RENATA NASCIMENTO GOMES

ANÁLISE DO PAPEL DA PROSTAGLANDINA E₂ NA PROLIFERAÇÃO,
MIGRAÇÃO E APOPTOSE NA LINHAGEM DE GLIOMA HUMANO T98G E O
EFEITO DO ÁCIDO GAMA - LINOLÊNICO E IBUPROFENO SOBRE ESTE
PROSTANÓIDE

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós - Graduação em
Biologia Celular e Tecidual do
Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

São Paulo
2011

RENATA NASCIMENTO GOMES

ANÁLISE DO PAPEL DA PROSTAGLANDINA E₂ NA PROLIFERAÇÃO,
MIGRAÇÃO E APOPTOSE NA LINHAGEM DE GLIOMA HUMANO T98G E O
EFEITO DO ÁCIDO GAMA - LINOLÊNICO E IBUPROFENO SOBRE ESTE
PROSTANÓIDE

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós - Graduação em
Biologia Celular e Tecidual do
Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

Área de Concentração: Biologia
Celular e Tecidual.

Orientador: Profa. Dra. Alison
Colquhoun.

Versão Original

São Paulo
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Gomes, Renata Nascimento.

Análise do papel da prostaglandina E₂ na proliferação, migração e apoptose na linhagem de glioma humano T98G e os efeitos do ácido gama linolênico e Ibuprofeno sobre este prostanóide. / Renata Nascimento Gomes. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Alison Colquhoun.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Ácidos graxos e tumores cerebrais.

Versão do título para o inglês: Analysis of the role of prostaglandin E₂ on proliferation, migration and apoptosis in the T98G human glioma cell line and the effects of gamma - linolenic acid and Ibuprofen on this prostanoid.

Descritores: 1. Glioma 2. Prostaglandina 3. T98G 4. Migração 5. Apoptose 6. Proliferação I. Colquhoun, Alison II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB0115/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Renata Nascimento Gomes.

Título da Dissertação: Análise do papel da prostaglandina E₂ na proliferação, migração e apoptose na linhagem de glioma humano T98G e os efeitos do ácido gama linolênico e Ibuprofeno sobre este prostanóide.

Orientador(a): Alison Colquhoun.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 436/10 referente ao projeto intitulado: *"Análise do papel da prostaglandina E2 na proliferação, migração e invasão das células T98G de glioma humano, e dos efeitos do ácido gama-linolênico sobre o metabolismo deste prostanóide"* sob a responsabilidade de **Renata Nascimento Gomes**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 23 de novembro de 2010.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A. ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

“Mais do que a inteligência é à força de vontade”

Dedico este trabalho a minha mãe, que esteve ao meu lado em todos os momentos (alegres e difíceis) com seu carinho, incentivo e amor incondicional. Ao meu pai que sempre me incentivou. Aos meus irmãos Patricia e Ricardo, pela ajuda, carinho e torcida.

Ao meu maior presente e anjinho particular, Alex, só tenho que agradecer pelo carinho, a apoio, dedicação, compreensão, paciência, companheirismo e amor a todo o momento. Sem vocês meu sonho não seria possível.
Obrigado!!!

Amo a todos

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço eternamente, a minha chefe e orientadora, Profa. Dra. Alison Colquhoun, a quem só tenho que agradecer. Muito obrigado pela oportunidade, pela confiança, dicas, ensinamentos, companheirismo e pela super PACIÊNCIA (que não foi pouca).

Mais que uma orientadora, um exemplo profissional e pessoal.

Chefa quando crescer quero ser igual a você!!!!

AGRADECIMENTOS

Aos amigos de laboratório, Marcel, Ju e Andrew, pelos ensinamentos, dicas e risadas. Ao Fabio (Forasteiro) o mais novo membro do laboratório, e apesar do pouco tempo juntos já mostrou para que veio. E a minha irmã, filha e dupla Fêzinha pela ajuda, atrapalhadas (células trocadas), e tudo mais. Obrigado!!!

As minhas eternas técnicas prediletas, ou melhor, minhas “gurus” Emilinha (mestra) e Marloquinha (maravilhosa). Sempre presentes no meu dia a dia.

Ao Tio Bauer pelas excelentes aulas, papos, dicas, bolachinhas, cafés e principalmente pela escolinha. Tio Bauer é uma honra ter a oportunidade de conviver com você.

À Profa. Dra. Marilce Santos, pela oportunidade de participar do PAE na turma de graduação de Odontologia. Além dos ensinamentos, dicas, e papos.

A Profa. Dra. Marília e alunos pelo espaço, bolos e conversas.

Aos professores do Departamento de Biologia Celular e Tecidual, Profa. Dra. Dânia, Emer, Maria Inês, Eugênia, Estela, Edna, Irene, Gláucia, Norma, Patrícia, Anselmo, Sérgio, Ruy, Nathalie, Fábio e Vanessa; pelas excelentes disciplinas e palestras.

A minha amiga, Kitty que me apresentou a pesquisa. Aos amigos Flavio, Ju, Sheila, Daise e Dani que sempre acreditaram em mim.

Aos colegas e amigos que conheci durante estes muitos anos no ICB. Em especial ao Felipe (Fê)

As secretárias, Elo e Ana. Em especial Celi pela big atenção, carinho e caroninhas.

Ao pessoal da Biblioteca pela total atenção.

Ao pessoal da XEROX da bio, pela ajuda e apoio.

E finalmente a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro.

RESUMO

Gomes RG. Análise do papel da prostaglandina E₂ na proliferação, migração e apoptose na linhagem de glioma humano T98G e os efeitos do ácido gama linolênico e Ibuprofeno sobre este prostanóide. 97 f. [dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2011.

Gliomas são tumores do sistema nervoso central e o glioblastoma multiforme (GBM) é sua forma mais comum e de pior prognóstico. A proliferação celular desordenada, a alta taxa de migração e ausência de apoptose estão entre os processos biológicos que conferem ao GBM um comportamento altamente agressivo. Apesar dos avanços nas técnicas cirúrgicas e de radioterapia e/ou quimioterapia, não há tratamento eficiente disponível para o GBM. O objetivo deste estudo foi analisar *in vitro* o papel de PGE₂ na proliferação, migração e apoptose da linhagem de glioma humano T98G através de tratamento com ácido gama-linolênico (GLA), Ibuprofeno (IBU) e adição de prostaglandina E₁ (PGE₁) e prostaglandina E₂ (PGE₂) exógeno. Em muitos tipos de cânceres, PGE₂ está relacionada a vários processos tumorais, como a proliferação e apoptose. Nossos resultados demonstraram através de vários ensaios uma diminuição nas taxas de proliferação e de migração e uma indução de apoptose nas células T98G tratadas com GLA ou IBU. A expressão dos genes analisados também sofreu alterações com GLA e IBU. Por outro lado, a adição exógeno de PGE₁ ou PGE₂ resultou num aumento da proliferação e da migração e numa inibição da apoptose. Esses resultados demonstram a influência de PGE₂ na linhagem T98G.

Palavras-chave: T98G. Glioma. Prostaglandina E₂. Ácido gama-linolênico (GLA). Proliferação. Migração. Apoptose.

ABSTRACT

Gomes RG. Analysis of the role of prostaglandin E₂ in proliferation, migration and apoptosis in the T98G human glioma cell line and the effects of gamma - linolenic acid and Ibuprofen on this prostanoid. 97 f[Masters Thesis. (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2011.

Gliomas are tumors of the central nervous system and glioblastoma multiforme (GBM) is the most common form with the worst prognosis. Uncontrolled cell proliferation, the high migration rate and absence of apoptosis, are among the biological processes that give GBM a highly aggressive behavior. Despite advances in surgical techniques and radiation therapy and / or chemotherapy, there is no effective treatment available for GBM. The aim of this study was to analyze in vitro the role of PGE₂ in the proliferation, migration and apoptosis of the T98G human glioma cell line through treatment with gamma-linolenic acid (GLA), ibuprofen (IBU) and the addition of exogenous prostaglandin E₁ (PGE₁) and prostaglandin E₂ (PGE₂). In many types of cancer, PGE₂ is associated with various tumor related processes such as proliferation and apoptosis. Our results demonstrated through various tests a decrease in the rates of proliferation and migration and an induction of apoptosis in T98G cells treated with GLA or IBU. The expression of analyzed genes also changed with GLA and IBU. On the other hand, the addition of exogenous PGE₁ or PGE₂ resulted in increased proliferation and migration and inhibition of apoptosis. These results demonstrate the influence of PGE₂ on the T98G cell line.

Keywords: T98G. Glioma. Prostaglandin E₂. Gamma-linolenic acid (GLA). Proliferation. Migration. Apoptosis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA – Ácido Araquidônico

AINEs - Antiinflamatórios não esteroidais

AMPc – adenosina monofosfato cíclico

AKT - Proteína Quinase B

Bax - Antagonista do BCL-2 (indutora de apoptose ou pró-apoptótica)

Bcl-2 - Célula de Linfona-2 = proteína inibidora de apoptose

BHE – Barreira hematoencefálica

BrdU - Bromodesoxiuridina

BSA - Soro bovino fetal

°C - Graus Celsius

CO₂ - Gás carbonico

cAMP - Monofosfato de adenosina cíclico

COX - Cicloxigenase

cPGES - Prostaglandina sintase c

DHGLA – Ácido dihomogama-Linolênico

DHA - Ácido docosaheptaenóico

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DEPC – Dimetil pirocarbonato

DMSO – di-metil sulfóxido

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

EGF - Epidermal Growth Factor (Fator de Crescimento Epidermal)

EGFR - Receptor de EGF

EP1 - Receptor de PGE₂ - 1

EP2 - Receptor de PGE₂ - 2

ERK - Quinase Regulada por Sinal Extracelular

ERO - Espécies Reativas de Oxigênio

FAK - Quinase de Adesão Focal

GAPDH - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GBM - Glioblastoma Multiforme

GLA - Ácido gama-Linolênico

H - Horas

IBU – Ibuprofeno

IP3 – Fosfatidil inositol 3

kDA - kilodalton (unidade de medida do peso molecular de proteínas)

LA – Ácido linolêico

LOX- Lipoxigenase

M - Molar

MAPK - Proteína Quinase Ativado por Mitógeno

MEC - Matriz Extracelular

Min - minutos

mM - milimolar

MMP - Metaloproteases da matriz

PKC – Proteína Kinase C

μM - micromolar

PG - Prostaglandina

PGE₁ - Prostaglandina do tipo E1

PGE₂ - Propstaglandina do tipo E2

PGES1 - Prostaglandina sintase 1

PGES2 - Prostaglandina sintase 2

PI3-K - Fosfatidil-inositol-3 quinase

PPAR – Receptor ativador de proliferação de peroxisso

PKC – Proteína Kinase C

Rho - subfamília de proteínas GTPases as família Ras.

RNA - Ácido Ribonucléico

mRNA– RNA mensageiro

RT-PCR - Reação em cadeia da polimerase pela transcriptase reversa

SDS - dodecilsulfato de sódio

SNC - Sistema Nervoso Central

SOD – superóxido dismutase

TBS - Tampão Tris Salina

TIMP - Tissue inhibitor Metalloprotease (Inibidor de Metaloprotease Tecidual)

WHO - World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Curva de concentração de GLA	39
Figura 2 - Curva de cencentração IBU.....	40
Figura 3 - Curva de concentração PGE ₁	40
Figura 4 - Curva de concentração PGE ₂	41
Figura 5 - Efeito do GLA na proliferação	42
Figura 6 - Efeito de IBU na proliferação	43
Figura 7 - Efeito de PGE ₁ na proliferação	44
Figura 8 - Efeito de PGE ₂ na proliferação	44
Figura 9 - Efeito do GLA na mitose	46
Figura 10 - Efeito de IBU na mitose.....	46
Figura 11 - Efeito de PGE ₁ e PGE ₂ na mitose	48
Figura 12 - Incorporação de BrdU em células tratadas com GLA	49
Figura 13 - Incorporação de BrdU em células tratadas com IBU	50
Figura 14 - Incorporação de BrdU em células tratadas com PGE ₁ e PGE ₂	50
Figura 15 - Efeito do GLA na fragmentação mde DNA.....	51
Figura 16 - Efeito de IBU na fragmentação mde DNA	52
Figura 17 - Efeito do GLA na apoptose.....	53
Figura 18 - Efeito de IBU na apoptose	54
Figura 19 - Efeito de PGE ₁ e PGE ₂ na mitose	55
Figura 20 - Ensaio de Caspase-3 e Caspase -9	56
Figura 21 - Efeito do GLA na migração de monocamada	58
Figura 22 - Efeito do IBU na migração de monocamada.....	59
Figura 23 - Efeito do PGE ₁ e PGE ₂ na migração de monocamada	60
Figura 24 - Efeito do GLA na migração de transwell.....	62
Figura 25 - Efeito do IBU na migração de transwell.....	63
Figura 26 - Efeito do PGE ₁ e PGE ₂ na migração de transwell.....	64
Figura 27 - Análise da expressão gênica após o tratamento com GLA	66
Figura 28 - Análise da expressão gênica após o tratamento com GLA	67
Figura 29 - Análise da expressão gênica após o tratamento com GLA	68
Figura 30 - Análise da expressão gênica após o tratamento com IBU	69
Figura 31 - Análise da expressão gênica após o tratamento com IBU	70

Figura 32 - Análise da expressão gênica após o tratamento com IBU	71
Figura 33 - Análise da expressão gênica após o tratamento com PGE ₁	72
Figura 34 - Análise da expressão gênica após o tratamento com PGE ₁	73
Figura 35 - Análise da expressão gênica após o tratamento com PGE ₁	74
Figura 36 - Análise da expressão gênica após o tratamento com PGE ₂	75
Figura 37 - Análise da expressão gênica após o tratamento com PGE ₂	76
Figura 38 - Análise da expressão gênica após o tratamento com PGE ₂	77
Figura 39 - Análise da expressão proteica após o tratamento com GLA.....	79
Figura 40 - Análise da expressão proteica após o tratamento com IBU	80

