

GUSTAVO HENRIQUE DA SILVA LOPES

INFLUÊNCIA DO ÁCIDO EICOSAPENTAENOICO E ÁCIDO
DOCOSAHEXAENOICO NA MIGRAÇÃO DE CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA
HUMANO E SUA RELAÇÃO COM A PROTEÍNA CAVEOLINA-1

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Biologia de Sistemas
do Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de Mestre em Ciências.

SÃO PAULO
2023

GUSTAVO HENRIQUE DA SILVA LOPES

INFLUÊNCIA DO ÁCIDO EICOSAPENTAENOICO E ÁCIDO
DOCOSAHEXAENOICO NA MIGRAÇÃO DE CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA
HUMANO E SUA RELAÇÃO COM A PROTEÍNA CAVEOLINA-1

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Profa Dra Alison Colquhoun

Versão Original

SÃO PAULO
2023

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Da Silva Lopes, Gustavo Henrique
Influência do ácido eicosapentaenoico e ácido
docosahexaenoico na migração de células de
glioblastoma humano e sua relação com a proteína
Caveolina-1 / Gustavo Henrique Da Silva Lopes;
orientadora Alison Colquhoun. -- São Paulo, 2023.
50 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Glioblastoma. 2. Migração celular. 3.
Caveolina-1. 4. Ômega-3. 5. Câncer. I. Colquhoun,
Alison , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Gustavo Henrique da Silva Lopes

Título: Influência do ácido eicosapentaenoico e ácido docosahexaenoico na migração de células de glioblastoma humano e sua relação com a proteína Caveolina-1

Orientador(a): Prof.(a) Dr(a) Alison Colquhoun

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado em sessão pública realizada a / /, considerou o(a) candidato(a):

Aprovado(a) Reprovado(a)

Examinado(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinado(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinado(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente: Assinatura:

Nome:

Instituição:




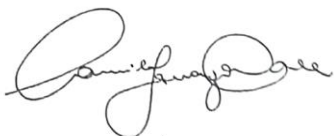
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **998/2018** referente ao projeto intitulado: ***"Efeito dos ácidos graxos ômega 3 no processo de migração de células de glioblastoma e sua relação com a proteína caveolina-1"*** sob a responsabilidade de ***Gustavo Henrique da Silva Lopes*** e orientação do(a)-Prof.(a) Dr.(a) ***Alison Colquhoun***, do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pelo **CEPSH** - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466/2012.

São Paulo, 18 de dezembro de 2018.


Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA ICB/USP


Profa. Dra. **Camila Squarzoni Dale**
Coordenadora CEPSH ICB/USP

“Se num dia de tristezas, tiveres de escolher entre o mundo e o amor... Escolhe o amor e com ele conquista o mundo!”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS ÀS AGÊNCIAS DE FOMENTO

Agradeço as seguintes agências de fomento que foram essenciais para a realização do meu trabalho.

Coordenação de aperfeiçoamento pessoal de nível superior – CAPES
Sob o número de processo 88882.377361/2019-01. - Código de Financiamento 001.

Fundação de amparo a pesquisa do estado de São Paulo – FAPESP

Todo o apoio direcionado a pesquisa e a ciência são merecedores de muito agradecimento, e sem as acima, eu jamais teria o engrandecimento pessoal e científico desenvolvidos durante o mestrado.

AGRADECIMENTOS

Esse mestrado foi uma longa e difícil caminhada. Muitas pessoas fizeram parte dela comigo, me dando apoio moral e emocional. Das vezes que eu achei que não seria mais possível continuar, essas pessoas me incentivaram demais. Vou tentar escrever um pouquinho sobre cada uma delas.

Primeiramente aos meu pais Walmir e Rosangela que eu amo tanto que nem sei dizer... sem o apoio deles, com certeza eu não teria vindo a São Paulo para fazer o estágio e conseguir assim entrar no laboratório. Obrigado pelo amor e carinho incondicionais, obrigado pelas brigas, obrigado pelos puxões de orelha, obrigado por todos o “e a tua dissertação Gustavo?”. Vocês foram e continuam sendo pilares fundamentais da minha vida. Sem vocês eu não estaria de pé onde estou agora.

À minha irmã Gabi, que se fez presente quase todos os dias desse período comigo. Durante esses anos, compartilhamos amores, dores, decepções... Nos fizemos companhia quando a saudade e a solidão eram tamanhas que não cabiam em nós. Morar longe da família é muito difícil, mas dividir esse peso com ela, deixou tudo mais leve. Eu te amo do fundo do meu coração e não consigo imaginar um mundo sem você viu minha ciumentinha? Obrigado por tudo! Nossa viagem que nos aguarde!

Ao meu irmão Guto, com quem pude contar inúmeras vezes, inclusive quando ninguém mais podia me ouvir. Obrigado por ser esse irmão paizão, que me defende, mas também puxa a orelha, e que sempre vai achar um jeito pra curtir com a minha cara e com a da Gabi. Por favor continua assim, te amo demais!

Aos meus sobrinhos Júlia e Ícaro! Apesar de nem sempre saber me expressar, eu amo vocês mais que tudo. Espero que esse trabalho um dia sirva também como inspiração pra vocês. Quando quiserem algo, nunca desistam!

À minha cunhada Carol. Meu deus como te amo, minha amiga e minha irmã de outra mãe. Foram horas de ligações pra falar sobre a vida, pra aconselhar, pra fazer companhia a distância e também pra fofocar. Mas é aquilo que a gente fala né cunhada, “quem somos nós pra julgar?”

Às minhas avós Alba, que amo demais e sempre demonstrou todo seu carinho, e Walkiria (*in memoriam*) que mantenho sempre no meu coração.

Às minhas tias Wânia e Wilma que foram importantíssimas para o meu desenvolvimento pessoal e intelectual.

Ao Maia que hoje é meu melhor amigo e ainda está ao meu lado mesmo depois de todas as provações que a vida colocou pra gente. Sei que tendo você como amigo eu tenho tudo, eu tenho cumplicidade, eu tenho um ombro pra chorar, eu tenho muito amor. Muito obrigado por tanto amigo e obrigado por nunca desistir de mim.

Era uma vez, 3 paraenses chegam em São Paulo para fazer pós-graduação. Alguns anos depois e sem saúde mental alguma, ainda estamos aqui um pelo outro. Minhas amigas Beth e Amanda como é maravilhoso ter vocês na minha vida. Vocês são minha família aqui em esse pé. Me arrependo cada segundo de todos os meus erros e todo o tempo que eu perdi sem vocês, mas hoje em dia eu só consigo ver o quanto eu admiro e amo vocês. Contem comigo para tudo e obrigado por me manterem de pé!

À minha amiga Lucas Rossetti! Amiga olha só eu consegui chegar aqui! E eu não conseguiria sem você. Obrigado por toda a paciência comigo no laboratório, por me ensinar as técnicas básicas, por me mostrar o que é ser um cientista. Obrigado por todas as ligações, pelas conversas e conselhos, por ser essa amiga que me traz conforto pra vida!

‘À minha miga Jana! Que hoje em dia além de termos sido amigas de lab, somos colegas de trabalho e amigas na vida também! A pessoa mais apaixonada pela pesquisa que eu conheço, inteligente e obstinada. Eu te admiro muito pela tua força miga, obrigado por tudo potoqueira!

À Marloquinha, que é a pessoa mais positiva que eu conheço, que sempre foi uma mãezona e deu muito abraço e carinho. Obrigado por todos os conselhos de vida!

Ao Geraldo! Gê, obrigado por ter me aceitado na sua vida como alguém além de housemate, como seu amigo. Obrigado pelas conversas e pelas fofocas, por dar uns tapas na cara quando eu faço besteira, e por tentar colocar algum juízo na minha cabeça de vez em quando. E obrigado por não me expulsar de casa.

Aos meus amigos Adri e Carla, que também vieram de terras tupiniquins e estão tentando a vida em SP. Obrigado pela amizade e pela felicidade que me dá sempre que eu vejo vocês.

Às minhas vizinhas favoritas, Guilherme, Tinto, Vagner, Victor e Luiz! Que acompanharam de pertinho a minha saga para escrever a dissertação e terminar o mestrado e por terem aturado os meus surtos. Obrigado por todos os almoços de sexta-feira, pelas fofquinhas e por todo o apoio.

Em especial ao Guilherme, que foi o primeiro amigo de verdade que eu fiz em SP. Não canso de dizer o quanto eu quero te levar pra minha vida toda. Obrigado por ter acompanhado cada passinho dos meus últimos 5 anos.

Ao Vinicius, que durante a pandemia conversava tanto comigo que eu nem me sentia mais tão sozinho. Tenho um carinho absurdo por você. Obrigado por ser essa pessoa completamente maluca e que me tira risada sempre com as coisas mais sem noção possíveis!

Aos meus colegas de trabalho da Veritas, Alessandra, Thiago, Marina, Sabrina e Yasmin! Trabalhar com vocês deixa meus dias mais leves. Obrigado pelo apoio de cada um de vocês!

Ao John John que sempre foi um amigão e me deu muitos conselhos.

Ao Jack e todos os meus amigos do Jaraguá. Houve um tempo em que eu só podia contar com vocês pra me apoiar. Por tudo isso, muito obrigado!

À minha amiga Jéssica Mello que eu sinto saudade todos os dias, mais que tudo.

À Ana Julia que me deu um suporte absurdo durante esse período todo, mesmo que a distância.

Ao Lufe, que chegou na minha vida na reta final do mestrado, mas que passou noites adentro escrevendo junto comigo e aturou meus surtos, me dando suporte emocional e muito carinho. Serei eternamente grato a você!

À minha orientadora Alison Colquhoun, que me recebeu de braços abertos no seu laboratório e teve que ter muita paciência comigo. Chefa, obrigado por todos os ensinamentos, por me ouvir e por entender tudo o que se passou comigo nesse período. Você foi essencial! Obrigado pelo "tough love"!

Agradeço também a todas as pessoas que por alguma eventualidade esqueci de mencionar, mas que foram importantes para a continuidade do meu trabalho.

Todas as pessoas que eu citei aqui, tem um espaço reservado no meu coração. Eu amo muito vocês. Obrigado por caminharem comigo.

RESUMO

Lopes, GHS. Influência do ácido eicosapentaenoico e ácido docosahexaenoico na migração de células de glioblastoma humano e sua relação com a proteína Caveolina-1. Dissertação (Mestrado em biologia celular e tecidual) – Instituto de ciências biomédicas – Universidade de São Paulo, 2023.

Introdução: O glioblastoma (GBM) é um câncer com perfil altamente agressivo e sem tratamentos eficazes até o momento, gerando um mau prognóstico para os pacientes. Tem perfil migratório rápido e metabolismo lipídico alterado. Esse alto perfil migratório faz com que as células se espalhem rapidamente pelo tecido nervoso formando novos focos tumorais. A caveolina-1 (CAV-1) é uma das proteínas conhecidas que modula a migração celular e é altamente expressa no GBM. O ácido eicosapentaenoico (EPA) e o ácido docosahexaenoico (DHA) são dois ácidos graxos ômega-3 de cadeia longa que já são conhecidos por modular a migração e invasão celular, além de participar da biogênese das gotículas lipídicas (LD). **Objetivos:** Investigar a influência de EPA e DHA na migração e acúmulo de LD em células GBM além da expressão gênica e proteica da CAV-1 nestas células após exposição a EPA e DHA. **Métodos:** Neste estudo, foram utilizadas as linhagens celulares de glioblastoma humano U87MG e T98G. Os ensaios de ferida e transwell foram realizados para avaliar a migração e transmigração das células GBM, respectivamente. As células foram tratadas com 100µM de EPA ou DHA, ou controle com albumina (BSA) por 72 horas para ensaio de ferida e 24 e 72 horas para transwell. O PCR em tempo real foi realizado para avaliar a expressão gênica de CAV-1 em células GBM sob tratamento com EPA ou DHA. O ensaio de Western Blot foi realizado para avaliar a expressão da proteína CAV-1 nas células tratadas com EPA ou DHA. Para visualização das gotículas lipídicas, as células foram coradas com oil red em 24, 48 e 72 horas após os tratamentos com EPA ou DHA. **Resultados:** Os resultados do ensaio de ferida indicaram que DHA e EPA aumentaram significativamente a migração de T98G quando comparados com o controle. Nem EPA nem DHA alteraram a transmigração em ambas as linhagens celulares e tempos de tratamento. EPA e DHA foram capazes de reduzir os níveis de mRNA de CAV-1 em ambas as linhagens celulares. O Western blot mostrou que EPA e DHA tem uma tendência maior de aumentar a expressão de CAV-1 em T98G quando comparado com U87MG. A coloração oil red mostrou acúmulo de LD nas células tratadas com EPA e DHA, enquanto o controle não apresentou formação considerável de gotículas lipídicas. **Conclusão:** Os resultados sugerem que EPA e DHA participam moderadamente na modulação da migração celular. Eles aumentam o acúmulo de LD, bem como a expressão proteica de CAV-1 e isso possivelmente aumenta o perfil migratório das células T98G. EPA e DHA também reduzem a expressão do gene CAV-1. A relação entre ácidos graxos, CAV-1 e o processo migratório ainda são pouco explorados em GBM, e indica que mais estudos devem ser feitos para elucidar essa relação.

Palavras-chave: Glioblastoma; Migração; Ômega-3; Ácidos graxos; Caveolina-1.

