativa das células tumorais, e a invasão destas pelo tecido normal, grandes áreas de necrose e alta capacidade angiogênica.

Após o tratamento com o GLA, observou-se uma menor quantidade de células tumorais com redução do tamanho do tumor, e modificação na morfologia dos vasos tumorais, incluindo a redução da densidade de microvasos.

Nesse modelo de GBM de rato observamos a imunomarcação do VEGF e seus receptores (Flt-1 e Flk-1) nos endoteliócitos e nas células tumorais. Dessa forma acredita-se que as próprias células tumorais possam se beneficiar com a presença do VEGF, que se encontra em altos níveis no tecido tumoral.

As enzimas MMP-2 e a COX-2, e a glicoproteína TNC também são expressas no modelo estudado.

O tratamento com o GLA, não modificou a imunomarcação do receptor Flk-1 e da glicoproteína TNC.

O GLA foi capaz de modular a expressão de algumas dessas proteínas como o VEGF, o Flt-1 e a MMP-2, e dessa forma, acredita-se ser um dos mecanismos que levaram a diminuição do tumor e da angiogênese quando comparado ao grupo controle.

O GLA foi incorporado pelas células constituintes do tumor estudado, levando também ao aumento do ácido docosapentaenóico (22:5 n-6).

O GLA causou apoptose das células tumorais nos modelos in vivo e ex vivo.

O GLA diminuiu a proliferação das células tumorais e a distância de migração das células no modelo *ex vivo*. Porém, não alterou o número de células migratórias, após o tratamento com o GLA.

O GLA foi capaz de modular a expressão da PGE<sub>2</sub> nas análises in vitro.

# **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**<sup>\*</sup>

Abdel Wahab SI, Abdul AB, Alzubairi AS, Mohamed Elhassan M, Mohan S. J In vitro ultramorphological assessment of apoptosis induced by zerumbone on (HeLa). Biomed Biotechnol. 2009;2009:769568.

Alvarez-Dolado M, González-Sancho JM, Navarro-Yubero C, García-Fernández LF, Muñoz A. Retinoic acid and 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibit tenascin-C expression in rat glioma C6 cells. J Neurosci Res. 1999 Oct 15;58(2):293-300.

Artwohl M, Roden M, Waldhäusl W, Freudenthaler A, Baumgartner-Parzer SM. Free fatty acids trigger apoptosis and inhibit cell cycle progression in human vascular endothelial cells. FASEB J. 2004 Jan;18(1):146-8.

Attiga FA, Fernandez PM, Weeraratna AT, Manyak MJ, Patierno SR. Inhibitors of prostaglandin synthesis inhibit human prostate tumor cell invasiveness and reduce the release of matrix metalloproteinases. Cancer Res. 2000 Aug 15;60(16):4629-37.

Bae DG, Kim TD, Li G, Yoon WH, Chae CB. Anti-flt1 peptide, a vascular endothelial growth factor receptor 1-specific hexapeptide, inhibits tumor growth and metastasis. Clin Cancer Res. 2005 Apr 1;11(7):2651-61.

Bakshi A, Mukherjee D, Bakshi A, Banerji AK, Das UN. γ-linolenic acid therapy of human gliomas. Appli Nutrit Invest. 2003 19:305-309.

Banu SK, Lee J, Speights VO Jr, Starzinski-Powitz A, Arosh JA. Cyclooxygenase-2 regulates survival, migration, and invasion of human endometriotic cells through multiple mechanisms. Endocrinology. 2008 Mar;149(3):1180-9.

Behrem S, Zarković K, Eskinja N, Jonjić N. Distribution pattern of tenascin-C in glioblastoma: correlation with angiogenesis and tumor cell proliferation. Pathol Oncol Res. 2005;11(4):229-35.

Belien AT, Paganetti PA, Schwab ME. Membrane-type 1 matrix metalloprotease (MT1-MMP) enables invasive migration of glioma cells in central nervous system white matter. J Cell Biol. 1999 Jan 25;144(2):373-84.

Bell HS, Wharton SB, Leaver HA, Whittle IR. Effects of N-6 essential fatty acids on glioma invasion and growth: experimental studies with glioma spheroids in collagen gels. J Neurosurg. 1999 Dec;91(6):989-96.

\* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Bomedical Journal: sample references. Available from: http://www.icmje.org [2007 May 22].

Bellail AC, Hunter SB, Brat DJ, Tan C, Van Meir EG. Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion. Int J Biochem Cell Biol. 2004 Jun;36(6):1046-69.

Benadiba M. Análise da expressão de proteínas envolvidas no controle do ciclo celular, apoptose, angiogênese, invasão e migração de células C6 *in vitro* e *in vivo*, após o tratamento com o ácido gama-linolênico (GLA) e com um novo complexo dirutênico contendo Ibuprofeno (Ru-Ibp) [Tese]. São Paulo: Instututo de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

Benadiba M, Miyake JA, Colquhoun A. Gamma-linolenic acid alters Ku80, E2F1, and bax expression and induces micronucleus formation in C6 glioma cells in vitro. IUBMB Life. 2009 Mar;61(3):244-51.

Benouaich-Amiel A, Simon JM, Delattre JY. Concomitant radiotherapy with chemotherapy in patients with glioblastoma. Bull Cancer. 2005 Dec 1;92(12):1065-72.

Binder DK, Berger MS. Proteases and the biology of glioma invasion. J Neurooncol. 2002 Jan;56(2):149-58.

Björklund M, Koivunen E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. Biochim Biophys Acta. 2005 May 25;1755(1):37-69.

Bökel C, Brown NH. Integrins in development: moving on, responding to, and sticking to the extracellular matrix. Develop Cell. 2002 Sep.(3):311-321.

Boocock CA, Charnock-Jones DS, Sharkey AM, McLaren J, Barker PJ, Wright KA, Twentyman PR, Smith SK. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors flt and KDR in ovarian carcinoma. J Natl Cancer Inst. 1995 87: 506-16.

Bras M, Queenan B, Susin SA. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. Biochemistry (Mosc). 2005 Feb;70(2):231-9.

Brat DJ, Castellano-Sanchez AA, Hunter SB, Pecot M, Cohen C, Hammond EH, Devi SN, Kaur B, Van Meir EG. Pseudopalisades in glioblastoma are hypoxic, express extracellular matrix proteases, and are formed by an actively migrating cell population. Cancer Res. 2004 Feb 1;64(3):920-7.

Brunelle JK, Letai A. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. J Cell Sci. 2009 Feb 15;122(Pt 4):437-41.

Bouzier-Sore AK, Merle M, Magistretti PJ, Pellerin L. Feeding active neurons: (re)emergence of a nursing role for astrocytes. J Physiol Paris. 2002 Apr-Jun;96(3-4):273-82.
Buchanan FG, Wang D, Bargiacchi F, DuBois RN. Prostaglandin E2 regulates cell migration via the intracellular activation of the epidermal growth factor receptor. J Biol Chem. 2003 Sep 2;278(37):35451-7.

Cai J, Jiang WG, Mansel RE. Inhibition of angiogenic factor- and tumour-induced angiogenesis by gamma linolenic acid. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 1999a Jan;60(1):21-9.

Cai J, Jiang WG, Mansel RE. Inhibition of the expression of VE-cadherin/catenin complex by gamma linolenic acid in human vascular endothelial cells, and its impact on angiogenesis. Biochem Biophys Res Commun. 1999b Apr 29;258(1):113-8.

Cao Y, Prescott SM. Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer. J Cell Physiol. 2002 190: 279-86.

Carragher NO, Frame MC. Focal adhesion and actin dynamics: a place where kinases and proteases meet to promote invasion. Trends Cell Biol. 2004 May;14(5):241-9.

Clark RA, An JQ, Greiling D, Khan A, Schwarzbauer JE. Fibroblast migration on fibronectin requires three distinct functional domains. J Invest Dermatol. 2003 Oct;121(4):695-705.

Colquhoun A, Schumacher RI. gamma-Linolenic acid and eicosapentaenoic acid induce modifications in mitochondrial metabolism, reactive oxygen species generation, lipid peroxidation and apoptosis in Walker 256 rat carcinosarcoma cells. Biochim Biophys Acta. 2001 Oct 31;1533(3):207-19.

Colquhoun A. Gamma-linolenic acid alters the composition of mitochondrial membrane subfractions, decreases outer mitochondrial membrane binding of hexokinase and alters carnitine palmitoyltransferase I properties in the Walker. Biochim Biophys Acta. 2002 Jun 13;1583(1):74-84.

Colquhoun A, Miyake JA, Benadiba M. Invited Review: Fatty acids, eicosanoids and cancer. Nutrit Ther Metabol. 2009.

Cowan KN, Jones PL, Rabinovitch M. Elastase and matrix metalloproteinase inhibitors induce regression, and tenascin-C antisense prevents progression, of vascular disease. J Clin Invest. 2000 Jan;105(1):21-34.

Culav EM, Clark CH, Merrilees MJ. Connective tissues: matrix composition and its relevance to physical therapy. Phys Ther. 1999 Mar;79(3):308-19.

Chang C, Werb Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. Trends Cell Biol. 2001 Nov;11(11):S37-43.

Chen YC, Shen SC, Tsai SH. Prostaglandin D(2) and J(2) induce apoptosis in human leukemia cells via activation of the caspase 3 cascade and production of reactive oxygen species. Biochim Biophys Acta. 2005 Apr 15;1743(3):291-304.

Chintala SK, Tonn JC, Rao JS. Matrix metalloproteinases and their biological function in human gliomas. Int J Devl Neuros. 1999 17(5-6):495-502.

Das B, Yeger H, Tsuchida R, Torkin R, Gee MF, Thorner PS, Shibuya M, Malkin D, Baruchel S. A hypoxia-driven vascular endothelial growth factor/Flt1 autocrine loop interacts with hypoxia-inducible factor-1alpha through mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway in neuroblastoma. Cancer Res. 2005 Aug 15;65(16):7267-75.

Das UN. Essential Fatty acids - a review. Curr Pharm Biotechnol. 2006 Dec;7(6):467-82.

Das UN. From bench to the clinic: γ-linolenic acid therapy of human glioma. Prost Leukot Essenc Fatty Acids. 2004 (70) 539-52.

Das UN, Prasad VVSK, Rddy DR. Local application of  $\gamma$ -linolenic acid in the treatment of human gliomas. Cancer Let. 1995 94:147-55.

de Groot J, Milano V. Improving the prognosis for patients with glioblastoma: the rationale for targeting Src. J Neurooncol. 2009 May 13.

Dejana E. Endothelial cell-cell junctions: happy together. Nat Rev Mol Cell Biol. 2004 Apr;5(4):261-70.

Del Duca D, Werbowetski T, Del Maestro RF. Spheroid preparation from hanging drops: characterization of a model of brain tumor invasion. J Neurooncol. 2004 May;67(3):295-303.

Demuth T, Berens ME. Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion. J Neurooncol. 2004 Nov;70(2):217-28.

Deryugina EI, Bourdon MA, Reisfeld RA, Strongin A. Remodeling of collagen matrix by human tumor cells requires activation and cell surface association of matrix metalloproteinase-2. Cancer Res. 1998 Aug 15;58(16):3743-50.

Dohadwala M, Luo J, Zhu L, Lin Y, Dougherty GJ, Sharma S, Huang M, Pold M, Batra RK, Dubinett SM. Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent invasion is mediated by CD44. J Biol Chem. 2001 Jun 15;276(24):20809-12.

Doolittle ND, Abrey LE, Bleyer WA, Brem S, Davis TP, Dore-Duffy P, Drewes LR, Hall WA, Hoffman JM, Korfel A, Martuza R, Muldoon LL, Peereboom D, Peterson DR, Rabkin SD, Smith Q, Stevens GH, Neuwelt EA. New frontiers in translational research in neuro-oncology and the blood-brain barrier: report of the tenth annual Blood-Brain Barrier Disruption Consortium Meeting. Clin Cancer Res. 2005 Jan 15;11(2 Pt 1):421-8.

Duan W, Gao L, Wu X, Hade EM, Gao JX, Ding H, Barsky SH, Otterson GA, Villalona-Calero MA. Expression of a mutant p53 results in an age-related demographic shift in spontaneous lung tumor formation in transgenic mice. PLoS ONE. 2009;4(5):e5563.

Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. Nat Rev Cancer. 2002 Mar;2(3):161-74.

Elstrom RL, Bauer DE, Buzzai M, Karnauskas R, Harris MH, Plas DR, Zhuang H, Cinalli RM, Alavi A, Rudin CM, Thompson CB. Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. Cancer Res. 2004 Jun 1;64(11):3892-9.

Ezhilarasan R, Mohanam I, Govindarajan K, Mohanam S. Glioma cells suppress hypoxia-induced endothelial cell apoptosis and promote the angiogenic process. Int J Oncol. 2007 Mar;30(3):701-7.

Fan YY, Chapkin RS. Importance of dietary gamma-linolenic acid in human health and nutrition. J Nutr. 1998 Sep;128(9):1411-4.

Farin A, Suzuki SO, Weiker M, Goldman JE, Bruce JN, Canoll P. Transplanted glioma cells migrate and proliferate on host brain vasculature: a dynamic analysis. Glia. 2006 Jun;53(8):799-808.

Feng D, Nagy JA, Brekken RA, Pettersson A, Manseau EJ, Pyne K, Mulligan R, Thorpe PE, Dvorak HF, Dvorak AM. Ultrastructural localization of the vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) receptor-2 (FLK-1, KDR) in normal mouse kidney and in the hyperpermeable vessels induced by VPF/VEGF-expressing tumors and adenoviral vectors. J Histochem Cytochem. 2000 Apr;48(4):545-56.

Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. Endocr Rev. 2004 Aug;25(4):581-611.

Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. Nat Med. 2003 Jun;9(6):669-76.

Ferrara, N, Davis-Smyth, T. The biology of vascular endothelial growth factor. Endocr Rev. 1997;18: 4-25.

Figueira RC, Gomes LR, Neto JS, Silva FC, Silva ID, Sogayar MC. Correlation between MMPs and their inhibitors in breast cancer tumor tissue specimens and in cell lines with different metastatic potential. BMC Cancer. 2009 Jan 14;9:20.

Fillmore HL, VanMeter TE, Broaddus WC. Membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs): expression and function during glioma invasion. J Neurooncol. 2001 Jun;53(2):187-202.

Fischer C, Mazzone M, Jonckx B, Carmeliet P.FLT1 and its ligands VEGFB and PIGF: drug targets for anti-angiogenic therapy? Nat Rev Cancer. 2008 Dec;8(12):942-56.

Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J Biol Chem. 1957 May;226(1):497-509.

Franco-Hernández C,Martínez-Glez V, Rey JA. Biología molecular de los glioblastomas. Neurocirugía. 2007;18:373-82.

Fürstenberger G, Krieg P, Müller-Decker K, Habenicht AJ. What are cyclooxygenases and lipoxygenases doing in the driver's seat of carcinogenesis? Int J Cancer. 2006 Nov 15;119(10):2247-54.

Goldbrunner RH, Bernstein JJ, Tonn JC. ECM-mediated glioma cell invasion. Microsc Res Tech. 1998 Nov 1;43(3):250-7.

Goldbrunner RH, Bernstein JJ, Tonn JC. Cell-extracellular matrix interaction in glioma invasion. Acta Neurochir (Wien). 1999;141(3):295-305; discussion 304-5.

Graeven U, Fiedler W, Karpinski S, Ergun S, Kilic N, Rodeck U, Schmiegel W, Hossfeld DK. Melanoma-associated expression of vascular endothelial growth factor and its receptors FLT-1 and KDR. J Cancer Res Clin Oncol. 1999 125: 621-9.

Grandemange S, Herzig S, Martinou JC. Mitochondrial dynamics and cancer. Semin Cancer Biol. 2009 Feb;19(1):50-6.

Grewal S, Herbert SP, Ponnambalam S, Walker JH. Cytosolic phospholipase A2-alpha and cyclooxygenase-2 localize to intracellular membranes of EA.hy.926 endothelial cells that are distinct from the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. FEBS J. 2005 5:1278-90.

Grumet M, Milev P, Sakurai T, Karthikeyan L, Bourdon M, Margolis RK, Margolis RU. Interactions with tenascin and differential effects on cell adhesion of neurocan and phosphacan, two major chondroitin sulfate proteoglycans of nervous tissue. J Biol Chem. 1994 Apr 22;269(16):12142-6.

Guo P, Hu B, Gu W, Xu L, Wang D, Huang HJ, Cavenee WK, Cheng SY. Plateletderived growth factor-B enhances glioma angiogenesis by stimulating vascular endothelial growth factor expression in tumor endothelia and by promoting pericyte recruitment. Am J Pathol. 2003 Apr;162(4):1083-93.

Hagihara K, Miura R, Kosaki R, Berglund E, Ransht B, Yamaguchi Y. Imunohistochemical evidence for the brevican-tenascin-R interaction: colonization in perineuronal nets suggests a physiological role for the interaction in the adult rat brain. J Comp Neurol. 1999 410:256-264.

Hamilton JA, Brunaldi K. A model for fatty acid transport into the brain. J Mol Neurosci. 2007 Sep;33(1):12-7.

Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. Nat Rev Cancer. 2002 Jan;2(1):38-47.

Hatton GI. Dynamic neuronal-glial interactions: an overview 20 years later. Peptides. 2004 Mar;25(3):403-11.

Hawkes SP, Li H, Taniguchi GT. Zymography and reverse zymography for detecting MMPs, and TIMPs. Methods Mol Biol. 2001;151:399-410.

Hawkins BT, Davis TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. Pharmacol Rev. 2005 Jun;57(2):173-85.

He H, Venema VJ, Gu X, Venema RC, Marrero MB, Caldwell RB. Vascular endothelial growth factor signals endothelial cell production of nitric oxide and prostacyclin through flk-1/KDR activation of c-Src. J Biol Chem. 1999 Aug 27;274(35):25130-5.

Hinz B, Brune K. Cyclooxygenase-2--10 years later. J Pharmacol Exp Ther. 2002 Feb;300(2):367-75.

Hoffmann C. COX-2 in brain and spinal cord implications for therapeutic use. Curr Med Chem. 2000 11:1113-20.