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Padrão de distribuição das principais alterações genéticas	20
Esquema 2 - Biossíntese de PGE_2	21

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Sequência dos oligonucleotídeos utilizados.....	35
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Glioma	19
1.2 Próstaglandinas, Prostaglandina E sintase e Receptores EPs	21
1.3 Ciclooxygenases	24
1.4 Ácido gama-linolênico	25
1.5 Antiinflamatórios não esteróidas - Ibuprofeno	26
2 OBJETIVOS	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 Cultivo de Células	29
3.2 Curvas de Concentrações	29
3.3 Ensaios de proliferação celular	29
3.4 Análises da Morfologia Nuclear: Mitose e Apoptose	30
3.5 Incorporação de Bromodesoxiuridina ao DNA Celular (BrdU)	30
3.6 Extrações de DNA e detecção de fragmentação do DNA	31
3.7 Ensaios de caspase-3 e Caspase-9	32
3.8 Ensaios de migração celular em monocamada	32
3.9 Ensaios de migração celular em transwell	32
3.10 Análises de expressão gênica através de PCR semiquantitativa	33
<i>3.10.1 Desenho de Primers</i>	34
<i>3.10.2 Extração do RNA total</i>	35
<i>3.10.3 Preparação do DNA complementar (cDNA)</i>	36
<i>3.10.4 Reação em cadeia Polimerase (PCR)</i>	36
3.11 Western Blot	36
3.12 Análises dos Dados	37
4 RESULTADOS	39
4.1 Curva de concentração	39
4.2 Ensaio de proliferação em T98G	41
4.3 Análise Morfológica da Mitose e Apoptose	45

4.4 Incorporação de Bromodesoxiuridina (BrdU)	47
4.5 Apoptose	51
4.6 Ensaio de Migração	57
4.6 PCR	65
4.7 Western Blot	78
5 DISCUSSÃO	81
6 CONCLUSÃO	87
REFERÊNCIA	88

1 INTRODUÇÃO

1.1 Glioma

O tecido cerebral é composto basicamente por dois tipos celulares, neurônios e a glia. A glia, por sua vez, é formada por astrócitos (50%), oligodendrócitos (40%), células endoteliais (5%) e microglia (5%), desempenhando as funções de suporte estrutural, nutrição, homeostasia entre outras (Noctor et al., 2001).

Os tumores da glia, genericamente conhecidos como glioma, são os tumores primários mais comuns do sistema nervoso central (SNC) e estão classificados de acordo com sua morfologia e características clínicas em astrocitomas, oligodendrogliomas e oligoastrocitomas (Ohgaki, 2009).

Dentre os gliomas, os tumores mais prevalentes são os astrocitomas, que em ordem crescente de anaplasia são denominadas astrocitomas pilocíticos (grau I), astrocitomas difusos (grau II), astrocitomas anaplásicos (grau III) e glioblastomas multiforme (grau IV). Esta classificação é feita com base nas características histopatológicas e no prognóstico destes (Louis et al., 2007).

Glioblastoma multiforme (GBM) é o tumor glial mais agressivo e é comumente encontrado na região fronto temporal, podendo afetar os lobos parietais. O GBM apresenta características distintas de atipia nuclear, focos de necrose com a presença de células em palçadas, capacidade proliferativa, alto índice de mitose, presença de regiões com hemorragia e vários tipos de deleções, amplificações e mutações de ponto (Holland, 2000; Ohgaki, 2005).

GBMs primários e secundários são subtipos distintos de glioblastoma multiforme, afetando pacientes de diferentes idades e se desenvolvendo através de diferentes mecanismos. O GBM primário, aproximadamente 90% dos casos, se desenvolvem rapidamente sem evidências clínicas ou histológicas de lesões malignas precursoras e acometem principalmente indivíduos acima de 60 anos. GBMs secundários desenvolvem-se através da progressão de um glioma de baixo grau, como astrocitoma difuso ou astrocitoma anaplásico e se manifestam em indivíduos mais jovens (45 anos) (Kleihues et al., 2007) (Esquema 1).

Esquema 1- Padrão de distribuição das principais alterações genéticas e morfológicas de acordo com a origem e grau tumoral. Fonte: Ohgaki e Kleihues (2007).

Em virtude do seu rápido crescimento, da destruição de extensas áreas de tecido nervoso e do edema intenso que provoca, o GBM possui um prognóstico muito sombrio, com uma sobrevivência média dos pacientes inferior a um ano e meio após o diagnóstico (Holland, 2001; Minniti et al., 2009; Sen et al., 2009).

Os primeiros sintomas clínicos de glioma são dores de cabeça, papiloedema, náusea e vômitos, resultado do aumento da pressão intracraniana exercida pelo tumor e edema provocado por ele. Ataques epiléticos são comuns em pacientes. Podem apresentar déficit neurológicos na forma de perda sensorial ou motora, problemas de memória e outros aspectos relacionados a funções mentais (Behin et al., 2003)

Apesar dos avanços dos últimos anos, o tratamento para gliomas malignos recém - diagnosticados ainda consiste em ressecção cirúrgica seguida de radioterapia e quimioterapia quando possível. Porém devido ao seu alto poder infiltrativo no cérebro, a remoção cirúrgica total do tumor é muito difícil. Para o tratamento com quimioterapia o GBM é resistente, pois apresenta células com alta capacidade de reparo ao DNA, varias áreas de hipóxia com células resistentes ao tratamento, além de apresentar células em diversos estágios do ciclo celular e não apenas na fase G2/M (Benouaich-Amiel et al.,

2005). Adicionalmente, a presença da barreira hematoencefálica (BHE) dificulta a passagem de drogas para o tecido nervoso. A soma desses fatores cria um ambiente celular quimiorresistente, o que leva a quimioterapia a ficar em segundo plano no tratamento dos GBMs (Lu e Shervington, 2008).

Diante deste quadro, é necessário compreender cada vez mais os mecanismos celulares e genéticos que estão envolvidos na biologia deste tumor para o desenvolvimento de melhorias de novas estratégias terapêuticas e/ou adjuvantes.

1.2 Prostaglandina E₂ (PGE₂), Prostaglandinas E sintases e Receptores de PGE₂ (EPs)

As prostaglandinas (PGs) fazem parte da família dos eicosanóides, metabólitos dos ácidos graxos poliinsaturados de 20 carbonos, e estão envolvidas em uma série de processos fisiológicos e patológicos importantes em muitos tecidos.

A síntese das prostaglandinas pode ser desencadeada por diversos estímulos fisiológicos e/ou patológicos que ativam receptores de membrana, resultando na ativação da fosfolipase A₂ (PLA₂). A PLA₂ hidrolisa fosfolipídios da membrana plasmática liberando o ácido araquidônico. O AA liberado é metabolizado pelas ciclooxygenases (COXs) produzindo uma substância intermediária, prostaglandina G₂ (PGG₂), o qual rapidamente é convertida em prostaglandina H₂ (PGH₂). A PGH₂ serve como substrato para diversas enzimas denominadas prostaglandinas sintases (PGs), responsáveis pela produção da prostaglandina E₂ (PGE₂), prostaglandina I₂ (PGI₂), prostaglandina D₂ (PGD₂) e prostaglandina F₂α (PGF₂α) (Wang, 2007; Greenhough et al., 2009).

Isomerização de PGH₂ a PGE₂ é catalisada por sintases específicas. Até a data foram identificadas três isoformas desta enzima sendo cada uma delas codificada por diferentes genes: a citosólica (cPGES) e as microsossomais PGES-1 (mPGES-1) e PGES-2 (mPGES-2) (Kudo et al, 2005).

A mPGES-1 mPGES-1 é uma proteína microsossomal pertencente a superfamília MAPEG (proteína associada a membrana envolvida no metabolismo de eicosanóides e glutatona). Em condições basais a mPGES-1 é fracamente expressa na maioria das células e tecidos, sua expressão é regulada por estímulos inflamatórios, tais como LPS, IL-1β e TNF-α (Murakami et al., 2000) Curiosamente, muitos estudos têm indicado que o aumento da expressão mPGES-1 está fortemente correlacionada com a indução de

COX-2 e com a produção de PGE₂. Além disso, mPGES-1 catalisa preferencialmente a síntese de PGE₂ da COX-2-em vez de COX-1 derivados PGH₂. Portanto acoplamento, funcional entre COX-2 e mPGES-1 parece ser essencial para a produção de PGE₂ durante a inflamação (Stichtenoth et al., 2001).

A isoforma mais recente, a mPGES-2, é sintetizada como uma proteína de membrana associada ao Golgi, onde a remoção proteolítica do domínio hidrofóbico N-terminal leva à formação de uma enzima citosólica madura (Tanikawa et al, 2002; Murakami et al, 2003). mPGES-2 é constitutivamente expressa na maioria das células e tecidos, e sua expressão não parece ser regulado por estímulos inflamatórios. Em contraste com mPGES-1, mPGES-2 é capaz de catalisar a síntese de PGE₂ estando associada funcionalmente tanto à COX-1 como à COX-2. No entanto as suas funções fisiológicas e patológicas continuam pouco claras (Murakami et al., 2003).

cPGES é uma proteína citosólica expressa constitutivamente no citosol de uma variedade de tecidos e células, sendo na maioria das vezes resistente a estímulos pró-inflamatórios (Kobayashi et al., 2004). Estudos indicam que a ação de cPGES para produção de PGE₂ está associada à COX-1 ao invés da COX-2

A PGE₂ é a prostaglandina mais abundante do organismo, este prostanóide é produzido por várias células, incluindo os fibroblastos, leucócitos e células renais. De maneira geral, as prostaglandinas da série E promovem resposta imunológica, vasodilatação ou vasoconstricção, inibição ou ativação da proliferação, proteção da mucosa gástrica e inibição da secreção ácida também no estômago, entre outras.

As diversas funções exercidas por PGE₂ são desencadeadas por quatro subtipos de receptores, denominados de EP₁, EP₂, EP₃, e EP₄. Todos esses receptores possuem arquitetura de sete domínios transmembrana característica de receptores acoplados a proteínas G, embora cada um deles seja codificado por um gene distinto e promovam respostas celulares através da ativação de diferentes tipos de proteína G (Coleman et al., 1994). Apesar de não estar bem definido pela literatura, o receptor EP₁ liga-se à proteína G_{αq} que promove a mobilização de cálcio e a ativação da proteína quinase C (PKC), envolvida na transdução de sinais. Os receptores EP₂ e EP₄ ligam-se à proteína G_{αq}, e regulam o aumento dos níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPc). O receptor EP₄ pode ainda ativar a via da proteína fosfatidil inositol 3 quinase (PI3K), via ligação com a proteína G_{αi}. (BOS et al., 2004; Sugimoto e Narumiya, 2007).

O receptor EP₃ apresenta três isoformas, com diferenças na região c-terminal (EP_{3α}, EP_{3β} e EP_{3γ}). Em geral, as três isoformas ligam-se a proteína G_{ai}, e reduzem os níveis de cAMP, atuam sobre inositol trifosfato (IP₃) e aumentam os níveis de cálcio. As isoformas EP_{3α} e EP_{3β} também se ligam à G_{α12} pela qual ativam a via de sinalização Rho. A isoforma EP_{3γ} liga-se também a proteína G_{as} e aumentam os níveis de cAMP (Sugimoto e Narumiya, 2007; Dorsan e Gutkind, 2007) (Esquema 2).

Esquema 2 - Biossíntese das prostaglandinas e interação de PGE₂ e seus receptores.

Níveis elevados de PGE₂ são observados em diversos tipos de cânceres humanos, incluindo cólon, mama e próstata (Sheng, 2001; Han, 2010). Nos estudos realizados com carcinoma hepatocelular o aumento intracelular de PGE₂ está correlacionado com a expressão

1.3 Ciclooxygenases (COX)

A ciclooxygenase (COX) é a enzima chave responsável pela formação das prostaglandinas a partir AA. Pelo menos duas isoformas da COX já foram caracterizadas em mamíferos, COX-1 e COX-2. Ambas as COXs são enzimas com dupla função e cada uma delas possui duas atividades catalíticas distintas: a de ciclooxygenase e a de peroxidase. Porém, apesar da semelhança estrutural partilhada pelas duas isoformas, as COXs diferem na regulação da sua expressão e nas atividades que executam na biologia e patologia dos tecidos. A COX-2 localiza na membrana nuclear e no retículo endoplasmático, enquanto a COX-1 apenas nas membranas do retículo endoplasmático. Estas duas enzimas são codificadas por genes diferentes localizados em cromossomos diferentes (COX-1 pelo cromossomo 9 e a COX-2 pelo cromossomo 1) (Du Bois et al., 1998; Kern et al., 2006).

A COX-1 é a isoforma expressa constitutivamente, na maioria dos tecidos. Esta enzima é responsável pela formação dos prostanóides que, em condições fisiológicas, são responsáveis pela regulação da homeostasia. Normalmente, a concentração de COX-1 é constante, porém, em alguns casos, pequenos aumentos podem ocorrer em resposta a estímulos por hormônios ou fatores de crescimento. Por outro lado, a COX-2 é indetectável na maioria dos tecidos normais (exceto para o sistema nervoso central, rins e vesículas seminais), mas é induzida por hormônios, fatores de crescimento e citocinas em vários tipos celulares desempenhando um importante papel fisiológico (Simmos et al., 2004) .

