Graziela Rosa Ravacci

**Desestruturação de *lipid rafts* por ácido docosaexaenoico (DHA) induz apoptose
em células epiteliais luminais da glândula mamária humana transformadas pela
superexpressão de HER-2**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade
de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências
Programa de: Oncologia
Orientador: Prof. Dan Linetzky Waitzberg

São Paulo

2013

Graziela Rosa Ravacci

Desestruturação de *lipid rafts* por ácido docosaexaenoico (DHA) induz apoptose em células epiteliais luminais da glândula mamária humana transformadas pela superexpressão de HER-2

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade
de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências
Programa de: Oncologia
Orientador: Prof. 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

Ravacci, Graziela Rosa

Desestruturação de *lipid rafts* por ácido docosaexaenoico (DHA) induz apoptose em células epiteliais luminais da glândula mamária humana transformadas pela superexpressão de HER-2 / Graziela Rosa Ravacci. -- São Paulo, 2013.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Oncologia.

Orientador: Dan Linetzky Waitzberg.

Descritores: 1.Neoplasias da mama 2.Receptor do fator de crescimento epidérmico HER-2 3.Microdomínios da membrana 4.Transdução de sinal 5.Apoptose 6.Ácidos graxos ômega 3

USP/FM/DBD-030/13

DEDICATÓRIA

*Dedico esta tese ao meu pai **Rubens Carrano Ravacci** e a minha mãe **Francisca R. Carrano Ravacci** por todo amor e carinho dedicado a mim. A minha irmã **Leticia Rosa Ravacci** por ser minha parceira incondicional e ao meu esposo **Domingos Antônio Mucciacito Jr.** por estar sempre ao meu lado.*

Obrigada por todo amor e apoio para que eu pudesse alcançar mais um objetivo na vida! Minha família é meu porto seguro.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador **Dan L. Waitzberg** e a minha co-orientadora **Maria Mitzi Brentani**,

Na minha curta jornada na vida científica, vocês estiveram ao meu lado. Durante todo esse tempo, a orientação e amizade que recebi foram fundamentais para meu amadurecimento profissional. Mais do que meus orientadores científicos, vocês são meus mestres, donos de meu mais profundo respeito e admiração.

“Mas estes contemporâneos cujas mãos parecem feitas somente para remexer corrosivos em cadinhos e os olhos para olharem através do microscópio, na verdade realizaram milagres. Eles penetram no recôndito da natureza e revelam como ela opera em suas funções mais secretas. Eles galgam o espaço. Descobriram o processo de circulação do sangue e a natureza do ar que respiramos. Adquiriram novos e quase ilimitados poderes. E podem comandar o trovão nos céus, reproduzir nos laboratórios os terremotos e perscrutar o mundo invisível.”

Mary Shelley

AGRADECIMENTOS

Á **Raquel Torrinhas** pela amizade, carinho, respeito, compartilhamento do conhecimento científico, pertinentes sugestões, revisão cuidadosa da tese e auxílio em minhas atividades junto à Equipe de Metabologia e Nutrição em Cirurgia (Metanutri) do Laboratório de Nutrição e Cirurgia Metabólica do Aparelho Digestivo da FMUSP.

Ao **Ronaldo Santos** pelo respeito, compartilhamento científico, pertinentes sugestões, revisão cuidadosa da tese e pela deliciosa amizade de mais ou menos 12 anos.

Aos Profs. **Maria Mitzi Brentani, Roger Chammas, Elizabeth Torres, Vilma Regina Martins e Rui Curi**, pelo acolhimento em seus laboratórios e viabilização das análises metodológicas desta tese.

Ao amigos, **Tharcisio Tortelli, Thiago Manzoni Jacintho, Glaucia Hajj e William Festuccia**, pela parceria científica, auxílio na padronização dos métodos e interpretação dos resultados.

Aos colegas da Metanutri, em especial, à **Liliam Mika Horie, Cristiane Verotti, Livia Samara Rodrigues, Priscila Sala e Priscila Garla**, pela colaboração, intercâmbio de experiências/conhecimentos e companheirismo frequentes que, por vezes, amenizaram momentos difíceis vividos durante o desenvolvimento desta tese; e à **Elaine Aparecida da Silva**, pelo auxílio administrativo e amizade.

Às queridas biólogas **Raquel Santana e Thaís Garcia**, pela amizade e intercâmbio de experiências.

Aos colegas do Laboratório de Oncologia Experimental (LIM24), em especial, à **Lucia Hirata Katayama, Rosimeire Aparecida Roela, Fátima Solange**

Pasini, Giselly Encinas, Simone Vieira da Costa, Cintia Milani, Adriana Priscila Trapé; e à equipe do Prof. **Roger Chammas**, em especial, à **Andrea Otake, Guilherme Francisco e Renata Saito**, por fazerem de meu ingresso no Programa de Oncologia, descontraído e prazeroso.

À **Maria José** pelo constante auxílio administrativo, carinho e amizade; e ao **Jair Claudio** pela colaboração na manutenção da sala de cultura e por tornar nosso ambiente de trabalho mais agradável.

Aos Profs. **Heraldo Possolo de Souza, Igor Moyses Longo Snitcovsky** e **Thomas Prates Ong**, pelas valiosas sugestões oferecidas durante minha prova de qualificação, que certamente contribuíram para qualidade científica desta tese.

A **FAPESP** pelo auxílio financeiro que viabilizou o desenvolvimento desta tese.

“O homem que acredita que sua cidade natal é o mundo tem mais chances de ser feliz do que aquele que aspira tornar-se maior que sua natureza lhe permite.”

Mary Shelley

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELA

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE SIGLAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	2
2. OBJETIVO.....	20
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3. MÉTODOS.....	22
3.1. COMITÊ DE ÉTICA.....	22
3.2. LOCAL DE EXECUÇÃO DAS ATIVIDADES.....	22
3.3. PLANEJAMENTO DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	23
3.4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS –.....	25
3.4.1. <i>Culturas celulares</i>	25
3.4.1.1. Linhagens celulares.....	25
3.4.1.2. Plaqueamento.....	26
3.4.1.3. Condições de cultura.....	27
3.4.1.4. Tratamento com DHA.....	27
3.4.2. <i>Análise de morte, ciclo celular e apoptose</i>	28
3.4.2.1. Preparo das amostras celulares.....	28
3.4.2.2. Incorporação de iodeto de propídio (PI).....	29
3.4.2.3. Marcação com Anexina V.....	31
3.4.3. <i>Análise dos lipid rafts</i>	32
3.4.4. <i>Análise da incorporação de DHA e perfil de ácidos graxos na membrana celular</i>	36
3.4.5. <i>Análise de proliferação celular</i>	37
3.4.5.1. Exclusão por azul de Tripán.....	37
3.4.5.2. Número de células metabolicamente ativas.....	38
3.4.6. <i>Análise da proteína BAD (Bcl-2 associated death promoter)</i>	39
3.4.7. <i>Análise de proteínas Akt, Erk1/2, FASN, S6K</i>	40
3.4.8. <i>Análise do conteúdo de RNAm dos genes HER-2/neu, FAT/CD36, FABP4, DGAT, DEPTOR, SREBP e FASN</i>	43
3.4.8.1. Extração de RNA.....	43
3.4.8.2. Síntese de cDNA.....	44
3.4.8.3. Reação de RT-PCR.....	44
3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS.....	46
4. RESULTADOS.....	48
4.1. DA SUPEREXPRESSÃO DE HER-2.....	48
4.1.1. <i>Lipid rafts e perfil de ácidos graxos de membranas celulares</i>	48

4.1.2.	<i>Sinalização iniciada por receptores HER-2: lipogênese, sobrevivência e proliferação celular</i>	51
4.1.3.	<i>Na atividade transcricional de PPARγ</i>	53
4.1.4.	<i>Na expressão de DEPTOR</i>	54
4.2.	DO TRATAMENTO COM DHA	56
4.2.1.	<i>Na estrutura dos lipid rafts e perfil de ácidos graxos da membrana celular</i>	56
4.2.2.	<i>Sinalização iniciada por receptores HER-2: lipogênese, sobrevivência e proliferação celular</i>	59
4.2.3.	<i>Na indução de apoptose</i>	62
5.	DISCUSSÃO	67
6.	CONCLUSÕES	77
7.	PERSPECTIVAS	79
8.	ANEXOS	81
9.	REFERÊNCIAS	105
	APÊNDICE	

LISTAS

Lista de Figuras

Figura 1 - Figura ilustrativa de vias de sinalização ativadas por receptores HER-2.

Figura 2 - Figura ilustrativa da localização dos receptores HER-2 na membrana celular.

Figura 3 - Figura ilustrativa dos complexos mTORC2 e mTORC1 e suas proteínas constituintes.

Figura 4 - Figura ilustrativa da ativação da via HER-2/PI3k/Akt/mTOR/SREBP-1.

Figura 5 - Figura ilustrativa dos elementos necessários para ativação completa de mTORC1.

Figura 6 - Figura ilustrativa da regulação da ativação de Akt por mTORC1 e mTORC2.

Figura 7 - Figura ilustrativa da regulação de mTORC1 pela superexpressão de DEPTOR.

Figura 8 - Histograma representativo da distribuição das células consideradas em morte e nas diferentes fases do ciclo celular após aquisição dos dados por citometria de fluxo.

Figura 9 - Histograma representativo da distribuição das células marcadas com PI e/ou Anexina V-FITC.

Figura 10 - Micrografias obtidas em microscópio de fluorescência (aumento de 20x), mostram a marcação indireta de *lipid rafts* (contorno em vermelho) de

linhagens celulares HB4a, HB4aC5.2, MCF-10 e MDA-MB231 por *Alexa Flúor 594* conjugado com a subunidade B da toxina da cólera.

Figura 11 - Micrografias obtidas em microscópio confocal mostram a marcação de *lipid rafts* (contorno em vermelho) e de colesterol (contorno em azul), bem como a combinação das imagens (merge) de linhagens celulares HB4a e HB4aC5.2, por *Alexa Flúor 594* conjugado com a subunidade B da toxina da cólera em associação com filipina.

Figura 12 - Porcentagem relativa de ácidos graxos na membrana de células HB4a (A) e HB4aC5.2 (B).

Figura 13 - Efeito da superexpressão de HER-2 na ativação de proteínas associadas com sobrevivência celular, lipogênese e proliferação.

Figura 14 - Expressão relativa de genes FAT/CD36, FABP4 e DGAT, alvos de PPAR γ .

Figura 15 - Expressão relativa do gene DEPTOR e sua consequência na atividade de mTORC1.

Figura 16 - Porcentagem relativa de ácidos graxos na membrana de células HB4a (A) e HB4aC5.2 (B) tratadas com ácido docosaexaenoico (DHA - 100 μ M, por 72 horas).

Figura 17 - Visualização de *lipid rafts* e colesterol em células HB4a e HB4aC5.2 tratadas com ácido docosaexaenoico (DHA - 100 μ M, por 72 horas).

Figura 18 - Efeito do tratamento de células HB4a e HB4aC5.2 com ácido docosaexaenoico (DHA - 100 μ M, por 72 horas) nas proteínas ativadas pelos receptores HER-2.

Figura 19 - Expressão relativa de genes FAT/CD36, FABP4, DGAT, DEPTOR, SREBP-1 e FASN, em células HB4a e HB4aC5.2, tratadas com ácido docosaexaenoico (DHA - 100 μ M, por 72 horas; grupo DHA).

Figura 20 - Visualização da proteína BAD em células HB4a e HB4aC5.2.

Figura 21 - Porcentagem de morte celular e apoptose induzida por ácido docosaexaenoico (DHA), em linhagens HB4a e HB4aC5.2.

Lista de Tabela

Tabela 1 - *Primers* utilizados na quantificação dos níveis de RNAm.

Lista de Abreviaturas

4EBP1	<i>Eucaryotic initiation factor 4E-binding protein 1</i>
ADP	Adenosina difosfato
AG	Ácidos graxos
Akt	<i>Protein kinase B</i>
BAD	<i>Bcl-2 associated death promoter</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CD36	<i>Cluster of differentiation 36</i>
cDNA	DNA complementar
CT-B	Subunidade B da toxina colérica
CXCR4	<i>C-X-C motif chemokine receptor type 4</i>
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride</i>
DEPEC	<i>Diethylpyrocarbonate</i>
DEPTOR	<i>DEP domain-containing mTOR-interacting protein</i>
DGAT	<i>Diacylglycerol acyltransferases</i>
DHA	Docosaenoico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EPA	Eicosapentaenoico
Erk1/2	<i>Extracellular-signal-regulated kinases</i>
FABP4	<i>Fatty acid binding protein 4</i>
FASN	<i>Fatty acid synthase</i>

FAT	<i>Fatty acid translocase gene</i>
FITC	Fluorocromo isotiocianato de fluoresceína
FL	Fluorescência
GLUT4	<i>Glucose transporter type 4</i>
HB4a	Célula epitelial luminal do tecido mamário humano normal com baixa expressão de HER-2
HB4aC5.2	Clone derivado da HB4a, que superexpressa receptores HER-2.
HER-2	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
HMBS	<i>Hydroxymethylbilane synthase</i>
IgG	Imunoglobulina G
IRS	<i>Insulin receptor substract</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCF-10	Células epiteliais basais isoladas da glândula mamária de pacientes com fibrose cística.
MDA-MB 231	Células epiteliais basais de adenocarcinoma de mama isoladas da efusão pleural de pacientes com carcinoma invasivo.
mLST8/GβL	<i>Mammalian lethal with SEC13 protein 8 / G protein beta subunit-like</i>
mSin 1	<i>Mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1</i>
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
mTORC	<i>mTOR complex</i>
MTT	Brometo de tetrazolium amarelo
PBS	Tampão salina fosfato
PCR	Reação em cadeia de polimerase

PI	Iodeto de propídio
PI3K	<i>Phosphoinositide-3-kinase</i>
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PPRE	<i>Peroxisome proliferator element response</i>
PRAS40	<i>Proline rich AKT substrate 40kDa</i>
Protor-1	<i>Protein observed with Rictor-1</i>
Raptor	<i>Regulatory associated protein of TOR</i>
RHEB	<i>Ras homologue enriched in brain</i>
Rictor	<i>Rapamycin-insensitive companion of mTOR</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNA_m	RNA mensageiro
RT-PCR	Transcriptase reversa – reação em cadeia de polimerase
RXR	<i>Retinoid X receptors</i>
S6K	<i>Ribosomal S6 kinase</i>
SFB	Soro fetal bovino
SGK 1	<i>Serum glucocorticoid regulated kinase 1</i>
SREBP-1	<i>Sterol regulatory element-binding proteins-1</i>
TSC	<i>Tuberous sclerosis complex</i>
UBC	Ubiquitin C

Lista de Símbolos

%	Porcentagem
≤	Menor ou igual
≥	Maior ou igual
°C	Grau Centígrado
g	Gramas
L	Litros
M	Molaridade
mA	Miliampere
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
N	Normalidade
nm	Nanômetro
rpm	Rotações por minuto
V	Volts
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar

Lista de Siglas

CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CIPE	Centro Internacional de Pesquisa
EUA	Estados Unidos da América
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FSP	Faculdade de Saúde Pública
HC	Hospital das Clínicas
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
INCOR	Instituto do Coração
LIM	Laboratório de Investigação Médica
UK	Reino Unido
USP	Universidade de São Paulo

RESUMO

Ravacci GR. Desestruturação de *lipid rafts* por ácido docosaexaenoico (DHA) induz apoptose em células epiteliais luminais da glândula mamária humana transformadas pela superexpressão de HER-2 [tese] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

A superexpressão de receptores HER-2 é anormalidade celular de grande relevância clínica no câncer de mama. Ela ocorre em aproximadamente 30% de carcinomas de mama incluindo lesões pré-neoplásicas e malignas, e está associada a prognóstico desfavorável. A hiperativação dos receptores HER-2, consequência natural de sua superexpressão, promove proliferação celular aberrante e tumorigênese. Admite-se que a ativação e envio de sinais via HER-2 possa acontecer quando estes receptores se encontram em compartimentos específicos da membrana celular, os *lipid rafts*. Assim, um número maior de HER-2 poderia implicar em maior quantidade de *lipid rafts*. Para testar essa hipótese, usamos modelo de transformação oncogênica que nos permitiu avaliar, especificamente, os efeitos da superexpressão de HER-2 e identificar a quantidade de *lipid rafts*. Para isso utilizamos a linhagem celular HB4a, derivada de célula epitelial luminal do tecido mamário humano normal com baixa expressão de HER-2; e a linhagem HB4aC5.2, um clone derivado da HB4a, que superexpressa receptores HER-2. Nas células HB4aC5.2, a superexpressão de HER-2 foi acompanhada pelo aumento dos *lipid rafts* na membrana celular, bem como, hiperativação de sinais de sobrevivência, proliferação (aumento da ativação de proteínas Akt e Erk1/2, respectivamente), e taxa de proliferação celular duas vezes mais rápida que a linhagem normal HB4a. Adicionalmente, a superexpressão de HER-2 foi associada com aumento da lipogênese celular (fenótipo lipogênico), dependente do aumento de ativação da enzima FASN e da superexpressão de DEPTOR. A FASN é responsável pela síntese de palmitato, utilizado para formação de *lipid rafts*. A superexpressão de DEPTOR, por modular a atividade transcricional de PPAR γ , pode evitar a lipotoxicidade do excesso de palmitato. Além disso, DEPTOR, por sua capacidade em reduzir atividade do complexo mTORC1, contribui para sobrevivência celular dependente da proteína Akt. Em continuidade, consideramos, como segunda hipótese, que a desestruturação de *lipid rafts* poderia influenciar negativamente a ativação dos receptores HER-2. Para isso tratamos, as mesmas linhagens celulares anteriormente descritas, com ácido docosaexaenoico (DHA), um tipo de ácido graxo ômega-3. Nossos resultados mostraram que, nas células HB4aC5.2, o tratamento com DHA desestruturou os *lipid rafts*, inibiu a sinalização iniciada pelos receptores HER-2 (diminuição da ativação das proteínas Akt, Erk1/2, FASN, atividade transcricional de PPAR γ e expressão de DEPTOR) e reverteu o fenótipo lipogênico. Adiciona-se que essas modificações celulares e moleculares foram acompanhadas por indução significativa de morte e apoptose. As mesmas alterações não foram observadas nas células normais HB4a. Em conclusão, o presente estudo reforça a associação entre a presença de HER-2 e *lipid rafts*. Adicionalmente aponta que a desestruturação de *lipid rafts* por DHA reduz a sinalização de HER-2. Por fim, sugere que distúrbios em *lipid rafts*, induzidos por DHA, possam representar ferramenta útil no controle da sinalização aberrante

deflagrada pelos receptores HER-2, e aponta potencial terapêutico na suplementação de DHA para quimioprevenção e tratamento do câncer de mama HER-2 positivo.

Descritores: 1.Neoplasias da mama 2.Receptor do fator de crescimento epidérmico HER-2 3.Microdomínios da membrana 4.Transdução de sinal 5.Apoptose 6.Ácido graxo ômega-3.

ABSTRACT

Ravacci GR. Lipid rafts disruption by docosahexaenoic acid (DHA) induces apoptosis in transformed human mammary luminal epithelial cells harboring HER-2 overexpression [thesis] São Paulo: "Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo"; 2013.

HER-2 receptor overexpression is a cellular abnormality of great clinical significance in breast cancer. It is described in approximately 30% of breast carcinomas, including preneoplastic and malignant lesions, and is associated with poor prognosis. Hyperactivation of HER-2 receptors, a natural consequence of its overexpression, promotes aberrant cell proliferation and tumorigenesis. For signal activation and transduction to occur, HER-2 must be localized in specific compartments in the cell membrane: the lipid rafts. Therefore, we hypothesize that a greater number of HER-2 receptors could indicate a greater quantity of lipid rafts. To test this, we used an oncogenic transformation model that specifically allowed assessment of the effects of HER-2 overexpression and identification of the quantity of lipid rafts: an HB4a cell line derived from normal human breast tissue luminal epithelial cells with low HER-2 expression, and an HB4aC5.2 cell line, a clone derived from HB4a that overexpresses HER-2 receptors. In the HB4aC5.2 cells, HER-2 overexpression was accompanied by an increase in lipid rafts in cell membranes as well as hyperactivation of survival signals, proliferation (increased activation of the proteins Akt and ERK1/2, respectively), and an increased rate of proliferation, compared to the normal HB4a line. In addition, HER-2 overexpression was associated with increased cellular lipogenesis (lipogenic phenotype), dependent on the increased activation of the FASN enzyme and the overexpression of DEPTOR. FASN is responsible for the synthesis of palmitate, used to synthesize lipid rafts. Overexpression of DEPTOR by modulating PPAR γ transcriptional activity, may avoid lipotoxicity from excess palmitate. Moreover, DEPTOR, with its ability to reduce mTORC1 complex activity, contributes to cell survival dependent on Akt. To continue, we considered as a second hypothesis that the disruption of lipid rafts could negatively influence HER-2 receptor activation. For this, we treated the same cell lines described above with docosahexaenoic acid (DHA), a omega-3 fatty acid. Our results showed that in HB4aC5.2 cells DHA treatment disrupted the lipid rafts, inhibited signaling initiated by HER-2 receptors (reduced activation of Akt, ERK1/2, and FASN proteins, PPAR γ transcriptional activity, and DEPTOR expression) and reversed the lipogenic phenotype. In addition, these cellular and molecular changes were accompanied by a significant induction of apoptosis and death. The same changes were not observed in normal HB4a cells. In conclusion, the present study reinforces the association between HER-2 presence and lipid rafts. It also indicates that the disruption of lipid rafts by DHA reduces HER-2 signaling. Finally, it suggests that DHA-induced disturbances in lipid rafts may represent a useful tool in controlling aberrant signaling triggered by HER-2 receptors, and indicate therapeutic potential in DHA supplementation for chemoprevention and treatment of HER-2 positive breast cancer.

Descriptors: 1.Breast neoplasias 2.Epidermal growth factor receptor HER-2 3.Membrane microdomains 4.Signal transduction 5.Apoptosis 6. Fatty acids omega-3

► INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama permanece como o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e o primeiro entre as mulheres. No Brasil, cerca de 52.680 novos casos desse tumor são estimados para o ano de 2012, com risco de 77 casos a cada 100 mil mulheres¹.

A progressão natural do câncer de mama envolve estágios clínicos e patológicos, onde células luminais epiteliais adquirem características fenotípicas que permitem sua rápida proliferação, progressão para carcinoma *in situ*, invasão do tecido adjacente e metástase. Essas características podem ser decorrentes de diversas alterações genômicas e epigenéticas, que resultam na superexpressão de oncogenes e redução da expressão de genes supressores tumorais^{2,3}.

De maneira geral, o prognóstico de câncer de mama é determinado por fatores clínico-patológicos tradicionais, como tamanho, grau e expressão de receptores hormonais e de superfície celular. Esses fatores podem classificá-lo como luminais A e B, basais (ou triplo negativos), normal - *like* e com superexpressão de HER-2/neu (do inglês, *human epidermal growth factor receptor 2*)⁴.

A superexpressão de receptores HER-2 é anormalidade celular de grande relevância clínica no câncer de mama. Ela ocorre em aproximadamente 30% dos carcinomas de mama, desde lesões pré-neoplásicas até malignas, e está associada a prognóstico desfavorável e menor taxa de sobrevida, em comparação a tumores de mama com níveis normais de receptores HER-2^{5,6,7}.

O receptor HER-2 é uma glicoproteína transmembrana com atividade tirosina quinase, que funciona como um correceptor. Embora não se conheça seu ligante, o

receptor HER-2 forma homo ou heterodímeros com membros de sua família (EGFR -do inglês, *epidermal growth factor receptor* - HER1 e HER3) para ativar, em diferentes intensidades, vias de sinalização que regulam processos envolvidos na proliferação e sobrevivência celular, como PI3k/Akt (do inglês, *phosphoinositide-3-kinase/protein kinase B*) e MAPK-Erk1/2 (do inglês, *mitogen-activated protein kinase - extracellular-signal-regulated kinases*)^{8,9}.

Adicionalmente, a ativação de receptores HER-2 potencializa sinais de sobrevivência e proliferação celular, por inibir diretamente vias de indução de apoptose, como as iniciadas por BAD (do inglês, *Bcl-2-associated death promoter protein*)^{8,9,10}. As vias de sinalização que regulam processos envolvidos na proliferação e sobrevivência celular, ativadas por HER-2, encontram-se ilustradas na figura 1^{8,9,10}.

Dessa forma, a hiperativação de receptor HER-2, devido à sua superexpressão, à amplificação de seu gene ou à mutação na sua ativação, pode promover proliferação celular aberrante e tumorigênese. Essa propriedade faz do receptor HER-2 importante alvo terapêutico contra o câncer de mama^{9,11}.

Figura 1- Figura ilustrativa de vias de sinalização ativadas por receptores HER-2. Ativação de Akt e Erk1/2 e inibição da proteína Bad promovem sobrevivência celular, proliferação e evasão de apoptose. Adaptada de Menendez et al¹⁰.

A terapia contra o câncer de mama HER-2 positivo frequentemente inclui o uso de Trastuzumab, um anticorpo monoclonal cujo alvo é o domínio extracelular de HER-2¹⁰. Embora clinicamente efetivo, uma proporção significativa de pacientes com tumor de mama HER-2 positivo não responde ou se torna resistente ao tratamento com Trastuzumab, sugerindo que a biogênese do receptor HER-2 não está completamente entendida¹⁰.