Hrelia S, Bordoni A, Biagi PL, Rossi CA, Bernardi L, Horrobin DF, Pession A. γ-linolenic acid supplementation can affect cancer cell proliferation via modification of fatty acid composition. Bioch Bioph Res Commun. 1996 225:441-47.

lazzo RV, San Antonio JD. Heparan sulfate proteoglycans: heavy hitters in the angiogenesis arena. J Clin Invest. 2001 108: 349-55.

Jackson MW, Roberts JS, Heckford SE, Ricciardelli C, Stahl J, Choong C, Horsfall DJ, Tilley WD. A potential autocrine role for vascular endothelial growth factor in prostate cancer. Cancer Res. 2002 62: 854-9.

Jansen M, de Witt Hamer PC, Witmer AN, Troost D, van Noorden CJ. Current perspectives on antiangiogenesis strategies in the treatment of malignant gliomas. Brain Res Rev. 2004 Jul;45(3):143-63.

Jiang WG, Bryce RP, Horrobin DF, Mansel RE. Regulation of tight junction permeability and occludin expression by polyunsaturated fatty acids. Biochem Biophys Res Commun. 1998 Mar 17;244(2):414-20.

Jiang WG, Watkins G, Douglas-Jones A, Mansel RE. Reduction of isoforms of 15lipoxygenase (15-LOX)-1 and 15-LOX-2 in human breast cancer. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2006 Apr;74(4):235-45. Jin E, Ghazizadeh M, Fujiwara M, Nagashima M, Shimizu H, Ohaki Y, Arai S,Gomibuchi M, Takemura T, Kawanami O. Angiogenesis and phenotypic alteration of alveolar capillary endothelium in areas of neoplastic cell spread in primary lung adenocarcinoma. Pathol Int. 2001 Sep;51(9):691-700.

Johnson TM, Yu ZX, Ferrans VJ, Lowenstein RA, Finkel T. Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Oct 15;93(21):11848-52.

Joki T, Heese O, Nikas DC, Bello L, Zhang J, Kraeft SK, Seyfried NT, Abe T, Chen LB, Carroll RS, Black PM. Expression of cyclooxygenase 2 (COX-2) in human glioma and in vitro inhibition by a specific COX-2 inhibitor, NS-398. Cancer Res. 2000 Sep 1;60(17):4926-31.

Jones FS, Jones PL. The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. Dev Dyn. 2000 Jun;218(2):235-59.

Kalluri R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. Nat Rev Cancer. 2003 Jun;3(6):422-33.

Kendall RL, Wang G, Thomas KA. Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR. Biochem Biophys Res Commun. 1996 226: 324-8.

Kerber M, Reiss Y, Wickersheim A, Jugold M, Kiessling F, Heil M, Tchaikovski V, Waltenberger J, Shibuya M, Plate KH, Machein MR. Flt-1 signaling in macrophages promotes glioma growth in vivo. Cancer Res. 2008 Sep 15;68(18):7342-51.

Ketteman H, Ranson BR. Neuroglia. Oxford: Oxford University Press; ANO. cap 69; p. 1044-58.

Kim CH, Bak KH, Kim YSK, Kim JM, Ko YK, Oh SJ, Kim KM, Hong EK. Expression of tenascin-C in astrocytic tumors: its relevance to proliferation and angiogenesis. Surg Neurol. 2000 54:235-240.

Kitson G, Larsen BS, McEwen CN. Gas Chromatoghaphy and mass spectrometry: a pratical guide. New York: Academic Press; 1996. p. 337.

Kleihues P, Soylemezoglu F, Schauble B, Scheithauer BW, Burger PC. Histopathology, classification, and grading of gliomas. Glia. 1995 Nov;15(3):211-21.

Komatsu K, Nakanishi Y, Nemoto N, Hori T, Sawada T, Kobayashi M. Expression and quantitative analysis of matrix metalloproteinase-2 and -9 in human gliomas. Brain Tumor Pathol. 2004;21(3):105-12.

Korkolopoulou P, Patsouris E, Konstantinidou AE, Pavlopoulos PM, Kavantzas N, Boviatsis E, Thymara I, Perdiki M, Thomas-Tsagli E, Angelidakis D, Rologis D, Sakkas D. Hypoxia-inducible factor 1alpha/vascular endothelial growth factor axis in astrocytomas. Associations with microvessel morphometry, proliferation and prognosis. Neuropathol Appl Neurobiol. 2004 Jun;30(3):267-78.

Kumar S, Mohan A, Guleria R. Prognostic implications of circulating anti-p53 antibodies in lung cancer—a review. Eur J Cancer Care (Engl). 2009 May;18(3):248-54.

Lampert K, Machein U, Machein MR, Conca W, Peter HH, Volk B. Expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in human brain tumors. Am J Pathol. 1998 Aug;153(2):429-37.

Lamszus K, Ulbricht U, Matschke J, Brockmann MA, Fillbrandt R, Westphal M. Levels of soluble vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor 1 in astrocytic tumors and its relation to malignancy, vascularity, and VEGF-A. Clin Cancer Res. 2003 Apr;9(4):1399-405.

Lange K, Kammerer M, Saupe F, Hegi ME, Grotegut S, Fluri E, Orend G. Combined lysophosphatidic acid/platelet-derived growth factor signaling triggers glioma cell migration in a tenascin-C microenvironment. Cancer Res. 2008 Sep 1;68(17):6942-52.

Larkins TL, Nowell M, Singh S, Sanford GL. Inhibition of cyclooxygenase-2 decreases breast cancer cell motility, invasion and matrix metalloproteinase expression. BMC Cancer. 2006 Jul 10;6:181.

Leaver HA, Williams JR, Ironside JW, Miller EP, Gregor A, Su BH, Prescott RJ, Whittle IR. Dynamics of reactive oxygen intermediate production in human glioma: n-6 essential fatty acid effects. Eur J Clin Invest. 1999 Mar;29(3):220-31.

Leaver HA, Bell HS, Rizzo MT, Ironside JW, Gregor A, Wharton SB, Whittle IR. Antitumor and pro-apoptotic actions of highly unsaturated fatty acids in glioma. Prost Leuko Essen Fatty Acids. 2002a Jan 66(1):19-29.

Leaver HA, Wharton SB, Bell HS, Leaver-Yap IM, Whittle IR. Highly unsaturated fatty acid induced tumour regression in glioma pharmacodynamics and bioavailability of gamma linolenic acid in an implantation glioma model: effects on tumour biomass, apoptosis and neuronal tissue histology. Prost Leukot Essent Fatty Acids. (2002b) Nov;67(5):283-92.

Lebedeva MA, Eaton JS, Shadel GS. Loss of p53 causes mitochondrial DNA depletion and altered mitochondrial reactive oxygen species homeostasis. Biochim Biophys Acta. 2009 May;1787(5):328-34.

Lafleur MA, Handsley MM, Edwards DR. Metalloproteinases and their inhibitors in angiogenesis. Expert Rev Mol Med. 2003 Sep 22;5(23):1-39.

Leins A, Riva P, Lindstedt R, Davidoff MS, Mehraein P, Weis S. Expression of tenascin-C in various human brain tumors and its relevance for survival in patients with astrocytoma. Cancer. 2003 Dec 1;98(11):2430-9.

Linder S. The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation. Trends Cell Biol. 2007 Mar;17(3):107-17.

Löffler I, Grün M, Böhmer FD, Rubio I. Role of cAMP in the promotion of colorectal cancer cell growth by prostaglandin E2. BMC Cancer. 2008 Dec 19;8:380.

Louis DN, Holland EC, Cairncross JG. Glioma classification. Am J Pathol. 2001 Sep.159(3):779-786.

Louis DN, Pomeroy SL, Cairncross JG. Focus on central nervous system neoplasia. Cancer Cell. 2002 Mar.(1):125-128.

Lu C, Shervington A. Chemoresistance in gliomas. Mol Cell Biochem. 2008 May;312(1-2):71-80.

Lynn BD, Li X, Cattini PA, Turley EA, Nagy JI. Identification of sequence, protein isoforms, and distribution of the hyaluronan-binding protein RHAMM in adult and developing rat brain. J Comp Neurol. 2001 Oct 22;439(3):315-30.

Mahesparan R, Read TA, Lund-Johansen M, Skaftnesmo KO, Bjerkvig R, Engebraaten O. Expression of extracellular matrix components in a highly infiltrative in vivo glioma model. Acta Neuropathol. 2003 Jan;105(1):49-57.

Mehta LR, Dworkin RH, Schwid SR. Polyunsaturated fatty acids and their potential therapeutic role in multiple sclerosis. Nat Clin Pract Neurol. 2009 Feb;5(2):82-92.

Munaut C, Noël A, Hougrand O, Foidart JM, Boniver J, Deprez M. Vascular endothelial growth factor expression correlates with matrix metalloproteinases MT1-MMP, MMP-2 and MMP-9 in human glioblastomas. Int J Cancer. 2003 Oct 10;106(6):848-55.

Marks F, Müller-Decker K, Fürstenberger G. A causal relationship between unscheduled eicosanoid signaling and tumor development: cancer chemoprevention by inhibitors of arachidonic acid metabolism. Toxicology. 2000 Nov 16;153(1-3):11-26.

Masoodi M, Nicolaou A. Lipidomic analysis of twenty-seven prostanoids and isoprostanes by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. 2006 20(20):3023-9.

Matsuo M, Yonemitsu N, Zaitsu M, Ishii K, Hamasaki Y, Fukuyama K, Tabuchi K, Miyazaki S. Expression of prostaglandin H synthase-2 in human brain tumors. Acta Neuropathol. 2001;102:181-87.

McArthur MJ, Atshaves BP, Frolov A, Foxworth WD, Kier AB, Schroeder F. J Cellular uptake and intracellular trafficking of long chain fatty acids. Lipid Res. 1999 Aug;40(8):1371-83.

Mend CH, Mueller MM, Bonsanto MM, Schmitt HP, Kunze S, Steiner HH. Clinical impact and functional aspects of tenascin-C expression during glioma progression. Int J Cancer. 2002 98:362-69.

Mentlein R, Forstreuter F, Mehdorn HM, Held-Feindt J. Functional significance of vascular endothelial growth factor receptor expression on human glioma cells. J Neurooncol. 2004 Mar-Apr;67(1-2):9-18.

Miyake JA, Benadiba M, Colquhoun A. Gamma-linolenic acid inhibits both tumour cell cycle progression and angiogenesis in the orthotopic C6 glioma model through changes in VEGF, Flt1, ERK1/2, MMP2, cyclin D1, pRb, p53 and p27 protein expression. Lipids Health Dis. 2009 Mar 17;8:8.

Morita I, Schindler M, Regier MK, Otto JC, Hori T, DeWitt DL, Smith WL. Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. J Biol Chem. 1995;18:10902-8.

Naidu MRC, Das UN, Kishan A. Intratumoral γ-linolenic acid therapy of human gliomas. Prost. Leukot. Essenc. Fatty Acids. 1992;45:181-184.

Nathoo N, Barnett GH, Golubic M. The eicosanoid cascade: possible role in gliomas and meningiomas. J Clin Pathol. 2004 Jan;57(1):6-13.

Neagoe PE, Lemieux C, Sirois MG. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A165induced prostacyclin synthesis requires the activation of VEGF receptor-1 and -2 heterodimer. J Biol Chem. 2005 Mar 18;280(11):9904-12.

Ng T, Shima D, Squire A, Bastiaens PIH, Gschmeissner S, Humphries MJ, Parker PJ. PKC $\alpha$  regulates  $\beta$ 1 integrin-dependent cell motility through association and control of integrin traffic. EMBO J. 1999;18(14):3909-923.

Ngwenya LB, Peters A, Rosene DL. Light and electron microscopic immunohistochemical detection of bromodeoxyuridine-labeled cells in the brain: different fixation and processing protocols. J Histochem Cytochem. 2005 Jul;53(7):821-32.

Nishida Y, Miyamori H, Thompson EW, Takino T, Endo Y, Sato H. Activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) by membrane type 1 matrix metalloproteinase through an artificial receptor for proMMP-2 generates active MMP-2. Cancer Res. 2008 Nov 1;68(21):9096-104.

Novak U, Kaye AH. Extracellular matrix and the brain: components and function. J Clin Neurosci. 2000 Jul;7(4):280-90.

Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. Nat Rev Mol Cell Biol. 2006 May;7(5):359-71.

Paku S, Paweletz N. First steps of tumor-related angiogenesis. Lab Invest. 1991 Sep;65(3):334-46.

Park JB, Kwak HJ, Lee SH. Role of hyaluronan in glioma invasion. Cell Adh Migr. 2008 Jul;2(3):202-7.

Park MT, Lee SJ. Cell cycle and cancer. J Biochem Mol Biol. 2003 Jan 31;36(1):60-5.

Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu IM, Gallia GL, Olivi A, McLendon R, Rasheed BA, Keir S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Busam DA, Tekleab H, Diaz LA Jr, Hartigan J, Smith DR, Strausberg RL, Marie SK, Shinjo SM, Yan H, Riggins GJ, Bigner DD, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. Science. 2008 Sep 26;321(5897):1807-12.

Perdiki M, Korkolopoulou P, Thymara I, Agrogiannis G, Piperi C, Boviatsis E, Kotsiakis X, Angelidakis D, Diamantopoulou K, Thomas-Tsagli E, Patsouris E. Cyclooxygenase-2 expression in astrocytomas. Relationship with microvascular parameters, angiogenic factors expression and survival. Mol Cell Biochem. 2007 Jan;295(1-2):75-83.

Perego C, Vanoni C, Massari S, Raimondi A, Pola S, Cattaneo MG, Francolini M,Vicentini LM, Pietrini G. Invasive behaviour of glioblastoma cell lines is associated with altered organisation of the cadherin-catenin adhesion system. J Cell Sci. 2002 Aug 15;115(Pt 16):3331-40.

Pham H, Vang K, Ziboh VA. Dietary gamma-linolenate attenuates tumor growth in a rodent model of prostatic adenocarcinoma via suppression of elevated generation of PGE(2) and 5S-HETE. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2006 Apr;74(4):271-82.

Phillips GR, Krushel LA, Crossin KL. Domains of tenascin involved in glioma migration. J Cell Sci. 1998 Apr;111(Pt 8):1095-104.

Pistolesi S, Boldrini L, Gisfredi S, De Ieso K, Camacci T, Caniglia M, Lupi G, Leocata P, Basolo F, Pingitore R, Parenti G, Fontanini G. Angiogenesis in intracranial meningiomas: immunohistochemical and molecular study. Neuropathol Appl Neurobiol. 2004 Apr;30(2):118-25.

Plate KH, Breier G, Weich HA, Mennel HD, Risau W. Vascular endothelial growth factor and glioma angiogenesis: coordinate induction of VEGF receptors, distribution of VEGF protein and possible in vivo regulatory mechanisms. Int J Cancer. 1994 Nov 15;59(4):520-9. Plate KH, Risau W. Angiogenesis in malignant gliomas. Glia. 1995;15:339-47.

Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W. Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. Nature. 1992 359: 845-8.

Podo F. Tumour phospholipid metabolism. NMR Biomed. 1999 Nov;12(7):413-39.

Preuss M, Girnum GD, Darby CJ, Khoo N, Spector AA, Robbins MEC. Role of antioxidant enzyme expression in the selective cytotoxic response of glioma cells to  $\gamma$ -linolenic acid supplemention. Free Radic Biol Med. 2000 28(7):1143-56.

Price DJ, Miralem T, Jiang S, Steinberg R, Avraham H. Role of vascular endothelial growth factor in the stimulation of cellular invasion and signaling of breast cancer cells. Cell Growth Differ. 2001;12:129-35.

Qi K, Hall M, Deckelbaum RJ. Long-chain polyunsaturated fatty acid accretion in brain. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2002 Mar;5(2):133-8.

Radotra B, McCormick D. Glioma invasion in vitro is mediated by CD44-hyaluronan interactions. J Pathol. 1997 Apr;181(4):434-8.

Ramos KL, Colquhoun A. Protective role of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in the metabolic response of C6 rat glioma cells to polyunsaturated fatty acid exposure. Glia. 2003 Aug;43(2):149-66.

Ramos KL. Estudos dos efeitos dos ácidos graxos polinsaturados sobre o metabolismo energético e migração de células tumorais [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2002.

Ravi R, Mookerjee B, Bhujwalla ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q, Dillehay LE, Madan A, Semenza GL, Bedi A. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. Genes Dev. 2000 Jan 1;14(1):34-44.

Reardon DA, Akabani G, Coleman RE, Friedman HS, Herndon JE, Cokgor I, McLendon RE, Pegram CN, Provenzale JM, Quinn JA, Rich JN, Regalado LV, Sampson JH, Shafman TD, Wikstrand CJ, Wong TZ, Zhao XZ, Zalutsky M, Bogner DD. Phase II trial of murine <sup>131</sup>I-labeled antitenascin monoclonal antibody 81C6 administered into surgically created resection cavities of patients with newly diagnosed malignant gliomas. J Clin Oncol. 2002 20(5):1389-97.

Rege TA, Fears CY, Gladson CL. Endogenous inhibitors of angiogenesis in malignant gliomas: nature's antiangiogenic therapy. Neuro Oncol. 2005 Apr;7(2):106-21.

Ruiz C, Huang W, Hegi ME, Lange K, Hamou MF, Fluri E, Oakeley EJ, Chiquet-Ehrismann R, Orend G. Differential gene expression analysis reveals activation of growth promoting signaling pathways by tenascin-C. Cancer Res. 2004 Oct 15;64(20):7377-85. Ruoslahti E. Specialization of tumour vasculature. Nat Rev Cancer. 2002 Feb;2(2):83-90.

Salmivirta M, Elenius K, Vainio S, Hofer U, Chiquet-Ehrismann R, Thesleff I, Jalkanen M. Syndecan from embryonic tooth mesenchyme binds tenascin. J Biol Chem. 1991 Apr 25;266(12):7733-9.

Sameshima T, Nabeshima K, Toole BP, Yokogami K, Okada Y, Goya T, Koono M, Wakisaka S. Expression of emmprin (CD147), a cell surface inducer of matrix metalloproteinases, in normal human brain and gliomas. Int J Cancer. 2000 Oct 1;88(1):21-7.

Sandstrom PA, Pardi D, Tebbey PW, Dudek RW, Terrian DM, Folks TM, Buttke TM. Lipid hydroperoxide-induced apoptosis: lack of inhibition by Bcl-2 over-expression. FEBS Lett. 1995 May 22;365(1):66-70.