O envolvimento das COXs em processos neoplásicos, em especial a isoforma COX-2, este bem elucidado nos carcinomas colorretais, polipose adenomatosa familiar, carcinomas de mama e gástricos. Níveis elevados de COX-2 está relacionado à proliferação celular, a supressão da apoptose, a indução da angiogenese e da metástase, ações que contam para a função oncogênica (Dubinett et al., 2003; Hasegawa et al., 2005).

Em gliomas a superexpressão da COX-2 está relacionada com o grau de malignidade do glioma e um pior prognóstico dos pacientes (Shono et al., 2001).

O mecanismo de ação da COX-2 no processo tumoral ainda não foi completamente esclarecido. Mas parece ser desencadeada pelo excesso de produção de PGE₂ decorrente de uma super regulação da COX-2.

1.4 Ácido Gama-linolênico (GLA)

O ácido gama-linolênico (GLA; 18:3) é um ácido graxo da série ômega-6 (ω -6), obtido principalmente de óleos vegetais. No organismo o GLA é produzido a partir do ácido linoléico (LA) pela ação da enzima delta-6-desaturase. Uma vez formado o GLA é metabolizado a ácido dihomogama linlênico (DHGLA; 20:3) que também pode ser convertido em ácido araquidônico (AA; 20:4). Esses dois ácidos, DHGLA e AA, servem de substrato para a biossíntese das prostaglandinas.

O GLA tem sido proposto como uma terapia antitumoral, devido a sua influência no processo tumoral (Das, 2006; Colquhoun et al, 2009), além de ser seletivamente citotóxica a várias linhagens de células tumorais humanas e auxiliar na sensibilização das células de glioma a outras terapias. (Das, 2007). Outros estudos o GLA apresentou efetiva ação sobre a migração e proliferação celular, aumentando as evidências de que o tratamento com GLA pode ser útil para a inibição da proliferação e migração de células residuais após remoção cirúrgica da massa tumoral (Jiang et al., 1998; Leaver et al., 2002a; Leaver et al., 2002b; Das, 2006; Colquhoun et al, 2009).

O GLA em gliomas, é capaz de influenciar processos importantes do tumor, como a inibição da proliferação e migração celular, indução da apoptose e angiogênese. Porém o mecanismo pelo qual esse ácido graxo age ainda não é totalmente conhecido (Benadiba et al., 2009; Colquhoun , 2009; Miyake et al., 2009).

Estudos com implantes de células de glioma C6 no cérebro de rato, após 8 dias da cirurgia o GLA foi injetado sobre o tumor por meios de bombas de infusão. Os resultados observados mostraram células com núcleo e cromatina condensando, características do processo apoptótico (Leaver et al., 2002).

No estudo com paciente diagnosticados com glioma, catétes foram implantado na cavidade deixada após a cirurgia de remoção do tumor. O GLA foi injetada por 7 dias e os pacientes foram 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 destes pacientes passou de 5-6 semanas para 4 meses (Bakshi et al., 2003). No trabalho realizado por Das (2004) a injeção de GLA por 10 dias consecutivo após a, cirurgia demonstraram que houve aumento na sobrevida média dos pacientes de 6 meses para 2 anos. (Das, 2004).

Estes estudos mostram que o GLA é capaz de aumentar a sobrevida dos paciente

com glioma, podendo ser utilizados como um tratamento adjunto.

1.5 Antiinflamatórios não esteroidais – Ibuprofeno

Os antiinflamatórios não esteroidais (AINE) constituem um grupo heterogêneo de compostos que apresentam efeitos terapêuticos similares para o tratamento da dor, inflamação e febre causada por várias condições fisiológicas ou patológicas. Seus principais efeitos são antiinflamatório, analgésico e antipirético.

Estudos epidemiológicos relacionam o uso prolongado de AINE com a redução de câncer colorretal, mama, pulmão, próstata e câncer gástrico (Baron e Sandle, 2000; Ulrich et al., 2006; Johnson et al., 2010). Os mecanismos tumorais ainda não foram totalmente elucidados, mas envolve o bloqueio da atividade não específica das enzimas COX-1 e COX-2, suprimindo a produção de prostaglandinas e assim afetando a proliferação celular, apoptose, angiogênese, migração e metástase (Gallo et al., 2002).

Ensaio clínico demonstraram que paciente que usam AINEs por um período prolongado apresentam regressão de pólipos no cólon. Existem evidências de que o uso dessas drogas faça regredir lesões pré neoplásicas, como os pólipos cólon retais, presentes na síndrome de polipose adenomatosa familiar Fujino et al. (2007) demonstraram que a indometacina, um inibidor não seletivo da COX, é capaz de reduzir a formação de cAMP induzida pela PGE₂ e reduziu a expressão de mRNA e do receptor de EP2 em células de carcinoma de cólon.

Estudos em *in vivo* com pacientes com carcinoma de esôfago, demonstraram uma redução dos níveis de mRNA e da proteína COX-2 após o uso do inibidor seletivo de COX-2 (Liu et al., 2008). Em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECP), o uso de inibidores seletivos quanto os não seletivos para COXs foram demonstrado como inibidores da secreção de PGE₂ em linhagens celulares de CECP (Husvik et al., 2009).

O ibuprofeno é um composto de grupo dos derivados do ácido propiônico, um dos mais importantes grupos do AINE. Foi uma das primeiras drogas desse grupo a ser utilizado e, atualmente, se encontra em franca expansão. O mecanismo de ação do ibuprofeno, assim como os demais derivados do AINE, está atribuído à sua capacidade de inibição direta das COXs. O ibuprofeno se liga no sítio ativo destas enzimas impedindo assim a ligação do AA, seu substrato e sua posterior conversão em prostaglandinas (Newa et al., 2008).

Estudos apontam a eficiência do uso do ibuprofeno na redução do risco de câncer de próstata (Mahmud et al., 2010), além de desencadear mecanismos que levam á morte células tumorais em linhagem de câncer de próstata (Andrew et al., 2002) Campos et al. (2004), aponta o ibuprofeno como um indutor de apoptose e necrose, bem como promotor de alterações no ciclo celular e modulador de crescimento em várias linhagens de leucêmias humanas como célula Walker 256. Outro estudo mostrou um declínio significativo no risco de câncer com aumento da ingestão de aspirina ou ibuprofenoem câncer de cólon, mama, pulmão e câncer de próstata (Harris et al., 2005).

2 OBJETIVOS GERAIS

Esse projeto tem como objetivo analisar o efeito de PGE_2 na migração, proliferação e apoptose na linhagem de glioma humano T98G.

1) Determinar os efeitos da adição de GLA na proliferação, migração e apoptose, sobre as células T98G.

4) Determinar os efeitos da adição de IBU na proliferação, migração e apoptose, sobre as células T98G.

3) Determinar os efeitos da adição de PGE_2 e PGE_1 na proliferação, migração e apoptose, sobre as células T98G.

4) Determinar a influência dos tratamentos na expressão de COX-1, COX-2, PGES1, PGES2, cPGES e os receptores EP1, EP2, EP3 e EP4..

3 MATERIAIS E MÉTODO

3.1 Cultivo de células

As células da linhagem T98G de glioma humano foram cultivadas em frascos plásticos descartáveis, contendo meio Dulbecco's (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos (penicilina 50 U/ml, estreptomicina 50 µg/ml). O pH e a temperatura foram mantidos através da incubação em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de ar. O meio de cultura foi trocado a cada 2 ou 3 dias, de acordo com o metabolismo celular, e ao atingir 80-90% da sua densidade de saturação foram sub-cultivadas. Os estoques celulares foram congelados em meio de cultura contendo 10% DMSO (dimetilsulfóxido) e 20% de SFB em nitrogênio (N₂).

3.2 Curvas de concentração

Para testar a influência dos tratamentos sobre a linhagem T98G, foram realizadas curvas de concentração com diferentes tratamentos de 24 h, 48 h e 72 h. Foram cultivadas 5 x 10⁴ células / poço em placas de 24 poços por 12 h (período de aderência). Após o período de aderência as células foram tratadas com GLA (0 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM e 300 µM), IBU (0 µM, 50 µM, 100 µM e 200 µM), PGE₁ (0 µM, 0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM e 10 µM) ou PGE₂ (0 µM, 0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM e 10 µM). No período de 24 h, 48 h e 72 h de tratamento, as células foram tripsinizadas (Trypsina 0,025% com EDTA 0,02%) e contadas em uma câmara de Neubauer.

3.3 Ensaios de proliferação celular

As células foram plaqueadas em frascos de 25 cm² com a finalidade de analisar o efeito dos tratamentos na proliferação celular. Após o período de aderência (aproximadamente 12 h), as células foram tratadas com GLA, IBU, PGE₁ ou PGE₂ por 72 h, sendo o meio junto com o tratamento trocado diariamente. Passado o período de 72 h, as células foram tripsinizadas (tripsina 0,025% / EDTA 0,02%) e contadas em câmara de Neubauer. O ensaio de proliferação celular foi realizado em triplicata para cada tratamento realizado.

3.4 Análises da morfologia nuclear: mitose e apoptose

As células foram cultivadas em placas de Petri de 30 mm de diâmetro e mantidas em condições de cultivo (estufa 37 °C, 5% CO₂, 95% ar) por 24 h. Após o período de aderência (aproximadamente 12 h), as células foram tratadas com GLA, IBU, PGE₁ ou PGE₂, por um período previamente determinado de 72 h. O meio de cultura junto com tratamento foram trocados diariamente.

Ao final do tratamento, as células foram fixadas *in situ* com formaldeído 4% (0,1M tampão fosfato de potássio a pH 7,2 a 4 °C) e lavadas (3x) com PBS, pH 7,2. Após as lavagens as células fixadas foram incubadas com 1ml de Hoechst 33342, por 5 min em temperatura ambiente. No final da incubação as células foram novamente lavadas (3x) com PBS, pH 7,2, antes da montagem em SlowFade meio de montagem. Em seguida, as placas de Petri foram fotografadas aleatoriamente em 10 campos diferentes, e analisadas com microscópio de fluorescência Nikon Optiphot-II equipado com uma câmera Cool Snap Pro e software Image Pro Plus.

O índice apoptótico foi determinado através do número de células com cromatina nuclear condensada e núcleo fragmentado, em comparação com o número total de células. O mesmo para mitose, porém verificando apenas as células que estavam em divisão celular. Os ensaios de morfologia celular foram realizados em triplicata para cada tratamento realizado.

3.5 Incorporação de Bromodesoxiuridina ao DNA celular (BrdU)

Para estudo de proliferação/reparação de DNA foi feita incorporação de BrdU. O BrdU é um análogo da timidina, que pode ser utilizado como um marcador de células em síntese (fase S). As células foram cultivadas em placas de 12 poços e mantidas em condições de cultivo (estufa 37 °C, 5% CO₂, 95% ar). Após o período de aderência (aproximadamente 12 h), as células foram tratadas com GLA, IBU, PGE₁ e PGE₂, por um período determinado de 72 h. Após o período de tratamento (72 h), as células foram expostas a 10µM de BrdU, após 45 min as células foram lavadas (1x) com PBS 1x e fixadas com formaldeído 4% em tampão P(K) 0,1M em pH 7,3. As células foram lavadas (3x) com PBS Triton e incubadas com 2M de HCl a temperatura ambiente por

10 min a temperatura. No final dos 10 min, as células fixadas e com HCl foram para uma estufa a 40 °C por mais 20 min.

Ao termino dos 40 min as células foram lavadas (3x) por 10 min com PBS-Triton. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado por 30 min com H₂O₂ (3%) em metanol/H₂O (1:1) seguido por lavagens (3x H₂O + 3x PBS). O bloqueio dos sítios inespecíficos foram realizados com glicínia e soro normal donkey por 1 h. As células foram então incubados “overnight” com anticorpo primários anti-BrdU (1:500). Após este tempo, as células foram lavadas (3x) com PBS-Triton. As células foram incubadas por 90 min com o anticorpo secundário biotilado (concentrações entre 1:500 e 1:1000) e então novamente lavadas com PBS-Triton 0,2%. A incubação foi seguida com um complexo streptavidina-biotilado horseradish peroxidase (numa concentração entre 1:100 e 1:200 por 60 min) e novas lavagens antes da revelação das células com 3,3'- diaminobenzidina (DAB) 40 mg/100ml + 1ml H₂O₂ 3%. As células foram deixadas na solução de revelação entre 2 e 10 min, contra-coradas (núcleos) com metil-green 0,1%, desidratadas e montadas com Permount. Em seguida, as imagens foram fotografadas aleatoriamente em 5 campos diferentes, e analisadas com microscópio de Nikon Optiphot-II equipado com uma câmera Cool Snap Pro e software Image Pro Plus.

3.6 Extrações do DNA e detecção de fragmentação do DNA

As células T98G foram cultivadas em frasco de 25cm² por 24 h, e depois tratadas com GLA, IBU, PGE₁ ou PGE₂ por 72 h. Após o tratamento as células foram tripsinizadas (tripsina 0,025% / EDTA 0,02%) e coletadas em eppendorfs contendo 300 µl de solução lise (5 µL 1 M Tris-HCl, pH 8,0, 20 µL de EDTA 0,5 M, NaCl 5M e 2 µl de SDS 10%) a 37 °C por 5 min. Em seguida, as proteínas foram precipitadas com 100 µl de NaCl 5M e centrifugada a 14.000g por 1 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi homogeneizado por 5 min em eppendorfs novos com 300 µl de isopropanol e 10 µl (1 mg / ml) de glicogênio. Posteriormente, a solução foi centrifugada por 1 min a 14.000g e o precipitado lavado com etanol 75% e finalmente, ressuspenso em 50 µl de água miliQ. A integridade do DNA foi confirmada por eletroforese em 1% agarose contendo brometo de etídio e visualizado com um sistema de UV para a captura.

