Danielle Fontes de Almeida

**Avaliação do perfil de expressão
gênica de linhagens celulares do
tecido mamário com diferentes
níveis de expressão do receptor
HER-2 tratadas com ácido
docosahexaenoico**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Dan Linetzky Waitzberg

São Paulo

2013

Danielle Fontes de Almeida

**Avaliação do perfil de expressão
gênica de linhagens celulares do
tecido mamário com diferentes
níveis de expressão do receptor
HER-2 tratadas com ácido
docosahexaenoico**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de: Oncologia
Orientador: Prof. Dr. Dan Linetzky Waitzberg

São Paulo

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
©reprodução autorizada pelo autor

Almeida, Danielle Fontes de

Avaliação do perfil de expressão gênica de linhagens celulares do tecido mamário com diferentes níveis de expressão do receptor HER-2 tratadas com ácido docosahexaenoico / Danielle Fontes de Almeida. -- São Paulo, 2013.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Oncologia.

Orientador: Dan Linetzky Waitzberg.

Descritores: 1.Neoplasias da mama 2.Linhagem celular 3.Ácidos graxos ômega-3
4.Ácidos docosahexaenoicos 5.Expressão gênica 6.Nutrigenômica 7.Receptor HER-2

USP/FM/DBD-110/13

À pessoa mais importante durante toda essa trajetória,

Rita de Cássia Borges de Castro.

Se não fosse por você tudo teria sido muito mais difícil.

Amigos são anjos enviados para cuidarem de nós.

À minha família:

Meus pais e meus irmãos que sempre me apoiaram;

Minhas amigas da vida inteira, pela força e carinho de sempre;

Meu namorado, Marcelo, por todo o amor e dedicação.

A importância que vocês têm na minha vida

supera os limites da escrita.

Agradecimentos

Ao meu grande mestre e orientador Prof. Dan L. Waitzberg, por toda a orientação nesses anos, por todo apoio na pesquisa científica e nas escolhas da minha vida.

À querida tutora Rose, Rosimeire Aparecida Roela, por todo carinho, paciência, ensinamentos científicos e pessoais.

À pequena Tuty, Tatiane Furuya, que me ajudou muito com seus detalhes, tanto nos experimentos quanto na parte teórica.

Aos meus amigos queridos, Paulo Roberto Del Valle, Simone Fernandes, Ruan Mendrano e Thiago Salles, pelas conversas moleculares e por toda a companhia de sempre.

À Aline de Conti, pesquisadora e mulher que tanto admiro meus agradecimentos em especial pela fase da escrita do artigo científico.

À minha amiga Karina Al Assal, nutricionista que me transborda de orgulho.

À Dra. Ângela Flávia Logullo Waitzberg por ter me recebido em sua casa com tanto carinho por todos esses anos, pelas conversas científicas e pela elaboração do artigo científico.

Aos colegas do laboratório Metanutri por todos esses anos de discussão científica. Em especial à Priscila Garla, por todas nossas conversas e pela nossa amizade.

Ao laboratório de oncologia experimental, LIM 24, grupo mama, por toda dedicação e companheirismo.

Ao laboratório do Prof. Roger Chammas por toda ajuda durante esse percurso.

À todos os funcionários a FMUSP que me ajudaram por todos esse anos.

Enfim, a todos que me ajudaram de alguma maneira nesse projeto e na minha vida!

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Nutrição e Cirurgia Metabólica do Aparelho Digestivo (LIM35) do Departamento de Gastroenterologia em conjunto com o Laboratório de Oncologia Experimental (LIM 24) do Departamento de Radiologia, ambos da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

O apoio financeiro foi concedido sob a forma de bolsa de mestrado e auxílio à pesquisa pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) sob números 2010/01736-2 e 2009/52244-5.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”

Cora Coralina

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Abstract

1. Introdução	1
1.1 Revisão da literatura	6
2. Objetivos	13
3. Métodos	15
4. Resultados	34
5. Discussão	69
6. Conclusão	79
7. Referências bibliográficas	81
8. Apêndices	

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus celsius
µg	microgramas
µl	microlitros
µM	micromolar
AGCC	ácidos graxos de cadeia curta
AGCL	ácidos graxos de cadeia longa
AGCM	ácidos graxos de cadeia média
AGPI	AG poli-insaturados
AGPI n-3	ácidos graxos poli-insaturados da família ômega 3
AGs	Ácidos graxos
ANGPTL4	(angiopoietin-like 4)
ATCC	do Inglês American Type Culture Collection
CD36	(CD36 molecule-thrombospondin receptor)
cDNA	DNA complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
c-ErbB2	homologo 2 do oncogene viral de leucemia eritroblástica
cm²	centímetros quadrados
CO₂	Dióxido de carbono
DEGs	genes diferencialmente expressos
DEPEC	dietilpirocarbonato
DHA	ácido docosaheptaenoico
DMEM	Dubelcco's Modified Eagle's Medium
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	<i>ácido desoxirribonucléico</i>
dNTP	desoxiribonucleotídeos
EPA	ácido eicosapentaenoico
ER	receptor de estrógeno
<i>ERBB2</i>	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2
FDR	False Discovery Rate
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
g	força da gravidade (aceleração centrípeta)
GO	Gene Ontology
Hb4a	<i>linhagem celular epitelial</i> mamária humana derivada de mamoplastia imortalizada pela transfecção do antígeno T grande do vírus SV40
HB4aC5.2	
HER-2	receptor de fator de crescimento epidermal 2
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IPA	Ingenuity Pathway Analysis
M	molar

Lista de Abreviaturas

mg	miligrama
ml	mililitro
mM	milimolar
NCBI	(National Center for Biotechnology Information)
ng	nanogramas
nM	nanometros
pb	pares de bases
PM	Perfect Match
PPARA	peroxisome proliferator-activated receptor alpha
PPARG	peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PR	receptor de progesterona
RIN	RNA Integrity Number
RMA	Robust Multiarray Average
RNA	ácido ribonucléico
RNAm	ácido ribonucléico mensageiro
RPMI	meio de cultura
RT	enzima Transcriptase Reversa
RT-qPCR	reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa
SAM	Significance Analysis of Microarrays
SFB	soro fetal bovino
SKBR-3	células luminais de adenocarcinoma de mama humano
SREBP	sterol regulatory element binding transcription factor 2
UI	Unidade internacional

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Elongação e dessaturação de ácidos graxos da família ômega 6 e ômega 3.	Pag.9
Figura 2	Esquema ilustrativo da sequência de procedimentos realizados na primeira etapa do estudo	Pag.17
Figura 3	Esquema representativo de um gene com as regiões de cobertura dos Genechips®.	Pag.20
Figura 4	Análise da integridade do RNA total utilizando o Bioanalyser.	Pag.35
Figura 5	Imagens obtidas pelo Scanner 3000 após a hibridização das amostras.	Pag.36
Figura 6	Relação entre <i>perfect mean</i> e <i>background mean</i> nos Genechips®	Pag.37
Figura 7	Relação “positivos <i>versus</i> negativos” nos Genechips®	Pag.38
Figura 8	Controles positivos de hibridização.	Pag.39
Figura 9	Controle de amplificação externo.	Pag.40
Figura 10	Histograma de Sinal.	Pag.41
Figura 11	<i>Box plots</i> com média aproximada no valor 0.	Pag.42
Figura 12	Novo desenho de análise estatística com análise pareada e com permutação.	Pag.44
Figura 13	Rede de ligações gênicas na linhagem HB4a; DEGs.	Pag.47
Figura 14	Rede de ligações gênicas na linhagem HB4a. Ligação com PPARG.	Pag.48
Figura 15	Rede de ligações gênicas na linhagem HB4a.Ligação com PPARG.	Pag.49
Figura 16	Rede de ligações gênicas na linhagem HB4a.Ligação com PPARG e PPARG.	Pag.50
Figura 17	Rede de ligações gênicas na linhagem HB4a. DEGs hiperexpressos	Pag.51

Figura 18	Rede de ligações gênicas na linhagem HB4aC5.2.Ligações indiretas com AKT e ERK.	Pag.52
Figura 19	Rede de ligações gênicas na linhagem HB4aC5.2.Ligações indiretas com TNF.	Pag.53
Figura 20	Rede de ligações gênicas na linhagem HB4aC5.2.Genes hiperexpressos e hipoexpressos.	Pag.54
Figura 21	Rede de ligações gênicas na linhagem HB4aC5.2.DEGs membrana celular.	Pag.55
Figura 22	Rede de ligações gênicas na linhagem SKBR-3. Ligações indiretas com TNF.	Pag.56
Figura 23	Rede de ligações gênicas na linhagem SKBR-3. DEGs metabolismo lipídico.	Pag.57
Figura 24	Estratégia para busca de genes diferencialmente expressos após o tratamento com DHA envolvidos com HER-2.	Pag.59
Figura 25	Box plots representativos da expressão gênica dos genes selecionados na linhagem HB4a por RT-PCR com significância estatística.	Pag.63
Figura 26	Box plots representativos da expressão gênica dos genes selecionados na linhagem HB4aC5.2 por RT-qPCR.	Pag.65
Figura 27	Box plots representativos da expressão gênica dos genes selecionados na linhagem SKBR-3 por RT-qPCR.	Pag.67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Especificações do GeneChip® Human Gene 1.0 ST Array	Pag.21
Tabela 2	Genes diferencialmente expressos (DEGs) utilizando método SAM e RankProd.	Pag.43
Tabela 3	Genes diferencialmente expressos (DEGs) utilizando método SAM com análise pareada e com permutação	Pag.44
Tabela 4	DEGs pré selecionados na linhagem HB4a	Pag.45
Tabela 5	DEGs pré selecionados na linhagem HB4aC5.2	Pag.46
Tabela 6	DEGs pré selecionados na linhagem SKBR-3	Pag.46
Tabela 7	Genes selecionados para validação técnica por qRT PCR.	Pag.61
Tabela 8	Primers forward e reverse desenhados para genes diferencialmente expressos selecionados para validação técnica.	Pag.62
Tabela 9	DEGs selecionados para validação técnica por RT-qPCR na linhagem HB4a	Pag.64
Tabela 10	Análise estatística do RT-qPCR em tempo real para os DEGs selecionados para validação técnica na linhagem HB4aC5.2.	Pag.66
Tabela 11	Análise estatística do RT-qPCR em tempo real para os DEGs selecionados para validação técnica na linhagem SKBR-3	Pag.68

RESUMO

ALMEIDA D.F. Avaliação do perfil de expressão gênica de linhagens celulares do tecido mamário com diferentes níveis de expressão do receptor HER-2 tratadas com ácido docosahexaenoico. [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

O câncer de mama permanece como segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e o primeiro entre as mulheres. Tumores de mama podem ser categorizados pela expressão de receptores como o HER-2 (receptor de fator de crescimento epidermal 2). A hiperexpressão do receptor HER-2 é observada em cerca de 30% dos carcinomas de mama, e está associada a prognósticos desfavoráveis. Os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), como os ácidos graxos ômega-3, parecem diminuir o risco de câncer de mama. O ácido docosahexaenoico (DHA), um tipo de AGPI ômega-3 parece ter o maior potencial antitumoral no câncer de mama. Alguns mecanismos de ação foram propostos para a ação do DHA no controle do câncer de mama, no entanto, faltam dados para elucidar os mecanismos moleculares do DHA no tecido mamário normal e cancerígeno. Dessa maneira, o objetivo desse trabalho foi avaliar a ação do DHA na modulação da expressão de genes em linhagem celular normal (HB4a), transformada (HB4aC5.2) e de carcinoma mamário humano (SKBR-3). As linhagens estudadas foram tratadas com 100 μ M de DHA ou controle (etanol) durante 72 horas. Após a extração de RNA realizamos a técnica de expressão gênica global (*Microarray*) para encontrar os genes diferencialmente expressos, em relação ao tratamento com DHA, em cada linhagem celular estudada. Na linhagem normal (HB4a) observamos 174 genes diferencialmente expressos ($p < 0,01$), sendo 136 hiperexpressos e 38 hipoexpressos, na linhagem celular transformada (HB4aC5.2) encontramos 208 genes diferencialmente expressos ($p < 0,01$), sendo 32 hiperexpressos e 176 hipoexpressos. A linhagem do carcinoma mamário (SKBR-3) apresentou 126 genes diferencialmente expressos ($p < 0,01$), sendo 48 hiperexpressos e 78 hipoexpressos. A análise ontológica destes genes permitiu identificar

processos biológicos como: adesão celular, diferenciação celular e metabolismo lipídico. Concluimos que o DHA altera o perfil de expressão gênica de maneiras distintas em linhagem normal, transformada e de carcinoma mamário humano. Além disso, encontramos após o tratamento com DHA genes envolvidos com o metabolismo lipídico nas linhagens que hiperexpressam o receptor HER-2.

Descritores: Câncer de mama; ácidos graxos ômega 3; expressão gênica; nutrigênômica, receptores HER-2.

ABSTRACT

ALMEIDA D.F. Evaluation of the gene expression profile of breast tissue cell lines with different expression levels of the HER-2 receptor treated with docosahexaenoic acid. [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2013.

Breast cancer remains the second most common cancer in the world and first among women. Breast tumors can be categorized by the expression of receptors such as HER-2. Overexpression of HER-2 receptor is associated with unfavorable prognosis. The polyunsaturated fatty acids (PUFAs) omega-3 appears to decrease the risk of breast cancer. Docosahexaenoic acid (DHA), a type of omega-3 PUFAs, seems to have greater antitumor potential in breast cancer. However, the gene expression profile resulting from the action of DHA in breast cancer has not been elucidated yet. We aimed to examine the effects of DHA on normal breast cell line (HB4a), transformed cell line (HB4aC5.2) and breast cancer cell line (SKBR-3) and using a microarray approach. Cells were treated with 100 μ M of DHA for 72 hours. We identified 174, 208 and 126 differentially expressed genes after DHA treatment, in HB4a, HB4aC5.2 and SKBR3, respectively. Notably, the molecular pathways for the differentially expressed genes included those related to lipid metabolism, cell growth, molecular transport and cell-to-cell signaling. Where found genes related to overexpression of HER-2 after treatment with DHA. These genes involved in lipid metabolism and were down-expressed after treatment, suggesting a possible mechanism DHA in breast cancer by lipid metabolism control.

Descriptors: breast cancer; unsaturated fatty acids, gene expression; nutrigenomics, HER-2 receptors.

1. Introdução

O câncer de mama permanece como segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e o primeiro entre as mulheres ^[1]. No Brasil, o número de casos de câncer de mama estimados para 2012 foi de 52.680^[2].

A história natural do câncer de mama envolve mudanças progressivas, refletidas por diferentes estágios clínicos e patológicos, de células luminais epiteliais que adquirem características fenotípicas. Estas permitem sua rápida proliferação, progressão para carcinoma *in situ*, invasão do tecido adjacente e metástase^[3].

O câncer de mama é referido como uma coleção de doenças caracterizadas pela presença de células malignas de diferentes tipos moleculares. Estes podem ser categorizados pela expressão de três receptores celulares: receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PR), e o receptor de fator de crescimento epidermal 2 (HER-2; gene *ERBB2*)^[4].

A amplificação e hiperexpressão do receptor HER-2 são observadas em aproximadamente 30% dos carcinomas de mama, e estão associados a prognósticos desfavoráveis [5, 6]. A via de sinalização deflagrada pelos receptores HER-2 tem sido considerada como via regulatória central de processos envolvidos na proliferação e sobrevivência celular, mesmo na presença de sinais apoptóticos [7].

O aumento de receptores HER-2 também está associado ao aumento do potencial metastático com menor resposta ao tratamento^[8]. O gene *ERBB2*, no momento, representa um dos mais importantes oncogenes no câncer de mama [5, 6, 9].

Admite-se que hábitos dietéticos desequilibrados sejam responsáveis pela origem de 1/3 de tipos distintos de câncer^[10]. A relação entre câncer de mama e dieta não está totalmente esclarecida^[11], porém, o alto consumo de gordura parece estar relacionado a um risco elevado deste tipo de câncer^[12-16].

No entanto, alguns tipos de lipídios, incluindo tanto os ácidos graxos (AG) insaturados quanto os monoinsaturados, além dos AG poli-insaturados (AGPI) como o ômega-3 (AGPI n-3), parecem diminuir o risco de câncer de mama^[17, 18]. Os lipídios presentes no peixe, e principalmente no óleo de peixe, são os AGPI da família AGPI n-3, que incluem o ácido eicosapentaenoico (EPA) e o ácido docosahexaenoico (DHA)^[19].

Diversos estudos epidemiológicos, experimentais *in vivo* e *in vitro* sugerem papel preventivo e terapêutico dos AGPI n-3 no câncer de mama^[20-25]. Adicionalmente, alguns estudos demonstraram que os AGPI n-3 podem aumentar a sensibilidade à quimioterapia^[26, 27] e inibir metástases no câncer de mama^[28], sendo o maior potencial antitumoral atribuído ao DHA^[22, 23, 29, 30].

O DHA incorpora-se na membrana celular e pode influenciar diretamente em vias de sinalização que controlam proliferação e morte celular^[31, 32]. No entanto, os mecanismos moleculares resultantes da ação do DHA não foram totalmente elucidados.

Nesse sentido vale ressaltar a importância de novas tecnologias para a compreensão dos mecanismos moleculares dos nutrientes. Elas permitiram aumentar nossa compreensão sobre como os nutrientes podem modular a expressão gênica e influenciar no metabolismo celular. Essa ciência é conhecida como Nutrigenômica. [33]

A Nutrigenômica utiliza tecnologias genômicas para desvendar a ação dos nutrientes na modulação de genes e proteínas e sua influencia no metabolismo celular e do organismo. A técnica mais utilizada na genômica até agora é transcriptômica, que permite a análise da expressão gênica de milhares de genes ao mesmo tempo.[33]

Existem evidências de que AG, em particular os insaturados, exercem muitos dos seus efeitos por meio da modulação da transcrição gênica regulando a atividade de fatores de transcrição, incluindo receptores nucleares. Particularmente, o DHA pode se ligar a fatores transcripcionais, como a família PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptor alpha*) e do

SREBP (*sterol regulatory element binding transcription factor 2*)^[4, 34], envolvidos no metabolismo de lipídeos e na homeostase do colesterol, tendo influência sobre genes que participam do ciclo celular, e no reparo de danos ao DNA ^[35].