Sarkar S, Nuttall RK, Liu S, Edwards DR, Yong VW. Tenascin-C stimulates glioma cell invasion through matrix metalloproteinase-12. Cancer Res. 2006 Dec 15;66(24):11771-80.

Schönfeld P, Wojtczak L. Fatty acids as modulators of the cellular production of reactive oxygen species. Free Radic Biol Med. 2008 Aug 1;45(3):231-41.

Schweitzer T, Vince GH, Herbold C, Roosen K, Tonn JC. Extraneural metastases of primary brain tumors. J Neurooncol. 2001 Jun;53(2):107-14.

Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. J Nutr Biochem. 2007 Sep;18(9):567-79.

Sheng H, Shao J, Washington MK, DuBois RN. Prostaglandin E2 increases growth and motility of colorectal carcinoma cells. J Biol Chem. 2003 May 5;276(21):18075-81.

Shono T, Tofilon PJ, Bruner JM, Owolabi O, Lang FF. Cyclooxygenase-2 expression in human gliomas: prognostic significance and molecular correlations. Cancer Res. 2001 Jun 1;61(11):4375-81.

Simard M, Nedergaard M. The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. Neuroscience. 2004;129(4):877-96.

Skuli N, Monferran S, Delmas C, Favre G, Bonnet J, Toulas C, Cohen-Jonathan Moyal E. Alphavbeta3/alphavbeta5 integrins-FAK-RhoB: a novel pathway for hypoxia regulation in glioblastoma. Cancer Res. 2009 Apr 15;69(8):3308-16.

Stefanik DF, Fellows WK, Rizkalla LR, Rizkalla WM, Stefanik PP, Deleo AB, Welch WC. Monoclonal antibodies to vascular endothelial growth factor (VEGF) and the VEGF receptor, FLT-1, inhibit the growth of C6 glioma in a mouse xenograft. J Neurooncol. 2001 Nov;55(2):91-100.

Steinbach JP, Weller M. Apoptosis in Gliomas: Molecular Mechanisms and Therapeutic Implications. J Neurooncol. 2004 Nov;70(2):247-56.

Stevens B, Fields RD. Regulation of the cell cycle in normal and pathological glia. Neuroscientist. 2002 Apr;8(2):93-7.

Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. Nature. 2009 Apr 9;458(7239):719-24.

Stylli SS, Kaye AH, Lock P. Invadopodia: at the cutting edge of tumour invasion. J Clin Neurosci. 2008 Jul;15(7):725-37.

Su B, Guan M, Xia J, Lu Y. Stimulation of lipocalin-type prostaglandin D synthase by retinoic acid coincides with inhibition of cell proliferation in human 3AO ovarian cancer cells. Cell Biol Int. 2003 27(7):587-92.

Susnow N, Zeng L, Margineantu D, Hockenbery DM. Bcl-2 family proteins as regulators of oxidative stress. Semin Cancer Biol. 2009 Feb;19(1):42-9.

Takahashi M, Fukami S, Iwata N, Inoue K, Itohara S, Itoh H, Haraoka J, Saido TC. In vivo glioma growth requires host-derived matrix metalloproteinase 2 for maintenance of angioarchitecture. Pharmacol Res. 2002;46(2):156-63.

Tang Y, Nakada MT, Kesavan P, McCabe F, Millar H, Rafferty P, Bugelski P, Yan L. Extracellular matrix metalloproteinase inducer stimulates tumor angiogenesis by elevating vascular endothelial cell growth factor and matrix metalloproteinases. Cancer Res. 2005 Apr 15;65(8):3193-9.

Telliez A, Furman C, Pommery N, Hénichart JP. Mechanisms leading to COX-2 expression and COX-2 induced tumorigenesis: topical therapeutic strategies targeting COX-2 expression and activity. Anticancer Agents Med Chem. 2006 May;6(3):187-208.

Timoshenko AV, Xu G, Chakrabarti S, Lala PK, Chakraborty C. Role of prostaglandin E2 receptors in migration of murine and human breast cancer cells. Exp Cell Res. 2003 Oct 1;289(2):265-74.

Tonn JC, Bernstein JJ, Goldbrunner RH. Process of glioma invasion. Int J Dev Neurosc. 1999 17(5-6):411-20.

Toole BP, Wight TN, Tammi MI. Hyaluronan-cell interactions in cancer and vascular disease. J Biol Chem. 2002 Feb 15;277(7):4593-6.

Treasurywala S, Berens ME. Migration arrested in glioma cells is dependent on the αv integrin subunit. Glia. 1998 24:236-43.

Trifan OC, Hla T. Cyclooxygenase-2 modulates cellular growth and promotes tumorigenesis. J Cell Mol Med. 2003 Jul-Sep;7(3):207-22.

Tzu J, Marinkovich MP. Bridging structure with function: structural, regulatory, and developmental role of laminins. Int J Biochem Cell Biol. 2008;40(2):199-214.

Ulrich TA, de Juan Pardo EM, Kumar S. The Mechanical Rigidity of the Extracellular Matrix Regulates the Structure, Motility, and Proliferation of Glioma Cells. Cancer Res. 2009 May 12.

Vajkoczy P, Goldbrunner R, Farhadi M, Vince G, Schilling L, Tonn JC, Schmiedek P, Menger MD. Glioma cell migration is associated with glioma-induced angiogenesis in vivo. Int J Dev Neurosci. 1999 Aug-Oct;17(5-6):557-63.

Van den Heuvel S. Cell-cycle regulation. WormBook. 2005 Sep 21:1-16.

Vartak S, Robbins ME, Spector AA. Polyunsaturated fatty acids increase the sensitivity of 36B10 rat astrocytoma cells to radiation-induced cell kill. Lipids. 1997 Mar;32(3):283-92.

Vartak S, McCaw R, Davis CS, Robbins M, Spector AA. γ-linolenic acid (GLA) is cytotoxic to 36B10 malignant astrocytoma cells but not "to normal" rat astrocyte. Brit J Cancer. 1998; 77(10):1612-20.

Wagner S, Fueller T, Hummel V, Rieckmann P, Tonn JC. Influence of VEGF-R2 inhibition on MMP secretion and motility of microvascular human cerebral endothelial cells (HCEC). J Neurooncol. 2003 May;62(3):221-31.

Wang MT, Honn KV, Nie D. Cyclooxygenases, prostanoids, and tumor progression. Cancer Metastasis Rev. 2007 Dec;26(3-4):525-34.

Wick W, Wick A, Schulz JB, Dichgans J, Rodemann HP, Weller M. Prevention of irradition-induced glioma cell invasion by temozolomide involves caspase 3 activity and cleavage of focal adhesion kinase. Cancer Res. 2002 Mar;62:1915-19.

Witmer AN, Dai J, Weich HA, Vrensen GF, Schlingemann RO. Expression of vascular endothelial growth factor receptors 1, 2, and 3 in quiescent endothelia. J Histochem Cytochem. 2002 Jun;50(6):767-77.

Yamagata K, Tagami M, Takenaga F, Yamori Y, Nara Y, Itoh S. Polyunsaturated fatty acids induce tight junctions to form in brain capillary endothelial cells. Neuroscience. 2003; 116:649-56.

Yao Y, Kubota T, Sato K, Kitai R, Takeuchi H, Arishima H. Prognostic value of vascular endothelial growth factor and its receptors Flt-1and Flk-1 in astrocytic tumours. Acta Neurochir (Wien). 2001;143(2):159-66.

Yehuda S, Rabinovitz S, Mostofsky DI. Essential fatty acids and the brain: from infancy to aging. Neurobiol Aging. 2005 Dec;26 Suppl 1:98-102

Zagzag D, Capo V. Angiogenesis in the central nervous system: a role for vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor and tenascin-C. Common molecular effectors in cerebral neoplastic and non-neoplastic "angiogenic diseases". Histol Histopathol. 2002 Jan;17(1):301-21.

Zagzag D, Shiff B, Jallo GI, Greco MA, Blanco C, Cohen H, Hukin J, Allen JC, Friedlander DR. Tenascin-C promotes microvascular cell migration and phosphorylation of focal adhesion kinase. Cancer Res. 2002 May 1;62(9):2660-8.

Zamecnik J. The extracellular space and matrix of gliomas. Acta Neuropathol. 2005 Nov;110(5):435-42.

Zhang H, Wu J, Meng L, Shou CC. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors KDR and Flt-1 in gastric cancer cells. World J Gastroenterol. 2002;8:994-8.

Zhang L, Jiang L, Sun Q, Peng T, Lou K, Liu N, Leng J. Prostaglandin E2 enhances mitogen-activated protein kinase/Erk pathway in human cholangiocarcinoma cells: involvement of EP1 receptor, calcium and EGF receptors signaling. Mol Cell Biochem. 2007 Nov;305(1-2):19-26.

Zhang X, Jiang L, Geng C, Cao J, Zhong L. The role of oxidative stress in deoxynivalenol-induced DNA damage in HepG2 cells. Toxicon. 2009 Sep 15;54(4):513-8.

Zubkov AY, Ogihara K, Bernanke DH, Parent AD, Zhang J. Apoptosis of endothelial cells in vessels affected by cerebral vasospasm. Surg Neurol. 2000 Mar;53(3):260-6.

# ANEXOS A

# Tabela A.1 – Descrição dos Anticorpos.

	microscopia	
	IUZ	<b>( )</b>
	anticorpo	anticorpo
	primario	secundario
	camundongo	burro anti
BrdU	monocional	camundongo
	cabra	burro anti
COX-2	policional	cabra
	coelho	burro anti
Flt-1	policlonal	coelho
	coelho	burro anti
Flk-1	policlonal	coelho
	cabra	burro anti
GFAP	policlonal	cabra
	cabra	burro anti
MMP-2	policlonal	cabra
	camundongo	burro anti
Macrófago	monoclonal	camundongo
	cabra	burro anti
TNC	policional	cabra
	coelho	burro anti
VEGF	policional	coelho
	microscopia	
	eletrônica	
	anticorpo	anticorpo
	primario	secundario
	cabra	coelho anti
COX-2	policional	cabra 10 nn
	coelho	cabra anti
Flt-1	policlonal	coelho 15 nn
	coelho	cabra anti
Flk-1	policlonal	coelho 15 nn
	cabra	coelho anti
MMP-2	policlonal	cabra 10 nn
	cabra	coelho anti
TNC	policlonal	cabra 10 nn
	coelho	cabra anti
VEGF	policlonal	coelho 15 nn

# ANEXO B – TRABALHOS PUBLICADOS

# **Research Communication**

# Gamma-linolenic Acid Alters Ku80, E2F1, and Bax Expression and Induces Micronucleus Formation in C6 Glioma Cells *In Vitro*

Marcel Benadiba, Juliano Andreoli Miyake, and Alison Colquhoun

Department of Cell and Developmental Biology, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

#### Summary

Gamma-linolenic acid (GLA) is an inhibitor of tumor cell proliferation in both in vitro and in vivo conditions. The aim of this study was to investigate the effects of 150  $\mu$ M GLA on the expression of E2F1, cyclin D1, bax, bcl2, Ku70, and Ku80 in C6 rat glioma cells. The Ku proteins were chosen as previous studies have shown that loss or reduction in their expression causes increased DNA damage and micronucleus formation in the presence of radiation. The fact that GLA exposure is known to enhance the efficacy of radiation treatment raised the question whether the Ku proteins could be involved in this effect as seen for other molecules such as roscovitine and flavopiridol. GLA altered the mRNA expression of E2F1, cyclin D1, and bax, but no changes were found for bcl2, Ku70, and Ku80. Alterations in protein expression were observed for bax, Ku80, and E2F1. The 45% decrease in E2F1 expression was proportional to decreased cell proliferation (44%). Morphological analysis found a 25% decrease in mitotic activity in the GLA-treated cells, which was accompanied by a 49% decrease in S-phase by FACS analysis. A 39% increase in the number of micronuclei detected by Hoechst fluorescence points to GLA's effects on cell division even at concentrations that do not produce significant increases in apoptosis. Most important was the finding that Ku80 expression, a critical protein involved in DNA repair as a heterodimer with Ku70, was decreased by 71%. It is probable that reduced Ku80 is responsible for the increase in micronucleus formation in GLA-treated cells in a similar manner to that found in Ku80 null cells exposed to radiation. The decreased expression of Ku80 and E2F1 could make cells more susceptible to radiotherapy and chemotherapy. © 2009 IUBMB

IUBMB Life, 61(3): 244–251, 2009

Keywords gamma-linolenic acid; Ku80; E2F1; glioma; cell cycle; apoptosis.

#### INTRODUCTION

Gliomas are the most common form of central nervous system tumor, and high-grade gliomas (WHO III-IV) are notoriously difficult to treat. Although standard treatment involves surgical resection and radio/chemotherapy, the incidence of recurrence is very high because of the diffusing nature of these tumors. Previous studies have shown that polyunsaturated fatty acids such as gamma-linolenic acid (GLA) and eicosapentaenoic acid are cytotoxic to tumor cells both in vitro and in vivo (1-4). GLA can alter tumor cell metabolism and proliferation through the production of lipid peroxides and reactive oxygen species, changes in mitochondrial membrane lipid composition, loss of mitochondrial membrane potential, induction of apoptosis, and cell cycle arrest (3-5). Several PUFAs including GLA have been reported to alter bcl2 expression thereby inducing apoptosis (6). GLA also has synergistic effects on both radiotherapy and chemotherapy (7). The difficulty in treating patients with gliomas has led to the proposed use of GLA as an adjuvant therapy (7, 8). However, the mechanisms by which GLA causes its antitumor effects remain largely unknown in gliomas (5, 7). At subcytotoxic concentrations, GLA reduces both rates of glioma cell proliferation and migratory capacity (9), without inducing the apoptosis typically seen with higher concentrations of GLA (2, 5, 8). This study aimed to identify the possible molecular targets of GLA treatment to provide a better understanding of the mechanisms behind these previous findings in gliomas. Because GLA may alter DNA cell cycle, control and repair mechanisms was analyzed as lipid peroxides can cause substantial DNA and protein damage (6). The expression of E2F1, cyclin D1, bax, bcl2, Ku70, and Ku80 and the effects of the natural antioxidant vitamin E on expression were analyzed. The Ku proteins were chosen as previous studies have shown that loss or reduction in their expression causes increased DNA damage and micronucleus formation in the presence of radiation (10). The fact that GLA exposure is known to enhance the efficacy of radiation treatment raised the question whether the Ku proteins could be involved in this effect as seen for other molecules such as roscovitine (10) and flavopiridol (11).

Received 23 July 2008; accepted 18 October 2008

Address correspondence to: Alison Colquhoun, Department of Cell and Developmental Biology, University of São Paulo, São Paulo, CEP 05508-900, SP, Brazil. Tel.: +55-11-3091-7261. Fax: +55-11-3091-7402. E-mail: alison@usp.br

#### EFFECTS OF GLA ON THE EXPRESSION OF Ku80, E2F1, AND Bax

#### MATERIALS AND METHODS

#### Cell Culture

C6 rat glioma cells were obtained from the ATCC and grown in DMEM containing 10% fetal calf serum and antibiotics (penicillin 50 U/mL, streptomycin 50  $\mu$ g/mL). Cells in the exponential phase of growth were used, growing in 75 cm<sup>2</sup> flasks in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>, 95% air at 37°C. Cells were exposed to 150  $\mu$ M GLA complexed with 0.5% albumin (9), whereas the control cells were exposed to 0.5% albumin. Cell proliferation and viability assays followed standard methods (12). The concentration of 150  $\mu$ M was chosen based on the previous studies allowing inhibition of cell proliferation without extensive cytotoxicity and apoptosis (9). This concentration is clinically relevant as it can be readily achieved by dietary supplementation with fatty acids. A recent study in pregnant women detected plasma EPA concentrations of 41.5  $\pm$ 17.8 mg/L after 17 weeks supplementation (13). Cell proliferation and gene expression studies were also performed in the presence or absence of 10 µM vitamin E as a natural antioxidant.

#### FACS Analysis

Control and treated cells were prepared and collected following standard procedures for FACS analysis after 24 hours  $\pm$  150  $\mu$ M GLA (3).

#### Immunohistochemical Analysis

The cells were grown on glass cover slips  $\pm 150 \ \mu$ M GLA for 24 hours before fixation with ice-cold 4% formaldehyde in 0.1 M phosphate buffer. Standard immunohistochemical methods were used following the sequence: primary antibody, biotin-ylated secondary antibody, and streptavidin-Alexa 488 (9). All cells were triple-labeled for the respective protein of interest, actin (rhodamine-phalloidin) and nucleus (Hoechst 33342), and mounted with Vectashield (Vector Labs, USA).

#### **Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction**

GLA-exposed and control C6 cells were used for total RNA extraction by Trizol (Life Technologies, USA). The first strand of complementary DNA (cDNA) was generated from 1  $\mu$ g RNA as previously described (12). PCR amplification cycle: 1 min at 94°C, 1 min at primer-specific temperature (55°C for Ku80; 60°C for E2F1, Ku70, GAPDH; 65°C for p53, cyclin D1, bcl-2, c-myc; and 68°C for bax), and 1 min at 72°C. To ensure the exponential phase of amplification, the number of PCR cycles was determined and optimized for each of the proteins. Controls for nonspecific amplification showed no bands on gel (data not shown). Semiquantitative gene expression data was calculated by the ratio of respective gene/GAPDH density after ethidium bromide staining. GAPDH expression remained unchanged after GLA exposure. Primers used were as follows (sense/antisense): cyclin D1 (435 bp): 5'-TGTTCGTGGCC TCTAAGATGA-3', 5'-GCTTGACTCCAGAAGGG CTT-3';

E2F-1 (143 bp): 5'-ACGCTATGAAACCTCACT AAA-3', 5'-AGGACATTGGTGATG TCATA-3'; Bax (352 bp): 5'-GCAGGGAGGATGGCT GGGGAGA-3', 5'-TCCAGACAAGC AGCCGCTCACG-3'; Bcl-2 (780 bp): 5'-GCGAAGTGCTATTG GTACCTG-3', 5'-ATATT TGTTTGGGGGCAGGTCT-3'; Ku70 (414 bp): 5'-AAGAGGATCATGCTATTCACCAA-3', 5'-TCCTTGTCTTAGTTTTCACTGG-3'; Ku80 (433 bp): 5'-GAT-GAGGCAGCAGCTGTT-3', 5'-CAAAATGTGCTGCTGAAT-3'; GAPDH (306 bp): 5'-GTCGGTGTGAACGGATTTG-3', 5'-ACAAACATGGGGGCATCAG-3'.