ABSTRACT

Lopes, GHS. Influence of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on the migration of human glioblastoma cells and their relationship with the Caveolin-1 protein. Dissertation (Master degree in cell and tissue biology) – Biomedical Science Institute – University of São Paulo, 2023.

Introduction: Glioblastoma (GBM) is a cancer with a highly aggressive profile and without effective treatments so far, generating a poor prognosis for patients. It has a fast migratory profile and altered lipid metabolism. This high migratory profile causes the cells to spread rapidly through the nervous tissue, forming new tumor foci. Caveolin-1 (CAV-1) is one of the known proteins that modulates cell migration and is highly expressed in GBM. Eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) are two long-chain omega-3 fatty acids that are already known to modulate cell migration and invasion, in addition to participating in the biogenesis of lipid droplets (LD). **Aims:** To investigate the influence of EPA and DHA on the migration and accumulation of LD in GBM cells in addition to the gene and protein expression of CAV-1 in these cells after exposure to EPA and DHA. **Methods:** In this study, human glioblastoma cell lines U87MG and T98G were used. Scratch and transwell assays were performed to assess migration and transmigration of GBM cells, respectively. Cells were treated with 100µM EPA or DHA, or albumin control (BSA) for 72 hours for wound assay and 24 and 72 hours for transwell. Real-time PCR was performed to assess CAV-1 gene expression in GBM cells under EPA or DHA treatment. The Western Blot assay was performed to evaluate the expression of the CAV-1 protein in cells treated with EPA or DHA. To visualize the lipid droplets, the cells were stained with oil red at 24, 48 and 72 hours after treatments with EPA or DHA. **Results:** The scratch assay results indicated that DHA and EPA significantly increased T98G migration when compared to control. Neither EPA nor DHA altered transmigration in both cell lines and treatment times. EPA and DHA were able to reduce CAV-1 mRNA levels in both cell lines. Western blot showed that EPA and DHA have a greater tendency to increase CAV-1 expression in T98G when compared to U87MG. Oil red staining showed accumulation of LD in cells treated with EPA and DHA, while the control showed no considerable formation of lipid droplets. **Conclusion:** The results suggest that EPA and DHA moderately participate in the modulation of cell migration. They increase LD accumulation as well as CAV-1 protein expression and this possibly increases the migratory profile of T98G cells. EPA and DHA also reduce the expression of the CAV-1 gene. The relationship between fatty acids, CAV-1 and the migratory process are still little explored in GBM, and it indicates that more studies should be done to elucidate this relationship.

Keywords: Glioblastoma; Migration; Omega 3; Fatty acids; Caveolin-1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diferenças entre a distribuição, número e tamanho de gotículas lipídicas intracelulares.

Figura 2 - Ensaio de ferida com a linhagem U87MG

Figura 3 - Ensaio de ferida com a linhagem T98G

Figura 4 - Análise de transmigração através do ensaio de transwell com 24 horas de tratamento

Figura 5 - Análise de transmigração através do ensaio de transwell com 72 horas de tratamento

Figura 6 - Análise de expressão da proteína CAV-1 por western blot

Figura 7 – Coloração de *oil red* na linhagem U87MG

Figura 8 – Coloração de *oil red* na linhagem T98G

Figura 9 – Coloração de oil red na linhagem U87Mg em contraste de fase

Figura 10 - Coloração de oil red na linhagem T98G em contraste de fase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Gliomas.....	16
1.2 Glioblastoma.....	16
1.3 Migração Celular.....	18
1.4 Cavéolas e Caveolina-1.....	19
1.5 Ômegas-3.....	22
1.6 Gotículas lipídicas.....	23
2. OBJETIVOS.....	26
2.1 Objetivos específicos.....	26
3. MÉTODOS.....	27
3.1 Cultivo celular e tratamentos.....	27
3.2 Ensaio de ferida.....	28
3.3 Ensaio de transmigração por transwell.....	28
3.4 PCR em tempo real.....	28
3.5 Western blot.....	29
3.6 Coloração oil red.....	30
3.7 Análise estatística.....	30
4. RESULTADOS.....	31
4.1 Ensaio de ferida.....	31
4.2 Ensaio de transmigração.....	32
4.3 PCR em tempo real.....	34
4.4 Western blot.....	35
4.5 Coloração de gotículas lipídicas com <i>oil red</i>	36
5. DISCUSSÃO.....	41
6. CONCLUSÃO.....	44
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

1. INTRODUÇÃO

1.1 Gliomas

Os gliomas são tumores primários do sistema nervoso central que tem como origem, as células da glia – astrócitos, oligodendrócitos, microglia e células endoteliais. As células da glia tem como função principal a nutrição, sustentação e proteção dos neurônios e, histologicamente, os gliomas tem características semelhantes às células da glia normais e, por isso, são nomeados de acordo com essas semelhanças (ARAM S MODREK; N SUMRU BAYIN; DIMITRIS G PLACANTONAKIS, 2014; LOUIS et al., 2007)

Os gliomas compreendem o grupo dos tumores neuroepiteliais e cerca de 33% dos casos são classificados como tumores primários e 79% como tumores malignos do sistema nervoso central. Os astrocitomas, tumores cerebrais e da medula espinhal que se desenvolvem a partir dos astrócitos, correspondem a 75% de todos os gliomas clinicamente detectados em pacientes adultos e 52% dos casos são referentes aos glioblastomas (OSTROM et al., 2017).

O glioblastoma é o mais frequente e maligno dos tumores e apesar dos avanços na medicina, o prognóstico ainda permanece bem limitado (Brandes *et al.*, 2008) e a abordagem tradicional para tratar esta e outras classes de gliomas continua sendo cirurgias, radioterapia e quimioterapia. A cirurgia é a prática mais comum e primária com o objetivo de retirar o máximo possível de massa tumoral e de obter amostras para diagnósticos e possíveis terapias (STUPP et al., 2014).

1.2 Glioblastoma

O glioblastoma é a mais comum e letal neoplasia do sistema nervoso central. Segundo a nova classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2021 que, pela primeira vez, usa parâmetros moleculares, histológico e genéticos para definir as classes tumorais, o glioblastoma corresponde ao glioma de grau 4, sendo o glioma difuso mais agressivo da linhagem das células astrocíticas (LOUIS et al., 2021).

Com relação a incidência, quando correlacionada à idade, aumenta após os 40 anos e apresenta um pico entre os 75 e 80 anos, além da idade, outros fatores podem contribuir para o surgimento desse tumor, como o sexo masculino é mais afetado e a cor da pele branca em relação à negra (ALIFIERIS; TRAFALIS, 2015; LU et al., 2018) e em menor proporção pode acometer casos

congênitos e crianças (PREUSSER et al., 2011). Dessa forma, a perspectiva de vida é de 15 meses após o diagnóstico e sem tratamento, a sobrevida é ainda menor, cerca de 3 meses com evolução rápida e agressiva dos sintomas (GHOSH; NANDI; BHATTACHARJEE, 2018; LI et al., 2016; THAKKAR et al., 2014).

A principal região acometida é o lobo frontal (25%), seguido do temporal (20%), parietal (13%) e occipital (3%) e a localização do tumor afeta diretamente os sintomas que acometem os pacientes. A sintomatologia pode causar reações locais ou generalizadas e são diretamente proporcionais ao estágio da doença, – dores de cabeça, perda de memória, alterações de humor e personalidade, convulsões, vômitos, anormalidades visuais (ALIFIERIS; TRAFALIS, 2015).

Estudos genéticos e moleculares mostram centenas de biomarcadores relevantes para a compreensão biológica e terapias para combater os glioblastomas, como as mutações nos genes das enzimas isocitrato desidrogenase 1 e 2, que na atual classificação a sua mutação pode ser inclusive um subtipo de glioblastoma. No entanto, apesar do avanço em terapias multimodal e da possibilidade de cirurgia, o prognóstico ainda é bastante preocupante (ALDAPE et al., 2015; FERREIRA et al., 2018) e o diagnóstico ainda é baseado em estudos de imagem e, em alguns casos, é requerido tecido tumoral por meio de biópsia ou resseção para uma análise histológica (GERALDO et al., 2019).

As principais características de um GBM incluem a proliferação celular descontrolada, infiltração difusa, propensão a necrose, resistência à apoptose e sua alta capacidade de migração (FURNARI et al., 2007; WELLER et al., 2013). A capacidade de necrose o diferencia histologicamente dos gliomas de baixo grau.. É um tumor que raramente apresenta relação com histórico familiar e com um único fator de risco conhecido até o momento – a exposição à radiação (MIRANDA et al., 2017; THAKKAR et al., 2014) .

Nesses tumores as metástases acontecem intracranialmente com disseminação, principalmente, pela substância branca. Apenas em raras exceções há metástases extraneurais (HUNG; GARZON-MUVDI; LIM, 2017). Na grande maioria dos casos os sintomas evoluem de forma acelerada em menos de 3 meses e, clinicamente, o paciente apresenta déficit neurológico frontal (40-60%), crise convulsiva e hipertensão intracraniana, além da cefaleia, o sintoma mais comum em todos os tipos de gliomas. Quando atinge o lobo

frontal pode causar mudança de personalidade, detectada em cerca em 30% dos pacientes (HUNG; GARZON-MUVDI; LIM, 2017).

Os atuais tratamentos existentes para GBM incluem a radioterapia e quimioterapia, porém com baixa eficácia devido ao alto perfil agressivo do tumor (ANTON; BAEHRING; MAYER, 2012; WEN; KESARI, 2008). A característica de migração das células tumorais faz com que a remoção cirúrgica do tumor não seja eficiente devido à rápida formação de novos focos de GBM em outras áreas do cérebro (ALPHANDÉRY, 2018).

1.3 Migração Celular

A migração celular desempenha um papel primário em uma ampla variedade de processos biológicos, desde a resposta imune inflamatória até a formação de metástases (PAUL; MISTRITIS; KONSTANTOPOULOS, 2017). O perfil migratório das células de GBM é descrito na literatura como rápido e invasivo (KIM, 2013). A migração de células tumorais pode ser induzida por fatores favoráveis a invasão como fatores quimiotáticos extracelulares presentes na matriz extracelular ou substratos e estruturas específicas do cérebro (KIM et al., 2009).

Os fatores externos, sejam eles químicos, mecânicos ou elétricos, estimulam o processo de migração celular que inicia-se com a reorganização da célula, seguida da polimerização da actina, proteína globular do citoesqueleto necessária para o movimento celular. Em seguida, outros componentes do citoesqueleto se contraem para permitir a movimentação da célula na direção em que as protusões começaram a ser emitidas (MAIR; AMES; LI, 2018).

Os lamelipódios, protusões da membrana plasmática, são formados na porção frontal da célula, possibilitando a formação de complexos adesivos que estabilizam a célula. Esses complexos possuem receptores do tipo integrina, além de filamentos de actina e proteínas associadas que, juntos, são capazes de formar adesões focais fortemente ligadas entre o corpo celular e a matriz extracelular para que, em seguida, ocorra o deslocamento celular (MAK et al., 2016; RAFTOPOULOU; HALL, 2004).

Significativas mudanças biológicas são necessárias para que as células possam migrar e invadir espaços perivasculares ou o espaço entre os neurônios e as células da glia (PAW et al., 2015). Essas mudanças compreendem desde a

perda de adesão célula-célula até mudanças na forma e volume para entrar nos espaços (CUDDAPAH et al., 2014).

A migração celular é um fenômeno importante para compreender a doença metastática, principal fator que leva à óbito os pacientes com câncer, visto que é por esse processo que as células malignas são capazes de migrar e invadir as células saudáveis proximais e, em casos mais graves, células saudáveis mais distantes (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

O comportamento migratório das células pode ser influenciado de diversas maneiras. Uma das proteínas que podem fazer parte da regulação dos processos de migração e invasão celular é a Caveolina-1 (CAV-1) (PARAT; RIGGINS, 2012). Tal proteína é responsável por modular processos como distribuição de colesterol na membrana celular, transdução de sinais, tráfego de vesículas e migração, caracterizando-se como um importante regulador do metabolismo celular (NWOSU et al., 2016).

1.4 Cavéolas e Caveolina-1

Cavéolas são pequenas invaginações da membrana plasmática em formato de ômega (Ω), ricas em caveolinas, glicoesfingolípídeos e colesterol que podem surgir como invaginações individuais, aglomeradas ou em estruturas tubulares alongadas (NASSOY; LAMAZE, 2012; ZOU et al., 2011), são visíveis apenas sob microscopia eletrônica de transmissão (MET) e possuem perfis lisos de membrana (HANSEN; NICHOLS, 2010).

As cavéolas também podem ser consideradas como um subconjunto dos microdomínios de membrana lipídica (rafts) devido ao seu tamanho e considerável conteúdo lipídico. Porém, apesar desses dois subdomínios apresentarem constituintes parecidos e compartilharem funções, nem todos os “rafts” lipídicos são cavéolas. As cavéolas podem ser encontradas em diferentes tipos celulares, a citar os fibroblastos, adipócitos, células epiteliais e endoteliais (GUPTA; TOUFAILY; ANNABI, 2014) e influenciam diretamente na fluidez, permeabilidade, curvatura e outras características das membranas plasmáticas (GUPTA; TOUFAILY; ANNABI, 2014; PARAT; RIGGINS, 2012)

As cavéolas possuem duas famílias de proteínas muito importantes, as caveolinas e as cavininas, sendo que as caveolinas são compostas por três proteínas: caveolina-1 (Cav-1), caveolina-2 (Cav-2) e caveolina-3 (Cav-3). A caveolina-1 é a principal das cavéolas, possui um tamanho maior que as demais

e, assim como a Cav-2, é encontrada em diferentes tipos celulares, principalmente adipócitos e células endoteliais (FRIDOLFSSON et al., 2014).

Os componentes das cavéolas regulam uma série de eventos envolvendo a membrana celular, além de que as caveolinas participam do metabolismo lipídico das células normais e tumorais, modulando processos de lipólise e formação de gotículas lipídicas (COHEN et al., 2004; GUPTA; TOUFAILY; ANNABI, 2014).

A Cav-1 apresenta diversas atuações, como no transporte de lipídeos, expressão gênica e função mitocondrial, além de ser encontrada em uma variedade de organelas citoplasmáticas, a citar o complexo de Golgi, núcleo, lisossomos, peroxissomos e gotas lipídicas (FRIDOLFSSON et al., 2014). As funções que a Cav-1 pode exercer de maneira extracelular, são determinantes nas transduções de sinais, regulando ativação de receptores e tem participação na angiogênese, (FRIDOLFSSON et al., 2014; MORAIS et al., 2012).

Ademais, a Cav-1 demonstrou uma interessante capacidade inibitória com proteínas como a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), a proteína quinase A (PKA) e o receptor de insulina (COHEN et al., 2004).

Estudos de Annabi et al em 2001, indicaram que a superexpressão de CAV-1 em células de GBM inibe a migração dependente da metaloprotease MT1 – MMP. A CAV-1 também inibe diretamente as proteínas quinases MEK-1 e ERK-2, que por sua vez, são envolvidas no processo de crescimento, proliferação, e migração celular (PARAT; RIGGINS, 2012).

O papel das CAV-1 no metabolismo da célula tumoral pode ser dual, agindo como supressor ou promotor de tumores, de acordo com o tipo e estágio do tumor (GUPTA; TOUFAILY; ANNABI, 2014; WANG et al., 2015). Em certos tipos de câncer como o de cólon, a alta expressão de CAV-1 diminui a migração das células, reduzindo sua capacidade metastática (WANG et al., 2018). Entretanto, em GBM, a CAV-1 está envolvida em processos de migração e invasão, além de sua expressão aumentada estar relacionada com a malignidade dos gliomas (PARAT; RIGGINS, 2012).

Estudos de Abulrob et al., 2004) indicaram os altos níveis de expressão de mRNA de CAV-1 na linhagem de glioblastoma U87MG. A análise do mRNA extraído de duas amostras de GBM comprovou o aumento da expressão gênica de CAV-1 quando comparada com mRNAs de tecido nervoso normal (SALLINEN et al., 2000).

BARRESI et al em 2009 avaliou a presença de CAV-1 em 20 amostras de GBM e revelou que mais de 50% das células testadas apresentaram CAV-1. Utilizando a ferramenta GlioVis que acessa o banco de dados *The cancer genome atlas program* (TCGA), foi possível verificar a alta expressão de mRNA de CAV-1 em glioblastoma quando comparado com gliomas de baixo grau, e que quanto maior o grau do glioma, maior é a expressão de CAV-1 (BOWMAN et al., 2017).

A seguir, podemos observar um gráfico gerado no GlioVis utilizando dados do estudo TCGA, que demonstra que o mRNA de CAV-1 em células de GBM é muito mais expresso em comparação com amostras não tumorais.

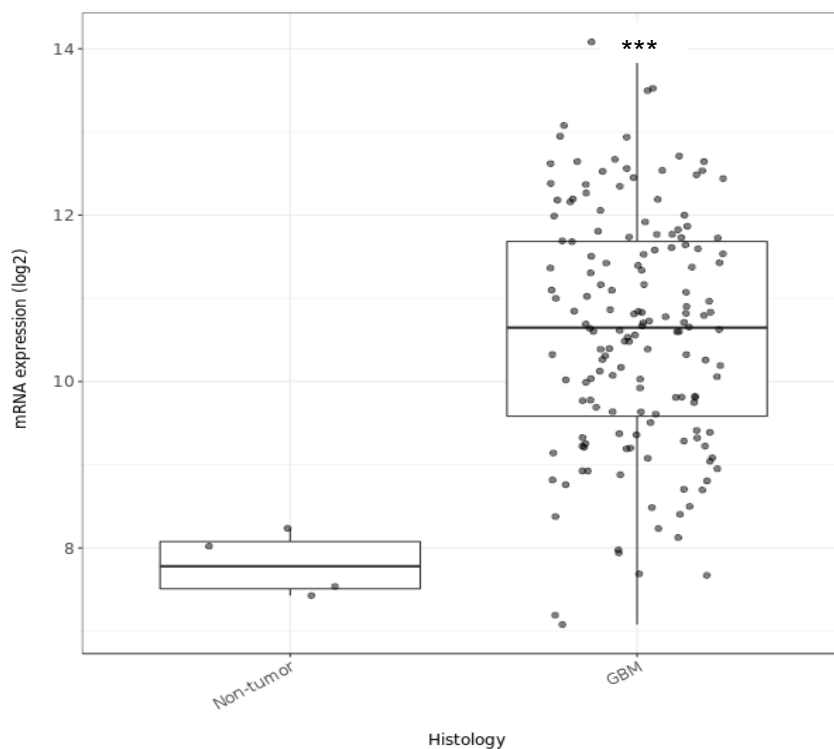


Gráfico 1. Comparação entre a expressão de mRNA de CAV-1 em amostras de GBM e em amostras não tumorais. Comparações pareadas entre níveis de grupo com correções para testes múltiplos (valores-p com correção de Bonferroni). GBM – Non-tumour 1.1E-04.

Utilizando a mesma ferramenta, porém, usando dados do estudo Rembrandt, conseguimos observar no gráfico a seguir a diferença entre a expressão do mRNA de CAV-1 em GBM em comparação com amostras de astrocitomas de menor grau e amostras não tumorais,

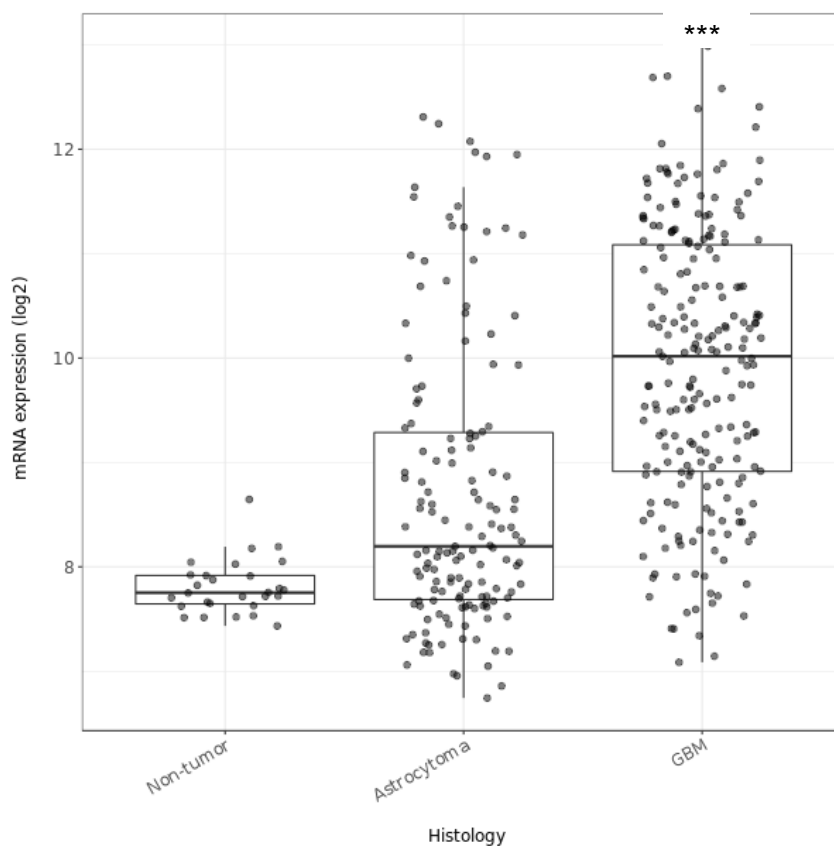


Gráfico 2. Comparação entre a expressão de mRNA de CAV-1 em amostras de GBM, astrocitomas de menor grau e amostras não tumorais. O gráfico mostra a diferença entre os pares, o intervalo de confiança de 95% e o valor p das comparações pareadas. *** $p < 0,001$.

1.5 Ômega-3

Moléculas de ácidos graxos que podem ser adicionadas de forma exógena, como ômega 3, podem regular o metabolismo lipídico de células, além de modificar a expressão gênica e proteica de proteínas envolvidas no processo de migração e invasão tumoral.

Os ácidos graxos poliinsaturados possuem diversos efeitos contra as células tumorais, como a diminuição da proliferação celular e neoangiogênese, aumentam a apoptose, induzem a diferenciação celular e reduzem o surgimento de metástases. Além disso, existem relatos de que o conteúdo de ácidos graxos nos tumores é inversamente proporcional ao grau de malignidade do mesmo (BABCOCK; BEKOJ; ESPAT, 2005; MENENDEZ; LUPU, 2007).

O uso de ácidos graxos insaturados é observado na modulação da migração celular. Tonutti et al em 2010, avaliou o quanto que os ômega 3 poderiam influenciar no mecanismo de adesão e migração celular de células

endoteliais e concluíram que o ácido eicosapentaenoico (EPA) e o ácido docosahexaenoico (DHA) são capazes de inibir a migração de tais células, sendo EPA o mais eficaz para diminuição da migração. Em outro estudo, foi identificado que o DHA é capaz de reduzir consideravelmente a migração de células de câncer de mama, podendo ser explorado o potencial anti-metastático do DHA (LII et al., 2016).

Q. Li et al demonstrou em 2007 que o ácido eicosapentaenoico (EPA), modifica a composição lipídica das cavéolas, diminuindo a concentração da proteína caveolina-1 em células endoteliais humanas. Na pesquisa de (Yang et al em 2018, comprovou-se a redução na concentração de colesterol intracelular após o tratamento de células de adenocarcinoma epitelial (CaCo-2) com ácidos graxos, entre eles, o EPA e o DHA, também da família do ômega 3.

A CAV-1 está intimamente relacionada com o transporte do colesterol nas células (HEAD; PATEL; INSEL, 2014). O colesterol aumenta a rigidez da membrana plasmática, enquanto os ácidos graxos poliinsaturados podem aumentar a fluidez da membrana devido a suas características físico-químicas, facilitando então procedimentos quimioterápicos e auxiliando no tratamento contra o câncer (FABIAN; KIMLER; HURSTING, 2015).

Tendo em vista a interferência direta dos ômega-3 no processo de migração, e sua capacidade de alterar a composição lipídica de estruturas caveolares é possível que exista uma relação entre os ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e a proteína CAV-1, presente nas cavéolas e que também modula a migração, podendo os ácidos EPA e DHA modular a expressão de CAV-1.

Células tratadas com EPA ou DHA podem resultar num acúmulo lipídico intracelular, ocasionando a formação de gotículas lipídicas (Lecchi *et al.*, 2013). Algumas evidências indicam as gotículas lipídicas armazenam ácidos graxos insaturados e, dessa forma, podem ser locais para síntese de eicosanoides, docosanoides e mediadores pró-resolução especializados (SPM's) (JARC; PETAN, 2020).

1.6 Gotículas lipídicas

Também chamados de adipossomos ou corpos lipídicos, gotículas lipídicas são organelas compostas de lipídios neutros, rodeados por uma monocamada de fosfolipídeos polares e proteínas (LECCHI et al., 2013). Os

componentes dessas organelas podem ser usados como estoque de energia para a célula, funcionar como componentes de membrana e como lipídeos sinalizadores (WELTE, 2015).

Muito têm-se discutido sobre a função de gotículas lipídicas intracelulares. Tem sido cada vez mais reconhecidas como organelas independentes totalmente funcionais, em vez de depósitos de gordura inerte. Elas agora estão emergindo como principais reguladores do metabolismo lipídico, tráfego intracelular e transdução de sinal (JARC; PETAN, 2020).

A formação e acúmulo de gotículas lipídicas varia muito entre os tipos celulares, tanto em organização quanto em número e tamanho e isso pode ter relação com a função que elas desenvolvem dentro das células (Cruz et al., 2020; Thiam & Beller, 2017).

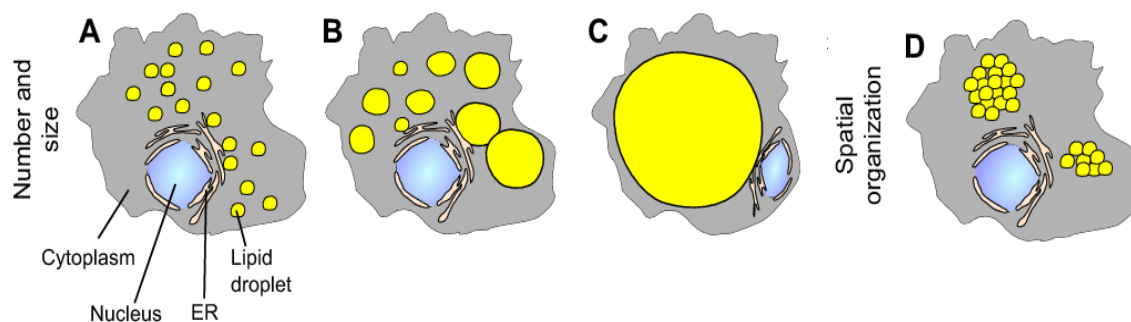


Figura 1. Diferenças entre a distribuição, número e tamanho de gotículas lipídicas intracelulares. A) Células de *Drosophilla* S2 com tamanhos uniformes de gotículas. B) Linhagens celulares COS-7 e AML 12 apresentam gotículas de diferentes tamanhos. C) Adipócitos de mamíferos contém na sua maioria uma grande gotícula unilocular. D) Também podem se apresentar como gotículas clusterizadas de acordo com o seu estado metabólico. Adaptado de Thiam & Beller, 2017.

A relação entre gotículas lipídicas e câncer é complexa e ainda está sob investigação. No entanto, há evidências de que as gotículas lipídicas podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento e progressão do câncer e tem sido cada vez mais reconhecido como uma característica prevalente em tumores (FADER KAISER et al., 2022). Alguns estudos demonstram que o aumento na formação de gotículas lipídicas pode significar também um aumento na agressividade do tumor, regulando processos como proliferação celular,

resistência ao estresse oxidativo, migração e invasão celular e resistência a quimioterápicos (FADER KAISER et al., 2022; PETAN, 2020).

Diversos estudos demonstram que as gotículas lipídicas regulam o metabolismo do ácido araquidônico, um ácido graxo poliinsaturado precursor de prostaglandinas e leucotrienos, que também está estocada nas gotículas (ACCIOLY et al., 2008). Também atuam então, como locais de produção de prostaglandina E₂ (PGE₂), que atua como um importante mediador pró-inflamatório e pró-tumoral e está envolvida diretamente com a patogênese de alguns tipos de câncer incluindo o Glioblastoma (PANAGOPOULOS et al., 2018)

Tendo o panorama do estudo da biologia da ação das gotículas lipídicas no câncer, é importante acessar mais informações sobre como e em quais circunstâncias elas podem se formar, haja visto que hoje em dia elas são vistas como características essenciais do câncer e que podem ser alvos de novas terapias (COTTE et al., 2018).

2. OBJETIVOS

O objetivo geral do projeto é avaliar a ação dos ácidos graxos ômega 3, eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenoico (DHA), em duas linhagens celulares de glioblastoma humano (T98G e U87MG) e sua relação com a proteína caveolina-1 (CAV-1).

2.1 Objetivos específicos

- Determinar as expressões gênica e proteica de caveolina-1 em células de glioblastoma em condições basais e após o tratamento com EPA e DHA.
- Analisar diversos aspectos dos perfis migratórios das células de glioblastoma, tais como migração em monocamada e transmigração em insertos de transwell.
- Demonstrar a formação de gotículas lipídicas nas células tratadas com EPA e DHA.

3. MÉTODOS

3.1 Cultivo celular e tratamentos

As células utilizadas nessa pesquisa foram as linhagens U87MG que foi fornecida pelo Prof. Dr Carlos Frederico Martins Menck, ICB-USP e a linhagem T98G cedida pela Profa Dra Sylvia Stuchi Maria-Engler da FCF-USP.

A escolha das linhagens deu-se por se tratar de glioblastomas com diferentes perfis genéticos e morfológicos, como pode ser visualizado na tabela a seguir:

Linhagem	PTEN	p53	Morfologia
U87MG	Mutante	Selvagem	
T98G	Selvagem	Mutante	

Tabela 1. Diferenças entre as linhagens U87MG e T98G.

As linhagens de células de glioblastoma humano U87MG e T98G foram cultivadas em frascos de cultura de células contendo meio DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbecco), suplementado com 10% de soro fetal bovino e com os antibióticos penicilina e estreptomicina em concentrações de 50U / ml e 50 µg / ml, respectivamente. Os frascos foram mantidos incubados à temperatura de 37 ° C e 5% de CO₂.

Para o ensaio de ferida, rt-PCR e *oil red*, as células foram tratadas por 72 horas com 100 µM de EPA ou DHA ou o veículo dos anteriores, a proteína albumina sérica bovina (BSA). Para o ensaio transwell, as células foram tratadas com 100 µM de EPA ou DHA ou BSA durante 24 horas. A concentração utilizada foi escolhida a partir de uma revisão da literatura e baseado em todas as pesquisas já feitas no nosso laboratório.

3.2 Ensaio de ferida

As células foram coletadas, ressuspensas em meio de cultura e plaqueadas um número de 5×10^4 em uma placa de 24 poços para atingir 100% de confluência em 72 horas. Uma ponteira de 100 μ l foi usada para fazer um arranhão vertical na monocamada de células. O meio de cultura foi aspirado para remover resíduos celulares. Com cuidado, novo meio de cultura contendo os tratamentos foi adicionado, quando apropriado.

Todas as fotos foram tiradas no tempo 0 após o arranhão na placa. Depois disso foram tiradas em um período de 6 horas para a célula U87MG e 11 horas para a célula T98G, em microscópio invertido. Os tempos foram padronizados de acordo com o comportamento de cada célula. As imagens foram posteriormente analisadas, comparando-se os grupos experimental e controle, medindo-se a área da ferida por meio do software "ImageJ". Por fim, foi traçado um gráfico com as medidas das áreas nos diferentes momentos de captação das imagens.

3.3 Ensaio de transmigração por transwell

A análise foi feita conforme descrito em (GOMES; COLQUHOUN, 2012). As células foram coletadas, ressuspensas em meio de cultura e colocadas uma quantidade de 1×10^4 na parte superior da câmara transwell (poros de 8 μ m; usando uma placa de 24 poços). No compartimento inferior, o meio de cultura também foi colocado. A placa foi deixada na estufa para permitir a adesão das células. Após um período de 12 horas, o meio de cultura das câmaras foi trocado por meio de tratamento contendo os tratamentos, quando aplicável.

Após o período de 24 e 72 horas de tratamento, o inserto de transwell foi retirado da placa, fixado e corado com cristal violeta (0,05%). As células que não migraram foram removidas com hastes com pontas de algodão. Após a retirada do excesso de corante, a membrana foi deixada ao ar livre para secar e, posteriormente, visualizada em microscópio invertido. As células foram contadas em 10 diferentes campos aleatórios. As médias das células que migraram foram calculadas e analisadas pelo software GraphPad Prism 5.0.

3.4 PCR em tempo real

O RNA foi extraído de pellets celulares, usando trizol, e o cDNA foi sintetizado para seguir a análise de PCR em tempo real. Para a reação rt-PCR,

3µl da mistura de pares de primers Forward e Reverse (projetados usando o banco de dados Genbank) para cada gene, 3µl de cDNA da etapa anterior e 6µl de SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems). As amplificações foram realizadas no ABI Prism 7300 (Applied Biosystems), nas seguintes condições: 50 ° C por 2 minutos, 95 ° C por 10 minutos, 95 ° C por 15 segundos (40 ciclos) e 60 ° C por 1 minuto. Os primers CAV-1 foram utilizados com as seguintes sequências: Forward - TACGTAGACTCGGAGGGACATC e Reverse - CTTCTCGCTCAGCTCGTCTG.

3.5 Western blot

As células foram lisadas utilizando tampão lise (0,21g/100ml de Tris base, 0,584g/100ml NaCl 0,037g/100ml de EDTA e 1% Triton 1 ml/100ml; pH=7,6), inibidores de proteases e inibidor de fosfatase, segue-se então com uma centrifugação (1500 rpm por 2 minutos). A concentração proteica foi determinada através do método de Lowry.

Para o processo de separação, foram feitos dois géis de acrilamida, o primeiro com concentração de 4,0% e um segundo, com 10%. Cada poço recebeu 20µg de extrato proteico total. A corrida no primeiro gel foi feita a 75V, durante 30 min; e no segundo gel (gel de separação), a 100V, por uma hora. Em seguida, as proteínas foram transferidas entre 1 e 2 horas para uma membrana de nitrocelulose utilizando o tampão de transferência (57,6g de glicina, 12g de Tris-base e 4g de SDS; pH=8,3). Ao final da transferência as membranas foram lavadas com tampão TBS (Tris buffered saline) por 5 minutos e com TBS Tween 0,1% por 5 minutos e incubadas com solução de bloqueio (leite desnatado em TBS 1x) por uma hora e meia. Para detecção da proteína, a membrana de nitrocelulose foi incubada com anticorpo primários anti-CAV-1, em diluição 1:1000, por 2 horas em temperatura ambiente. No dia seguinte, as membranas foram lavadas com TBS (10 minutos) e com TBS Tween 0,1% (10 minutos) por 3x, para a incubação com anticorpo secundário anti-rabbit (HRP) na diluição 1:2000 por duas horas. Após a incubação com o anticorpo secundário (por 1 hora) as membranas foram lavadas com TBS e com TBS Tween 0,1% por 10 minutos.

As revelações foram feitas através da detecção quimioluminescente no aparelho G-Box.

3.6 Coloração oil red

Em placas de 6 poços, as linhas de células U87MG e T98G foram tratadas com EPA ou DHA ou o controle BSA e coradas com *oil red* por 24, 48 e 72 horas.

Após os respectivos tratamentos, as células foram lavadas duas vezes com PBS, sendo então fixadas com formaldeído 4% por 20 minutos. O excesso de formaldeído foi removido lavando os poços duas vezes com água destilada. Removido o excesso de fixador, foi colocado nas cavidades álcool isopropílico 60% por 5 minutos. Após esse tempo, o isopropanol foi removido e 2 ml do corante *oil red* foram adicionados durante 20 minutos. Com as células já coradas, os poços foram lavados 2 a 5 vezes com água destilada. As células foram visualizadas e as fotos tiradas em microscopia de contraste de fase.

3.7 Análise estatística

Os dados foram apresentados como média \pm S.E.M, com n=3 em duplicata. A análise foi feita com GraphPad Prism 5.0 para Windows (Institute Software for Science, San Diego, CA) com ANOVA unilateral seguida pelo teste de Dunnett e Tukey.

4. RESULTADOS

4.1 Ensaio de ferida

Para o ensaio de ferida, os resultados mostraram que EPA, DHA e BSA não afetaram significativamente a migração das células da linhagem U87MG, como pode ser visualizado na imagem (x):

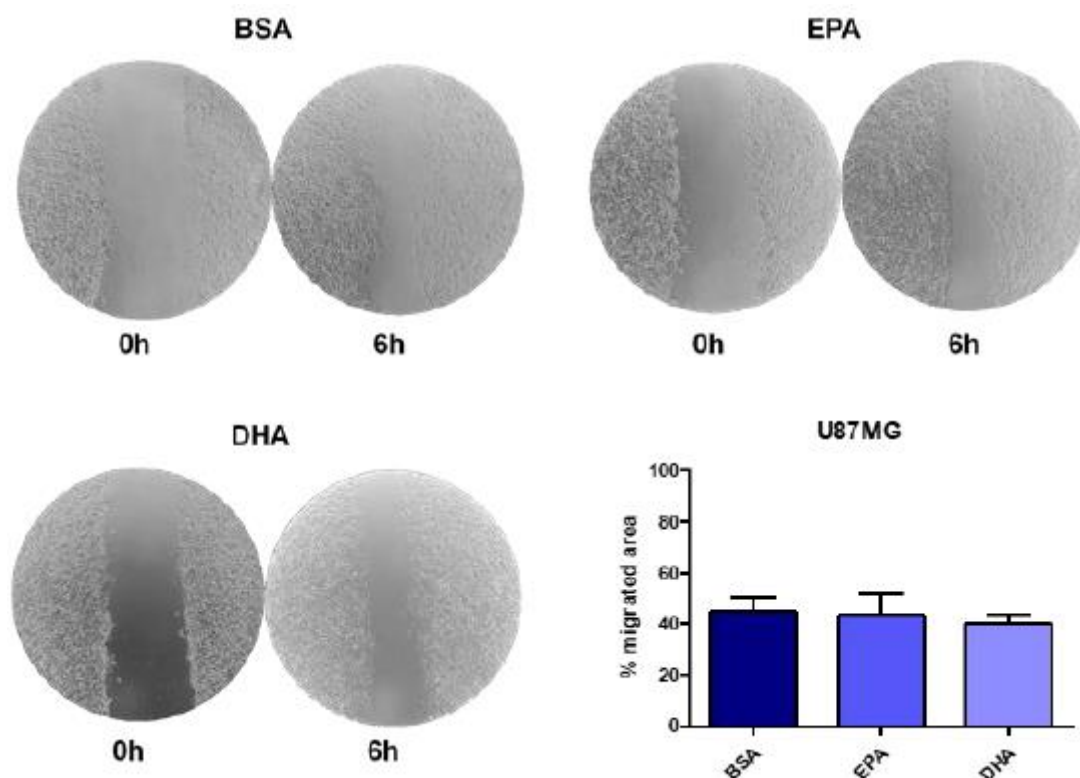


Figura 2. Ensaio de ferida com a linhagem U87MG. EPA e DHA não tiveram influência significativa na migração da linhagem U87MG quando comparada com o controle BSA. Células foram tratadas com 100 μ M de EPA ou DHA por 72 horas. O gráfico representa as médias das áreas migradas após 6 horas de migração. As médias, erro padrão médio (n=3 em duplicatas) e diferenças foram analisadas com one-way ANOVA, seguido do teste de Dunnett.

Entretanto, EPA e DHA aumentaram consideravelmente a migração das células T98G quando comparadas com o controle BSA, como pode ser observado na imagem x:

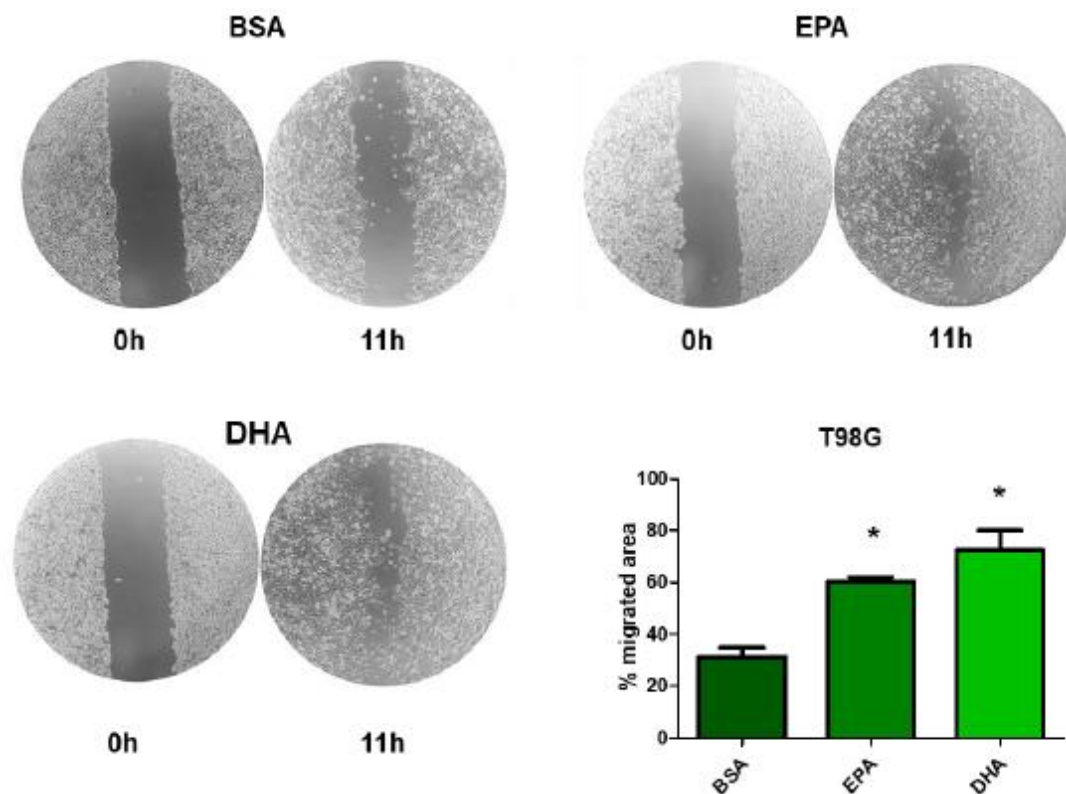


Figura 3. Ensaio de ferida com a linhagem T98G. EPA e DHA aumentaram significativamente a migração das células da linhagem T98G. Células foram tratadas com 100 μ M de EPA ou DHA por 72 horas. O gráfico representa as médias das áreas migradas após 11 horas de migração. As médias, erro padrão médio (n=3 em duplicatas) e diferenças foram analisadas com one-way ANOVA, seguido do teste de Dunnett. *p<0,05.

4.2 Ensaio de transmigração

Para avaliar a possível influência de EPA e DHA na transmigração de células GBM, foi realizado o ensaio de transmigração. A imagem x mostra o número de células que transmigraram através da câmara de Bodin.

Tanto EPA quanto DHA não afetaram a transmigração de ambas as linhas celulares:

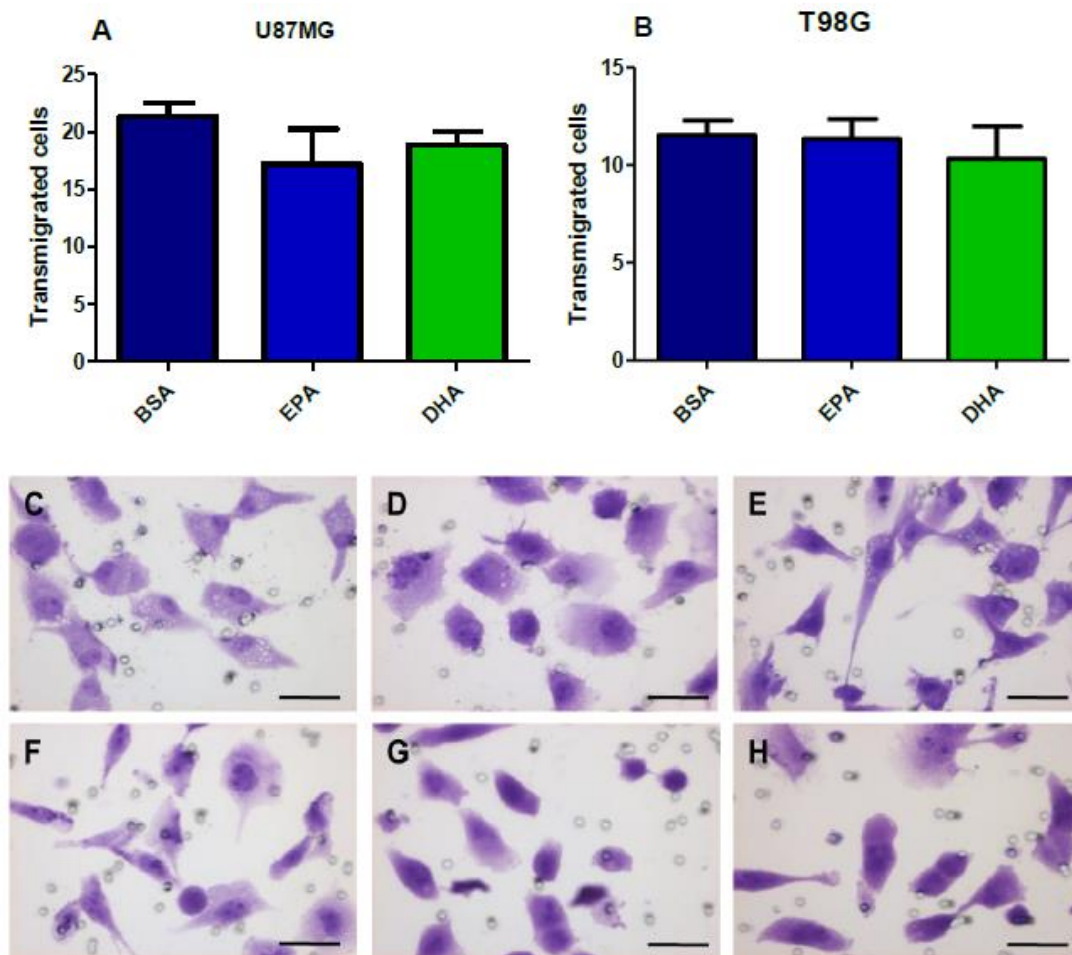


Figura 4. Análise de transmigração através do ensaio de transwell com 24 horas de tratamento. EPA e DHA não alteram a transmigração das células de GBM. A. Na linhagem U87MG. B. Na linhagem T98G. Imagens representativas do ensaio de transwell em C. U87MG tratado com EPA. D. U87MG células tratadas com DHA. E. Células U87MG tratados BSA F. Células T98G tratadas com EPA G. Células T98G tratadas com DHA e H. Células T98G tratadas com BSA. Os gráficos representam o número de células que migraram através dos poros dos insertos após 24 horas de tratamento. As médias, erro padrão médio (n=3 em duplicata) e diferenças foram analisadas com one-way ANOVA seguido do teste de Dunnett. Barra de escala = 50μm.

Para avaliar se o tempo de tratamento com EPA ou DHA influencia na transmigração das linhagens U87MG e T98G, o ensaio de transwell foi equiparado ao tempo de tratamento das células no ensaio de ferida, sendo assim de 72 horas de tratamento.

Tanto EPA quanto DHA, não alteraram significativamente a transmigração das linhagens U87MG e T98G com 72 horas de tratamento:

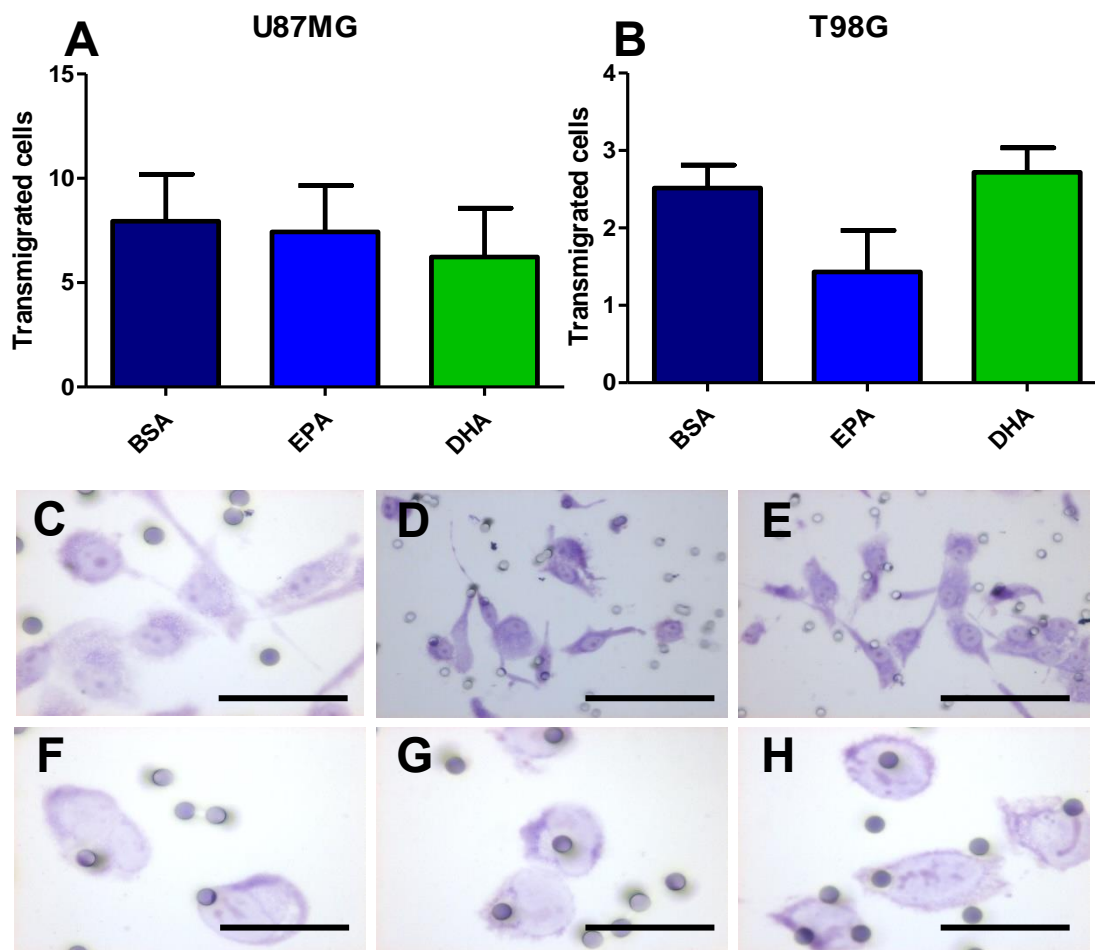


Figura 5. Análise de transmigração através do ensaio de transwell com 72 horas de tratamento. EPA e DHA não alteram a transmigração das células de GBM. Os gráficos representam o número de células que migraram através dos poros dos insertos após 72 horas de tratamento. As médias, erro padrão médio (n=3 em duplicata) e diferenças foram analisadas com one-way ANOVA seguido do teste de Dunnett. Barra de escala 50 μ m.

4.3 PCR em tempo real

Na análise da expressão gênica com rt-PCR, foi possível avaliar diferenças na expressão gênica de CAV-1 após tratamentos com EPA ou DHA. A imagem x mostra a mudança nos níveis de mRNA de CAV-1.

Para a linhagem U87MG, EPA e DHA diminuíram significativamente a expressão do gene CAV-1 em comparação com seu grupo de controle. Para células T98G, DHA mostrou mais eficácia na redução dos níveis de mRNA de CAV-1.

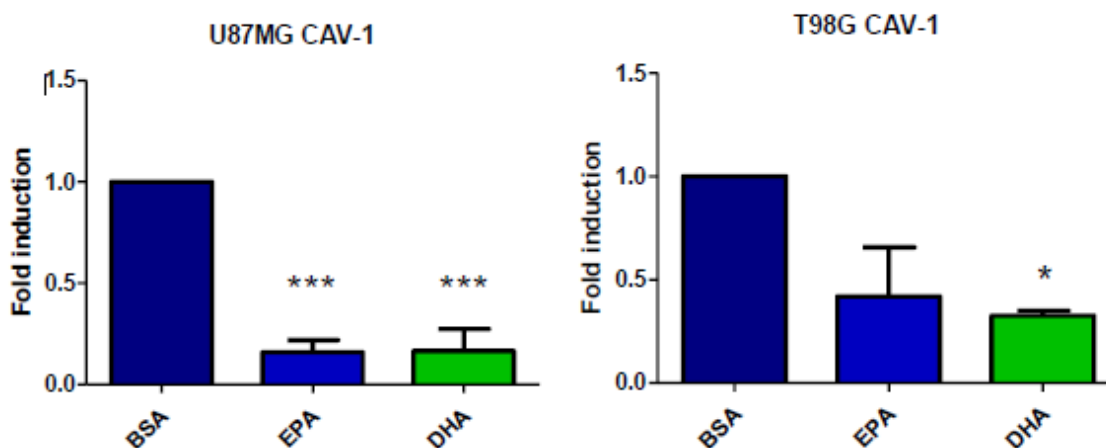


Gráfico 3. PCR em tempo real para o gene CAV-1. Os gráficos representam a mudança na expressão do gene CAV-1 em U87MG e T98G. Valores de média em duplicata para n=3. As diferenças foram analisadas com one-way ANOVA, seguido de teste de Tukey * $p < 0.05$ e *** $p < 0,005$.

4.4 Western blot

Os dados do Western blot demonstram que EPA e DHA tem uma tendência maior em aumentar o nível proteico de CAV-1 em T98G quando comparado com a U87MG. Quando tratadas com DHA, a migração das células T98G aumenta significativamente.

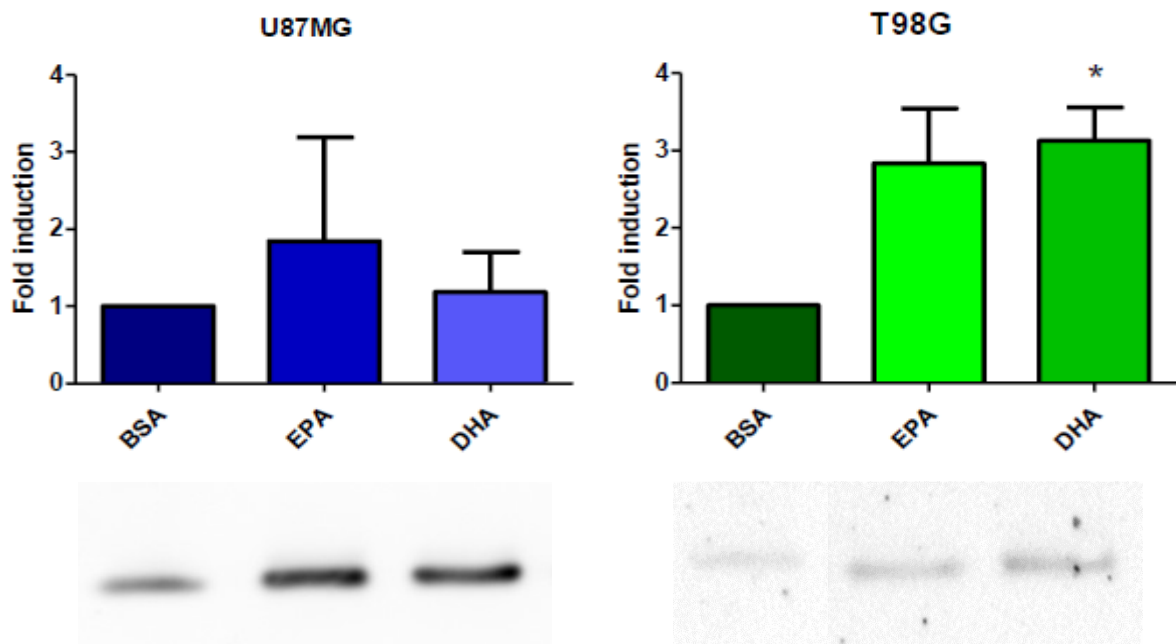


Figura 6. Análise de expressão da proteína CAV-1 por western blot. EPA e DHA não alteram significativamente a concentração da proteína CAV-1 em U87MG. Entretanto há um aumento expressivo na T98G sendo o DHA o principal fator de aumento da concentração da proteína em questão. Os gráficos representam a diferença de concentração de CAV-1 nas células após 72 horas de tratamento com EPA, DHA ou BSA. As médias, desvio médio padrão (n=3 em duplicata) e diferenças foram analisadas com one sample T test.

4.5 Coloração de gotículas lipídicas com *oil red*

Para avaliar o acúmulo de gotículas lipídicas durante 72 horas de tratamento, ambas as linhagens celulares foram fotografadas a cada 24 horas de tratamento. As figuras x e x representam as linhagens celulares U87MG e T98G coradas com *oil red*, respectivamente.

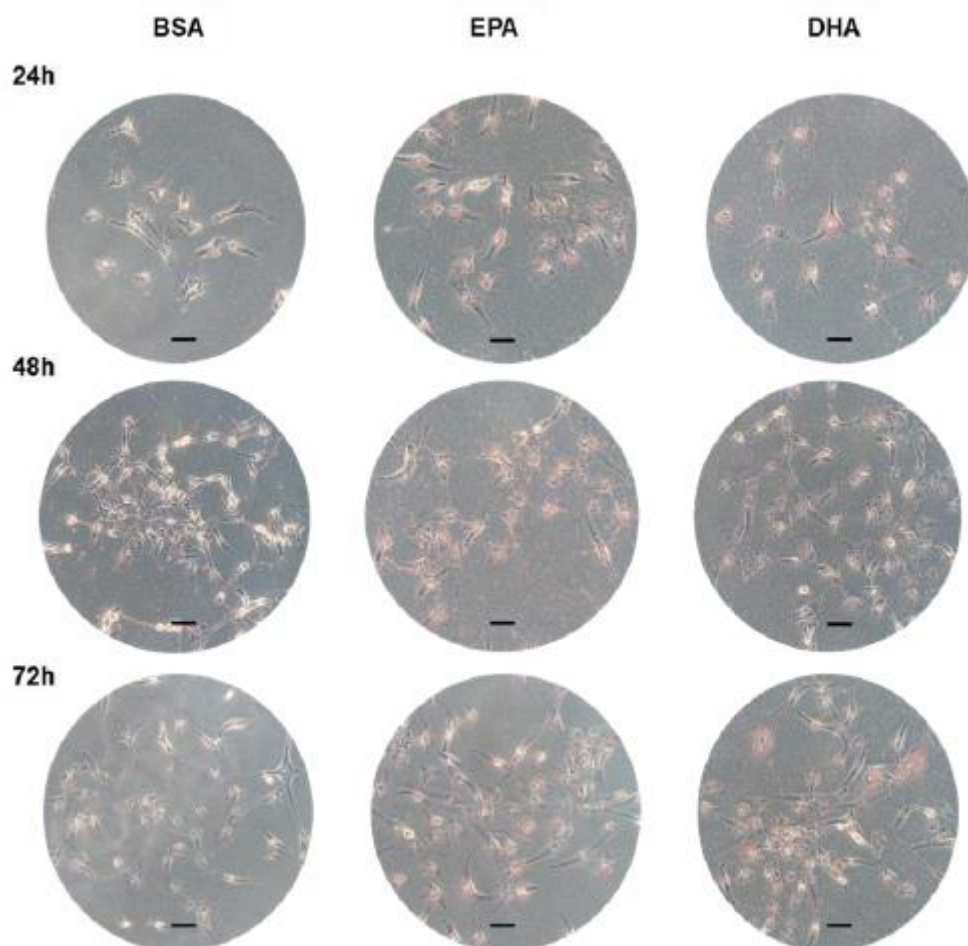


Figura 7. Coloração de *oil red* na linhagem U87MG. Imagens representativas da coloração de gotículas lipídicas com *oil red*. Todas as placas foram fotografadas a cada 24 horas de tratamento. EPA e DHA aumentam a formação de gotículas lipídicas quando comparadas com o controle. Barra de escala = 100 μ m.

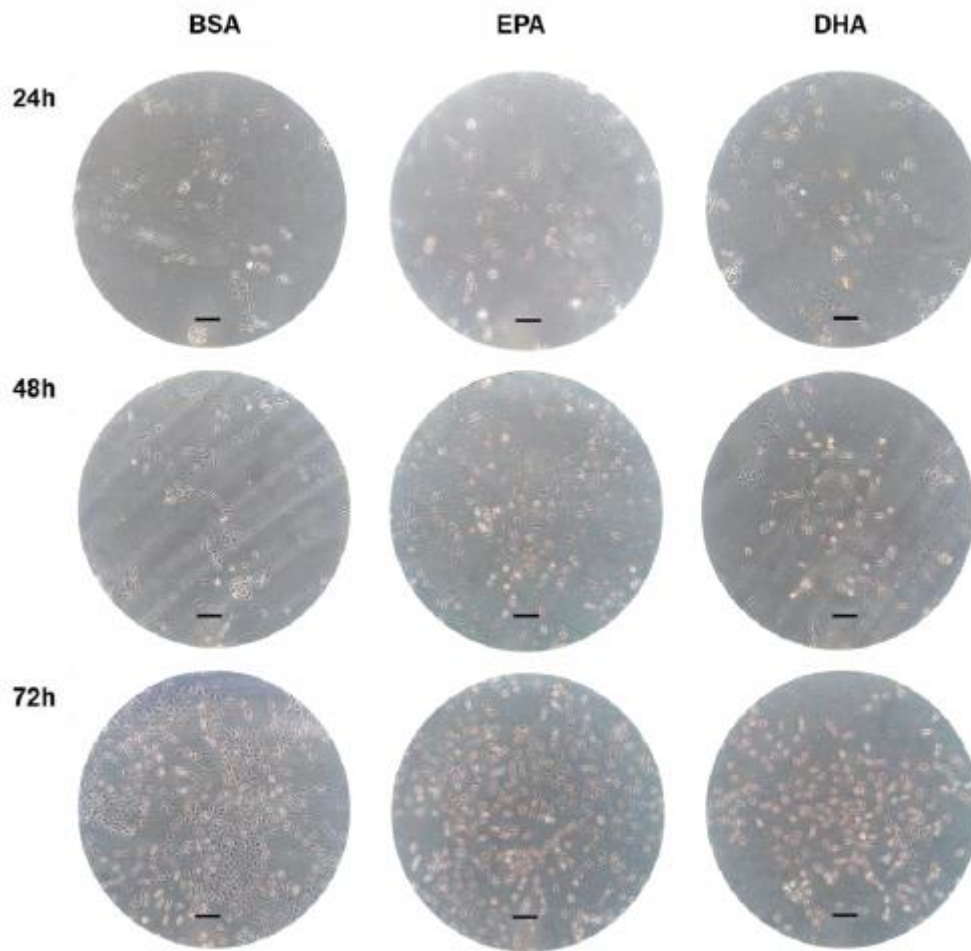


Figura 8. Coloração de *oil red* na linhagem T98G. Imagens representativas da coloração de gotículas lipídicas com *oil red*. Todas as placas foram fotografadas a cada 24 horas de tratamento. EPA e DHA aumentam a formação de gotículas lipídicas quando comparadas com o controle. Barra de escala = 100 μ m.

Em ambas as linhagens é possível perceber o acúmulo de gotículas lipídicas à medida que as células são tratadas com EPA e DHA.

Através de microscopia com contraste de fase, é possível perceber que as gotículas lipídicas se depositam ao redor do núcleo das células, como pode ser observado nas imagens a seguir:

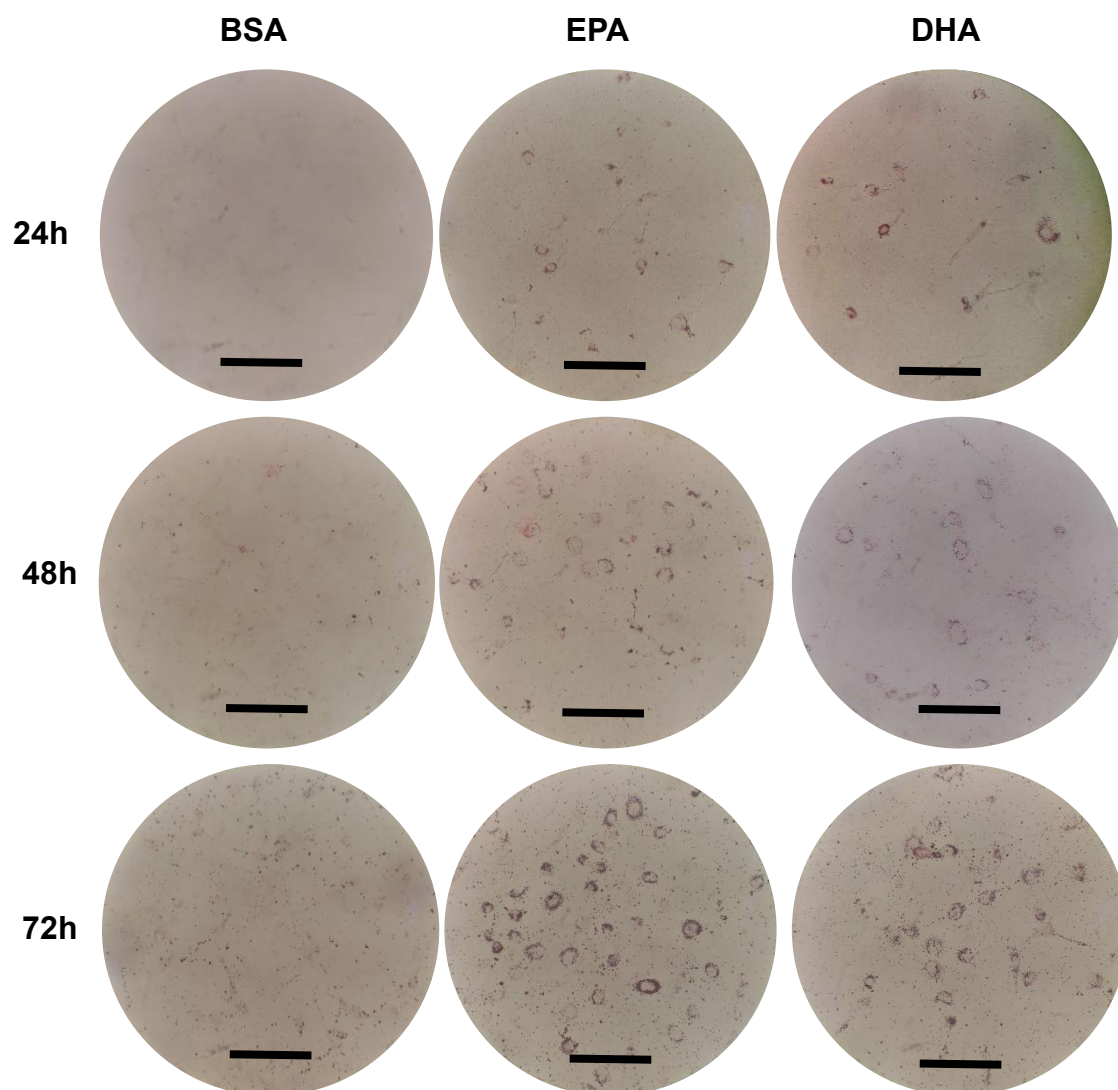


Figura 9. Coloração de *oil red* na linhagem U87MG em contraste de fase. Imagens representativas da coloração de gotículas lipídicas com oil red. Todas as placas foram fotografadas a cada 24 horas de tratamento. As gotículas lipídicas são depositadas ao redor do núcleo das células. Barra de escala = 100 μ m.

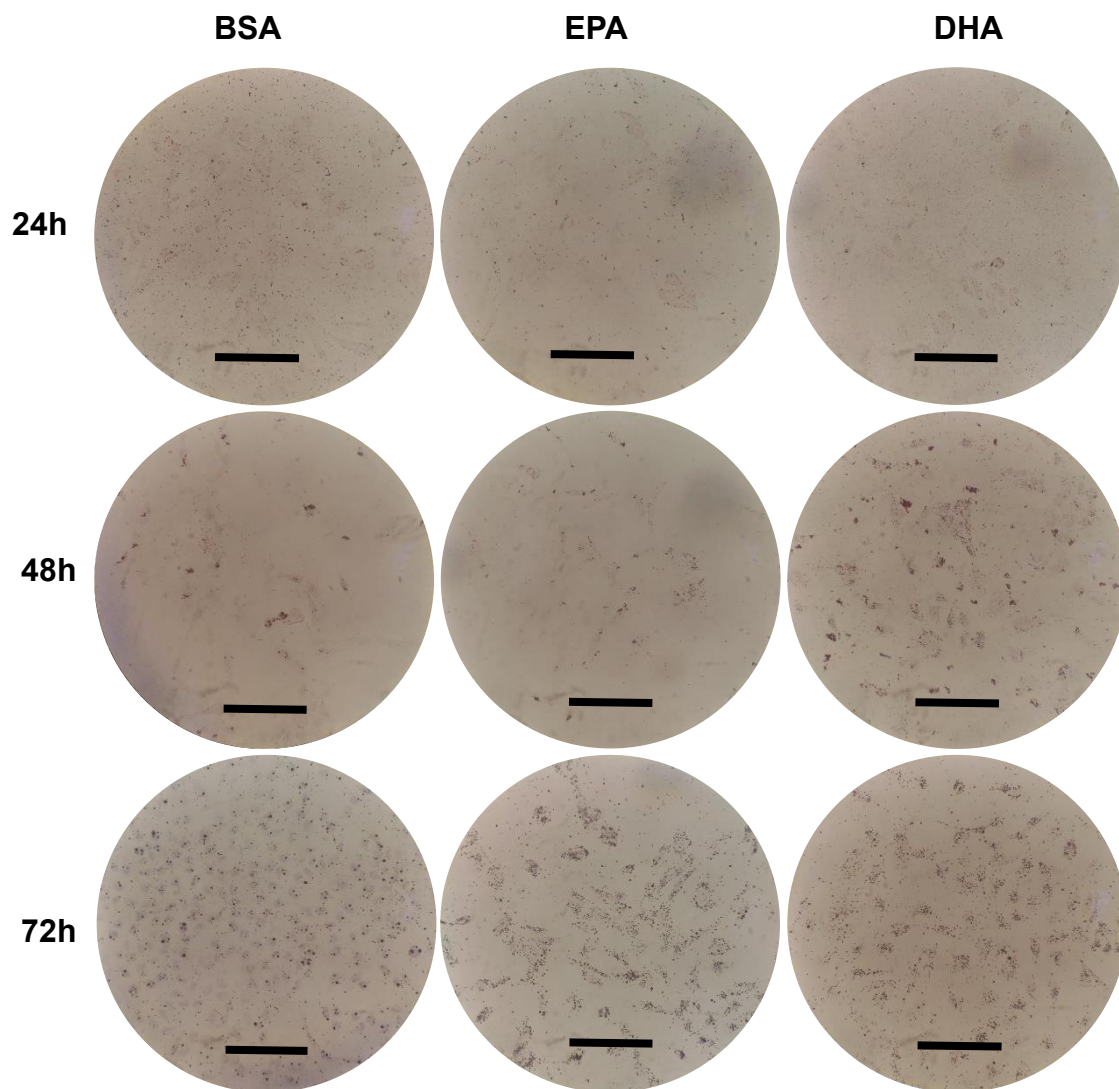


Figura 10. Coloração de *oil red* na linhagem T98G em contraste de fase. Imagens representativas da coloração de gotículas lipídicas com oil red. Todas as placas foram fotografadas a cada 24 horas de tratamento. As gotículas lipídicas são depositadas ao redor do núcleo das células. Barra de escala = 100 μ m.

5. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstraram que o EPA e o DHA podem afetar de alguma forma as atividades celulares nas linhagens celulares T98G e U87MG, de glioblastoma humano.

EPA e DHA são ácidos graxos poliinsaturados conhecidos por ter propriedades anticâncer ou por serem adjuvantes na quimioterapia (JING; WU; LIM, 2013; VOLPATO; HULL, 2018). Suas propriedades anticancerígenas estão bem estabelecidas. Estudos de (BROWN et al., 2006), mostraram que os ácidos graxos ômega-6 aumentaram a migração de linhas celulares de câncer de próstata, enquanto quando tratados com ácidos graxos ômega-3 ocorreu a inibição da migração. (OONO et al., 2017) mostraram inibição da proliferação, migração e invasão da linha celular PC3 através do tratamento com EPA e DHA.

Este é o primeiro estudo que mostra o EPA e o DHA aumentando a taxa de migração celular nas linhagens celulares testadas, na pesquisa de literatura que abrangeu este trabalho.

Normalmente, esses ácidos graxos são relatados para reduzir a migração, transmigração e invasão de células cancerígenas. (Yun et al em 2016) mostraram que o DHA suprimiu a migração e a invasão das linhagens celulares de câncer de mama MDA-MB-231 e T47D pela via das metaloproteinases de matriz. (Liu et al em 2018) mostraram que o EPA reduziu a migração celular em células de câncer de ovário.

Os resultados sugerem que EPA e DHA afetam a migração e a transmigração de forma diferente nas células de GBM quando comparadas entre as linhagens e com outros tipos de câncer.

Há evidências de que os ácidos graxos ômega-3 podem reduzir o CAV-1 in vitro. Sabe-se que o EPA modifica a composição lipídica da estrutura cavéola e desloca algumas proteínas que formam essa estrutura, como CAV-1 e óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) em células endoteliais HUVEC (LI et al., 2007).

No presente estudo, tanto o EPA quanto o DHA mostraram eficácia na redução dos níveis de mRNA de CAV-1. Estudos de Yang et al em 2018, mostraram que EPA e DHA reduzem os níveis de mRNA de CAV-1 em uma cultura de células da linhagem CACO-2 (adenocarcinoma colorretal humano), ocasionando uma diminuição da captação e transporte de colesterol, funções

essas desenvolvidas pela proteína Caveolina-1, resultados esses que corroboram com os obtidos nesse estudo.

Os resultados do western blot indicam que há uma tendência de aumento da concentração proteica de caveolina-1 nas células de glioblastoma humano, principalmente na linhagem T98G no qual DHA aumentou significativamente essa expressão. Tais resultados podem significar que o aumento da concentração proteica de caveolina-1 está também relacionado com o aumento da migração. Tanto no ensaio de ferida quanto no western blot, DHA foi capaz de aumentar a migração e concentração de CAV-1, respectivamente.

Navarro et al em 2004, revisaram a função do CAV-1 no processo de migração. O CAV-1 como principal proteína contida nas cavéolas, impulsiona a formação de sua membrana plasmática e liga a membrana ao citoesqueleto de actina, além de modular a interação celular com a matriz extracelular, processos altamente ativos e importantes para a migração celular. A fosforilação da tirosina 14 da caveolina-1 também está associada com o aumento do processo de migração e estimulação da formação de adesões focais, estabilizando a quinase de adesão focal (FAK), aumenta a migração do tumor (GOETZ et al., 2008)

A coloração com *oil red* é comumente usada em citopatologia e diagnóstico de doenças relacionadas ao tecido adiposo. Mas está sendo cada vez mais usado para analisar o estado do metabolismo lipídico quando saudável e em estado patológico (MEHLEM et al., 2013). Ele pode ser usado para detectar gotículas lipídicas, que são lipídios neutros rodeados por lipídios polares e algumas proteínas. EPA e DHA também podem ser armazenados em gotículas lipídicas, tornando a coloração vermelho óleo um método apropriado neste estudo (LECCHI et al., 2013)

Em ambas as linhagens celulares houve aumento no acúmulo de gotículas lipídicas quando comparadas com o veículo. O aumento na quantidade de gotículas lipídicas já foi observado por (MEHLEM et al., 2013) em monócitos caprinos e por Guštin et al em 2017) em células HeLa, cujo acúmulo de gotículas lipídicas foi proporcional às concentrações de ômega-3. Também foi relatado que o EPA aumenta o acúmulo de gotículas lipídicas em células de carcinossarcoma de rato LLC-WRC256 quando analisadas pelas técnicas de sudan black e oil red (COLQUHOUN; SCHUMACHER, 2001). Os dados também são confirmados por estudos anteriores que confirmaram o aumento no número

de gotículas lipídicas na linhagem celular de glioma de rato C6 após exposição ao EPA (RAMOS; COLQUHOUN, 2003).

O conhecimento sobre a biologia das gotículas lipídicas ainda está crescendo, mas há evidências de que, se elas armazenam ácidos graxos poliinsaturados, também podem ser o local de síntese de eicosanóides, docosanóides e mediadores pró-resolução especializados (SPM's), uma vez que os PUFA's são os precursores da desses produtos (JARC; PETAN, 2020).

A capacidade de aumentar a agressividade do câncer e a migração celular de eicosanóides foi descrita por Panagopoulos et al., 2018. A relação entre o acúmulo de gotículas lipídicas e o possível aumento da concentração intracelular de eicosanóides pode justificar o aumento da migração celular mostrado anteriormente, mostrando que as gotículas lipídicas podem também ser um alvo para o tratamento do câncer.

6. CONCLUSÃO

A aplicação dos ácidos graxos ômega-3 no tratamento do câncer é bastante estudada em vários tipos de câncer. Apesar de muitos avanços nessa área, o mecanismo de ação por trás de como o EPA e o DHA modulam a migração celular ainda é incerto, principalmente no glioblastoma. Este estudo sugere que sem qualquer combinação com quimioterapia, EPA e DHA aumentam a migração celular das células T98G, possivelmente por aumentar a formação de gotículas lipídicas e aumentar também a concentração proteica de caveolina-1, que cria um local agressivo nas células. Além disso, ambos diminuem os níveis de mRNA de CAV-1, sugerindo que pode haver um mecanismo de feedback negativo na expressão do gene de CAV-1 e na produção da proteína caveolina-1. Os tratamentos com EPA e DHA aumentam a acumulação de gotículas lipídicas intracelulares em ambas as linhagens utilizadas.

As relações entre o ômega-3, caveolina-1 e gotículas lipídicas ainda são pouco estudadas em glioblastoma. É importante ressaltar a importância de continuar estudando as condições que podem levar a diminuição da agressividade do glioblastoma, haja visto sua alta letalidade, para aumentar a qualidade de vida dos pacientes acometidos por ele.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABULROB, A. et al. Interactions of EGFR and caveolin-1 in human glioblastoma cells: evidence that tyrosine phosphorylation regulates EGFR association with caveolae. **Oncogene**, v. 23, n. 41, p. 6967–6979, 9 set. 2004.

ACCIOLY, M. T. et al. Lipid Bodies Are Reservoirs of Cyclooxygenase-2 and Sites of Prostaglandin-E2 Synthesis in Colon Cancer Cells. **Cancer Research**, v. 68, n. 6, p. 1732–1740, 15 mar. 2008.

ALDAPE, K. et al. Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. **Acta neuropathologica**, v. 129, n. 6, p. 829–848, 26 jun. 2015.

ALIFIERIS, C.; TRAFALIS, D. T. Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. **Pharmacology & therapeutics**, v. 152, p. 63–82, 29 jun. 2015.

ALPHANDÉRY, E. Glioblastoma Treatments: An Account of Recent Industrial Developments. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. SEP, 13 set. 2018.

ANNABI, B. et al. Localization of membrane-type 1 matrix metalloproteinase in caveolae membrane domains. **The Biochemical journal**, v. 353, n. Pt 3, p. 547–553, 1 fev. 2001.

ANTON, K.; BAEHRING, J. M.; MAYER, T. Glioblastoma multiforme: overview of current treatment and future perspectives. **Hematology/oncology clinics of North America**, v. 26, n. 4, p. 825–853, ago. 2012.

ARAM S MODREK; N SUMRU BAYIN; DIMITRIS G PLACANTONAKIS. Brain stem cells as the cell of origin in glioma. **World journal of stem cells**, v. 6, n. 1, p. 43, 2014.

BABCOCK, T. A.; BEKOJ, T.; ESPAT, N. J. Experimental studies defining omega-3 fatty acid antiinflammatory mechanisms and abrogation of tumor-related syndromes. **Nutrition in clinical practice: official publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 20, n. 1, p. 62–74, 2005.

BARRESI, V. et al. Caveolin-1 expression in diffuse gliomas: correlation with the proliferation index, epidermal growth factor receptor, p53, and 1p/19q status. **Human pathology**, v. 40, n. 12, p. 1738–1746, dez. 2009.

BOWMAN, R. L. et al. GlioVis data portal for visualization and analysis of brain tumor expression datasets. **Neuro-oncology**, v. 19, n. 1, p. 139–141, 1 jan. 2017.
BROWN, M. D. et al. Promotion of prostatic metastatic migration towards human bone marrow stroma by Omega 6 and its inhibition by Omega 3 PUFAs. **British journal of cancer**, v. 94, n. 6, p. 842–853, 27 mar. 2006.

COHEN, A. W. et al. Role of caveolin-1 in the modulation of lipolysis and lipid droplet formation. **Diabetes**, v. 53, n. 5, p. 1261–1270, maio 2004.

COLQUHOUN, A.; SCHUMACHER, R. I. γ -Linolenic acid and eicosapentaenoic acid induce modifications in mitochondrial metabolism, reactive oxygen species generation, lipid peroxidation and apoptosis in Walker 256 rat carcinosarcoma cells. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1533, n. 3, p. 207–219, 31 out. 2001.

COTTE, A. K. et al. LPCAT2 controls chemoresistance in colorectal cancer. **Molecular & cellular oncology**, v. 5, n. 3, 4 maio 2018.

CRUZ, A. L. S. et al. Lipid droplets: platforms with multiple functions in cancer hallmarks. **Cell Death & Disease**, v. 11, n. 2, p. 105, 6 fev. 2020.

CUDDAPAH, V. A. et al. A neurocentric perspective on glioma invasion. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 15, n. 7, p. 455–465, 2014.

FABIAN, C. J.; KIMLER, B. F.; HURSTING, S. D. Omega-3 fatty acids for breast cancer prevention and survivorship. **Breast cancer research: BCR**, v. 17, n. 1, 4 maio 2015.

FADER KAISER, C. M. et al. Biogenesis and Breakdown of Lipid Droplets in Pathological Conditions. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 9, 7 fev. 2022.

FERREIRA, J. et al. Drug resistance in glioblastoma and cytotoxicity of seaweed compounds, alone and in combination with anticancer drugs: A mini review. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 48, p. 84–93, 15 set. 2018.

FRIDOLFSSON, H. N. et al. Regulation of intracellular signaling and function by caveolin. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 28, n. 9, p. 3823–3831, 1 set. 2014.

FURNARI, F. B. et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. **Genes & development**, v. 21, n. 21, p. 2683–2710, 1 nov. 2007.
GERALDO, L. H. M. et al. Glioblastoma Therapy in the Age of Molecular Medicine. **Trends in cancer**, v. 5, n. 1, p. 46–65, 1 jan. 2019.

GHOSH, D.; NANDI, S.; BHATTACHARJEE, S. Combination therapy to checkmate Glioblastoma: clinical challenges and advances. **Clinical and translational medicine**, v. 7, n. 1, dez. 2018.

GOETZ, J. G. et al. Caveolin-1 in tumor progression: the good, the bad and the ugly. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 27, n. 4, p. 715–735, 28 dez. 2008.
GOMES, R. N.; COLQUHOUN, A. E series prostaglandins alter the proliferative, apoptotic and migratory properties of T98G human glioma cells in vitro. **Lipids in health and disease**, v. 11, 2012.

GUPTA, R.; TOUFAILY, C.; ANNABI, B. Caveolin and cavin family members: dual roles in cancer. **Biochimie**, v. 107 Pt B, n. PB, p. 188–202, 2014.

GUŠTIN, E. et al. Lipid Droplet Formation in HeLa Cervical Cancer Cells Depends on Cell Density and the Concentration of Exogenous Unsaturated Fatty Acids. **Acta chimica Slovenica**, v. 64, n. 3, p. 549–554, 2017.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 4 mar. 2011.

HANSEN, C. G.; NICHOLS, B. J. Exploring the caves: cavins, caveolins and caveolae. **Trends in cell biology**, v. 20, n. 4, p. 177–186, abr. 2010.

HEAD, B. P.; PATEL, H. H.; INSEL, P. A. Interaction of membrane/lipid rafts with the cytoskeleton: impact on signaling and function: membrane/lipid rafts, mediators of cytoskeletal arrangement and cell signaling. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1838, n. 2, p. 532–545, 2014.

HUNG, A. L.; GARZON-MUVDI, T.; LIM, M. Biomarkers and Immunotherapeutic Targets in Glioblastoma. **World neurosurgery**, v. 102, p. 494–506, 1 jun. 2017.

JARC, E.; PETAN, T. A twist of FATE: Lipid droplets and inflammatory lipid mediators. **Biochimie**, v. 169, p. 69–87, 1 fev. 2020.

JING, K.; WU, T.; LIM, K. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cancer. **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, v. 13, n. 8, p. 1162–1177, 12 out. 2013.

KIM, Y. et al. A mathematical model for pattern formation of glioma cells outside the tumor spheroid core. **Journal of theoretical biology**, v. 260, n. 3, p. 359–371, 7 out. 2009.

KIM, Y. Regulation of cell proliferation and migration in glioblastoma: new therapeutic approach. **Frontiers in oncology**, v. 3, 2013.

LECCHI, C. et al. Effects of EPA and DHA on lipid droplet accumulation and mRNA abundance of PAT proteins in caprine monocytes. **Research in veterinary science**, v. 94, n. 2, p. 246–251, abr. 2013.

LI, Q. et al. Eicosapentaenoic acid modifies lipid composition in caveolae and induces translocation of endothelial nitric oxide synthase. **Biochimie**, v. 89, n. 1, p. 169–177, jan. 2007.

LI, Y. et al. The Prognosis of Anti-Angiogenesis Treatments Combined with Standard Therapy for Newly Diagnosed Glioblastoma: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. **PLoS one**, v. 11, n. 12, 1 dez. 2016.

LII, C. K. et al. Docosahexaenoic acid inhibits 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced fascin-1-dependent breast cancer cell migration by suppressing the PKC δ - and Wnt-1/ β -catenin-mediated pathways. **Oncotarget**, v. 7, n. 18, p. 25162–25179, 1 maio 2016.

LIU, J. et al. Blocking the Nav1.5 channel using eicosapentaenoic acid reduces migration and proliferation of ovarian cancer cells. **International journal of oncology**, v. 53, n. 2, p. 855–865, 1 ago. 2018.

LOUIS, D. N. et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta neuropathologica**, v. 114, n. 2, p. 97–109, ago. 2007.

LOUIS, D. N. et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Neuro-Oncology**, v. 23, n. 8, p. 1231–1251, 2 ago. 2021.

LU, V. M. et al. The survival effect of valproic acid in glioblastoma and its current trend: a systematic review and meta-analysis. **Clinical neurology and neurosurgery**, v. 174, p. 149–155, 1 nov. 2018.

MAIR, D. B.; AMES, H. M.; LI, R. Mechanisms of invasion and motility of high-grade gliomas in the brain. **Molecular biology of the cell**, v. 29, n. 21, p. 2509–2515, 15 out. 2018.

MAK, M. et al. Single-Cell Migration in Complex Microenvironments: Mechanics and Signaling Dynamics. **Journal of biomechanical engineering**, v. 138, n. 2, 1 fev. 2016.

MEHLEM, A. et al. Imaging of neutral lipids by oil red O for analyzing the metabolic status in health and disease. **Nature protocols**, v. 8, n. 6, p. 1149–1154, jun. 2013.

MENENDEZ, J. A.; LUPU, R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. **Nature reviews. Cancer**, v. 7, n. 10, p. 763–777, out. 2007.

MIRANDA, A. et al. Breaching barriers in glioblastoma. Part I: Molecular pathways and novel treatment approaches. **International journal of pharmaceuticals**, v. 531, n. 1, p. 372–388, 5 out. 2017.

MORAIS, C. et al. Altered Angiogenesis in Caveolin-1 Gene-Deficient Mice Is Restored by Ablation of Endothelial Nitric Oxide Synthase. **Atherosclerosis, and Endothelium Biology**, v. 180, p. 1702–1714, 2012.

NASSOY, P.; LAMAZE, C. Stressing caveolae new role in cell mechanics. **Trends in cell biology**, v. 22, n. 7, p. 381–389, jul. 2012.

NAVARRO, A.; ANAND-APTE, B.; PARAT, M. A role for caveolae in cell migration. **The FASEB Journal**, v. 18, n. 15, p. 1801–1811, dez. 2004.

NWOSU, Z. C. et al. Caveolin-1 in the regulation of cell metabolism: a cancer perspective. **Molecular cancer**, v. 15, n. 1, 16 nov. 2016.

OONO, K. et al. Inhibition of PC3 human prostate cancer cell proliferation, invasion and migration by eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. **Molecular and clinical oncology**, v. 7, n. 2, 8 jun. 2017.

OSTROM, Q. T. et al. CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010-2014. **Neuro-oncology**, v. 19, n. suppl_5, p. v1–v88, 6 nov. 2017.

PANAGOPOULOS, A. T. et al. The prostanoid pathway contains potential prognostic markers for glioblastoma. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 137, p. 52–62, jul. 2018.

PARAT, M. O.; RIGGINS, G. J. Caveolin-1, caveolae, and glioblastoma. **Neuro-oncology**, v. 14, n. 6, p. 679–688, jun. 2012.

PAUL, C. D.; MISTRITIS, P.; KONSTANTOPOULOS, K. Cancer cell motility: lessons from migration in confined spaces. **Nature reviews. Cancer**, v. 17, n. 2, p. 131–140, 27 jan. 2017.

PAW, I. et al. Mechanisms regulating glioma invasion. **Cancer letters**, v. 362, n. 1, p. 1–7, 2015.

PETAN, T. Lipid Droplets in Cancer. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**, v. 185, p. 53–86, 2020.

PREUSSER, M. et al. Current concepts and management of glioblastoma. **Annals of neurology**, v. 70, n. 1, p. 9–21, jul. 2011.

RAFTOPOULOU, M.; HALL, A. Cell migration: Rho GTPases lead the way. **Developmental Biology**, v. 265, n. 1, p. 23–32, 1 jan. 2004.

RAMOS, K. L.; COLQUHOUN, A. Protective role of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in the metabolic response of C6 rat glioma cells to polyunsaturated fatty acid exposure. **Glia**, v. 43, n. 2, p. 149–166, 1 ago. 2003.

SALLINEN, S. L. et al. Identification of differentially expressed genes in human gliomas by DNA microarray and tissue chip techniques. **Cancer research**, v. 60, n. 23, p. 6617–22, 1 dez. 2000.

STUPP, R. et al. High-grade glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology**, v. 25 Suppl 3, p. 93–101, 1 set. 2014.

THAKKAR, J. P. et al. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 23, n. 10, p. 1985–1996, 1 out. 2014.

THIAM, A. R.; BELLER, M. The why, when and how of lipid droplet diversity. **Journal of Cell Science**, 1 jan. 2017.

TONUTTI, L. et al. Eicosapentaenoic acid inhibits endothelial cell migration in vitro. **Journal of angiogenesis research**, v. 2, n. 1, 2010.

VOLPATO, M.; HULL, M. A. Omega-3 polyunsaturated fatty acids as adjuvant therapy of colorectal cancer. **Cancer metastasis reviews**, v. 37, n. 2–3, p. 545–555, 1 set. 2018.

WANG, Y. et al. Caveolin-1 enhances RANKL-induced gastric cancer cell migration. **Oncology Reports**, v. 40, n. 3, p. 1287, 1 set. 2018.

WANG, Z. et al. Caveolin-1, a stress-related oncotarget, in drug resistance. **Oncotarget**, v. 6, n. 35, p. 37135–37150, 10 nov. 2015.

WELLER, M. et al. Standards of care for treatment of recurrent glioblastoma--are we there yet? **Neuro-oncology**, v. 15, n. 1, p. 4–27, jan. 2013.

WELTE, M. A. Expanding Roles for Lipid Droplets. **Current Biology**, v. 25, n. 11, p. R470–R481, jun. 2015.

WEN, P. Y.; KESARI, S. Malignant gliomas in adults. **The New England journal of medicine**, v. 359, n. 5, p. 492–507, 31 jul. 2008.

YANG, F. et al. Fatty acids modulate the expression levels of key proteins for cholesterol absorption in Caco-2 monolayer. **Lipids in health and disease**, v. 17, n. 1, 20 fev. 2018.

YUN, E. J. et al. Docosahexaenoic acid suppresses breast cancer cell metastasis by targeting matrix-metalloproteinases. **Oncotarget**, v. 7, n. 31, p. 49961–49971, 2016.

ZOU, H. et al. Caveolin-1, cellular senescence and age-related diseases. **Mechanisms of ageing and development**, v. 132, n. 11–12, p. 533–542, 2011.