A mesma via deflagrada pelo HER-2 também é capaz de regular o fator de transcrição SREBP. A forma ativa da proteína SREBP favorece o aumento da expressão da HMG-CoA redutase, enzima marca-passo da síntese endógena de colesterol, implicando no aumento da produção endógena de colesterol.

O perfil gênico de diferentes linhagens de câncer de mama (MDA-MB 231, MDA-MB 435, MCF-7 e HCC2218) tratadas com AG n-3 (EPA e DHA) e AG n-6 (ácido araquidônico e ácido linoléico) foi analisada durante 6 e 24 horas. Os autores observaram que 35 genes se alteraram nas primeiras 6 horas de tratamento. Foram encontradas diferenças essenciais entre os AGPI na alteração da expressão gênica. Análises ontológicas mostraram diversos genes com funções na progressão do ciclo celular e apoptose. Vale ressaltar que nenhuma das linhagens de câncer de mama estudadas apresenta receptores HER-2 hiperexpressos^[36].

Pesquisas conduzidas pelo nosso laboratório utilizando células com hiperexpressão dos receptores HER-2, HB4aC5.2, mostraram que essas células apresentaram níveis elevados de colesterol e *lipid rafts* na membrana celular.

Os *lipid rafts* são microdomínios na membrana celular com capacidade de incluir e excluir proteínas da membrana. São importantes em diversos processos celulares, principalmente na transdução de sinal. Para essa função é necessário que os níveis totais de colesterol e esfingolípides saturados, além de sua distribuição na membrana celular, estejam rigorosamente controlados. ^[37] Adicionalmente, o agrupamento dos *rafts* pode ser favorecido se a concentração de seus componentes lipídicos (colesterol e esfingolípides saturados) aumentar e, conseqüentemente algumas

proteínas, como por exemplo, os receptores da família HER podem ser hiperativadas, descontrolando a cascata de proliferação celular.^[38]

Em pesquisa conduzida pelo nosso grupo mostrou em linhagem mamária transformada HB4aC5.2, após o tratamento com 100 μ M de DHA por 72 horas, a indução de apoptose e inibição da proteína Akt (principal proteína da via *downstream* dos receptores HER-2, envolvida com proliferação celular), por meio da desestruturação desses *lipid rafts*.^[39] No entanto, o perfil de expressão gênica resultante dessa alteração não foi investigado.

A hipótese da nossa pesquisa considera que células de câncer de mama com e sem hiperexpressão de HER-2 possam ser sensíveis à modulação na expressão gênica induzidos por DHA.

Ponderamos que nossa abordagem tem como vantagem avaliar o potencial efeito do DHA na expressão de múltiplos genes para esclarecer os mecanismos da ação do DHA na célula mamária normal, transformada e cancerígena.

1.1 Revisão da Literatura

1.1.1. Ácidos graxos ômega-3

Ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) são considerados uma subclasse de componentes bioativos (ver <http://www.lipidmaps.org/>), dividido em dois grupos (AG n-6 e n-3), e são estudados na prevenção do câncer. ^[40]

Os AG são ácidos carboxílicos representados pela fórmula $R\text{-CO}_2\text{H}$, em que o radical R é geralmente uma cadeia hidrocarbônica, não ramificada, com número par de átomos de carbono, unidos por ligações simples ou duplas. Os AG podem ser classificados de acordo com o grau de saturação, número total de carbonos e pela essencialidade ^[41, 42].

O grau de saturação é caracterizado pelo número de duplas ligações: saturados (sem duplas ligações), monoinsaturados (uma dupla ligação e poli-insaturados (mais de uma dupla ligação). Os AG têm cadeias com distintos números de átomos de carbono e podem ser: AG de cadeia curta (AGCC – 2 a 4 carbonos), AG de cadeia média (AGCM – 6 a 12 carbonos) e AG de cadeia longa (AGCL – 14 a 22 carbonos) ^[41, 42].

A essencialidade dos AG é determinada pela capacidade de serem produzidos bioquimicamente pelo organismo. Os mamíferos podem sintetizar AG a partir de acetil-CoA, por meio da síntese *de novo* de AGs. O produto final da enzima AG sintetase é o ácido palmítico (16:0), o qual pode ser alongado a ácido esteárico (18:0) e a outros AG saturados de cadeia longa. A enzima delta 9 dessaturase, presente em plantas e animais, introduz uma dupla ligação entre o carbono 9 e 10, convertendo o ácido esteárico em oleico (18:1, n-9 ou ω -9), com uma única insaturação na nona posição a partir do hidrocarboneto terminal. Estes AG, além de serem sintetizados pelos mamíferos, também são obtidos pela dieta. ^[43]

No entanto, há um grupo de AG, denominados essenciais, que só podem ser obtidos pela dieta ^[44], devido à ausência, em mamíferos, de enzimas para a sua biossíntese. As principais insaturações destes AGs essenciais estão na terceira (n-3 ou ω -3) ou sexta posição (n-6 ou ω -6), a partir da extremidade metil (distal) ^[43].

Os ácidos linoleico (C18:2 n-6, [LA]) e γ -linolênico (C18:3 n-6, [DGLA]) são precursores do ácido araquidônico (C20:4 n-6, [AA]) e pertencem à família dos AG n-6. Os AG essenciais que pertencem à família n-3 são os ácidos α -linolênico (C18:3 n-3 [ALA]), precursores de eicosapentaenoico (C20:5 n-3, [EPA]) e docosahexaenoico (C22:6 n-3, [DHA]). As células animais podem apenas converter o ALA em outros AG da mesma família n-3, como o EPA e DHA. Por sua vez, o γ -linolênico dá origem ao ácido araquidônico da mesma família n-6. Com isso, AGs de famílias diferentes não se interconvertem (Figura 1) ^[41, 43, 45].

Uma das principais características do AG n-3 é a sua capacidade de incorporação na membrana celular, desencadeando diversas respostas celulares. Os AG insaturados incorporam-se na posição sn-2 de fosfolipídios da membrana celular de forma competitiva, com graus de afinidade que respeitam a ordem n-3>n-6>n-9, influenciando de maneira distinta sua estrutura e a função de diferentes receptores, transportadores, enzimas e canais iônicos a ela relacionados. ^[46] Os AG LA e ALA podem ser obtidos a partir de fonte vegetal e animal, sendo encontrados em maior quantidade nas fontes vegetais. Óleos de milho, canola e soja são fontes significativas de AG n-6 e óleo de linhaça e semente de chia são exemplos de fontes vegetais de ALA. Os AG EPA e DHA, por sua vez, podem ser encontrados em alimentos de origem marinha, como óleo de microalga, óleo de peixe, salmão, sardinha, arenque e cavallinha ^[45].

Figura 1: Elongação e dessaturação de AGs n-6 e n3. As enzimas delta 6 dessaturase ($\Delta 6$ -dessaturase) e delta 5 dessaturase ($\Delta 5$ -dessaturase) atuam na dessaturação de ácidos graxos poli-insaturados. Essas reações ocorrem no retículo endoplasmático. A formação do DHA envolve a atuação das enzimas elongase, delta 4 e delta 6 dessaturase, que nos peroxissomos sofrem a remoção de dois átomos de carbono. A eficiência global de conversão de ALA (alfa linoleico) é baixa.^[45, 47, 48] ELOVL2: *elongation of very long chain fatty acids protein 2*; ELOVL5: *elongation of very long chain fatty acids protein 5*

1.1.2. Câncer de mama, expressão gênica e AG n-3

O câncer é um termo geral que representa mais de 100 doenças, e cada tipo apresenta etiologia própria. O câncer de mama continua a ser um problema de saúde pública com mais de um milhão de casos de incidentes por ano no mundo, sendo quase a metade na América do Norte e na Europa.^[49] O prognóstico desta doença depende das características do tumor e da qualidade dos tratamentos. Estes tratamentos consistem em cirurgia, quimioterapia e depois manipulação hormonal, para evitar ou retardar o aparecimento de metástases ^[50]

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o número estimado para 2012 foi de 518.510 casos novos de câncer no Brasil, incluindo os casos de pele não melanoma, que é o tipo mais incidente para ambos os sexos (134 mil casos novos), seguido por próstata (60 mil), mama feminina (53 mil), cólon e reto (30 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (18 mil) ^[51].

Fatores dietéticos podem contribuir para a carcinogênese mamária. A progressão e o controle dessa doença parecem estar relacionados a hábitos alimentares, consumo de gorduras, carnes, frutas, vegetais, fibras fitoestrógenos e outros componentes dietéticos. A importância da dieta na abordagem preventiva do câncer de mama já é conhecida. No entanto ainda faltam dados relacionando o componente alimentar, o mecanismo e a ação no combate ao câncer de mama ^[40]. Embora existam inconsistências, estudos populacionais têm mostrado que o consumo de uma dieta rica em AG n-3 pode prevenir diversos tipos de câncer, incluindo os da mama ^[52-54] próstata ^[55] e cólon ^[56]. Embora muitos destes estudos tivessem sido feitos com base em dados de questionários sobre ingestão dietética ou estimativas baseadas no consumo nacional, alguns têm usado a composição de AGs nos tecidos como medida de exposição a gorduras dietéticas.

O estudo EURAMIC é um dos maiores a fornecer provas de que o equilíbrio entre AGPI n-3 e n-6 tem papel importante no câncer de mama [57, 58].

Estudos experimentais têm observado que AG n-3 podem inibir a formação e o crescimento dos tumores de mama em modelos animais [59-61]. Uma série de mecanismos têm sido propostos para as ações anticâncer dos AG n-3, incluindo supressão de transformação neoplásica, inibição da proliferação celular, aumento da apoptose e antiangiogênese [52, 62-65]. No entanto, poucos estudos relatam a expressão gênica global resultante da ação dos AG n-3.

Foi avaliado o perfil de expressão gênica em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de indivíduos idosos saudáveis após consumo de diferentes AGs. A intervenção foi em 26 semanas com suplementação diária de 0,4 gramas de AG n-3 (EPA + DHA) ou uma dose maior de 1,8 gramas de AG n-3 (EPA + DHA). O consumo diário de 1,8g AG n-3 resultou em alterações em cerca de 1000 genes enquanto que no grupo de controle (óleo de girassol rico em ácido oleico) alterou cerca de 300 genes. A maior parte das alterações AG n-3 foi relacionada a diminuição na expressão de genes envolvidos em vias imunológicas e vias de desenvolvimento da aterosclerose. [33]

Em câncer de mama, foi realizado estudo em linhagens celulares de câncer de mama (MDA-MB-231, MCF-7 e HCC2218) tratadas com AG n-3 e n-6 durante 6 e 24 horas, verificou-se que 35 genes foram alterados nas primeiras 6 horas de tratamento. Após o tratamento com AG n-3 houve superexpressão do gene *DUSP2* (*Dual specificity phosphatase 2*) que codifica a proteína envolvida na regulação negativa de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK / ERK, SAPK / JNK, p38), regulando a proliferação e diferenciação celular.

Outros genes que apresentaram hiperexpressão após o tratamento com AG n-3 foram: *ITGB4* (*Integrin, beta 4*), considerado um importante biomarcador para terapia do câncer de mama, regulador de crescimento

celular e sinalização célula-célula; *SLC26A4* (*Solute carrier family 26, member 4*), que codifica proteína envolvida no transporte de íons, considerada fator inibidor do crescimento de tecido mamário maligno^[36].

Verificamos a ausência de dados consistentes nas alterações moleculares de AG n-3 nas células mamárias normais e tumorais.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Verificar a ação do ácido docosahexaenoico (DHA) na modulação da expressão de genes em linhagens normal, transformada e de carcinoma mamário humano.

2.2. Objetivos específicos

- a) Encontrar os genes diferencialmente expressos entre o grupo controle e grupo tratado com DHA para as diferentes linhagens celulares mamárias;
- b) Encontrar genes envolvidos com a via do receptor HER-2 após o tratamento com DHA;

3. Métodos

3.1. Comitê de Ética

O trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEP-FMUSP) (protocolo nº 026/10).

3.2. Planejamento experimental

As linhagens celulares escolhidas para o presente estudo foram HB4a, HB4aC5.2 e SKBR-3. As linhagens HB4a e HB4aC5.2 foram doadas pelo pesquisador Michael J. O'Hare do Laboratório de Câncer de Mama da Universidade de Londres e Instituto Ludwig de Pesquisa em Câncer de Londres. Estudos desenvolvidos pelo grupo de O'Hare mostraram que a linhagem HB4aC5.2 foi derivada da transfecção da linhagem HB4a com o *cDNA full lenght* correspondente ao receptor HER-2 ^[66]. Enquanto a linhagem HB4a apresenta níveis basais do receptor HER-2, a linhagem HB4aC5.2 expressa níveis equivalentes aos da linhagem SKBR-3, a qual apresenta constitutivamente altos níveis desse receptor (10^6 receptores/célula)^[67].

O uso da linhagem HB4aC5.2, planejada especificamente para hiperexpressar HER-2, permite analisar células imortalizadas com fenótipo estritamente luminal e, por se assemelhar à sua linhagem de origem, HB4a, permite também observar efeitos específicos da hiperexpressão do HER-2.

A linhagem tumoral SKBR-3, além da hiperexpressão do receptor HER-2, apresenta fenótipo invasivo e metastático, ou seja, apresenta múltiplas aberrações genéticas. A referida linhagem foi adquirida do ATCC (*American Type Culture Collection* nº HTB-30).

3.2.1. Cultura celular

As linhagens (HB4a, HB4aC5.2, SKBR-3) foram tratadas com 100 μ M de etanol (veículo de diluição do AG n-3), 100 μ M de DHA durante 72 horas. A Figura 2 ilustra o fluxograma da cultura celular desse estudo.

Figura 2: Esquema ilustrativo da sequência de procedimentos realizados na primeira etapa do estudo.

3.2.1.1. Grupos experimentais

Linhagem de Células Epiteliais Normais da Glândula Mamária – HB4a

As células luminais HB4a são clones não-transformados e não-tumorigênicos derivados do tecido epitelial mamário humano, além de apresentarem marcadores e comportamento semelhante ao tecido de origem^[7]. As células foram mantidas em meio RPMI 1640® (Gibco), acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB, Invitrogen), insulina, ampicilina, hidrocortisona e gentamicina e foram incubadas a 37°C, em atmosfera de 95% e com 5% de CO₂^[7].

Linhagem de Células Epiteliais da Glândula Mamária – HB4aC5.2

As células luminais HB4aC5.2 são clones derivados da linhagem HB4a transformados pela hiperexpressão de receptores HER-2. Elas apresentam fenótipo transformado, são sensíveis a hormônios e fatores de crescimento, porém sem potencial agressivo^[7]. As células foram mantidas em meio RPMI 1640® (Gibco), acrescido de 10% de SFB (Invitrogen),

insulina, ampicilina, hidrocortisona e gentamicina e foram incubadas a 37°C, em atmosfera de 95% e com 5% de CO₂^[7].

Linhagem de Células de Adenocarcinoma de Mama - SKBR-3

SKBR-3 são células luminais de adenocarcinoma de mama humano que apresentam fenótipo invasivo, metastático, ausência de receptores de estrógeno e hiperexpressão de receptor HER-2^[67]. As células foram mantidas em meio RPMI 1640® (Gibco), acrescido de 10% de SFB (Invitrogen), glutamina, ampicilina, estreptomicina e fungizona e foram incubadas a 37°C, em atmosfera de 95% e com 5% de CO₂^[7].

3.2.1.2. Viabilidade celular

A viabilidade das linhagens foi avaliada utilizando método de exclusão por azul de Tripan ("*Tripan Blue*", Sigma). Todos os experimentos foram realizados com amostras que apresentaram viabilidade celular superior a 95%.

3.2.1.3. Plaqueamento

As linhagens celulares HB4a, HB4aC5.2 e SKBR-3 foram cultivadas nas condições estabelecidas e após atingirem 80% de confluência foram tripsinizadas com 0,5% *Trypsin*-EDTA® 1X (Gibco) inativada com RPMI® suplementado com 10% SFB (Invitrogen). Após serem homogeneizadas com esse meio, as células em suspensão foram finalmente retiradas da garrafa e colocadas em tubo falcon para serem centrifugadas por 2 minutos a 2000 x g. Posteriormente, 1x10⁶ células foram plaqueadas e cultivadas em meio apropriado para cada linhagem acrescida de etanol (células controle) ou de 100 µM de DHA durante 72 horas. Após o tratamento, as células foram coletadas e armazenadas a -70°C com TRIzol® (Invitrogen) para posterior extração e purificação do RNA total.

3.2.1.4. Tratamento das linhagens com DHA

As linhagens celulares foram tratadas durante 72 horas com etanol (controle da diluição do DHA) ou 100 μ M de DHA (cis-4,7,10,13,16,19 – Docosahexaenoic acid- D2534- Sigma). A porcentagem de etanol foi sempre menor que 0,05% do volume total de meio^[30, 68]. A concentração de DHA e o tempo de tratamento foram padronizados em estudos anteriores desenvolvidos em nosso laboratório (Projeto FAPESP nº09/52244-5).

A confluência das células nas garrafas foi mantida em torno de 70%-80% da área total. Esse controle foi realizado com o objetivo de evitar a ocorrência de alterações na progressão do ciclo decorrentes das condições do próprio ambiente de cultura, como a privação de nutrientes, que pode estar diretamente relacionada ao nível de confluência das células.

3.2.1.5. Coleta das células e armazenamento a - 70°C com TRIzol® (Invitrogen)

Após o tratamento das linhagens HB4a, HB4aC5.2 e SKBR-3 como descrito anteriormente, o meio foi retirado das garrafas e as células aderidas foram cuidadosamente lavadas por cerca de 30 segundos em PBS (Na₂HPO₄ 10mM, NaCl 1,37 mM, KCl 27 mM, KH₂PO₄ 2mM). Após a retirada do PBS, foi adicionado 2 mL de TRIzol® (Invitrogen) sobre a camada celular e, com a ajuda de um *CellScraper*® (TRP), o material lisado foi coletado em micro-tubo de 1,5 mL. As amostras foram armazenadas a - 70°C até o momento da extração de RNA total.