#### Western Blotting Analysis

Twenty micrograms of sample proteins were electrophoresed through 7.5% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (Hybond ECL membrane, Amersham Pharmacia Biotech). Immunoblotting followed standard methods (9), and fluorescent bands (Alexa-488 label) were visualized in an image system (Molecular Dynamics Typhoon 8600 Variable Mode Imager). The antibodies used in this study were as follows: E2F-1 (H-137, rabbit), GAPDH—as internal control (V-18, goat) (Santa Cruz Biotechnology, USA). Bcl-2 (ab7973-1, rabbit), bax (ab16837-100, rabbit), and cyclin D1 (ab31450-250, rabbit) were purchased from Abcam, USA. Ku70/80 (ab1358, rabbit) was obtained from Chemicon International, USA. Secondary antibodies conjugated with Alexa-488 (anti-goat, antimouse, and anti-rabbit) used were produced in donkey (Invitrogen–Molecular Probes).

#### Statistical Analysis

The semiquantitative analysis of reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) products was performed using a Molecular Dynamics Typhoon 8600 Variable Mode Imager. All data are presented as the mean  $\pm$  standard error (SE). The results were submitted to analysis of variance followed by the unpaired *t*-test to compare gene expression results between treated and untreated cells. Differences were considered significant at P < 0.05.

#### RESULTS

After 24 hours of growth in the presence of 150  $\mu$ M GLA, C6 cells were counted, and then a 44% inhibition of cell proliferation was seen without inducing significant apoptosis. A 49% decrease in S-phase was found in the GLA-treated cells with no significant changes seen in sub-G1, G1, and polyploid phases (Fig. 1). Hoechst labeling of DNA highlighted a significant decrease (25%) in mitotic index in the GLA-treated cells without a significant change in apoptosis (Fig. 1). However, the most important finding in the morphological analysis of DNA was the 39% increase in micronucleus formation in the GLA-treated cells. Examples of micronucleus formation and cyclin D1 staining of these structures can be seen in Fig. 1.

The effects of 150  $\mu$ M GLA on mRNA expression of E2F-1, cyclin D1, Ku70, Ku80, bax, and bcl2 were analyzed during a



**Figure 1.** Effect of 24-hour exposure to 150  $\mu$ M GLA on cell cycle distribution, mitosis, apoptosis, and micronucleus formation in C6 glioma cells. (A) FACS analysis on RNase-treated, propidium iodide-stained cells, 10,000 events per sample (n = 3). (B–D) Analysis of Hoescht labeled cells performed with Image Pro Plus software on 5,556 control and 4,473 GLA-treated cells (n = 6). (E) Immunohistochemical labeling for cyclin D1 in GLA-treated cells. Note localization in both the nuclei and micronuclei of the cells. Arrows indicate micronuclei, arrowheads indicate apoptosis, and \* indicates abnormal mitosis; cyclin D1 labeling in green, actin in red (rhodamine phalloidin), and DNA in blue (Hoechst). Statistical significance, \* = P < 0.001. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]



**Figure 2.** mRNA and protein expression of E2F1, cyclin D1, Ku70, and Ku80 after 24-hour exposure to 150  $\mu$ M GLA. mRNA expression by RT-PCR normalized against GAPDH expression at 0, 1, 2, 3, 6, 12, and 24 hours after addition of GLA (n = 5). Striped bar: control; black bar: GLA-treated. Protein expression by Western blotting normalized against GADPH expression at 24 hours after addition of GLA. In B, D, F, and H: lanes 1–4: control; lanes 5–9: GLA. Upper lane: protein of interest, lower lane: GAPDH. Statistical significance, \* = P < 0.001. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]



**Figure 3.** mRNA and protein expression of Bcl-2 and Bax after 24-hour exposure to 150  $\mu$ M GLA. mRNA expression by RT-PCR normalized against GAPDH expression at 0, 1, 2, 3, 6, 12, and 24 hours after addition of GLA (n = 5). Striped bar: control, black bar: GLA-treated. Protein expression by Western blotting normalized against GADPH expression at 24 hours after addition of GLA. In B, D, F, and G: lanes 1–4: control; lanes 5–9: GLA. Upper lane: protein of interest, lower lane: GAPDH. (E) Bax/Bcl-2 ratio calculated for control and GLA-treated cells, data representative of n = 5. Statistical significance, \* = P < 0.001.

24-hour period, at intervals of 0, 1, 2, 3, 6, 12, and 24 hours (Figs. 2 and 3). Protein expression was determined at the end of the 24-hour period (Figs. 2 and 3). The expression of cyclin D1 mRNA was seen to increase only after 1 hour of GLA exposure

and remained higher than the control value until the end of the 24-hour period (Fig. 2). However, no significant alteration in protein levels of cyclin D1 was observed by Western blot analysis (Fig. 2). In contrast, E2F1 mRNA started to decrease at

1 hour of treatment and E2F1 protein expression was seen to decrease by 45% after GLA exposure (Fig. 2).

The mRNA expression of bcl2, Ku70, and Ku80 were unaltered by GLA (Figs. 2 and 3). In contrast, Ku80 protein expression was decreased by 71% after 24 hours GLA treatment (Fig. 2). The high concentration of Ku70/80 immunolabeling in mitotic cells can be seen in Fig. 2, and loss of Ku80 expression may affect cell proliferation as well as DNA repair. Both mRNA and protein expression of the bax monomer and dimer was increased after treatment (Fig. 3). The bax/bcl2 ratio increased in the GLA-treated cells for bax 21 kDa, bax 50 kDa, and total ratio (217%) in relation to the control group (Fig. 3). The presence of the natural antioxidant vitamin E did not significantly alter the mRNA expression patterns of the proteins studied although it did partially reverse the effects of 150  $\mu$ M GLA on cell proliferation (Fig. 4). The effects of GLA are therefore only, in part, dependent on peroxidation, confirming previous findings in this cell line where 150  $\mu$ M GLA causes only a small increase in reactive oxygen species generation and TBARS formation (9).

### DISCUSSION

In this study, 150  $\mu$ M GLA treatment for 24 hours *in vitro* caused a downregulation of E2F1 mRNA and protein expression showing a rapid response of mRNA, starting only after 1 hour of treatment and lasting until the end of the 24-hour period (Fig. 2). Because of the importance of E2F1 in the control of S-phase entry, significant decreases in its expression may directly influence cell proliferation. Recent studies with Minerval (2-hydroxy-9-cis-octadecenoic acid), a derivative of oleic acid, showed that this drug induced cell cycle arrest before entry into S phase, causing human lung adenocarcinoma (A549) cells to arrest in the G0/G1 phase. This cell cycle arrest was associated with a marked decrease in the expression of E2F1 (*14*), in a similar manner to our present findings in GLA exposed C6 glioma cells.

GLA increased the expression of bax 21 kDa and 50 kDa, and the bax/bcl-2 ratio was altered demonstrating the higher levels of bax in relation to bcl-2 levels after treatment. However, at 150  $\mu$ M, GLA did not increase apoptotic rates in C6 cells *in vitro*, Fig. 1 and (9). Although these results suggest that bax would stimulate the apoptotic response, other proteins also form heterodimers with bax and can thus modulate or inhibit the apoptotic response. In neuroblastoma cells, bax associates with cytoplasmic Ku70, blocking apoptosis in response to certain chemotherapeutic agents (*15*, *16*). Ku70 can also function as a physiological inhibitor of bax-induced apoptosis (*17*).

A single report showed that Ku proteins can bind to the E2F motif thereby regulating the cell cycle response to DNA damage and other insults (18). High levels of the DNA repair proteins Ku70 and Ku80 are related to hyperproliferation and carcinogenesis, and the heterodimeric Ku70/Ku80 protein complex is important for DNA repair in resistant tumor cells (16). Ku70/Ku80 heterodimers represent the regulatory subunit of DNA-dependent



**Figure 4.** Cell proliferation and mRNA expression after 24hour exposure to GLA  $\pm$  10  $\mu$ M vitamin E. (A) Cell proliferation expressed as cells/mL, n = 6. Cells treated with GLA at 75 or 150  $\mu$ M  $\pm$  10  $\mu$ M vitamin E. Note dose-dependent inhibition of cell proliferation by GLA, partially reversed by vitamin E. mRNA expression of E2F1 (B), cyclin D1 (B), Ku70 (C), Ku80 (C), Bcl-2 (D), and Bax (D) after 24-hour exposure to 150  $\mu$ M GLA. mRNA expression by RT-PCR normalized against GAPDH expression at 24 hours after addition of GLA (n = 3). Statistical significance, \* = P < 0.05.

protein kinase (DNA-PKc), which plays an important role during the repair of DNA double strand breaks. Ku proteins have been implicated in the maintenance of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) on chromatin following ionizing radiation (*19*). In this study, GLA caused a 71% decrease in Ku80 protein expression. However, this was not accompanied by decreased mRNA expression and may point to an increase in Ku80 proteolysis in GLA-treated cells. The decreased Ku80 levels in GLA-treated cells could subsequently lead to increased Ku70 protein availability for interaction with other proteins such as bax, which could thus block the apoptotic response to GLA (20, 21). The oxidative stress caused by GLA in tumor cells (3, 9) may be involved in reduced Ku80 protein levels, as oxidative stress was able to induce nuclear loss of Ku70 and Ku80 in pancreatic acinar AR42J cells (22).

Taken together, we may speculate that this mechanism is at least partly responsible for the nonapoptotic response caused by 150  $\mu$ M GLA in these cells. A recent study has reported that reducing Ku80 to 10% of original levels by RNAi caused impaired DNA replication and activated a DNA replication checkpoint blocking cell division in G1 (23). The RNAi study did not, however, induce increased apoptosis but led to a decrease in S-phase and caused a decrease in PCNA expression. An important finding in this study was the significant increase in micronucleus formation in the GLA-treated cells, and this is indicative of altered DNA replication. The reduced Ku80 concentration could be directly related to impaired DNA replication resulting in cell cycle changes and micronucleus formation. A recent study reported that shRNA inhibition of Ku80 expression caused decreased cell proliferation and increased sensitivity to both radio and chemotherapy (24). In addition, Ku knockout mice are hypersensitive to ionizing radiation (16). In cells with Ku80 knockout, irradiation leads to increased micronucleus formation versus Ku80 positive cells (25). A recent study has shown that the cyclin-dependent kinase inhibitor roscovitine also induces reduced S-phase, inhibition of Ku80 expression, and to a lesser degree Ku70 expression, and then increases A549 nonsmall cell lung cancer sensitivity to radiation (10). To our knowledge, this is the first report of polyunsaturated fatty acids altering Ku protein expression, and this finding is of importance as it may explain one of the reasons why GLA is able to increase the sensitivity of tumor cells to both radiotherapy and chemotherapy (7). Further studies are underway to determine the mechanism by which GLA or one of its metabolites alters the metabolism and function of the Ku proteins in glioma cells.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This research was funded by the Brazilian research foundations FAPESP, CNPq, and CAPES. The authors thank the collaboration of Thais Martins de Lima and Rui Curi in the use of the FACS system.

#### REFERENCES

 Das, U. N. (1990) Gamma-linolenic acid, arachidonic acid, and eicosapentaenoic acid as potential anticancer drugs. *Nutrition* 6, 429–434.

- Colquhoun, A. and Schumacher, R. I. (2001) Modifications in mitochondrial metabolism and ultrastructure and their relationship to tumour growth inhibition by gamma-linolenic acid. *Mol. Cell. Biochem.* 218, 13–20.
- Colquhoun, A. and Schumacher, R. I. (2001) Gamma-linolenic acid and eicosapentaenoic acid induce modifications in mitochondrial metabolism, reactive oxygen species generation, lipid peroxidation and apoptosis in Walker 256 rat carcinosarcoma cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1533, 207–219.
- Colquhoun, A. (2002) Gamma-linolenic acid alters the composition of mitochondrial membrane subfractions, decreases outer mitochondrial membrane binding of hexokinase and alters carnitine palmitoyltransferase I properties in the Walker 256 rat tumour. *Biochim. Biophys. Acta.* 1583, 74–84.
- Leaver, H. A., Wharton, S. B., Bell, H. S., Leaver-Yap, I. M., and Whittle, I. R. (2002) Highly unsaturated fatty acid induced tumour regression in glioma pharmacodynamics and bioavailability of gamma linolenic acid in an implantation glioma model: effects on tumour biomass, apoptosis and neuronal tissue histology. *Prostaglandins Leukot*. *Essent. Fatty Acids* 67, 283–292.
- Das, U. N. (1999) Essential fatty acids, lipid peroxidation and apoptosis. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 61, 157–163.
- Das, U. N. (2004) From bench to the clinic: gamma-linolenic acid therapy of human gliomas. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 70, 23–32.
- Bakshi, A., Mukherjee, D., Bakshi, A., Banerji, A. K., and Das, U. N. (2003) Gamma-linolenic acid therapy of human gliomas. *Nutrition* 19, 305–309.
- Ramos, K. L. and Colquhoun, A. (2003) Protective role of glucose-6phosphate dehydrogenase activity in the metabolic response of C6 rat glioma cells to polyunsaturated fatty acid exposure. *Glia* 43, 149–166.
- Zhang, F., Zhang, T., Gu, Z. P., Zhou, Y. A., Han, Y., Li, X. F., Wang, X. P., Cheng, Q. S., and Mei, Q. B. (2008) Enhancement of radiosensitivity by roscovitine pretreatment in human non-small cell lung cancer A549 cells. J. Radiat. Res. (Tokyo) 49, 541–548.
- Raju, U., Nakata, E., Mason, K. A., Ang, K. K., and Milas, L. (2003) Flavopiridol, a cyclin-dependent kinase inhibitor, enhances radiosensitivity ofovarian carcinoma cells. *Cancer Res.* 63, 3263–3267.
- Ribeiro, G., Benadiba, M., Colquhoun, A., and Silva, D. O. (2008) Diruthenium (II, III) complexes of ibuprofen, aspirin, naproxen and indomethacin non-steroidal anti-inflammatory drugs: synthesis, characterization and their effects on tumor-cell proliferation. *Polyhedron* 27, 1131–1137.
- Helland, I. B., Saugstad, O. D., Saarem, K., Van Houwelingen, A. C., Nylander, G., and Drevon, C. A. (2006) Supplementation of n-3 fatty acids during pregnancy and lactation reduces maternal plasma lipid levels and provides DHA to the infants. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* 19, 397–406.
- Martinez, J., Gutierrez, A., Casas, J., Llado, V., Lopez-Bellan, A., Besalduch, J., Dopazo, A., and Escriba, P. V. (2005) The repression of E2F-1 is critical for the activity of Minerval against cancer. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **315**, 466–474.
- Subramanian, C., Opipari, A. W., Jr., Bian, X., Castle, V. P., and Kwok, R. P. (2005) Ku70 acetylation mediates neuroblastoma cell death induced by histone deacetylase inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 4842–4847.
- Gullo, C., Au, M., Feng, G., and Teoh, G. (2006) The biology of Ku and its potential oncogenic role in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1765, 223–234.
- Mazumder, S., Plesca, D., Kinter, M., and Almasan, A. (2007) Interaction of a cyclin E fragment with Ku70 regulates Bax-mediated apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 27, 3511–3520.
- Pedley, J., Pettit, A., and Parsons, P. G. (1998) Inhibition of Ku autoantigen binding activity to the E2F motif after ultraviolet B irradiation of melanocytic cells. *Melanoma Res.* 8, 471–481.
- Park, S. J., Ciccone, S. L., Freie, B., Kurimasa, A., Chen, D. J., Li, G. C., Clapp, D. W., and Lee, S. H. (2004) A positive role for the Ku

complex in DNA replication following strand break damage in mammals. J. Biol. Chem. 279, 6046–6055.

- Nothwehr, S. F. and Martinou, J. C. (2003) A retention factor keeps death at bay. *Nat. Cell. Biol.* 5, 281–283.
- Sibani, S., Price, G. B., and Zannis-Hadjopoulos, M. (2005) Decreased origin usage and initiation of DNA replication in haploinsufficient HCT116 Ku80+/- cells. J. Cell. Sci. 118(Part 15), 3247– 3261.
- Song, J. Y., Lim, J. W., Kim, H., and Kim, K. H. (2003) Role of NFkappaB and DNA repair protein Ku on apoptosis in pancreatic acinar cells. *Ann. NY Acad. Sci.* 1010, 259–263.
- Rampakakis, E., Di Paola, D., and Zannis-Hadjopoulos, M. (2008) Ku is involved in cell growth, DNA replication and G1-S transition. *J. Cell. Sci.* 121(Part 5), 590–600.
- 24. Yang, Q. S., Gu, J. L., Du, L. Q., Jia, L. L., Qin, L. L., Wang, Y., and Fan, F. Y. (2008) ShRNA-mediated Ku80 gene silencing inhibits cell proliferation and sensitizes to gamma-radiation and mitomycin Cinduced apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma lines. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* **49**, 399–407.
- 25. Groesser, T., Chun, E., and Rydberg, B. (2007) Relative biological effectiveness of high-energy iron ions for micronucleus formation at low doses. *Radiat. Res.* **168**, 675–682.

# Lipids in Health and Disease

# Research

# Gamma-linolenic acid inhibits both tumour cell cycle progression and angiogenesis in the orthotopic C6 glioma model through changes in VEGF, Flt1, ERK1/2, MMP2, cyclin D1, pRb, p53 and p27 protein expression

Juliano Andreoli Miyake<sup>†</sup>, Marcel Benadiba<sup>†</sup> and Alison Colquhoun\*

Address: Department of Cell and Developmental Biology, Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

Email: Juliano Andreoli Miyake - juam@usp.br; Marcel Benadiba - benadiba@usp.br; Alison Colquhoun\* - alison@usp.br \* Corresponding author tequal contributors

Published: 17 March 2009

Lipids in Health and Disease 2009, 8:8 doi:10.1186/1476-511X-8-8

This article is available from: http://www.lipidworld.com/content/8/1/8

© 2009 Miyake et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<u>http://creativecommons.org/licenses/by/2.0</u>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

# Abstract

**Background:** Gamma-linolenic acid is a known inhibitor of tumour cell proliferation and migration in both *in vitro* and *in vivo* conditions. The aim of the present study was to determine the mechanisms by which gamma-linolenic acid (GLA) osmotic pump infusion alters glioma cell proliferation, and whether it affects cell cycle control and angiogenesis in the C6 glioma *in vivo*.