Em células de câncer de mama HER-2 positiva, receptores HER-2 estão distribuídos na membrana celular, em um complexo equilíbrio entre homodímeros, heterodímeros e monômeros¹⁰. Evidências experimentais mostraram que o ponto-chave da ativação de receptores HER-2, seja na forma de homo ou heterodímeros, é sua localização na membrana celular¹². Admite-se que a ativação e envio de sinais

via HER-2 possa acontecer quando estes receptores se encontram em compartimentos específicos da membrana celular, os *lipid rafts*¹².

Os *lipid rafts* são estruturas ricas em colesterol e fosfolípidos saturados que, quando agrupados, funcionam como plataformas para sinalização celular (figura 2)^{10,13}. Adicionalmente, o receptor HER-2 está associado com ativação de via lipogênica mediada por FASN (do inglês, *fatty acid synthase*), que sinaliza síntese de palmitato, frequentemente utilizado para formação dos *lipid rafts*^{10,12,14}. Assim, em células de câncer de mama, é possível que a superexpressão de receptores HER-2 seja acompanhada pelo aumento dos microdomínios *rafts* na membrana celular. Essa propriedade garantiria o envio de sinais constantes para proliferação e sobrevivência celular, favorecendo um ciclo vicioso de sinalização celular aberrante pró-sobrevivência, conforme ilustrado na figura 2¹⁰.

Por outro lado, o acúmulo de palmitato em tecido não adiposo pode funcionar como *feedback* negativo para a síntese desse ácido graxo e estimular lipólise e apoptose, por aumentar a produção de radicais livres e ceramidas^{15,16}. No entanto, em células de carcinoma mama com superexpressão de HER-2, a citotoxicidade do excesso de palmitato parece ser evitada através da sua conversão e armazenamento na forma de triglicérides, de maneira dependente de PPAR γ (do inglês, *peroxisome proliferator-activated receptor*)^{15,16}.

Figura 2 - Figura ilustrativa da localização dos receptores HER-2 na membrana celular. Para sua ativação e envio de sinais de sobrevivência e proliferação, os receptores HER-2 devem se localizar nos *lipid rafts*. Os fosfolípidos saturados estão representados em vermelho e o colesterol em azul. Destaca-se que a ativação de receptores HER-2 também é responsável pela síntese de palmitato, utilizado para a formação dos *lipid rafts*, através da ativação de via lipogênica mediada pela enzima FASN. Adaptada de Menendez et al¹⁰.

PPAR γ é um fator de transcrição da família de receptores nucleares, cujos membros incluem ainda PPAR α e PPAR β , caracterizados por seu padrão de distribuição nos tecidos e por sua função metabólica. Funcionam como fatores de transcrição ligantes dependentes, que regulam a expressão de genes alvo. Esse processo ocorre pela formação de heterodímeros com RXR (do inglês, *retinoid X receptors*), com posterior associação a PPRE (do inglês, *peroxisome proliferator element response*), localizados na região promotora de cada gene¹⁷.

Elevados níveis de PPAR γ são encontrados no tecido adiposo branco e marrom, epitélio intestinal, retina, músculo esquelético, órgãos linfóides e tecidos

sensíveis à insulina, como a mama. Funcionam como sensores de níveis de ácidos graxos na célula e regulam transcricionalmente vias de sinalização, envolvidas na captação e transporte de ácidos graxos e na síntese de triglicérides, por meio da ativação dos genes FAT/CD36 (do inglês, *fatty acid translocase gene/cluster of differentiation 36*), FABP4 (do inglês, *fatty acid binding protein 4*) e DGAT (do inglês, *diacylglycerol acyltransferases*), respectivamente^{17,18,19,20}.

Embora pouco seja conhecido sobre os mecanismos de regulação da atividade de PPAR γ em células da glândula mamária, sua ativação e consequente aumento da expressão dos genes FAT/CD36, FABP4 e DGAT, frente à superexpressão de HER-2, pode conferi-las fenótipo lipogênico e vantagens proliferativas e de sobrevivência. Além de evitar lipotoxicidade, por permitir a conversão e armazenamento de palmitato em triglicérides, PPAR γ pode viabilizar a captação e transporte de outros lipídios importantes para a biossíntese de membranas e modificações pós-traducionais de proteínas, ambos eventos que acompanham a proliferação celular^{15,16,17,18,19,20}.

Nesse sentido, estudos *in vitro* têm mostrado associação entre superexpressão de HER-2 e níveis protéicos de PPAR γ . Na clínica, análises imuno-histoquímicas de biópsias de carcinomas de mama HER-2 positivo também mostraram intensa expressão nuclear de PPAR γ ²¹.

Especula-se que receptores HER-2 podem regular a expressão e/ou atividade de PPAR γ por meio da ativação da proteína mTOR (do inglês, *mammalian target of rapamycin*). A via de sinalização HER-2/PI3k/Akt/mTOR pode culminar na ativação de fatores de transcrição, como SREBP-1 (do inglês, *sterol regulatory element*-

binding proteins-1) que, dentre suas funções, pode regular atividade de PPAR γ ^{10,15,22,23}.

A mTOR é uma serina/treonina da família da proteína PI3K que regula processos envolvidos no crescimento e divisão celular. Para executar essa atividade regulatória, mTOR interage com diferentes proteínas formando dois complexos, mTORC2 (do inglês, *mTORcomplex 2*) e mTORC1 (do inglês, *mTOR complex 1*)²³.

Quando mTOR se associa à Rictor (do inglês, *rapamycin-insensitive companion of mTOR*), mSin 1 (do inglês, *mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1*), Protor-1 (do inglês, *protein observed with Rictor-1*), mLST8/G β L (do inglês, *mammalian lethal with SEC13 protein 8 / G protein beta subunit-like*) e DEPTOR (do inglês, *DEP domain-containing mTOR-interacting protein*), ela constitui o complexo mTORC2 (figura 3)²³. Como mostra a figura 4, esse complexo parece se localizar na porção interna da membrana celular, sendo exclusivamente ativado pela ligação entre fatores de crescimento com seus receptores. Ativação de mTORC2 promove fosforilação das proteínas Akt e SGK 1 (do inglês, *serum glucocorticoid regulated kinase 1*), envolvidas na sobrevivência e progressão do ciclo celular. Ao mesmo tempo, ativação de Akt inibe atividade GTPase do complexo TSC1-TSC2 (do inglês, *tuberous sclerosis complex 1 and 2*), com consequente ativação da proteína RHEB (do inglês, *Ras homologue enriched in brain*). Dessa forma, RHEB pode interagir fisicamente e ativar o complexo mTORC1. No entanto, ativação completa de mTORC1 também depende da quantidade de nutrientes intracelulares (figura 5)²³.

O complexo mTORC1 é composto quando mTOR se associa à Raptor (do inglês, *regulatory associated protein of TOR*), mLST8/G β L (do inglês, *mammalian*

lethal with SEC13 protein 8 / G protein beta subunit-like), PRAS40 (do inglês, *proline rich AKT substrate 40kDa*) e DEPTOR (do inglês, *DEP domain-containing mTOR-interacting protein*), como mostra a figura 3²³. Esse complexo é ativado em resposta a nutrientes, principalmente aminoácidos como a leucina. A principal função de mTORC1 é agrupar os sinais originados pelos fatores de crescimento (via mTORC2) e dos aminoácidos, estimulando processos celulares anabólicos que permitem crescimento e divisão celular (figura 5)²³.

Na ausência de aminoácidos, mTORC1 se localiza no citoplasma da célula, na sua forma inativa. A mudança para a forma ativa ocorre quando os níveis de aminoácidos aumentam e as proteínas Rag GTPases recrutam mTORC1 para a membrana dos lisossomos, onde reside a proteína RHEB ativada por mTORC2. A interação entre mTORC1 e RHEB, na membrana dos lisossomos, promove ativação completa de mTORC1 estimulando processos anabólicos como, síntese protéica, por meio da ativação das proteínas 4EBP1 (do inglês, *eucaryotic initiation factor 4E-binding protein 1*) e S6K (do inglês, *ribosomal S6 kinase*). A figura 4 ilustra os passos envolvidos na ativação de mTORC1²³.

Atualmente se sabe que, além da síntese protéica, ativação de S6K por mTORC1, é capaz de regular o metabolismo lipídico por induzir a translocação de SREBP-1 para o núcleo²³. SREBP-1 é um fator de transcrição que, quando ativado regula a homeostase lipídica, por promover a expressão de genes necessários para a síntese de ácidos graxos (como a FASN) e, principalmente, por aumentar a expressão de ligantes endógenos de PPAR γ (figura 4). Como resultado, em células com superexpressão de HER-2, a modulação de PPAR γ pela via

PI3K/Akt/mTOR/SREBP-1 aumentaria processos anabólicos de síntese proteica e de lipídios, estimulando crescimento celular^{10,22,23}.

No entanto, assumir que o controle do metabolismo lipídico e suporte para a sobrevivência em células HER-2 positivas ocorram por meio da via PI3K/Akt/mTOR/SREBP-1/PPAR γ ainda é controverso. A ativação da proteína S6K, por mTORC1, ao mesmo tempo que favorece síntese proteica e de lipídios, promove um *feedback* inibitório no eixo PI3K/Akt, e consequentemente em mTORC2 (figura 6)^{23,24}. Assim, embora o mTORC2 promova ativação direta da proteína Akt, o complexo mTORC1 regula negativamente essa ativação, por meio da inibição da proteína PI3K (*upstream* a mTORC2, figura 6)^{23,24}. Essa propriedade torna o complexo mTORC1 regulador da atividade de mTORC2 e da ativação de Akt^{23,24}. *In vitro*, o tratamento com rapamicina, um inibidor do mTORC1, promove aumento de ativação de PI3K/mTORC2/Akt, prolongando sinais de sobrevivência^{23,24}.

Figura 3 –Figura ilustrativa dos complexos mTORC2 e mTORC1 e suas proteínas constituintes²³.

Figura 4- Figura ilustrativa da ativação da via HER-2/PI3k/Akt/mTOR/SREBP-1. O complexo mTORC2 pode ser ativado pelos receptores HER-2 com consequente ativação de Akt e SGK, envolvidos na sobrevivência e progressão do ciclo celular. Ao mesmo tempo, Akt inibe atividade GTPase do complexo TSC1-TSC2, mantendo a proteína RHEB na forma ativa e carregada com GTP, na membrana dos lisossomos. Dessa maneira, RHEB-GTP está apto para interagir e ativar o complexo mTORC1. No entanto, ativação completa de mTORC1 também depende da quantidade de nutrientes intracelulares, principalmente de aminoácidos como a leucina. As proteínas Rag GTPases funcionam como sensores dos níveis intracelulares de aminoácidos e regulam ativação de mTORC1. Na ausência de aminoácidos, as Rag GTPases são mantidas na forma inativa, onde os heterodímeros RAGA e RAGB são carregados com GDP, e RAGC e RAGD com GTP. O aumento de aminoácidos promove troca de nucleotídeos mudando a conformação dos heterodímeros para a forma ativa. Assim, RAGA e RAGB são carregados com GTP, e RAGC e RAGD com GDP. Tal evento permite a interação entre as Rag GTPases ativas com Raptor (proteína acessória de mTORC1), que funciona como recrutadora do complexo mTORC1 para a superfície dos lisossomos, onde a proteína RHEB, ativada por mTORC2, reside. A interação física entre mTORC1 e RHEB promove ativação completa de mTORC1 favorecendo processos anabólicos de síntese proteica e de lipídios. IRS (do inglês, *insulin receptor substrate*). Adaptada de Zoncu et al²³.

Figura 5- Figura ilustrativa dos elementos necessários para ativação completa de mTORC1. (a) Na ausência de aminoácidos e fatores de crescimento, RHEB e Rags permanecem inativas e consequentemente mantêm mTORC1 na forma inativa no citoplasma. (b) A ligação entre fatores de crescimento com seus receptores pode ativar RHEB, mas não é suficiente para ativar Rags e mTORC1. (c) Da mesma maneira, o aumento de aminoácidos pode ativar Rags e recrutar mTORC1 para a membrana dos lisossomos, no entanto, não é suficiente para ativar mTORC1. (d) e (e) Finalmente, sinais originados pela ligação entre fatores de crescimento com seus receptores, em conjunto com aumento dos níveis de aminoácidos, promove ativação completa de mTORC1. Adaptada de Zoncu et al²³. ↑: aumento dos níveis de aminoácidos e/ou fatores de crescimento. ↓: diminuição dos níveis de aminoácidos e/ou fatores de crescimento. ↑↑↑: aumento exacerbado dos níveis de aminoácidos e/ou fatores de crescimento.

Figura 6 - Figura ilustrativa da regulação da ativação de Akt por mTORC1 e mTORC2. Ativação da proteína S6K por mTORC1 promove síntese proteica e inibição das proteínas PI3K/Akt. Adaptada de Zoncu et al²³.

Especificamente em células HER-2 positivas, observamos frequentemente hiperativação de Akt e dentre suas funções, é digno de nota, seu papel na sobrevivência celular^{26,27}.

Essas observações contribuem para que haja controvérsias sobre o real papel da proteína mTOR, em particular de mTORC1, em tumores de mama com superexpressão de HER-2. Nesse contexto, especula-se que proteínas reguladoras da atividade de mTORC1 possam ter papel relevante na sinalização de sobrevivência, dependente das proteínas PI3K/Akt^{25,28}.

DEPTOR é considerada a principal proteína reguladora dos complexos mTORC1 e mTORC2. Ela interage especificamente com a proteína mTOR de ambos os complexos funcionando como repressor de mTORC1 e mTORC2²³. Ocorre que, quando superexpresso, DEPTOR parece funcionar de maneira diferente. Nessa situação, sugere-se que DEPTOR interage especificamente com a proteína mTOR, do complexo mTORC1, e sua estabilidade e níveis de expressão são aumentados quando mTORC1 não está ativo, funcionando como repressor específico de mTORC1. Esse tipo de circuito regulatório evidencia que a superexpressão de DEPTOR está acoplada à atividade de mTORC1. Assim, a superexpressão de DEPTOR pode reduzir ou inibir mTORC1, mas reativa a via PI3K/mTORC2/Akt^{23,25,28}. Curiosamente, este modo indireto de ativação da proteína Akt parece importante para viabilidade de células de carcinoma da tireoide e de mieloma múltiplo^{25,28}.

Recentemente, Sabatini et al²⁸, em 2011 mostraram que, na clínica, cerca de 28% dos mielomas múltiplos apresentam superexpressão de DEPTOR e redução da atividade do complexo mTORC1, ambos associados com menores taxas de sobrevida²⁸.

Experimentalmente, a superexpressão de DEPTOR em linhagens de células de mieloma múltiplo reduziu síntese proteica e crescimento, por meio de mTORC1, mas liberou sinais de sobrevivência dependentes de PI3K/Akt, como exemplifica a figura 7. Adicionalmente, a redução da atividade de mTORC1 foi associada com diminuição do tamanho (em diâmetro) de células de mieloma múltiplo, enquanto a ativação da via PI3K/Akt potencializou a evasão de sinais apoptóticos e de

sobrevivência. A diminuição da expressão de DEPTOR causou apoptose nessas células²⁸.

Figura 7 - Figura ilustrativa da regulação de mTORC1 pela superexpressão de DEPTOR. A superexpressão de DEPTOR pode reduzir a atividade de mTORC1, e diminuir a síntese proteica e lipogênese mediada por S6K e SREBP-1, respectivamente. Por outro lado, pode potencializar os sinais de sobrevivência e evasão de apoptose originados do eixo PI3K/Akt. Adaptada de Zoncu et al²³.

Resultados semelhantes foram observados em adipócitos. DEPTOR está superexpresso em células do tecido adiposo branco e está associado com sua expansão e lipogênese mediada por PPAR γ . Especula-se que o aumento da expressão de DEPTOR potencialize sinais de sobrevivência e proliferação, por meio da ativação de PI3K/Akt; regule a lipogênese, por ativar PPAR γ ; e ainda aumente a sensibilidade à insulina²⁴.

Diferente do complexo mTORC1, a proteína Akt é a principal promotora de translocação de GLUT4 (do inglês, *glucose transporter type 4*) e captação de glicose, fundamentais para síntese de lipídeos e proliferação celular. Assim, sugere-se que em tecidos sensíveis à insulina, como o adiposo, o aumento da expressão de DEPTOR libere o eixo PI3K/Akt/PPAR γ , favorecendo lipogênese, sobrevivência e proliferação celular e funcionando como mecanismo alternativo contra o controle negativo de mTORC1 na ativação de Akt e captação de glicose²⁴. Embora ainda sem evidências científicas específicas, considerou-se a ocorrência de mecanismo semelhante em células do tecido mamário com superexpressão de HER-2 para o desenvolvimento da presente pesquisa.

A partir dessa perspectiva, especula-se que a dependência do metabolismo lipídico, para formação dos *lipid rafts*, sobrevivência e proliferação, de células de câncer de mama, representa o “calcanhar de Aquiles” na oncogênese conduzida pelos receptores HER-2^{10,15}. Assim, inibidores de enzimas lipogênicas, moduladores da expressão de DEPTOR, e o fornecimento de ácidos graxos insaturados, podem ser de grande valia para o controle da oncogênese nesse tipo celular^{14,15,24,25}.

Ácidos graxos (AG) poli-insaturados ômega-3, como ácido docosaenoico (DHA) e eicosapentaenoico (EPA), derivados do óleo de peixe, são conhecidos por seus benefícios em várias doenças, incluindo câncer de mama^{29,43}. Dentre os mecanismos propostos especula-se que o DHA, especificamente, pode desestruturar *lipid rafts* de maneira semelhante ao reagente metil- β -ciclodextrina. A metil- β -ciclodextrina é conhecida por sua capacidade de remover colesterol da membrana e, por isso, desestruturar *lipid rafts*^{30,36,41,43}.

Com 22 carbonos e seis duplas ligações, o DHA representa o AG mais

insaturado encontrado no organismo humano. Graças a essa propriedade, o DHA influencia a estrutura e função de membranas celulares, após sua incorporação na posição *sn-2* de seus fosfolípides⁴¹. De maneira semelhante, evidências experimentais sugerem que o DHA pode se incorporar nos *lipid rafts* e, conseqüentemente, modificar sua estrutura e função, influenciando vias de sinalização associadas a esses microdomínios^{41,43}.

Especificamente em câncer de mama, evidências preliminares sugerem que o DHA possa influenciar vias de sinalização prevalentes em células tumorais da mama, por alterar a composição e estrutura de *lipid rafts*⁴³. O tratamento com DHA inibiu a proliferação de células de linhagem de câncer de mama tripla-negativa (MDA-MB231), por alterar a composição dos *lipid rafts* e, subsequentemente, por afetar a localização e ativação do EGFR nos *lipid rafts*^{36,41}. A expressão da quimiocina CXCR4 (do inglês, *C-X-C motif chemokine receptor type 4*) e sua sinalização foi afetada de maneira semelhante⁴⁰.

O presente trabalho considerou a hipótese de que a transformação oncogênica de células da mama pela superexpressão de HER-2 é acompanhada pelo aumento dos *lipid rafts* na membrana celular, e que sua correta localização e ativação deflagram sinais envolvidos na sobrevivência e proliferação celular. Adicionalmente, a ativação dos receptores HER-2 cria um ambiente intracelular lipogênico dependente da superexpressão de DEPTOR que, através da modulação de PPAR γ , evita lipotoxicidade, por captar e transportar ácidos graxos para diferentes vias metabólicas (como síntese de membranas e triglicérides); e que fornece suporte para sinalização constante de sobrevivência e proliferação dependente das proteínas PI3K/Akt, através da redução da atividade de mTORC1. Nesse contexto, o

tratamento com DHA poderia inibir a sinalização e fenótipo lipogênico, iniciados pelos receptores HER-2, e induzir apoptose, por desestruturar *lipid rafts*.

► OBJETIVOS

2. OBJETIVO

Avaliar a influência da superexpressão de HER-2 sobre a composição e estrutura de *lipid rafts* e a sinalização intracelular iniciada por esses receptores, em linhagens celulares de câncer de mama, antes e após o tratamento com DHA.

2.1. Objetivos específicos

Avaliar em linhagens de células epiteliais da glândula mamária normal (HB4a) e transformadas pela superexpressão de HER-2 (HB4aC5.2):

- a) Estrutura e composição da membrana celular: *lipid rafts*, colesterol e porcentagem de ácidos graxos.
- b) Vias de sinalização envolvidas na sobrevivência, proliferação, lipogênese e apoptose.
- c) Expressão de genes envolvidos na lipogênese celular.
- d) Porcentagem de morte celular e apoptose.

► MÉTODOS

3. MÉTODOS

3.1. Comitê de Ética

O protocolo experimental do presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da USP (CAPPesq, protocolo n 831/06), e contou com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2009/52244-5) para seu desenvolvimento.

3.2. Local de execução das atividades

As atividades experimentais do presente trabalho foram desenvolvidas no Laboratório de Investigação Médica (LIM) em Oncologia Experimental do Departamento de Radiologia e Oncologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) - LIM 24 - e no Laboratório de Nutrição e Cirurgia Metabólica do Aparelho Digestivo da Disciplina de Cirurgia do Aparelho Digestivo do Departamento de Gastroenterologia da FMUSP (LIM 35). Além disso, contou com o apoio e parceria dos Laboratórios de Bromatologia da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP-USP), de Biologia Vascular do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da FMUSP, de Fisiologia Celular do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP) e do Centro Internacional de Pesquisa (CIPE) do Hospital A.C. Camargo de São Paulo.

3.3. Planejamento do protocolo experimental

Pouco é conhecido sobre a influência da composição lipídica de membranas e de *lipid rafts* sobre a função de receptores HER-2. Consideramos que, para ocorrer ativação e envio de sinais, receptores HER-2 devem se localizar nesses microdomínios de membrana, sugerindo relação entre expressão de HER-2 e quantidade de *lipid rafts* na membrana celular. Para testar essa hipótese, usamos modelo celular de transformação oncogênica que nos permitiu avaliar especificamente os efeitos da superexpressão dos receptores HER-2: a linhagem celular HB4a, derivada de célula luminal da mama normal, que expressa níveis basais do oncogene HER-2; e a linhagem HB4aC5.2, um clone da HB4a, que superexpressa receptores HER-2.

Nossa hipótese considerou ainda que o tratamento de células HB4aC5.2 com DHA poderia desestruturar os *lipid rafts* e influenciar a sinalização iniciada por receptores HER-2. Pelo fato de não existirem pesquisas com DHA e as linhagens HB4a e HB4aC5.2, fizemos uma cinética, a fim de verificar quais doses e tempo de cultura apresentavam ações antitumorais. A porcentagem de morte celular, apoptose e distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular, foram avaliadas por citometria de fluxo e se encontram no Anexo A. Observou-se ação anti-tumoral por DHA tempo e dose dependente. Maior porcentagem de morte e apoptose foi observada depois de 72 horas de tratamento com 100µM de DHA, em ambas as linhagens, porém com intensidades diferentes. Interessantemente, a linhagem controle, HB4a, foi resistente aos efeitos pró-apoptóticos do DHA. Posteriormente, a referida dose e tempo de cultura foram utilizados para investigar os efeitos do DHA

na composição da membrana celular e estrutura dos *lipid rafts*, bem como na sinalização iniciada por receptores HER-2.

A relação da superexpressão de HER-2 sobre a composição e estrutura de membrana e *lipid rafts*, bem como seus efeitos sobre a sinalização intracelular deflagrada por esses receptores foram avaliadas antes (para acessar a influência da superexpressão de HER-2 propriamente dita) e após tratamento com DHA (para acessar o efeito de DHA) utilizando-se ambas as linhagens, HB4a e HB4aC5.2. Nosso protocolo seguiu as seguintes etapas:

1. Análise de *lipid rafts* e perfil de ácidos graxos de membranas celulares: Após separação da membrana celular, por gradiente de ultracentrifugação, a porcentagem de ácidos graxos da membrana celular foi analisada por cromatografia gasosa e a visualização dos *lipid rafts* e colesterol foi padronizada em microscópio de fluorescência com subsequente análise em microscópio confocal.

2. Análise da sinalização iniciada por receptores HER-2 - ativação de vias de sobrevivência e proliferação celular e de vias lipogênicas: Para avaliação de vias de sinalização iniciadas por receptores HER-2 avaliou-se a atividade de proteínas chave das vias de sobrevivência, Akt; proliferação, Erk1/2; e lipogênese, FASN, por *western blotting*. Além disso, quantificamos e comparamos a proliferação de células normais HB4a com as células que superexpressam HER-2, HB4aC5.2.

3. Análise de mecanismos possivelmente relacionados com a ativação de vias lipogênicas - Atividade transcricional de PPAR γ , expressão de DEPTOR: A fim de compreender mecanismos possivelmente relacionados com a ativação de vias lipogênicas, a participação de PPAR γ na lipogênese induzida por receptores HER-2 foi avaliada por meio da quantificação do conteúdo de RNAm dos genes alvos de PPAR γ , FAT/CD36, FABP4 e DGAT, por PCR em tempo real. Em seguida, na tentativa de eliminar a contradição referente ao controle da lipogênese, via PPAR γ , a mesma metodologia foi utilizada para avaliar o papel da via mTOR. Assim, o conteúdo de RNAm de genes alvos da via mTOR, como SREBP-1, FASN e DEPTOR, foram avaliados por PCR em tempo real.

4. Análise da proteção contra eventos de morte: sabendo-se que a transformação oncogênica de uma célula normal pode criar mecanismos que suportam eventos de morte, quantificamos (por citometria de fluxo) e comparamos marcador de apoptose (proteína BAD) de células normais HB4a com células com superexpressão de HER-2, HB4aC5.2.