Para análise da expressão diferencial de transcritos, as amostras de RNA foram processadas de acordo com as recomendações do *GeneChip*® *Human Gene 1.0 ST Array*.

3.2.2. Perfil de expressão gênica global (*Microarray*)

3.2.2.1. Características dos GeneChips®

Para a construção dos *GeneChips® Human Gene 1.0 ST Array* foram utilizados vários bancos públicos, tais como *GenBank*, *RefSeq* e *Ensembl*.

As sequências de oligonucleotídeos (sondas) selecionadas correspondem a regiões distribuídas ao longo do gene. Com o termo denominado “*whole-transcript (WT)*”, esses *GeneChips®* oferecem uma cobertura mais completa do que outros *GeneChips®* desenhados na porção 3’ do transcrito alvo. Podemos observar as diferenças na construção dos *GeneChips®* na Figura 3^[69].

Figura 3: Esquema representativo de um gene com as regiões de cobertura dos GeneChips® desenhadas por barras coloridas. Em lilás observamos o GeneChips® utilizado HuGene-1_0-st-v1:Gene Level (+) ^[69].

O *GeneChip® Human Gene 1.0 ST Array* contém sequências de oligonucleotídeos representativos de mais de 28.000 transcritos humanos. Os transcritos são representados por “grupos de sondas”, os quais correspondem a 26 pares de sondas. Cada “grupo de sondas” pode reconhecer diferentes transcritos de um mesmo gene ou transcritos correspondentes a genes diferentes. Os pares de sondas são constituídos

apenas por sondas *Perfect Match (PM)*. O *Background* é estimado utilizando um grupo de 17.000 sondas genéricas de erros. Controles padrão de poli-A e controles de hibridização são representados nos *GeneChips®* para permitir a solução de problemas experimentais durante o processo^[69]. Outros detalhes da construção dos *GeneChips®* podem ser visualizados na Tabela 1.

Tabela 1: Especificações do GeneChip® Human Gene 1.0 ST Array^[69]

Especificações – GeneChip® Human Gene 1.0 ST Array	
Número de array	1
Formato do array	169
Características do tamanho	5µm
Comprimento da sonda	25-oligonucleotídeos/sonda
Número total de sondas distintas	764.885
Resolução (número de sondas por gene)	26 (média)
Número estimado de genes	28.869
Controles positivos (genes expressos constitutivamente)	1.195 grupos de sondas (nível éxon) de supostos genes constitutivos
Controles Negativos	2.904 grupos de sondas (nível íntron) a partir de genes supostamente constitutivos
Controles de Hibridização	bioB, bioC, bioD, Cre
Sondas de “background”	Grupo antígenomico
Controle de Poli-A	Dap, lys, phe, thr
Quantidade de material total inicial recomendado	100ng RNA total

3.2.2.2. Extração e purificação do RNA total

A extração de RNA total foi realizada por meio da metodologia de TRIzol® (Invitrogen). As amostras armazenadas a -70°C foram descongeladas e, em seguida, adicionou-se 200 µL de clorofórmio e as amostras foram homogeneizadas. Após 10 minutos a temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas durante 15 minutos a 4°C e 12.000 x g. O sobrenadante foi transferido para outro micro-tubo para adição de 500 µL de isopropanol (mesmo volume do sobrenadante). As amostras foram homogeneizadas por 2 minutos e deixadas à temperatura ambiente por 20 minutos para iniciar a precipitação. Em seguida, as amostras permaneceram a -20°C por uma noite para permitir a precipitação do RNA total.

No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas durante 30 minutos a 4°C e 14.000 x g. O sobrenadante foi descartado para adição de 1 mL de etanol 70%, seguida de centrifugação por 2 minutos a 4°C e 14.000 x g. Este processo foi repetido por mais duas vezes. O excesso de etanol foi retirado e o precipitado foi seco por 2 minutos em banho seco a 42° C. A ressuspensão do precipitado de RNA total foi feita em 21 µL de água DEPC. Para facilitar a ressuspensão, os tubos foram deixados em banho seco a 55°C durante 10 minutos.

Após a extração, a purificação do RNA total foi realizada utilizando o *Rneasy mini kit* (n° 74104, Qiagen), de acordo com a descrição do fabricante. Para esse procedimento, foram utilizados 10 µg de RNA total em o volume final de 100µL. Após a adição de 350 µL de tampão RLT, foi adicionado 250 µL de etanol 100% e a solução final transferida para uma coluna *Rneasy Mini spin*, acoplada a um tubo coletor, sendo submetida à centrifugação por 15 segundos a 8000 x g. Em seguida, o eluato foi descartado e 500 µL de tampão RPE foram aplicados no centro da coluna, submetendo-a à nova centrifugação (15 segundos e 8000 x g).

Após descarte do eluato, foi adicionado mais 500 µL de tampão RPE sobre a coluna, submetendo-a à centrifugação por 2 minutos a 8000 x g.

A seguir, a coluna foi colocada em um novo tubo de 1,5 mL e, após a aplicação de 25-30 µL de água livre de RNAses, a amostra foi centrifugada por 1 minuto a 8000 x g para eluição e quantificação do RNA.

3.2.2.3. Quantificação de RNA total

A quantificação, ou seja, a concentração do RNA total foi obtida pela leitura da absorbância nos comprimentos de onda de 260 e 280 nM pelo espectrofotômetro NanoDrop (ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer, NanoDrop Technologies), sendo a pureza avaliada pela razão 260/280. Foram consideradas amostras de pureza aceitável quando os valores dessa razão se situaram entre 1.8 e 2.1.

3.2.2.4. Integridade do RNA total

Após a extração e a purificação do RNA total foi realizada a análise da integridade do RNA por meio do aparelho de eletroforese por microcapilaridade, *Bioanalyzer* (Model 2100; Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Com a ajuda de uma “estação de preparação”, os canais do *chip* são preenchidos com o gel contendo corante, que se intercala diretamente com o ácido nucléico. Como princípio, este instrumento detecta as biomoléculas pela fluorescência induzida pelo laser a 670-700nm^[70]. A imagem de um eletroferograma é gerada e a qualidade das amostras é dada pelo RIN (*RNA Integrity Number*), o qual varia de 0 a 10 em ordem crescente de integridade. Assim, para as amostras de RNA total e amplificado, são esperados valores altos de RIN (>7,0) e para as amostras fragmentadas, valores menores (em torno de 2,0). Foram utilizados para experimentos de amplificação e hibridização nos *GeneChips*® 1.0 ST Array (*Affymetrix*) amostras com valores de RIN > 8.

3.2.3. Preparo das amostras para hibridização

Para o preparo das amostras para hibridização no *GeneChip*® 1.0 ST Array(Affymetrix)utilizamos o protocolo de marcação recomendado pelo fabricante com 100ng de RNA total, denominado *GeneChip*® Whole Transcript Sense Target Labeling Assay.

3.2.3.1. Preparação da diluição dos controles Poly-A RNA

Para este procedimento utilizamos o *Kit GeneChip*® Poly-A de Controle de RNA (cat. nº 900433, Affymetrix, Santa Clara, CA).A qualidade do RNA da amostra inicial é essencial para o sucesso da análise de expressão gênica global, assim como descrito no manual do fabricante foi utilizado 1 µg de RNA total. Os controles de RNA Poly-A são fornecidos em quatro diferentes concentrações de estocagem. O tampão de diluição é fornecido com o *kit* e foi diluído conforme recomendação do fabricante. Para a primeira diluição (1:20) foi utilizado 2µL do reagente *Poly-A RNA Control Stock* adicionado a 38 µL do reagente *Poly-A Control Die Buffer*,. Para a segunda diluição (1:50) foi utilizado 2µL da 1ª diluição adicionado a 98µL do reagente *Poly-A Control Die Buffer*. Para a terceira diluição (1:50) foi adicionado 2 µL da 2ª diluição adicionado a 98 µL do reagente *Poly-A Control Die Buffer*. Foi adicionado 2 µL da terceira diluição ao volume de amostra contendo 2 µg de RNA total para compor a mistura de RNA Total/RNA Poly-A.

3.2.3.2. Preparação do Mix T7-(N)6 Primers/Controle Poly-A

Preparamos uma diluição de 250 ng/µL dos *Primers T7-(N)6* (a partir de 2,5 µg/µL do estocado) conforme indicado pelo fabricante. Para isso, foram adicionados 2 µL do *Primer concentrado T7-(N)6* a 6 µL da terceira diluição do Controle Poly-A e 12 µL de água livre de RNase para um volume

total de 20 μL . Para cada amostra contendo RNA total é necessário acrescentar 2 μL do *mix* T7.

Em seguida, foram acrescentados 2 μL do *mix* T7 nas amostras contendo a mistura de RNA Total/RNA Poly-A. O volume final foi de 5 μL (quando necessário o volume final foi acrescentado de água livre de RNase). Após homogeneizar esta solução as amostras foram incubadas por 5 minutos a 70°C e por 2 minutos a 4°C.

3.2.3.3. Síntese da 1° fita de cDNA (1° Ciclo)

Nesta etapa foi utilizado o *Kit GeneChip® WT cDNA Synthesis*(cat. n° 900673, Affymetrix, Santa Clara, CA) conforme descrito pelo fabricante. Foi preparada a solução *Master Mix 1° Ciclo*. Em um micro-tubo foi adicionado 2 μL do reagente *5X 1st Strand Buffer*, 1 μL do reagente *DTT(0,1M)*, 0,5 μL do reagente *dNTP Mix (10nM)*, 0,5 μL do reagente *RNase Inhibitor* e por fim 1 μL do reagente *SuperScript II*, com o volume final de 5 μL . Foram adicionados 5 μL da solução *Master Mix 1° Ciclo, 1° Fita* ao tubo contendo o concentrado *RNA total/ Controle de Poly-A/T7-(N)6 Primers*, com um volume total de 10 μL , as amostras foram homogenizadas. A reação foi incubada por 10 minutos a 25°C, por 60 minutos a 42°C e por 10 minutos a 70°C. A reação foi resfriada a 4°C por 2 minutos.

3.2.3.4. Síntese da 2° fita de cDNA (1° Ciclo)

Para a síntese da 2° fita foi adicionado 4,8 μL de água RNase-free, 4,0 μL de MgCl_2 (17,5mM), 0,4 μL *dNTP Mix (10nM)*, 0,6 μL *DNA Polymerase I* e 0,2 μL de *RNase H*. Foram adicionados 10 μL do *Master Mix 1° ciclo, 2° fita* ao tubo da reação de Síntese da 1° fita de cDNA, tendo um volume final da reação de 20 μL , as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas rapidamente. A reação foi incubada por 120 minutos a 16°C e por 10 minutos a 75°C. Em seguida a reação foi esfriada por 2 minutos a 4°C.

3.2.3.5. Transcrição *In vitro*

Para este procedimento utilizamos o *Kit GeneChip® WT cDNA Amplification* (cat. nº900673, Affymetrix, Santa Clara, CA) e o *Kit GeneChip® Sample Cleanup Module* (cat. nº900371, Affymetrix, Santa Clara, CA) conforme descrito e fornecido pelo fabricante. Em um micro-tubo foi preparada a solução *IVT Master Mix*. Foi adicionado 5 µL do reagente *10X IVT Buffer*, 20 µL do *IVT NTP Mix* e 5 µL do *IVT Enzyme Mix*. Com o volume total de 30 µL. Foi transferido 30 µL do *IVT Master Mix* em cada amostra da reação de *Síntese da 2ª fita de cDNA*. Após homogeneizar as amostras, a reação foi incubada por 16 horas a 37°C.

3.2.3.6. Purificação do cRNA (1º Ciclo)

Para a purificação do cRNA utilizamos as colunas de *cRNA Cleanup Spin* do *Kit GeneChip® Sample Cleanup Module*. Foi adicionado 50 µL de água *RNase free* em cada amostra da reação de síntese de cRNA, tornando o volume final da reação de 100 µL. Foi adicionado 30 µL do reagente *cRNA Binding Buffer* em cada amostra e misturamos por 3 segundos. Em seguida, foi adicionado 250 µL de etanol (80%) em cada amostra. Essa solução foi aplicada nas colunas de *cRNA Cleanup Spin* colocando em um tubo coletor de 2 mL. A reação foi centrifugada em minicentrífuga por 15 segundos a 9000 x g e descartamos o filtrado. A coluna foi transferida para um novo tubo coletor, foi adicionado 500 µL *cRNA Wash Buffer*, e foi centrifugado por 15 segundos a 9000 x g e o filtrado foi descartado. Em seguida, foi adicionado 500 µL de etanol (80%), e centrifugado por 15 segundos a 9000 x g e o filtrado foi descartado. Em seguida, com a tampa da coluna aberta a reação foi centrifugada em velocidade máxima (25000 x g) por 5 minutos. A coluna foi transferida para um novo tubo coletor e foi adicionado 15 µL de água *RNase-free* diretamente na membrana da coluna. Reação foi centrifugada a velocidade máxima (25.000 x g) por 1 minuto. Eluimos pela segunda vez, colocando a solução eluída na mesma

membrana da coluna e incubamos a temperatura ambiente por 5 minutos e centrifugamos por 1 minuto a velocidade máxima (25.000 x g).

A concentração de cRNA foi analisada utilizando o espectrofotômetro. A concentração mínima para o seguimento do protocolo foi entre 1,23µg/µL e 1,53µg/µL.

3.2.3.7. Síntese da 1° fita de cDNA (2° Ciclo)

Foram adicionadas nas amostras de cRNA do último procedimento, 1,5µL de *Primers Randômicos* (3µg/µL) e o volume foi completado para 8µL com água livre de RNase. Após, as amostras foram incubadas a 70°C por 5 minutos, a 25°C por 5 minutos e a 4°C por pelo menos 2 minutos. Enquanto as amostras estavam incubando um novo mix foi preparado.

3.2.3.8. Síntese da 2° fita de cDNA (2° Ciclo)

Foi preparado o *Master Mix 2° Ciclo / Síntese de cDNA 1° Fita* adicionando 4µL do *5X 1st Strand Buffer*, 2µL de *DTT(0,1M)*, 1,25 µL *dNTP+dUTP (10mM)* e 4,75 µL da *SuperScript II* com um volume final de 12 µL. Transferimos 12 µL do *Master Mix 2° Ciclo / Síntese de cDNA 1° Fita* ao tubo da reação anterior, misturamos com cuidado e centrifugamos rapidamente. Incubamos a reação a 25° C por 10 minutos, 42°C por 90 minutos, 70°C por 10 minutos e 4°C por 2 minutos.

3.2.3.9. Hidrólise do cRNA

Para este procedimento utilizamos o *Kit GeneChip® WT cDNA Synthesis*. Primeiramente, adicionamos 1µL de RNase H em cada amostra e incubamos a 37°C por 45 minutos, 95°C por 5 minutos e 4°C por 2 minutos.

3.2.3.9. Purificação de Fita única DNA

Neste procedimento foi utilizado o kit *GeneChip® Sample Cleanup Module*. Adicionamos 80 µL de água livre de RNase em cada amostra, depois adicionamos 370 µL de cDNA Binding Buffer, e misturamos por 3 segundos. Aplicamos toda a amostra (volume de aproximadamente 471µL) na *Spin Column* com um tubo coletor de 2 mL. Centrifugamos a 9.000 x g por 1 minuto. Descartamos o filtrado. Transferimos o *cDNA Cleanup Spin Column* para um novo tubo coletor de 2 mL e adicionamos 750 µL de *cDNA Wash Buffer* a coluna. Centrifugamos a 9.000 x g por 1 minuto e descartamos o filtrado. Abrimos a tampa do *cDNA Cleanup Spin Column* e centrifugamos a 16.000 x g por 7 minutos com as tampas abertas. Descartamos o filtrado e colocamos a coluna em um novo tubo de 1,5mL. Adicionamos 15 µL do *cDNA Elution Buffer* diretamente na membrana da coluna e incubamos a temperatura ambiente por 1 minuto. Depois centrifugamos a 16.000 x g por 3 minutos. Repetimos o passo de eluição, adicionando 15 µL *cDNA Elution Buffer* diretamente na coluna da membrana e incubamos a temperatura ambiente por 1 minuto. Depois centrifugamos a 16.000 x g por 1 minuto. O volume final da fita única de DNA eluída foi de 28 µL. Dosamos o rendimento no aparelho espectrofotômetro, utilizando 2µL de amostra. A concentração foi entre 5,5 µg total ou 220ng/µL de fita única de DNA.

3.2.3.10. Fragmentação de Fita Única DNA

Para este procedimento foi utilizado o *Kit GeneChip® WT Terminal Labeling* (cat. nº900671, Affymetrix, Santa Clara, CA, EUA). Em novos tubos de 0,2mL utilizamos 5,5µg da fita única de DNA (volume variável) e água livre de RNase para um volume final de 31,2 µL. Preparamos o *Master Mix de Fragmentação* utilizando, 10 µL de água livre de RNase, 4,8µL de 10X *cDNA Fragmentation Buffer*, 1,0µL *UDG* (10U/µL), 1,0µL de *APE* (1,000 U/µL), com volume total de 16,8µL. Adicionamos 16,8µL do *Master Mix de Fragmentação* nas amostras. Misturamos e com cuidado, centrifugamos

rapidamente. Incubamos a reação por 60 minutos a 37°C, 93°C por 2 minutos e 4°C por pelo menos 2 minutos, as amostras foram homogenizadas e transferimos 45 µL da amostra em um novo tubo de 0,2 mL. Neste momento, realizamos um controle de qualidade, analisando no aparelho *Bioanalyser* para avaliar a fragmentação das amostras. Estas apresentavam entre 40 e 70 nt (nucleotídeos).

3.2.3.11. Marcação e Fragmentação de Fita única DNA

Para esta etapa utilizamos o *kit GeneChip® WT Terminal Labeling*. Preparamos os mix de marcação utilizando 1 µL 5X TdT Buffer, 2 µL de *TdT*, 1 µL de *DNA Labeling Reagent (5mM)* e por fim, 45 µL de DNA fita única fragmentado. As amostras foram homogenizadas e incubadas a 37°C por 60 minutos, 70°C por 10 minutos, 4°C por 2 minutos.

3.2.3.12. Hibridização

Utilizamos o *kit GeneChip® WT Terminal Labeling* para esta etapa. Três blocos de aquecimento são necessários (65°C, 99°C, 45°C). Preparamos um *mix* de hibridização. Adicionamos 1,7 µL do reagente Control Oligonucleotide B2 (3nM), 5 µL do *20X Eukaryotic Hybridization*, 50 µL *2X Hybridization Mix*, 7 µL de DMSO, 9,3 µL de água livre de RNase e 27 µL de DNA fita única fragmentado. Após a homogeneização, as amostras foram incubadas a 99°C por 5 minutos e em seguida a 45°C por 5 minutos. Centrifugamos por 1 minuto na velocidade máxima (16.000 x g). Foi aplicado 80 µL dessa solução no *GeneChip®*. Colocamos o *GeneChip®* no forno de hibridização (*Hybridization Oven 640, Affymetrix, P/N 800138 110V*) à rotação de 60 x g por 18 horas a 45°C.

3.2.3.13. Lavagem e Marcação dos *GeneChips*®

Após esse período de incubação, as demais etapas foram realizadas no aparelho *Fluidics Station 400 ou 450/250*, operado com o *software GOCS/Microarray Suit*. Os *GeneChip*® foram submetidos a 10 ciclos de lavagem a 25°C com tampão não estringente (6X SSPE, 0.01% Tween-20) e 8 ciclos de lavagem a 50°C com tampão estringente (100 mM MES, 0.1 M [Na⁺], 0.01% Tween-20). Em seguida, os *GeneChip*® foram deixados por 10 minutos a 25°C em solução SAPE (*Streptoavidin-Phycoerythrin*), constituída de 600 µL de Stain Buffer (2X); 48 µL de SFB (50 mg/mL); SAPE (1 mg/mL) e 540 µL de água deionizada. Após nova lavagem de 10 ciclos com tampão não estringente a 30 °C, os *GeneChips*® foram incubados por 10 minutos em solução contendo anticorpo (300 µL de Stain Buffer 2X; 24 µL de BSA- (50 mg/mL); 6 µL de Goat IgG Stock 10 mg/mL; 3.6 µL de anticorpo biotilado 0.5 mg/mL e 266.4 µL de água deionizada) e submetidos à segunda etapa de incubação em solução SAPE por 10 minutos e 25 °C. A lavagem final consistiu em 35 ciclos a 35°C utilizando tampão não estringente.

3.2.4. Obtenção dos dados

A captura das imagens correspondentes à intensidade de sinal da hibridização foi realizada pelo aparelho *GeneChip*® Scanner 7G, operado com o auxílio do *software GeneChip*® *Command Console*. O *software Expression Console*TM (*Affymetrix*) foi utilizado para a determinação da qualidade da hibridização.

3.2.5. Análise da qualidade dos dados

3.2.5.1. Análise da Imagem

Os *GeneChips*® foram escaneados (*Affymetrix GeneChip*® *Scanner 3000*) e os valores de intensidade de sinal resultante da hibridização foram

detectados. Toda a área do *chip* foi inspecionada com o objetivo de identificar a presença de artefatos, como manchas ou riscos. Outros parâmetros foram verificados, tais como a hibridização do Oligo B2 que, além de servir como controle positivo da hibridização, é utilizado pelo *software* para localizar a “grade” que define a área de cada *spot*. Foram considerados *chips* de qualidade satisfatória aqueles que apresentaram o contorno, os cantos e o nome do *chip* visíveis, visto que essas são as principais regiões relacionadas à hibridização desse controle.

3.2.5.2. Controles positivos

A porcentagem de genes presentes para cada amostra deve incluir os denominados controles positivos, os quais também funcionam como parâmetros para a verificação da qualidade do ensaio. Dentre esses, temos os controles positivos de hibridização (BioB, BioC e BioD, Cre) e os de amplificação, que consistem em controles externos (Dap, Lys, Phe, Thr).

Controles de hibridização: além do Oligo B2, outras moléculas de RNA amplificado e biotinilado são adicionadas como uma mistura (20X *Eukaryotic Hybridization Controls*) nas amostras a serem hibridizadas, que correspondem aos genes BioC e BioD (*E.coli*) e Cre (bacteriófago P1). Todos eles devem estar sempre presentes, com sinais crescentes de intensidade de acordo com suas concentrações finais na mistura: BioC (5 pM) < BioD (25 pM) < Cre (100 pM).

Controles de amplificação externos: São moléculas de RNA correspondentes aos genes Dap, Lys, Phe, Thr (espécie *B. subtilis*) que, por serem adicionados durante o preparo das amostras, são utilizados para monitorar todo o processo de amplificação e marcação do RNA mensageiro. Devem ser considerados presentes em todas as amostras, com intensidades de sinal crescentes de acordo com sua concentração na solução: Lys<Phe<Thr<Dap. Da mesma forma que para os controles internos, a razão entre as intensidades de sinal dos *probe sets* que representam as regiões a 3' e 5' desses genes devem estar em torno de 3.0.

3.2.6. Análise dos dados de *Microarrays*

As análises do perfil de expressão induzido pelo tratamento com DHA foram realizadas pela Doutora em Ciências pela Universidade de São Paulo (USP), com ênfase em Bioinformática, Daniele Yumi Sunaga da empresa Genotypics Assessoria e Consultoria em Genética LTDA.

3.2.6.1. Pré-processamento dos dados

Os valores de intensidade de sinal para cada *probe set* foi calculado pelo método RMA (*Robust Multiarray Average*), baseado em *median polish*, considerando apenas os valores de intensidade das sondas PM. ^[71]

3.2.6.2. Classificação dos genes diferencialmente expressos

O método SAM (*Significance Analysis of Microarrays*)^[72] pareado com permutação foi aplicado para a identificação dos genes diferencialmente expressos (DEGs), com $p < 0,05$ corrigidos por FDR (*False Discovery Rate*) ^[73].

3.2.6.3. Classificação funcional

A análise funcional (*in silico*) foi feita com o programa IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*, <http://www.ingenuity.com/>). Consideramos os parâmetros *defaultMolecules per Network* = 35 e *Networks per Analysis* = 25, que significa que foram definidas no máximo 25 redes biológicas hipotéticas com no máximo 35 genes cada. Estas redes são chamadas hipotéticas, pois são criadas a partir de informações da literatura. Diferente do conceito das vias canônicas, as redes são dinâmicas, ou seja, mudam de acordo com a relação de genes que está sendo analisada. Os genes são representados por nós e o relacionamento entre dois genes é representado por uma aresta.

Todas as arestas são suportadas por, no mínimo, 1 referência da literatura ou informação de vias canônicas. Foi utilizado o banco de dados *Ingenuity Expert Information* e a nova opção *Ingenuity Expert Assist Findings*, na qual as informações disponíveis foram manualmente curadas e revisadas de publicações científicas.

3.2.7. Realização do RT PCR em Tempo Real

3.2.7.1. Desenho dos *primers*

A sequência FASTA obtida do banco do *Nucleotide* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) foi utilizada para acessar a sequência genômica por meio da ferramenta BLAT (<http://www.genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>), na qual os *primers* foram desenhados, seguindo os seguintes critérios:

1. Localização em éxons diferentes, o que possibilita reconhecer a amplificação de sequência genômica contaminante (Íntron extensor), o que minimiza a possibilidade de amplificação de possíveis sequências genômicas contaminantes;
2. Temperatura de anelamento dos *primers* em torno de 60°C, calculada de acordo com o número de bases G/C ou A/T presentes em cada sequência.

4. Resultados

4.1. Extração e Purificação do RNA total

O primeiro passo determinante para o sucesso da técnica de *microarray* é a qualidade da integridade do RNA total extraído e purificado. As amostras de RNA total purificadas apresentaram níveis de pureza satisfatórios após a quantificação com relação 260/280 entre 1,9 e 2,0. As integridades das amostras foram determinadas pela análise do valor do RIN obtido para cada amostra. Amostras são consideradas de boa qualidade quando apresentam valores de RIN acima de 7. Em nosso estudo, os RNAs extraídos apresentaram ótima integridade, com valores de RIN variando entre 9 e 10, como exemplificado na Figura 4, que demonstra eletroferogramas das três linhagens, controle e tratada.

Figura 4: Análise da integridade do RNA total utilizando o *Bioanalyser*. Imagens de eletroferograma correspondentes a dois ensaios independentes (S1, semana 1 e S2, semana 2), das três linhagens (HB4a, HB4aC5.2 (C5.2) e SKBR3), controle (ETOH) e tratada (DHA). RIN (*RNA Integrity Number*). [FU]:Fluorescência e [s]: segundos.

4.2. Análise da Qualidade dos Dados

4.2.1. Análise da Qualidade da Imagem dos *Genechips*®

A avaliação da qualidade da hibridização foi realizada pelo *software Affymetrics (Expression Console™ Software Version 1.0)*. Os valores de intensidade de sinal resultante da hibridização com os *Genechips*® foram detectados utilizando o *Affymetrix Genechips® Scanner 3000*. Todas as áreas dos *Genechips*® foram inspecionadas, com o objetivo de identificar a presença de artefatos, tais como manchas ou riscos. Além disso, outros parâmetros foram verificados, tais como a hibridização do Oligo B2 que, além de servir como controle positivo da hibridização, é utilizado pelo *software* para localizar a “grade” que define a área de cada spot. Foram considerados *Genechips*® de qualidade satisfatória aqueles que apresentaram o contorno, os cantos e o nome visíveis (Figura 5), visto que essas são as principais regiões relacionadas à hibridização desse oligo.

Figura 5: Imagens obtidas pelo Scanner 3000 após a hibridização das amostras. Cada quadrado representa uma região cell. a) Padrão alternado de hibridização do Oligo B2 em um dos cantos e nas bordas do *chip*; b) Visualização do nome da lâmina também pela hibridização com esse oligo.

4.2.2. Análise da Qualidade das Reações de Amplificação e hibridização

O segundo passo determinante para o sucesso da técnica de *microarray* é a qualidade das reações de amplificação e hibridização, também realizada com o *software Affymetrics (Expression Console™ Software Version 1.0)*. Durante a análise da qualidade das reações, valores de *background mean (bgrd_mean)* maiores que de *perfect mean (pm_mean)*

indicam amostras de baixa qualidade. Em nossos experimentos, todas as amostras analisadas apresentaram valores de *bgrd_mean* menores que *pm_mean*, indicando reações de boa qualidade. A Figura 6 demonstra a relação entre *pm_mean* e *bgrd_mean*.

Figura 6: Genechips® demonstrados em três ensaios independentes (S1,S2 e S3). Valores de *perfect mean* (*pm_mean*) em vermelho e *background mean* (*bgrd_mean*) em azul.

A relação “positivos *versus* negativos” (*pos_vs_neg_auc*) compara os sinais entre os controles positivos (medida de positivos verdadeiros) e negativos (medida de falsos positivos). Valores próximos de 1,0 indicam separação perfeita entre os controles. Valores abaixo ou iguais a 0,5 indicam não separação entre esses controles. Entre replicatas é aceitável uma diferença de 0,2. A Figura 7 ilustra os valores dessa relação obtidos nos *Genechips®*.

Figura 7: Genechips® demonstrados em três ensaios independentes. Valores de positivos *versus* negativos em vermelho. Observamos variação pequena entre os Genechips® sendo o menor valor 0,85 e o maior 0,91.

Os controles positivos de hibridização apresentaram intensidades de sinal a 3' na ordem estabelecida pelas concentrações diferentes: BioB 1.5 pM, BioC 5 pM, BioD 25 pM e Cre 100 pM segundo recomendações do fabricante. Assim, como demonstrado na Figura 8, todas as amostras apresentaram eficiências semelhantes de hibridização.

Figura 8: Controles positivos de hibridização. Semelhança entre os Genechips® segundo a ordem BioB<BioC<BioD<Cre.

Os controles de amplificação externos são formados por um conjunto de RNAs exógenos poliadenilados (Lys, Phe, Thr e Dap), os quais apresentam concentrações diferentes, Lys 1:100,000; Phe 1:50:000; Thr 1:25,000; Dap 1:7,500 e devem ser considerados presentes com valores de sinais crescentes na seguinte ordem: Lys, Phe, Thr e Dap. Estes controles apresentaram padrões normais na linhagem HB4a e padrão invertido entre o Phe e o Thr nas duas linhagens tumorigênicas, como podemos observar na Figura 9.

Figura 9: Controle de amplificação externo. Genechips® demonstrados em três ensaios independentes (S1,S2 e S3). Valores de Thr (vermelho), Lys (azul), Dap (verde), Phe (rosa).

4.2.2. Distribuição de Sinal

O padrão de intensidade de sinal foi analisado por meio do *Histograma de Sinal*. Como observamos na Figura 10 a curva mantém o padrão de intensidade de sinal para todos os *Genechips®*.

Figura 10: Histograma de Sinal.

Além disso, a análise do *Relative Signal Box Plot* confirma a semelhança do padrão de intensidade entre os *Genechips®*. As médias dos *box plots* devem ser zero ou muito próximas a zero. Como demonstrado na Figura 11 todos os *box plots* apresentaram essa média ao redor de 0.

Figura 11: *Box plots* com média aproximada no valor 0. Linhas verticais referentes ao nome de cada *Genechips®* das três linhagens.

4.3. Descrição das análises de bioinformática

Inicialmente o método SAM pareado foi aplicado para a identificação dos genes diferencialmente expressos (DEGs), com $p < 0,05$ corrigidos por FDR. O resultado desta análise foi uma quantidade muito limitada de DEGs, impossibilitando posterior análise de agrupamento, busca por vias de sinalização e busca por categorias GO (*Gene Ontology*). Também aplicamos o método RankProd^[74] pareado com $p < 0,05$ corrigido por FDR. Os dois métodos foram testados com diferentes valores para o filtro de dados de

variância (sem filtro, 30% e 50%), mesmo assim, poucos DEGs foram selecionados, conforme descrito na Tabela 2 a seguir:

Tabela 2: Genes diferencialmente expressos (DEGs) utilizando método SAM e RankProd.

Comparações	SAM (DEGs)	RankProd (DEGs)	Comuns
HB4a etanol vs HB4a DHA	8 (filtro 50%) Todos hiper	20 (sem filtro) 8 hiper e 12 hipo	8
C5.2 etanol vs C5.2 DHA	0	0	0
SKBR3 etanol vs SKBR3 DHA	2 (sem filtro) Todos hipo	12 (sem filtro) 6 hiper e 6 hipo	2

Legenda: hiper (hiper-expresso) e hipo(hipoexpressos)

Esta pequena quantidade de DEGs identificada por ambos os métodos indica que a diferença de expressão entre as amostras comparadas é sutil. Seriam necessárias mais amostras para que os métodos estatísticos pudessem identificar expressão alterada com significância. Por esta razão, foi definido um novo desenho de análise, em que as amostras foram replicadas de forma que cada uma das três amostras controle pudesse ser comparada com cada uma das três amostras tratadas. Desta forma, em vez de fazer três comparações pareadas, foi possível fazer nove comparações pareadas, conforme ilustrado na Figura 12.

Figura 12: Novo desenho de análise estatística com análise pareada e com permutação.

Com este novo desenho de análise foi possível aumentar o poder estatístico do método SAM para a identificação dos DEGs, com valor de $p < 0,01$ corrigidos por FDR. Os resultados estão descritos na Tabela 3 a seguir:

Tabela 3: Genes diferencialmente expressos (DEGs) utilizando método SAM com análise pareada e com permutação.

Comparações	DEGs (SAM)
HB etanol vs HB DHA	174 (136 hiper e 38 hipo)
C5 etanol vs C5 DHA	208 (32 hiper e 176 hipo)
SKBR3 etanol vs SKBR3 DHA	126 (48 hiper e 78 hipo)

Legenda: hiper (hiper-expresso) e hipo(hipoexpressos)

4.4. Análises dos genes diferencialmente expressos (DEGs)

A partir das listas de DEGs de cada linhagem, começamos a busca pelos genes de interesse, ou seja, os genes modulados pelo DHA e que poderiam apresentar alguma função importante em relação à tumorigênese da mama. Primeiramente, os genes sem anotação (genes que já foram sequenciados, mas ainda não apresentam função definida) foram removidos. Após essa primeira triagem, a função de cada um dos genes foi avaliada no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) para genes (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene). Assim, os grupos de genes com funções ou localizações celulares semelhantes foram categorizados. Como demonstrado na Tabela 4 para linhagem HB4a, Tabela 5 linhagem Hb4aC5.2 e Tabela 6 linhagem SKBR3.

Tabela 4: DEGs pré selecionados na linhagem HB4a

Categoria	DEGS (↑ hiper-expressos ou ↓ hipoexpressos)
Adesão Celular	↑DSG3 ↑CLDN1 ↑ITGA2 ↑SDC1 ↑CA12 ↑MYLK ↑ECM2
	↑LTBP1 ↑NTN4 ↑TUBA4A ↑DSC3 ↑CD36 ↑CD68
	↑TIMP3 ↑CEACAM ↓ADAM21
Metabolismo Lipídico	↑PDK4 ↑CPT1A ↑ANGPTL4 ↑APOD ↑VLDLR
	↑ACADVL ↑RETSAT ↑UGT2B28 ↑OLAH ↑STOM
	↑HMGCS2 ↑ECH1 ↑S1PR3
Diferenciação celular	↑KRT6C ↑KRT6A ↑KRT6B ↑PLIN2 ↑S100A6 ↑S100A2
	↑IVL ↑CRYAB
Supressores de tumor	↑LOX ↑CLCA2 ↑FABP3 ↑SERPINB5 ↑NUPR1 ↑ABLIM1
Transporte celular	↑FXD3 ↑SLC3A2 ↑SLC7A8 ↑SLC7A11 ↑SLC25A30
	↑SLC38A4 ↑SLC25A20 ↑SLC31A2
Hipoexpressos	↓FANCD2 ↓CDC25C ↓MKI67 ↓FOXO1 ↓KIF2 ↓SRRT
	↓SPAG5 ↓RUNX2 ↓KIF14
Oxidação e Redução	↑CAT ↑AOX1 ↑HMOX1
Sinalização Celular	↑GRB10 ↑GPR87 ↑TFDP3 ↑KFL11 ↑KFL4 ↑RAB30
	↑GCOM1

Tabela 5: DEGs pré selecionados na linhagem HB4aC5.2

Categoria	DEGS (↑ hiper-expressos ou ↓ hipoexpressos)
Invasão e Metástase	↑SERPINF1 ↓ANGPTL1 ↓MMP26 ↓S1PR1 ↓SERPINI2
Transporte Celular	↓SLC25A31 ↓SLC35F1 ↓KCNIP1 ↓KCNH8 ↓SLC14A2 ↓SLC22A11
Membrana Plasmática	↓RIC3 ↓CXCR2 ↓GRM8 ↑ANKRD42 ↓ADORA1 ↓GPR78 ↓TPTE ↓RGS1 ↓LYPLA2 ↓SAG ↑TBC1D2B ↓TACR2 ↓MCOLN3 ↓OR56A3 ↓OR7E13P ↓OR4C45 ↓GPR85 ↓TMEM88 ↓PF4 ↓PCDH8 ↓AQP5 ↓ANKRD30B ↓NPTXR
Metabolismo Lipídico	↓GDF3 ↓ADRB3 ↓NPY ↓LIPN ↓APOC2
Sistema Imune	↓TARP ↑CDRT1 ↓SERPINI2 ↓DEFB110 ↓ENTPD1 ↓GBP7 ↓CDC14C ↓CD48 ↓NLRP7 ↓HLA-DRA
Proteína Dedos de Zinco	↓ZNF679 ↓ZNF491 ↑ZNF528 ↑ZNF445 ↑ZNF239 ↓TRIM55
Múltiplas funções	↓LDHAL6B ↓CSN2 ↓NAT8B ↓HOXD4 ↑CP ↓PCDH8 ↓GCAT ↓RBL1 ↓LRRC3B ↓DPEP1

Tabela 6: DEGs pré selecionados na linhagem SKBR-3

Categoria	DEGS (↑ hiper-expressos ou ↓ hipoexpressos)
Adesão Celular	↓ADAM23 ↓PARP9 ↓FAM38A ↑AOC3 ↑CLEC5A ↓GJA10
Metabolismo Lipídico	↓LDLR ↓DHCR7 ↓SC4MOL ↓INSIG1 ↓DDX60L ↓AKR1D1 ↓THRSP ↑PDK4 ↓SCD
Transporte Celular	↓SLCO1A2 ↓SLC10A1 ↓KCNJ1 ↓SLC36A3 ↑KCNV1
Múltiplas Funções	↑TREX2 ↑PTPRZ1 ↓RTDR1 ↓PTRH2 ↑GSTA1 ↓NDUFA11 ↑COX6A2 ↑MAGEB17
Membrana Plasmática	↓ADCY4 ↓NHEDC1 ↓OR6C4 ↑GPR84 ↑DAB1
Mecanismos Epigenéticos	↓HIT1H2BJ ↓N6AMT1

4.5. Análise Funcional dos DEGs

A análise funcional dos DEGs (*in silico*) foi feita com o programa IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*, <http://www.ingenuity.com/>).

A Figura 13 demonstra um exemplo de rede de ligações entre os DEGs na linhagem celular HB4a. Nas setas pontilhadas verifica-se a ligação indireta entre o gene *CD36* (*CD36 molecule-thrombospondin receptor*) e o gene *SDC1* (*syndecan 1*), ambos hiperexpressos na linhagem HB4a após o tratamento.

Figura 13: Rede de ligações gênicas na linhagem HB4a. Genes preenchidos com a cor cinza são diferencialmente expressos nessa linhagem após o tratamento com DHA.

Entre os DEGs envolvidos com o metabolismo lipídico encontrados na linhagem HB4a após o tratamento com DHA, dois deles podem ser visualizados na Figura 14. O gene *PDK4* (*pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4*) e o *ANGPTL4* (*angiopoietin-like 4*) apresentam ligações diretas com o gene *PPARG* (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*).

Figura 14: Rede de ligações gênicas na linhagem HB4a. Circulado em verde observamos a ligação do PPARG com PDK4. Em vermelho a ligação do mesmo fator transcrricional com ANGPTL4.

Adicionalmente, na linhagem HB4a, foram observados outros genes envolvidos com o metabolismo lipídico, como o *SLC25A20* (*solute carrier family 25 (carnitine/acylcarnitine translocase- member 20)*) que codifica uma proteína carreadora de soluto envolvida na oxidação de ácidos graxos. Este gene está ligado diretamente como o fator transcricional *PPARA* (*peroxisome proliferator-activated receptor alpha*), demonstrado na Figura 15.

Figura 15: Rede de ligações gênicas na linhagem HB4a. Circulado em verde a ligação direta do PPARA com SLC25A20.

Na Figura 16, observa-se outros DEGs da linhagem HB4a após o tratamento com DHA, como o *FABP3* (*fatty acid binding protein 3, muscle and heart /mammary-derived growth inhibitor*) e o *PLIN2*(*perilipin 2*). Estes também demonstram envolvimento com os fatores de transcrição *PPARD* e *PPARG*. Alguns genes já descritos acima como o *CD36*, *ANGPTL4* também apresentam ligações com estes fatores transcricionais.

Figura 16: Rede de ligações gênicas na linhagem HB4a. DEGs hiper-expressos (preenchidos na cor vermelha) e envolvidos com PPARD e PPARG.

Verificou-se a relação entre o gene *CPT1A* (*carnitine palmitoyltransferase 1A-liver*) com o gene *CD36* já descrito anteriormente, ambos DEGs da linhagem HB4a e hiperexpressos após o tratamento, essa ligação pode ser observada na Figura 17. Adicionalmente, nesta rede de interação gênica, observou-se o envolvimento do gene *SERPINB5* (*serpin peptidase inhibitor, clade B /ovalbumin- member 5*) com o gene *SDC1* também descrito anteriormente e ambos hiperexpressos após o tratamento.

Figura 17: Rede de ligações gênicas na linhagem HB4a. DEGs hiperexpressos (preenchidos na cor vermelha). Envolvimento do gene *SERPINB5* com *SDC1* circulado em verde e ligação direta do *CD36* com *CPT1A* circulado em azul.

Na linhagem Hb4aC5.2 foi analisado as redes de interações gênicas com os DEGs após o tratamento com DHA. A Figura 18 demonstra ligações indiretas de três genes diferencialmente expressos, *ANGPTL1* (*angiopoietin-like 1*), *S1PR1* (*sphingosine-1-phosphate receptor 1*), *CXCR2* (*chemokine (C-X-C motif) receptor 2*), com duas proteínas importantes para a sobrevivência e proliferação dessa linhagem, *AKT* (*v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*) e *ERK* (*mitogen-activated protein kinase 1*)^[7].

Figura 18: Rede de ligações gênicas na linhagem Hb4aC5.2. Circulado em verde observamos a ligação do *ANGPTL1* (*angiopoietin-like 1*) com *ERK* (*mitogen-activated protein kinase 1*). Circulado em vermelho, a ligação indireta entre *S1PR1* (*sphingosine-1-phosphate receptor 1*) e *ERK*. Em roxo, observamos a ligação indireta entre o gene *CXCR2* (*chemokine (C-X-C motif) receptor 2*) com *AKT* (*v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*).

Adicionalmente na linhagem HB4aC5.2, verificou-se alguns genes envolvidos com o sistema imunológico. O genes *CP* (*ceruloplasmin - ferroxidase*) hiperexpresso após o tratamento e o *RBL1*(*retinoblastoma-like 1 -p107*) hipoexpressos após o tratamento, demonstram ligação indireta com o *TNF*(*tumor necrosis factor*) como observado na Figura 19.

Figura 19: Rede de ligações gênicas na linhagem HB4aC5.2. Circulado em verde observamos a ligação do *CP* com *TNF*. Em vermelho a ligação do mesmo gene com o gene *RBL1*.

Observa-se na Figura 20 outra rede de interação gênica envolvendo o gene *CP* com outro gene hiperexpresso após o tratamento, *SERPINF1* (serpin peptidase inhibitor, clade F-alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor, member 1).

Figura 20: Rede de ligações gênicas na linhagem HB4aC5.2. Circulado em azul observa-se o envolvimento do *CP* com *SERPINF1*. Genes preenchidos na cor verde simbolizando a hipoexpressão e em vermelho a hiperexpressão.

Em relação aos genes hipoexpressos nessa linhagem, na Figura 21, verifica-se o envolvimento de diversos genes na mesma rede biológica hipotética. Observa-se, que uma das relações destes genes parece ser a localização das proteínas codificadas por estes genes. Por exemplo, o *GRM8* (*glutamate receptor, metabotropic 8*), *CXCR2*, *S1PR1* e *NPY* (*neuropeptide Y*) codificam receptores localizados na membrana plasmática. Assim como genes que codificam receptores acoplados à proteína G, como o *GPR78* (*G protein-coupled receptor 78*) e o *GPR85* (*G protein-coupled receptor 85*).

Figura 21: Rede de ligações gênicas na linhagem HB4aC5.2. Circulado em azul alguns exemplos de genes codificadores de proteínas localizadas na membrana celular. Genes preenchidos na cor verde simbolizando a hipoexpressão.

Analizamos também as redes biológicas hipotéticas com os DEGs da linhagem SKBR3. Foram encontrados alguns genes relacionados com o processo de adesão celular. Determinados genes deste grupo, foram relacionados na rede biológica hipotética, com ligação indireta com o *TNF*, como o *AOC3* (*amine oxidase, copper containing 3 - vascular adhesion protein 1*) e o *ADAM23* (*ADAM metallopeptidase domain 23*), verificado na Figura 22.

Figura 22: Rede de ligações gênicas na linhagem SKBR-3. Circulado em azul a ligação indireta do *AOC3* com *TNF*. Circulado em vermelho a ligação indireta do *TNF* com *ADAM23*.

O maior grupo de genes relacionados numa mesma rede biológica hipotética nesta linhagem foi associado com metabolismo lipídico. Por exemplo, os genes já pré-selecionados como *LDLR* (*low density lipoprotein*

receptor), *DHCR7* (7-dehydrocholesterol reductase), *SC4MOL* (sterol-C4-methyl oxidase-like), *INSIG1* (insulin induced gene 1), *DDX60L* (DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 60-like), *AKR1D1* (aldo-keto reductase family 1, member D1, delta 4-3-ketosteroid-5-beta-reductase), *THRSP* (thyroid hormone responsive) e *SCD* (stearoyl-CoA desaturase- delta-9-desaturase) estão envolvidos de alguma forma com o metabolismo lipídico e foram hipoexpressos após o tratamento. O único envolvido com o metabolismo lipídico que se apresentou hiperexpresso após o tratamento foi o *PDK4*.

Destes DEGs hipoexpressos após o tratamento, o *INSIG1*, *THRSP* e *SCD*, *LDLR*, *DHCR7* e *SC4MOL* estão envolvidos com o mesmo fator transcricional *SREBP* (ou *SREBF1*- sterol regulatory element binding transcription factor 1) como observado na Figura 23.

Figura 23: Rede de ligações gênicas na linhagem SKBR-3. DEGs envolvidos com o metabolismo lipídico e associados ao mesmo fator transcricional *SREBP* (*SREBF1*).

Com o objetivo de avaliar a ação semelhante do DHA nas três linhagens, comparamos os DEGs de cada linhagem. Observamos que na linhagem SKBR-3, os genes associados com metabolismo lipídico na maioria

são diferentes dos genes envolvidos com metabolismo lipídico encontrados na linhagem HB4a (*CPT1A*, *ANGPTL*, *APOD* e etc).

O único gene encontrado diferencialmente expresso nas duas linhagens (HB4a e SKBR3) é o gene *PK4*. Este gene codifica uma proteína localizada na matriz mitocondrial e inibe o complexo piruvato desidrogenase, contribuindo assim para a regulação da glicose. Além de ser regulado pelo fator transcricional *PPAR*^[75]. A regulação nas duas linhagens foi semelhante, porém mais predominante na linhagem HB4a. Nesta houve uma hiperexpressão do *PK4* com um *fold change* de 4,6204. Enquanto que na SKBR-3 o *fold change* foi de 1,9110.

Na comparação entre os genes comuns nas linhagens SKBR-3 e HB4aC5.2 após o tratamento, encontramos dois genes, *SCD* e *LIPN*(*lipase, family member N*). Em ambas as linhagens houve uma hipoeexpressão no gene *SCD* e no gene *LIPN* após o tratamento com o DHA. Na linhagem HB4aC5.2 encontramos um *fold change* de 0,6206 enquanto na linhagem SKBR-3 o *fold change* foi de 0,5143 para o gene *SCD*. Para o gene *LIPN* o *fold change* foi de 0,4161 e 0,5669 para a linhagem HB4aC5.2 e SKBR-3, respectivamente.

Na comparação entre a linhagem HB4a e HB4aC5.2, não encontramos nenhum gene diferencialmente expresso comum nas duas linhagens após o tratamento com DHA.

4.6. Análise de DEGs após o tratamento com DHA envolvidos com HER2

Com a finalidade de encontrar o DEGs envolvidos especificamente com o HER-2 após o tratamento com o DHA, partimos do pressuposto que a linhagem HB4aC5.2 é semelhante a linhagem HB4a com a única diferença da hiperexpressão do HER-2.

Assim, comparamos a lista de genes diferencialmente expressos após o tratamento com DHA na linhagem HB4a com a lista de genes diferencialmente expressos após o tratamento com DHA na linhagem HB4aC5.2 e procuramos os genes diferentes nessas duas listas. Assim produzimos uma lista de genes exclusivos do HER-2 após o tratamento com DHA. Comparamos esta lista com a lista de genes diferencialmente expressos após o tratamento com DHA na linhagem SKBR-3 e procuramos os genes em comum. Assim obtivemos a confirmação dos genes exclusivos do HER-2 após o tratamento com DHA. Na Figura 24 podemos visualizar um esquema dessa estratégia. Encontramos assim, dois genes regulados pelo HER2 após o tratamento com DHA, o *SCD* e *LIPN*, ambos envolvidos com metabolismo lipídico.

Figura 24: Estratégia para busca de genes diferencialmente expressos após o tratamento com DHA envolvidos com HER-2.

4.7. Seleção dos genes candidatos para Validação Técnica por RT qPCR

A partir dos resultados obtidos pelas análises de bioinformática, analisamos as redes hipotéticas geradas pelo *software IPA* e utilizamos alguns critérios para selecionar os genes que serão validados por qRT-PCR, como:

- 1) Função do gene bem estabelecida em banco de dados como NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) para genes (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene);
- 2) Valores de *fold change* (quantas vezes está alterado em relação ao controle). Genes com valores de *fold change* $\geq 2,5$ e $\leq 0,5$ foram considerados com maior importância;
- 3) Relação do gene com câncer de mama;
- 4) Impacto das publicações que relacionam o gene com diferentes aspectos do câncer de mama.

Dessa maneira, 31 genes foram escolhidos para posterior validação técnica. Sendo 13 genes na linhagem HB4a, 9 genes na linhagem HB4aC5.2 e 10 genes na linhagem SKBR-3. A Tabela 7 mostra, para cada linhagem celular, a função, o símbolo, o nome completo e o *fold change* dos genes selecionados. A Tabela 8 mostra os primers utilizados para a validação.

Tabela 7: Genes selecionados para validação técnica por qRT PCR.

Linhagem celular	Função	Símbolo do Gene	Nome do Gene	Fold Change
HB4a	Adesão Celular	CLDN1	claudin 1	1,754
		SDC1	syndecan 1	1,367
		CD36	CD36 molecule (thrombospondin receptor)	1,783
	Metabolismo Lipídico	PDK4	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4	4,620
		CPT1A	carnitine palmitoyltransferase 1A (liver)	2,151
		ANGPTL4	angiopoietin-like 4	1,782
		ACADVL	acyl-CoA dehydrogenase, very long chain	1,327
	Diferenciação Celular	PLIN2	perilipin 2	4,222
		CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	1,444
		FABP3	fatty acid binding protein 3, muscle and heart (mammary-derived growth inhibitor)	1,344
		SERPINB5	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 5	1,526
	Transporte Celular	SLC25A20	solute carrier family 25 (carnitine/acylcarnitine translocase), member 20	1,686
	Down-regulados	MKI67	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	0,592
HB4aC5.2	Invasão e Metástase	SERPINF1	serpin peptidase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor), member 1	1,207
		S1PR1	sphingosine-1-phosphate receptor 1	0,738
	Membrana Celular	CXCR2	chemokine (C-X-C motif) receptor 2	0,689
		GRM8	glutamate receptor, metabotropic 8	0,678
		PF4	platelet factor 4	0,702
	Metabolismo Lipídico	NPY	neuropeptide Y	0,761
	Sistema Imune	TARP	TCR gamma alternate reading frame protein	0,632
		CP	ceruloplasmin (ferroxidase)	1,453
		RBL1	retinoblastoma-like 1 (p107)	0,686
SKBR-3	Adesão Celular	AOC3	amine oxidase, copper containing 3 (vascular adhesion protein 1)	1,733
	Metabolismo Lipídico	LDLR	low density lipoprotein receptor	0,736
		DHCR7	7-dehydrocholesterol reductase	0,743
		INSIG1	insulin induced gene 1	0,610
		THRSP	thyroid hormone responsive (SPOT14 homolog, rat)	0,404
		PDK4	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4	1,911
		SCD	stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)	0,514
	Múltiplas Respostas	PTPRZ1	protein tyrosine phosphatase, receptor-type, Z polypeptide 1	0,795
		GSTA1	glutathione S-transferase alpha 1	1,442
	Inflamação	TNFSF4	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member4	0,671

Tabela 8: *Primers forward e reverse* desenhados para genes diferencialmente expressos selecionados para validação técnica.

Linhagem celular	Genes	Forward	Reverse
HB4a	<i>CLDN1</i>	TCTATGACCCTATGACCCCAG	TGGTGTGGGTAAGAGGTTG
	<i>SDC1</i>	CCTTCACACTCCCCACAC	GCCACTACAGCCGTATTCTC
	<i>CD36</i>	TCCTTGGCCTGATAGAAATGATC	AATTGGTTTGTGCTTGAGCC
	<i>PDK4</i>	TGCCCCGAGAGGTGGAGCATT	TGGCGAGTCTCACAGGCAATTCTTG
	<i>CPT1A</i>	ACCCAGAGTACGTGTCCAG	TCCAAAGCGATGAGAATCCG
	<i>ANGPTL4</i>	GCCAGTTGACCCGGCTCACAAT	GGAGACCCCTGAGGCTGGATTCA
	<i>ACADVL</i>	GGGGCTTCGGGGGCATTACC	CACGTTCTCCGATGGCACCCG
	<i>PLIN2</i>	GTGGCAGCCGGAGTCGTCTTC	AGGTTGACCACCCGAGTCACCA
	<i>CLCA2</i>	GCACCCCAGCCCACTCTATTCCA	AAAGCCCCACTTTTCGCTCCTCCT
	<i>FABP3</i>	AGAAATGGGACGGGCAAG	ACAGTGCAGTCAGGTCATG
	<i>SERPINB5</i>	GTGCTCCTCGCTTGCTGTTCC	GGACATTGCCAGTGGCTCCTTT
	<i>SLC25A20</i>	GCCAAAACCCATCAGCCCGCT	CAGGCAAACCTCGGTGGCTGTGT
	<i>MKI67</i>	TGCCTGCTCGACCCTACAGAGTG	CTGCGGTTGCTCCTTCACTGGG
C5.2	<i>SERPINF1</i>	ATGAAGGCGAAGTCACCAAGTCCCT	TCCACTCAAAGCCAGCCCGGT
	<i>S1PR1</i>	AGCGAGCCGTACAGATCCCGG	CACTGGCTTCAGGGGTGGTTG
	<i>CXCR2</i>	TTGTTGGCTCTTCTTCAGGG	TGAGGCTTGGAATGTGACTG
	<i>GRM8</i>	CATTTGGTTAGCTTTCATCCCC	ACCTTGGGCATATAGAGCATG
	<i>PF4</i>	CCCACTGCCCAACTGATAG	GCAAATGCACACACGTAGG
	<i>NPY</i>	TGGAAAACGATCCAGCCCAGAGACA	TCCCATCACCACATTGCAGGGTCT
	<i>LIPN</i>	TGCATATAAAACAGCTTTACCACTC	ACCAGCCCCAAATAGCAGTAG
	<i>CP</i>	CCTGGAACATACCAAACCCTAG	TCATTAGCCAGATTTGGTGT
	<i>RBL1</i>	TTCCCCGCACAAGAATGG	ATCGATGGCTATTACTCGCTTC
	<i>SCD</i>	GGAGATAAGTTGGAGACGATGC	TCCAGACATATTCAACCTTGGG
SKBR3	<i>AOC3</i>	ATTCCTCTTTGGTGCTACTGG	GGACAAAGACCATATCCTCGG
	<i>LDLR</i>	CACATTTGCCACAACCAGG	TCTTTGAATAAAACAAGGCCGG
	<i>DHCR7</i>	CTGCCTTATCTTTACACGCTG	GGAACAGGTCCTTCTGGTG
	<i>INSIG1</i>	CCTCTATATTGTTCTTGCTCC	ATCTTCCTTGCTCTCAGAATCG
	<i>THRSP</i>	CTCACCGAGAAAGCCCAGGAGGT	AACTGCTCCGCCGACCTCATCA
	<i>PTPRZ1</i>	TGTGGAAAGATCAAGGGTTGG	GATGGTATGAAGGAGAGGGTG
	<i>GSTA1</i>	CGGTGACAGCGTTTAACAAAG	TTCTCTTCAAACCTCTACTCCAGC
	<i>TNFSF4</i>	CTCCTGTGCTTACCTACATC	TTGGGAAGTGAGGATGAAACC

4.8. Validação Técnica por RT-qPCR

Selecionamos 13 genes para validação técnica por RT-qPCR. São eles: *PLIN2*, *FABP3*, *ACADVL*, *CLCA2*, *CLDN1*, *CPT1A*, *MKI67*, *SLC25A30*, *SERPINB5*, *PDK4*, *ANGPTL4*, *SDC1*, *CD36*. Desses, 8 genes (*PLIN2*, *FABP3*, *CLCA2*, *CPT1A*, *MKI67*, *PDK4*, *ANGPTL4*, *CD36*) foram validados pela reação de RT-qPCR. Apenas um gene (*SDC1*) foi observado como hipoexpresso na reação de RT-qPCR, apresentando discordância nos dados do *Microarray* (hiperexpresso com *fold change* de 1.3) em relação aos dados do RT-qPCR (Figura 25 e Tabela 9).

Figura 25: Box plots representativos da expressão gênica dos genes selecionados na linhagem HB4a por RT-PCR com significância estatística ($p < 0,05$)

Na Tabela 9 observamos os genes selecionados para validação técnica o *fold change* e o valor significância encontrado na técnica de RT-qPCR.

Tabela 9. DEGs selecionados para validação técnica por RT-qPCR na linhagem HB4a

Símbolo do Gene	Microarray [†]			RT-qPCR*	
	<i>Fold Change</i>	Hiper (↑) ou Hipo (↓)	Valor de p	Hiper (↑) ou Hipo (↓)	Valor de p
PLIN2	4,222	↑	<0,05	↑	0,043
FABP3	1,344	↑	<0,05	↑	0,043
ACADVL	1,327	↑	<0,05	↑	0,686
CLCA2	2,562	↑	<0,05	↑	0,043
CLDN1	1,754	↑	<0,05	↑	0,893
CPT1A	2,151	↑	<0,05	↑	0,043
MKI67	0,592	↓	<0,05	↓	0,043
SLC25A30	2,013	↑	<0,05	↑	0,138
SERPINB5	1,526	↑	<0,05	↑	0,500
PDK4	4,620	↑	<0,05	↑	0,043
ANGPTL4	1,782	↑	<0,05	↑	0,043
SDC1	1,367	↑	<0,05	↓	0,043
CD36	1,783	↑	<0,05	↑	0,043

[†] Teste SAM

* Teste Wilcoxon Signed Ranks

Na linhagem HB4aC5.2 dos 208 genes diferencialmente expressos ($p < 0,01$), sendo 32 hiper-regulados e 176 hipo-regulados, foram escolhidos 9 DEGs para a validação técnica por RT-qPCR, sendo 2 hiper-expressos (*CP* e *SERPINF1*) e 7 hipo-expressos (*S1PR1*, *CXCR2*, *PF4*, *RBL1*, *PF4*, *NPY*, *TARP*). Três desses genes *PF4*, *NPY* e *TARP* não foram padronizados na curva de eficiência da reação de qPCR apesar de terem sido feitos diferentes *primers*. Na Figura 26 visualizamos os *Box plots* representativos dos genes selecionados para validação técnica da linhagem HB4aC5.2.

Figura 26: Box plots representativos da expressão gênica dos genes selecionados na linhagem HB4aC5.2 por RT-qPCR.

Na Tabela 10 verificam-se os DEGs com o resultado de *Microarray* e os valores de RT-qPCR. Não foi encontrado nenhum valor estatisticamente significativo nessa linhagem.

Tabela 10. Análise estatística do RT-qPCR em tempo real para os DEGs selecionados para validação técnica na linhagem HB4aC5.2.

Símbolo do Gene	Microarray [†]			RT-qPCR*	
	<i>Fold Change</i>	Hiper (↑) ou Hipo (↓)	Valor de p	Hiper (↑) ou Hipo (↓)	Valor de p
<i>SERPINF1</i>	1,207	↑	<0,05	↑	0,893
<i>S1PR1</i>	0,738	↓	<0,05	↓	0,686
<i>CXCR2</i>	0,689	↓	<0,05	↓	0,500
<i>CP</i>	1,453	↑	<0,05	↑	0,500
<i>RBL1</i>	0,686	↓	<0,05	↑	0,225
<i>SCD</i>	0,620	↓	<0,05	↓	0,080

[†] Teste SAM

* Teste Wilcoxon Signed Ranks

Na linhagem SKBR-3 dos 126 genes diferencialmente expressos ($p < 0,01$), sendo 48 hiper-expressos e 78 hipo-expressos, selecionamos 7 genes para a validação técnica. Sendo 3 hiper-expressos: *AOC3*, *PDK4* e *GSTA1* (*glutathione S-transferase alpha 1*) e 7 hipo-expressos: *LDLR*, *DHCR7*, *INSIG1*, *THRSP*, *SCD*, *PTPRZ1* (*protein tyrosine phosphatase, receptor-type, Z polypeptide 1*), *TNFS4* (*tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4*). Na Figura 27 visualizamos os *Box plots* representativos dos genes selecionados para validação técnica da linhagem SKBR-3. Os genes *DHCR7*, *INSIG1* e *LDLR* apresentaram significância estatística.

Figura 27: Box plots representativos da expressão gênica dos genes selecionados na linhagem SKBR-3 por RT-qPCR. * $p = 0,008$

Na Tabela 11 observamos os genes escolhidos para validação técnica por RT-qPCR. Os genes *INSIG1*, *DHCR7*, *LDLR* apresentaram a mesma tendência do *microarray* e tiveram significância estatística.

Tabela 11. Análise estatística do RT-qPCR em tempo real para os DEGs selecionados para validação técnica na linhagem SKBR-3

Símbolo do Gene	<i>Microarray</i> [†]			RT-qPCR*	
	<i>Fold Change</i>	Hiper (↑) ou Hipo (↓)	Valor de p	Hiper (↑) ou Hipo (↓)	Valor de p
<i>TNFSF4</i>	0,671	↓	<0,05	↓	0,685
<i>THRSP</i>	0,404	↓	<0,05	↓	0,500
<i>INSIG1</i>	0,609	↓	<0,05	↓	0,008
<i>GSTA1</i>	1,441	↑	<0,05	↑	0,841
<i>DHCR7</i>	0,742	↓	<0,05	↓	0,008
<i>AOC3</i>	1,733	↑	<0,05	↑	1,000
<i>LDLR</i>	0,736	↓	<0,05	↓	0,008

† *Teste SAM*

* *Teste Wilcoxon Signed Ranks*

5. Discussão

5.0. DISCUSSÃO

A análise dos efeitos do DHA no perfil de expressão gênica nas linhagens mamárias HB4a, HB4aC5.2 e SKBR-3 nos fornece informações sobre a ação do DHA no tecido mamário normal e tumorigênico.

Realizamos a técnica de *Microarray* nas três linhagens celulares tratadas com 100µM de DHA ou etanol (controle) durante 72 horas, com o intuito de melhorar o entendimento desse ácido graxo em linhagens celulares de câncer de mama.

A escolha da linhagem HB4a nos possibilitou avaliar a ação do DHA em uma célula com o fenótipo normal, representando um modelo para observação fisiológica do efeito de DHA. Nesta linhagem, encontramos 174 genes diferencialmente expressos ($p < 0,01$), sendo 136 hiperexpressos e 38 hipoexpressos. Estes genes estão relacionados com processos de adesão celular, metabolismo lipídico e diferenciação celular, destacando que todos esses processos são importantes para a quimioprevenção do câncer^(30,31).

O uso da linhagem HB4aC5.2 permitiu analisar células transformadas com fenótipo hiperproliferativo e planejadas especificamente para hiperexpressar HER-2. Como estas células se assemelham à sua linhagem de origem (HB4a), foi possível observar os efeitos específicos do DHA em relação à hiperexpressão de HER-2. Nesta linhagem foram encontrados 208 genes diferencialmente expressos ($p < 0,01$), sendo 32 hiperexpressos e 176 hipoexpressos. Adicionalmente, foram selecionados dois genes envolvidos com o HER2 após o tratamento, o *SCD* e *LIPN* os quais discutiremos adiante.

A linhagem SKBR-3 permitiu avaliar os efeitos do DHA em células com fenótipo invasivo, metastático e múltiplas aberrações genéticas além da hiperexpressão dos receptores HER-2. Observamos, nesta linhagem, 126 genes diferencialmente expressos ($p < 0,01$), sendo 48 hiperexpressos

e 78 hipoexpressos. Estes genes estão relacionados principalmente com metabolismo lipídico.

O aumento da biossíntese lipídica é uma característica de alguns cânceres. A desregulação da lipogênese tem um papel fundamental na sobrevivência do tumor ^[76]. Adicionalmente, chama a atenção, a associação entre a hiperexpressão do receptor HER-2 e modificações do metabolismo lipídico celular. Em particular na amplificação da região cromossômica 17q12-21, onde o gene do receptor HER-2(*ERBB2*) está localizado, encontram-se fatores de transcrição como NR1D1(*nuclear receptor subfamily 1 group D member 1*) e PBP (*peroxisome proliferator activated receptor gamma binding protein*), atuantes da via de síntese de ácidos graxos (AG) *de novo*. A produção de um alto nível de lipídios resultantes do aumento da expressão desses genes, provavelmente contribui para um metabolismo energético celular anormal, com o aumento da produção de energia necessária para a sobrevivência desregulada desse subtipo de câncer^[77].

Nossos resultados mostraram que o DHA pode agir de maneira diferente em cada tipo celular cabendo discutir em separado cada uma delas.

5.1. Efeitos específicos na expressão gênica após o tratamento com DHA em cada linhagem:

Linhagem HB4a:

Nesta linhagem é interessante avaliar alguns genes envolvidos com o processo de diferenciação celular por se tratar de uma linhagem semelhante ao fenótipo do tecido de origem. Estudos demonstraram que o processo de diferenciação celular pode ajudar na prevenção do câncer ^[78, 79]. O gene *PLIN 2*, encontrado hiperexpresso em nosso estudo, codifica para uma proteína associada à vesículas lipídicas. Ela possui papel principal na absorção e estoque de ácidos graxos, além de ser

ativada principalmente por ácidos graxos de cadeia longa ^[80]. Adicionalmente, estudos propõem que esta proteína tem um papel central na formação e secreção de lipídios do leite ^[81] e, assim, esse gene pode estar envolvido com o processo de diferenciação celular mamária^[82]. A parada de ciclo celular é um indício do processo de diferenciação celular ^[78]. O gene *CDKN1A* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*) codifica uma proteína regulatória do ciclo celular^[83]. No nosso estudo, encontramos esse gene hiperexpresso após o tratamento com DHA.

A proteína codificada pelo gene *FABP3* (*fatty acid binding protein 3*) participa da absorção, metabolismo intracelular e transporte de ácidos graxos de cadeia longa^[84]. Está envolvido com a síntese de lipídeos do leite^[85]. Além disso, pode ser ativado pelo fator transcricional PPARG ^[86]. Neste trabalho, a expressão do gene *FABP3* aumentou após o tratamento com o DHA. Corroborando com esse dado, Wang e colaboradores demonstraram que a proteína MRG (ou *B-FABP*, membro da família de *FABPs*) participa da diferenciação celular mamária. Além disso, eles observaram que o tratamento com DHA em células de câncer de mama, MDA-MB-231, MDA-MB-436, e MDA-MB-468, aumenta a expressão da proteína MRG e diminui a proliferação dessas células. Demonstrando assim, o envolvimento do DHA na regulação desse gene^[87].

Além disso, outro gene hiperexpresso no nosso estudo, *SERPINB5* (*serpin peptidase inhibitor, clade B*), conhecido também como *maspin*, está envolvido na diferenciação celular de linhagens de mama ^[88] e pode atuar como supressor de tumor neste tipo de câncer ^[89].

O gene *CLDN1*(*claudin 1*) codifica uma proteína componente do complexo proteico *tight junction* nas células epiteliais participando do processo de adesão celular. A quebra da barreira celular e a desregulação de genes envolvidos com o complexo *tight junction* está associada com os principais passos para a invasão e metástase tumoral^[90]. Adicionalmente, este gene foi proposto como supressor de tumor em câncer de mama^[91].

Envolvido também com o processo de adesão celular, sindecans são uma família de proteoglicanos transmembrana de heparan sulfato. Estes mediam a ligação, sinalização celular e a organização do citoesqueleto^[92, 93]. O gene *SDC1* (*syndecan 1*), codifica uma sindecana dessa família e oferece relevância, pois além de estar relacionado com o processo de adesão celular, apresenta relação com os AG n-3. Alguns estudos demonstraram em células de câncer de mama, após a suplementação com AG n-3, um aumento significativo na expressão gênica de *SDC1*^[25, 94]. Ainda referente ao processo de adesão celular, observamos a expressão aumentada do gene *CD36*. A proteína codificada por este gene é um receptor transmembrana e pode exercer função de transporte de ácidos graxos^[95].

Os genes diferencialmente expressos envolvidos com metabolismo lipídico foram o *PDK4* (*pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4*), *CPT1A* (*carnitine palmitoyltransferase 1A*), *ANGPTL4* (*angiopoietin-like 4*), *ACADVL* (*acyl-CoA dehydrogenase, very long chain*). O gene *PDK4* codifica uma proteína da família do piruvato desidrogenase quinase, cuja função principal é a manutenção da homeostase metabólica^[75]. A expressão deste gene é controlada pelo fator de transcrição nuclear PPARs (*peroxisome proliferator-activated receptors*). Na literatura AG n-3 são descritos como ligantes diretos dos PPARs^[96]. Além disso, um estudo demonstrou que altos níveis de AG livres estão associados com a regulação da expressão do *PDK4*^[97].

O gene *AGPTL4* codifica uma proteína envolvida na regulação da homeostase da glicose, além de estar envolvida no metabolismo lipídico^[98]. Adicionalmente, foi demonstrado que o *AGPTL4* também pode ser ativado pelo fator transcricional nuclear PPAR^[98].

O gene *ACADVL* codifica uma proteína principal na via de beta-oxidação mitocondrial de ácidos graxos^[99, 100]. A desregulação desse gene pode estar envolvida com a produção de estresse oxidativo^[101].

Escolhemos um gene de transporte celular, *SLC25A20* (*solute carrier family 25*), por estar envolvido no papel central da via de beta-oxidação de AGs e pode ser ativado pelo fator transcricional PPAR^[102].

De todos os 38 genes hipoexpressos nessa linhagem, selecionamos apenas o gene *MKI67* (*antigen identified by monoclonal antibody Ki-67*) como de maior importância. Diversos estudos mostram a relação do aumento da proteína Ki-67 com um fenótipo maligno para câncer de mama^[103].

Linhagem HB4aC5.2:

Dos 208 genes diferencialmente expressos ($p < 0,01$), sendo 32 hiper-regulados e 176 hipoexpressos, foram escolhidos 9 DEGs para a validação técnica, sendo 2 hiperexpressos [*CP* (*ceruloplasmin*) e *SERPINF1* (*serpin peptidase inhibitor, clade F*)] e 7 hipoexpressos: *S1PR1* (*sphingosine-1-phosphate receptor 1*), *CXCR2* (*chemokine (C-X-C motif) receptor 2*), *GRM8* (*glutamate receptor, metabotropic 8*), *PF4* (*platelet factor 4*), *NPY* (*neuropeptide Y*), *TARP* (*TCR gamma alternate reading frame protein*), *RBL1* (*retinoblastoma-like 1*).

Destes, escolhemos dois genes com envolvimento no processo de invasão e metástase tumoral. O gene *SERPINF1* codifica uma glicoproteína importante na inibição da angiogênese em câncer de mama^[104]. Além disso, Beckers e colaboradores, verificaram que a hiperexpressão do HER-2 pode diminuir a expressão do *SERPINF1*^[105]. Em nosso estudo, observamos um aumento da expressão desse gene após o tratamento com DHA, sugerindo uma possível participação na inibição do processo de angiogênese.

O outro gene hiperexpresso selecionado foi o gene *CP* codifica uma proteína metaloproteinase e pode estar envolvido com câncer de mama^[106, 107].

Entre os genes hipoexpressos selecionados, o gene *S1PR1* codifica uma proteína de membrana de uma família de proteínas denominadas de *receptores acoplados à proteína G*^[108]. O ligante deste receptor, *sphingosine 1-phosphate* (S1P), é um lipídio bioativo com diversas funções biológicas, incluindo proliferação celular, diferenciação, angiogênese, quimiotaxia e migração^[109].

Entre os genes hipoexpressos com o tratamento com DHA salienta-se um gene, *CXCR2*, que codifica proteínas membro da família de receptores acoplados a proteína G. Estas proteínas podem estar envolvidas com angiogênese em câncer de mama^[110]. Além disso, o aumento da expressão desse gene está relacionado com aumento de angiogênese, desregulação do ciclo celular e diminuição de apoptose em câncer de ovário^[111]. No entanto no presente estudo ele se manifestou hipoexpresso após o tratamento com DHA, sugerindo um papel benéfico do DHA na ação deste gene.

Na presente pesquisa, alguns genes hipoexpressos, descritos a seguir, aparentemente não tem ligações em redes biológicas.

O gene *PF4*, conhecido também como *CXCL4*, está envolvido com alta agressividade tumoral na mama^[112]. Borgstrom e col. supõem que a proteína codificada por este gene é um marcador angiogênico para o câncer de mama^[113]. Assim, o tratamento com o DHA propõe a vantagem de reduzir a expressão deste gene.

O gene *GRM8* codifica uma proteína localizada na membrana celular que esta envolvida com a carcinogênese do câncer de mama. No entanto, não estão claros os mecanismos e a importância dessa associação^[114, 115].

O neuropeptídeo Y 5, cujo gene é *NPY*, em células de câncer de mama, está relacionado a um aumento do crescimento celular. A hiperexpressão desse gene está relacionada a diversos tipos de câncer^[116, 117].

O aumento da expressão do gene está associado com células de câncer de mama e próstata^[118, 119].

O gene *RBL1* codifica uma proteína possivelmente atuante como um supressor de tumor^[120] e pode estar associado ao receptor HER2^[121].

Linhagem SKBR-3:

Dos 126 genes diferencialmente expressos ($p < 0,01$), sendo 48 hiper-expressos e 78 hipoexpressos selecionamos 10 genes para a validação técnica. Sendo 3 hiper-expressos: *AOC3*, *PDK4* e *GSTA1* (*glutathione S-transferase alpha 1*) e 7 hipoexpressos: *LDLR*, *DHCR7*, *INSIG1*, *THRSP*, *SCD*, *PTPRZ1* (*protein tyrosine phosphatase, receptor-type, Z polypeptide 1*), *TNFS4* (*tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4*).

Entre os genes hipoexpressos, oferecemos atenção aos de metabolismo lipídico. O gene *LDLR* codifica uma proteína de membrana celular. Esta parece estar envolvida com o metabolismo de colesterol^[122]. Outro gene associado com o metabolismo de colesterol é o *DHCR7*, localizada na membrana do retículo endoplasmático^[123]. Outra proteína da membrana do retículo endoplasmático é a Insig-1, codificada pelo gene. Esta proteína tem papel principal no metabolismo lipídico. A transcrição do *INSIG1* envolve o fator transcricional SREBP^[124, 125]. Este fator transcricional também está associado com outros genes de interesse do nosso trabalho, *THRSP*. Este prediz pior prognóstico para os tumores de mama^[126, 127]. Além disso, AG n-3 regulam a expressão desse gene^[128, 129].

A enzima delta -9-desaturase é codificada pelo gene *SCD*, essa catalisa o primeiro passo da síntese de AGs insaturados^[89]. A inibição dessa enzima pode diminuir a proliferação de células de câncer^[130] e o aumento da sua expressão pode aumentar a proliferação de células de câncer de mama^[131].

Ainda entre os genes hipoexpressos, mas envolvidos com o processo imunológico, está o gene *TNFSF4* que codifica uma proteína da família dos receptores de fator de necrose tumoral. Este gene parece estar envolvido com tumores de mama^[132, 133].

Entre os genes hiperexpressos selecionamos o gene *GSTA1*, que codifica uma proteína envolvida na detoxificação de compostos eletrofílicos, incluindo carcinógenos^[134]. Além do *GSTA1*, selecionamos mais 2 genes hiperexpressos: o gene *AOC3* que codifica uma proteína que apresenta propriedades de adesão celular^[135]; e o gene *PDK4*, que também apresentou-se diferencialmente expresso na linhagem HB4a.

5.2. Efeitos específicos na expressão gênica associados com HER2 após o tratamento com DHA

A hiperexpressão do HER-2 está associada ao pior prognóstico em câncer de mama^[6], além de estar associada a um caráter lipogênico. Segundo Kourtidis e col. existe um mecanismo lipogênico alterado devido à hiperexpressão de HER-2, o qual desencadeia vias de sinalização que ativam enzimas principais envolvidas na síntese de AGs *de novo* e facilitam a glicólise aeróbica para a produção de energia^[77]. Adiciona-se que aumentam a expressão do PPARG, conhecido pelo seu papel bem definido no metabolismo lipídico de diversos tipos celulares^[77]. Adicionalmente, análises de *microarray* do tecido mamário de pacientes com CDIS (carcinoma ductal *in situ*) classificado como subtipo HER-2, mostraram que a progressão para CIDS de alto grau está correlacionado com alteração no metabolismo lipídico^[9].

Dada as devidas proporções da importância do metabolismo lipídico em células que hiperexpressam o HER-2, nossos dados demonstram que é possível alterar o metabolismo lipídico após o tratamento com DHA.

Encontramos apenas dois genes envolvidos exclusivamente pela hiperexpressão do receptor HER-2 após o tratamento com DHA, *SCD* e

LIPN, ambos hipoexpressos neste trabalho e associados com o metabolismo lipídico. Segundo Luyimbazi D e colaboradores, a inibição do *SCD* com RNA de interferência (siRNA) inibe o crescimento de células de câncer de mama e a hiperexpressão causa o aumento da proliferação ^[131].

Este estudo estabelece informações moleculares importantes para o entendimento do DHA nas células de câncer de mama. Porém, investigações adicionais são necessárias para esclarecer e confirmar os mecanismos do DHA no câncer de mama com possível ação antineoplásica.

6. Conclusões

6.0. CONCLUSÕES

Nas condições da presente pesquisa, o tratamento com DHA :

- 1- Altera o perfil de expressão gênica de linhagem mamária normal (HB4a), transformada (HB4aC5.2) e metastática (SKBR-3).
- 2- Atua de maneira distinta em cada linhagem estudada, dependendo das características fenotípicas.
- 3- Regula genes envolvidos com o metabolismo lipídico em células que hiperexpressam o receptor HER-2.

7. Referências Bibliográficas

7.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

As referências desta dissertação foram inseridas através do programa *EndNote X3*.

1. Jemal, A., et al., *Global cancer statistics*. CA Cancer J Clin. **61**(2): p. 69-90.
2. INCA. *Estimativas 2012: Incidência de câncer no Brasil*. 2012 [cited; Available from: <http://www.inca.gov.br>].
3. Burstein, H.J., et al., *Ductal carcinoma in situ of the breast*. N Engl J Med, 2004. **350**(14): p. 1430-41.
4. Altenburg, J.D., et al., *A synergistic antiproliferation effect of curcumin and docosahexaenoic acid in SK-BR-3 breast cancer cells: unique signaling not explained by the effects of either compound alone*. BMC Cancer. **11**: p. 149.
5. Arribas, J., et al., *p95HER2 and breast cancer*. Cancer Res. **71**(5): p. 1515-9.
6. Tovey, S.M., et al., *Poor survival outcomes in HER2-positive breast cancer patients with low-grade, node-negative tumours*. Br J Cancer, 2009. **100**(5): p. 680-3.
7. Timms, J.F., et al., *Effects of ErbB-2 overexpression on mitogenic signalling and cell cycle progression in human breast luminal epithelial cells*. Oncogene, 2002. **21**(43): p. 6573-86.
8. Yu, D., et al., *Overexpression of c-erbB-2/neu in breast cancer cells confers increased resistance to Taxol via mdr-1-independent mechanisms*. Oncogene, 1996. **13**(6): p. 1359-65.
9. Tamimi, R.M., et al., *Comparison of molecular phenotypes of ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer*. Breast Cancer Res, 2008. **10**(4): p. R67.
10. Institute, W.C.R.F.A. and f.C. Research, *Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective*. 2007.
11. Romieu, I., *Diet and breast cancer*. Salud Publica Mex. **53**(5): p. 430-9.
12. Cohen, L.A., P.C. Chan, and E.L. Wynder, *The role of a high-fat diet in enhancing the development of mammary tumors in ovariectomized rats*. Cancer, 1981. **47**(1): p. 66-71.
13. Goldin, B.R. and S.L. Gorbach, *Effect of diet on the plasma levels, metabolism, and excretion of estrogens*. Am J Clin Nutr, 1988. **48**(3 Suppl): p. 787-90.
14. Goldin, B.R., et al., *Effect of diet on excretion of estrogens in pre- and postmenopausal women*. Cancer Res, 1981. **41**(9 Pt 2): p. 3771-3.
15. Ingram, D.M., et al., *Effect of low-fat diet on female sex hormone levels*. J Natl Cancer Inst, 1987. **79**(6): p. 1225-9.
16. Wu, A.H., M.C. Pike, and D.O. Stram, *Meta-analysis: dietary fat intake, serum estrogen levels, and the risk of breast cancer*. J Natl Cancer Inst, 1999. **91**(6): p. 529-34.
17. Wynder, E.L., D.P. Rose, and L.A. Cohen, *Diet and breast cancer in causation and therapy*. Cancer, 1986. **58**(8 Suppl): p. 1804-13.
18. Kelsey, J.L., *A review of the epidemiology of human breast cancer*. Epidemiol Rev, 1979. **1**: p. 74-109.
19. Manna, S., et al., *Fish oil regulates cell proliferation, protect DNA damages and decrease HER-2/neu and c-Myc protein expression in rat mammary carcinogenesis*. Clin Nutr. **29**(4): p. 531-7.
20. Turner, L.B., *A meta-analysis of fat intake, reproduction, and breast cancer risk: an evolutionary perspective*. Am J Hum Biol. **23**(5): p. 601-8.
21. Chamras, H., et al., *Fatty acid modulation of MCF-7 human breast cancer cell proliferation, apoptosis and differentiation*. J Nutr Biochem, 2002. **13**(12): p. 711-716.
22. Menendez, J.A., R. Lupu, and R. Colomer, *Exogenous supplementation with omega-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid (DHA; 22:6n-3) synergistically*

- enhances taxane cytotoxicity and downregulates Her-2/neu (c-erbB-2) oncogene expression in human breast cancer cells. *Eur J Cancer Prev*, 2005. **14**(3): p. 263-70.
23. Menendez, J.A., et al., *Novel signaling molecules implicated in tumor-associated fatty acid synthase-dependent breast cancer cell proliferation and survival: Role of exogenous dietary fatty acids, p53-p21WAF1/CIP1, ERK1/2 MAPK, p27KIP1, BRCA1, and NF-kappaB*. *Int J Oncol*, 2004. **24**(3): p. 591-608.
24. Schley, P.D., et al., *Mechanisms of omega-3 fatty acid-induced growth inhibition in MDA-MB-231 human breast cancer cells*. *Breast Cancer Res Treat*, 2005. **92**(2): p. 187-95.
25. Sun, H., I.M. Berquin, and I.J. Edwards, *Omega-3 polyunsaturated fatty acids regulate syndecan-1 expression in human breast cancer cells*. *Cancer Res*, 2005. **65**(10): p. 4442-7.
26. Hardman, W.E., et al., *Three percent dietary fish oil concentrate increased efficacy of doxorubicin against MDA-MB 231 breast cancer xenografts*. *Clin Cancer Res*, 2001. **7**(7): p. 2041-9.
27. Siddiqui, R.A., et al., *Docosahexaenoic acid: A natural powerful adjuvant that improves efficacy for anticancer treatment with no adverse effects*. *Biofactors*. **37**(6): p. 399-412.
28. Rose, D.P. and J.M. Connolly, *Effects of dietary omega-3 fatty acids on human breast cancer growth and metastases in nude mice*. *J Natl Cancer Inst*, 1993. **85**(21): p. 1743-7.
29. Maheo, K., et al., *Differential sensitization of cancer cells to doxorubicin by DHA: a role for lipoperoxidation*. *Free Radic Biol Med*, 2005. **39**(6): p. 742-51.
30. Siddiqui, R.A., et al., *Docosahexaenoic acid induces apoptosis in Jurkat cells by a protein phosphatase-mediated process*. *Biochim Biophys Acta*, 2001. **1499**(3): p. 265-75.
31. Rogers, K.R., et al., *Docosahexaenoic acid alters epidermal growth factor receptor-related signaling by disrupting its lipid raft association*. *Carcinogenesis*. **31**(9): p. 1523-30.
32. Corsetto, P.A., et al., *Effects of n-3 PUFAs on breast cancer cells through their incorporation in plasma membrane*. *Lipids Health Dis*. **10**: p. 73.
33. Afman, L.A. and M. Muller, *Human nutrigenomics of gene regulation by dietary fatty acids*. *Prog Lipid Res*. **51**(1): p. 63-70.
34. Kaur, G., et al., *Docosapentaenoic acid (22:5n-3) down-regulates the expression of genes involved in fat synthesis in liver cells*. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. **85**(3-4): p. 155-61.
35. Chiu, L.C., E.Y. Wong, and V.E. Ooi, *Docosahexaenoic acid modulates different genes in cell cycle and apoptosis to control growth of human leukemia HL-60 cells*. *Int J Oncol*, 2004. **25**(3): p. 737-44.
36. Hammamieh, R., et al., *Differential effects of omega-3 and omega-6 Fatty acids on gene expression in breast cancer cells*. *Breast Cancer Res Treat*, 2007. **101**(1): p. 7-16.
37. Simons, K. and D. Toomre, *Lipid rafts and signal transduction*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2000. **1**(1): p. 31-9.
38. Menendez, J.A., L. Vellon, and R. Lupu, *Targeting fatty acid synthase-driven lipid rafts: a novel strategy to overcome trastuzumab resistance in breast cancer cells*. *Med Hypotheses*, 2005. **64**(5): p. 997-1001.
39. Ravacci, G.R., et al., *Lipid raft disruption by docosahexaenoic acid induces apoptosis in transformed human mammary luminal epithelial cells harboring HER-2 overexpression*. *J Nutr Biochem*. **24**(3): p. 505-15.
40. Bougnoux, P., et al., *Fatty acids and breast cancer: sensitization to treatments and prevention of metastatic re-growth*. *Prog Lipid Res*. **49**(1): p. 76-86.
41. Gunstone, F.D., et al., *The lipid handbook* 3ed. 2007, London: Taylor & Francis Group, LLC. 656.
42. Tvrzicka, E., et al., *Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease--a review. Part 1: classification, dietary sources and biological functions*. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. **155**(2): p. 117-30.

43. Simopoulos, A.P., *Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development*. Am J Clin Nutr, 1991. **54**(3): p. 438-63.
44. Simopoulos, A.P., *Evolutionary aspects of omega-3 fatty acids in the food supply*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1999. **60**(5-6): p. 421-9.
45. Simopoulos, A.P., *The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases*. Exp Biol Med (Maywood), 2008. **233**(6): p. 674-88.
46. Waitzberg, D.L., R.S. Torrinhas, and T.M. Jacintho, *New parenteral lipid emulsions for clinical use*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2006. **30**(4): p. 351-67.
47. Pawlosky, R.J., et al., *Physiological compartmental analysis of alpha-linolenic acid metabolism in adult humans*. J Lipid Res, 2001. **42**(8): p. 1257-65.
48. Edwards, I.J. and J.T. O'Flaherty, *Omega-3 Fatty Acids and PPARgamma in Cancer*. PPAR Res, 2008. **2008**: p. 358052.
49. Parkin, D.M., *Global cancer statistics in the year 2000*. Lancet Oncol, 2001. **2**(9): p. 533-43.
50. Parkin, D.M., F.I. Bray, and S.S. Devesa, *Cancer burden in the year 2000. The global picture*. Eur J Cancer, 2001. **37 Suppl 8**: p. S4-66.
51. INCA, I.N.d.C., *Estimativa 2012 : incidência de câncer no Brasil*. 2011: Rio de Janeiro. p. 118.
52. Kaizer, L., et al., *Fish consumption and breast cancer risk: an ecological study*. Nutr Cancer, 1989. **12**(1): p. 61-8.
53. Hursting, S.D., M. Thornquist, and M.M. Henderson, *Types of dietary fat and the incidence of cancer at five sites*. Prev Med, 1990. **19**(3): p. 242-53.
54. Sasaki, S., M. Horacsek, and H. Kesteloot, *An ecological study of the relationship between dietary fat intake and breast cancer mortality*. Prev Med, 1993. **22**(2): p. 187-202.
55. Terry, P.D., J.B. Terry, and T.E. Rohan, *Long-chain (n-3) fatty acid intake and risk of cancers of the breast and the prostate: recent epidemiological studies, biological mechanisms, and directions for future research*. J Nutr, 2004. **134**(12 Suppl): p. 3412S-3420S.
56. Caygill, C.P., A. Charlett, and M.J. Hill, *Fat, fish, fish oil and cancer*. Br J Cancer, 1996. **74**(1): p. 159-64.
57. Simonsen, N., et al., *Adipose tissue omega-3 and omega-6 fatty acid content and breast cancer in the EURAMIC study. European Community Multicenter Study on Antioxidants, Myocardial Infarction, and Breast Cancer*. Am J Epidemiol, 1998. **147**(4): p. 342-52.
58. Simonsen, N.R., et al., *Tissue stores of individual monounsaturated fatty acids and breast cancer: the EURAMIC study. European Community Multicenter Study on Antioxidants, Myocardial Infarction, and Breast Cancer*. Am J Clin Nutr, 1998. **68**(1): p. 134-41.
59. Rose, D.P., J.M. Connolly, and M. Coleman, *Effect of omega-3 fatty acids on the progression of metastases after the surgical excision of human breast cancer cell solid tumors growing in nude mice*. Clin Cancer Res, 1996. **2**(10): p. 1751-6.
60. Noguchi, M., et al., *Chemoprevention of DMBA-induced mammary carcinogenesis in rats by low-dose EPA and DHA*. Br J Cancer, 1997. **75**(3): p. 348-53.
61. Rose, D.P. and J.M. Connolly, *Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents*. Pharmacol Ther, 1999. **83**(3): p. 217-44.
62. Bartram, H.P., et al., *Effects of fish oil on rectal cell proliferation, mucosal fatty acids, and prostaglandin E2 release in healthy subjects*. Gastroenterology, 1993. **105**(5): p. 1317-22.
63. Hardman, W.E., *Omega-3 fatty acids to augment cancer therapy*. J Nutr, 2002. **132**(11 Suppl): p. 3508S-3512S.
64. Bagga, D., et al., *Long-chain n-3-to-n-6 polyunsaturated fatty acid ratios in breast adipose tissue from women with and without breast cancer*. Nutr Cancer, 2002. **42**(2): p. 180-5.
65. Wu, M., et al., *Omega-3 polyunsaturated fatty acids attenuate breast cancer growth through activation of a neutral sphingomyelinase-mediated pathway*. Int J Cancer, 2005. **117**(3): p. 340-8.

66. Harris, R.A., et al., *New model of ErbB-2 over-expression in human mammary luminal epithelial cells*. Int J Cancer, 1999. **80**(3): p. 477-84.
67. Lewis, G.D., et al., *Growth regulation of human breast and ovarian tumor cells by heregulin: Evidence for the requirement of ErbB2 as a critical component in mediating heregulin responsiveness*. Cancer Res, 1996. **56**(6): p. 1457-65.
68. Fernanda Cury-Boaventura, M., et al., *Mechanisms involved in Jurkat cell death induced by oleic and linoleic acids*. Clin Nutr, 2006. **25**(6): p. 1004-14.
69. AFFYMETRIX®, P. *GeneChip® Gene 1.0 ST Array System for Human, Mouse and Rat*. 2007 [cited; Available from: http://www.ohsu.edu/xd/research/research-cores/gmsr/about/upload/gene_1_0_st_datasheet.pdf].
70. Lorenz, C., F. von Pelchrzim, and R. Schroeder, *Genomic systematic evolution of ligands by exponential enrichment (Genomic SELEX) for the identification of protein-binding RNAs independent of their expression levels*. Nat Protoc, 2006. **1**(5): p. 2204-12.
71. Irizarry, R.A., et al., *Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data*. Biostatistics, 2003. **4**(2): p. 249-64.
72. Tusher, V.G., R. Tibshirani, and G. Chu, *Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(9): p. 5116-21.
73. Benjamini, Y., & Hochberg, Y., *Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing*. 57. 1995: Journal of the Royal Statistical Society
74. Breitling, R., et al., *Rank products: a simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments*. FEBS Lett, 2004. **573**(1-3): p. 83-92.
75. Degenhardt, T., et al., *Three members of the human pyruvate dehydrogenase kinase gene family are direct targets of the peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta*. J Mol Biol, 2007. **372**(2): p. 341-55.
76. Mashima, T., H. Seimiya, and T. Tsuruo, *De novo fatty-acid synthesis and related pathways as molecular targets for cancer therapy*. Br J Cancer, 2009. **100**(9): p. 1369-72.
77. Kourtidis, A., et al., *An RNA interference screen identifies metabolic regulators NR1D1 and PBP as novel survival factors for breast cancer cells with the ERBB2 signature*. Cancer Res. **70**(5): p. 1783-92.
78. Russo, I.H. and J. Russo, *Primary prevention of breast cancer by hormone-induced differentiation*. Recent Results Cancer Res, 2007. **174**: p. 111-30.
79. Russo, J., et al., *Breast differentiation and its implication in cancer prevention*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(2 Pt 2): p. 931s-6s.
80. Tobin, K.A., et al., *Regulation of ADRP expression by long-chain polyunsaturated fatty acids in BeWo cells, a human placental choriocarcinoma cell line*. J Lipid Res, 2006. **47**(4): p. 815-23.
81. Chong, B.M., et al., *Determinants of adipophilin function in milk lipid formation and secretion*. Trends Endocrinol Metab. **22**(6): p. 211-7.
82. Russell, T.D., et al., *Cytoplasmic lipid droplet accumulation in developing mammary epithelial cells: roles of adipophilin and lipid metabolism*. J Lipid Res, 2007. **48**(7): p. 1463-75.
83. Abukhdeir, A.M. and B.H. Park, *P21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance*. Expert Rev Mol Med, 2008. **10**: p. e19.
84. Hyder, A., et al., *Expression of fatty acid binding proteins 3 and 5 genes in rat pancreatic islets and INS-1E cells: regulation by fatty acids and glucose*. Islets. **2**(3): p. 174-84.
85. Piantoni, P., et al., *Expression of metabolic, tissue remodeling, oxidative stress, and inflammatory pathways in mammary tissue during involution in lactating dairy cows*. Bioinform Biol Insights. **4**: p. 85-97.
86. Chung, S.S., et al., *SUMO modification selectively regulates transcriptional activity of peroxisome-proliferator-activated receptor gamma in C2C12 myotubes*. Biochem J. **433**(1): p. 155-61.

87. Wang, M., et al., *Induction of mammary differentiation by mammary-derived growth inhibitor-related gene that interacts with an omega-3 fatty acid on growth inhibition of breast cancer cells*. *Cancer Res*, 2000. **60**(22): p. 6482-7.
88. Teoh, S.S., J.C. Whisstock, and P.I. Bird, *Maspin (SERPINB5) is an obligate intracellular serpin*. *J Biol Chem*. **285**(14): p. 10862-9.
89. Zhang, B., et al., *Effects of 5-Aza-CdR on cell proliferation of breast cancer cell line MDA-MB-435S and expression of maspin gene*. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2007. **27**(5): p. 543-6.
90. Kominsky, S.L., *Claudins: emerging targets for cancer therapy*. *Expert Rev Mol Med*, 2006. **8**(18): p. 1-11.
91. Myal, Y., E. Leygue, and A.A. Blanchard, *Claudin 1 in breast tumorigenesis: revelation of a possible novel "claudin high" subset of breast cancers*. *J Biomed Biotechnol*. **2010**: p. 956897.
92. Hallberg, G., et al., *The expression of syndecan-1, syndecan-4 and decorin in healthy human breast tissue during the menstrual cycle*. *Reprod Biol Endocrinol*. **8**: p. 35.
93. Hozumi, K., et al., *Syndecan- and integrin-binding peptides synergistically accelerate cell adhesion*. *FEBS Lett*. **584**(15): p. 3381-5.
94. Edwards, I.J., et al., *In vivo and in vitro regulation of syndecan 1 in prostate cells by n-3 polyunsaturated fatty acids*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(26): p. 18441-9.
95. Tunstall, R.J. and D. Cameron-Smith, *Effect of elevated lipid concentrations on human skeletal muscle gene expression*. *Metabolism*, 2005. **54**(7): p. 952-9.
96. Deckelbaum, R.J., T.S. Worgall, and T. Seo, *n-3 fatty acids and gene expression*. *Am J Clin Nutr*, 2006. **83**(6 Suppl): p. 1520S-1525S.
97. Tsintzas, K., et al., *Elevated free fatty acids attenuate the insulin-induced suppression of PDK4 gene expression in human skeletal muscle: potential role of intramuscular long-chain acyl-coenzyme A*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007. **92**(10): p. 3967-72.
98. Hato, T., M. Tabata, and Y. Oike, *The role of angiopoietin-like proteins in angiogenesis and metabolism*. *Trends Cardiovasc Med*, 2008. **18**(1): p. 6-14.
99. Djordjevic, S., et al., *Identification of the catalytic base in long chain acyl-CoA dehydrogenase*. *Biochemistry*, 1994. **33**(14): p. 4258-64.
100. He, M., et al., *Identification and characterization of new long chain acyl-CoA dehydrogenases*. *Mol Genet Metab*. **102**(4): p. 418-29.
101. Kabuyama, Y., et al., *Dysregulation of very long chain acyl-CoA dehydrogenase coupled with lipid peroxidation*. *Am J Physiol Cell Physiol*. **298**(1): p. C107-13.
102. Tachibana, K., et al., *Regulation of the human SLC25A20 expression by peroxisome proliferator-activated receptor alpha in human hepatoblastoma cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. **389**(3): p. 501-5.
103. Markova, I., et al., *Selected immunohistochemical prognostic factors in endometrial cancer*. *Int J Gynecol Cancer*. **20**(4): p. 576-82.
104. Zhou, D., et al., *Evaluation of protein pigment epithelium-derived factor (PEDF) and microvessel density (MVD) as prognostic indicators in breast cancer*. *J Cancer Res Clin Oncol*. **136**(11): p. 1719-27.
105. Beckers, J., et al., *Identification and validation of novel ERBB2 (HER2, NEU) targets including genes involved in angiogenesis*. *Int J Cancer*, 2005. **114**(4): p. 590-7.
106. DiSilvestro, R.A., et al., *Soy isoflavone supplementation elevates erythrocyte superoxide dismutase, but not plasma ceruloplasmin in postmenopausal breast cancer survivors*. *Breast Cancer Res Treat*, 2005. **89**(3): p. 251-5.
107. Ozyilkan, O., E. Baltali, and S. Kirazli, *CA 15-3, ceruloplasmin and tissue polypeptide specific antigen as a tumour marker panel in breast cancer*. *East Afr Med J*, 2000. **77**(6): p. 291-4.
108. Chi, H., *Sphingosine-1-phosphate and immune regulation: trafficking and beyond*. *Trends Pharmacol Sci*. **32**(1): p. 16-24.
109. Watters, R.J., et al., *Targeting Sphingosine-1-Phosphate Receptors in Cancer*. *Anticancer Agents Med Chem*.
110. Snoussi, K., et al., *Combined effects of IL-8 and CXCR2 gene polymorphisms on breast cancer susceptibility and aggressiveness*. *BMC Cancer*. **10**: p. 283.

111. Yang, G., et al., *CXCR2 promotes ovarian cancer growth through dysregulated cell cycle, diminished apoptosis, and enhanced angiogenesis*. Clin Cancer Res. **16**(15): p. 3875-86.
112. Bieche, I., et al., *CXC chemokines located in the 4q21 region are up-regulated in breast cancer*. Endocr Relat Cancer, 2007. **14**(4): p. 1039-52.
113. Borgstrom, P., R. Discipio, and T.E. Maione, *Recombinant platelet factor 4, an angiogenic marker for human breast carcinoma*. Anticancer Res, 1998. **18**(6A): p. 4035-41.
114. Ruan, Y., W. Pei, and M. Wan, *Membrane protein analysis of human breast cancer cell line MCF-7 by different membrane washing methods*. Cell Biochem Funct, 2008. **26**(7): p. 787-96.
115. Stepulak, A., et al., *Expression of glutamate receptor subunits in human cancers*. Histochem Cell Biol, 2009. **132**(4): p. 435-45.
116. Sheriff, S., et al., *Neuropeptide Y Y5 receptor promotes cell growth through extracellular signal-regulated kinase signaling and cyclic AMP inhibition in a human breast cancer cell line*. Mol Cancer Res. **8**(4): p. 604-14.
117. Lenkinski, R.E., et al., *An illustration of the potential for mapping MRI/MRS parameters with genetic over-expression profiles in human prostate cancer*. MAGMA, 2008. **21**(6): p. 411-21.
118. Epel, M., et al., *Targeting TARP, a novel breast and prostate tumor-associated antigen, with T cell receptor-like human recombinant antibodies*. Eur J Immunol, 2008. **38**(6): p. 1706-20.
119. Oh, S., et al., *Human CTLs to wild-type and enhanced epitopes of a novel prostate and breast tumor-associated protein, TARP, lyse human breast cancer cells*. Cancer Res, 2004. **64**(7): p. 2610-8.
120. Simpson, D.S., et al., *Retinoblastoma family proteins have distinct functions in pulmonary epithelial cells in vivo critical for suppressing cell growth and tumorigenesis*. Cancer Res, 2009. **69**(22): p. 8733-41.
121. Gonzales, A.J. and D.W. Fry, *G1 cell cycle arrest due to the inhibition of erbB family receptor tyrosine kinases does not require the retinoblastoma protein*. Exp Cell Res, 2005. **303**(1): p. 56-67.
122. Li, Y., et al., *In vitro invasiveness of human breast cancer cells is promoted by low density lipoprotein receptor-related protein*. Invasion Metastasis, 1998. **18**(5-6): p. 240-51.
123. Horvat, S., J. McWhir, and D. Rozman, *Defects in cholesterol synthesis genes in mouse and in humans: lessons for drug development and safer treatments*. Drug Metab Rev. **43**(1): p. 69-90.
124. Lee, J.N., et al., *Unsaturated fatty acids inhibit proteasomal degradation of Insig-1 at a postubiquitination step*. J Biol Chem, 2008. **283**(48): p. 33772-83.
125. Konig, B., et al., *Activation of PPAR α and PPAR γ reduces triacylglycerol synthesis in rat hepatoma cells by reduction of nuclear SREBP-1*. Eur J Pharmacol, 2009.
126. Moncur, J.T., et al., *The "Spot 14" gene resides on the telomeric end of the 11q13 amplicon and is expressed in lipogenic breast cancers: implications for control of tumor metabolism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(12): p. 6989-94.
127. Kinlaw, W.B., et al., *Spot 14: A marker of aggressive breast cancer and a potential therapeutic target*. Endocrinology, 2006. **147**(9): p. 4048-55.
128. Jump, D.B., et al., *Polyunsaturated fatty acids inhibit S14 gene transcription in rat liver and cultured hepatocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(18): p. 8454-8.
129. Jump, D.B., et al., *Coordinate regulation of glycolytic and lipogenic gene expression by polyunsaturated fatty acids*. J Lipid Res, 1994. **35**(6): p. 1076-84.
130. Scaglia, N., J.W. Chisholm, and R.A. Igal, *Inhibition of stearylCoA desaturase-1 inactivates acetyl-CoA carboxylase and impairs proliferation in cancer cells: role of AMPK*. PLoS One, 2009. **4**(8): p. e6812.
131. Luyimbazi, D., et al., *Rapamycin regulates stearyl CoA desaturase 1 expression in breast cancer*. Mol Cancer Ther. **9**(10): p. 2770-84.
132. Morris, A., et al., *Induction of anti-mammary cancer immunity by engaging the OX-40 receptor in vivo*. Breast Cancer Res Treat, 2001. **67**(1): p. 71-80.

133. Xie, F., et al., *Costimulatory molecule OX40/OX40L expression in ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of breast: an immunohistochemistry-based pilot study*. *Pathol Res Pract*. **206**(11): p. 735-9.
134. Ahn, J., et al., *Effects of glutathione S-transferase A1 (GSTA1) genotype and potential modifiers on breast cancer risk*. *Carcinogenesis*, 2006. **27**(9): p. 1876-82.
135. Maula, S.M., et al., *Carbohydrates located on the top of the "cap" contribute to the adhesive and enzymatic functions of vascular adhesion protein-1*. *Eur J Immunol*, 2005. **35**(9): p. 2718-27.

8. Apêndices

Certificado

Certificamos que o Trabalho intitulado **ÁCIDO DOCOSAHEXAENOICO ALTERA A EXPRESSÃO GÊNICA GLOBAL DE MANEIRAS DIFERENTES EM LINHAGEM NORMAL E TUMORAL DE MAMA** de autoria de **Almeida DF; Castro RCB; Mazzotti TKF; Del Valle PR; Ravacci GR; Roela RA** foi vencedor em 1º Lugar, do II Prêmio Pedro Kassab em parceria com a Sociedade Brasileira de Cancerologia (SBC), por ocasião do V Congresso Brasileiro de Nutrição e Câncer (CBNC), em memória ao inesquecível médico Dr. Pedro Salomão Kassab.

Dan L. Waltberg
Presidente do Ganep e CBNC

Dr. Robson Freitas de Moura
Secretário Geral da SBC

Apoio:

CERTIFICATE

We certify that the abstract P055 - DOCOSAHEXAENOIC ACID REGULATES GENES RELATED WITH LIPID METABOLISM DIFFERENTLY IN NORMAL AND BREAST CANCER CELL LINE: A MICROARRAY APPROACH attended the 6th Congress of the International Society of NutriGenetics / NutriGenomics in São Paulo, Brazil, Rebouças Convention Center, November 18-21, 2012 as ORAL PRESENTATION - YOUNG INVESTIGATOR AWARD SESSION

Authors: DANIELLE FONTES ALMEIDA; RITA DE CÁSSIA BORGES CASTRO; ROSINEIRE APARECIDA ROELA; TATIANE KATSUE F MAZZOTTI; GRAZIELA ROSA RAVACCI; DAN LINETZKY WAITZBERG

Sao Paulo, November 21, 2012

THOMAS GNA
PRESIDENT OF THE
ORGANIZING COMMITTEE

RUI CURI
CO-PRESIDENT OF THE
CONGRESS

FRANCISCO LAJOLO
CO-PRESIDENT OF THE
CONGRESS

ORGANIZER:

International Society of
NutriGenetics / NutriGenomics

CO-ORGANIZERS:

USP
SBAN