**Methods:** Established C6 rat gliomas were treated for 14 days with 5 mM GLA in CSF or CSF alone. Tumour size was estimated, microvessel density (MVD) counted and protein and mRNA expression measured by immunohistochemistry, western blotting and RT-PCR.

**Results:** GLA caused a significant decrease in tumour size (75  $\pm$  8.8%) and reduced MVD by 44  $\pm$  5.4%. These changes were associated with reduced expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) (71  $\pm$  16%) and the VEGF receptor Flt1 (57  $\pm$  5.8%) but not Flk1. Expression of ERK1/2 was also reduced by 27  $\pm$  7.7% and 31  $\pm$  8.7% respectively. mRNA expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP2) was reduced by 35  $\pm$  6.8% and zymography showed MMP2 proteolytic activity was reduced by 32  $\pm$  8.5%. GLA altered the expression of several proteins involved in cell cycle control. pRb protein expression was decreased (62  $\pm$  18%) while E2F1 remained unchanged. Cyclin D1 protein expression was increased by 42  $\pm$  12% in the presence of GLA. The cyclin dependent kinase inhibitors p21 and p27 responded differently to GLA, p27 expression was increased (27  $\pm$  7.3%) while p21 remained unchanged. The expression of p53 was increased (44  $\pm$  16%) by GLA. Finally, the BrdU incorporation studies found a significant inhibition (32  $\pm$  11%) of BrdU incorporation into the tumour *in vivo*.

**Conclusion:** Overall the findings reported in the present study lend further support to the potential of GLA as an inhibitor of glioma cell proliferation *in vivo* and show it has direct effects upon cell cycle control and angiogenesis. These effects involve changes in protein expression of VEGF, Flt1, ERK1, ERK2, MMP2, Cyclin D1, pRb, p53 and p27. Combination therapy using drugs with other, complementary targets and GLA could lead to gains in treatment efficacy in this notoriously difficult to treat tumour.

# **Open Access**

Received: 2 February 2009 Accepted: 17 March 2009

# Background

Gamma-linolenic acid has been proposed as an antitumour therapy and has proven efficacy in several tumour types [1,2]. Studies have used GLA for the treatment of human gliomas although these trials were preliminary in nature [3-5]. Studies in the C6 rat glioma model have shown GLA inhibits cell proliferation and induces apoptosis and similar results have been obtained with human glioma cells in primary culture [6-9]. GLA is known to induce reactive oxygen species generation and cause lipid peroxidation in tumour cells and leads to altered mitochondrial metabolism and ultrastructure, cytochrome c release, caspase activation and apoptosis [10-14]. Both GLA and its metabolic products can alter the gene expression of several proteins and GLA is known to inhibit glioma cell migration [14-16].

One of the major problems of glioma progression is intense angiogenesis which has been related not only to tumour nutrition but also to tumour cell migration along the basement membrane of the growing blood vessels [17]. In gliomas, the best characterized pro-angiogenic factor is vascular endothelial growth factor (VEGF), whose overexpression is correlated with increasingly malignant phenotypes [18]. VEGF and its receptors Flt1 (VEGFR1) and Flk1 (VEGFR2) are important proteins in the angiogenic process and represent a treatment target in many tumours including gliomas. In order for angiogenesis to progress extracellular matrix (ECM) degradation is necessary and the metalloproteinases 2 and 9 (MMP2 and MMP9) are highly expressed in gliomas [19,20]. Interestingly, GLA is known to inhibit both endothelial cell proliferation and induce endothelial cell apoptosis. Several studies have reported GLA-induced changes in endothelial cells including altered occludin and VE-cadherin expression and altered barrier properties [21,22]. Polyunsaturated fatty acids have also been reported to influence MMP2 expression in endothelial cells [23]. However the effects of GLA on cell cycle and angiogenesis related proteins in gliomas in vivo has not been explored and is the principal focus of the present study.

The aim of the study was to determine the effects of slow  $(0.5 \ \mu l/hr)$  osmotic pump infusion of 5 mM GLA on factors related to the angiogenic process and to the control of the cell cycle in the C6 rat glioma model. The mRNA and protein expression were studied of (i) angiogenesis related proteins: vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors Flt1 and Flk1, matrix metalloproteinase 2 (MMP2), matrix metalloproteinase 9 (MMP9), ERK1 and ERK2, and (ii) cell cycle control related proteins: pRb, cyclin D1, E2F1, p16, p21, p27 and p53. Immunohistochemical localization of proteins was performed by light microscopy and semi-quantitative analysis of protein

expression was performed for VEGF, Flt1 and Flk1. MMP2 proteolytic activity was determined by zymography in order to determine GLA effects on ECM degradation capacity *in vivo*. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) was immunohistochemically localized in order to determine the tumour area by image analysis. Bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation was analysed by immunohistochemical localization of the compound to determine the effects of GLA on S-phase DNA synthesis *in vivo*.

# Methods

### Cell culture

C6 rat glioma cells were obtained from the ATCC and stocks were maintained frozen (liquid nitrogen) in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% foetal calf serum and 20% glycerol. Stock cells were grown in DMEM containing 10% foetal calf serum and antibiotics (penicillin 50 U/ml, streptomycin 50  $\mu$ g/ml). Cells in the exponential phase of growth were used, growing in 75 cm<sup>2</sup> flasks in a humidified atmosphere of 5% CO2: 95% air at 37°C.

### Surgical procedures

C6 rat glioma cells were grown in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) containing 10% foetal calf serum and antibiotics (penicillin/streptomycin). Cells in the exponential phase of growth were used and a suspension prepared in sterile saline at a concentration of  $5 \times 10^5$  cells per 4–5 µl. Adult female Wistar rats of 250–350 g (n = 34) were anaesthetised with an intramuscular injection of ketamine:xylazine, 10 mg:1.5 mg/100 g body weight to provide deep anaesthesia and analgesia. The rats were placed on a stereotaxic surgical table, a midline incision was made and a burrhole was drilled 0.48 mm anterior and 3 mm lateral to bregma. The C6 cell suspension was slowly injected into the striatum using a Hamilton syringe at a depth of 5.4 mm to the bone surface and the needle left in situ for 3 minutes before its removal. After 14 days Alzet osmotic pumps containing artificial cerebrospinal fluid (CSF) (Alzet) or 5 mM GLA in artificial CSF were surgically implanted and attached to Alzet brain infusion kits. Artificial CSF was chosen as a vehicle solution in order to mimic more closely the composition of the interstitial fluid within the brain. These concentrations were chosen based on previous work and unpublished data from our laboratory [7]. The pump infusion rate was  $0.5 \,\mu$ l/hr with a duration of 2 weeks. After a further 14 days the rats were killed by transcardiac perfusion with 4% formaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH7.4 or by anaesthetic overdose for removal of fresh tissues for RT-PCR and western blotting. This procedure was approved by the Ethical Commission for Animal Experimentation of the Biomedical Institute (University of São Paulo) - protocol number 190/02.

The antibodies used in this study were: MMP-2 (goat), MMP-2 (mouse), MMP-9 (goat), MMP-9 (mouse), VEGF (mouse), VEGF (rabbit), Flt-1 (rabbit), Flk-1 (rabbit), cd34 (mouse), BrdU (mouse), pRb (rabbit), cyclin D1 (rabbit), E2F1 (rabbit), p16 (mouse), p21 (rabbit), p27 (rabbit), p53 (rabbit), ERK1/ERK2 (rabbit) and GFAP (goat). All of the primary antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology, USA. Biotinylated Ulex europaeus lectin was from Vector Laboratories, USA. Biotinylated secondary antibodies (anti-goat, anti-mouse and anti-rabbit) used for IHC were produced in donkey (Santa Cruz Biotechnology, USA), and the streptavidin-biotin/ HRP (horseradish peroxidase) was produced by Amersham Biosciences, UK.

# Immunohistochemical (IHC) analysis

The perfused brains were cryoprotected in a solution of 20% sucrose in 0.1 M potassium phosphate buffer (KPB) overnight. The brain sections were cut on a freezing microtome (Leica SM 2000R) and mounted on gelatinized slides. The sections were dried at 40°C-50°C for 2 hours and were maintained at -20°C until analysis. Immunohistochemical analysis followed [14] described briefly here. The sections were incubated at room temperature overnight with the respective primary antibody (MMP-2, MMP-9, Flt-1 and Flk-1, 1:100, VEGF, CD34 and BrdU 1:200 and GFAP, 1:500) diluted in PBST. The negative controls received only PBST. The slides were washed with PBST and incubated with the secondary antibodies (1:500-1:1000 in PBST) for 90 minutes. The slides were washed again with PBST and incubated with streptavidin-HRP (1:100-1:200 in PBST) for 60 minutes. The reactions were developed with 0.04% 3,3'-diaminobenzidine (DAB) + 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. For MMP-2, Flt-1, Flk-1 and GFAP the DAB reactions were intensified with an OsO<sub>4</sub> solution (0.04%) for 30 minutes. All slides were counterstained with 0.1% methyl-green, dehydrated and mounted with Permount<sup>®</sup> (Fisher Scientific).

# mRNA expression analysis by RT-PCR

Samples were dissected with the aid of a surgical microscope and used for total RNA extraction with Trizol (Life Technologies, USA). The first strand of complementary DNA (cDNA) was generated from 1 µg RNA as previously described [24]. PCR amplification cycle: 1 minute at 94°C, 1 minute at primer-specific temperature and 1 minute at 72°C. To ensure the exponential phase of amplification, the number of PCR cycles was determined and optimized for each of the proteins. Controls for nonspecific amplification showed no bands on gel (data not shown). Semi-quantitative gene expression data was calculated by the ratio of respective gene/GAPDH density after ethidium bromide staining. GAPDH expression remained unchanged after GLA exposure. Primers used were as follows (sense/antisense):

MMP-2 (500 bp):5'-TGGCAGTGCAATACCTGAAC-3',

5'-CAAGGTCCATAGCTCATCGTC-3';

MMP-9 (531 bp):5'-GAGGAATACCTGTACCGCTATG-3',

5'-CAAACCGAGTTGGAACCAC-3';

VEGF (148 bp):5'-CTGTACCTCCACCATGCCAAG-3',

5'-GGTACTCCTGGAAGATGTCCACC-3';

FLT-1 (453 bp):5'-TGGAAGGAGGCGAGGATTACAGT-GAGA-3',

5'GGTAGATTCCAGGTGTGGCATACTCTGGTG-3';

FLK-1(445 bp):5'-GTACTCCAGCGACGAGGCAG-GACTTTTA-3',

5'-TTTTATCCAGTTTCACAGAGGGCTCCATTG-3';

GAPDH (306 bp):5'-GTCGGTGTGAACGGATTTG-3',

5'-ACAAACATGGGGGGCATCAG-3';

ERK1 (188 bp) 5'-CCTGCTGGACCGGATGTTA-3'

5'-GTCTCTTGGAAGATCAGCTC-3'

pRb (549 bp): 5'-TCTACCTCCCTTTCCCTGTTT-3',

5'-AGTCATTTTTGTGGGTGTTGG-3';

p16 (180 bp): 5'-TCTGCAGATAGACTAGCCA-3',

5'-CTCGCAGTTCGAATCTGCA-3';

p21 (200 bp): 5'-TCCGATCCTGGTGATGTCC-3',

5'-CGAACACGCTCCCAGACGT-3';

p27 (325 bp): 5'-GCAGCTTGCCCGAGTTCTAC-3',

5'-TTCTTGGGCGTCTGCTCCAC-3';

p53 (271 bp): 5'-GTGGCCTCTGTCATCTTCCG-3',

5'-CCGTCACCATCAGAGCAACG-3';

E2F1 (143 bp): 5'-ACGCTATGAAACCTCACTAAA-3',

# 5'-AGGACATTGGTGATGTCATA-3';

# Cyclin D1 (435 bp): 5'-TGTTCGTGGCCTCTAAGATGA-3',

# 5'-GCTTGACTCCAGAAGGGCTT-3'.

### Western blotting

20-µg sample proteins were electrophoresed through 7.5% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (Hybond ECL membrane, Amersham Pharmacia Biotech). Immunoblotting followed standard methods [9] and fluorescent bands (Alexa-488 label) were visualized in an image system (Molecular Dynamics Typhoon 8600 Variable Mode Imager). The secondary antibodies conjugated with Alexa-488 (anti-goat, anti-mouse and anti-rabbit) used were produced in donkey (Invitrogen – Molecular Probes).

### BrdU incorporation

DNA synthesis was determined *in vivo* by administration of 100 mg/kg BrdU intraperitoneally 90 minutes before transcardiac perfusion of CSF or GLA + CSF treated rats. Immunohistochemical detection of cells containing BrdU was performed on cryosections as described above. The method used followed doses used in mouse studies [25].

### Zymography

The activity of MMP2 and MMP9 was detected using zymography on a 10% SDS-PAGE gel containing 1 mg/ml gelatin. The proteolytic activity was identified as clear bands on a blue background after Coomassie blue staining of the gel after protein separation by electrophoresis and incubation for 20 hrs following the method of [26]. The intensity of the bands was determined by densitometry and the activity was attributed to MMPs as it was readily inhibited by 5 mM EDTA solution during development.

# Gas Chromatography-Mass Spectrometry Analysis

Lipids were extracted and fatty acid methyl esters were formed by the sulphuric acid/anhydrous methanol method [27,28]. The fatty acid methyl esters were separated on a DB-23 column [(50% cyanopropyl)methyl polysiloxane, 0.25  $\mu$ m film thickness, 0.250 mm × 60 m], in a Shimadzu GCMS model QP5050 as described in [14]. Individual fatty acid methyl esters were identified by comparison with authentic standard retention times and mass spectra.

# **Experimental Analyses**

Immunohistochemistry images were captured and analysed using a CCD camera, an Olympus Optiphot microscope and Image ProPlus software. All labelling above background intensity was selected and a mask created for immunolabelling area calculations on calibrated images. Values were expressed in  $\mu$ m<sup>2</sup> ± SEM and are the mean of 6–10 random areas within each tumour section for each experimental animal, totalling 664 areas analysed for this experiment.

The microvessel density was calculated by counting 5 random high power fields (×40 objective) in each tumour section for each experimental animal, totalling 145 areas analysed for this experiment. Vessels of less than 14  $\mu$ m were considered as microvessels, following criteria from [29].

Tumour area was estimated by two parameters the first being area analysis after image capture of GFAP labelled tumour sections. The second method was by calculating the rostrocaudal extension of the tumour (length) from the number of cryosections obtained for immunohistochemical analysis multiplied by section thickness. Image analysis was performed using Sigma Scan and Image Pro Plus software.

The semi-quantitative analysis of RT-PCR products and quantitative analysis of Western blots was performed using a Molecular Dynamics Typhoon 8600 Variable Mode Imager and ImageQuant. All data are presented as the mean  $\pm$  SEM. Statistical differences were determined by one-way ANOVA with *post-hoc* Tukey's test and p < 0.05 was considered significant.

# Results

The infusion of 5 mM GLA in CSF caused a significant decrease in C6 tumour growth in comparison with CSF alone *in vivo* (Figure 1A), as previously reported at lower concentrations [7]. The average tumour area was reduced by 75  $\pm$  8.8% while the tumour length (rostrocaudal extension) was reduced by 38  $\pm$  9.7%. Tumour fatty acid composition was also altered by GLA treatment with significant increases in 18:3, n-6 and 22:5, n-6 content (Figure 1E).

After confirmation of the efficacy of treatment the expression of angiogenesis related proteins was examined by mRNA and/or protein expression analysis. The mRNA and protein expression of VEGF and its receptors Flt1 and Flk1 were compared in control CSF and 5 mM GLA treated animals. In Figure 1B, 1D the mRNA expression of VEGF was reduced by  $38 \pm 5.8\%$  in the presence of 5 mM GLA while the protein expression was reduced by  $71 \pm 16\%$ . The mRNA expression of Flt1 was reduced by  $77 \pm 16\%$  in the presence of 5 mM GLA while the protein expression was reduced by  $77 \pm 16\%$  in the presence of 5 mM GLA while the protein expression was reduced by  $57 \pm 5.8\%$  (Figure 1F, 1G). While GLA increased the mRNA expression of Flk1 by  $39 \pm 12\%$  its protein expression was unchanged in the GLA treated tumour (data not shown).



#### Figure I

Effect of 14-day osmotic pump infusion of 5 mM gamma-linolenic acid (GLA) or control cerebrospinal fluid (CON = CSF) on C6 glioma development *in* vivo. (A) Tumour size estimated by glial fibrillary acidic protein labeling and image analysis with ImageProPlus. Average tumour area (mm<sup>2</sup>) and length = rostral-caudal extension (mm) were plotted for CON (control CSF) and GLA (5 mM GLA + CSF) (n = 12), statistical significance, \* = p < 0.0001. Left side of graph presents area (CON A and GLA A) while right side of graph presents length (CON L and GLA L). (B and F) mRNA expression of VEGF and Flt-1 in CON and GLA-treated tumours, with GAPDH as an internal control (n = 10), statistical significance, \* = p < 0.001. (D and G) Immunohistochemical labeling for VEGF and Flt-1 CON and GLA-treated tumours, semi-quantitative analysis with ImageProPlus. (n = 9), statistical significance, \* = p < 0.01 (C and E) Fatty acid composition by gas chromatography-mass spectrometry of CON (C) and GLA (E) treated tumours (n = 11), statistical significance, \* = p < 0.0001. (H-J) Representative images of control (H), VEGF (I) and Flt-1 (J) immunohistochemical labeling (n = 9).