3.7 Ensaio de Caspase-3 e Caspase-9

As células foram cultivadas em placas de 12 poços e mantidas em condições de cultivo (estufa 37 °C, 5% CO₂, 95% ar). Após o período de aderência (aproximadamente 12 h), as células foram tratadas com GLA IBU, PGE₁ e PGE₂, por um período determinado de 72 h. O meio de cultura junto com o tratamento foi trocado diariamente. Passado o período de 72 h, as células foram tripsinizadas (Trypsina 0,025% com EDTA 0,02%), coletadas e centrifugadas a 1500 rpm por 2 min. O pellet formado foi ressuspensionado no meio de cultura contendo o tratamento que foi retirado antes das células serem tripsinizadas coletadas. Nas células ressuspensionadas foram adicionados 1 µl da sonda FITC-DEVD-FMK para caspase-3 e 1 µl da sonda FITC-LEHD-FMK para caspase-9, além de 1 µl Hoechst 33342, por 1 h a 37 °C. As células foram lavadas (2x) e ressuspensionadas no tampão do kit. Após a montagem das lâminas as células foram visualizadas e fotografadas no microscópio de fluorescência Nikon Optiphot-II equipado com uma câmera Cool Snap Pro e software Image Pro Plus.

3.8 Ensaios de migração celular

As células foram cultivadas em placas de Petri de 30 mm de diâmetro contendo 1 ml de meio de cultura e 10% SFB. Durante o período determinado de 48 h, as células receberam os tratamentos com GLA, IBU, PGE₁ ou PGE₂, que foram trocados diariamente junto com o meio de cultura. No último dia de tratamento, foi realizada uma linha indicativa do ponto zero da migração, com a ajuda de uma lâmina autoclavada. As células foram lavadas 3x com 1ml de meio de cultura para retirada completa de resíduos celulares da linha formada. Após 10 h da raspagem as células foram fixadas *in situ* com formaldeído 4% (0,1 M de fosfato de potássio a pH 7,2), e lavadas com PBS (3x), pH 7,2. Depois das lavagens, as células foram incubadas com 1 ml de Hoechst 33342, por 5 min em temperatura ambiente e novamente lavadas com PBS (3x), pH 7,2, antes da montagem em SlowFade.

As imagens das placas foram capturadas aleatoriamente em 10 campos diferentes, e foram analisadas com microscópio de fluorescência Nikon Optiphot-II equipado com uma câmera Cool Snap Pro e software Image Pro Plus. Os resultados

foram expressos com o número de células que migram por mm^2 da área riscada na placa de Petri.

3.9 Ensaio de migração em Transwell

Para complementar os resultados obtidos com o ensaio de migração em monocamada, foram realizados ensaios de migrações, em câmaras bipartes transwell, utilizando placas de 24 poços. Essas câmaras são compostas por dois comportamentos distintos, separados entre si por um filtro de polycarbonato com poros de 8 μM de diâmetro (BD- Biosciences San Jose, CA, USA).. Este sistema cria dois ambientes diferentes que permitem a passagem voluntária das células de um lado para o outro do filtro.

As células T98G (5×10^4 células/poço) foram colocadas na porção superior da câmara do transwell acrescido meio de cultura e SBF, no compartimento inferior da câmara também foi colocado meio de cultura e SBF. Após o período de aderência o meio de cultura da parte superior da câmara foi trocado e nele adicionado o tratamento (GLA, IBU, PGE_1 e PGE_2). O meio de cultura junto com os tratamentos foram trocados diariamente.

Após 48 h de tratamento, as células foram coradas com cristal de violeta (cristal de violeta 0,05% e 70% de etanol) por 30min e lavadas com PBS (3x), pH 7,2. As células da porção superior do filtro (células que não migraram) foram removidas com cotonete assim não afetariam o resultado final. As membranas contendo as células coradas que migraram foram secas e suas imagens capturadas aleatoriamente em 5 campos diferentes no microscópio Nikon Optiphot-II equipado com uma câmera Cool Snap Pro.

3.10 Análise de expressão gênica através de PCR semiquantitativo

3.10.1 Desenho de primers

Todos os primers utilizados foram desenhados com base em sequências disponíveis no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) e com o auxílio do programa Primer 3 (www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi). A especificidade de cada primer foi verificada através do BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Os primers foram sintetizados pela Invitrogen. Abaixo estão as sequências dos primers utilizados (Tabela 1).

Tabela 1 – Sequência dos Oligonucleotídeos utilizados.

Gene	N° acesso	Sêquencia (5'-3')	T°C	Ciclo
COX-1	NM_000955.2	R: CAGACGACCCGCCTCATCCTCATAG F: GCCTCAACCCCATAGTCCACCAACA	63	38
COX-2	<u>NM_000963.2</u>	R: ATGATCTACCCTCCTCAAGTCCCT F: TACTTTCTGTACTGCGGGTGGAAC	69	38
PGES1	<u>NM_004878.4</u>	R: CATGTGAGTCCCTGTGATGG F: GACTGCAGCAAAGACATCCA	59	37
PGES2	NG_012488.1	R: GCAGGGCTGAGATCAAGTTC F: GCCTTCATGGCTGGGTAGTA	59	37
cPGES	AY795074.1	R: CAGAGAAGGCACACAAACGA F: CACTGGTGAGACAGGCTTGA	60	37
EP2	<u>NM_000956.3</u>	R: GCAGTCTCCCTGCTCTTCTGC F: GCACCGAGACAATGAGAAGCA	61	40
EP4	NM_198713.1	R: GCTGCTCGTGTCGCGCAGCTACC F: TGGCTGGCGCTCACCGACCTGGT	63	40
GAPDH	BT006893.1	R: GAGTCAACGGATTTGGTCGT F: TTGATTTTGGAGGGATCTCG	59	38

3.10.2 Extração do RNA total

Para extração do RNA total, as células foram cultivadas em frascos de 25 cm² e tratadas com GLA, IBU, PGE₁ ou PGE₂ por 72 h. Ao termino do tratamento as células foram coletadas e homogeneizadas (aparelho Politron) com 1 ml de Trizol e mantidas em temperatura ambiente por 5 min. Em seguida foi adicionado as amostras 200 µl de clorofórmio que foi centrifugado a 10600 rpm durante 15 min a 4 °C. O sobrenadante de

cada amostra foi retirado e transferido para um novo tubo ao qual foi adicionado 500 µl de isopropanol para centrifugação a 10600 rpm durante 10 min a 4 °C. Ao final da centrifugação o sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado com 1ml de etanol 75% por duas vezes seguida de nova centrifugação de 7500 rpm por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi removido e o precipitado de RNA ressuspensionado em 50 µM de água DEPC (Dimetil pirocarbonato) inativa.

A concentração de RNA das amostras foi quantificada em espectrofotômetro, usando a relação $A_{260} / A_{280} \geq 1.8$. O RNA purificado foi estocado e mantido no -80 °C. A integridade do RNA foi observada através de eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

3.10.3 Preparação do DNA complementar (cDNA)

O cDNA foi obtido através da técnica de RT-PCR utilizando MMLV – transcriptase reversa. Para tal foi adicionados 1 µl Inibidor de RNA, 2 µl Random Primer, 2 µl dNTP mix, 2 µl Dithiothreitol (DTT), 4 µl RTbuffer, 2 µl MMLV e aproximadamente 1 µg de cDNA de interesse. Para a amplificação do cDNA foi utilizado um termociclador com as seguintes temperaturas e tempos previamente determinados: 21 °C por 10', 42 °C por 50' e, 99 °C por 10'. A amplificação foi confirmada pela eletroforese em gel de 1% de agarose contendo brometo de etídio sendo o produto visualizado com um sistema de captura UV.

3.10.4 Reação em cadeia Polimerase (PCR)

Para método de PCR foi preparado uma reação com volume final de 50 µl contendo: 1 µl dNTP, 1,5 µl MgCl₂, 5 µl PCR buffer, 34,5 µl H₂O miliQ autoclavada, 0,5 µl Platinum *Taq* DNA, 6 µl oligonucleotídeo sense e anti-sense e 1,5 µl cDNA sintetizado. O PCR foi padronizado em três etapas: 94 °C por 1' (para liberação da enzima *Taq* do seu anticorpo), temperatura específica do oligonucleotídeos por 1'(anelamento Oligonucleotídeos) e 72 °C por 1'(síntese da nova molécula). A amplificação foi confirmada pela eletroforese em gel de 1% de agarose contendo brometo de etídio sendo o produto visualizado com um sistema de captura UV. A análise semiquantitativa do produto foi feita usando o sistema de

imagem Signa Scan Pro. O gene GAPDH foi utilizado como controle endógeno de expressão constitutiva

3.11 Western Blot

Para a extração de proteína, as células foram lisadas com tampão lise (0,21 g / 100 ml de Tris base, 0,584 g / 100 ml NaCl, 0,037 g / 100 ml de EDTA e 1% Triton 1 ml / 100 ml pH=7,6), inibidor de protease e inibidor de fosfatase por 5 min. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 1500 rpm por 2 min, e o sobrenadante transferido para um novo tubo onde foi armazenada a -80°C. A concentração protéica foi determinada através do método de Lowry. Após a quantificação os extratos protéicos foram diluídos em tampão de amostra (1,51 g de Tris-Hcl pH=6,8, 40 ml de SDS 10%, 10 ml de mercaptoetanol, 20 ml de glicerol e 0,004 g de azul de bromofenol) incubados a 100 °C por 3 min.

Para o processo de separação foi feito um gel de SDS-PAGE com 7,5% de acrilamida, acompanhado de um segundo gel com 4% de acrilamida. Em cada poço foram colocados 40 µg de extrato protéico total (diluído em tampão de amostra) e 3 µl de marcador de peso nuclear em cada gel. A corrida foi feita à 70V / 30 min durante o primeiro gel e a 100V / 1 h durante o segundo gel (gel de separação).

Em seguida foram realizadas as transferências das proteínas para uma membrana de nitrocelulose utilizando o tampão de transferência (57,6 g de glicina, 12 g de Tris-base e 4 g de SDS pH=8,3) à ± 4 °C / 200 mA / 2:00 h. Terminada a transferência das proteínas as membranas foram lavadas 1x com TBS 1x (5 min) e 3x com TBS Tween 0,1% (5 min) para retirada do metanol. A fim de bloquear as possíveis ligações não específicas, as membranas foram incubadas em solução de PBS 1x + Albumina 1% por 1 h a temperatura ambiente sob agitação a fim de bloquear as possíveis ligações não específicas. Passada uma h da incubação com albumina, a membrana foi incubada com anticorpo primário na diluição 1:200 *overnight* em agitação.

No dia seguinte, as membranas foram lavadas com TBS (1x) por 10 min e com TBS Tween 0,1% (3x) por 10 min. Após as 3 lavagens as membranas foram incubadas com anticorpo secundário na diluição 1:1000 por 2h. Após a incubação com o anticorpo secundário as membranas foram lavadas com TBS (1x) por 10 min e com TBS Tween 0,1% (3x) por 10 min. As revelações foram feitas através da detecção fluorescente no aparelho Molecular Dynamics Typhoon 8600 Variable Mode Imagen.

3.12 Análise dos Dados

Todos os dados obtidos estão apresentados como média $\pm$ erro padrão (SE). As análises estatísticas foram feitas utilizando o programa Graph Pad Instat, usando o teste-t para comparação das amostras. As diferenças foram consideradas significantes com $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Curvas de concentrações

Para determinar quais concentrações de GLA, IBU, PGE₁ ou PGE₂ seriam usadas na linhagem T98G, foram feitas curvas com diferentes doses e períodos dos tratamentos. Através da análise dos dados, foi possível observar que a ação dos tratamentos sobre as células é dose e tempo dependente, ou seja, quanto maior a dose e o tempo de exposição da célula, menor a proliferação celular. Os gráficos abaixo mostraram as curvas de inibição no crescimento de GLA (figura 1), IBU (figura 2), PGE₁ (figura 3), e PGE₂ (figura 4).

Figura 1 – Curva de concentração de GLA na célula T98G.

Figura 2 – Curva de concentração de IBU na célula T98G.

Figura 3 – Curva de concentração de PGE₁ na célula T98G.

Figura 4 – Curva de concentração de PGE₂ na célula T98G.

4.2 Ensaio de proliferação em T98G tratadas com GLA ou IBU

A proliferação celular foi avaliada através da contagem das células T98G na presença e ausência do GLA, IBU, PGE₁ e PGE₂ pelo período determinado de 72 h. No grupo tratado com GLA, podemos verificar que após 72 h de tratamento com 50 μM ocorreu uma diminuição de 39% na proliferação celular, enquanto que no tratamento com 25 μM não foi observada nenhuma mudança da proliferação celular quando comparada aos controles (figura 5).

Figura 5 - Efeito de GLA na proliferação da célula T98G após 72 h de tratamento. * $p=0.0047$ em relação ao controle. $n = 4$ controle, $n = 3$ tratado com 25 µM de IBU e $n= 3$ em tratado com 50 de µM IBU.

No grupo tratado com IBU, a diminuição da proliferação celular foi observada em ambas as concentrações (25 µM e 50 µM) do tratamento. Na concentração de 25 µM a diminuição da proliferação foi de aproximadamente 45%, enquanto que na concentração de 50 µM a queda foi ainda maior chegando a 54% quando comparada aos controles (figura 6).

Figura 6 - Efeito de IBU na proliferação da célula T98G após 72 h de tratamento. * $p=0.0010$ em relação ao controle, ** $p=0.0005$ em relação ao controle. $n = 4$ controle, $n = 3$ tratado com 25 μM de IBU e $n= 3$ em tratado com 50 μM de IBU.