3.4. Procedimentos experimentais –

3.4.1. Culturas celulares

Todos os procedimentos relacionados à cultura das linhagens HB4a e HB4aC5.2 foram realizados no LIM24 do Departamento de Radiologia e Oncologia da FMUSP, sob a supervisão da Profa. Maria Mitzi Brentani.

3.4.1.1. Linhagens celulares

As células epiteliais luminais HB4a são clones não-transformados e não-tumorigênicos derivados de tecido mamário normal, obtido de mamoplastia redutora. Apresentam fenótipo não-transformado além de marcadores e comportamento semelhante ao tecido de origem⁴⁴.

As células epiteliais luminais HB4aC5.2 são clones derivados da linhagem HB4a, transformados pela transfecção das células HB4a com a construção pJ5E.c-erbB-2 (vetor de expressão contendo a sequência total de cDNA do oncogene HER-2 obtida da célula de câncer de mama BT474 sob o controle do promotor viral MMTVLTR- *mouse mammary tumour virus long terminal repeat*)⁴⁴. As células HB4aC5.2 possuem 5 cópias da construção pJ5E.c-erbB-2 inseridas em seu genoma e superexpressam HER-2 (aproximadamente 10^6 receptores HER-2 por célula)⁴⁴. Apresentam fenótipo transformado, hiperproliferativo, são sensíveis a hormônios e fatores de crescimento, porém sem potencial agressivo⁴⁴. A eficiência de nosso modelo de transfecção, quanto à superexpressão de HER-2, foi confirmada por PCR em tempo real, conforme pode ser verificado no Anexo B.

Ambas as linhagens foram gentilmente cedidas pelo Michael O'Hare, pesquisador do Instituto Ludwig de Pesquisa em Câncer e do Laboratório de Câncer de Mama da Universidade de Londres, Inglaterra.

3.4.1.2. Plaqueamento

Células das linhagens HB4a e HB4aC5.2 foram plaqueadas em lamínulas, em placas de 24 poços, com meio de cultura padrão. Antes do plaqueamento, ambas linhagens foram submetidas à análise de viabilidade celular, por teste de exclusão, através do uso de azul de Tripan. As células foram contadas em hemocitômetro e

aquelas sem marcação foram consideradas viáveis. Foram utilizadas apenas amostras que apresentaram viabilidade $\geq 95\%$. O número de células a ser plaqueado para os tratamentos foi padronizado para cada linhagem e etapa de estudo. A confluência das células nas garrafas foi de aproximadamente 50% da área total, para evitar a ocorrência de alterações decorrentes das condições do próprio ambiente de cultura (exemplo: privação de nutrientes, uma condição diretamente relacionada com o nível de confluência das células e que pode mascarar os efeitos do DHA sobre o ciclo celular).

3.4.1.3. Condições de cultura

Células das linhagens HB4a e HB4aC5.2 foram mantidas sob as mesmas condições de cultura: meio RPMI 1640 acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB), 5 $\mu\text{g/mL}$ de insulina, 5 $\mu\text{g/mL}$ de hidrocortisona, 100 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina, 50 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina, e incubadas em estufa a 37°C, atmosfera de 95% e com 5% de CO_2 ⁴⁴. Durante o período de cultura, ambas as linhagens foram avaliadas periodicamente quanto à possível contaminação por micoplasma (dados não mostrados) e à superexpressão de HER-2, por PCR em tempo real.

3.4.1.4. Tratamento com DHA

O tratamento das culturas celulares com DHA teve início 24 horas após o plaqueamento das células HB4a e HB4aC5.2. Para tal, o meio de cultura foi aspirado, descartado e substituído por meio novo acrescido ou não (controle) de DHA. Previamente à adição de DHA no meio de cultura, este foi diluído em etanol. As células que serviram como controles negativos do tratamento foram cultivadas na

ausência de DHA e com a mesma quantidade de etanol do que as células tratadas, respeitando-se a concentração de em 0,05% do volume final do meio de cultura^{45,46}.

O tempo e concentração de DHA variaram de acordo com a etapa do estudo. Para avaliação da cinética do efeito pró-apoptótico do DHA, as células foram tratadas durante 24, 48 e 72 horas com 25µM, 50µM, 75µM e 100µM de DHA. Para investigar o mecanismo base da ação pró-apoptótica do DHA, sua relação com *lipid rafts* e sinalização deflagrada pelos receptores HER-2, as células foram tratadas por 72 horas com 100µM de DHA.

3.4.2. Análise de morte, ciclo celular e apoptose

A análise das células nas diferentes fases do ciclo e as consideradas em morte foi realizada no LIM24 do Departamento de Radiologia e Oncologia da FMUSP, sob a supervisão da Dra Mitzi Brentani. Ocorreu pelo estudo da incorporação de iodeto de propídio (PI) e marcação com Anexina V, em citometria de fluxo (*FACScalibur*, *Beckton Dickson*), com auxílio do software *Cell Quest* ou *ModFit LT v2.0* (PMAC).

3.4.2.1. Preparo das amostras celulares

Após tratamento na presença ou ausência (controle) de DHA, 10⁵ células HB4a e HB4aC5.2 foram soltas da garrafa por tripsinização. Inicialmente, o meio de cultura foi retirado por sucção a vácuo e as células foram lavadas com solução tampão salina fosfato (*PBS*) e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) - 10mM Na₂HPO₄, 1,37mM NaCl, 27mM KCl, 2mM KH₂PO₄, 1mM EDTA-, por aproximadamente 30 segundos. Posteriormente, as células foram descoladas, pela ação de 0,5% *Trypin-EDTA* 1X. A inativação da enzima ocorreu pela adição de meio

RPMI suplementado com 10% de SFB. Depois de homogenizadas, as células em suspensão foram retiradas da garrafa e colocadas em tubo *Falcon* para centrifugação, por 2 minutos a 2000 *rpm*, em temperatura ambiente. Após descartar o sobrenadante, o *pellet* celular foi ressuspensionado em meio padrão para cada linhagem, conforme descrito no item 3.4.13 deste capítulo. Aliquotas de 10µl foram utilizadas para avaliação da viabilidade celular pelo método de exclusão do corante azul de Tripán.

Constatada a viabilidade celular, as células em suspensão foram centrifugadas durante 2 minutos a 2000 *rpm*, em temperatura ambiente e, após descartar o sobrenadante, ressuspensionadas em *PBS* (10mM Na₂HPO₄, 1,37mM NaCl, 27mM KCl, 2mM KH₂PO₄). O *pellet* formado após nova centrifugação (2 minutos a 2000 *rpm*, temperatura ambiente) foi cuidadosamente ressuspensionado, para fixação das células em 1mL de etanol 70% diluído em *PBS*, e transferido para tubos do tipo *ependorfs* de 1,5mL mantidos em gelo. As amostras foram armazenadas a -20°C para posterior análise por citometria de fluxo.

3.4.2.2. Incorporação de iodeto de propídio (PI)

A análise de morte e ciclo celular em citômetro de fluxo foi feita por incorporação de PI. Para esse propósito, após tratamento na presença ou ausência (controle) de DHA, células HB4a e HB4aC5.2 fixadas foram descongeladas e centrifugadas a 2000 *rpm* durante 5 minutos em temperatura ambiente. Após o descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensionadas cuidadosamente em 1mL de *PBS* e submetidas à nova centrifugação. A seguir, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensionadas em 200µl de solução de PI, previamente preparada a partir

da mistura de 5mL de *PBS*, 5µl de *Triton* 100 (0,01% v/v), 50µl de *RNAse A* (2mg/mL) e 20µl de PI (5mg/mL).

O PI é um agente que se intercala de forma estequiométrica às duplas-fitas de DNA. A incidência do *laser* do citômetro de fluxo sobre a amostra provoca a excitação do PI e emissão de fluorescência, proporcional ao conteúdo de DNA da célula. Células diplóides quiescentes (fases G0/G1 do ciclo celular) possuem conteúdo de DNA 2n, emitindo sinais de intensidade menor do que células situadas na fase S, quando ocorre aumento do conteúdo de DNA. No entanto, células em fase S geram sinais de intensidade menor do que aquelas situadas nas fases G2/M, até que completem a replicação do conteúdo de DNA para 4n. O conteúdo de DNA permanece em 4n durante a fase G2 até a mitose, na qual cada célula-mãe dá origem a duas células-filhas. As células situadas no pico hipodiplóide (Sub-G1) possuem conteúdo de DNA menor que 2n, e podem representar aumento de DNA fragmentado, característicos de eventos de morte celular.

Foram analisadas 10000 partículas por amostra, em fluxo de cerca de 300 eventos/segundo. O conteúdo de DNA foi avaliado por fluorescência vermelha, captada como fluorescência 2 (FL2), conforme histograma representativo (Figura 8).

Figura 8 - Histograma representativo da distribuição das células consideradas em morte e nas diferentes fases do ciclo celular após aquisição dos dados por citometria de fluxo. As regiões M1, M2, M3 e M4 foram consideradas em morte celular, fase G0/G1, fase S/G2/M e *debris* celulares, respectivamente.

3.4.2.3. Marcação com Anexina V

A análise de apoptose celular em citômetro de fluxo foi feita por marcação com Anexina V. Para esse propósito, após tratamento na presença ou ausência (controle) de DHA, 10^5 células HB4a e HB4aC5.2 foram incubadas com Anexina-V FITC e PI, de acordo com protocolo estabelecido pelo fabricante (Departamento de Imunologia – ICBIII/USP). Após o tratamento ou não (controle) com DHA e tripsinização das amostras, 10^5 células foram incubadas com 100µl de tampão de ligação (10mM Hepes, 150mM NaCl, 5mM KCL, 1mM MgCl₂ e 1,8mM CaCl₂) contendo Anexina V conjugada ao FITC (fluorocromo isotiocianato de fluoresceína), na diluição de 1:500. Depois de incubação por 20 minutos, no escuro, acrescentou-se 400µl de tampão de ligação e 40µl de solução de PI (100µg/mL).

Durante apoptose precoce, os danos na membrana celular expõem a fosfatidilserina, normalmente localizada na porção citoplasmática da membrana celular, ao ambiente extracelular, o que permite sua ligação com a proteína fluorescente Anexina V-FITC. A Anexina V é uma proteína de 35-36 kDa ligante de fosfolipídios na presença de Ca⁺², e que apresenta elevada afinidade pela

fosfatidilserina. Assim, sua marcação na superfície celular funciona como indicativo de processo de apoptose.

As amostras foram analisadas imediatamente em citômetro de fluxo, utilizando-se o canal FL1 para leitura de Anexina e FL3 para leitura de PI, como ilustra o histograma representativo (Figura 9). Para análise estatística utilizamos a porcentagem de células marcadas com Anexina V-FITC e PI.

Figura 9 - Histograma representativo da distribuição das células marcadas com PI e/ou Anexina V-FITC. As siglas nos quadrantes indicam: (IE) inferior esquerdo e corresponde a quantidade de células viáveis; (ID) inferior direito e corresponde a quantidade de células marcadas com Anexina V-FITC; (SD) superior direito e corresponde a quantidade de células marcadas com Anexina V-FITC e PI; (SE) superior esquerdo e corresponde a quantidade de células marcadas com PI.

3.4.3. Análise dos *lipid rafts*

O estudo dos *lipid rafts* foi padronizado inicialmente por microscopia de fluorescência (Nikon E1000, Nikon Inc, NY, EUA), através da marcação com Vybrant Lipid Raft Labeling Kit (Molecular Probe) e conforme instruções especificadas por seu fabricante. Além das células HB4a e HB4aC5.2, as linhagens MCF-10 e MDA-MB 231, também foram utilizadas para a padronização da técnica de marcação dos *lipid rafts*. Brevemente, 10^6 células foram tripsinizadas, centrifugadas (2 minutos, 2000 rpm, a 4°C) e o *pellet* obtido foi ressuspenso em 2mL da solução fluorescente

contendo a subunidade B de toxina da cólera conjugada ao fluorescente *Alexa Fluor 596*, com a qual permaneceram em incubação, por 10 minutos e a 4°C. Após a incubação, as células foram lavadas com *PBS* gelado, centrifugadas (2 minutos, 2000 *rpm*, a 4°C) e o *pellet* obtido foi ressuscitado delicadamente em 2mL de solução de trabalho anti-CT-B (anti-subunidade B da toxina colérica), que permaneceu reagindo durante 15 minutos e a 4°C. Após a última incubação, as células foram lavadas com *PBS* gelado, ressuscitadas em 50µl de *PBS* e, para melhor visualização e fixação nas lâminas, estas foram ressuscitadas em *PBS*, colocadas no *citospin* e centrifugadas por 3 minutos a 500*rpm*. A Figura 10 ilustra a padronização da visualização de *lipid rafts* em diferentes linhagens, incluindo HB4a e HB4aC5.2.

Figura 10 - Micrografias obtidas em microscópio de fluorescência (aumento de 20x), mostram a marcação indireta de *lipid rafts* (contorno em vermelho) de linhagens celulares HB4a, HB4aC5.2, MCF-10 e MDA-MB231 por *Alexa Flúor 594* conjugado com a subunidade B da toxina da cólera.

O *Vybrant Lipid Raft Labeling Kit* fornece um reagente fluorescente e foto-estável para a marcação indireta dos *lipid rafts*, o *Alexa Flúor 594* conjugado com a subunidade B da toxina da cólera (CT-B). Esse conjugado se liga especificamente na cadeia pentassacarídeo do gangliosídeo G_{M1} que se localiza, constitutivamente, nos microdomínios *rafts*. O conjugado CT-B é livre da subunidade A da toxina colérica,

eliminando toxicidade indesejada e atividade ADP-ribosilação. O anticorpo específico reconhece o conjugado CT-B e agrupa os *lipid rafts* na membrana celular, para melhor visualização em microscópio. Pelo fato deste reagente marcar indiretamente os microdomínios *rafts* optamos, posteriormente, pela utilização adicional do reagente chamado filipina, que se liga e marca especificamente o colesterol, principal componente estrutural dos *lipid rafts*. Além do colesterol funcionar como componente estrutural dos *lipid rafts*, sua marcação não depende dos diferentes tipos de gangliosídeos.

A marcação fluorescente do colesterol da membrana celular com filipina foi feita conforme protocolo de imunofluorescência utilizado no LIM24 do Departamento de Radiologia e Oncologia da FMUSP e em conjunto com o *Vybrant Lipid Raft Labeling Kit*, para marcação dupla: colesterol e *lipid rafts*. Brevemente, após tratamento na presença ou ausência (controle) de DHA, 10^4 células HB4a e HB4aC5.2 foram lavadas três vezes com *PBS* gelado e incubadas, por 10 minutos e a 4°C , com 500 μl da solução fluorescente contendo CT-B conjugada com o fluorescente *Alexa Fluor 596*. Depois da incubação, o meio foi aspirado e as células foram lavadas três vezes com *PBS* gelado e incubadas, por 15 minutos e a 4°C , com 500 μl da solução de trabalho anti-CT-B. Após a última incubação, as células foram lavadas três vezes com *PBS* gelado, incubadas com 10 $\mu\text{g/mL}$ de filipina diluída em *PBS*, por 10 minutos e a 4°C . As células foram lavadas três vezes com *PBS* gelado, incluídas em lâminas, usando Etellan®, e visualizadas em microscópio confocal (*ZEISS LSM 510 Meta/UV*), no Laboratório de Biologia Vascular do INCOR, HC-FMUSP.

3.4.4. Análise da incorporação de DHA e perfil de ácidos graxos na membrana celular

A análise da incorporação de DHA na membrana das linhagens celulares HB4a e HB4aC5.2 foi realizada por cromatografia gasosa (cromatógrafo *SHIMADZU*, *CG-2010*, equipado com coluna capilar SP 2560 da *SUPELCO*), no Laboratório de Bromatologia da FSP-USP.

A extração e esterificação de lipídeos foram realizadas conforme método de Folch et al⁴⁷. Após tratamento na presença ou ausência (controle) de DHA, células HB4a e HB4aC5.2 foram tripsinizadas e alíquotas de 10^7 células foram ressuspensas em *PBS* e congeladas em nitrogênio líquido, a fim de provocar o rompimento da membrana celular. Após congelar e descongelar as células repetidas vezes, as amostras foram centrifugadas a 4°C, por 10 minutos e a 4000 *rpm*. O sobrenadante foi transferido para tubos de ultracentrífuga e centrifugado a 4°C, por 60 minutos e a 30000 *rpm*, utilizando-se o Rotor 50Ti. O sobrenadante foi desprezado e, para a obtenção da fração lipídica da membrana celular, adicionou-se 2,5mL de metanol e 5mL de clorofórmio, seguido de homogenização por 3 minutos, para que ocorresse a separação de fases. A purificação da amostra aconteceu pela adição de 3mL de solução aquosa de *KCl* 0,88%. A fase superior foi desprezada e, no extrato de clorofórmio contendo lipídios, foram adicionados aproximadamente 2mL de solução metanol/água, para promover nova separação de fases. A fase superior foi desprezada e o restante foi evaporado com nitrogênio gasoso. Para esterificação dos ácidos graxos, utilizamos 2mL de solução *NaOH* 0,5N, 6mL da mistura de esterificação e, depois de incubar em banho-maria, acrescentamos 5mL de solução *NaCl* saturada na mistura ainda aquecida (morna). Foram feitas três extrações,

utilizando-se hexano, a fim de transferir a fase superior para outro tubo. Ácidos graxos de cadeia longa, esterificados com hexano, foram evaporados em atmosfera de nitrogênio até o volume aproximado de 500µL. Posteriormente foram armazenados a -26°C, até o momento da análise em *vial* modelo 0221-34.274-91 com tampa e septo.

As temperaturas do ejetor e detector do cromatógrafo foram de 250°C e 260°C, respectivamente. Inicialmente, a programação da temperatura da coluna foi de 140°C com acréscimo de 4°C por minuto até o platô de 240°C, permanecendo nessa temperatura por 15 minutos. A razão de divisão *split* utilizada foi de 1.

3.4.5. Análise de proliferação celular

A proliferação celular foi avaliada por contagem direta em câmara de *Neubauer* (exclusão por azul de Tripan) e número de células metabolicamente ativas por conversão do brometo de tetrazolium amarelo (MTT), no LIM24 do Departamento de Radiologia e Oncologia da FMUSP.

3.4.5.1. Exclusão por azul de Tripan

Para exclusão por azul de Tripan, 10⁵ células HB4a e HB4aC5.2 foram adicionadas à placas de 6 poços e mantidas, em triplicata, em condições de cultura *overnight*. No dia seguinte, as células foram lavadas com *PBS* e o meio de cultura foi substituído por meio novo, para cultivo das células por mais cinco dias. A cada 24h, as placas correspondentes às células HB4a e HB4aC5.2 foram retiradas da estufa, tripsinizadas, marcadas por azul de Tripan e contadas em hemocitômetro.

3.4.5.2. Número de células metabolicamente ativas

Para o ensaio do número de células metabolicamente ativas, células HB4a e HB4aC5.2 foram adicionadas à placas de 96 poços, em densidades iniciais de 10^3 células, e mantidas em condições de cultura *overnight*. No dia seguinte, as células foram lavadas com *PBS* e adicionadas de meio de cultura novo, para análise da incorporação de MTT por 5 dias. A cada 24h, duas placas (correspondentes às células HB4a e HB4aC5.2) foram retiradas da estufa para adição de 0,5mg/mL de MTT. Em seguida, as placas retornavam para estufa para incubação por 4 horas. Após esse período, foi adicionado tampão de solubilização e as placas retornaram para estufa para mais 15 horas de incubação. Posteriormente, foi feita leitura em espectrofotômetro, a 595nm e com filtro de referência em 655nm. Foram criadas curvas de calibração, com número conhecido de células, permitindo a conversão da absorbância da solução em número de células.

O Método MTT é empregado para determinação *in vitro* do número de células metabolicamente ativas. Consiste em ensaio quantitativo, colorimétrico, que mede a proliferação, viabilidade e toxicidade celular. MTT é um sal de tetrazolium amarelo e sua oxirredução provoca formação de cristais de formazan, insolúveis em água, de coloração azul escura. Essa reação ocorre apenas em células viáveis, por meio da enzima mitocondrial succinato desidrogenase. Os cristais formados são solubilizados e a absorbância da solução é medida em espectrofotômetro. A absorbância medida é convertida e correlacionada diretamente com o número de células metabolicamente ativas.

3.4.6. Análise da proteína BAD (*Bcl-2 associated death promoter*)

A análise do marcador de apoptose celular, proteína BAD, foi feita por imunofluorescência, de acordo com protocolo padronizado e utilizado no LIM24 do Departamento de Radiologia e Oncologia da FMUSP. Brevemente, após tratamento na presença ou ausência (controle) de DHA, 10^4 células HB4a e HB4aC5.2 foram lavadas com *PBS*. Posteriormente, adicionou-se solução contendo 500 μ L de meio de cultura e marcador fluorescente da mitocôndria (*mitotracker*, Invitrogen, diluição 1:2000), que permaneceu reagindo durante 30 minutos, a 37 °C. Após a incubação, o meio foi aspirado e cerca de 350 μ L de paraformaldeído a 4% foi adicionado aos poços, permanecendo em incubação por 15 minutos e em temperatura ambiente. Após 3 lavagens com *PBS*, foram adicionados 200 μ L de *Triton X-100/PBS* 0,2% e as células permaneceram em incubação por 5 minutos. O bloqueio dos sítios inespecíficos aconteceu durante 1 hora, com a adição de 300 μ L de *PBS/BSA* 5% (do inglês, *phosphate buffer solution/bovine serum albumin*). Posteriormente, as células foram lavadas por três vezes com *PBS* e acrescidas de anticorpo primário, anti-Bad (Calbiochem) diluído em *PBS/BSA* 5% (1:100), que permaneceu em incubação *overnight* e a 4°C. Após a incubação, as células foram lavadas com *PBS* por três vezes e acrescidas de anticorpo secundário (anti-rabbit FITC, Sigma) diluído em *PBS/BSA* 1% (1:1000), que permaneceu em incubação por 1 hora. Após o período de incubação, as células foram lavadas com *PBS* por três vezes e adicionada de *DAPI* (do inglês, *4',6-diamidino-2-phenylindole,dihydrochloride* - Invitrogen) diluída em 100 μ L de *PBS/BSA* 5% (1:500), para a marcação nuclear, que permaneceu em incubação por 15 minutos. Finalmente, as lamínulas com as células marcadas foram retiradas das placas para montagem das lâminas com Etellan® (*Merk Chemicals*). As

células foram visualizadas por Microscópio Confocal (*ZEISS LSM 510 Meta/UV*), no Laboratório de Biologia Vascular do INCOR, HC-FMUSP.

3.4.7. Análise de proteínas Akt, Erk1/2, FASN, S6K

A análise de proteínas Akt, Erk1/2, FASN e S6K foi feita por *western blotting*, no Centro Internacional de Pesquisa (CIPE) do Hospital A.C. Camargo, sob a supervisão da pesquisadora Glaucia Hajj.

Para as análises de *western blotting*, as células HB4a e HB4aC5.2 foram divididas em dois grupos: controle (CTL) e soro fetal bovino (SFB). No grupo CTL, as células HB4a e HB4aC5.2 foram cultivadas em meio de cultura padrão, e no grupo SFB, as células HB4a e HB4aC5.2 foram tratadas por 24 horas com meio de cultura livre de SFB, com posterior adição de 20% de SFB por 4 horas. Esse grupo foi escolhido como controle positivo da reação de *western blotting*.

A detecção das proteínas foi realizada por reação quimioluminescente, usando *ECL Western Blotting Detection Reagents* (GE healthcare, Buckinghamshire, UK) e de acordo com recomendações do fabricante, seguida pela exposição em filme de *Raio-X Amersham Hiperfilm™ ECL* (GE healthcare, Buckinghamshire, UK), em sala escura e à temperatura ambiente. Para tal, após tratamento na presença ou ausência (controle) de DHA, 10⁵ células HB4a e HB4aC5.2 foram coletadas e suas proteínas extraídas, pela adição do tampão de lise (RIPA) contendo 50mM *Tris HCl* (pH 7,4), 150mM *NaCl*, 1% *NP-40*, 0,5% Deoxicolato de Sódio, 0,1% *SDS* e inibidores de proteases (0,08% de aprotinina, 0,8% de *OMSF* e 0,8% de ortovanadato). A quantificação do extrato proteico foi determinada usando *Bradford Protein Assay Reagent*. Utilizou-se como curva padrão uma diluição seriada de *BSA*

(1µg/mL) nas seguintes concentrações: 0,5 µg, 1,0 µg, 1,5 µg e 2,0 µg, adicionada em duplicata à placas de 96 poços contendo 2 µL de amostra. A seguir, adicionou-se 200 µL de *Bradford* diluído em água miliqui (4x) em cada poço. A leitura foi realizada no *MICROPLATE READER – BIO-RADE*, à 595nm. Os valores de absorbância foram plotados em gráfico *Microsoft® Office Excel® 2007*, onde as absorbâncias da curva padrão serviram como referência para a quantificação dos extratos proteicos.

O lisado celular (40µg de proteína) foi aquecido por 5 minutos em *Laemil Buffer* (7,5% *Tris* 2,0M pH 6,8; 0,5% de *SDS*; 5% de azul de bromofenol; 26% de glicerol; 16,5% de 2-mercaptoetanol) e as proteínas foram separadas por 10% *SDS-PAGE* (gel de separação 10% e gel de empilhamento 5%). Para a proteína FASN foi utilizado 6% *SDS-PAGE* (gel de separação 10% e gel de empilhamento 5%). Para a corrida dos géis foi utilizado *Tris-Glicina* (3,0g/l de *Tris* Base; 14,5g/l de glicina), contendo 0,1% de *SDS* e, como marcador de peso molecular, o *ColorBrust™ Eletrophoresis Marker* (*Sigma Chemical Corporation, St Louis, EUA*). A corrida eletroforética foi iniciada a 30mA, por 30 minutos ou até que as amostras atravessassem o gel de empilhamento, e continuou por mais 60 minutos (para o *SDS-PAGE* 10%) e 90 minutos (para *SDS-PAGE* 6%). Ao término da corrida, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose, utilizando-se o aparelho *Trans-Blot SD Semy-dry Transfer Cell* (*Bio-Rad, EUA*) e o tampão de transferência *Tris-Glicina* (5,8g/L *Tris* Base; 2,9g/L Glicina), contendo 20% de metanol e 0,0375% de *SDS*. A transferência foi realizada sob corrente elétrica de 10V por 40 minutos. A seguir, a membrana foi retirada, lavada uma vez com H_2O miliqui e incubada por alguns segundos (5 segundos) em solução *Pounceau*, para avaliação da quantidade

de proteínas transferidas. Para bloqueio dos sítios inespecíficos, as membranas foram incubadas, sob agitação, por 1 hora em temperatura ambiente em solução *TBST* (2,42g/L *Tris* Base; 8,0g/L NaCl; 0,05% tween-20) e 5% de leite desnatado. Posteriormente, as membranas foram lavadas três vezes com solução *TBST*, durante 5 minutos, em temperatura ambiente e sob agitação, e incubadas com anticorpos humanos (*Cell Signaling Technology* 1:1000) anti-phospho Akt mAb, anti-Akt, anti-phospho Erk 1/2 mAb, anti-Erk 1/2, anti-phospho p70S6K mAb, anti-p70S6k and anti-FAS mAb. por 16h a 4°C. Posteriormente, a membrana foi lavada com *TBST* três vezes, durante 5 minutos e sob agitação, e incubadas com anti-rabbit IgG (imunoglobulina G), diluído em solução composta por *TBST* e 5% de leite desnatado (1:5000). Para os anticorpos fosforilados, o leite desnatado foi substituído por 5% de *BSA*. Em seguida, a membrana foi lavada com *TBST*, três vezes, durante 5 minutos, e preparada para visualização das bandas representativas das proteínas de interesse. As bandas obtidas foram quantificadas por análise de densitometria, utilizando β -actina como normalizador da massa, pelo *software Scion Image*.

Quando necessário, a membrana já hibridizada foi submetida ao processo de *stripping* (retirada de anticorpos), para reutilização. Nesse processo, a membrana foi mergulhada por 3 minutos em solução 1M *NaOH* e lavada três vezes com H₂O destilada, por 10 minutos. Para análise qualitativa do *stripping*, realizou-se nova reação quimioluminescente e exposição ao filme de Raio-X. Posteriormente, os sítios inespecíficos foram novamente bloqueados, lavados e a membrana foi incubada com anticorpo primário e secundário. Após a última lavagem, a membrana foi submetida à reação quimioluminescente e exposição ao filme de Raio-X.

3.4.8. Análise do conteúdo de RNAm dos genes HER-2/neu, FAT/CD36, FABP4, DGAT, DEPTOR, SREBP e FASN

A quantificação do conteúdo de RNAm foi realizada por PCR em tempo real, no Laboratório de Fisiologia Celular, do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB-USP, sob a supervisão do Prof. William Festuccia.

3.4.8.1. Extração de RNA

A análise dos genes em estudo iniciou-se pela extração de RNA com uso de *RNeasy® Mini Kit* (Quiagen), de acordo com as instruções do seu fabricante. Para tal, após tratamento na presença ou ausência (controle) de DHA, 10^5 células HB4a e HB4aC5.2 foram lavadas com *PBS* e 1mL de *TRIzol®* foi adicionado em cada garrafa. Com a ajuda de um *cell scrapper*, o conteúdo foi removido, colocado em *eppendorfs* de 2mL e congelado em freezer -80°C até a extração de RNA total. Após descongelamento, foram adicionados 200 μL de clorofórmio em cada amostra e as amostras foram agitadas por 30 segundos e incubadas por 5 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 13000 *rpm*, por 15 minutos a 4°C , e coletou-se a fase superior para sua transferência para outro tubo, aonde acrescentou-se 700 μL de etanol 70%. Posteriormente, as amostras foram transferidas para colunas de purificação de RNA (*RNeasy spin column*), posicionadas em tubos coletores de 2mL. As colunas foram lavadas sucessivamente com tampões *RWI* (700 μL) e *RPE* (500 μL) e as amostras foram centrifugadas por 30 segundos, a 10000 *rpm*. Após lavagem, a coluna de purificação foi colocada em novo tubo coletor e submetida à centrifugação, por 1 minuto. Finalmente, para obtenção do RNA, adicionou-se 30 μL de H_2O livre de RNase e os tubos foram centrifugados por 1

minuto, a 10000 *rpm*. A concentração de RNA nas amostras foi determinada pela leitura de absorbância em 260 e 280nm, pelo espectrofotômetro *NanoDrop* (*NanoDrop ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer, NanoDrop Technologies*), sendo a pureza determinada pela razão entre os valores de 260/280.

3.4.8.2. Síntese de cDNA

A análise dos genes em estudo prosseguiu com a síntese de cDNA, realizada por transcrição reversa, com uso de *SuperScriptTM III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* e de acordo com protocolo fornecido por seu fabricante. Para tal, adicionou-se RNA diluído em H₂O *DEPC* (do inglês, *diethylpyrocarbonate*) na concentração de 1µg/12µL, em tubos de 0,2mL. Em seguida, o conteúdo foi incubado com 1µL de *oligo-dT* e 1µL de *dNTP* (10mM), a 65°C e por 5 minutos. Em seguida, os tubos foram colocados no gelo por 1 minuto e adicionou-se 6µL de uma mistura contendo 4µL de tampão *5X First Strand*, 1µL de *DTT* e 1µL de *SuperScript III RT*. As amostras foram sequencialmente incubadas a 50°C por 1 hora, a 70°C por 5 minutos e 4°C por 3 minutos. O cDNA foi diluído 25 vezes em H₂O *DEPC* (18µL da reação + 432µL de água), agitado e distribuído em alíquotas de 90µL.

3.4.8.3. Reação de RT-PCR

Após extração de RNA e síntese de cDNA iniciou-se a reação de RT-PCR (Transcriptase reversa – reação em cadeia de polimerase) em tempo real, propriamente dita. Os níveis de RNAm foram avaliados e quantificados, em duplicata, por detecção química dos produtos da PCR, com uso de *SYBER Green I* (*Molecular Probe*) e *Rotor Gene 3000 System*. Para cada amostra, foram utilizados

2,5µL de cDNA e 7,5µL de mistura contendo 5µL de *SYBER Green*, 1,1µL de MgCl₂, 0,9µL de H₂O *DEPC* e 0,5µL de *primer*. Os *primers* utilizados para as reações de PCR estão descritos na tabela 1. No final de cada corrida, a curva de “*melting*” foi analisada, a fim de avaliar a especificidade da reação. Os dados foram expressos como razão entre a expressão do gene alvo e da média dos genes constitutivos. Selecionou-se os genes constitutivos UBC, HMBS e β-actina, por não apresentarem expressão com variação significativa entre as linhagens celulares e seus tratamentos. Para comparação entre as linhagens celulares, os valores de expressão gênica foram normalizados pelo resultado da quantificação da linhagem normal HB4a. Para comparação entre os tratamentos, os valores de expressão gênica obtidos foram normalizados pelo resultado da quantificação das linhagens celulares tratadas com etanol.

Tabela 1. *Primers* utilizados na quantificação dos níveis de RNAm.

GENE	5'PRIMER (5' - 3')	3'PRIMER (5' - 3')
HER-2/neu	GGGCTGGCCCGATGTATTTGAT	ATAGAGGTTGTCTGAAGGCTGGGC
FAT/CD36	TGCAAAACGGCTGCAGGTCA	TGGTTTGTGCTTGAGCCAGGTTTAT
FABP4	GGAGTGGGCTTTGCCACCAGG	CGCCTTTCATGACGCATTCCACC
DGAT	TCGCCTGCAGGATTCTTTAT	GCATCACCACACACCAGTTC
DEPTOR	GCGGAGCTGCCCCGAACAAA	GTGCAGCCTGAGCCGTAGCTG
SREBP	ACAGTGACTTCCCTCGCCTAT	GCATGGACGGCTACATCTTCAA
FASN	CCGAGACACTCGTGGGCTA	CTTCAGCAGGACATTGATGCC
UBC	ACCCAAGAAAAGCACAAGG	AGCCCAGTGTTACCACCAAG
HMBS	CAAAGATGAGAGTGATTCGC	CACACTGTCCGTCTGTATGC
β-actina	GGGACGACATGGAGAAAATC	GGGTGTTGAAGGTCTCAAAC

3.5. Análise estatística dos resultados

Para os diferentes ensaios, os valores de média e desvio padrão obtidos nos experimentos foram submetidos a teste estatístico *Oneway Anova* e pós-teste de Bonferroni, com uso do programa *GraphPad Prism4*, considerando-se nível de significância de $p \leq 0,05$.

► RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Da superexpressão de HER-2

4.1.1. *Lipid rafts* e perfil de ácidos graxos de membranas celulares

Para testar a hipótese de que a superexpressão de HER-2 requer grandes quantidades de *lipid rafts* na membrana celular, células das linhagens HB4a e HB4aC5.2 foram marcadas com toxina colérica e visualizadas por microscópio confocal (Figura 11). Considerando-se que a toxina colérica marca indiretamente os microdomínios *rafts*, optamos pela utilização adicional do reagente filipina, que se liga e marca especificamente o colesterol, principal componente estrutural dos *lipid rafts* (Figura 11). De acordo com a Figura 11, observamos que a transformação das células HB4aC5.2, pela superexpressão de HER-2, foi acompanhada pelo aumento dos *lipid rafts* e de seu principal componente estrutural, o colesterol.

A estrutura rígida, característica dos *lipid rafts*, não depende apenas do colesterol presente na membrana celular, mas também de ligações covalentes entre este e a cadeia acil saturada de fosfolípides da membrana celular, já que a ligação entre colesterol e cadeia acil poli-insaturada não é forte suficiente para manutenção dos *lipid rafts*, impossibilitando seu agrupamento e rigidez^{13,14,30,43}. Considerando-se essa premissa e o alto grau de insaturação de DHA, o perfil de ácidos graxos de membranas de células HB4a e HB4aC5.2, também foram analisados. Os cromatogramas obtidos mostraram que células HB4aC5.2, com superexpressão de HER-2, apresentam perfil de ácidos graxos de membrana diferente de células da linhagem HB4a, com expressão normal de HER-2 (Figura 12). Em comparação a células HB4a (Figura 12A), observou-se porcentagem significativamente maior do

ácido graxo saturado palmítico e menor do ácido graxo poli-insaturado DHA em membranas de células HB4aC5.2 (Figura 12B).

Figura 11- Micrografias obtidas em microscópio confocal mostram a marcação de *lipid rafts* (contorno em vermelho) e de colesterol (contorno em azul), bem como a combinação das imagens (merge), de linhagens celulares HB4a e HB4aC5.2, por *Alexa Flúor 594* conjugado com a subunidade B da toxina da cólera em associação com filipina.

Figura 12 - Porcentagem relativa de ácidos graxos na membrana de células HB4a (A) e HB4aC5.2 (B). Destaque para os ácidos palmítico e DHA. A membrana celular das linhagens HB4a e HB4aC5.2 foi isolada e a quantidade de ácidos graxos foi analisada por cromatografia gasosa. Valores representados como porcentagem e desvio padrão de cada ácido graxo, relativa ao total da quantidade de ácidos graxos da membrana celular. Os dados foram obtidos a partir de três experimentos em triplicata. * $p < 0,001$ vs células HB4a.

4.1.2. Sinalização iniciada por receptores HER-2: lipogênese, sobrevivência e proliferação celular

O ácido palmítico, frequentemente utilizado na síntese de fosfolípidos para membrana celular e *lipid rafts*, constitui produto final da ativação de ácido graxo sintase (FASN), principal enzima envolvida na lipogênese celular¹⁰. Para analisar a participação da FASN no aumento de *lipid rafts*, observado em células HB4aC5.2, ambas as linhagens foram submetidas à análise dos níveis endógenos dessa proteína (Figura 13A). A expressão da FASN foi maior em células HB4aC5.2, quando comparada com células normais HB4a.

A composição lipídica da membrana celular também influencia sua mobilidade e a ativação de componentes a ela associados^{10,13,43}. Para examinar se o aumento de *lipid rafts* influenciou a sinalização iniciada por receptores HER-2, avaliou-se a ativação de proteínas envolvidas na sobrevivência e proliferação celular como, Akt e Erk1/2 (Figura 13A), em células HB4a e HB4aC5.2. Em células normais HB4a sob estímulo com 20% de SFB, proteínas *downstream* a HER-2 foram ativadas somente quando expostas a estímulo mitogênico adicional no meio de cultura. De maneira diferente, células HB4aC5.2, com superexpressão de HER-2, foram capazes de promover hiperativação constante de proteínas Akt e Erk1/2 (Figura 13A), independente de mitógenos adicionais, e proliferação duas vezes mais rápida que a linhagem normal HB4a (Figura 13B e C).

(B)

(C)

Figura 13- Efeito da superexpressão de HER-2 na ativação de proteínas associadas com sobrevivência celular, lipogênese e proliferação. (A) Proteínas de linhagens HB4a e HB4aC5.2 foram precipitadas e submetidas à análise de *western blotting* para Akt, Erk1/2, FASN e β -actina (controle). (a) células normais HB4a. (b) células com superexpressão de HER-2, HB4aC5.2. CTL: células tratadas com meio de cultura padrão. SFB: células tratadas com meio de cultura livre de SFB por 24 horas, com posterior adição de 20% de SFB por 4 horas. (B) e (C) Os gráficos comparam a proliferação de células HB4a e HB4aC5.2 cultivadas em meio de cultura padrão, sem estimulação mitogênica adicional, por 5 dias. Em (B) foi utilizado método de azul de Tripan. Em (C) a proliferação foi avaliada por MTT. Os dados foram obtidos a partir de três experimentos em triplicata. * $p < 0,001$ vs células HB4a.

4.1.3. Na atividade transcricional de PPAR γ

O aumento da atividade transcricional de PPAR γ , em células com superexpressão de HER-2, promove lipogênese e síntese de triglicérides, evitando lipotoxicidade e mantendo a sinalização iniciada por esses receptores^{15,48}. Para determinar a influência da superexpressão de HER-2 na atividade transcricional de PPAR γ em células HB4aC5.2, a expressão de seus genes alvos foram quantificados. Células HB4aC5.2 apresentaram aumento significativo ($p < 0,001$) na expressão dos genes FAT/CD36, FABP4 e DGAT, envolvidos na captação e transporte de ácidos graxos e na síntese de triglicérides, respectivamente, em relação a células HB4a (Figura 14).

Figura 14 - Expressão relativa de genes FAT/CD36, FABP4 e DGAT, alvos de PPAR γ . Células de linhagens HB4a e HB4aC5.2 foram mantidas em meio de cultura padrão, com 10% de SFB e os genes HMBS e UBC foram usados como controle. Os dados foram obtidos a partir de um experimento em quadruplicata e a reação de PCR em tempo real foi realizada em duplicata. Para comparação entre as linhagens celulares, os valores de expressão gênica foram normalizados pelo resultado da quantificação da linhagem normal HB4a. * $p < 0,001$ vs células HB4a.

4.1.4. Na expressão de DEPTOR

A superexpressão de DEPTOR pode inibir a ativação de mTOR, principalmente mTORC1, mas promove ativação de Akt e PPAR γ ^{24,25}. Nesse sentido, avaliamos a possível relação da hiperativação de Akt e o aumento da atividade transcricional de PPAR γ , observados em células HB4aC5.2, com superexpressão de DEPTOR. A superexpressão de HER-2, em células HB4aC5.2, foi acompanhada por aumento significativo de DEPTOR ($p < 0,001$), quando comparado com a linhagem normal HB4a (Figura 15A). Como já é conhecido, a superexpressão e atividade de DEPTOR possui relação inversa com atividade de mTORC1^{24,25}. Por essa razão, avaliamos a expressão relativa de genes alvos de mTORC1, como SREBP-1 e FASN. Houve diminuição significativa de SREBP-1, mas não da expressão de FASN (Figura 15A). Quando ativada por mTORC1, a proteína S6K é responsável pela ativação e expressão de SREBP-1, bem como pela inibição de Akt^{23,24,25}; portanto, a ativação da proteína S6K também foi avaliada. O aumento na expressão de DEPTOR em células HB4aC5.2 também foi acompanhado pela diminuição da ativação de S6K (Figura 15B), em relação a células normais HB4a.

Figura 15 - Expressão relativa do gene DEPTOR e sua consequência na atividade de mTORC1. (A) Para metodologia de PCR em tempo real, células HB4a e HB4aC5.2 foram mantidas em meio de cultura padrão, com 10% de SFB. Genes HMBS e UBC foram usados como controle. Os dados foram obtidos a partir de um experimento em quadruplicata e a reação de PCR em tempo real foi realizada em duplicata. Para comparação entre as linhagens celulares, os valores de expressão gênica foram normalizados pelo resultado da quantificação da linhagem normal HB4a. * $p < 0,001$ vs células HB4a. (B) Para metodologia de *western blotting*, proteínas foram precipitadas e ativação de p70S6K (S6K) foi analisada. Ambas as linhagens foram cultivadas com meio de cultura padrão.

4.2. Do tratamento com DHA

4.2.1. Na estrutura dos *lipid rafts* e perfil de ácidos graxos da membrana celular

Evidências experimentais têm mostrado que a substituição de fosfolípidos saturados por poli-insaturados, na membrana celular, pode facilitar a ruptura dos *lipid rafts*^{13,30,41,43}. Nesse sentido, linhagens HB4a e HB4aC5.2 foram tratadas com 100µM de DHA por 72 horas. Posteriormente, o perfil de ácidos graxos de membranas celulares foi analisado por cromatografia gasosa (Figura 16), e a estrutura de *lipid rafts* e colesterol, visualizada por microscópio confocal (Figura 17).

Os cromatogramas ilustram que o tratamento de células HB4aC5.2 com DHA, promoveu alteração no perfil de ácidos graxos de membrana celular, quando comparado com as mesmas células não tratadas. O aumento da saturação dos fosfolípidos da membrana celular de células HB4aC5.2, necessária para a sua transformação oncogênica, foi substituído por aumento significativo de ácido graxo poli-insaturado DHA, cuja porcentagem atingiu valores semelhantes àqueles observados em células normais HB4a (Figura 16A e B). Vale ressaltar que, ambas as linhagens também alcançaram níveis semelhantes de ácido palmítico na membrana celular (Figura 16C e D), no entanto, as micrografias confocais mostraram que o tratamento com DHA desestruturou *lipid rafts* em células HB4aC5.2, mas não em células normais HB4a (Figura 17).

(A) HB4a- DHA

(B) HB4aC5.2 - DHA

Figura 16 - Porcentagem relativa de ácidos graxos na membrana de células HB4a (A) e HB4aC5.2 (B) tratadas com ácido docosaexaenoico (DHA - 100 μ M, por 72 horas). Destaque para os ácidos palmítico e DHA. Após tratamento, membranas celulares de linhagens HB4a e HB4aC5.2 foram isoladas e a quantidade de ácidos graxos analisada por cromatografia gasosa. Os dados foram obtidos a partir de três experimentos em triplicata. (A) e (B): cromatogramas, com porcentagem e desvio padrão de cada ácido graxo. (C) e (D): porcentagem dos ácidos graxos, palmítico e DHA. * $p < 0,001$ vs HB4a controle; ** $p < 0,001$ vs HB4a controle; *** $p < 0,001$ vs HB4aC5.2 controle. (C) *** $p < 0,001$ vs HB4a controle.

Figura 17 - Visualização de *lipid rafts* e colesterol em células HB4a e HB4aC5.2 tratadas com ácido docosaexaenoico (DHA - 100 μ M, por 72 horas). As micrografias (A) e (B) mostram os *lipid rafts* (contorno em vermelho), colesterol (contorno em azul) e a combinação das imagens (merge) das células estudadas. As micrografias foram selecionadas a partir de três experimentos em triplicata.

4.2.2. Sinalização iniciada por receptores HER-2: lipogênese, sobrevivência e proliferação celular

Para avaliar se a ruptura de *lipid rafts* pelo tratamento com DHA poderia inibir a sinalização iniciada por receptores HER-2, proteínas responsáveis por sinais de sobrevivência, proliferação e lipogênese, como Akt, Erk1/2 e FASN, respectivamente, foram analisadas em células HB4a e HB4aC5.2, após tratamento com esse ácido graxo poli-insaturado. Células normais HB4a, cuja estrutura de microdomínios *rafts* foi mantida após tratamento com DHA, apresentaram ligeiro aumento na ativação de Akt e FASN (Figura 18A). De maneira diferente, a ruptura de *lipid rafts* em células HB4aC5.2 tratadas com DHA foi acompanhada por diminuição da ativação das proteínas Akt, Erk1/2 e FASN (Figura 18B).

Figura 18 - Efeito do tratamento de células HB4a e HB4aC5.2 com ácido docosaexaenoico (DHA - 100μM, por 72 horas) nas proteínas ativadas pelos receptores HER-2. As proteínas imunoprecipitadas foram submetidas à técnica de *western blotting* para análise de Akt, Erk1/2 e FASN. A proteína β-actina foi utilizada como controle. CTL: células cultivadas em meio de cultura padrão e etanol. FBS (controle positivo): células cultivadas em meio de cultura livre de soro fetal bovino por 24 horas, com posterior estímulo de soro fetal bovino a 20% por 4 horas. DHA: células tratadas com 100μM de DHA por 72h. As micrografias foram selecionadas a partir de três experimentos.

Em nosso modelo celular de transformação oncogênica, a superexpressão de HER-2 conferiu fenótipo lipogênico às células HB4aC5.2, acompanhado por aumento da expressão de DEPTOR e atividade transcricional de PPAR γ . Nesse cenário, receptores HER-2 garantem elevada mobilização intracelular de lipídios sem toxicidade e evitam o controle negativo de vias lipogênicas¹⁵. Após o tratamento com 100 μ M de DHA por 72 horas, o fenótipo lipogênico de células HB4aC5.2 foi alterado, atingindo fenótipo semelhante ao encontrado em células normais HB4a (Figura 19A e B). Houve diminuição significativa da maior parte dos genes envolvidos na lipogênese celular, em ambas as linhagens, com exceção do FABP4, que aumentou significativamente após tratamento com DHA em células HB4aC5.2 (Figura 19B). A expressão do gene FAT/CD36 não foi influenciada pelo tratamento com DHA (Figura 19A e B).

Figura 19 - Expressão relativa de genes FAT/CD36, FABP4, DGAT, DEPTOR, SREBP-1 e FASN, em células HB4a e HB4aC5.2, tratadas com ácido docosaexaenoico (DHA - 100 μ M, por 72 horas; grupo DHA). Para comparação entre os tratamentos, os valores de expressão gênica, obtidos por PCR em tempo real, foram normalizados pelos resultados obtidos do tratamento de ambas linhagens celulares com etanol (grupo ETA). Genes HMBS e UBC foram usados como controle. Os dados foram obtidos a partir de um experimento em quadruplicata e a reação de PCR em tempo real foi realizada em duplicata. * $p < 0,001$ vs ETA

4.2.3. Na indução de apoptose

Ativação da proteína Akt por receptores HER-2 e por DEPTOR promove evasão de sinais apoptóticos, por meio da inibição da proteína pró-apoptótica BAD^{8,23,26}. Células em crescimento apresentam a BAD localizada na porção citoplasmática da membrana celular, aonde esta funciona como um sensor de morte em resposta à inibição da Akt ou danos na membrana⁴⁹. A BAD inicia sua cascata de apoptose através de seu deslocamento para a mitocôndria⁴⁹. Na presente pesquisa, o tratamento com DHA provocou ambas as situações nas células HB4aC5.2: as micrografias confocais mostraram que as alterações na membrana celular, em particular dos *lipid rafts*, e a inibição da Akt, observadas nessas células, foram associadas com a localização da BAD na mitocôndria (Figura 20). Análises posteriores de citometria de fluxo mostraram ainda que, a expressão da BAD na mitocôndria de células HB4aC5.2, tratadas com DHA, foi associada com indução significativa de morte e apoptose (Figura 21). O mesmo não foi encontrado em células normais HB4a (Figuras 18 e 19).

Figura 20 - Visualização da proteína BAD em células HB4a e HB4aC5.2. Após o tratamento com ácido docosaenoico (DHA - 100 μ M, por 72 horas), células HB4a e HB4aC5.2 foram incubadas com MitoTracker® RedCMXRos, para visualização da mitocôndria (em vermelho); anti-pAB BAD, para marcação da proteína BAD (em verde); e DAPI, para visualização do núcleo (em azul). As setas em branco ilustram aumento da coloração laranja, nas células HB4aC5.2 tratadas com DHA, sugerindo co-localização da BAD (em verde) na mitocôndria (em vermelho). As figuras foram selecionadas a partir de três experimentos em triplicata.

(A)

(B)

(C)

Figura 21 - Porcentagem de morte celular e apoptose induzida por ácido docosaexaenoico (DHA), em linhagens HB4a e HB4aC5.2. (A) Para análise de morte celular, células HB4a e HB4aC5.2 foram tratadas com diferentes concentrações de DHA (25μM, 50μM, 75μM e 100μM) e controles (cultura com meio padrão, CTL; cultura com meio acrescido com etanol, ETHA), por 72h. Posteriormente, ambas as linhagens foram marcadas com PI e analisadas por citometria de fluxo. Células com quantidade de DNA inferior a 2n (hipodiplóides) foram consideradas em morte. Barras representam valores de médias e desvios padrão. *** $p < 0,001$ vs CTL e ETHA, 25μM, 50μM e 75μM. ** $p < 0,001$ vs CTL e ETHA, 25μM, 50μM. (B) O gráfico compara a porcentagem de morte celular entre as linhagens HB4a e HB4aC5.2 tratadas com 100μM de DHA. * $p < 0,001$ vs HB4a. (C) Para análise de apoptose, células HB4a e HB4aC5.2 foram tratadas com diferentes concentrações de DHA (25μM, 50μM, 75μM e 100μM) e controles (CTL e ETHA) por 72h, marcadas com PI e Anexina V-FITC, para posterior análise em citômetro de fluxo. Os histogramas representam os dados obtidos do *software* do aparelho. Nos quadrantes superiores – direito: porcentagem de células marcadas com PI; esquerdo: porcentagem de células marcadas com PI e Anexina V-FITC. Quadrantes inferiores – direito: porcentagem de células marcadas com Anexina V-FITC; esquerdo: porcentagem de células viáveis. (D) O gráfico representa a porcentagem de células marcadas com PI e Anexina V-FITC. Barras representam valores de médias e desvios padrão. ** $p < 0,001$ vs CTL, ETHA, 25μM e 50μM. *** $p < 0,001$ vs CTL, ETHA, 25μM, 50μM e 75μM. CTL: Os dados foram obtidos a partir de três experimentos em triplicata.

► DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho contemplou duas hipóteses distintas. A primeira delas considerou que a superexpressão de HER-2 poderia favorecer a formação de *lipid rafts*, enquanto a segunda propôs que desestruturação desses microdomínios de membrana celular por DHA poderia inibir a sinalização iniciada por HER-2 em linhagens de câncer de mama.

Como modelo experimental escolhemos as linhagens celulares HB4a e HB4aC5.2, o que nos permitiu analisar células imortalizadas, com fenótipo estritamente luminal, planejadas especificamente para superexpressar HER-2 (HB4aC5.2) e, em outros aspectos, se assemelhar à sua linhagem de origem (HB4a)^{26,44}. Nosso modelo difere da maioria das linhagens tumorais já estabelecidas e descritas em estudos *in vitro*, pois nossas linhagens celulares não apresentam múltiplas alterações genéticas além da desejada superexpressão de receptores HER-2^{26,44}.

De acordo com nossos resultados, células transformadas HB4aC5.2 apresentaram, de fato, maiores quantidades de *lipid rafts* e de seus componentes estruturais, colesterol e ácido graxo saturado (como palmítico) nas suas membranas celulares do que células HB4a, sugerindo que a transformação oncogênica por superexpressão de HER-2 exigiu modificações nesses microdomínios de membrana.

A formação de homo ou heterodímeros de HER-2 parece acontecer nos *lipid rafts*¹². Além disso, o controle da sobrevivência e proliferação de células HER-2 positivas também depende da localização de HER-2 com outras proteínas de membrana, como as integrinas e o fator extranuclear do receptor de estrogênio, nos *lipid rafts*^{50,51}.

Assim, é possível que o aumento dos microdomínios *rafts* em células com superexpressão de HER-2 seja importante para potencializar a ação oncogênica desses receptores.

De maneira geral, a superexpressão e ativação de receptores HER-2 aumenta sinais proliferativos, promove ativação constante de vias de sobrevivência celular e evasão de apoptose^{7,8,26,44}. Nossas análises de vias de sinalização, iniciadas por receptores HER-2, mostraram que células HB4aC5.2 apresentaram aumento da ativação de proteínas Akt e Erk1/2. Este aumento foi associado a uma proliferação celular, na ausência de ligantes adicionais, duas vezes mais rápida do que a linhagem normal HB4a. A ativação das proteínas Akt e Erk1/2, por sua vez, estão envolvidas na expressão da enzima FASN, responsável por síntese de palmitato¹⁰.

Adicionalmente, a atividade de FASN está associada à superexpressão de HER-2, por meio da interação física direta com a fração tirosina quinase de receptores HER-2⁵². Nossas análises mostraram que a superexpressão de HER-2 e ativação constitutiva da Akt e Erk1/2 foram acompanhadas pelo aumento da expressão da enzima FASN em células HB4aC5.2, sugerindo que os receptores HER-2 estavam superexpressos e ativos.

Genes envolvidos no aumento da expressão de FASN são necessários para a sobrevivência de células HER-2 positivas¹⁶. Os produtos finais da atividade da FASN são fosfolípidos saturados como ácido palmítico, frequentemente utilizado para formação da membrana celular^{10,52,53}, conforme observado na presente pesquisa. Clinicamente, o aumento de ácido palmítico em câncer de mama está associado com fases iniciais da tumorigênese^{52,54}.

Em conjunto, essas observações sugerem que a FASN pode participar da organização de um ambiente favorável para a superexpressão e ativação de receptores HER-2, garantindo síntese de ácidos graxos necessários para a formação dos *lipid rafts*, bem como para a localização, interação com outras proteínas, e ativação de receptores HER-2^{10,52,53}, proporcionando benefício lipogênico em direção à malignidade¹⁵. O aumento de FASN em cânceres de mama HER-2 positivos já foi descrito por outros autores e sua modulação parece ser alvo terapêutico promissor no tratamento de cânceres de mama HER-2 positivos^{10,14,15,16,52}.

Por outro lado, o excesso de ácido palmítico produzido por FASN tem efeito citotóxico e pode funcionar como controle negativo na atividade dessa enzima¹⁵. No entanto, nossos resultados sugerem que células da mama com superexpressão de HER-2 e aumento da FASN mantêm sua proliferação e evitam lipotoxicidade, por meio da conversão e armazenamento do excesso de palmitato em triglicérides, de maneira dependente de PPAR γ . Um dos principais alvos transcricionais de PPAR γ é o gene DGAT, responsável por codificar uma enzima com o mesmo nome, envolvida no passo final da síntese de triglicérides^{18,21}. Em nossas análises, por PCR em tempo real, observamos que a superexpressão de HER-2, em células HB4aC5.2, foi acompanhada pelo aumento da expressão do gene DGAT.

PPAR γ é o regulador principal da lipogênese com possíveis benefícios adicionais na proliferação celular^{18,48}. Em alguns tipos celulares o aumento da atividade transcricional de PPAR γ promove aumento da expressão de genes FAT/CD36 e FABP4, que estão envolvidos no aumento da captação e transporte de ácidos graxos, para serem preferencialmente utilizados na construção de membranas

celulares, durante a proliferação celular^{10,15,17,19,20}. De acordo com nossos resultados, o aumento significativo na expressão de genes DGAT, FAT/CD36 e FABP4, em células HB4aC5.2, sugere que a superexpressão de HER-2 foi acompanhada pelo aumento da atividade transcricional de PPAR γ . Nossos resultados nos permitem ainda sugerir que o metabolismo de células com superexpressão de HER-2 parece estar adaptado para facilitar a síntese de triglicérides, bem como a captação e incorporação de lipídios, necessários para produção de novas células¹⁵. Nesse cenário, células com superexpressão de HER-2 maximizariam sua habilidade em adquirir e metabolizar lipídios favorecendo mais a proliferação, do que a produção eficiente de ATP¹⁵. Adiciona-se que em mulheres com câncer de mama, a superexpressão de HER-2 está associada com aumento de níveis proteicos de PPAR γ ^{17,21}.

Nos últimos 10 anos entendeu-se que, em câncer de mama, a lipogênese mediada por PPAR γ poderia ser controlada pela via mTOR^{10,14,15,22,55}. No entanto, essa teoria se tornou questionável a partir de evidências experimentais recentes sugerindo que o inibidor de mTOR, DEPTOR, seja o principal modulador da atividade de PPAR γ em adipócitos, por ativar o eixo Akt/PPAR γ ²⁴. A expressão de DEPTOR promove adipogênese, enquanto sua inibição bloqueia esse processo²⁴. Em modelos animais, a superexpressão de DEPTOR é responsável pelo acúmulo de tecido adiposo branco, e em humanos, está associada com algum grau de obesidade, sugerindo que DEPTOR possa ser importante regulador da adipogênese²⁴.

Especificamente em câncer, sua função ainda é controversa²⁵. Ocorre que, por sua capacidade em inibir mTOR (cuja atividade está aumentada em muitos tumores), DEPTOR poderia ser considerado uma proteína supressora tumoral²⁵. Por

outro lado, por inibir exclusivamente mTORC1 e reativar Akt quando superexpresso, DEPTOR poderia ser considerado um oncogene²⁵. O potencial papel de DEPTOR como supressor tumoral ou oncogene, poderia depender de condicionantes celulares ainda não conhecidos²⁵. A superexpressão de DEPTOR foi encontrada em tumores de próstata, leucemia mielóide crônica e pulmão²⁵. Em pacientes com carcinoma da tireoide, a superexpressão de DEPTOR foi associada com metástase, recidiva precoce e diminuição da sobrevida²⁵. Em células de mieloma múltiplo está associada com ativação de Akt e maior sobrevivência da célula cancerosa²⁸.

Em nosso modelo de transformação oncogênica, houve hiperativação de Akt e aumento da atividade transcricional de PPAR γ , ambos associados à superexpressão de HER-2, que foram acompanhados pelo aumento significativo de DEPTOR e diminuição da atividade de mTORC1. Nesse cenário, o aumento da expressão de DEPTOR parece constituir importante vantagem oncogênica para células HB4aC5.2, pois ao mesmo tempo que DEPTOR pode estar envolvido no controle da atividade de PPAR γ a favor de proliferação, ele também pode potencializar ativação de Akt a favor da sobrevivência celular.

Em resumo, nossos resultados mostraram que a transformação oncogênica de células HB4aC5.2, pela superexpressão de HER-2, foi acompanhada de modificações na membrana celular, com aumento da formação de *lipid rafts*, promoveu ativação constante de vias de sobrevivência, proliferação, e criou ambiente lipogênico favorável à manutenção da proliferação e sobrevivência celular, que parece ser dependente da superexpressão de DEPTOR. Já o tratamento dessas células com DHA desestruturou os *lipid rafts*, inibiu a sinalização deflagrada por receptores HER-2, reverteu o fenótipo lipogênico, e induziu sua apoptose. Possivelmente, o

aumento da porcentagem de DHA e redução de ácido palmítico na membrana de células HB4aC5.2, dificultou a dimerização dos receptores HER-2 nos *lipid rafts* prejudicando sua sinalização^{36,41,43}, como evidenciado pela diminuição da ativação das proteínas Akt, Erk1/2, FASN, e expressão dos genes DGAT e DEPTOR. Além disso, a diminuição da capacidade de acumular lipídios na forma de triglicérides, sugerida pela diminuição da expressão de DGAT em células HB4aC5.2 após a suplementação de DHA, está de acordo com a hipótese de que células com superexpressão de HER-2 trabalham com níveis endógenos de ácidos graxos, principalmente palmitato, próximos à toxicidade^{15,53}. Curiosamente, o aumento na expressão de genes FAT/CD36 e FABP4, induzido pela superexpressão de HER-2 nas células HB4aC5.2, foi mantido após tratamento com DHA. Essa observação sugere que a atividade transcricional de PPAR γ foi parcialmente mantida após o tratamento com esse ácido graxo.

O DHA é um ligante de PPAR γ ^{15,17,56} e possivelmente, graças a essa característica, células HB4aC5.2 tratadas em cultura com DHA, foram capazes de captar e transportá-lo preferencialmente para formação de membrana celular. Isso pode ter contribuído para o aumento da porcentagem de DHA na membrana celular, ruptura dos *lipid rafts* e prejuízo da sinalização iniciada pelos receptores HER-2 nas células HB4aC5.2.

Nossa hipótese considerou ainda que a desestruturação de *lipid rafts* poderia ativar vias apoptóticas^{49,57}. A inibição da Akt pode permitir ativação de vias apoptóticas mediadas pela proteína BAD^{49,57}. Evidências experimentais sugerem que a BAD seja uma proteína apoptótica localizada no citoplasma de células em crescimento e em alguns tipos celulares, ancorada nos *lipid rafts*^{49,57}. Para iniciar

processos apoptóticos, a BAD se desloca para mitocôndria^{49,57}. No presente estudo, a inibição de Akt e ruptura de *lipid rafts* de células HB4aC5.2, pelo tratamento com DHA, promoveu deslocamento da BAD para a mitocôndria. Análises posteriores comprovaram que a BAD localizada na mitocôndria de células com superexpressão de HER-2 foi acompanhada por indução significativa de apoptose, fato não observado na linhagem normal HB4a. Isso nos permite sugerir que a manutenção dos *lipid rafts* em células HB4a pode ter contribuído para a baixa porcentagem de apoptose induzida por DHA, observada nessas células.

Diversos estudos têm fornecido evidências consistentes sobre a capacidade antitumoral do DHA^{30-41,58}. Embora vários mecanismos sejam descritos, é geralmente aceito que DHA possa inibir vias de sobrevivência e proliferação por alterar microdomínios presentes na membrana celular, como os *lipid rafts*^{30,36,40,41,43}.

Uma limitação de nosso modelo de estudo é sua especificidade. Nossas células foram transformadas especificamente para superexpressar HER-2 (HB4aC5.2), e apresentar características fenotípicas e marcadores epiteliais luminiais que podem ser comparadas somente às células de carcinoma *in situ*^{26,44}. Na clínica cerca de 70% dos carcinomas *in situ* apresentam superexpressão de receptores HER-2^{59,60,61}. Por essa razão, nossos resultados devem ser analisados com cautela quando extrapolados para modelos mais complexos ou para outros tipos de células de câncer de mama que representem estadios tumorais diferentes. Em estudo preliminar de nosso laboratório (LIM 35), três linhagens celulares, frequentemente utilizadas e já estabelecidas em estudos *in vitro*⁶², mas com características fenotípicas diferentes das células HB4aC5.2, também foram submetidas a tratamento com DHA (Anexo C). Os resultados preliminares obtidos sugerem que efeitos antiproliferativos e pró-

apoptóticos de DHA significativos acontecem apenas na linhagem HB4aC5.2, conforme pode ser verificado no Anexo C. As outras três linhagens tumorais testadas, que apresentam fenótipo metastático, invasivo e marcadores que refletem transição epitélio-mesênquima, não foram sensíveis aos efeitos pró-apoptóticos do DHA (Anexo C).

Vale ressaltar que os resultados da presente pesquisa parecem válidos exclusivamente para DHA, que se demonstrou mais ativo que o EPA (detalhes no anexo C).

A modulação de *lipid rafts*, incluindo a utilização de DHA e outras substâncias como agentes indutores, em outros modelos celulares, já foi descrita, mas com consequências diferentes em cada um deles. Na linhagem de câncer de mama tripla-negativa MDA-MB231 (receptores de estrógeno, progesterona e HER-2 ausentes), o tratamento com DHA ou metil- β -ciclodextrina diminuiu a capacidade invasiva dessas células, sem induzir apoptose^{40,63}. Vale destacar que o mecanismo de invasão de células MDA-MB 231 necessita de *lipid rafts* íntegros para acontecer^{63,64,65}. De maneira diferente, em células de mieloma múltiplo, a desestruturação de *lipid rafts* por metil- β -ciclodextrina prejudicou a apoptose induzida por edelfosina, sugerindo que a integridade dos *lipid rafts* é necessária para sua ação apoptótica⁶⁶. A edelfosina é uma droga que se acumula nos *lipid rafts* e induz apoptose em células de mieloma múltiplo, pela sua co-localização com receptores de morte⁶⁶.

Tomadas em conjunto essas informações apontam para um importante questionamento: seria possível uma associação entre fenótipo tumoral e *lipid rafts*? Em nosso estudo, a linhagem HB4aC5.2 mantém seu fenótipo transformado e

hiperproliferativo graças ao aumento de HER-2 na membrana celular em particular nos *lipid rafts*^{10,12}. Experimentalmente, a linhagem MDA-MB231 mantém seu fenótipo invasivo por meio da interação de proteínas de membrana nos *lipid rafts*^{40,63}. E, finalmente, células de mieloma múltiplo mantém seu fenótipo anti-apoptótico graças à inibição da localização de receptores de morte nos *lipid rafts*. Essas observações indicam a necessidade de se desenvolver novos estudos nessa área, ainda pouco explorada⁶⁶.

Embora pouco seja conhecido sobre os *lipid rafts*, o presente estudo reforça a hipótese de que distúrbios nesses microdomínios, induzidos por DHA, possam representar ferramenta útil para o controle da sinalização aberrante deflagrada por receptores HER-2, e aponta potencial terapêutico da suplementação de DHA para quimioprevenção e tratamento do câncer de mama HER-2 positivo. Intervenções nutricionais constituem uma nova abordagem para melhorar a terapêutica convencional sem afetar negativamente a qualidade de vida do paciente. Mais estudos são necessários para explorar o potencial uso da suplementação de DHA em combinação com outras drogas, como inibidores de HER-2 para o tratamento de câncer de mama.

► CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Nas condições da presente pesquisa, em linhagens de câncer de mama:

1) A superexpressão de HER-2 está associada com aumento de *lipid rafts*, bem como de seus principais constituintes estruturais, e ativação de vias de sinalização iniciadas por esses receptores, envolvidas na sobrevivência, proliferação e lipogênese.

2) O tratamento com DHA foi acompanhado pela desestruturação de *lipid rafts*, influenciou negativamente a ativação das vias de sobrevivência, proliferação e lipogênese e, em consequência dos mecanismos envolvidos nessa modulação, induziu apoptose.

► PERSPECTIVAS

7. PERSPECTIVAS

Os passos seguintes da presente pesquisa buscam complementar a compreensão de mecanismos envolvidos nos processos biológicos observados e explorar aspectos da possível aplicação clínica de DHA no tratamento de câncer de mama HER-2 positivo. Nesse sentido, o conhecimento da habilidade de receptores HER-2 em potencializar a lipogênese, enquanto evitam lipotoxicidade, nos levou a considerar que a capacidade de adaptação de células com superexpressão de HER-2 pode estar associada ao metabolismo lipogênico. Portanto, avaliaremos o efeito do tratamento com DHA em combinação com inibidor de PPAR γ , GW9662. Finalmente, considerando-se que regimes de terapias combinadas podem melhorar a sobrevida de pacientes com câncer de mama, pretendemos avaliar o efeito da combinação do tratamento de DHA com inibidor de HER-2, Trastuzumab, em células HB4aC5.2, e em modelos animais.

▶ ANEXOS

8. ANEXOS

ANEXO A – ANÁLISE DA PORCENTAGEM DE MORTE, CICLO CELULAR E APOPTOSE DAS CÉLULAS HB4a E HB4aC5.2 TRATADAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE DHA.

Figura 1 - Histogramas representativos das análises de morte e ciclo celular da linhagem HB4a tratada com diferentes doses de DHA durante 72 horas. As regiões M1, M2, M3 e M4 foram consideradas como porcentagem de células em morte, fase G0/G1, fase S/G2/M e *debris* celulares, respectivamente.

Figura 2 - Histogramas representativos das análises de morte e ciclo celular da linhagem HB4aC5.2 tratada com diferentes doses de DHA durante 72 horas. As regiões M1, M2, M3 e M4 foram consideradas como porcentagem de células em morte, fase G0/G1, fase S/G2/M e *debris* celulares, respectivamente.

Tabela 1. Média e desvio padrão ($m \pm dp$) da porcentagem de morte celular da linhagem HB4a tratada com diferentes doses de DHA durante 24, 48 e 72 horas.

TRATAMENTO	% de morte celular	% de morte celular	% de morte celular
HB4a	24h ($m \pm dp$)	48h ($m \pm dp$)	72h ($m \pm dp$)
Meio de cultura (cnt)	$6,80 \pm 1,62$	$7,95 \pm 3,76$	$5,65 \pm 0,90$
Etanol (Eta)	$5,56 \pm 0,46$	$5,24 \pm 0,77$	$5,89 \pm 1,06$
25 μ M	$5,68 \pm 0,34$	$5,44 \pm 0,84$	$5,93 \pm 1,07$
50 μ M	$6,74 \pm 0,25$	$6,92 \pm 2,07$	$6,56 \pm 0,37$
75 μ M	$6,69 \pm 0,85$	$6,09 \pm 0,72$	$10,58 \pm 1,74$
100 μ M	$8,50 \pm 1,56$	$9,61 \pm 2,56$	$18,13 \pm 2,57^*$
ANOVA e pós-teste de Bonferroni	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,001(*)$

(*) estatisticamente diferente do cnt, Eta, 25 μ M, 50 μ M e 75 μ M

Gráfico 1. Porcentagem de morte celular da linhagem HB4a tratada com diferentes doses de DHA durante 24 h.

Gráfico 2: Porcentagem de morte celular da linhagem HB4a tratada com diferentes doses de DHA durante 48 h.

Gráfico 3: Porcentagem de morte celular da linhagem HB4a tratada com diferentes doses de DHA durante 72 h.

(*) estatisticamente diferente do cnt, eta, 25 μ M, 50 μ M e 75 μ M

Tabela 2. Média e desvio padrão ($m \pm dp$) da porcentagem de morte celular da linhagem HB4aC5.2 tratada com diferentes doses de DHA durante 24, 48 e 72 horas.

TRATAMENTO HB4aC5.2	% de morte celular 24h ($m \pm dp$)	% de morte celular 48h ($m \pm dp$)	% de morte celular 72h ($m \pm dp$)
Meio de cultura (cnt)	$6,39 \pm 0,06$	$5,88 \pm 1,12$	$6,71 \pm 0,77$
Etanol (Eta)	$6,88 \pm 0,12$	$4,60 \pm 0,21$	$7,52 \pm 1,00$
25 μ M	$5,95 \pm 0,77$	$7,14 \pm 0,22$	$9,70 \pm 0,37$
50 μ M	$7,29 \pm 0,01$	$4,23 \pm 0,61$	$13,68 \pm 1,74$
75 μ M	$7,77 \pm 0,60$	$7,93 \pm 1,09$	$47,71 \pm 2,39^{**}$
100 μ M	$13,31 \pm 0,37^{***}$	$20,13 \pm 9,68$	$51,82 \pm 13,79^{***}$
ANOVA e pós-teste de Bonferroni	#p<0,001(***)	p>0,05	p<0,001(**)(**)

#(***) estatisticamente diferente do cnt, Eta; 25 μ M, 50 μ M e 75 μ M

(**) estatisticamente diferente do cnt, Eta, 25 μ M, 50 μ M

(***)estatisticamente diferente do cnt, Eta; 25 μ M, 50 μ M

Gráfico 4. Porcentagem de morte celular da linhagem HB4aC5.2 tratada com diferentes doses de DHA durante 24 h.

Gráfico 5: Porcentagem de morte celular da linhagem HB4a5.2 tratada com diferentes doses de DHA durante 48 h.

Gráfico 6: Porcentagem de morte celular da linhagem HB4aC.5 tratada com diferentes doses de DHA durante 72 h.

Tabela 3: Média e desvio padrão ($m \pm dp$) da porcentagem de células HB4a na fase G0/G1 do ciclo celular tratada com diferentes doses de DHA durante 24, 48 e 72 horas.

TRATAMENTO HB4a	% de células 24h ($m \pm dp$)	% de células 48h ($m \pm dp$)	% de células 72h ($m \pm dp$)
Meio de cultura (cnt)	$60,92 \pm 1,41$	$59,92 \pm 8,11$	$61,92 \pm 3,26$
Etanol (Eta)	$60,17 \pm 3,24$	$57,88 \pm 0,71$	$62,47 \pm 6,64$
25 μ M	$61,53 \pm 2,54$	$59,73 \pm 0,29$	$63,30 \pm 5,09$
50 μ M	$63,02 \pm 0,20$	$63,17 \pm 3,06$	$62,88 \pm 3,82$
75 μ M	$61,12 \pm 3,13$	$66,34 \pm 1,15$	$58,91 \pm 3,47$
100 μ M	$57,17 \pm 6,97$	$66,10 \pm 3,01$	$52,24 \pm 2,42$
ANOVA e pós-teste de Bonferroni	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$

Gráfico 7: Porcentagem de células HB4a na fase G0/G1 do ciclo celular tratada com diferentes doses de DHA durante 24 h.

Gráfico 8: Porcentagem de células HB4a na fase G0/G1 do ciclo celular tratada com diferentes doses de DHA durante 48 h.

Gráfico 9: Porcentagem de células HB4a na fase G0/G1 do ciclo celular tratada com diferentes doses de DHA durante 72 h.

Tabela 4: Média e desvio padrão ($m \pm dp$) da porcentagem de células HB4aC5.2 na fase G0/G1 do ciclo celular tratada com diferentes doses de DHA durante 24, 48 e 72 horas.

TRATAMENTO	% de células	% de células	% de células
HB4aC5.2	24h ($m \pm dp$)	48h ($m \pm dp$)	72h ($m \pm dp$)
Meio de cultura (cnt)	55,71 $\pm$ 2,25	59,58 $\pm$ 1,75	57,56 $\pm$ 5,40
Etanol (Eta)	55,98 $\pm$ 1,09	52,27 $\pm$ 6,95	56,35 $\pm$ 2,78
25 μ M	56,80 $\pm$ 0,36	64,87 $\pm$ 0,76	60,36 $\pm$ 0,64
50 μ M	58,27 $\pm$ 0,89	54,48 $\pm$ 2,03	58,14 $\pm$ 0,53
75 μ M	57,80 $\pm$ 0,29	64,86 $\pm$ 8,95	35,37 $\pm$ 4,32**
100 μ M	58,15 $\pm$ 0,67	64,03 $\pm$ 2,39	38,84 $\pm$ 11,43***
ANOVA e pós-teste de Bonferroni	p>0,05	p>0,05	p<0,01(**) p<0,05(***)

(**) estatisticamente diferente do cnt, Eta, 25 μ M, 50 μ M

(***) estatisticamente diferente do cnt, Eta; 25 μ M, 50 μ M

Gráfico 10: Porcentagem de células HB4aC5.2 na fase G0/G1 do ciclo celular tratada com diferentes doses de DHA durante 24 h.

Gráfico 11: Porcentagem de células HB4aC5.2 na fase G0/G1 do ciclo celular tratada com diferentes doses de DHA durante 48 h.

Gráfico 12: Porcentagem de células HB4aC5.2 na fase G0/G1 do ciclo celular tratada com diferentes doses de DHA durante 72 h.

** estatisticamente diferente do cnt, eta, 25 μ M, 50 μ M

*** estatisticamente diferente do cnt, eta; 25 μ M, 50 μ M

Tabela 5: Média e desvio padrão ($m \pm dp$) da porcentagem de células HB4a na fase S/G2/M do ciclo celular tratada com diferentes doses de DHA durante 24, 48 e 72 horas.

TRATAMENTO	% de células	% de células	% de células
HB4a	24h ($m \pm dp$)	48h ($m \pm dp$)	72h ($m \pm dp$)
Meio de cultura (cnt)	31,63 $\pm$ 0,05	31,59 $\pm$ 3,54	31,67 $\pm$ 2,19
Etanol (Eta)	31,23 $\pm$ 4,95	34,73 $\pm$ 2,62	27,73 $\pm$ 0,46
25 μ M	31,61 $\pm$ 3,38	34,05 $\pm$ 0,78	29,26 $\pm$ 4,15
50 μ M	29,27 $\pm$ 0,27	29,47 $\pm$ 1,10	29,08 $\pm$ 3,86
75 μ M	27,71 $\pm$ 0,48	28,05 $\pm$ 1,49	27,37 $\pm$ 0,91
100 μ M	25,66 $\pm$ 0,50	25,31 $\pm$ 2,28	26,02 $\pm$ 0,23
ANOVA e pós-teste de Bonferroni	p>0,05	p>0,05	p>0,05

Gráfico 13: Porcentagem de células HB4a na fase S/G2/M do ciclo celular tratada com diferentes doses de DHA durante 24 h.

Gráfico 14: Porcentagem de células HB4a na fase S/G2/M do ciclo celular tratada com diferentes doses de DHA durante 48 h.

Gráfico 15: Porcentagem de células HB4a na fase S/G2/M do ciclo celular tratada com diferentes doses de DHA durante 72 h.

Tabela 6: Média e desvio padrão ($m \pm dp$) da porcentagem de células HB4aC5.2 na fase S/G2/M do ciclo celular tratada com diferentes doses de DHA durante 24, 48 e 72 horas.

TRATAMENTO	% de células	% de células	% de células
HB4aC5.2	24h ($m \pm dp$)	48h ($m \pm dp$)	72h ($m \pm dp$)
Meio de cultura (cnt)	13,68 $\pm$ 2,80	32,95 $\pm$ 1,17	35,32 $\pm$ 0,60
Etanol (Eta)	13,74 $\pm$ 1,20	36,73 $\pm$ 1,25	33,69 $\pm$ 0,58
25 μ M	12,93 $\pm$ 0,53	28,31 $\pm$ 0,96	28,45 $\pm$ 3,42
50 μ M	11,54 $\pm$ 0,62	33,72 $\pm$ 0,07	25,43 $\pm$ 2,96
75 μ M	11,34 $\pm$ 0,23	28,35 $\pm$ 3,59	7,37 $\pm$ 0,93**
100 μ M	11,15 $\pm$ 0,07	24,15 $\pm$ 6,87	8,16 $\pm$ 2,46***
ANOVA e pós-teste de Bonferroni	p>0,05	p>0,05	p>0,001(**)(***)

(**) estatisticamente diferente do cnt, Eta, 25 μ M, 50 μ M

(***) estatisticamente diferente do cnt, Eta; 25 μ M, 50 μ M

Gráfico 16: Porcentagem de células HB4aC5.2 na fase S/G2/M do ciclo celular tratada com diferentes doses de DHA durante 24 h.

Gráfico 17: Porcentagem de células HB4aC5.2 na fase S/G2/M do ciclo celular tratada com diferentes doses de DHA durante 48 h.

Gráfico 18: Porcentagem de células HB4aC5.2 na fase S/G2/M do ciclo celular tratada com diferentes doses de DHA durante 72 h.

Figura 3 - Histogramas representativos das análises de Anexina V-FITC e Iodeto de Propídio (PI) da linhagem HB4a tratada com diferentes doses de DHA durante 72 horas. As siglas nos quadrantes representam: (IE) inferior esquerdo e corresponde a percentagem de células viáveis, (SE) superior esquerdo e corresponde a percentagem de células marcadas com PI, (SD) superior direito e corresponde a percentagem de células marcada com PI e Anexina, (ID) inferior direito e corresponde a percentagem de células marcadas com Anexina.

Figura 4 - Histogramas representativos das análises de Anexina V-FITC e Iodeto de Propídio (PI) da linhagem HB4aC5.2 tratada com diferentes doses de DHA durante 72 horas. As siglas nos quadrantes representam: (IE) inferior esquerdo e corresponde a porcentagem de células viáveis, (SE) superior esquerdo e corresponde a porcentagem de células marcadas com PI, (SD) superior direito e corresponde a porcentagem de células marcadas com PI e Anexina, (ID) inferior direito e corresponde a porcentagem de células marcadas com Anexina.

Tabela 7. Média e desvio padrão ($m \pm dp$) da porcentagem de células HB4a marcadas com Anexina V-FITC e PI tratadas com diferentes doses de DHA durante 24, 48 e 72 horas.

TRATAMENTO	% de células	% de células	% de células
HB4a	24h ($m \pm dp$)	48h ($m \pm dp$)	72h ($m \pm dp$)
Meio de cultura (cnt)	$8,46 \pm 1,77$	$2,85 \pm 0,63$	$3,51 \pm 0,15$
Etanol (Eta)	$7,34 \pm 0,89$	$4,30 \pm 1,39$	$3,71 \pm 0,21$
25 μ M	$9,07 \pm 0,34$	$2,76 \pm 0,13$	$3,91 \pm 0,05$
50 μ M	$9,08 \pm 0,85$	$2,61 \pm 0,24$	$4,82 \pm 0,08$
75 μ M	$10,45 \pm 0,37$	$4,46 \pm 0,22$	$6,95 \pm 1,17^{**}$
100 μ M	$9,97 \pm 2,72$	$7,82 \pm 0,34^{***}$	$13,30 \pm 12,02^{***}$
ANOVA e pós-teste de Bonferroni	p>0,05	p<0,05(***)	p<0,05(**)(***)

(**) estatisticamente diferente do cnt, Eta; 25 μ M, 50 μ M

(***) estatisticamente diferente do cnt, Eta; 25 μ M, 50 μ M e 75 μ M.

Gráfico 19: Porcentagem de células HB4a marcadas com Anexina V-FITC e PI tratadas com diferentes doses de DHA durante 24 h.

Gráfico 20: Porcentagem de células HB4a marcadas com Anexina V-FITC e PI tratadas com diferentes doses de DHA durante 48 h.

***estatisticamente diferente do CNT, ETA; 25 μ M, 50 μ M e 75 μ M.

Gráfico 21: Porcentagem de células HB4a marcadas com Anexina V-FITC e PI tratadas com diferentes doses de DHA durante 72 h.

**estatisticamente diferente do CNT, ETA; 25 μ M, 50 μ M

***estatisticamente diferente do CNT, ETA; 25 μ M, 50 μ M e 75 μ M.

Tabela 8: Média e desvio padrão ($m \pm dp$) da porcentagem de células HB4aC5.2 marcadas com Anexina V-FITC e PI tratadas com diferentes doses de DHA durante 24, 48 e 72 horas.

TRATAMENTO HB4aC5.2	% de células 24h ($m \pm dp$)	% de células 48h ($m \pm dp$)	% de células 72h ($m \pm dp$)
Meio de cultura (cnt)	$4,62 \pm 0,10$	$3,45 \pm 2,32$	$1,91 \pm 0,01$
Etanol (Eta)	$4,89 \pm 0,28$	$2,55 \pm 0,16$	$1,70 \pm 0,36$
25 μ M	$3,64 \pm 0,53$	$3,03 \pm 0,27$	$2,23 \pm 0,19$
50 μ M	$5,92 \pm 0,89$	$4,41 \pm 2,39$	$4,01 \pm 0,27$
75 μ M	$5,59 \pm 0,91$	$9,45 \pm 0,56$	$39,05 \pm 8,42^{**}$
100 μ M	$11,56 \pm 2,97^{***}$	$39,00 \pm 4,73^{***}$	$41,56 \pm 7,98^{***}$
ANOVA e pós-teste de Bonferroni	p<0,05(***)	#p<0,001(***)	*p<0,01(**)(***)

(***)estatisticamente diferente do cnt, Eta; 25 μ M

#(***) estatisticamente diferente do cnt, Eta; 25 μ M, 50 μ M, 75 μ M

*(**) estatisticamente diferente do cnt, Eta; 25 μ M, 50 μ M

*(***) estatisticamente diferente do cnt, Eta; 25 μ M, 50 μ M

Gráfico 22: Porcentagem de células HB4aC5.2 marcadas com Anexina V-FITC e PI tratadas com diferentes doses de DHA durante 24 h.

Gráfico 23: Porcentagem de células HB4aC5.2 marcadas com anexina V e PI tratadas com diferentes doses de DHA durante 48 h.

Gráfico 24: Porcentagem de células HB4aC5.2 marcadas com anexina V e PI tratadas com diferentes doses de DHA durante 72 h.

ANEXO B – ANÁLISE DA SUPEREXPRESSÃO DE RECEPTORES HER-2

Figura 1 - Expressão relativa do RNAm do oncogene HER-2/neu nas linhagens HB4a e HB4aC5.2. Para análise de RT-PCR em tempo real, as células foram mantidas em condições normais de cultura e o gene da β -actina foi utilizado como controle endógeno. O RNAm foi obtido a partir de um experimento em quadruplicata e as análises de RT-PCR dessas amostras foram feitas em duplicata.

ANEXO C – PORCENTAGEM DE MORTE CELULAR DE DIFERENTES LINHAGENS CELULARES NORMAIS E TRANSFORMADAS DA GLÂNDULA MAMÁRIA TRATADAS COM EPA E DHA.

Figura 1 - Porcentagem de morte celular das linhagens HB4a, HB4aC5.2, SKBR3, MDA-MB 231, MCF-7 e MCF-10 tratadas com 100 μ M de EPA, 100 μ M de DHA, 50 μ M de EPA + 50 μ M de DHA e seus respectivos controles.* p <0,001 estatisticamente diferente do CNT, ETA e DHA. ** p <0,001 estatisticamente diferente do CNT, ETA, EPA e EPA+DHA. HB4a e MCF-10: *** p <0,001 estatisticamente diferente do CNT, ETA e DHA. HB4aC5.2: *** p <0,001 estatisticamente diferente do CNT, ETA, EPA e DHA.

ORIGENS E CONDIÇÕES DE CULTURA DAS CÉLULAS MCF-10, MCF-7, SKBR3 E MDA-MB231

1) Linhagem MCF-10:

As células epiteliais basais MCF-10 foram isoladas da glândula mamária de pacientes com fibrose cística. São clones não-transformados e não-tumorigênicos. As células foram cultivadas em meio DEMEM e F12 (1:1) contendo 5% de soro fetal de cavalo, 10µg/mL de fator de crescimento epidermal, 0,5mg/mL de toxina colérica, 5 µg/ml de insulina, 0,5 µg/mL de hidrocortisona, 100µg/mL de estreptomicina, 100µg/mL de ampicilina, e incubadas em estufa a 37°C, atmosfera de 100% e 5% de CO₂⁶⁷.

2) Linhagem MCF-7:

As células epiteliais luminais de adenocarcinoma de mama, MCF-7, foram isoladas da efusão pleural de pacientes com carcinoma invasivo. Expressam receptores de estrógeno, progesterona e EGF. As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 contendo 10% de SFB, 50µg/mL de ampicilina, 50µg/mL de estreptomicina, e incubadas em estufa a 37°C, atmosfera de 100% e com 5% de CO₂⁶⁷.

3) Linhagem SKBR-3:

As células epiteliais luminais de adenocarcinoma de mama, SKBR-3, foram isoladas da efusão pleural de pacientes com carcinoma invasivo. Apresentam superexpressão do receptor HER-2 (semelhantes à linhagem HB4aC5.2), fenótipo invasivo, metastático, e ausência de receptores de estrógeno e progesterona. As células foram mantidas em meio RPMI 1640 acrescido de 10% de SFB, 2mM de

glutamina, 50µg/mL de ampicilina, 50µg/mL de estreptomicina, e incubadas em estufa a 37°C, atmosfera de 95% e com 5% de CO₂⁶⁷.

4) Linhagem MDA-MB-231:

As células epiteliais basais de adenocarcinoma de mama foram isoladas da efusão pleural de pacientes com carcinoma invasivo. As células MDA-MB-231, apresentam fenótipo invasivo, metastático, altos níveis de receptor de EGF, ausência de receptores de estrógeno, progesterona e HER-2. As células foram cultivadas em meio Leibovitz's contendo 10% de SFB, 100µg/mL de ampicilina, 100µg/mL de estreptomicina, e incubadas em estufa a 37°C, atmosfera de 100% e sem CO₂⁶⁷.

► REFERÊNCIAS

9. REFERÊNCIAS

1. INCA- *Instituto Nacional do Câncer*. Incidência de Câncer de Mama no Brasil. Disponível em:
http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/cancer_.
Acessado em: 04 de janeiro de 2013.
 2. Burstein HJ, Polyak K, Wong JS, Lester SC, Kaelin CM. Ductal carcinoma in situ of the breast. *N Engl J Med*. 2004;350(14):1430-41.
 3. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
 4. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumors. *Nature*. 2000;406(6797):747-52.
 5. Tamimi RM, Baer HJ, Marotti J, Galan M, Galaburda L, Fu Y, et al. Comparison of molecular phenotypes of ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2008;10:1–9.
 6. Tovey SM, Brown S, Doughty JC, Mallon EA, Cooke TG, Edwards J. Poor survival outcomes in HER2-positive breast cancer patients with low-grade, node-negative tumours. *Br J Cancer*. 2009;100:680–3.
 7. Arribas J, Baselga J, Pedersen K, Parra-Palau JL. p95HER2 and breast cancer. *Cancer Res*. 2011;71:1515–9.
 8. Bollig-Fischer A, Dziubinski M, Boyer A, Haddad R, Giroux CN, Ethier SP. HER-2 signaling, acquisition of growth factor independence, and regulation of
-

-
- biological networks associated with cell transformation. *Cancer Res.* 2010;70:7862–73.
9. Ghosh R, Narasanna A, Wang SE, Liu S, Chakrabarty A, Balko JM, et al. Trastuzumab has preferential activity against breast cancers driven by HER2 homodimers. *Cancer Res.* 2011;71:1871–82.
 10. Menendez JA, Lupu R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2007;7:763–76.
 11. MoasserMM. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene.* 2007;26:6469–87.
 12. Nagy P, Vereb G, Sebestyén Z, Horváth G, Lockett SJ, Damjanovich S, et al. Szöllosi. Lipid rafts and the local density of ErbB proteins influence the biological role of homo- and heteroassociations of ErbB2. *J Cell Sci.* 2002;115:4251–62.
 13. Simons K, Toomre D. Lipid raft and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000;1:31–9.
 14. Menendez JA, Vellon L, Lupu R. Targeting fatty acid synthase-driven lipid rafts: a novel strategy to overcome trastuzumab resistance in breast cancer cells. *Med Hypothesis.* 2005;64:997–1001.
 15. Menendez JA. Fine-tuning the lipogenic/lipolytic balance to optimize the metabolic requirements of cancer cell growth: Molecular mechanisms and therapeutic perspectives. *Biochimica ET Biophysica Acta.* 2010;1801(3):381-91.
 16. Kourtidis A, Jain R, Carkner RD, Eilfert C, Brosnan MJ, Conklin DS. An RNA interference screen identifies metabolic regulators NR1D1 and PBP as novel survival factors for breast cancer cells with the ERBB2 signature. *Cancer Res.* 2010;70:1783–92.
-

17. Michalik L, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome-proliferator-activated receptors and cancers: complex stories. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(1):61-70.
18. Yen CE, Stone SJ, Koliwad S, Harris C, Farese RV. DGAT enzyme and triacylglycerol biosynthesis. *J Lipid Res*. 2008;49(11):2283-301.
19. Hancke K, Grubeck D, Hauser N, Kreienberg R, Weiss JM. Adipocyte fatty acid-binding protein as a novel prognostic factor in obese breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;119(2):367-77.
20. Glatz JF, Luiken JJ, Bonen A. Membrane fatty acid transporters as regulators of lipid metabolism: implications for metabolic disease. *Physiol Rev*. 2010;90(1):367-417.
21. Yang Z, Bagheri-Yarmand R, Balasenthil S, Hortobagvi G, Sahin AA, Barnes CJ, Kumar R. HER-2 regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) expression and sensitivity of breast cancer cells to PPAR gamma ligand therapy. *Clin Cancer Res*. 2003;9(8):3198-203.
22. Laplante M, Sabatini DM. An emerging role of mTOR in lipid biosynthesis. *Curr Biol*. 2009;19(22):R1046-52.
23. Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;12(1):21-35.
24. Laplante M, Horvat S, Festuccia WT, Birsoy K, Prevorsek Z, Efeyan A, Sabatini DM. DEPTOR cell-autonomously promotes adipogenesis, and its expression is associated with obesity. *Cell Metab*. 2012;16(2):202-12.
25. Wang Z, Zhong J, Inuzuka H, Gao D, Shaik S, Sarkar FH, Wei W. An evolving role for DEPTOR in tumor development and progression. *Neoplasia*. 2012;14(5):368-75.

26. Timms JF, White SL, O'Hare M, Waterfield MD. Effect of ErbB-2 overexpression on mitogenic signaling and cell cycle progression in human breast luminal epithelial cells. *Oncogene*. 2002;21(43):6573-86.
27. She QB, Chandarlapaty S, Ye Q, Lobo J, Haskell KM, Leander KR, DeFeo-Jones D, Huber HE, Rosen N. Breast tumor cells with PI3K mutation or HER-2 amplification are selectively addicted to Akt signaling. *PLoS One*. 2008;3(8):e3065.
28. Peterson TR, Laplante M, Thoreen CC, Sancak Y, Kang SA, Kuehl WM, Gray NS, Sabatini DM. DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell*. 2009;137(5):873-86.
29. Waitzberg DL, Torrinhas RS. Fish oil emulsion and immune response: what clinicians need to know. *Nutr Clin Parct*. 2009;24(4):487-99.
30. Shaikh SR, Cherezov V, Caffrey M, Stillwell W, Wassall SR. Interaction of cholesterol with a docosahexaenoic acid-containing phosphatidylethanolamine: trigger for microdomain/raft formation? *Biochemistry*. 2003;42(41):12028-37.
31. Menendez JA, Mehmi I, Atlas E, Colomer R, Lupu R. 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):591-608.
32. Schley PD, Jijon HB, Robinson LE, Field CJ. Mechanisms of omega-3 fatty acid-induced growth in MDA-MB 231 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2005;92(2):187-95.
33. Wu M, Harvey KA, Ruzmetov N, Welch ZR, Sech L, Jackson K, Stillwell W, Zaloga GP, Siddiqui RA. Omega-3 polyunsaturated fatty acids attenuate breast

cancer growth through activation of a neutral sphingomyelinase-mediated pathway.

Int J Cancer. 2005;117(3):340-8.

34. Menendez JA, Lupu R, Colomer R. 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):263-70.

35. Barascu A, Besson P, Le Floch O, Bougnoux P, Jourdan ML. CDK1-cyclin B1 mediates the inhibition of proliferation induced by omega-3 fatty acids in MDA-MB 231 breast cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006;38(2):196-208.

36. Schley PD, Brindley DN, Field CJ. (n-3) PUFA alter raft lipid composition and decrease epidermal growth factor receptor levels in lipid rafts of human breast cancer cells. *J Nutr*. 2007;137(3):548-53.

37. Horia E, Watkins BA. Complementary actions of docosahexaenoic acid and genistein on COX-2, PGE2 and invasiveness in MDA-MB 231 breast cancer cells. *Carcinogenesis*. 2007;28(4):809-15.

38. Hammamieh R, Chakraborty N, Miller SA, Waddy E, Barmada M, Das R, Peel SA, Day AA, Jett M. Differential effects of omega-3 and omega-6 fatty acids on gene expression in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2007;101(1):7-16.

39. Sun H, Berquin IM, Owens RT, O'Flaherty JT, Edwards IJ. Peroxisome proliferator-activated receptor γ -mediated up-regulation of syndecan-1 by n-3 fatty acids promotes apoptosis of human breast cancer cells. *Cancer Res*. 2008;68(8):2912-9.

40. Altenburg JD and Siddiqui RA. Omega-3 polyunsaturated fatty acids down-modulate CXCR4 expression and function in MDA-MB 231 breast cancer cells. *Mol Cancer Res.* 2009;7(7):1013-20.
 41. Rogers KR, Kikawa KD, Mouradian M, Hernandez K, M.McKinnon, Ahwah SM, Pardini RS. Docosahexaenoic acid alters epidermal growth factor receptor-related signaling by disrupting its lipid raft association. *Carcinogenesis.* 2010;31(9):1523-30.
 42. Déliseo D, Mazi L, Merendino N, Velotti F. Docosahexaenoic acid inhibits invasion of human RT112 urinary bladder and PT45 pancreatic carcinoma cells via down-modulation of granzyme B expression. *J Nutr Biochem.* 2012;23(5):452-7.
 43. Corsetto PA, Cremona A, Montorfano G, Jovenitti IE, Orsini F, Arosio P, Rizzo AM. Chemical-physical changes in cell membrane microdomains of breast cancer cells after omega-3 PUFA incorporation. *Cell Biochem Biophys.* 2012;64(1):45-59.
 44. Harris RA, Eichholtz TJ, Hiles ID, Page MJ, O'Hare MJ. New model of ErbB-2 over-expression in human mammary luminal epithelial cells. *Int J Cancer.* 1999;80(3):477-84.
 45. Siddiqui RA, Jensi LJ, Neff K, Harvey K, Kovacs RJ, Stillwell W. Docosahexaenoic acid induces apoptosis in Jurkat cells by a protein phosphatase-mediated process. *Biochim Biophys Acta.* 2001;1499(3):265-75.
 46. Cury-Boaventura FM, Cristine Kanunfre C, Gorjão R, Martins de Lima T, Curi R. Mechanisms involved in Jurkat cell induced by oleic and linolenic acids. *Clin Nutr.* 2006;25(6):1004-14.
-

47. Folch J, Lees M, Sloane GHS. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J Biol Chem.* 1957;226(1):497-509.
 48. Kourtidis A, Sirinivasaiah R, Carkner RD, Brosnan MJ, Conklin DS. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ protects ERBB2-positive breast cancer cells from palmitate toxicity. *Breast Cancer Res.* 2009;11(2):R16.
 49. Ayllon V, Fleischer A, Cayla X, Garcia A, Rebollo A. Segregation of bad from lipid rafts is implicated in the induction of apoptosis. *J Immunol.* 2002;168(7):3387-93.
 50. Márquez DC, Chen HW, Curran EM, Welshons WV, Pietras RJ. Estrogen receptors in membrane lipid rafts and signal transduction in breast cancer. *Mol Cell Endocrinol.* 2006;246(1-2):91-100.
 51. Mocanu MM, Fazekas Z, Petrás M, Nagy P, Sebestyén Z, Isola J, Timár J, Park JW, Vereb G, Szöllosi J. Associations of ErbB2, beta1-integrin and lipid rafts on Herceptin (trastuzumab) resistant and sensitive tumor cell lines. *Cancer Lett.* 2005;227(2):201-12.
 52. Jin Q, Yuan LX, Delphine B, Baek JM, Wang YN, Gomez-Cabello D, Hawke DH, Yeung SC, Lee MH, Hortobagyi GN, Hung MC, Esteva FJ. Fatty acid synthase phosphorylation: a novel therapeutic target in HER-2-overexpressing breast cancer cells. *Breast Cancer Res.* 2010;12(6):R96.
 53. Rysman E, Brusselmans K, Scheys K, Timmermans L, Derua R, Munck S, Veldhoven PPV, Waltregny D, Daniels VW, Machiels J, Vanderhoydonc F, Smans K, Waelkens E, Verhoeven G, Swinnen J. De novo lipogenesis protects cancer cells from free radicals and chemotherapeutics by promoting membrane lipid saturation. *Cancer Res.* 2010;70(20):8117-26.
-

54. Hilvo M, Denkert C, Lehtinen L, Muller B, Brockmoller S, Seppanen-Laakso T, Budczies J, Bucher E, Yetukuri L, Castillo S, Berg E, Nygren H, Sysi-Aho M, Griffin JL, Fiehn O, Loibl S, Richter-Ehrenstein C, Radke C, Hyotylainen T, Kallioniemi O, Iljin K, Oresic M. Novel theranostic opportunities offered by characterization of altered membrane lipid metabolism in breast cancer progression. *Cancer Res.* 2011;71(9):3236-45.
 55. Vazquez-Martin A, Ortega-Delgado FJ, Fernandez-Real JM, Menendez JA. The tyrosine kinase receptor HER-2 (erbB-2): from oncogenesis to adipogenesis. *J Cell Biochem.* 2008;105(5):1147-52.
 56. Oster RT, Tishinsky JM, Yuan Z, Robinson LE. Docosahexaenoic acid increases cellular adiponectin mRNA and secreted adiponectin protein, as well as PPAR γ mRNA, in 3T3-L1 adipocytes. *Appl Physiol Nutr Metabol.* 2010;35(6):783-9.
 57. Motoyama K, Kameyama K, Onodera R, Araki N, Hirayama F, Uekama K, Arima H. Involvement of PI3K-Akt-Bad pathway in apoptosis induced by 2,6-di-O-methyl-beta-cyclodextrin, not 2,6-di-O-methyl-alpha-cyclodextrin, through cholesterol depletion from lipid rafts on plasma membranes in cells. *Eur J Pharm Sci.* 2009;38(3):249-61.
 58. Ewaschuk JB, Newell M, Field CJ. Docosahexaenoic acid improves chemotherapy efficacy by inducing CD95 translocation to lipid rafts in ER(-) breast cancer cells. *Lipids.* 2012;47(11):1019-30.
 59. Lodato RF, Maguire HC Jr, Greene MI, Weiner DB, LiVolsi VA. Immunohistochemical evaluation of c-erbB-2 oncogene expression in ductal
-

carcinoma in situ and atypical ductal hyperplasia of the breast. *Mod Pathol*. 1990;3(4):449-54.

60. Dawkins HJ, Robbins PD, Smith KL, Sarna M, Harvey JM, Sterrett GF, Papadimitriou JM. What's new in breast cancer? Molecular perspectives of cancer development and the role of the oncogene c-erbB-2 in prognosis and disease. *Pathol Res Pract*. 1993;189(10):1233-52.

61. Han K, Nofech-Mozes S, Narod S, Hanna W, Vesprini D, Saskin R, Taylor C, Kong I, Paszat L, Rakovitch E. Expression of HER2neu in ductal carcinoma in situ is associated with local recurrence. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2012;24(3):183-9.

62. Trost N, Hevir N, Rizner TL, Debeljak N. Correlation between erythropoietin receptor(s) and estrogen and progesterone receptor expression. In different breast cancer cell lines. *Int J Mol Med*. 2013 Jan8. doi:10.3892/ijmm.2013.1231. [Epub ahead of print].

63. Yamaguchi H, Takeo Y, Yoshida S, Kouchi Z, Nakamura Y, Fukami K. Lipid rafts and caveolin-1 are required for invadopodia formation and extracellular matrix degradation by human breast cancer cells. *Cancer Res*. 2009;69(22):8594-602.

64. Mader CC, Oser M, Magalhaes MA, Bravo-Cordero JJ, Condeelis J, Koleske AJ, Gil-Henn H. An EGFR-Src-Arg-cortactin pathway mediates functional maturation of invadopodia and breast cancer cell invasion. *Cancer Res*. 2011;71(5):1730-41.

65. Samataro D, Pisanti S, Santoro A, Gazzero P, Malfitano AM, Laezza C, Bifulco M. The cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant (SR141716)

inhibits human breast cancer cell proliferation through a lipid raft-mediated mechanism. *Mol Pharmacol*. 2006;70(4):1298-1306.

66. Molinedo F, de la Iglesia-Vicente J, Gajate C, Estella-Hermoso de Mendoza A, Villa-Pulgarin JA, Campanero MA, Blanco-Prieto MJ. Lipid raft-targeted therapy in multiple myeloma. *Oncogene*. 2010;29(26):3748-57.

67. Lacroix M, Leclercq G. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumors: an update. *Breast Cancer Res Treat*. 2004;83(3):249-89.

► APÊNDICE

APÊNDICE

Lipid raft disruption by docosahexaenoic acid induces apoptosis in transformed human mammary luminal epithelial cells harboring HER-2 overexpression^{☆,☆☆,★,★★}

Graziela Rosa Ravacci^{a,b,*}, Maria Mitzi Brentani^a, Tharcisio Tortelli Jr.^a, Raquel Suzana M.M. Torrinhas^b, Tatiana Saldanha^c, Elizabeth Aparecida F.S. Torres^d, Dan Linetzky Waitzberg^b

^aDepartment of Oncology Medical School, University of São Paulo, 01246-903 São Paulo, Brazil

^bDepartment of Gastroenterology Medical School, University of São Paulo-LIM 35, 01246-903 São Paulo, Brazil

^cDepartment of Food Technology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, 23890-000 Rio de Janeiro, Brazil

^dPublic Health Faculty, University of São Paulo-LIM 35, 01246-903 São Paulo, Brazil

Received 28 July 2011; received in revised form 13 January 2012; accepted 6 February 2012

Abstract

In HER-2-overexpressing breast cells, HER-2 receptors exist on the cell surface as monomers, homodimers and heterodimers. For signal activation and transduction to occur, HER-2 must be localized to lipid rafts. Therefore, we hypothesized that the amount of lipid rafts on the cell membrane would be a factor in HER-2 signaling. To test this, we used HB4a (an untransformed human mammary epithelial cell line) and HB4aC5.2 cells. HB4aC5.2 cells are HB4a derivatives that have been transfected with five copies of pJ5E.c-ErbB-2 and express approximately 900 times more HER-2 than HB4a cells. In these cells, HER-2 overexpression was accompanied by increased lipid rafts in cell membranes, a hyperactivation of downstream Akt and ERK1/2 proteins, and an increased rate of cell growth compared to HB4a. In addition, HER-2 overexpression was associated with an increased activation of FASN, a key enzyme involved in cellular lipogenesis. Its final product, palmitate, is frequently used to synthesize lipid rafts. We further hypothesized that treatment with docosahexaenoic acid (DHA), an omega-3 fatty acid, would disrupt the lipid rafts and lead to a growth arrest. In HB4aC5.2 cells, but not HB4a cells, we found that DHA treatment disrupted lipid raft; inhibited HER-2 signaling by decreasing activation of Akt, ERK1/2 and FASN proteins; and induced apoptosis. Although little is known about lipid rafts, our data support the idea that disturbances in these microdomains induced by DHA may represent a useful tool for controlling the signaling initiated by HER-2 receptors and its therapeutic potential in the treatment of HER-2 positive breast cancer.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Lipid rafts; Docosahexaenoic acid; Cell signaling; Apoptosis; HER-2 overexpression

[☆] Authors' contributions: G.R.R. was responsible for the conception, design, acquisition and analysis of data, interpretation of the results, and drafting of the manuscript. M.M.B. contributed to the conception and design of the research, reviewing of the manuscript and interpretation of the results. T.T.G. was responsible for the acquisition and analysis of data and reviewing of the manuscript. R.S.T. participated in the writing of the manuscript. T.S. and E.A.F.S.T. carried out the gas chromatography analysis. D.L.W. contributed to the conception of the research and reviewing of the manuscript.

^{☆☆} Funding sources: FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa-Brasil) process no. 2009/52244-5.

[★] Grant support: We would like to thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Brazil) for the financial support for this study (process number 2009/52244-5).

^{★★} Disclosure of potential conflicts of interest: No potential conflicts of interest were disclosed.

^{*} Corresponding author. Tel.: +55 11 3061 7459; fax: +55 11 3082 6580.

E-mail addresses: grazielametanutri@gmail.com (G.R. Ravacci), mariajo@lim24.fm.usp.br (M.M. Brentani), tharjr@lim24.fm.usp.br (T. Tortelli), torrinhas@uol.com.br (R.S.M.M. Torrinhas), tatysal@hotmail.com (T. Saldanha), etorres@usp.br (E.A.F.S. Torres), waitzber@terra.com.br (D.L. Waitzberg).

1. Introduction

HER-2 receptor overexpression is one of the greatest clinically significant cellular abnormalities in breast cancer. It is described in approximately 25% of breast cancers and is associated with poor prognosis and lower survival rates compared with breast tumors with normal HER-2 levels [1–3].

The HER-2 receptor is a transmembrane glycoprotein with tyrosine kinase activity. It functions as a co-receptor and forms homodimers or heterodimers with related family members (EGFR or HER-1, and HER-3) to activate signaling pathways, such as phosphoinositide-3-kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase, and inhibition of apoptotic pathways such as Bcl-2-associated death promoter protein (BAD). Thus, HER-2 signaling is central to many processes involved in cellular proliferation and survival [4,5]. Hyperactivation of HER-2 receptor due to overexpression, amplification or mutation in activation promotes aberrant cell proliferation and tumorigenesis, turning HER-2 receptors into important therapeutic targets against breast cancer [5,6].

In HER-2-overexpressing breast cancer cells, HER-2 is present in a complex equilibrium of preassociated active or inactive homodimers, heterodimers and monomers on the cell surface [5]. Experimental evidence has shown that a key factor in HER-2 receptor activation is their location in the cell membrane [7]. For the activation and transmission of signals to occur, the HER-2 receptors must be located in lipid rafts. Lipid rafts are specific compartments of the cell membrane rich in cholesterol and saturated phospholipids that, when clustered together, function as operating platforms for signaling molecules [7,8].

It should be noted that the HER-2 receptors also activate lipogenic pathways mediated by the fatty acid synthase (FASN) protein. FASN increases the synthesis of saturated fatty acids frequently used for the lipid raft formation in the cell membrane [9,10]. This ensures the proper localization and activation of HER-2 homo- or heterodimeric receptors [7,10]. Therefore, in breast cancer cells, it is possible that the overexpression of HER-2 receptors may be accompanied by an increase in lipid raft microdomains in the cell membrane, thereby establishing a vicious cycle of aberrant prosurvival cell signaling [10]. Moreover, its disruption could inhibit the intracellular signaling pathway HER-2-mediated or inducing apoptotic signals [11,12].

Omega-3 fatty acids, such as docosahexaenoic acid (DHA), are derived from fish oil and are known for their benefits in various diseases, including breast cancer [13–31]. With 22 carbons and 6 *cis* double bonds, DHA is of particular clinical interest because it represents the most unsaturated fatty acid in the human body [31]. DHA incorporates into the *sn*-2 position of phospholipids in the cell membrane, thereby influencing the membrane's structure and function [31]. Experimental evidence suggests that DHA may similarly modify the structure and function of lipid rafts, thereby influencing the activation of cellular signaling pathways [16,18]. In previous studies using the triple-negative breast cancer cell line MDA-MB-231, DHA inhibited proliferation by changing the composition of lipid rafts and by subsequently affecting the localization and activation of EGFR and its downstream signaling [25,31]. CXCR4 expression and signaling were similarly affected. These data suggest that DHA may specifically influence signaling events prevalent in cancer [29].

This study tested the hypothesis that the oncogenic transformation of breast cells by HER-2 overexpression is accompanied by an increase of lipid rafts in cell membranes and that treatment with DHA would (a) disrupt these microdomains, (b) inhibit signaling pathways initiated by HER-2 and (c) induce cell apoptosis. Our data supported this hypothesis and suggested that DHA may be a useful therapeutic agent for controlling HER-2-mediated oncogenesis.

2. Methods and materials

2.1. Cell culture

Parental HB4a (nontransformed cells) and HB4aC5.2 (a HER-2-overexpressing HB4a variant) cells were cultured in RPMI-1640 with 10% fetal bovine serum (FBS) (GIBCO, Invitrogen, Brazil) plus ampicillin, hydrocortisone and insulin (Sigma-Aldrich, Brazil) at 37°C in 10% CO₂ humidifier incubator. The HB4a was derived from normal breast luminal cells, and HB4aC5.2 was engineered from HB4a by stable co-transfection by pJ5E.c-erbB-2 (full-length normal human HER-2 cDNA, derived from the established breast cancer line BT474) under the control of the MMTV-LTR promoter and SV40 polyadenylation signals. HB4aC5.2 cells have five copies of pJ5E.c-erbB-2 inserted into their genome and express approximately 10⁶ receptors per cell [32,33]. The cells were tested periodically for mycoplasma (data not shown) and authenticated by real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) to evaluate HER-2 overexpression. Both the HB4a and HB4aC5.2 cell lines were a generous gift from Michael J. O'Hare (Ludwig Institute for Cancer Research and University College London Breast Cancer Laboratory, Department of Surgery, London, UK).

2.2. RT-PCR

Total RNA was extracted from cells using TRIzol (Invitrogen, Brazil). cDNA was synthesized by reverse transcription of 2 µg of RNA in a 20 µl Superscript III Reverse

Transcriptase Kit (Invitrogen, Brazil) at 55°C for 45 min. PCRs were performed using Platinum Taq DNA Polymerase Kit, with specific primers for HER-2:

Sense: 5'-GGGCTGGCCGATGTATTGAT-3';
Antisense: 5'-ATAGAGGTGTGCAAGCGCTGGGC-3'

As an internal control, β -actin was used. After the initial denaturation step (95°C for 5 min), PCRs consisted of 40 cycles of 95°C for 1 min, 60°C for 1 min and 72°C for 1 min, followed by a final elongation step at 72°C for 7 min. The PCR products were separated on 2% agarose–ethidium bromide gels.

For quantitative determination of PCR product, a real-time RT-PCR was performed using SYBR Green. The relative expression was determined by the 2^{−ΔΔCt} formula.

2.3. Treatment with DHA

DHA (C22:6n-3, Sigma-Aldrich, Brazil) was first dissolved in ethanol before emulsification in medium containing serum protein. The final concentration of ethanol in the culture medium did not exceed 0.05% and is not toxic to cells [34,35]. HB4a and HB4aC5.2 cell lines were treated with different concentrations of DHA (25, 50, 75, and 100 µM) in standard medium, or standard medium plus ethanol as a control, for 24, 48 or 72 h.

Briefly, cells were seeded in flasks with medium containing 10% FBS and allowed to adhere for 24 h. Then, the culture medium was replaced with fresh medium containing 10% FBS plus DHA, and the cells were further incubated for 24, 48 or 72 h without changing the medium. The cells were then harvested using trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich, Brazil), and viable cells were counted using trypan blue exclusion (Sigma-Aldrich, Brazil) and a hemocytometer. Only samples with more than 95% viable cells were used.

2.4. Akt, ERK 1/2 and FASN protein analysis by Western blotting

HB4a and HB4aC5.2 (10⁵ cells/25-cm² flask) were treated with 5 ml of medium containing 10% FBS plus DHA for 72 h. After treatment, cells were collected and proteins were extracted by homogenizing the pellet in a lysis buffer containing 50 mM Tris HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) and protease inhibitors. The protein concentration was determined using the Bradford assay. The cell lysate (40 µg) was boiled for 5 min in Laemmli buffer, and the proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (10% acrylamide gels) and transferred to nitrocellulose membranes. To separate the FAS protein, a 6% acrylamide gel was used. The membranes were blocked for 1 h in Tris-buffered saline containing 0.05% Tween-20 and 5% skim milk. The membrane was incubated with an antibody (Cell Signaling Technology, 1:1000) against human anti-phospho Akt mAb, anti-Akt, anti-phospho ERK1/2 mAb, anti-ERK 1/2 and anti-FAS mAb for 16 h at 4°C, followed by anti-rabbit IgG (1:5000). The reaction was detected with ECL (GE). For bands obtained by autoradiography, quantitative densitometric analysis was performed with Scion Image software.

2.5. Lipid rafts and cholesterol visualization by confocal microscope imaging

Briefly, 1×10⁴ cells grew in a 24-well plate and were treated with the experimental fatty acids for 72 h. After the indicated period of time, the medium was replaced, and cells were stained according to Vybrant Lipid Raft Labeling Kits (Molecular Probe, Invitrogen, Brazil) with cholera toxin B subunit-Alexa 594 for GM1 staining and filipin (0.05 mg/ml; Sigma-Aldrich, Brazil) for plasma membrane cholesterol evaluation. Cells were visualized using confocal imaging with a ZEISS LSM 510 Meta/UV.

2.6. DHA cell membrane incorporation by gas chromatography

HB4a and HB4aC5.2 (10⁷ cells/75 cm² flask) were treated with 20 ml of medium containing 10% FBS plus DHA for 72 h. After treatment, the cell membrane was fractionated by freezing the cells in nitrogen, thawing them several times and centrifuging for 10 min at 4°C. The samples were then ultracentrifuged at 4°C for 60 min. Lipids from the cell membranes were extracted using a modified Folch procedure [36]. Fatty acids methyl esters were isolated from cell membrane total phospholipids and separated by gas chromatography (SHIMADZU, CG 2010) on a SUPELCO SP 2560 capillary column. The analyses were performed at the Bromatology Laboratory, School of Public Health, University of São Paulo.

2.7. Growth experiments

To compare the growth between HB4a and HB4aC5.2 cell lines, 10⁵ cells were plated in triplicate and were allowed to attach to a six-well plate overnight in culture medium. The following day, cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and then refed with culture medium for an additional 5 days, at which point the cells were harvested and counted using a hemocytometer.

Fig. 1. Relative expression of HER-2 mRNA oncogene in HB4a and HB4aC5.2 cells. For analysis, cells were maintained in 10% FBS culture medium, and the β -actin gene was used as a control.

2.8. Determination of early apoptosis by annexin V-FITC staining

In order to assess apoptosis, HB4a and HB4aC5.2 (10^5 cells/25-cm² flask) were treated with 5 ml of medium containing 10% FBS plus DHA for 24, 48 or 72 h. After treatment, cells were incubated with 1:500 diluted annexin V-FITC (Molecular and Cellular Biology Laboratory, Immunology Department at University of São Paulo, Brazil) plus buffer (10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂ and 1mM CaCl₂) for 20 min at room temperature. Next, 100 μ g/ml of propidium iodide was added to differentiate membrane-damaged cells from normal cells, followed by FACS analysis using Cell Quest software. This was established methodology for the Molecular and Cellular Biology Laboratory, University of São Paulo.

2.9. Flow cytometry analysis of the cell death by using propidium iodide (PI) staining

In order to assess cell death, HB4a and HB4aC5.2 (10^5 cells/25-cm² flask) were treated with 5 ml of medium containing 10% FBS plus different concentrations of DHA for 24, 48 or 72 h. After fatty acid treatments, HB4a and HB4aC5.2 cell lines were fixed in 70% ethanol at -20°C and stained for 30 min at room temperature with 20 μ g/ml PI

(Sigma-Aldrich, Brazil), Triton-X (0.1% v/v) and 200 μ g/ml DNase-free RNase, diluted in PBS. Cells from each sample were analyzed for DNA content using a Becton Dickinson FACS Caliber instrument. The percentage of cells in sub-G1, G0/G1 and S/G2/M phases was determined using Cell Quest software. Cell death was measured as the percentage of cells in the sub-G1 region of the fluorescence scale having a hypodiploid DNA content.

2.10. BAD immunofluorescence and confocal imaging

For the immunofluorescence assay, HB4a and HB4aC5.2 (10^4 cells) were grown in a 24-well plate containing the experimental fatty acids for 72 h. Briefly, after the treatments, both cell lines were incubated with MitoTracker Red CMXRos (1:2000, Invitrogen, Brazil) for 45 min to label the mitochondria and then fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min. Cells were blocked with 5% PBS/bovine serum albumin (BSA) and 0.2% Triton X-100 in PBS for 1 h and then incubated overnight at 4°C with anti-BAD pAb (1:100, Calbiochem, Brazil) in 5% PBS/BSA. Subsequently, the cell lines were incubated with anti-rabbit FITC (1:1000, Sigma, Brazil) for 1 h at room temperature and incubated with DAPI (1:500, Invitrogen, Brazil), to label nuclei, for 15 min in a dark space. Coverslips were mounted with Etellan (MERK CHEMICALS, Brazil) and visualized using confocal imaging with a ZEISS LSM 510 Meta/UV microscope.

2.11. Statistical analysis

Data presented were the mean $\pm$ S.E. of three independent experiments performed for each assessed variable. Significance differences between fatty acid treatments were assessed using the one-way analysis of a variance test followed by a Bonferroni posttest.

3. Results

3.1. In HB4aC5.2 cells, HER-2 receptor overexpression is associated with changes in the lipid profile of the cell membrane in favor of lipid rafts

We first tested the hypothesis that HER-2 overexpression requires the presence of large amounts of lipid rafts in cell membranes using the HB4aC5.2 immortalized cell line as a model. HB4aC5.2 cells are a variant of HB4a and were specifically engineered to overexpress HER-2. RT-PCR analysis showed that HB4aC5.2 cells expressed 900 times more HER-2 receptors than

Fig. 2. Visualization of lipid rafts and cholesterol in HB4a and HB4aC5.2 cells. Micrographs (A and B) show the lipid rafts (red outline), cholesterol (blue contour) and the overlapping of images (merge) of the studied cells. The oncogenic transformation of HB4aC5.2 cells by HER-2 overexpression promoted an increase in cholesterol and lipid rafts.

HB4a (Fig. 1). Both cell lines were labeled with cholera toxin and filipin in order to visualize lipid rafts and cholesterol, and were imaged using confocal microscopy (Fig. 2). Also, the fatty acid profile from cell membrane phospholipids was analyzed by gas chromatography (Fig. 3).

The results demonstrated that HB4aC5.2 cell transformation by HER-2 overexpression caused a significant increase in lipid rafts as well as its main components, cholesterol (Fig. 2B) and saturated fatty acid, such as palmitic acid, at the expense of a decrease in polyunsaturated fatty acids, such as DHA, in the cell membrane (Fig. 3B). It should be noted that while the lipid raft structure is maintained by covalent bonds between cholesterol and saturated acyl chain phospholipids, the bond between cholesterol and polyunsaturated acyl chains is not strong enough to maintain lipid rafts [8,16,37].

Together, the results indicate that oncogenic transformation by HER-2 receptors on the cell membrane required modifications for saturation and formation of lipid rafts.

3.2. Lipogenic pathway activation is accompanied by an increased saturation of phospholipids and the formation of lipid rafts in HB4aC5.2 cell membranes

FASN is the main enzyme involved in cellular lipogenesis. The final product of FASN activation is palmitic acid, which can be used in the phospholipid synthesis for the cell membrane and lipid rafts [10,38,39]. To analyze whether increased FASN expression could be accountable for the increased formation of lipid rafts, HB4a and HB4aC5.2 cells were subjected to Western blotting analysis (Fig. 4A).

Fig. 3. Relative percentage of fatty acids in the HB4a and HB4aC5.2 cell membranes. Palmitic acid and DHA are highlighted. The HB4a and HB4aC5.2 cell membranes were isolated, and the amount of fatty acids was analyzed by gas chromatography. Values were represented as a percentage and standard deviation of each fatty acid relative to the total amount of fatty acids. * $P < .001$ was statistically different from HB4a cells. The transformation of HB4a cells into HB4aC5.2 by HER-2 overexpression required a reversal of the percentages of palmitic acid and DHA.

Fig. 4. Effect of HER-2 overexpression on downstream protein activation. (A) The immunoprecipitated proteins were subjected to Western blotting for Akt, ERK1/2, FASN and β -actin. HER-2 overexpression promoted increased activation of proteins associated with cell survival, proliferation and saturated fatty acids synthesis compared to HB4a. (a) Normal HB4a cells; (b) HER-2-overexpressing cells (HB4aC5.2). CTL: cells grown in standard culture medium plus ethanol. FBS (positive control): cells cultured in non-FBS culture medium for 24 h after stimulation in 20% FBS medium for 4 h. In HB4a normal cells, the stimulation with 20% FBS was used to show that HER-2 downstream proteins are activated only when exposed to additional mitogenic stimuli. In contrast, in HB4aC5.2 cells, the HER-2 overexpression is able to promote constant activation of its downstream protein in the same way that additional mitogenic stimulation. However, DHA effects should be compared to controls. (B) HER-2 receptor overexpression in HB4aC5.2 cells growth. The graph compares the growth of HB4a and HB4aC5.2 cultured in a standard medium without additional mitogen stimulation for 5 days. Results are shown with error bars and standard deviation. * $P<.001$.

The expression of FASN was substantially higher in HB4aC5.2 cells [Fig. 4A (b)], suggesting that a lipogenic phenotype is associated with the formation of lipid rafts and oncogenic transformation induced by HER-2 receptors overexpression.

3.3. The alteration of the cell membrane lipid composition, in favor of lipid raft formation, is accompanied by increased HER-2 signaling

The lipid composition of cell membranes has an effect on the mobility and activation of membrane-bound components [40]. To examine if an increase in microdomain rafts influenced HER-2 signaling, HB4a and HB4aC5.2 cells were subjected to Western blotting analysis to evaluate the downstream activation of proteins involved in cell survival and proliferation (Fig. 4A). The HB4aC5.2 cells showed increased activation of Akt and ERK1/2 proteins [Fig. 4A (b)]. Also, these cells had an increased rate of cell growth, independent of additional mitogen stimulation, as compared to the normal cell HB4a (Fig. 4B). Altogether, these data confirm that the HB4aC5.2 cells have overactive downstream HER-2 signaling.

3.4. Treatment with DHA is accompanied by changes of the lipogenic phenotype in favor of polyunsaturation and lipid raft disruption

Experimental evidence has shown that replacing saturated phospholipids with polyunsaturated phospholipids in the cell membrane facilitates microdomain raft disruption [16,31,37,40]. The HB4a and HB4aC5.2 cell lines were treated with ethanol, as a control, or 25, 50, 75 or 100 μ M of DHA for 24, 48 or 72 h. The effect of DHA was time and dose dependent, with statistical significance for HB4a after 72 h of culture with 100 μ M of DHA.

The fatty acid profile was analyzed by gas chromatography (Fig. 5), and the structures of lipid rafts and cholesterol were analyzed using confocal microscopy (Fig. 6).

The chromatograms illustrated that treatment of HB4aC5.2 cells with DHA promoted an alteration of the fatty acid profile compared to DHA-nontreated HB4aC5.2 cells (Fig. 5B–C). The increased saturation of phospholipids in cell membranes required for oncogenic transformation in HB4aC5.2 cells (Fig. 3B and 5C–D) was instead replaced by

an increase in phospholipids with polyunsaturated fatty acids, such as DHA. The percentages of polyunsaturated fatty acids in DHA-treated HB4aC5.2 cells were similar to those that were observed in normal HB4a cells (Fig. 5A–B). It should be noted that both cell lines achieved similar levels of DHA and palmitic acid (Fig. 5A–B), but the confocal micrographs showed that treatment with DHA disrupted lipid rafts in HB4aC5.2 cells, but not in HB4a cells (Fig. 6).

Subsequently, Western blotting analysis showed that treatment with DHA inhibited FASN expression in HB4aC5.2 cells (Fig. 7B), further supporting this enzyme's involvement in reducing the saturation of the cell membrane and disrupting the formation of lipid rafts.

3.5. Disruption of lipid rafts by DHA is accompanied by the inhibition of signaling initiated by HER-2 receptors in HB4aC5.2 cells

To assess if the disruption of lipid rafts could inhibit signaling initiated by HER-2 receptors, the survival and proliferation proteins in DHA-treated HB4a and HB4aC5.2 cells were analyzed by Western blotting (Fig. 7). In the DHA-treated HB4a parental cells, the raft microdomains were maintained (Fig. 6B) and were associated with a slight increase in Akt activity and FASN (Fig. 7A). Conversely, the disruption of lipid rafts in DHA-treated HB4aC5.2 cells was accompanied by an inhibition of Akt and ERK1/2 activation (Fig. 7B), suggesting that lipid raft integrity may be important to HER-2 receptor activity.

3.6. Lipid raft disruption is accompanied by increased BAD localization to mitochondria and the induction of apoptosis in HB4aC5.2 cells

HER-2/Akt pathway activation suppresses apoptosis through direct inhibition of the BAD protein [41]. In proliferating cells, BAD is a cytoplasmic proapoptotic protein that acts as a death sensor in response to Akt inhibition or damage to the membrane. BAD signals the induction of apoptosis by translocating to the mitochondria [12,32,33,41]. In this study, DHA treatment was associated with both Akt inhibition and membrane damage in HB4aC5.2 cells (Figs. 6B and 7B). Both of these alterations signaled

Fig. 5. Relative percentage of fatty acids on HB4a and HB4aC5.2 cell membranes treated with DHA. (A) HB4a cells treated with 100 μ M of DHA for 72 h. (B) HB4aC5.2 cells treated with 100 μ M of DHA for 72 h. Palmitic acid and DHA are highlighted. After treatment, the cell membranes from HB4a and HB4aC5.2 were isolated, and the amount of fatty acids was analyzed by gas chromatography. Values are represented as percentages and standard deviation of each fatty acid relative to the total amount of fatty acids. In the HB4aC5.2 cells, DHA treatment promoted decrease of palmitic acid percentage, while DHA percentage was increased. Nonstatistical difference as compared to HB4a cell line was found. (C and D) Graphs compare the percentage of DHA and palmitic acid between HB4a and HB4aC5.2 cells treated with culture medium plus ethanol, and HB4aC5.2 cells treated with 100 μ M of DHA for 72 h.

Fig. 6. Visualization of lipid rafts and cholesterol in HB4aC5.2 and HB4a cells treated with DHA. Micrographs (A and B) show the lipid rafts (red outline), cholesterol (blue contour) and the overlapping of images (merge) of the studied cells. In cells with HER-2 overexpression, 100 μ M of DHA for 72-h treatment disrupted the lipid rafts, while the normal HB4a cell maintained the structure of these microdomains.

the translocation of BAD to the mitochondria (Fig. 8). Further analysis by flow cytometry showed that BAD expression in mitochondria was increased in DHA-treated HB4aC5.2 but not HB4a cells, further potentiating the induction of death and apoptosis (Figs. 8 and 9). It is possible that, in HB4a cells, Akt activation and the increase in FASN induced by DHA may both favor the maintenance of lipid rafts and contribute to the low percentage of apoptosis observed.

Together, these data show that the oncogenic transformation of HB4aC5.2 cells by HER-2 overexpression constitutively activated survival and proliferation pathways and changed the cell membrane

lipid profile to increase the formation of lipid rafts, mediated by FASN. Treatment with DHA changed the cells' lipogenic phenotype, disrupted the lipid rafts, inhibited HER-2 signaling and induced cell apoptosis.

4. Discussion

Several independent reports have provided consistent data regarding the capacity of DHA to inhibit cancer cell growth [14,15,17,19–24,26,28,30,34]. Although several potential mechanisms have been described, it is generally accepted that DHA can disrupt survival and proliferation pathways by altering cell membrane microdomains [25,29,31]. Given the high percentage of breast cancers with dysregulated HER-2 and its potential dependence on lipid rafts for signaling, DHA supplementation could potentially interfere with downstream signaling regardless of the HER-2 mutational status or the overexpression of other HER-2 family members associated with oncogenic transformation [4,7,40,42,43].

In the present study, we sought to investigate the possible effect of DHA on membrane lipid rafts, which are essential to HER-2-mediated transformation. For a model, we chose a transformed, immortalized cell line with a strictly luminal phenotype that has been specifically engineered to overexpress HER-2 (HB4aC5.2) but is identical to its parental strain (HB4a) in all other aspects. This permits a cleaner analysis of the specific effects of enhanced HER-2 levels on luminal epithelial cell function and phenotype, unlike most tumor cell lines already established and described in *in vitro* studies, which show multiple genetic aberrations other than overexpression of HER-2 receptors [32,33].

We hypothesized that HER-2 overexpression would be associated with the increased formation of lipid rafts and that the disruption of membrane microdomains by DHA could inhibit HER-2 activity. Our data demonstrated that HB4aC5.2 cells did, in fact, have more lipid rafts and structural components, e.g., cholesterol and saturated fatty acid (such as palmitic acid), in their cell

Fig. 7. The effect of DHA treatment on proteins activated by HER-2 receptors. The immunoprecipitated proteins were subjected to Western blotting for Akt, ERK1/2, FASN and β -actin. In HER-2-overexpressing cells, DHA treatment inhibited activation of proteins associated with cell survival, proliferation and synthesis of saturated fatty acids as compared with HB4a. (A) Normal HB4a cells; (B) HER-2-overexpressing cells (HB4aC5.2). CTL: cells grown in standard culture medium plus ethanol. FBS (positive control): cells cultured in non-FBS culture medium for 24 h after stimulation in 20% FBS medium for 4 h. DHA: cells treated with 100 μ M DHA for 72 h.

Fig. 8. Visualization of BAD protein in HB4a and HB4aC5.2 cells. Cells were treated with standard culture medium plus ethanol (control) and 100 μ M DHA for 72 h (DHA). After treatment, cells were incubated with MitoTracker RedCMXRos to visualize mitochondria (red outline), anti-pAB BAD to mark the BAD (in green) and DAPI to visualize the nucleus (blue outline). In HER-2-overexpressing cells (HB4aC5.2), the increase of orange color intensity (white arrows) indicates co-localization of BAD (green outline) and mitochondria (red outline), suggesting that DHA treatment increased localization of BAD in mitochondria. The labeling pattern and orange color intensity were not altered in the normal HB4a cell line after DHA treatment.

membranes than HB4a cells. This finding suggests that oncogenic transformation by HER-2 potentially requires increased lipid rafts. Previous experimental evidence has shown that the formation of HER-2 homo- or heterodimers seems to occur in lipid rafts [7]. Furthermore, the proliferation and survival of HER-2 positive cells also depend on the co-localization of HER-2 with other membrane proteins, such as integrins and the extracellular factor of the estrogen receptor, in lipid rafts [42,43]. Therefore, it is possible that the increased raft microdomains in cells with HER-2 overexpression are functionally important to increasing the activation of these oncogenic receptors.

In general, the overexpression and/or activation of HER-2 receptors increases signal proliferation and activates prosurvival signaling [32,33]. Our analysis of downstream signaling showed that HB4aC5.2 cells had an increased activation of Akt and ERK1/2

proteins, which were associated with an increased rate of cell growth in the absence of mitogens, compared to the parental HB4a cells.

Activation of these proteins by HER-2 overexpression can increase the expression of FASN, whose activity is dependent on a direct interaction with the tyrosine kinase fraction of the HER-2 receptor [38]. Our analysis showed that HER-2 overexpression and constitutive Akt and ERK1/2 activation were accompanied by an increased expression of FASN in HB4aC5.2 cells. Analyses based on interfering RNA technology have shown that genes involved in increased FASN expression are necessary for the survival of HER-2-positive cells [44]. The final products of FASN activity are saturated fatty acids, such as palmitic acid, which are frequently used to generate phospholipids for the cell membrane [39]. Clinically, the increase of palmitic acid in breast cancer is associated with early stages of tumorigenesis [39].

Fig. 9. Percentage of DHA-induced cell death and apoptosis. (A) For cell death analysis, HB4a and HB4aC5.2 cells were treated with different concentrations of DHA (25, 50, 75 and 100 μ M), and standard medium (ctl) and standard medium plus ethanol (etha) as control for 72 h, labeled with PI and analyzed by flow cytometry. Cells with DNA content less than 2n (hypodiploid) were considered in cell death. Bars represent the mean and standard deviation. *** P <.001; statistically different from cnt, etha, 25 μ M, 50 μ M and 75 μ M. ** P <.001; statistically different from cnt, etha, 25, 50. (B) Graph compared cell death percentage between HB4a and HB4aC5.2 treated with 100 μ M of DHA. * P <.001; statistically different from HB4a. (C) To analyze apoptosis, HB4a and HB4aC5.2 cells were treated with different concentrations of DHA (25, 50, 75 and 100 μ M) in standard medium (CTL), or standard medium plus ethanol (ETA) as control, for 72 h, labeled with PI and annexin V-FITC, and then were analyzed by flow cytometry. The histograms represent the data obtained by flow cytometry. In upper quadrants – right: percentage of cells labeled with PI; left: percentage of cells labeled with PI and annexin V. In lower quadrants – right: percentage of cells labeled with annexin V; left: percentage of viable cells. (D) Graphs represent the percentage of cells labeled with PI and annexin V. Bars represent the mean and standard deviation. ** P <.001; statistically different from the CTL, ETHA, 25 μ M and 50 μ M. *** P <.001; statistically different from the CTL, ETHA, 25, 50 and 75 μ M. Ctl: cells treated with standard medium; etha: cells treated with standard medium plus ethanol; 25–100 μ M: cells treated with standard medium plus different doses of DHA.

These observations suggest that FASN facilitates a favorable environment for the overexpression and activation of HER-2 receptors by (a) supporting the synthesis of the fatty acids necessary for the formation of lipid rafts; (b) facilitating the localization and interaction of lipid rafts with other proteins, leading to HER-2 receptor activation; and (c) maintaining the integrity of lipid rafts for activation of HER-2 [7,10,39,42,43]. It is also believed that maintaining raft integrity leads to an inhibition of apoptotic pathways [12]. Other authors have already described an increase of FASN in HER-2-positive breast cancer, and its modulation seems a promising therapeutic target in treating HER-2-positive breast cancer [10,38,39].

Taken together, our data suggested that lipid rafts are important for the transformation of the HB4aC5.2 cell line and that DHA was effective in disrupting lipid rafts in HER-2-overexpressing cells. Possibly, the reduced percentage of palmitic acid and increased DHA in HB4aC5.2 cell membranes hindered the dimerization of HER-2 receptors in the rafts and adversely affected their downstream signaling (as evidenced by the inhibition of Akt, ERK1/2 activation and FASN proteins). Our hypothesis also considered that the disruption of lipid rafts by DHA could activate apoptotic pathways. Furthermore, the consequent inhibition of Akt activation may allow the initiation of apoptotic pathways by BAD.

Experimental evidence has shown that BAD is localized to the cytoplasm of proliferating cells and, in some cellular models, is also located within lipid rafts. It becomes localized to the mitochondria to initiate apoptosis [12]. We found that, in HB4aC5.2 cells, the DHA-dependent inhibition of Akt and the disruption of lipid rafts were accompanied by an increased localization of BAD to the mitochondria. Further analysis showed that there was a higher induction of apoptosis when BAD was localized to the mitochondria of HER-2-overexpressing cells, but not when it was located to the mitochondria in the parental HB4a cells. This led us to consider that lipid raft maintenance in HB4a cells may have contributed to the low percentage of DHA-induced apoptosis.

A potential limitation of our model system is that it is cell-type specific in that our cells were transformed specifically by the overexpression of HER-2. These results, therefore, may not apply to more complex systems. However, the modulation of lipid rafts, including the use of DHA as a disruption agent, has been described in other cell models, but with varying consequences in each. In the MDA-MB-231 triple-negative (e.g., negative for oestrogen and progesterone, and HER-2 expression) breast cancer line, treatment with DHA or methyl- β -cyclodextrin, another reagent capable of disrupting lipid rafts, decreased the invasive capacity of these cells without inducing apoptosis [29]. Recent evidence has shown that the invasion mechanism for MDA-MB-231 cells requires the presence of intact lipid rafts [45–47]. Conversely, in multiple myeloma cells, the disruption of lipid rafts by methyl- β -cyclodextrin impaired the apoptotic action of drugs [48]. Edelfosine is a drug that accumulates in lipid rafts and induces apoptosis in multiple myeloma cells by its co-location with death receptors [48].

Taken together, this study tackles an important question: Are tumor phenotype and the levels of lipid rafts associated? The HB4aC5.2 strain used in our study had a hyperproliferative and transformed phenotype due to increased HER-2 expression in the cell membrane, particularly in lipid rafts [7,10]. Prior experimental results indicated that the MDA-MB-231 cell line maintained its invasive phenotype through membrane protein interactions in lipid rafts [29,45]. In addition, multiple myeloma cells maintain their anti-apoptotic phenotype by inhibiting localization of death receptors in lipid rafts [48]. The answer to this question could champion DHA as a new therapeutic agent for the treatment of different cancers through the disruption of lipid rafts.

Although little is known about lipid rafts, this study supports the idea that disturbances in these microdomains, induced by DHA, may represent a useful tool for abrogating aberrant HER-2 signaling. It also supports the therapeutic potential of DHA supplementation in the treatment of HER-2-positive breast cancer. Nutritional intervention provides a promising approach to enhancing conventional therapeutics without negatively affecting a patient's quality of life. Further work is needed to explore the potential use of DHA supplementation in combination with other drugs, such as HER-2 inhibitors, for the treatment of breast cancer.

Acknowledgments

We are grateful to Michael J. O'Hare for the gift of the cell lines, to Dr. Angela Flávia Logullo for her helpful suggestions and to Dr. Glaucia Hajj for the technical assistance in Western blotting methodology.

References

- [1] Arribas J, Baselga J, Pedersen K, Parra-Palau JL. p95HER2 and breast cancer. *Cancer Res* 2011;71:1515–9.
- [2] Tovey SM, Brown S, Doughty JC, Mallon EA, Cooke TG, Edwards J. Poor survival outcomes in HER2-positive breast cancer patients with low-grade, node-negative tumours. *Br J Cancer* 2009;100:680–3.
- [3] Tamimi RM, Baer HJ, Marotti J, Galan M, Galaburda L, Fu Y, et al. Comparison of molecular phenotypes of ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer. *Breast Cancer Res* 2008;10:1–9.
- [4] Bollig-Fischer A, Dziubinski M, Boyer A, Haddad R, Giroux CN, Ethier SP. HER-2 signaling, acquisition of growth factor independence, and regulation of biological networks associated with cell transformation. *Cancer Res* 2010;70:7862–73.
- [5] Ghosh R, Narasanna A, Wang SE, Liu S, Chakrabarty A, Balko JM, et al. Trastuzumab has preferential activity against breast cancers driven by HER2 homodimers. *Cancer Res* 2011;71:1871–82.
- [6] Moasser MM. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene* 2007;26:6469–87.
- [7] Nagy P, Vereb G, Sebestyén Z, Horváth G, Lockett SJ, Damjanovich S, et al. Szöllosi. Lipid rafts and the local density of ErbB proteins influence the biological role of homo- and heteroassociations of ErbB2. *J Cell Sci* 2002;115:4251–62.
- [8] Simons K, Toomre D. Lipid raft and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000;1:31–9.
- [9] Menendez JA, Vellon L, Lupu R. Targeting fatty acid synthase-driven lipid rafts: a novel strategy to overcome trastuzumab resistance in breast cancer cells. *Med Hypothesis* 2005;64:997–1001.
- [10] Menendez JA, Lupu R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer* 2007;7:763–76.
- [11] Li YC, Park MJ, Ye SK, Kim CW, Kim YN. Elevated levels of cholesterol-rich lipid rafts in cancer cells are correlated with apoptosis sensitivity induced by cholesterol-depleting agents. *Am J Pathol* 2006;168:1107–18.
- [12] Ayllon V, Fleischer A, Cayla X, Garcia A, Rebollo A. Segregation of bad from lipid rafts is implicated in the induction of apoptosis. *J Immunol* 2002;168:3387–93.
- [13] Waitzberg DL, Torrinhas RS. Fish oil lipid emulsions and immune response: what clinicians need to know. *Nutr Clin Pract* 2009;24:487–99.
- [14] Manzi L, Merendino N, Velotti F, D'Eliseo D. Docosahexaenoic acid inhibits invasion of human RT112 urinary bladder, PT45 pancreatic carcinoma cells via down-modulation of granzyme B expression. *J Nutr Biochem* 2012;23:452–7.
- [15] Chamras H, Ardashian A, Heber D, Glaspy JA. Fatty acid modulation of MCF-7 human breast cancer cell proliferation, apoptosis and differentiation. *J Nutr Biochem* 2002;13:711–6.
- [16] Shaikh SR, Cherezov V, Caffrey M, Stillwell W, Wassall SR. Interaction of cholesterol with a docosahexaenoic acid-containing phosphatidylethanolamine: trigger for microdomain/raft formation? *Biochemistry* 2003;42:12028–37.
- [17] Menendez JA, Mehmi I, Atlas E, Colomer R, Lupu R. 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;24:591–608.
- [18] Well WS, Shaikh SR, Zerouga M, Siddiqui R, Wassall SR. Docosahexaenoic acid affects cell signaling by altering lipid rafts. *Reprod Nutr Dev* 2005;45:559–79.
- [19] Schley PD, Jijon HB, Robinson LE, Field CJ. Mechanisms of omega-3 fatty acid-induced growth in MDA-MB 231 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2005;92:187–95.
- [20] Wu M, Harvey KA, Ruzmetov N, Welch ZR, Sech L, Jackson K, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids attenuate breast cancer growth through activation of a neutral sphingomyelinase-mediated pathway. *Int J Cancer* 2005;117:340–8.
- [21] Menendez JA, Lupu R, Colomer R. 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;14:263–70.
- [22] Duncan RE, EL-Sohemy A, Archer MC. Regulation of HMG-CoA reductase in MCF-7 cells by genestein, EPA, and DHA, alone and in combination with mevastatin. *Cancer Lett* 2005;224:221–8.
- [23] Barascu A, Besson P, Le Floch O, Bougnoux P, Jourdan ML. CDK1-cyclin B1 mediates the inhibition of proliferation induced by omega-3 fatty acids in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2006;38:196–208.
- [24] Khan NA, Nishimura K, Aires V, Yamashita T, Oaxaca-Castilho D, Kashiwagi K, et al. Docosahexaenoic acid inhibits cancer cell growth via p27kip1, CDK2, ERK1/ERK2, and retinoblastoma phosphorylation. *J Lipid Res* 2006;47:2306–13.
- [25] Schley PD, Brindley DN, Field CJ. (n-3) PUFA alter raft lipid composition and decrease epidermal growth factor receptor levels in lipid rafts of human breast cancer cells. *J Nutr* 2007;137:548–53.
- [26] Horia E, Watkins BA. Complementary actions of docosahexaenoic acid and genistein on COX-2, PGE2 and invasiveness in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Carcinogenesis* 2007;28:809–15.
- [27] Hammamieh R, Chakraborty N, Miller SA, Waddy E, Barmada M, Das 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;101:7–16.
- [28] Sun H, Berquin IM, Owens RT, O'Flaherty JT, Edwards IJ. Peroxisome proliferator-activated receptor γ -mediated up-regulation of syndecan-1 by n-3 fatty acids promotes apoptosis of human breast cancer cells. *Cancer Res* 2008;68:2912–9.
- [29] Altenburg JD, Siddiqui RA. Omega-3 polyunsaturated fatty acids down-modulate CXCR4 expression and function in MDA-MB 231 breast cancer cells. *Mol Cancer Res* 2009;7:1013–20.
- [30] Ghosh-Choudhury T, Mandal CC, Woodruff K, St Clair P, Fernandes G, Choudhury GG, et al. Fish oil targets PTEN to regulate NF κ B for downregulation of anti-apoptotic genes in breast tumor growth. *Breast Cancer Res Treat* 2009;118:213–28.
- [31] Rogers KR, Kikawa KD, Mouradian M, Hernandez K. M. McKinnon, Ahwah SM, Pardini RS. Docosahexaenoic acid alters epidermal growth factor receptor-related signaling by disrupting its lipid rafts association. *Carcinogenesis* 2010;31:1523–30.
- [32] Harris RA, Eichholtz TJ, Hiles ID, Page MJ, O'Hare MJ. New model of ErbB-2 overexpression in human mammary luminal epithelial cells. *Int J Cancer* 1999;80:477–84.
- [33] Timms JF, White SL, O'Hare MJ, Waterfield MD. Effects of ErbB-2 overexpression on mitogenic signaling and cell cycle progression in human breast luminal epithelial cells. *Oncogene* 2002;21:6573–86.
- [34] Siddiqui RA, Jenks LJ, Neff K, Harvey K, Kovacs RJ, Stillwell W. Docosahexaenoic acid induces apoptosis in Jurkat cells by a protein phosphatase-mediated process. *Biochim Biophys Acta* 2001;1499:265–75.
- [35] Cury-Boaventura FM, Cristine Kanunfre C, Gorjão R, Martins de Lima T, Curi R. Mechanisms involved in Jurkat cell death induced by oleic and linoleic acids. *Clin Nutr* 2006;25:1004–14.
- [36] Folch J, Lees M, Sloane GHS. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 1957;226:497–509.
- [37] Wong SW, Kwon MJ, Choi AM, Kim HP, Nakahira K, Hwang DH. Fatty acids modulate Toll-like receptor 4 activation through regulation of receptor dimerization and recruitment into lipid rafts in a reactive oxygen species-dependent manner. *J Biol Chem* 2009;284:27384–92.
- [38] Jin Q, Yuan LX, Delphine B, Baek JM, Wang YN, Gomez-Cabello D, et al. Fatty acid synthase phosphorylation: a novel therapeutic target in HER2-overexpressing breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2010;12:R96.
- [39] Hilvo M, Denkert C, Lehtinen L, Muller B, Brockmoller S, Seppanen-Laakso T, et al. Novel theranostic opportunities offered by characterization of altered membrane lipid metabolism in breast cancer progression. *Cancer Res* 2011;71:3236–45.
- [40] Rysman E, Brusselmans K, Scheys K, Timmermans L, Derua R, Munck S, et al. De novo lipogenesis protects cancer cells from free radicals and chemotherapeutics by promoting membrane lipid saturation. *Cancer Res* 2010;70:8117–26.
- [41] Lee-Hoeflich ST, Crocker L, Yao E, Pham T, Munroe X, Hoeflich KP, et al. A central role for HER3 in HER2-amplified breast cancer: implications for targeted therapy. *Cancer Res* 2008;68:5878–87.
- [42] Márquez DC, Chen HW, Curran EM, Welshons WV, Pietras RJ. Estrogen receptors in membrane lipid rafts and signal transduction in breast cancer. *Mol Cell Endocrinol* 2006;246:91–100.
- [43] Mocanu MM, Fazekas Z, Petráš M, Nagy P, Sebestyén Z, Isola J, et al. Associations of ErbB2, beta1-integrin and lipid rafts on Herceptin (trastuzumab) resistant and sensitive tumor cell lines. *Cancer Lett* 2005;227:201–12.
- [44] Kourtidis A, Jain R, Carkner RD, Eilfert C, Brosnan MJ, Conklin DS. An RNA interference screen identifies metabolic regulators NR1D1 and PBP as novel survival factors for breast cancer cells with the ERBB2 signature. *Cancer Res* 2010;70:1783–92.
- [45] Yamaguchi H, Takeo Y, Yoshida S, Kouchi Z, Nakamura Y, Fukami K. Lipid rafts and caveolin-1 are required for invadopodia formation and extracellular matrix degradation by human breast cancer cells. *Cancer Res* 2009;69:8594–602.
- [46] Mader CC, Oser M, Magalhaes MA, Bravo-Cordero JJ, Condeelis J, Koleske AJ, et al. An EGFR-Src-Arg-cortactin pathway mediates functional maturation of invadopodia and breast cancer cell invasion. *Cancer Res* 2011;71:1730–41.
- [47] Sarnataro D, Pisanti S, Santoro A, Gazzero P, Malfitano AM, Laezza C, et al. The cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant (SR141716) inhibits human breast cancer cell proliferation through a lipid raft-mediated mechanism. *Mol Pharmacol* 2006;70:1298–306.
- [48] Mollinedo F, de la Iglesia-Vicente J, Gajate C, Estella-Hermoso de Mendoza A, Villa-Pulgarin JA, Campanero MA, et al. Lipid raft-targeted therapy in multiple myeloma. *Oncogene* 2010;29:3748–57.