GLA infusion was associated with a decrease in MMP2 (35  $\pm$  6.8%) mRNA expression (Figure 2A). MMP9 mRNA was not expressed by the tumour and this was confirmed by negative staining with MMP9 antibody on cryosections and lack of activity in zymograms (data not shown). Due to the heterogeneous distribution of MMP2 in the tumour tissue immunohistochemical quantification was not possible. Zymography confirmed a significant decrease (32  $\pm$  8.5%) in proteolytic activity of MMP2 in the presence of GLA (Figure 2B). The presence of 5 mM GLA caused a significant decrease in both ERK1 (27  $\pm$  7.7%) and ERK2 (31  $\pm$  8.7%) protein expression (Figure 2C, 2E) and mRNA expression (data not shown).

In the knowledge that 5 mM GLA caused significant changes in mRNA expression and protein expression of important factors involved in the angiogenic process we further investigated these effects by measuring the microvessel density of treated and control tumours. The microvessel density of the GLA treated tumour was reduced by  $44 \pm 5.4\%$  versus the control tumour (Figure 2G).

GLA was found to alter the expression of several proteins involved in cell cycle control (Figure 3). pRb protein expression was decreased ( $62 \pm 18\%$ ) while E2F1 remained unchanged (Figure 3A, 3B). Cyclin D1 protein expression was increased by  $42 \pm 12\%$  in the presence of GLA (Figure 3C). The cyclin dependent kinase inhibitors p21 and p27 responded differently to GLA, p27 expression was increased ( $27 \pm 7.3\%$ ) while p21 remained unchanged (Figure 3D, 3E). C6 glioma cells did not express the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (data not shown) as previously reported [30]. The expression of p53 was increased ( $44 \pm 16\%$ ) by GLA (Figure 3F). Finally, the BrdU incorporation studies found a significant inhibition ( $32 \pm 11\%$ ) of BrdU incorporation into the tumour *in vivo* (Figure 3G).

# Discussion

Previous studies have shown that GLA is an effective inhibitor of glioma cell proliferation both *in vitro* and *in vivo* [6,7,14]. During *in vivo* studies infusion of 2 mM GLA at 1  $\mu$ l/hr for 7 days caused a marked inhibition (~50%) of tumour growth accompanied by apoptosis [7]. This finding stimulated our hypothesis that a longer period of infusion at higher concentrations may be more effective. The present study infused 5 mM GLA at 0.5  $\mu$ l/hr for 14 days and the tumour area was significantly reduced (75 ± 8.8%) in comparison with the CSF treated tumours and confirmed the efficacy of this treatment method in gliomas.

The presence of GLA caused inhibition of mRNA expression of VEGF, Flt1, ERK1/2 and MMP2 but not Flk1. Immunohistochemical quantification confirmed the

decrease in VEGF and Flt1 protein expression and found a lack of change in Flk1 protein content. ERK1 and ERK2 mRNA and protein expression was significantly decreased. The importance of VEGF and its receptors Flt1 and Flk1, along with ERK1/2 and MMP2 in glioma angiogenesis and the inhibitory effects of GLA on these proteins' expression suggested the possibility that angiogenesis could be modified in the GLA-treated tumours. After counting microvessel density (MVD) in both groups it was apparent that GLA had an inhibitory effect on vessel number causing a  $44 \pm 5.4\%$  reduction in MVD. These interactions are summarized in the scheme presented in Figure 3H. This in itself could be an important mechanism of tumour growth inhibition by reducing tumour nutrition and by reducing the potential for migration along blood vessels whose number is reduced by treatment.

While the role of Flk1 in endothelial proliferation is well known, the role of Flt1 is less well defined. Flt1 can be found at both the cell membrane and in soluble form in the extracellular matrix (ECM) where it is believed to influence the angiogenic process [31,32]. It has been suggested that Flt1 may protect VEGF from proteolytic degradation by binding to it in the ECM [33]. The decrease in Flt1 expression seen in the presence of GLA may reduce the degree of protection of VEGF from degradation in the ECM thereby compounding the effect of decreased VEGF expression. An autocrine loop has been described in neuroblastoma involving VEGF, Flt1 and ERK1/2 [34] and our current data suggest that GLA may interfere with this loop leading to inhibition of tumour cell proliferation and survival in C6 cells *in vivo*.

From the present study it may be suggested that the marked reduction in Flt1 and VEGF expression caused by GLA treatment could cause a reduction in angiogenesis as seen by reduced MVD most likely through reduced endothelial cell proliferation, although this was not quantified directly. The decrease in ERK1 and ERK2 expression may be involved in the decrease in VEGF and Flt1 expression in the GLA treated tumours. In addition, the decrease in ERK1 and ERK2 expression could be directly linked to decreased MMP2 expression and proteolytic activity in the GLA treated tumours. Recent studies have shown that ERK-specific inhibitors cause a decrease in the expression of MMP2 in breast cancer brain metastases [35]. In addition, previous studies have shown that the n-3 PUFA's 20:5 and 22:6 cause decreased pERK concomitant with decreased VEGF expression in HT29 colon cancer cells. These n-3 PUFA's also caused a reduction in HT29 tumour volume in vivo and the tumour microvessel density was reduced [36]. It is possible that GLA may affect C6 glioma cells in a similar manner although this remains to be confirmed.



### Figure 2

Effect of 14-day osmotic pump infusion of 5 mM gamma-linolenic acid (GLA) or control cerebrospinal fluid (CON = CSF) on protein expression and angiogenesis in the C6 glioma *in vivo*. (A) mRNA expression of MMP2 in CON and GLA-treated tumours, with GAPDH as an internal control (n = 10), statistical significance, \* = p < 0.001. (B) Zymographic detection of MMP2 proteolytic activity in CON and GLA-treated tumours (n = 9), statistical significance, \* = p < 0.004. Lanes I-4 CON, 5–9 GLA. (C and E) Western blot of ERK1 and ERK2 protein expression, with GAPDH as an internal control (n = 11), statistical significance, \* = p < 0.006. Lanes I-5 CON, 6–11 GLA. (D) Representative images of MMP2 immunohistochemical labeling (n = 9). (F and H) Haematoxylin and eosin stained sections of CON (F) and GLA (H) treated tumours. Note large number of blood vessels and tumour cells in the CON tumour in comparison with the GLA treated tumour. (G) Number of microvessels in CON and GLA-treated tumours (n = 9). Statistical significance, \* = p < 0.001.



#### Figure 3

Effect of 14-day osmotic pump infusion of 5 mM gamma-linolenic acid (GLA) or control cerebrospinal fluid (CON = CSF) on cell cycle control in the C6 glioma *in vivo*. (A) Western blot of pRb protein expression, statistical significance, \* = p < 0.009. (B) Western blot of E2F1 protein expression. (C) Western blot of cyclin D1 protein expression, statistical significance, \* = p < 0.008. (D) Western blot of p21 protein expression. (E) Western blot of p27 protein expression, statistical significance, \* = p < 0.005. (F) Western blot of p53 protein expression, statistical significance, \* = p < 0.026. For all Western blots GAPDH was used as an internal control and is presented below the protein bands of interest in A-F, (n = 11), Lanes 1–5 CON, 6–11 GLA. (G) Bromodeoxyuridine incorporation *in vivo*, representative image of labelled cells (n = 9), statistical significance, \* = p < 0.015. (H) Schematic presentation of changes found in GLA-treated tumours in comparison with control tumours and possible interactions among proteins based on current literature.

Together with the changes in angiogenesis seen in GLA treated tumours several important changes were found in cell cycle control. The combination of decreased pRb in the absence of functional p16 may cause the cell to lose adequate control over the pRb pathway which is reinforced by the increase in cyclin D1 expression. Increased p53 expression together with these changes in pRb and cyclin D1 can significantly increase cell apoptosis [37-39]. E2F1 expression remained unchanged, in contrast to previous findings in vitro, demonstrating the potential importance of the orthotopic tumour microenvironment on cell responses to GLA treatment [9]. The increase in p53 seen in the GLA treated tumour did not lead to altered p21 expression which could explain why pRb was not increased in this model. Instead GLA caused a significant increase in another cyclin-dependent kinase inhibitor, p27, causing a G1/S transition block and subsequently reducing S-phase. This was confirmed by a reduction in Sphase BrdU incorporation and was similar to the findings reported for C6 glioma cells in vitro where 150 µM GLA caused a 49% decrease in S-phase [8]. These interactions are summarized in the scheme presented in Figure 3H.

#### Conclusion

Overall the findings reported in the present study lend further support to the potential of GLA as an inhibitor of glioma cell proliferation *in vivo* and show it has direct effects upon cell cycle control and angiogenesis in this orthotopic model. Proteins related to angiogenesis which were altered by GLA treatment included VEGF, Flt1, ERK1, ERK2 and MMP2, while those related to cell cycle control altered by GLA treatment included Cyclin D1, pRb, p53 and p27. Combination therapy using drugs with other, complementary targets and GLA could lead to gains in treatment efficacy in this notoriously difficult to treat tumour.

#### **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

### **Authors' contributions**

JAM and MB made an equal contribution to the experimental work reported in this manuscript and as such should be considered as joint first authors. AC participated in the design, execution and analysis of the study and performed the surgical procedures.

#### Acknowledgements

This research was funded by the Brazilian research foundations FAPESP, CNPq and CAPES.

#### References

 Begin ME, Ells G, Das UN, Horrobin DF: Differential killing of human carcinoma cells supplemented with n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. J Natl Cancer Inst 1986, 77:1053-62.

- Colquhoun A, Curi R: Effects of saturated and polyunsaturated fatty acids on human tumour cell proliferation. Gen Pharmacol 1998, 30(2):191-194.
- Das UN, Prasad VV, Reddy DR: Local application of gamma-linolenic acid in the treatment of human gliomas. *Cancer Lett* 1995, 94:147-55.
- Bakshi A, Mukherjee D, Bakshi A, Banerji AK, Das UN: Gammalinolenic acid therapy of human gliomas. Nutrition 2003, 19:305-9.
- Das UN: Gamma-linolenic acid therapy of human glioma-a review of in vitro, in vivo, and clinical studies. Med Sci Monit 2007, 13(7):RA119-131.
- Leaver HA, Bell HS, Rizzo MT, Ironside JW, Gregor A, Wharton SB, Whittle IR: Antitumour and pro-apoptotic actions of highly unsaturated fatty acids in glioma. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 2002, 66:19-29.
- Leaver HA, Wharton SB, Bell HS, Leaver-Yap IM, Whittle IR: Highly unsaturated fatty acid induced tumour regression in glioma pharmacodynamics and bioavailability of gamma linolenic acid in an implantation glioma model: effects on tumour biomass, apoptosis and neuronal tissue histology. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 2002, 67:283-92.
- Leaver HA, Williams JR, Smith C, Whittle IR: Intracellular oxidation by human glioma cell populations: effect of arachidonic acid. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 2004, 70:449-53.
- Benadiba M, Miyake JA, Colquhoun A: Gamma-linolenic acid alters Ku80, E2FI and Bax Expression and induces micronucleus formation in C6 glioma cells in vitro. *IUBMB Life* 2009, 61:244-51.
- Leaver HA, Williams JR, Ironside JW, Miller EP, Gregor A, Su BH, Prescott RJ, Whittle IR: Dynamics of reactive oxygen intermediate production in human glioma: n-6. Essential fatty acid effects. Eur J Clin Invest 1999, 29:220-31.
- 11. Colquhoun Á, Schumacher RI: Gamma-linolenic acid and eicosapentaenoic acid induce modifications in mitochondrial metabolism, reactive oxygen species generation, lipid peroxidation and apoptosis in Walker 256 rat carcinosarcoma cells. Biochim Biophys Acta 2001, 1533:207-19.
- Colquhoun A, Schumacher RI: Modifications in mitochondrial metabolism and ultrastructure and their relationship to tumour growth inhibition by gamma-linolenic acid. Mol Cell Biochem 2001, 218:13-20.
- 13. Colquhoun A: Gamma-linolenic acid alters the composition of mitochondrial membrane subfractions, decreases outer mitochondrial membrane binding of hexokinase and alters carnitine palmitoyltransferase I properties in the Walker 256 rat tumour. *Biochim Biophys Acta* 2002, 1583:74-84.
- 14. Ramos KL, Colquhoun A: Protective role of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in the metabolic response of C6 rat glioma cells to polyunsaturated fatty acid exposure. *Glia* 2003, **43**:149-66.
- Jiang WG, Bryce RP, Horrobin DF, Mansel RE: Gamma-linolenic acid blocks cell cycle progression by regulating phosphorylation of p27kip1 and p57kip2 and their interactions with other cycle regulators in cancer cells. Int J Oncol 1998, 13:611-7.
- Yu Q, Shan Z, Ni K, Qian SY: LC/ESR/MS study of spin trapped carbon-centred radicals formed from in vitro lipoxygenasecatalysed peroxidation of gamma-linolenic acid. Free Radic Res 2008, 42:442-55.
- Farin A, Suzuki SO, Weiker M, Goldman JE, Bruce JN, Canoll P: Transplanted glioma cells migrate and proliferate on host brain vasculature: a dynamic analysis. *Glia* 2006, 53:799-808.
- Kaur B, Tan C, Brat DJ, Post DE, Van Meir EG: Genetic and hypoxic regulation of angiogenesis in gliomas. J Neurooncol 2004, 70:229-43.
- Lakka SS, Gondi CS, Rao JS: Proteases and glioma angiogenesis. Brain Pathol 2005, 15:327-41.
- 20. Takahashi M, Fukami S, Iwata N, Inoue K, Itohara S, Itoh H, Haraoka J, Saido T: In vivo glioma growth requires host-derived matrix metalloproteinase 2 for maintenance of angioarchitecture. *Pharmacol Res* 2002, **46**:155-63.
- Jiang WG, Bryce RP, Horrobin DF, Mansel RE: Regulation of tight junction permeability and occludin expression by polyunsaturated fatty acids. Biochem Biophys Res Commun 1998, 244:414-20.
- 22. Cai J, Jiang WG, Mansel RE: Inhibition of the expression of VEcadherin/catenin complex by gamma linolênico acid in

- 23. Tsuzuki T, Shibata A, Kawakami Y, Nakagawa K, Miyazawa T: Conjugated eicosapentaenoic acid inhibits vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis by suppressing the migration of human umbilical vein endothelial cells. J Nutr 2007, 137:641-6.
- Ribeiro G, Benadiba M, Colquhoun A, Silva DO: Diruthenium (II, III), complexes of ibuprofen, aspirin, naproxen and indomethacin non-steroidal anti-inflammatory drugs: Synthesis, characterization and their effects on tumor-cell proliferation. *Polyhedron* 2008, 27:1131-1137.
- Guo P, Hu B, Gu W, Xu L, Wang D, Huang HJ, Cavenee WK, Cheng SY: Platelet-derived growth factor-B enhances glioma angiogenesis by stimulating vascular endothelial growth factor expression in tumor endothelia and by promoting pericyte recruitment. Am J Pathol 2003, 162:1083-93.
- Hawkes SP, Li H, Taniguchi GT: Methods in Molecular Biology 151. Matrix Metalloproteinase Protocols 2001:399-410.
- Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J Biol Chem 1957, 226:497-509.
- Kitson G, Larsen BS, McEwen CN, editors: Gas chromatography and mass spectrometry: a practical guide. New York: Academic Press; 1996:337.
- Pistolesi S, Boldrini L, Gisfredi S, De leso K, Camacci T, Caniglia M, Lupi G, Leocata P, Basolo F, Pingitore R, Parenti G, Fontanini G: Angiogenesis in intracranial meningiomas: immunohistochemical and molecular study. Neuropathol Appl Neurobiol 2004, 30:118-25.
- Strauss BE, Fontes RB, Lotfi CF, Skorupa A, Bartol I, Cipolla-Neto J, Costanzi-Strauss E: Retroviral transfer of the p16INK4a cDNA inhibits C6 glioma formation in Wistar rats. Cancer Cell Int 2002, 2(1):2.
- 31. Ferrara N: Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy. Oncologist 2004, 9:2-10.
- Shibuya M: Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. J Biochem Mol Biol 2006, 39:469-78.
- Lamszus K, Ulbricht U, Matschke J, Brockmann MA, Fillbrandt R, Westphal M: Levels of soluble vascular endothelial growth factor (VEGF), receptor I in astrocytic tumors and its relation to malignancy, vascularity, and VEGF-A. Clin Cancer Res 2003, 9:1399-405.
- 34. Das B, Yeger H, Tsuchida R, Torkin R, Gee MF, Thorner PS, Shibuya M, Malkin D, Baruchel S: A hypoxia-driven vascular endothelial growth factor/Flt1 autocrine loop interacts with hypoxia-inducible factor-lalpha through mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway in neuroblastoma. Cancer Res 2005, 65:7267-75.
- 35. Mendes O, Kim HT, Lungu G, Stoica G: MMP2 role in breast cancer brain metastasis development and its regulation by TIMP2 and ERK1/2. *Clin Exp Metastasis* 2007, 24:341-51.
- 36. Calviello G, Di Nicuolo F, Gragnoli S, Piccioni E, Serini S, Maggiano N, Tringali G, Navarra P, Ranelletti FO, Palozza P: n-3 PUFAs reduce VEGF expression in human colon cancer cells modulating the COX-2/PGE2 induced ERK-1 and -2 and HIF-1alpha induction pathway. *Carcinogenesis* 2004, 25:2303-10.
- Maddika S, Ande SR, Panigrahi S, Paranjothy T, Weglarczyk K, Zuse A, Eshraghi M, Manda KD, Wiechec E, Los M: Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy. Drug Resist Updat 2007, 10:13-29.
- Godefroy N, Lemaire C, Mignotte B, Vayssière JL: p53 and Retinoblastoma protein (pRb):a complex network of interactions. Apoptosis 2006, 11:659-61.
- Burkhart DL, Sage J: Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. Nat Rev Cancer 2008, 8:671-82.



http://www.biomedcentral.com/info/publishing\_adv.asp

#### Review

# Fatty acids, eicosanoids and cancer

A. COLQUHOUN, J.A. MIYAKE, M. BENADIBA

Department of Cell and Developmental Biology, Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo, São Paulo - Brazil

ABSTRACT: Epidemiological studies have repeatedly provided evidence to link dietary fatty acid intake to cancer incidence in the human population. Studies have shown that many tumor cells are susceptible to the inhibitory effects of polyunsaturated fatty acids both in vitro and in animal models of cancer. The antitumor effects of polyunsaturated fatty acids are known to involve many facets of cellular metabolism including: (i) changes in membrane composition, (ii) lipid peroxidation and oxidative stress, (iii) production of eicosanoids, (iv) inhibition of cell cycle progression, (v) induction of apoptosis and (vi) alterations in intracellular signalling. The recent development of polyunsaturated fatty acid-drug conjugates provides new opportunities for cancer research involving polyunsaturated fatty acids and holds promise for the development of more effective cancer treatments in the future. (Nutritional Therapy & Metabolism 2009; 27: 00-00)

KEY WORDS: Fatty acids, Cancer, Glioma, Eicosanoids, Prostaglandins

### **INTRODUCTION**

Lipids, comprising fats, oils and waxes, can be subdivided into several groups including fatty acids, phospholipids, eicosanoids, glycolipids, triacylglycerols and sterols. While originally considered to be used by the body to store energy not required for immediate use, lipids are now known to play important structural and signalling roles in cell biology and biochemistry.