No caso dos grupos que tiveram a adição exógena de PGE_1 ou PGE_2 , os resultados mostram um aumento na proliferação celular e não uma diminuição como ocorreu com GLA e IBU. Para a adição de 10 μM de PGE_1 foi observado um aumento da proliferação de aproximadamente 37% (figura 7), o mesmo ocorreu com 10 μM de PGE_2 , que teve um aumento da proliferação de 45% (figura 8).

Figura 7 – Efeito de PGE_1 na proliferação da célula T98G após 72 h de tratamento. * $p=0,0007$ em relação ao controle. $n = 3$ controle e $n = 3$ tratado com 10 μM de PGE_1 .

Figura 8 – Efeito de PGE₂ na proliferação da célula T98G após 72 h de tratamento. *p=0, 0008 em relação ao controle. n = 3 controle e n = 3 tratado com 10μM de PGE₂.

4.3 Análise morfológica da mitose

A influência dos tratamentos sobre a proliferação, também foi analisada através da morfologia da mitose. Os resultados demonstram que no tratamento com GLA e IBU, ocorreu uma diminuição no número de mitoses. No tratamento realizado com 25 μM de GLA o número de mitoses reduziu, atingindo 16% do número total de célula quantificada. Um efeito ainda maior foi observado no tratamento com 50 μM de GLA, que reduziu o número de mitoses em 45% em relação ao número total de células (figura 9 B).

Na figura 10 B, estão representadas as diferenças no número de mitoses observadas no tratamento feito com IBU em ambas as concentrações. Essas reduções representaram 49% no número de células tratadas com 25 μM de IBU e 57% no caso das células tratadas com 50 μM de IBU.

Para o grupo tratado com 10 μM de PGE₁ ou 10 μM de PGE₂ de exógenos, não foi observado nenhuma mudança no número de apoptoses quando comparada ao grupo controle (figura 11 B).

Figura 9 – Efeito do GLA no número de mitoses na célula T98G. **A.** Análise morfológica da mitose em núcleos corado com Hoechst 33342, em células tratadas com 25 μ M de GLA ou 50 μ M de GLA. **B.** Porcentagem de mitoses em células tratadas com 25 μ M de GLA ou 50 μ M de GLA em relação ao número total de células. *p=0,0028 em relação ao controle e **p<0,0001 em relação ao controle. n = 8 controle, n = 6 tratada com 25 μ M de GLA e n = 6 tratada com 50 de μ M GLA. Escala: 20 μ m.

Figura 10 – Efeito do IBU no número de mitoses na célula T98G. **A.** Análise morfológica da mitose em núcleos corado com Hoechst 33342, em células tratadas com 25 μ M de IBU ou 50 μ M de IBU. **B.** Porcentagem de mitoses em células tratadas com 25 μ M de IBU e 50 μ M de IBU em relação ao número total de células. *p <0,0001 em relação ao controle e **p<0,0001 em relação ao controle. n = 8 controle, n = 6 tratada com 25 μ M de IBU e n = 6 tratada com 50 μ M de IBU. Escala: 20 μ m.

Figura 11 – Efeito do PGE₁ ou PGE₂ no número de mitoses na célula T98G. **A.** Análise morfológica da mitose em núcleos corado com Hoechst 33342, em células tratadas com 10 μ M de PGE₁ ou 10 μ M de PGE₂. **B.** Porcentagem de mitoses em células tratadas com 10 μ M de PGE₁ ou 10 μ M de PGE₂ em relação

4.4 Incorporação de BrdU

No intuito de se investigar o efeito dos tratamentos na célula T98G, foi realizado o ensaio de captação de BrdU. Assim, quanto maior a incorporação de BrdU no DNA, maior era atividade proliferativa das células analisadas.

Dessa forma, a análise dos dados mostrou no tratamento com o GLA nenhuma diferença no número de células na fase S entre os grupos controle e o grupo tratado (figura 12).

Figura 12 – Incorporação de BrdU em células T98G tratadas com GLA por 72 h. n=4 controle, n= tratado com 25 µM de GLA, n=4 tratado com 50 µM de GLA.

Diferente do que ocorreu com o GLA, o tratamento realizado com IBU mostrou uma diferença no número de células na fase S. Essa redução no número total células representou 43% para 25 µM e 65% para 50 µM (figura 13).

Figura 13 – Incorporação de BrdU em células T98G tratadas com IBU por 72 h. * $p < 0,0011$ em relação ao controle, ** $p < 0,0011$ em relação ao controle. $n=4$ controle, $n=$ tratado com 25 μ M de IBU, $n=4$ tratado com 50 μ M de IBU.

No tratamento com PGE₁ e PGE₂ exógeno, o número de células na fase S aumentou para 62,5% no caso de PGE₁ e 100% para PGE₂ (figura 14).

Figura 14 - Incorporação de BrdU em células T98G tratadas com PGE₁ ou PGE₂ por 72 h. * $p < 0,0001$ em relação ao controle, ** $p < 0,0001$ em relação ao controle. $n=4$ controle, $n=$ tratado com 10 μ M de PGE₁, $n=4$ tratado com 10 de μ M de PGE₂.

4.5 Apoptose

A possível indução da apoptose na linhagem T98G foi verificada através de três ensaios diferentes: fragmentação de DNA (avaliar a indução de danos no DNA), morfologia da apoptose (quantificar o número de células em apoptose pelo corante Hoechst 33342) e ensaio de caspase -3 e caspase-9 ativada

No experimento de fragmentação do DNA (característica de células apoptóticas), não foi observada nenhuma fragmentação de DNA nas células tratado com GLA ou IBU (figura 15 e figura 16 respectivamente). Esses resultados podem indicar que estes tratamentos não são capazes de induzir a apoptose.

Figura 15 - Efeito de GLA na fragmentação de DNA na célula T98G. Eletroforese de fragmentação de DNA em gel de agarose. Linha L: marcador de DNA (ladder). Linha 1 e 2: controle de 25 μ M. Linha 3, 4 e 5: tratado com 25 μ M de GLA. Linha 6 e 7: controle de 50 μ M de IBU. Linha 8, 9 e 10: tratado com 50 μ M de GLA. n = 3 controle, n = 3 tratado com de 25 μ M de GLA e n= 3 tratado com 50 μ M de GLA.

Figura 16 - Efeito de IBU na fragmentação de DNA na célula T98G. Eletroforese de fragmentação de DNA em gel de agarose. Linha L: marcador de DNA (ladder). Linha 1 e 2: controle de 25 μ M. Linha 3, 4 e 5: tratado com 25 μ M de IBU. Linha 6 e 7: controle de 50 μ M. Linha 8, 9 e 10: tratado com 50 μ M de IBU. n = 3 controle, n = 3 tratado com de 25 μ M de IBU e n= 3 tratado com 50 μ M de IBU.

No entanto, com a análise morfológica das células coradas com Hoechst 33342, foi confirmada a influência de GLA e IBU no processo de apoptose.

Para o tratamento realizado com GLA, a indução da apoptose na concentração de 25 μ M foi de 5% em relação ao número total de células. Já na concentração de 50 μ M o aumento no número de células em apoptose representou 6% também em relação ao controle (3%) (figura 17 B).

No caso do IBU em ambas as concentrações (25 μ M e 50 μ M) foi observada indução da apoptose. Essa indução foi de 7% no número total de células tratadas com 25 μ M de IBU e 8% nas células tratadas com 50 μ M de IBU (figura 18 B) em relação ao controle (3%). Outro resultado relevante foi a presença mais evidente das caspase -3 e caspase-9 ativadas nos grupos tratados de GLA e IBU em relação ao controle (figura 20)

Para a adição de PGE₁ e PGE₂ exógeno o ensaio de morfologia não mostrou diferenças no número de apoptoses das células tratadas quando comparada aos seus controles (figura 19 B).

Figura 17 – Efeito do GLA na apoptose da célula T98G. **A.** Alterações morfológicas do núcleo (típicos de apoptose) corado com Hoechst 33342, em células tratadas com 25 μ M de GLA ou 50 μ M de GLA por 72 h. **B.** Porcentagem de apoptoses em células tratadas com 25 μ M de GLA ou 50 μ M de GLA em relação ao número total de células. * $p=0,0285$ em relação ao controle e ** $p=0,0089$ em relação ao controle. $n = 8$ controle, $n = 6$ tratada com 25 de μ M GLA e $n = 6$ tratada com 50 de μ M GLA. Escala: 20 μ m.

Figura 18 – Efeito do IBU na apoptose da célula T98G. **A.** Alterações morfológicas do núcleo (típicos de apoptose) corado com Hoechst 33342, em células tratadas com 25 μM de IBU ou 50 μM de IBU por 72 h. **B.** Porcentagem de apoptoses em células tratadas com 25 μM IBU ou 50 μM IBU em relação ao número total de células. * $p=0,0010$ em relação ao controle e ** $p<0,0001$ em relação ao controle. $n = 8$ controle, $n = 6$ tratada com 25 μM de IBU e $n = 6$ tratada com 50 μM de IBU. Escala: 20 μm .

Figura 19 – Efeito de PGE₁ ou PGE₂ na apoptose da célula T98G. **A.** Alterações morfológicas do núcleo (típicos de apoptose) corado com Hoechst 33342, em células tratadas com 10 μ M de PGE₁ ou 10 μ M de PGE₂ por 72 h. **B.** Porcentagem de apoptoses em células tratadas com 10 μ M de PGE₁ ou 10 μ M de PGE₂ em relação ao número total de células. *p=0,0852 em relação ao controle e **p=0,0732 em relação ao controle. n = 8 controle, n = 6 tratada com 10 μ M de PGE₁ e n = 6 tratada com 10 μ M de PGE₂. Escala: 20 μ m

Figura 20 – Ensaio de caspase-9 e caspase-3 ativadas em células T98G tratadas com GLA, IBU, PGE₁ ou PGE₂. **A.** controle caspase-9. **B.** tratado 50 μM de GLA caspase-9. **C.** tratado 50 μM de IBU caspase-9. **D.** tratado 10μM de PGE₁ caspase-9. **E.** controle caspase-3. **F.** tratado 50μM de GLA caspase-3. **G.** tratado 50 μM de IBU caspase-3. **H.** tratado 10 μM de PGE₁ caspase-3. **I.** tratado 10 μM de PGE₂ caspase-3.

4.6 Ensaios de migração

Para avaliar a influência de GLA, IBU, PGE₁ e PGE₂ sobre a migração utilizamos ensaio de migração em monocamada e ensaio de migração em tranwell.

No grupo de células tratadas com GLA, os resultados de migração em monocamada mostraram uma redução da migração apenas com a concentração de 50 µM. Essa redução representou 64% do número de células que migraram em relação ao controle (figura 21 B).

Para o grupo tratado com o IBU à redução da migração ocorreu nas duas concentrações utilizadas (25 µM e 50 µM). Na concentração mais baixa (25 µM) a inibição da migração foi de aproximadamente 40%, enquanto que na concentração mais alta (50 µM) a redução representou 74% em relação aos grupos controles (figura 22 B).

Nos grupos de células tratados com PGE₁ ou PGE₂ exógeno, os resultados observados foram o oposto obtido com GLA e IBU. A adição de 10 µM de PGE₁ aumentou o processo de migração em 43%, no caso da adição de 10 µM de PGE₂ o aumento foi de 44% (figura 23 B).

Figure 21 – Efeito do GLA na migração em monocamada da célula T98G. **A** Migração corado com Hoechst 33342, em células tratadas com 25μM de GLA ou 50μM de GLA por 48 h. Linha superior (2): média máxima da distância de migração em 10h, linha inferior (1): ponto inicial da migração **B**. Número de células que migraram por área. *p <0,0001 em relação ao controle. n= 8 controles, n= 6 tratada com 25 μM de GLA e n= 6 tratada com 50 μM de GLA. Escala: 10 μm.

Figure 22 – Efeito do IBU na migração em monocamada da célula T98G. **A** Migração corado com Hoechst 33342, em células tratadas com 25 μM de IBU ou 50 μM de IBU por 48 h. Linha superior (2): média máxima da distância de migração em 10h, linha inferior (1): ponto inicial da migração **B**. Número de células que migraram por área. *p < 0,0001 em relação ao controle e **p < 0,0001 em relação ao controle. n= 8 controles, n= 6 tratada com 25 μM de IBU e n= 6 tratada com 50 μM de IBU Escala: 20 μm.

Figure 23 – Efeito de PGE₁ ou PGE₂ na migração em monocamada da célula T98G. **A** Migração corado com Hoechst 33342, em células tratadas com 10 μ M de PGE₁ ou 10 μ M de PGE₂ por 48 h. Linha superior (2): média máxima da distância de migração em 10h, linha inferior (1): ponto inicial da migração **B**. Número de células que migraram por área. *p < 0,0001 em relação ao controle e **p < 0,0001 em relação ao controle. n= 8 controles, n= 6 tratada com 10 μ M de PGE₁ e n= 6 tratada com 10 μ M de PGE₂. Escala: 10 μ m.

Para confirmar os efeitos observados no ensaio de migração de monocamada, foram realizados também ensaios de migração em transwell para todos os tratamentos. Como mostra a figura 24 B, o tratamento com GLA promoveu efeitos inibitórios sobre a migração somente na concentração de 50 μ M. A inibição da migração para 50 μ M de GLA representou 32%. Para o tratamento com IBU a inibição da migração em transwell foi de 15% para 25 μ M e de 36% para 50 μ M (figura 25 B).

O mesmo ocorreu para PGE_1 e PGE_2 que tiveram a indução da migração confirmada. Neste caso a adição de 10 μ M de PGE_1 aumentou a migração em 28% e em 68% para adição de 10 μ M de PGE_2 (figura 26 B).