Fatty acids are composed of hydrocarbon chains of variable length with a methyl group at one end and a carboxyl group at the other end of the chain. The hydrocarbon chain can be formed by single or double bonds between carbon atoms and fatty acids are named according to the number of double bonds present within their structure as saturated (no double bond), monounsaturated (one double bond) or polyunsaturated (more than one double bond). The biological activity and metabolism of fatty acids is often determined by both the carbon chain length and the number of unsaturated bonds present within the chain. Unsaturated fatty acids are classified into several families depending on the position of the first double bond from the methyl end of the molecule, including the n-3, n-6, n-7 and n-9 fatty acids. The eicosanoids are composed of 20 carbons and can be subdivided into several groups including the prostaglandins, thromboxanes, leukotrienes, lipoxins, epoxy- and hydroxyfatty acids. The eicosanoids are biologically active often as potent signalling molecules with a short half life in

vivo. A summary of the n-3 and n-6 fatty acid metabolic pathways and the principal products derived from them is presented in Figure 1 (1, 2).

# DIETARY INTAKE OF FATTY ACIDS AND CANCER

Epidemiological studies have identified the possibility of links between the type of fat ingested in the diet in the long term and the incidence of several common cancers including breast, colon and prostate cancer (3, 4). The effects of diet on cancer incidence have been particularly apparent in populations with diets rich in fish oils in comparison with those rich in animal fat and red meat. The increased risk of cancer in populations consuming industrialized, western diets has been attributed to the large differences in the amount of saturated fatty acids and n-3 versus n-6 fatty acids in the diet (5). The increase in calories associated with high fat diets has also been proposed to predispose individuals to the development of cancer. This has led to studies where dietary restriction is reported to delay the incidence and growth of certain tumors, with marked differences in sensitivity depending on the phosphatidylinositol-3-kinase pathway activation status (6). However, it is important to note that the n-3 fatty acids alter the expression pattern of proteins involved in fatty acid oxidation and lipogenesis in many tissues and thereby alter the metabolic status in a manner quite different to that of high fat, typically saturated fat-


**Fig. 1 -** *n*-3 and *n*-6 fatty acid metabolic pathways.

Metabolic pathways of n-3 and n-6 fatty acids are presented as number of carbons:number of unsaturated bonds, e.g., 18:2 contains 18 carbons and 2 unsaturated bonds. Common dietary sources of important fatty acids are given in boxes alongside the fatty acid in question. Abbreviations are as follows: ALA, alphalinolenic acid; SDA, stearidonic acid; EPA, eicosapentaenoic acid; DPA, docosapentaenoic acid: DHA, docosahexaenoic acid; LA, linoleic acid; GLA, gamma-linolenic acid; DHGLA, dihomo-linolenic acid; AA, arachidonic acid; PGs, prostaglandins of the 1-series; PGs, prostaglandins of the 2-series; PGs, prostaglandins of the 3-series; TXs,, thromboxanes of the 2-series; TXs,, thromboxanes of the 3-series; LTs<sub>4</sub>, leukotrienes of the 4-series; LTs, leukotrienes of the 5-series; 13S-HODE, 13Shydroxyoctadecadienoic acid: HETrEs, hydroxyeicosatrienoic acids; HETEs, hydroxyeicosatetraenoic acids; HEPEs, hydroxveicosapentaenoic acids.

ty acid-rich, and linoleic acid-rich diets. This fact raises the question of whether the increased calories obtained from n-3 fatty acids would be stimulators or inhibitors of tumor development (7). Interestingly, the cancer incidence rate in populations with high n-3 intake has been found to change when the diet becomes more industrialized and the content of n-6 fatty acids increases to the detriment of the n-3 fatty acid content (3, 8).

Animal models have been studied in detail to identify correlations between dietary fat and the development of tumor models in the hope that this information will provide a better understanding of the complex relationship between human diet and cancer development. Many animal studies have identified a clear relationship between the fatty acid composition of the diet and tumor growth rates in vivo (9-11). One of the general findings is that the n-6 fatty acid linoleic acid (LA) has stimulatory effects on tumor growth in experimental animal models (11-13). One important study found that while LA supplementation of an essential fatty acid-deficient diet increased tumor growth in a mouse model, a similar supplementation with arachidonic acid (AA) had no significant effect (9). The presence of high concentrations of LA in the diet, usually obtained by dietary supplementation with corn oil, caused increases in plasma/serum LA concentration and also in AA concentration, a product of the elongation and desaturation of LA in vivo (13).

In n-3 fatty acid-supplemented animal models of tumor development opposite effects from the LA data have been reported, with fish oil being used as the main supplement in most of the early studies. Diets containing fish oil were found to significantly decrease hepatoma and breast tumor growth rates, while diets containing 10% MaxEPA, a fish oil concentrate with 18% eicosapentaenoic acid (EPA) and 12% docosahexaenoic acid (DHA), caused significant inhibition of the growth of mammary tumors in rats and mice (3, 13-16). Pure EPA and DHA have also been reported to inhibit both breast and colon cancer growth in animal studies and to inhibit tumor development in models of carcinogenesis in vivo (3, 17). Metastatic spread of breast cancer has been reported to decrease in the presence of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and increase in the presence of n-6 PUFAs (11, 18).

Although the general view is that n-6 fatty acids tend to stimulate tumor growth, gamma-linolenic acid (GLA) does not share these properties despite belonging to the n-6 family. GLA has been reported to inhibit tumor cell growth in vitro and in vivo in breast, pancreatic and bladder cancer models (19-23). Tumor growth in the Walker 256 rat carcinosarcoma model was inhibited in a dose-dependent manner by increasing concentrations of GLA supplement in the diet (24, 25). In the C6 rat glioma model, GLA was reported to inhibit tumor growth and induce cell death with increasing efficacy as higher concentrations of GLA were introduced into the tumor by osmotic pump infusion (26, 27).

Preliminary studies in patients with gliomas have reported efficacy of GLA in the inhibition of disease recurrence after surgical resection of the tumor. These studies used a dosage of 1 mg per day for up to 20 days (28-31). The use of both n-3 and n-6 PUFAs has been tested in cancer patients as an adjuvant therapy with positive results in several cases (32-36). However, the efficacy of PUFA treatment as an option for human cancer is still hotly debated in the literature and is the subject of several current clinical trials recently reviewed by Berguin (36). Carefully controlled large-scale clinical trials will be essential to prove or disprove the potential of PUFAs for the treatment and control of tumor growth in humans. Notwithstanding, the use of animal models continues to provide important new insights into the mechanisms by which PUFAs may act on tumor cells, which are fundamental to the understanding of how PUFAs may be used in the human disease setting in the future.

## IN VIVO PRODUCTION OF EICOSANOIDS AND CANCER

Certain members of the n-3 and n-6 families of fatty acids can be metabolized into eicosanoids through the concerted action of several enzyme groups. The best known metabolic pathway is the metabolism of AA to the prostaglandins (PGs) and thromboxanes (TXs) via the consecutive action of the prostaglandin  $G_2/H_2$  synthase's cyclooxygenase (COX) and hydroperoxidase (HOX) activities, producing first prostaglandin  $G_2$  (PGG<sub>2</sub>) and then PGH<sub>2</sub>. This is followed by the activity of specific PG or TX synthases to produce the PGs and TXs (2, 37, 38). The type of prostanoid produced by a cell therefore depends on the expression profile of the synthases within the cell.

In cancer tissues one of the most prevalent PGs is that of the E series,  $PGE_2$ , and its production is accompanied by overexpression of the prostaglandin  $G_2/H_2$  synthase-2, more commonly known as cyclooxygenase COX-2 (39-42). While the COX-1 enzyme is widely distributed and constitutively expressed, the COX-2 enzyme is found in only a few tissues under normal conditions but is rapidly expressed in response to mitogens and cytokines during inflammation and cancer.

Competition exists between the substrates of the COX enzymes leading to inhibition of AA metabolism to 2-series PGs (43, 44). Both GLA (n-6) and EPA (n-3) can cause this inhibitory effect leading to increased production of 1-series and 3-series PGs, respectively, both of which tend to have a reduced proinflammatory effect in comparison with that of PGE<sub>2</sub>. In many dietary intervention studies the presence of EPA is reported to significantly reduce the production of PGE, by the tumor, concomitant with reduced tumor growth (3, 43). In addition to PGs, AA can be metabolized to leukotrienes, lipoxins, epoxy- and hydroxy-fatty acids via the action of enzymes including the lipoxygenases (LOXs) and cytochrome P450 epoxygenases or through free radical oxidation (45). Several of these products have been implicated in the progression and stimulation of tumor cell growth both in vitro and in vivo. The product of LA metabolism by the enzyme 15-LOX-1, 13S-hydroxyoctadecadienoic acid (13S-HODE), has been associated with increased rates of tumor development in rat hepatomas and human breast cancer xenografts in nude mice, with 13S-HODE production proportional to the LA uptake by the rat hepatomas (12, 13, 46, 47). Dietary supplementation with EPA caused a dose-dependent inhibition of both LA uptake and 13S-HODE production by rat hepatomas and a significant reduction in tumor growth rate. This effect may be attributed to the competition of EPA for 15-LOX-1, producing 15S-hydroxyeicosapentaenoic acid (15S-HEPE) and consequently reducing 13S-HO-DE production (48).

The potential to interfere with proinflammatory eicosanoid production is an important additional factor involved in the effects of PUFAs in both inflammation and cancer (49, 50). By reducing the production of stimulatory eicosanoids such as  $PGE_2$ , the tumor cells will be exposed to less autocrine/paracrine signalling to stimulate cell proliferation. In addition, the reduced production of proinflammatory eicosanoids can markedly inhibit the process of angiogenesis within the tumor, thus further contributing to reduced tumor progression in vivo. The n-3 PUFAs EPA and DHA may also interfere with tumor progression through the production of the lipid me-

diators derived from them, the resolvins and protectins (51). These mediators can function as resolving factors acting upon the inflammatory cells in the tumor stroma and may thus reduce the chronic inflammatory status so often associated with tumors (52,53).

In pancreatic cancer, the loss of 15-LOX-2 expression has been implicated in tumor development and has been proposed as a functional prostate tumor suppressor gene (54). Importantly, the exposure of tumor cells to the 15-LOX-2 product, 15S-hydroxyeicosatetraenoic acid (15S-HETE), in increasing concentrations leads to a dose-dependent increase in cell death (54, 55). The products of 15-LOX activity upon DHGLA and EPA, 15S-hydroxyeicosatrienoic acid (15S-HETE) and 15S-HEPE, respectively, cause a dose-dependent inhibition of PGE<sub>2</sub> and 5S-HETE production in prostate cancer cells. In addition, they cause a significant inhibition of DNA synthesis, with the GLA-derived 15S-HETE having a more potent effect on tumor proliferation in vitro (55,56).

# IMPORTANCE OF APOPTOSIS INDUCTION BY FATTY ACIDS AND EICOSANOIDS IN CANCER

The effects of fatty acids and their eicosanoid products upon tumor cells have been attributed to the induction of programmed cell death by apoptosis. The induction of apoptosis by both n-3 and n-6 PUFAs has been extensively studied in many different tumor types both in vitro and in vivo and was recently reviewed (57). Many studies have investigated apoptosis in breast and colon cancer in an attempt to identify the mechanisms behind PUFA-induced cell death (50, 58, 59). Apoptosis can be induced by n-3 PUFAs through both the extrinsic (Fas) and the intrinsic (mitochondrial) molecular pathways, with the subsequent activation of caspases and cleavage of their specific substrates resulting in cell death in vitro (21, 22, 57, 60, 61). Similar findings have been reported in animal models where the animals were treated with n-3 PUFAs in the form of fish oil, purified EPA or DHA supplements, and where hepatoma, colon and breast tumors exhibited greatly increased apoptotic indices in the presence of n-3 PUFAs (13, 50, 62, 63).

As previously mentioned, the n-6 fatty acid GLA is an inhibitor of glioma cell growth in vitro and in vivo (26, 27, 64, 65). GLA caused a significant increase in apoptosis in glioma cells when grown as a monolayer or as spheroids in vitro and also when implanted as an orthotopic model (C6 cells) in the rat brain (26, 27, 66-68). The presence of GLA in vitro has recently been reported to cause a decrease in the expression of E2F1 by C6 glioma cells and an increase in micronucleus formation (69). E2F1 is directly involved in the control of cell cycle progression from G1 to S-phase and is also involved in controlling the balance between cell proliferation and cell death. In vivo studies in the C6 glioma model in the rat brain have also found GLA to induce increased cyclin D1, p27 and p53 expression and decreased pRb expression, resulting in decreased tumor growth together with increased apoptosis (27).

GLA also induces changes in mitochondrial metabolism and membrane potential in vitro and mitochondrial membrane fatty acid composition and ultrastructure in vivo in the Walker 256 rat carcinosarcoma (24, 25, 60). The presence of GLA is also capable of inhibiting mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I activity and subsequently fatty acid oxidation, leading to increased intracellular fatty acid and fatty acyl CoA concentrations which may be related to the increased apoptotic rate found in certain tumor cells (24, 25, 70, 71). Further studies are warranted to identify in greater detail the differences in tumor cell susceptibility to PUFA-induced apoptosis and also to identify the mechanisms behind the actions of PUFA-derived eicosanoids.

### FATTY ACID-DRUG CONJUGATES, CHEMOTHER-APY AND CANCER

PUFAs can improve tumor cell responses to certain chemotherapeutic drugs including anthracyclines such as doxorubicin. Drugs which cause oxidative stress within the tumor have been particularly effective in combination studies with PUFAs (72, 73). Enhanced sensitivity to chemotherapy and radiotherapy in the presence of PUFAs such as GLA, EPA and DHA has been reported in common cancers including breast, colon and bladder tumors in both animal and human studies (32-35, 65, 74-77).

The fact that PUFAs inhibit tumor cell proliferation, induce apoptosis, and improve sensitivity to chemotherapy has led to the development of compounds containing a fatty acid conjugated with established drugs including paclitaxel and doxorubicin. Since many tumor cells avidly incorporate PUFAs into their membranes, PUFA-drug conjugates may also increase the efficacy of drug uptake into the tumor cells. Thus conjugating the two may further improve therapeutic outcome in vivo (78).

The PUFA conjugate Taxoprexin<sup>®</sup> contains DHA conjugated to the C2'-position of the paclitaxel structure and has been or is being used in phase II trials in several different tumor types including colon, esophageal and non-small cell lung cancer (79-83). DHA has also been successfully conjugated with doxorubicin, 10-hydroxycamptothecin and propofol as well as several second-generation taxoid structures (84-87). Both LA and alpha-linolenic acid (ALA) have also been conjugated to second-generation taxoids, while EPA has been

conjugated to propofol and ALA has been conjugated to doxorubicin (85, 87, 88). Each of these conjugates has shown antitumor properties, which demonstrates that not only DHA has potential as a fatty acid-drug conjugate.

### CONCLUSIONS

It is well established that dietary fatty acid composition plays a role in the carcinogenic process and in tumor proliferation after cellular transformation. The inhibitory effects of PUFAs upon tumor development have been clearly demonstrated and the mechanisms behind these effects have been partially identified to involve changes in membrane composition, lipid peroxidation and oxidative stress, production of eicosanoids, inhibition of cell cycle progression and induction of apoptosis, to name a few. However, further research is needed to identify the critical points at which PUFAs act in order to improve their efficacy in specific tumor types. Further information is required in the field of PUFA dosage optimization for each tumor type and which form of PUFA (fatty acid salt, ethyl ester, etc.) would be the most effective. In addition, large scale clinical trials are also needed in order to confirm or refute the efficacy of PUFAs in the treatment of human tumors. The potential advances that could be made in the treatment of tumors with fatty acid-drug conjugates also requires further exploration and holds great promise. Despite many years of research into fatty acids, much remains to be discovered about the interactions among PUFAs, tumor cells and the tumor microenvironment and provides a challenge to all those involved in this exciting field.

#### Abbreviations used:

LA = linoleic acidAA = arachidonic acidEPA = eicosapentaenoic acidDHA = docosahexaenoic acid PUFA = polyunsaturated fatty acid ALA = alpha-linolenic acidGLA = gamma-linolenic acid PG = prostaglandinTX = thromboxaneCOX = cyclooxygenaseHOX = hydroperoxidaseLOX = lipoxygenase 13S-HODE = 13S-hydroxyoctadecadienoic acid 15S-HEPE = 15S-hydroxyeicosapentaenoic acid 15S-HETE = 15S-hydroxyeicosatetraenoic acid 15S-HETrE = 15S-hydroxyeicosatrienoic acid

Note: This review has not cited exhaustively the many excellent papers published in this field and with this in mind the authors have included references to important reviews throughout the manuscript.

**Conflict of interest:** none declared **Financial support:** FAPESP, CAPES, CNPq

Address for correspondence: A. Colquhoun Department of Cell and Developmental Biology Biomedical Sciences Institute University of São Paulo São Paulo – Brazil e-mail: alison@usp.br

### REFERENCES

- Sprecher H. Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. Biochim Biophys Acta 2000; 1486: 219-31.
- Smith WL. Nutritionally essential fatty acids and biologically indispensable cyclooxygenases. Trends Biochem Sci 2008; 33: 27-37.
- Rose DP, Connolly JM. Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. Pharmacol Ther 1999; 83: 217-44.
- Nkondjock A, Shatenstein B, Maisonneuve P, Ghadirian P. Specific fatty acids and human colorectal cancer: an overview. Cancer Detect Prev 2003; 27: 55-66.
- Simopoulos AP. The Mediterranean diets: What is so special about the diet of Greece? The scientific evidence. J Nutr 2001; 131 (11 Suppl): 3065S-73S.