Figure 24 – Efeito do GLA na migração em transwell da célula T98G. **A** Migração corada com cristal de violeta, em células tratadas com 25 μ M de GLA ou 50 μ M de GLA por 48 h. **B**. Número de células que migraram. * $p=0,0052$ em relação ao controle. $n=16$ controles, $n=12$ tratada com 25 μ M de GLA e $n=12$ tratada com 50 μ M de GLA. Escala: 20 μ m.

Figure 25 – Efeito do IBU na migração em transwell da célula T98G. **A** Migração corada com cristal de violeta, em células tratadas com 25 μ M IBU ou 50 μ M IBU por 48 h. **B**. Número de células que migraram. * $p=0,0006$ em relação ao controle e * $p <0,0001$ em relação ao controle. $n= 16$ controles, $n= 12$ tratada com 25 μ M de IBU e $n= 12$ tratada com 50 μ M de IBU. Escala: 20 μ m.

Figure 28 – Efeito de PGE₁ ou PGE₂ na migração em transwell da célula T98G. **A** Migração corada com cristal de violeta, em células tratadas com 10 μ M de PGE₁ ou 10 μ M de PGE₂ por 48 h. **B**. Número de células que migraram. *p < 0,0001 em relação ao controle e ** p < 0,0001 em relação ao controle. n= 16 controles, n= 12 tratada com 10 μ M de PGE₁ e n= 12 tratada com 10 μ M de PGE₂. Escala: 20 μ m.

4.7 Análise da expressão do mRNA

Foi analisada a expressão de COX-1, COX-2, cPGES, PGES1, PGES2, EP2 e EP4 em células T98G tratadas com GLA, IBU, PGE₁ e PGE₂ por 72 h.

No grupo tratado com 25 µM de GLA, apenas as prostaglandinas síntases (cPGES, PGES1, PGES2), sofreram diminuição nos níveis de mRNA após 72 h de tratamento (figura 27, figura 28 e figura 29). No tratamento com 50 µM de GLA a expressão do mRNA foi diminuída em todas as moléculas analisadas.

A expressão de COX-1, COX-2, cPGES, PGES1, PGES2, EP2 e EP4, sofreram alteração após o tratamento com 25 µM de IBU e 50 µM de IBU (figura 30, figura 31 e figura 32).

Em relação a adição de 10 µM de PGE₁ ou 10 µM de PGE₂, a expressão do mRNA analisados também foram alterados. Com a adição de 10 µM de PGE₁ ou 10 µM de PGE₂ a expressão do mRNA de COX-1, COX-2, cPGES, PGES1, PGES2 sofreram um aumento na expressão do mRNA em relação aos controles. Para os receptores EP1 e EP2 a adição de 10 µM PGE₁ (figura 33, figura 34 e figura 35) ou 10 µM PGE₂ figura (36, figura 37 e figura 38) não ocorreu alteração na expressão dos mRNA.

Figura 27 – Análise da expressão gênica após o tratamento com GLA. Verifica-se a análise da expressão de COX-1 e COX-2 com 25 μM de GLA ou 50 μM de GLA. Para análise estatística foi usado Anova * $p < 0,05$. $n=3$ controle, $n=3$ tratado com 25 μM de GLA e $n=3$ tratado com 50 μM de GLA.

Figura 28 – Análise da expressão gênica após o tratamento com GLA. Verifica-se a análise da expressão de cPGES, PGES1 e PGES2, com 25 μM de GLA ou. 50 μM de GLA. Para análise estatística foi usado Anova * $p < 0,05$. $n=3$ controle, $n=3$ tratado com 25 de μM de GLA e $n=3$ tratado com 50 μM de GLA.

Figura 29 – Análise da expressão gênica após o tratamento com GLA. Verifica-se a análise da expressão de EP2 e EP4 com 25 μ M de GLA ou 50 μ M de GLA. Para análise estatística foi usado Anova * $p < 0,05$. $n=3$ controle, $n=3$ tratado com 25 de μ M de GLA e $n=3$ tratado com 50 μ M de GLA.

Figura 30 – Análise da expressão gênica após o tratamento com IBU. Verifica-se a análise da expressão de COX-1 e COX-2 com 25 μ M de IBU ou 50 μ M de IBU. Para análise estatística foi usado Anova * $p < 0,05$. $n=3$ controle, $n=3$ tratado com 25 μ M de IBU e $n=3$ tratado com 50 μ M de IBU.

Figura 31 – Análise da expressão gênica após o tratamento com IBU. Verifica-se a análise da expressão de cPGES, PGES1 e PGES2 com 25 μM de IBU ou 50 μM de IBU. Para análise estatística foi usado Anova * $p < 0,05$. $n = 3$ controle, $n = 3$ tratado com 25 μM de IBU e $n = 3$ tratado com 50 μM de IBU.

Figura 32 – Análise da expressão gênica após o tratamento com IBU. Verifica-se a análise da expressão de EP2 e EP4 com 25 μ M de IBU ou 50 μ M de IBU. Para análise estatística foi usado Anova * $p < 0,05$. $n=3$ controle, $n=3$ tratado com 25 μ M de IBU e $n=3$ tratado com 50 μ M de IBU.

Figura 33 – Análise da expressão gênica após o tratamento com PGE_1 . Verifica-se a análise da expressão de COX-1 e COX-2 com 10 μM de PGE_1 . Para análise estatística foi usado Anova. * $p < 0,05$ em relação ao controle. $n=3$ controle e $n=3$ tratado com PGE_1 .

Figura 34 – Análise da expressão gênica após o tratamento com PGE₁. Verifica-se a análise da expressão de cPGEs, PGES1, PGES2 com 10 μM de PGE₁. Para análise estatística foi usado Anova *p<0,05 em relação ao controle. n=3 controle e n=3 tratado com PGE₁.

Figura 35 – Análise da expressão gênica após o tratamento com PGE₁. Verifica-se a análise da expressão de EP2 e EP4 com 10 μ M de PGE₁. Para análise estatística foi usado Anova. * $p < 0,05$ em relação ao controle. $n=3$ controle e $n=3$ tratado com PGE₁.

Figura 36 – Análise da expressão gênica após o tratamento com PGE₂. Verifica-se a análise da expressão de COX-1 e COX-2 com 10 μ M de PGE₂. Para análise estatística foi usado Anova. * $p < 0,05$ em relação ao controle. $n = 3$ controle e $n = 3$ tratado com PGE₂.

Figura 37 – Análise da expressão gênica após o tratamento com PGE_2 . Verifica-se a análise da expressão de COX-1 e COX-2 com 10 μM de PGE_2 . Para análise estatística foi usado Anova. * $p < 0,05$ em relação ao controle. $n=3$ controle e $n=3$ tratado com PGE_2 .

Figura 38 – Análise da expressão gênica após o tratamento com PGE₂. Verifica-se a análise da expressão de COX-1 e COX-2 com 10 μ M de PGE₂. Para análise estatística foi usado Anova. * $p < 0,05$ em relação ao controle. $n = 3$ controle e $n = 3$ tratado com PGE₂.

4. 8 Análise da expressão da proteína

A fim de confirmar os achados em relação à ação do GLA e IBU sobre a expressão gênica das diversas proteínas (COX-1, COX-2, PGES1, PGES2, EP1, EP2, EP3 e EP4), prosseguiu-se então com as análises da expressão protéica das mesmas através da técnica de Western Blot. A expressão de COX-1, COX-2, PGES1 e PGES2 apareceu diminuída após o tratamento com GLA e IBU, condizendo com as análises dos mRNA.

No caso do GLA, a expressão de COX-1, COX-2, PGES1, PGES2, foram diminuídas apenas com a dose maior do tratamento (50 μ M) (figura 39). Com o IBU, a diminuição da expressão ocorreu para ambas às concentrações (25 μ M e 50 μ M) nos genes PGES1, PGES2. Para COX-1, COX-2 a diminuição da expresssão só ocorreu com a dose de 50 μ M (figura 40).

Apesar da tentativa de detecção dos receptores EPs, não foi possível verificar níveis protéicos de forma reprodutível na linhagem T98G.

Figura 39 – Análise da expressão protéica após o tratamento com GLA. Verifica-se a análise da expressão de COX-1, COX-2, PGES1 e PGES2 com 25 μM de GLA ou 50 μM de GLA. Para análise estatística foi usado. Anova. * $p < 0,05$ em relação ao controle. ** $p < 0,05$. $n=3$ em relação ao controle, $n=3$ tratado com 25 μM de IBU e $n=3$ tratado com 50 μM de IBU.

Figura 40 – Análise da expressão protéica após o tratamento com IBU. Verifica-se a análise da expressão de COX-1, COX-2, PGES1 e PGES2 com 25 μ M de IBU ou 50 μ M de IBU. Para análise estatística foi usado Anova. * $p < 0,05$ em relação ao controle. ** $p < 0,05$. $n = 3$ controle, $n = 3$ tratado com 25 μ M de IBU e $n = 3$ tratado com 50 μ M de IBU.

5 DISCUSSÃO

Glioblastomas (GBMs) são consideradas um dos piores cânceres humanos, caracterizado por uma alta taxa de proliferação, habilidade em infiltrar-se e invadir o tecido normal circundante (Nakada et al., 2006) e insensibilidade para com radioterapia e quimioterapia, bem como uma media de sobrevivência de menos de um ano na maioria dos pacientes (Fisher et al., 2007). Desta forma, novas estratégias terapêuticas fazem-se necessárias.

O GLA tem sido proposto como uma terapia antitumoral, por ter sua eficácia comprovada em vários tipos tumorais. Estudos feitos com este ácido graxo mostraram sua capacidade de induzir a apoptose, inibir a proliferação, migração e angiogênese, além de aumentar a sobrevida dos pacientes com glioma (Leaver et al., 2002^a; Benadiba et al., 2009). Porém o mecanismo pelo qual o GLA influencia todos esses processos não está totalmente elucidado.

Em nossos estudos, o tratamento realizado com GLA (50 μ M e 25 μ M) nas células T98G mostrou uma diminuição na proliferação celular e no número de mitoses das células tratadas com GLA. No tratamento de células C6, o GLA causou uma diminuição na proliferação (Ramos e Colquhoun, 2003; Miyake et al., 2009).

Segundo Benadiba et al. (2009), análise morfológica de células C6 tratadas com GLA mostrou uma diminuição de 25% na atividade mitótica dessas células. Em ratos “nudes” com tumores pancreáticos, a administração de GLA reduziu significativamente a proliferação das células tumorais, além de reduzir o tumor (Cooper e Johnson, 1998).

No estudo realizado com quatorze linhagens de vários tumores resistentes a quimioterápico, as células foram incubadas com GLA (25-100 μ M) e quimioterápico (1 μ M). Essa combinação de GLA e quimioterápico reduziu significativamente a viabilidade celular dos tumores de maneira dose dependente. Outro fato importante foi que o efeito combinado do quimioterápico e GLA foi seletivamente tóxico para as células malignas, pois nenhum efeito citotóxico foi observado em fibroblastos da pele humana normal e células endoteliais microvasculares (Wirtitsch et al., 2009).

A migração celular é um processo normal em algumas células, e consiste de um processo multifatorial dependente da interação célula-matriz, célula-célula e processos que ocorrem no interior da célula, os quais matam a movimentação da mesma. No trabalho realizado com linhagem de glioma de rato (C6) o GLA e seus metabólitos inibiram a migração das células (Ramos e Colquhoun, 2003).

Em um trabalho realizado com linhagem de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231) e de cólon (HT115 e HRT-18), o tratamento com GLA reduziu a migração, aderência das células cancerosas e a mobilidade da célula (Watkins et al., 2005).

Apoptose constitui uma linha de defesa do organismo contra o câncer. O equilíbrio entre a proliferação celular e morte celular determina o crescimento das populações de células tumorais. Com inúmeras alterações genéticas, a célula consegue escapar dos mecanismos de checagem e apoptose. Isso faz com que a célula tumoral seja capaz de continuar o ciclo e originar células com inúmeras alterações genéticas.

O GLA e seus metabólitos afetam a expressão de vários genes que possuem uma papel importante no processo da apoptose (Kapoor et al., 2006). Como foi observado nos resultados o tratamento com GLA aumentou o número de células em apoptose. Típicos núcleos apoptóticos foram mostrados através de coloração de Hoechst 33342. Estes dados foram complementados com os ensaios de atividade de caspase 3 e caspase 9 ativada, no qual observou a presença dessas caspases ativadas nos grupos tratados com GLA e não nos controles.

O GLA foi capaz de aumentar o número de células tumorais em processos de apoptoses. Este fato se confirma com o aumento no percentual de apoptose nas células Huh7 após o tratamento com GLA (Itoh et al., 2010). Os mecanismos de ação do GLA sobre a apoptose ainda não está bem elucidados, porém acredita-se que esteja envolvido com diversas vias de sinalização, reparação de DNA, alterações na composição da membrana lipídicas entre outras (Leaver et al., 2002; Colquhoun et al., 2009; Benadiba et al., 2009; Colquhoun, 2010).

Em células tumorais de leucemia, a administração de GLA resultou na morte de células K562, de maneira dose-dependente. Além disso, a liberação de citocromo c, a ativação da caspase-3 e clivagem da PARP foram encontrados no grupo tratado com GLA e não no grupo controle. Esses resultados sugerem que a apoptose pode ser mediada pela liberação de citocromo c e a ativação da caspase-3 (Yu et al., 2008; Ge et al., 2009). Em outro estudo realizado com célula de leucemia, o GLA inibiu a proliferação celular e induziu a apoptose na linhagem K562. Os resultados também mostraram o aumento da atividade da caspase-3 nas células tratadas com GLA (Kong et al., 2006).

Outro mecanismo que pode explicar a influência do GLA no processo de apoptose é com a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), uma vez que o

ERO é capaz de oxidar aminoácidos das proteínas e causar o dano ao DNA, levando á morte celular (Zhang et al., 2009).

Em células de glioma tratadas com GLA, foi observado um aumento na produção de ERO (Leaver et. al, 1999). Esse aumento de ERO também foi confirmado no trabalho de Colquhoun e Schumacher, (2001), junto com a liberação de citocromo c e a ativação de caspases.

Outro fato relevante é a indução da apoptose pela proteína p53. O acúmulo de p53 nas células tumorais pode induzir a liberação da caspase-3 e liberação do citocromo-c da mitocôndria (Park et al., 2005). Em um estudo realizado com GBM de rato, foi possível observar um aumento significativo da expressão de p53 nos animais tratados com GLA, enquanto que nos animais controles a expressão de p53 não foi alterada (Miyake et al., 2009). Em outro estudo com glioma, o GLA diminuiu a expressão de oncogenes ras, e Bcl-2 e aumentou a atividade da p53 (Das, 2007).

As alterações causadas por GLA na diminuição da proliferação celular, migração e aumento da apoptose, podem ser explicado pela possível relação existente entre o GLA e PGE₂.

O PGE₂ é o metabólito mais produzido através de COX-2 na maioria das células. Este prostanóide este relacionado, em muitos tipos tumorais, com a indução da migração, proliferação e metástase. Em gliomas, a superexpressão de PGE₂ e de COX-2 também está presente (Shono et al., 2001).

No trabalho realizado com suplementação de GLA em ratos com câncer de próstata, os resultados mostraram uma redução do tumor após o tratamento com ibuprofeno. Essa mudança foi atribuída a PGE₂, uma vez que este prostanóide estava presente no tumor em grande quantidade e com a suplementação de GLA ocorreu à diminuição deste (Pham et al., 2006).

Como característica o GLA possui a capacidade de modificar a síntese dos prostanóides por competição. Em grandes quantidades nas células o GLA é alongado e desnaturado, originando DHGLA, o qual compete com AA pela enzima COX. Quando o DHGLA é metabolizado pela COX-2, forma PGE₁, que possui efeitos semelhantes á PGE₂, porém menos eficientes.

No nosso trabalho o tratamento com GLA influenciou a diminuição da expressão dos mRNAs de COX-2, COX-1, cPGES, PGES1 e PGES2. No caso dos receptores EP2 e EP4 a expressão do mRNA também foi diminuída na presença de GLA. Isso sugere que a ação de PGE₂ é mediada através de seus receptores.

Para a análise da expressão protéica, os dados foram similares aos obtidos com o mRNA de COX-2, COX-1, PGES1 e PGES₂, porém a expressão protéica dos EPs não foi detectada. A partir dessas observações podemos sugerir a relação de PGE₂ com glioblastoma multiforme, pois uma vez diminuída a ação de PGE₂ pelo tratamento com GLA a proliferação e a migração foram diminuídas, além de um aumento da apoptose.

Em uma segunda etapa foi realizado o tratamento das células T98G com ibuprofeno (AINEs), para confirmar a influência de PGE₂ na apoptose, migração e proliferação dessa célula. O mecanismo de ação do ibuprofeno ocorre através da inibição não seletiva das ciclooxigenases (COX-1 e COX-2), enzimas responsáveis pelo metabolismo das prostaglandinas.

Um grande número de estudos epidemiológicos e experimentais mostraram que o uso de aspirina e outros AINEs podem não só reduzir a incidência de câncer colorretal, mas também diminuir os pólipos do cólon existentes ou adenoma. Um efeito similar dos AINEs, também foi encontrado em muitos tipos de câncer como pulmão, próstata, mama, estômago e bexiga (Baron et al., 2000; Ulrich et al., 2006; Johnson et al., 2010).

O tratamento com diclofenaco de sódio ou meloxicam inibiu significativamente a proliferação das células T98G, U118 e U373 em GBM (Kim et al., 2009). Em modelo de rato (C6), o tratamento com aspirina ou celecoxib inibiu a produção de PGE₂ e conseqüentemente o desenvolvimento do glioma (Fujita et al., 2011).

A proliferação e a invasão na linhagem U87-MG de glioma humano foram inibidas *in vitro* com o uso de inibidores específico de COX-2 (NS-398), que bloqueou a síntese de PGE₂ sugerindo um papel funcional para COX-2/PGE₂ em glioma (Chiu et al., 2010). Tais relatos dão suporte às observações feitas em nosso trabalho em relação a diminuição da proliferação celular em T98G tratadas com ibuprofeno.

Stolfi et al. (2008) mostrou em câncer de cólon que a inibição do mRNA de COX-2 está associado com a diminuição da síntese de PGE₂, inibição da proliferação e indução da apoptose. Os nossos estudos também mostraram uma diminuição na expressão do mRNA de COX-2 quando tratada com ibuprofeno. O mesmo ocorreu com a análise da expressão protéica de COX-1 e COX-2 tratadas com ibuprofeno.

Outro evento fortemente evidenciado pelo tratamento com ibuprofeno em T98G, foi à diminuição da migração. Em ambos os ensaios de migração realizados a presença de ibuprofeno teve um efeito inibitório na migração.

Uma possível explicação para a diminuição da migração é a ação de PGE_2 via receptores EP2 e EP4. Uma vez, que a expressão do mRNA desses receptores estava diminuídas em relação aos controles, e a expressão protéica nem foi detectada. PGE_2 promove em câncer de pulmão o aumento da migração através da ativação dos receptores de PGE_2 (Kim et al., 2010).

Estudos incluindo celoxib em melanoma resultou na redução de migração celular e redução da expressão de EP2 e EP4 (Singh et al., 2011). Um efeito muito similar na redução da migração, também foi observado em células de melanomas, tratadas com ibuprofeno (Redpath et al., 2009). Ensaio de transwell e de monocamada mostraram uma diminuição na migração em câncer de próstata tratada com AINEs (Wynne e Djakiew, 2010). Em gliomas o uso de AINEs nas linhagens A172, U87MG, U251MG e U373MG inibiu o processo de migração em todas as linhagens analisadas (Wang et al., 2005).

Outro processo alterado pelos AINEs foi a indução da apoptose (Wang et al., 2009; Xiang et al., 2009). Em câncer de cólon foi demonstrado que o uso de indometacina reduziu a concentração de PGE_2 no tecido normal e em tumores coloretais. Está redução do teor de PGE_2 no tecido do tumor está relacionada a alterações significativas na expressão de vários genes, incluindo genes relacionados ao controle do ciclo celular e apoptose (Gustafsson et al., 2010).

Nossos resultados demonstraram que as células de glioma T98G mostraram sinais de apoptose após tratamento com duas concentrações de ibuprofeno. Em um estudo recente, o tratamento de células de glioma U87-MG com nanopródrogas de Ibuprofeno (25 μM e 50 μM) resultou em um aumento significativo na morte celular (Bidwell et al., 2010). Em outro estudo, a aspirina induziu apoptose através da inibição da ciclina D1 e Bcl-2 na linha de glioma humano A172. Na mesma linhagem de glioma (A172), o tratamento com celocoxib também induziu a apoptose. E tais efeitos estavam relacionados com ativação de p53, redução de Bcl-2 e aumento na atividade da caspase-3 (Chen et al., 2007).

Como terceira e ultima etapa da avaliação do papel de PGE_2 na proliferação, migração e apoptose, foram adicionados PGE_1 ou PGE_2 exógeno nas células T98G. O tratamento com PGE_2 exógeno aumentou a migração e a invasão em vários tipos celulares de cânceres humanos (Tsujii et al., 1997; Sheng et al., 2001; Li et al., 2002; Han and Wu, 2005; Singh et al., 2005).

Nossos resultados mostraram que após a adição de PGE₁ ou PGE₂ nas células, a proliferação e a migração foram aumentadas, e a apoptose inibida. Reforçando a idéia de que PGE₂ está influenciando as células T98G nos processos analisados a cima.

Em carcinoma coloretal a adição de PGE₂ exógeno, afetou a expressão de genes e de alguma forma aumentou a progressão do tumor (Mauritz et al., 2006). No tumor de cólon a adição de PGE₂ inibe a apoptose através de BAX (Lalier et al., 2011).

Em carcinoma de pulmão, o aumento da migração ocorreu com a adição de PGE₂ exógeno, e ficou evidente o papel dos receptores EPs (Rozic et al., 2001). Em células de câncer de cólon (HT29) a inibição de COX-2 e PGE₂ reduziu o nível de migração, enquanto que a adição de PGE₂ exógeno elevou novamente a porcentagem de migração (Banu et al., 2007).

Baseado em nossos achados experimentais, demonstramos um papel de PGE₂ na migração, apoptose e proliferação de T98G, processos importantes para o desenvolvimento do glioma. Assim a importância de se continuar estudando para cada vez mais entender como PGE₂ e outros eicosanóides estão influenciando T98G. E através destes resultados buscar potenciais alvos terapêuticos como as prostaglandinas sintases e receptores EPs para estratégias terapêuticas mais eficazes.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que PGE_2 está envolvido na proliferação, migração e apoptose das células T98G de glioma humano. Os resultados mostraram que o uso do GLA, um competidor com AA pelas cicloxigenases, inibiu a proliferação e migração, além de aumentar a apoptose. Com o uso do IBU, inibidor da atividade das ciclooxygenases, os efeitos obtidos nos processos analisados foram muito mais significativos que com o GLA. A adição de PGE_1 e PGE_2 exógeno resultou no aumento da proliferação e migração, junto com a redução da apoptose confirmando a influência de PGE_2 sobre as células T98G.

REFERÊNCIAS*

Andrews JD, Jakiew D, Krygier S, Andrews P. Superior effectiveness of ibuprofen compared with other s for reducing the survival of human prostate câncer cells. *Câncer Chemother Pharmacol*. 2002 Oct;50(4):277-84.

Bai XM, Zhang W, Liu NB, Jiang H, Lou KX, Peng T, Ma J, Zhang L, Zhang H, Leng J. Focal adhesion kinase: important to prostaglandin E₂-mediated adhesion, migration and invasion in hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Rep*. 2009 Jan;21(1):129-36.

Bakshi A, Mukherjee D, Bakshi A, Banerji AK, Das UN. Gamma-linolenic acid therapy of human gliomas. *Nutrition*. 2003 Apr;19(4):305-9.

Baron JA, Sandler RS. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and câncer prevention. *Annu Rev Med*. 2000; 51:511-23.

Banu N, Buda A, Chell S, Elder D, Moorghen M, Paraskeva C, Qualtrough D, Pignatelli M.

Inhibition of COX-2 with NS-398 decreases colon câncer cell motility through blocking epidermal growth factor receptor transactivation: possibilities for combination therapy. *Cell Prolif*. 2007 Oct;40(5):768-79.

Behin A, Hoang-Xuan K, Carpentier AF, Delattre J. Promary braisn tumours in adults. *Lancet*. 2003 Jan;361(9354):323-31.

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(3):244-51.

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

1

Bidwell P, Joh K, Leaver HA, Rizzo MT: Prostaglandin E₂ activates cAMP response element-binding protein in glioma cells via a signaling pathway involving PKA-

* De acordo com:

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

dependent inhibition of ERK. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2010 Feb;91(1-2):18-29.

Bos CL, Richel, DJ, Ritsema T, Peppelenbosch MP, Versteeg HH. Prostanoids and prostanoids receptors in signal transduction. Int J Biochem Cell Biol. 2004 Jul;36(7):1187-205.

Campos CB, Degasperi GR, Pacífico DS, Alberici LC, Carreira RS, Guimarães F, Castilho RF, Vercesi AE. Ibuprofen-induced Walker 256 tumor cell death: cytochrome c release from functional mitochondria and enhancement by calcineurin inhibition. Biochem Pharmacol. 2004 Dec;68(11):2197-206.

Chen JC, Chen Y, Su YH, Tseng SH. Celecoxib increased expression of 14-3-3sigma and induced apoptosis of glioma cells. Anticancer Res. 2007 Jul-Aug;27(4B):2547-54.

Chiu WT, Shen SC, Chow JM, Lin CW, Shia LT, Chen YC: Contribution of reactive oxygen species to migration/invasion of human glioblastoma cells U87 via ERK-dependent COX-2/PGE(2) activation. Neurobiol Dis. 2010 Jan;37(1):118-29.

Coleman RA, Smith WL, Narumiya S. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. Pharmacol Rev. 1994 Jun;46(2):205-29.

Colquhoun A. Lipids, mitochondria and cell death: implications in neuro-oncology. Mol Neurobiol. 2010 Aug;42(1):76-88

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;1533(3):207-19.

Colquhoun A, Miyake JA, Benadiba M: invited Review. Fatty acids, eicosanoids and cancer. Nutrit Ther Metabol, 2009 Jan;29(1):29-36

Cooper A, Johnson CD: Effect of lithium gamma-linolenate on the growth of experimental human pancreatic carcinoma. Br J Surg. 1998 Sep;85(9):1201-5.

Das UN, Prasad VV, Reddy DR: Local application of gamma-linolenic acid in the treatment of human gliomas. Cancer Lett. 1995 Aug;94(2):147-55.

Das UN. From bench to the clinic: gamma-linolenic acid therapy of human gliomas. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2004 Jun;70(6):539-52.

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

Das UN. Gamma-linolenic acid therapy of human glioma-a review of in vitro, in vivo, and clinical studies. Med Sci Monit. 2007 Jul;13(7):RA119-31.

de Groot DJ, de Vries EG, Groen HJ, de Jong S: Non-steroidal anti-inflammatory drugs to potentiate chemotherapy effects: from lab to clinic. Crit Rev Oncol Hematol. 2007 Jan;61(1):52-69.

Dubinett SM, Sharma S, Huang M, Dohadwala M, Pold M, Mao J.T.. Cyclooxygenase-2 in lung câncer. Progress in Experimental Tumor Research. 2003;37:138–62.

Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, Lipsky PE. Cyclooxygenase and diases.The FASEB Journal.1998 Jun;12:1063-73.

Dorsm RT, Gutkind JS. G-protein-coupled receptors and câncer. Nat Ver Câncer. 2007 Feb;7(2):79-94

Fujino H, Chen XB, Regan JW, Murayama T. ndomethacin decreases EP2 prostanoid receptor expression in colon câncer cells. Biochem Biophys Res Commun. 2007 Aug;359(3):568-73.

Fujita M, Kohanbash G, Fellows-Mayle W, Hamilton RL, Komohara Y, Decker SA, Ohlfest JR, Okada H. COX-2 blockade suppresses gliomagenesis by inhibiting myeloid-derived suppressor cells.Câncer Res. 2011 Apr;71(7):2664-74.

Ge H, Kong X, Shi L, Hou L, Liu Z, Li P. Gamma-linolenic acid induces apoptosis and lipid peroxidation in human chronic myelogenous leukemia K562 cells. Cell Biol Int. 2009 Mar;33(3):402-10.

Greenhough A, Smartt HJ, MooreAE, Roberts HR, Williams AC, Paraskeva C, etal. The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of câncer and adaptation to the tumour microenvironment. Carcinogenesis.2009 Mar;30(3):377-86.

Gustafsson A, Andersson M, Lagerstedt K, Lönnroth C, Nordgren S, Lundholm K: Receptor and enzyme expression for prostanoid metabolism in colorectal cancer related to tumor tissue PGE₂. *Int J Oncol*. 2010 Jun;36(2):469-78.

Han EH, Kim HG, Hwang YP, Song GY, Jeong HG. *Toxicol Sci*. Prostaglandin E₂ induces CYP1B1 expression via ligand-independent activation of the ERalpha pathway in human breast cancer cells. 2010 Apr;114(2):204-16.

Harris RE, Beebe-Donk J, Doss H, Burr Doss D. Aspirin, ibuprofen, and other non-steroidal anti-inflammatory drugs in cancer prevention: a critical review of non-selective COX-2 blockade (review). *Oncol Rep*. 2005 Apr;13(4):559-83.

Hasegawa K., Ohashi Y, Ishikawa K, Yasue A, Kato R, Achiwa Y: Expression of cyclooxygenase-2 in uterine endometrial cancer and anti-tumor effects of a selective COX-2 inhibitor. *International Journal of Oncology*. 2005 Sep;26:1419-1428.

Holland EC. Gliomagenesis: Genetic alterations and mouse models. *Nat Rev Genet*. 2001 Feb;2(2):120-9.

Husvik C, Khuu C, Bryne M, Halstensen TSJ *Dent Res*. PGE₂ production in oral cancer cell lines is COX-2-dependent. 2009 Feb;88(2):164-9.

Itoh S, Taketomi A, Harimoto N, Tsujita E, Rikimaru T, Shirabe K, Shimada M, Maehara Y. Antineoplastic effects of gamma linolenic Acid on hepatocellular carcinoma cell lines. *J Clin Biochem Nutr*. 2010 Jul;47(1):81-90.

Johnson CC, Hayes RB, Schoen RE, Gunter MJ, Huang WY: Non-steroidal anti-inflammatory drug use and colorectal polyps in the prostate, lung, colorectal, and ovarian cancer screening trial. *Am J Gastroenterol*. 2010, 105(12):2646-55.

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 Brain Res Rev*. 2004, 45(3):143-63.

John-Aryankalayil M, Palayoor ST, Cerna D, Falduto MT, Magnuson SR, Coleman CN: NS-398, ibuprofen, and cyclooxygenase-2 RNA interference produce significantly different gene expression profiles in prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2009 Jan;8(1):261-73.

Kapoor R, Huang YS. Gamma linolenic acid: an antiinflammatory omega-6 fatty acid. *Curr Pharm Biotechnol*. 2006 Dec;7(6):531-4.

Kawai N, Tsujii M, Tsuji S: Cyclooxygenases and colon câncer. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2002, 68-69:187-96.

Kern MA, Haugg AM, Koch AF, Schilling T, Breuhahn K, Walczak H, Fleischer B, Trautwein C, Michalski C, Schulze-Bergkamen H, Friess H, Stremmel W, Krammer PH, Schirmacher P, Müller M. Cyclooxygenase-2 inhibition induces apoptosis signaling via death receptors and mitochondria in hepatocellular carcinoma. Câncer Res. 2006 Jul;66(14):7059-66.

Kim SR, Bae MK, Kim JY, Wee HJ, Yoo MA, Bae SK: Aspirin induces apoptosis through the blockade of IL-6-STAT3 signaling pathway in human glioblastoma A172 cells. Carcinogenesis. 2009, 30(3):377-86.

Kobayashi T, Nakatani Y, Tanioka T, Tsujimoto M, Nakajo S, Nakaya K, Murakami M, Kudo I.
Regulation of cytosolic prostaglandin E synthase by phosphorylation. Biochem J. 2004 Jul;381(Pt 1):59-69.

Kong X, Ge H, Hou L, Shi L, Liu Z. Induction of apoptosis in K562/ADM cells by gamma-linolenic acid involves lipid peroxidation and activation of caspase-3. Chem Biol Interact. 2006 Aug;162(2):140-8.

Kudo I, Murakami M. Prostaglandin e synthase, a terminal enzyme for prostaglandin E2 biosynthesis. J Biochem Mol Biol. 2005 Nov;38(6):633-8.

Lalier L, Pedelaborde F, Braud C, Menanteau J, M Vallette F, Olivier C. Increase in intracellular PGE2 induces apoptosis in Bax-expressing colon câncer cell. BMC Câncer. 2011 Apr;11:153.

Lalier L, Cartron PF, Olivier C, Logé C, Bougras G, Robert JM, Oliver L, Vallette FM. Prostaglandins antagonistically control Bax activation during apoptosis. Cell Death Differ. 2011 Mar;18(3):528-37.

Liu XH, Yao S, Kirschenbaum A, Levine AC. NS398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis and down-regulates bcl-2 expression in LNCaP cells. Câncer Res. 1998 Oct;58(19):4245-9.

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: Antitumour and pro-apoptotic actions of highly unsaturated fatty acids in glioma. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2002, 66(1):19-29.

Leaver HÁ, 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 Nov;67(5):283-92.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler DO, Cavenee KW, Burger CP, Jouvet A, Cheithauer WB, Kleihues P. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol*. 2007;114:97–109.

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

Mahmud SM, Franco EL, Turner D, Platt RW, Beck P, Skarsgard D, Tonita J, Sharpe C, Aprikian AG. Use of non-steroidal anti-inflammatory drugs and prostate cancer risk: a population-based nested case-control study. *PLoS One*. 2011 Jan;6(1):e16412.

Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, Zweifel BS, Settle SL, Woerner BM, Edwards DA, Flickinger AG, Moore RJ, Seibert K: Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer Res*. 2000, 60(5):1306-11.

Mauritz I, Westermayer S, Marian B, Erlach N, Grusch M, Holzmann K. Prostaglandin E(2) stimulates progression-related gene expression in early colorectal adenoma cells. *Br J Cancer*. 2006 Jun;94(11):1718-25

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;8:8.

Murakami M, Naraba H, Tanioka T, Semmyo N, Nakatani Y, Kojima F, Ikeda T, Fueki M, Ueno A, Oh S, Kudo I. Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J Biol Chem*. 2000 Oct ;275(42):32783-92.

Murakami M, Nakashima K, Kamei D, Masuda S, Ishikawa Y, Ishii T, Ohmiya Y, Watanabe K, Kudo I. Cellular prostaglandin E₂ production by membrane-bound prostaglandin E synthase-2 via both cyclooxygenases-1 and -2. *J Biol Chem*. 2003 Sep ;278(39):37937-47.

Minniti G, Muni R, Lanzetta G, Marchetti P, Enrici RM: Chemotherapy for Glioblastoma: Current Treatment and Future Perspectives for Cytotoxic and Targeted Agents. *Anticancer Res*. 2009 Dec;29(12):5171-84.

Newa M, Bhandari KH, Kim JO, Im JS, Kim JA, Yoo BK, Woo JS, Choi HG, Yong CS.

Enhancement of solubility, dissolution and bioavailability of ibuprofen in solid dispersion systems. *Chem Pharm Bull*. 2008 Apr;56(4):569-74.

Naidu MRC, Das UN, Kishan A: Intratumoral gamma-linolenic of acid therapy of human gliomas. *Essenc. Fatty Acids* 1992 Jun;70(6):539-52.

Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Dammeerman RS, Kriegstein AR. Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature*. 2001 Feb ;409(6821):714-20.

Ohgaki H. Genetic pathways to glioblastomas. *Neuropathology*. 2005 Mar;25(1):1-7.

Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol*. 2007 May;170(5):1445-53.

Ohgaki H: Epidemiology of brain tumors. *Cancer Sci*. 2009 Dec;100(12):2235-41.

Otto JC, Smith WL. Prostaglandin endoperoxide synthases -1 and -2. *J Lipid Mediat Cell Signal*. 1995 Oct;12(2-3):139-56.

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 PGE₂ and 5S-HETE. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2006 Apr;74(4):271-82.

Ramos KJ, 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.

Redpath M, Marques CM, Dibden C, Waddon A, Lalla R, Macneil S. Br J Dermatol. Ibuprofen and hydrogel-released ibuprofen in the reduction of inflammation-induced migration in melanoma cells. 2009 Jul;161(1):25-33

Rozic JG, Chakraborty C, Lala PK. Cyclooxygenase inhibitors retard murine mammary tumor progression by reducing tumor cell migration, invasiveness and angiogenesis. Int J Câncer. 2001 Aug;93(4):497-506.

Sen S, Dong M, Kumar S: Isoform-Specific Contributions of α -Actinin to Glioma Cell Mechanobiology. PLoS One. 2009, 4(12):8427.

Sheng H, Shao J, Washington MK, Dubois RN. Prostaglandin E₂ increases growth and motility of colorectal carcinoma cells. J Biol Chem. 2001 May ;276(21):18075-81

Shono T, Tofilon P.J, Bruner JM, Owolabi O, Lang FF: Cyclooxygenase-2 expression in human gliomas: prognostic significance and molecular correlations. Câncer Res.2001, 61:4375-81.

Simmons DL, Botting RN, Hla T. Cyclooxygenase isozymes: The biology of prostaglandin synthesis and inhibition. Pharmacological Reviews. 2004; 56:387-437.

Singh T, Vaid M, Katiyar N, Sharma S, Katiyar SK. Berberine, an isoquinoline alkaloid, inhibits melanoma câncer cell migration by reducing the expressions of cyclooxygenase-2, prostaglandin E₂ and prostaglandin E₂ receptors. Carcinogenesis. 2011 Jan;32(1):86-92. Epub 2010 Oct 25.

Stichtenoth DO, Thorén S, Bian H, Peters-Golden M, Jakobsson PJ, Crofford LJ. Microsomal prostaglandin E synthase is regulated by proinflammatory cytokines and glucocorticoids in primary rheumatoid synovial cells. J Immunol. 2001 Jul;167(1):469-74.

Stolfi C, Fina D, Caruso R, Caprioli F, Sarra M, Fantini MC, Rizzo A, Pallone F, Monteleone G.

Cyclooxygenase-2-dependent and -independent inhibition of proliferation of colon câncer cells by 5-aminosalicylic acid. Biochem Pharmacol. 2008 Feb ;75(3):668-76.

Sugimoto Y, Narumiya S: Prostaglandin E receptor. J Biol Chem. 2007 Apr 20;282(16):1613-7.

Tanikawa N, Ohmiya Y, Ohkubo H, Hashimoto K, Kangawa K, Kojima M, Ito S, Watanabe K.
Identification and characterization of a novel type of membrane-associated prostaglandin synthase. Biochem Biophys Res Commun. 2002 Mar 8;291(4):884-9.

Ulrich CM, Bigler J, Potter JD: Non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: promise, perils and pharmacogenetics. Nat Rev Cancer. 2006, 6(2):130-40.

Xiang S, Sun Z, He Q, Yan F, Wang Y, Zhang J. Aspirin inhibits ErbB2 to induce apoptosis in cervical cancer cells. Med Oncol. 2010 Jun;27(2):379-87.

Watkins G, Martin TA, Bryce R, Mansel RE, Jiang WG Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. . Gamma-Linolenic acid regulates the expression and secretion of SPARC in human cancer cells. 2005 Apr;72(4):273-8.

Wang M, Yoshida D, Liu S, Teramoto A. Inhibition of cell invasion by indomethacin on glioma cell lines: in vitro study. J Neurooncol. 2005 Mar;72(1):1-9.

Wang YZ, Cao B, Li SX, Zang ZH, Zhang JZ, Chen H. Effect of proliferation, cell cycle, and Bcl-2s of MCF-7 cells by resveratrol. J Asian Nat Prod Res. 2009;11(4):380-90

Wang D, Dubois RN: Measurement of eicosanoids in cancer tissues. Methods Enzymol. 2007, 433:27-50.

Wirtitsch M, Roth E, Bachleitner-Hofmann T, Wessner B, Sturlan S Oncol Res. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids enhance arsenic trioxide efficacy in arsenic trioxide-resistant leukemic and solid tumor cells. 2009 Sep;18(2-3):83-94.

Wynne S, Djakiew D. inhibition of prostate cancer cell migration is mediated by Nag-1 Induction via the p38 MAPK-p75(NTR) pathway. Mol Cancer Res. 2010 Dec;8(12):1656-64.