- Kalaany NY, Sabatini DM. Tumours with PI3K activation are resistant to dietary restriction. Nature 2009; 458: 725-31.
- Buckley JD, Howe PR. Anti-obesity effects of long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids. Obes Rev 2009 May 12 [Epub ahead of print].
- 8. Ziegler RG, Hoover RN, Pike MC, et al. Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women. J Natl Cancer Inst 1993; 85: 1819-27.
- 9. Hillyard LA, Abraham S. Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on growth of mammary adenocarcinomas in mice and rats. Cancer Res 1979; 39: 4430-7.
- Abraham S, Hillyard LA. Effect of dietary 18-carbon fatty acids on growth of transplantable mammary adenocarcinomas in mice. J Natl Cancer Inst 1983; 71: 601-5.

- 11. Welsch CW. Relationship between dietary fat and experimental mammary tumorigenesis: a review and critique. Cancer Res 1992; 52 (7 Suppl): 2040s-8s.
- Sauer LA, Dauchy RT, Blask DE. Mechanism for the antitumor and anticachectic effects of n-3 fatty acids. Cancer Res 2000; 60: 5289-95.
- 13. Sauer LA, Blask DE, Dauchy RT. Dietary factors and growth and metabolism in experimental tumors. J Nutr Biochem 2007; 18: 637-49.
- 14. Rose DP, Connolly JM. Effects of dietary omega-3 fatty acids on human breast cancer growth and metastases in nude mice. J Natl Cancer Inst 1993; 85: 1743-7.
- Cohen LA, Chen-Backlund JY, Sepkovic DW, Sugie S. Effect of varying proportions of dietary menhaden and corn oil on experimental rat mammary tumor promotion. Lipids 1993; 28: 449-56.
- Gonzalez MJ, Schemmel RA, Dugan L Jr, Gray JI, Welsch CW. Dietary fish oil inhibits human breast carcinoma growth: a function of increased lipid peroxidation. Lipids 1993; 28: 827-32.
- Chapkin RS, McMurray DN, Lupton JR. Colon cancer, fatty acids and anti-inflammatory compounds. Curr Opin Gastroenterol 2007; 23: 48-54.
- Rose DP, Connolly JM, Liu XH. Fatty acid regulation of breast cancer cell growth and invasion. Adv Exp Med Biol 1997; 422: 47-55.
- Bégin ME, Ells G, Das UN, Horrobin DF. Differential killing of human carcinoma cells supplemented with n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. J Natl Cancer Inst 1986; 77: 1053-62.
- Bégin ME, Ells G, Horrobin DF. Polyunsaturated fatty acid-induced cytotoxicity against tumor cells and its relationship to lipid peroxidation. J Natl Cancer Inst 1988; 80: 188-94.
- Lai PB, Ross JA, Fearon KC, Anderson JD, Carter DC. Cell cycle arrest and induction of apoptosis in pancreatic cancer cells exposed to eicosapentaenoic acid in vitro. Br J Cancer 1996; 74: 1375-83.
- 22. Hawkins RA, Sangster K, Arends MJ. Apoptotic death of pancreatic cancer cells induced by polyunsaturated fatty acids varies with double bond number and involves an oxidative mechanism. J Pathol 1998; 185: 61-70.
- 23. Hrelia S, Pession A, Buda R, et al. Concentrationand time-dependent effects of gamma-linolenic acid supplementation to tumor cells in culture. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 1999; 60: 235-41.
- Colquhoun A, Schumacher RI. Modifications in mitochondrial metabolism and ultrastructure and their relationship to tumour growth inhibition by gammalinolenic acid. Mol Cell Biochem 2001; 218: 13-20.
- 25. Colquhoun A. Gamma-linolenic acid alters the composition of mitochondrial membrane subfractions, decreases outer mitochondrial membrane binding of hexokinase and alters carnitine palmitoyltransferase I properties in the Walker 256 rat tumour. Biochim Biophys Acta 2002; 1583: 74-84.

- 26. Leaver HA, Wharton SB, Bell HS, Leaver-Yap IM, Whittle IR. Highly unsaturated fatty acid induced tumour regression in glioma pharmacodynamics and bioavailability of gamma linolenic acid in an implantation glioma model: effects on tumour biomass, apoptosis and neuronal tissue histology. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 2002; 67: 283-92.
- Miyake JA, Benadiba M, Colquhoun A. Gamma-linolenic acid inhibits both tumour cell cycle progression and angiogenesis in the orthotopic C6 glioma model through changes in VEGF, Flt1, ERK1/2, MMP2, cyclin D1, pRb, p53 and p27 protein expression. Lipids Health Dis 2009; 8: 8.
- Das UN, Prasad VV, Reddy DR. Local application of gamma-linolenic acid in the treatment of human gliomas. Cancer Lett 1995; 94: 147-55.
- 29. Bakshi A, Mukherjee D, Bakshi A, Banerji AK, Das UN. Gamma-linolenic acid therapy of human gliomas. Nutrition 2003; 19: 305-9. Comment on: Nutrition 2003; 19: 386-8.
- Das UN. From bench to the clinic: gamma-linolenic acid therapy of human gliomas. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 2004; 70: 539-52.
- Das UN. Gamma-linolenic acid therapy of human gliomaa review of in vitro, in vivo, and clinical studies. Med Sci Monit 2007; 13: RA119-31.
- Kenny FS, Pinder SE, Ellis IO, et al. Gamma linolenic acid with tamoxifen as primary therapy in breast cancer. Int J Cancer 2000; 85: 643-8.
- Harris NM, Crook TJ, Dyer JP, et al. Intravesical meglumine gamma-linolenic acid in superficial bladder cancer: an efficacy study. Eur Urol 2002; 42: 39-42.
- 34. Harris NM, Anderson WR, Lwaleed BA, Cooper AJ, Birch BR, Solomon LZ. Epirubicin and meglumine gamma-linolenic acid: a logical choice of combination therapy for patients with superficial bladder carcinoma. Cancer 2003; 97: 71-8.
- 35. Mackie SJ, Sharma DM, Cooper AJ, Harris NM, Lwaleed BA. Meglumine Eicosapentaenoic acid (MeEPA) a new soluble omega-3 fatty acid formulation: in vitro bladder cancer cytotoxicity tests in combination with epirubicin and mitomycin. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 2006; 75: 367-73.
- Berquin IM, Edwards IJ, Chen YQ. Multi-targeted therapy of cancer by omega-3 fatty acids. Cancer Lett 2008; 269: 363-77.
- FitzGerald GA. COX-2 and beyond: Approaches to prostaglandin inhibition in human disease. Nat Rev Drug Discov 2003; 2: 879-90.
- Masoodi M, Nicolaou A. Lipidomic analysis of twenty-seven prostanoids and isoprostanes by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 2006; 20: 3023-9.
- Romano M, Claria J. Cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase converging functions on cell proliferation and tumor angiogenesis: implications for cancer therapy.

#### Colquhoun et al

FASEB J 2003; 17: 1986-95.

- Nathoo N, Barnett GH, Golubic M. The eicosanoid cascade: possible role in gliomas and meningiomas. J Clin Pathol 2004; 57: 6-13.
- Fürstenberger G, Krieg P, Müller-Decker K, Habenicht AJ. What are cyclooxygenases and lipoxygenases doing in the driver's seat of carcinogenesis? Int J Cancer 2006; 119: 2247-54.
- 42. Panagopoulos AT, Lancellotti CL, Veiga JC, de Aguiar PH, Colquhoun A. Expression of cell adhesion proteins and proteins related to angiogenesis and fatty acid metabolism in benign, atypical, and anaplastic meningiomas. J Neurooncol 2008; 89: 73-87.
- 43. Dommels YE, Haring MM, Keestra NG, Alink GM, van Bladeren PJ, van Ommen B. The role of cyclooxygenase in n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acid mediated effects on cell proliferation, PGE(2) synthesis and cytotoxicity in human colorectal carcinoma cell lines. Carcinogenesis 2003; 24: 385-92.
- 44. Schmitz G, Ecker J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. Prog Lipid Res 2008; 47: 147-55.
- 45. Masoodi M, Mir AA, Petasis NA, Serhan CN, Nicolaou A. Simultaneous lipidomic analysis of three families of bioactive lipid mediators leukotrienes, resolvins, protectins and related hydroxy-fatty acids by liquid chromatography/ electrospray ionisation tandem mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 2008; 22: 75-83.
- 46. Sauer LA, Dauchy RT, Blask DE. Dietary linoleic acid intake controls the arterial blood plasma concentration and the rates of growth and linoleic acid uptake and metabolism in hepatoma 7288CTC in Buffalo rats. J Nutr 1997; 127: 1412-21.
- Sauer LA, Dauchy RT, Blask DE, Armstrong BJ, Scalici S. 13-Hydroxyoctadecadienoic acid is the mitogenic signal for linoleic acid-dependent growth in rat hepatoma 7288CTC in vivo. Cancer Res 1999; 59: 4688-92.
- 48. Kelavkar UP, Hutzley J, Dhir R, Kim P, Allen KG, McHugh K. Prostate tumor growth and recurrence can be modulated by the omega-6: omega-3 ratio in diet: athymic mouse xenograft model simulating radical prostatectomy. Neoplasia 2006; 8: 112-24.
- Calder PC. Immunomodulation by omega-3 fatty acids. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 2007; 77: 327-35.
- Chapkin RS, Seo J, McMurray DN, Lupton JR. Mechanisms by which docosahexaenoic acid and related fatty acids reduce colon cancer risk and inflammatory disorders of the intestine. Chem Phys Lipids 2008; 153: 14-23.
- 51. Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. Nat Rev Immunol 2008; 8: 349-61.
- Schäfer M, Werner S. Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited. Nat Rev Mol Cell Biol 2008; 9: 628-38.
- 53. Calder PC. Polyunsaturated fatty acids, inflammatory

processes and inflammatory bowel diseases. Mol Nutr Food Res 2008; 52: 885-97.

- 54. Tang DG, Bhatia B, Tang S, Schneider-Broussard R. 15-lipoxygenase 2 (15-LOX2) is a functional tumor suppressor that regulates human prostate epithelial cell differentiation, senescence, and growth (size). Prostaglandins Other Lipid Mediat 2007; 82: 135-46.
- 55. Vang K, Ziboh VA. 15-lipoxygenase metabolites of gamma-linolenic acid/eicosapentaenoic acid suppress growth and arachidonic acid metabolism in human prostatic adenocarcinoma cells: possible implications of dietary fatty acids. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 2005; 72: 363-72.
- 56. Pham H, Vang K, Ziboh VA. Dietary gamma-linolenate attenuates tumor growth in a rodent model of prostatic adenocarcinoma via suppression of elevated generation of PGE(2) and 5S-HETE. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 2006; 74: 271-82.
- 57. Serini S, Piccioni E, Merendino N, Calviello G. Dietary polyunsaturated fatty acids as inducers of apoptosis: implications for cancer. Apoptosis 2009; 14: 135-52.
- Jiang WG, Bryce RP, Horrobin DF. Essential fatty acids: molecular and cellular basis of their anti-cancer action and clinical implications. Crit Rev Oncol Hematol 1998; 27: 179-209.
- 59. Dupertuis YM, Meguid MM, Pichard C. Colon cancer therapy: new perspectives of nutritional manipulations using polyunsaturated fatty acids. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2007; 10: 427-32.
- 60. Colquhoun A, Schumacher RI. gamma-Linolenic acid and eicosapentaenoic acid induce modifications in mitochondrial metabolism, reactive oxygen species generation, lipid peroxidation and apoptosis in Walker 256 rat carcinosarcoma cells. Biochim Biophys Acta 2001; 1533: 207-19.
- Colquhoun A. Mechanisms of action of eicosapentaenoic acid in bladder cancer cells in vitro: alterations in mitochondrial metabolism, reactive oxygen species generation and apoptosis induction. J Urol 2009; 181: 1885-93.
- 62. Calviello G, Palozza P, Piccioni E, et al. Dietary supplementation with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid inhibits growth of Morris hepatocarcinoma 3924A in rats: effects on proliferation and apoptosis. Int J Cancer 1998; 75: 699-705.
- 63. Colquhoun A, Ramos KL, Schumacher RI. Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid effects on tumour mitochondrial metabolism, acyl CoA metabolism and cell proliferation. Cell Biochem Funct 2001; 19: 97-105.
- 64. Vartak S, McCaw R, Davis CS, Robbins ME, Spector AA. Gamma-linolenic acid (GLA) is cytotoxic to 36B10 malignant rat astrocytoma cells but not to 'normal' rat astrocytes. Br J Cancer 1998; 77: 1612-20.
- 65. Vartak S, Robbins ME, Spector AA. The selective cytotoxicity of gamma-linolenic acid (GLA) is associated

with increased oxidative stress. Adv Exp Med Biol 1999; 469: 493-8.

- 66. Bell HS, Wharton SB, Leaver HA, Whittle IR. Effects of N-6 essential fatty acids on glioma invasion and growth: experimental studies with glioma spheroids in collagen gels. J Neurosurg 1999; 91: 989-96.
- Leaver HA, Williams JR, Ironside JW, et al. Dynamics of reactive oxygen intermediate production in human glioma: n-6 essential fatty acid effects. Eur J Clin Invest 1999; 29: 220-31. Comment in: Eur J Clin Invest 1999; 29: 185-8.
- 68. Ramos KL, Colquhoun A. Protective role of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in the metabolic response of C6 rat glioma cells to polyunsaturated fatty acid exposure. Glia 2003; 43: 149-66.
- Benadiba M, Miyake JA, Colquhoun A. Gamma-linolenic acid alters Ku80, E2F1, and bax expression and induces micronucleus formation in C6 glioma cells in vitro. IUBMB Life 2009; 61: 244-51.
- Colquhoun A, de Mello FE, Curi R. Regulation of tumour cell fatty acid oxidation by n-6 polyunsaturated fatty acids. Biochem Mol Biol Int 1998; 44: 143-50.
- Colquhoun A. Induction of apoptosis by polyunsaturated fatty acids and its relationship to fatty acid inhibition of carnitine palmitoyltransferase I activity in Hep2 cells. Biochem Mol Biol Int 1998; 45: 331-6.
- Pardini RS. Nutritional intervention with omega-3 fatty acids enhances tumor response to anti-neoplastic agents. Chem Biol Interact 2006; 162: 89-105.
- Biondo PD, Brindley DN, Sawyer MB, Field CJ. The potential for treatment with dietary long-chain polyunsaturated n-3 fatty acids during chemotherapy. J Nutr Biochem 2008; 19: 787-96.
- 74. Madhavi N, Das UN. Effect of n-6 and n-3 fatty acids on the survival of vincristine sensitive and resistant human cervical carcinoma cells in vitro. Cancer Lett 1994 29; 84: 31-41.
- 75. Das UN, Madhavi N, Sravan Kumar G, Padma M, Sangeetha P. Can tumour cell drug resistance be reversed by essential fatty acids and their metabolites? Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 1998; 58: 39-54.
- 76. Germain E, Chajès V, Cognault S, Lhuillery C, Bougnoux P. Enhancement of doxorubicin cytotoxicity by polyunsaturated fatty acids in the human breast tumor cell line MDA-MB-231: relationship to lipid peroxidation. Int J Cancer 1998; 75: 578-83.
- 77. Vibet S, Goupille C, Bougnoux P, Steghens JP, Goré J, Mahéo K. Sensitization by docosahexaenoic acid (DHA) of breast cancer cells to anthracyclines through loss of glutathione peroxidase (GPx1) response. Free Radic Biol Med 2008; 44: 1483-91.

- Jaracz S, Chen J, Kuznetsova LV, Ojima I. Recent advances in tumor-targeting anticancer drug conjugates. Bioorg Med Chem 2005; 13: 5043-54.
- 79. Bradley MO, Swindell CS, Anthony FH, et al. Tumor targeting by conjugation of DHA to paclitaxel. J Control Release 2001; 74: 233-6.
- 80. Wolff AC, Donehower RC, Carducci MK, et al. Phase I study of docosahexaenoic acid-paclitaxel: a taxane-fatty acid conjugate with a unique pharmacology and toxicity profile. Clin Cancer Res 2003; 9: 3589-97.
- Harries M, O'Donnell A, Scurr M, et al. Phase I/II study of DHA-paclitaxel in combination with carboplatin in patients with advanced malignant solid tumours. Br J Cancer 2004; 91: 1651-5.
- 82. Jones RJ, Hawkins RE, Eatock MM, et al. A phase II open-label study of DHA-paclitaxel (Taxoprexin) by 2-h intravenous infusion in previously untreated patients with locally advanced or metastatic gastric or oesophageal adenocarcinoma. Cancer Chemother Pharmacol 2008; 61: 435-41.
- 83. Fracasso PM, Picus J, Wildi JD, et al. Phase 1 and pharmacokinetic study of weekly docosahexaenoic acid-paclitaxel, Taxoprexin, in resistant solid tumor malignancies. Cancer Chemother Pharmacol 2009; 63: 451-8.
- 84. Wang Y, Li L, Jiang W, Larrick JW. Synthesis and evaluation of a DHA and 10-hydroxycamptothecin conjugate. Bioorg Med Chem 2005; 13: 5592-9.
- Siddiqui RA, Zerouga M, Wu M, et al. Anticancer properties of propofol-docosahexaenoate and propofoleicosapentaenoate on breast cancer cells. Breast Cancer Res 2005; 7: R645-54.
- Wang Y, Li L, Jiang W, Yang Z, Zhang Z. Synthesis and preliminary antitumor activity evaluation of a DHA and doxorubicin conjugate. Bioorg Med Chem Lett 2006; 16: 2974-7.
- 87. Kuznetsova L, Chen J, Sun L, et al. Syntheses and evaluation of novel fatty acid-second-generation taxoid conjugates as promising anticancer agents. Bioorg Med Chem Lett 2006; 16: 974-7
- Huan ML, Zhou SY, Teng ZH, et al. Conjugation with alpha-linolenic acid improves cancer cell uptake and cytotoxicity of doxorubicin. Bioorg Med Chem Lett 2009; 19: 2579-84.

Received: Revised: Accepted: