



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE- FS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO HUMANA.**

LARISSA FERNANDA MELO VASCONCELOS

**AÇÃO DA VITAMINA “E” NA MODULAÇÃO DO METABOLISMO LIPÍDICO E DA
TUMORIGÊNESE NA LINHAGEM DE CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO
MDA-MB-231 SUPLEMENTADA COM ÁCIDO DOCOSAHEXAENÓICO.**

BRASÍLIA

2015

LARISSA FERNANDA MELO VASCONCELOS

**AÇÃO DA VITAMINA “E” NA MODULAÇÃO DO METABOLISMO LIPÍDICO E DA
TUMORIGÊNESE NA LINHAGEM DE CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO
MDA-MB-231 SUPLEMENTADA COM ÁCIDO DOCOSAHEXAENÓICO.**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Nutrição Humana da Faculdade de Saúde da Universidade de
Brasília, para a obtenção do Grau de Mestre em Nutrição
Humana, na linha de pesquisa Nutrição e Doenças Crônicas
não Transmissíveis.**

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Nathalia Marcolini Pelucio Pizato

**BRASÍLIA
2015**

LARISSA FERNANDA MELO VASCONCELOS

**AÇÃO DA VITAMINA “E” NA MODULAÇÃO DO METABOLISMO LIPÍDICO E DA
TUMORIGÊNESE NA LINHAGEM DE CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO
MDA-MB-231 SUPLEMENTADA COM ÁCIDO DOCOSAHEXAENÓICO.**

Data: 10 de setembro de 2015

Banca Examinadora

Prof.^a Dra. Nathalia Marcolini Pelucio Pizato (Presidente)
Programa de Pós-graduação em Nutrição Humana- Universidade de Brasília

Prof.^a Dra. Sandra Fernandes Arruda (Membro)
Programa de Pós-graduação em Nutrição Humana- Universidade de Brasília

Prof.^a Dra. Kelly Grace Magalhães (Membro)
Programa de Pós-graduação de Biologia Molecular- Universidade de Brasília

Prof.^a Dra. Marina Kiyomi Ito (Membro suplente)
Programa de Pós-graduação em Nutrição Humana- Universidade de Brasília

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, sem Ele eu nunca teria tido a honra de realizar esse sonho. Também agradeço a todos que, sem dúvida, colaboraram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

A Prof. Dr^a Nathalia Marcolini Pelucio Pizato, pela dedicação e sabedoria e por ter acreditado na minha capacidade, obrigada por todos os ensinamentos e direcionamentos e apoio em todas as etapas do trabalho, sem você eu nunca conseguiria.

A Prof. Dr^a Kelly Grace Magalhães, por todos os momentos planejamento, de ensinamento e direcionamento na bancada e pelas palavras de incentivo e também por acreditar em minha capacidade e pelo incentivo para encarar novos desafios com segurança.

A minha amiga querida, Beatriz Christina Luzete pelo apoio na realização do trabalho, companhia e paciência nas horas e horas de bancada, obrigada pela dedicação e pelas palavras sábias nos momentos difíceis e pelo seu sorriso e carinho nos momentos de alegria com os bons resultados.

A todos os meus amados colegas de trabalho pelo apoio e paciência para me ensinar e insentivar.

Aos meus queridos e amados pais, José Arimatéia Luiz de S. Vasconcelos e Aleide Jeane de Melo Vasconcelos, por todos os incentivos, apoio e paciência que me ajudaram imensamente a prosseguir com o trabalho até o fim. Sem vocês não conseguiria realizar esse sonho.

Ao meu amado e querido marido, Romulo P. Kiffer que sempre me incentivou e me deu muito apoio e carinho ao longo do mestrado.

A todos os meus queridos amigos que sempre me apoiaram e incentivaram com boas palavras e orações.

RESUMO

INTRODUÇÃO: O ácido graxo poliinsaturado docosahexaenóico (DHA), da família Ômega-3, e a Vitamina E são bastante estudados no microambiente tumoral em virtude da sua atuação como fator de proteção contra a progressão do câncer de mama, porém a atividade desses compostos na biogênese de corpúsculos lipídicos em células tumorais ainda é um pouco explorada. **OBJETIVO:** Investigar a ação de diferentes isoformas da vitamina E (Alfa-tocoferol, Delta-tocoferol e o Delta-tocotrienol) em células da linhagem de câncer de mama MDA-MB-231 suplementadas com DHA, na atuação na modulação do metabolismo lipídico e tumorigênese. **METODOLOGIA:** Células MDA-MB-231 foram tratadas com o 50 μM de DHA, 5 μM das isoformas de vitamina E ou ambos (coestimulos) para avaliar citotoxicidade, indução de espécies reativas de oxigênio, biogênese de corpúsculos lipídicos, expressão do receptor $\text{PPAR}\gamma$, lipofagia, e parâmetros da carcinogênese como a proliferação, a sobrevivência e a migração celular. **RESULTADOS:** O DHA e as vitaminas “E” não reduziram a viabilidade das células nas dosagens estudadas, sendo que o DHA aumentou a produção de ROS, e o coestimulo com Delta-Tocotrienol inibiu a produção de ROS. Houve aumento na biogênese de corpúsculos lipídicos nos tratamentos, porém as vitaminas “E” e os coestimulos apresentaram menor expressão de $\text{PPAR}\gamma$. A lipofagia foi identificada nos tratamentos com DHA e DHA + Delta-Tocotrienol. Em relação aos parâmetros de tumorigênese, foi verificada diminuição da migração celular nos tratamentos com DHA e coestimulos de DHA + Delta-Tocoferol e DHA + Delta-Tocotrienol. **CONCLUSÃO:** A presença das diferentes isoformas de vitamina E modulam a biogênese dos corpúsculos lipídicos, e na presença do Delta-Tocotrienol há maior ocorrência de lipofagia e menor migração celular.

Palavras chave: Ômega-3, Vitamina E, Corpúsculos lipídicos, Câncer de Mama.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Polyunsaturated fatty docosahexaenoic acid (DHA), the omega-3 family, and Vitamin E are extensively studied in the tumor microenvironment by virtue of its role as a protective factor against progression of breast cancer, but the activity of these compounds in biogenesis of lipid droplets in tumor cells is still a little explored. To investigate the action of different isoforms of vitamin E (alpha-tocopherol, delta-tocopherol and delta-tocotrienol) in MDA-MB-231 breast cancer cell line supplemented with DHA, in acting in the modulation of lipid metabolism and tumorigenesis. **METHODOLOGY:** MDA-MB-231 cells were treated with 50 μ M of DHA, 5 μ M isoforms of vitamin E or both (coestimulos) to assess cytotoxicity, induction of reactive oxygen species, biogenesis lipid droplets, PPAR gamma receptor expression, lipofagia and carcinogenesis parameters such as proliferation, survival, and cell migration. **RESULTS:** The DHA and vitamins "E" did not reduce cell viability in the studied dosages, and DHA increased ROS production, and coestimulo with Delta-Tocotrienol inhibited the ROS production. There was an increase in the biogenesis of lipid droplets in treatments, however vitamins "E" and coestimulos had lower expression of PPAR gamma. The lipofagia was identified in the treatments with DHA and DHA + Delta-Tocotrienol. In relation to tumorigenesis parameters, it was found decreased cell migration in treatment with DHA and DHA + coestimulos of Delta-Tocopherol and DHA + Delta-Tocotrienol. **CONCLUSION:** The presence of different isoforms of vitamin E modulate the biogenesis of lipid droplets, and Delta-Tocotrienol's presence is higher occurrence of lipofagia and lower cell migration.

Keywords: Omega-3, Vitamin E, lipid droplets and breast cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Vitamina E.....	14
Figura 2- (A) Citotoxicidade do DHA, do Alfa-Tocoferol (Alfa-T), do Delta-Tocoferol (Delta-T) e do Delta-Tocotrienol (Delta-T3), sobre células MDA-MB-231.....	29
Figura 3- Citotoxicidade dos diluentes etanol (0,5µL e 4µL) e DMSO (0,5µL e 2µL) ou DMSO (0,5µL) + Etanol (0,5µL) sobre células s MDA-MB-231.....	30
Figura 4- Formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelo DHA em células MDA-MB-231.....	31
Figura 5- Citotoxicidade do Alfa-T, Delta-T, Delta-T3 e do DHA na linhagem de células mononucleares (monócitos) humanos.....	32
Figura 6- Citotoxicidade dos diluentes etanol (0,5µL) ou DMSO (0,5µL) ou etanol (0,5µL) + DMSO (0,5µL) sobre a linhagem de células mononucleares humanas.....	33
Figura 7- Formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelo DHA ou as vitaminas E ou seus coestimulos em células MDA.MB.231.....	35
Figura 8- Formação de corpúsculos lipídicos induzido DHA em células MDA-MB-231.....	37
Figura 9- Formação de corpúsculos lipídicos induzido pelo DHA, alfa-T e pelo coestimulo de DHA + Alfa-T em células MDA-MB-231.....	38
Figura 10- Formação de corpúsculos lipídicos induzido pelo DHA e Delta-T ou pelo coestimulo de DHA + Delta-T em células MDA-MB-231.....	40
Figura 11- Formação de corpúsculos lipídicos induzido pelo DHA e Delta-T ou pelo coestimulo de DHA + Delta-T3 em células MDA-MB-231.....	42
Figura 12- Tamanho dos corpusculos lipídicos das células MDA-MB-231 tratadas com DHA e/ou as vitaminas E.....	44
Figura 13- Expressão do PPAR γ nas células MDA-MB-231 tratadas por 24 horas com o Ácido Docosahexaenóico (DHA) 50µM e/ou com seu coestimulo com Alfa-T, ou Delta-T ou Delta-T3.....	46
Figura 14- Indicação de lipofagia em células MDA-MB-231 tratadas com DHA ou Delta-T ou pelo coestimulo de DHA + Delta-T.....	48
Figura 15- Indicação de lipofagia em células MDA-MB-231 tratadas com DHA ou Delta-T3 ou pelo coestimulo de DHA + Delta-T3.....	49
Figura 16- Quantificação da proliferação celular das células MDA-MB-231 tratadas com Alfa-T, Delta-T, Delta-T3 e o DHA ou os seus coestimulos de DHA em células MDA-MB-231.....	51
Figura 17- Sobrevivência das células MDA-MB-231 tratadas com Alfa-T, Delta-T e Delta-T3, DHA e os seus coestimulos.....	52
Figura 18- Migração das células de câncer de mama MDA-MB-231 tratadas com DHA e coestimulos de DHA com as vitaminas E por um período de 0hora, 16horas e 24 horas...53/54	53/54
Figura 19- Migração das células de câncer de mama MDA-MB-231 tratadas com as vitamina E, por um período de 0hora, 16horas e 24 horas.....54/55	54/55
Figura 20- Esquema do possível mecanismo pelo qual o DHA e o Delta-T3 modulam a quantidade de corpúsculos lipídicos (CLs) em células de câncer de mama MDA-MB-231.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – Ácido Araquidônico
ACC1 - Acetil-Coa Carboxilase 1
AG - Ácidos Graxos
Akt - Proteína Quinase B
Alfa-T – Alfa Tocoferol
Atg - Autophagy Genes
Bodipy - 4,4-Difluoro-1,3,5,7,8-Pentametil-4-Bora-3',4'-Diaza-S-Bodipy
CA - Câncer
CDK- Ciclinas
CL- Corpúsculos Lipídicos
CNE - Controles Não Estimulados
CNM - Controle Não Marcado
COX - Ciclooxygenase
CPT1 - Carnitina Palmitoiltransferasa I
DAPI - *4',6-Diamidino-2-Phenylindole*
Delta-T – Delta Tocoferol
Delta-T3 – Delta Tocotrienol
DHA – Ácido Docosahexaenóico
DMSO - Dimetil Sulfoxido
DNA- Ácido Desoxirribonucleico
EPA- Ácido Eicosapentaenóico
FAS - Ácido-Graxo Sintase
HDL - Lipoproteínas de Alta Densidade
HER-2 – Receptor do Fator de Crescimento Epidermal 2
Huh-7- Carcinoma Hepatocelular
INCA- Instituto Nacional do Câncer
KCl – Cloreto de Potássio
KH₂PO₄ - Fosfato Monopotássico
LC3-I- Ligth Chain 3-I
LC3-II - Ligth Chain 3-Ii
LDL - Lipoproteína Baixa Densidade
LDLR- Receptor da Lipoproteína Baixa Densidade
LOX 5- Lipoxigenase
LPS - *Lipopolissacarídeo* Da *Escherichia Coli*
LTC4 Leucotrienos C4-Sintase
MTT- Brometo de 3-[4,5-Dimetil-Tiazol-2-II]-2,5-Difeniltetrazólio
Na₂HPO₄ – Fosfato de Sódio Dibásico
NaCl – Cloreto de Sódio
NFkB – Fator Nuclear “Kappa Be”
NOS- Espécies Reativas de Nitrogênio
PI3K - Fosfatidilinositol 3-Quinase
PPARγ- Receptor Gama de Proliferação Ativada do Peroxissomo
RE – Receptor de Estrogênio
RH - Receptor Hormonal
ROS - Espécies Reativas de Oxigênio
RP - Receptor De Progesterona
SCD - Estearoil-Coa Desaturase-1
SFB – Soro Fetal Bovino
SREBP 1c - Proteína 1c Ligadora do Elemento Regulatório de Esterol

T - Tocoferol

T3 - Tocotrienol

TME – Transição Mesenquimal para Epitelial

UCP2 - Proteínas de Desacoplamento 2

ω -3 – Ômega-3

ω -6 – Ômega-6

μ M - Micro Molar

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA:	3
2.1- Câncer de mama:.....	3
2.2- Corpúsculo lipídico:	5
2.3-Autofagia e Lipofagia.....	9
2.5- PPAR- γ	12
2.6- Vitamina E:.....	13
2.7-Ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) ω -3 e ω -6.....	16
3. OBJETIVOS.....	19
3.1-Objetivo geral:	19
3.2-Objetivos específicos:.....	19
4. METODOLOGIA	20
4.1- Células e Reagentes.....	20
4.2-Cultura de células.....	20
4.3- Delineamento do estudo	20
4.4-Curva de citotoxicidade.....	21
4.5-Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS).....	22
4.6-Biogênese de corpúsculos lipídicos.....	22
4.7- Expressão de PPAR- γ	24
4.8- Análise da lipofagia.....	24
4.9- Proliferação celular	25
4.10- Ensaio de sobrevivência celular	26
4.11- Ensaio de migração celular	26
4.12-Análise Estatística	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1-Citotoxicidade.....	28
5.2-Geração de espécies reativas de oxigênio (ROS)	32
5.3-Biogênese de corpúsculos lipídicos.....	35
5.4-Expressão de PPAR γ	45
5.4- Lipofagia.....	47
5.5-Tumorigênese.....	51
5.5.1-Proliferação celular	51
5.5.2-Sobrevivência Celular	52
5.5.3-Migração celular	53
6. CONCLUSÃO.....	58
7. REFERENCIAS.....	59
8. FIGURAS SUPLEMENTARES.....	69

1. INTRODUÇÃO

O câncer (CA) de mama é uma doença de alta incidência em todo mundo, e no Brasil as taxas de mortalidade continuam elevadas, provavelmente devido a doença ainda ser diagnosticada em estádios avançados, o que diminui as chances de cura (BRASIL, 2014).

O ácido graxo poliinsaturado da família Ômega-3 (ω -3) docosahexaenóico (DHA) já é bastante estudado no ambiente tumoral em virtude da sua atuação como fator de proteção contra a progressão do câncer de mama, devido as suas propriedades imunomoduladora e antiinflamatória, e através da sua ação em vias de peroxidação (oxidação) e de ativação de vias de morte celular programada (XIONG *et al.*, 2012; MERENDINO *et al.*, 2013; VAUGHAN *et al.*, 2013). No entanto a sua atividade na biogênese de corpúsculos lipídicos em células tumorais ainda é um campo de estudo pouco explorado, apesar da atividade antitumoral deste ácido graxo já ser bem descrita (SIDDIQUI *et al.*, 2011; COCKBAIN *et al.*, 2010), tornando-o um composto bioativo bastante utilizado na prática clínica com pacientes diagnosticados com diferentes tipos de câncer, o que ainda o faz ser um alvo de estudo interessante é que sua atividade na biogênese de corpúsculos lipídicos ainda é obscura (LEE *et al.*, 2013; KNÆVELSRUD *et al.*, 2012).

A vitamina E tem surgido como um potencial adjuvante ou inibidor da ação dos ácidos graxos ω -3 no câncer de mama (XIONG *et al.*, 2012) e em outros tipos de cancer (DING *et al.*, 2007; STURLAN *et al.*, 2003; YAM *et al.*, 2001). A vitamina E também é descrita como fator de proteção contra o CA de mama, e sua atividade anti-cancerígena já foi investigada em outros estudos (KLINE; LAWSON *et al.*, 2007; LOGANATHAN *et al.*, 2012). Alguns mecanismos de ação foram propostos como sua capacidade de inibir os receptores de estrógeno (RE), que quando ativos estimulam a proliferação celular (RUSSO *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2009) e pode estar relacionada ao aumento da expressão e atividade do receptor ativado pelo proliferador de peroxissoma (PPAR γ), conhecido por estar envolvida na absorção de ácidos graxos e por agir no controle da inflamação e na indução da apoptose, inibindo a proliferação de células cancerígenas e diminuindo sua sobrevivência (MICHALIK, DESVERGNE, WAHLI, 2004).

Apesar da vitamina E atuar no microambiente tumoral como anti-oxidante e anti-inflamatório (JIANG; ELSON-SCHWAB *et al.*, 2000; KLINE, LAWSON *et al.*, 2003; BARVE, KHOR, *et al.*, 2009; STONE, KRISHNAN, *et al.*, 2004; CHAMRAS, BARSKY *et al.*, 2005), a sua atividade ainda é pouco estudada na formação dos corpúsculos lipídicos (CL), assim como o DHA (UTO-KONDO, OHMORI, KIYOSE *et al.*, 2009; BURDEOS, NAKAGAWA *et al.*, 2014).

Novas abordagens como a quantificação de corpúsculos lipídicos são sugeridas em relação ao mal prognóstico e uma menor sobrevida em alguns tipos de tumores, devido à correlação entre ativação da síntese de lipídios *de novo* e o seu acúmulo nos corpúsculos lipídicos (NIEVA *et al.*, 2013). Esse estudo realizado por Nieva e colaboradores (2013) sugere a hipótese de que o teor de lipídios das células de câncer de mama pode ser uma medida útil em uma série de funções acopladas a progressão do câncer de mama de diferentes malignidades. Abramczyk e colaboradores (2015) avaliaram a quantidade de corpúsculos lipídicos em diferentes linhagens de câncer de mama invasivo (MDA-MB-231) e não invasivo (MCF-7) e também em células de mama saudáveis (MCF-10) e observaram que na linhagem MDA-MB-231 são encontrados quatro vezes mais corpúsculos lipídicos do que nas células MCF-10, e que as células MCF-7 possuem 2 vezes mais corpúsculos do que as MCF-10, sugerindo que o aumento de corpúsculos lipídicos correlaciona-se com o aumento da agressividade do câncer (NIEVA *et al.*, 2013).

Nesse sentido, este estudo propôs investigar a ação de diferentes isoformas da vitamina E, dentre elas o Alfa-tocoferol (Alfa-T), o Delta-tocoferol (Delta-T) e o Delta-tocotrienol (Delta-T3), na ação antitumoral do DHA, e sua ação na modulação da biogênese de corpúsculos lipídicos.

Sabendo que o aumento na quantidade de CL no citoplasma de células mamárias pode estar relacionado com o aumento do estoque de lipídios intracelulares, que normalmente é acentuado nos tecidos cancerígenos e que esse aumento pode ocorrer a partir de substratos lipídicos presentes no microambiente tumoral, a presença de maiores concentrações de DHA, fornecido às células tumorais como um suplemento lipídico, pode levar a um maior acúmulo dos lipídios intracelulares, e esses lipídios armazenados podem ser utilizados como substrato energético para a maior proliferação das células tumorais. Este estudo propôs avaliar se a vitamina “E” associada ou não ao DHA pode modular a biogênese de CLs, e assim, observar uma nova atuação desses compostos no microambiente tumoral e abrir um campo para o estudos de novas estratégias terapêuticas no tratamento do câncer de mama, como ação do acúmulo de lipídios na tumorigênese, o que poderia refletir no tratamento clínico do paciente e com conseqüente melhora na qualidade de vida (UTO-KONDO, OHMORI, KIYOSE *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2013; BURDEOS, NAKAGAWA *et al.*, 2014).

Anda existe um vasto campo a ser estudado a fim de elucidar a atuação de compostos como o DHA e a Vitamina E em células de câncer de mama e este estudo pode auxiliar na elucidação de mecanismos de ação envolvendo o acúmulo de corpúsculos lipídicos, no microambiente tumoral.

2. REVISÃO DA LITERATURA:

2.1- Câncer de mama:

O câncer (CA) de mama é segundo tipo mais frequente em todo o mundo e é o mais comum entre as mulheres, de acordo com dados do Instituto Nacional do Câncer ele corresponde a 22% dos novos casos de câncer diagnosticados a cada ano (BRASIL, 2014). Esse tipo de câncer é relativamente raro antes dos 35 anos e acima desta faixa etária sua incidência cresce rápida e progressivamente (BRASIL, 2014). Estatísticas indicaram um aumento da incidência do CA de mama tanto nos países desenvolvidos quanto nos em desenvolvimento, e, o INCA estimou 57.120 casos para o ano de 2014. No Brasil, as taxas de mortalidade por esse tipo de câncer ainda continuam elevadas, possivelmente devido a doença ser diagnosticada já em estádios avançados e, na população mundial, a sobrevida média após cinco anos é de 61% (BRASIL, 2014).

O CA de mama possui características clínicas heterogêneas, seu prognóstico é determinado de acordo com o subtipo biológico ao qual pertence. É dividido em dois grupos principais com base na expressão gênica do receptor de estrógeno (RE) ou na ausência da expressão desse receptor (ZEPEDA-CASTILLA *et al.*, 2008). Dentro desses dois grandes grupos ele ainda é subdividido em pelo menos cinco subtipos de acordo com perfis de expressão molecular (JUNG *et al.*, 2014).

No câncer de mama ocorrem diferenças entre a expressão de receptores de estrogênio, progesterona e do receptor do fator de crescimento epidermal 2 (HER-2) que são os três biomarcadores utilizados para o diagnóstico e classificação molecular da doença (AURÍLIO *et al.*, 2014). A classificação molecular para o prognóstico da doença traz *insights* interessantes sobre a taxonomia deste câncer. No entanto, a grande heterogeneidade intratumoral torna a classificação do subtipo molecular um tanto controversa, uma vez, que diferentes níveis de expressão desses receptores também foram mostrados em diferentes tumores do mesmo paciente ou mesmo em diferentes regiões no mesmo tumor, o que pode gerar resultados falsos positivos na classificação do subtipo molecular (AURÍLIO *et al.*, 2014). Além disso, a sua implementação como rotina no sistema clínico é questionável devido ao seu alto custo e também pela informação fornecida ser fruto de amostra retirada de um único local do tumor, por isso, essa classificação não mais é considerada suficientemente confiável (NIEVA *et al.*, 2013).

Aproximadamente 60-80% dos CAs de mama são positivos para os receptores hormonais (RH) (JUNG *et al.*, 2014), e esses CAs de mama RH-positivos possuem prognóstico mais favorável do que os RH-negativos (SUN *et al.*, 2014). Historicamente,

utiliza-se do sistema de estadiamento como o principal determinante do prognóstico e da necessidade de tratamento adjuvante em pacientes com câncer de mama (TORRISI *et al.*, 2013). No entanto, o estadiamento é realizado através das características anatômicas dos tumores e considera o câncer de mama como uma doença única; assim, é sub-ótima para refletir a heterogeneidade biológica desse tipo de câncer. Por isso, recentemente, com a rápida evolução da biologia molecular tem-se criado diferentes estratégias terapêuticas baseados nos subtipos moleculares de câncer de mama (TORRISI *et al.*, 2013).

No ano 2000, Perou e colaboradores classificaram o cancer de mama dentro de subtipos, baseados no seu perfil de expressão gênica. Quatro subtipos foram identificados inicialmente: normal like (uma categoria que permanece incerta, devido, em alguns casos, as amostras desse subtipo se contaminarem com amostras de células do tecido normal da mama), Luminal (dois grupos: Luminal A e B), sendo estes cânceres positivos para o receptor de estrógeno (RE+) e abrangem 60–70% casos diagnosticados (BLOWS; DRIVER; SCHMIDT *et al.*, 2010), um terceiro grupo chamado HER2+ foi assim nomeado por possuir o receptor do fator de crescimento epidermal 2 (HER-2+) e corresponde a 18–25% dos casos de cânceres de mama humano (OWENS; da SILVA, 2004), o quarto grupo caracterizado é negativo para HER-2 e para receptor de estrógeno (RE-) e foi classificado como Basal like (SORLIE *et al.*, 2003).

Em 2007 Herschkowitz e colaboradores descreveram um quinto subtipo, o Claudin-low. As células desse subtipo são semelhantes a células de iniciação tumoral com características genéticas de células-tronco de origem mamaria e são encontradas em tumores de mama humanos primários (HENNESSY, GONZALEZ-ANGULO *et al.*, 2009; PRAT *et al.*, 2010). O subtipo Claudin-low, compreende a 5-10% dos cânceres de mama, ele é triplo negativo aos receptores de estrógeno (RE), progesterona (RP), e fator de crescimento epidermal 2 (HER-2) (HERSCHKOWITZ *et al.*, 2007). Esse subtipo é destacado pela expressão de proteínas de junção célula-célula e por possuírem características de célula tronco em transição de mesenquimal para epitelial (TME) com aumento de marcadores mesenquimais (CREIGHTON *et al.*, 2009; HENNESSY *et al.*, 2009). A transição TME é mais frequentemente encontrada no subtipo basal (SARRIÓ *et al.*, 2008), e o resultado da aquisição dessas características mioepiteliais por células epiteliais de origem luminal está associada com o aumento da agressividade, da invasividade, do potencial metastático e a um pior prognóstico (JONES *et al.*, 2004). Um estudo realizado por Prat e colaboradores (2013) mostrou que 9 linhagens celulares que antes eram caracterizadas como do subtipo basal são na realidade pertencentes ao subtipo claudin-low e são elas: a MDA-MB-231, SUM159PT,

MDA-MB-157, BT549, SUM1315MO2, MDA-MB-436, MDA-MB-435, HBL-100 e Hs578T.

O CA de mama do subtipo triplo negativo, ao qual o perfil claudin-low pertence, é então definido pela ausência da expressão de ambos os receptores de estrogênio (RE-) e progesterona (RP-), bem como a ausência de receptor do fator de crescimento epidermal 2 (Her-2-) (TENG *et al.*, 2011). Tem um prognóstico ruim devido à falta de terapia direcionada para seu tratamento, e a única opção terapêutica atualmente disponível para o CA de mama triplo negativo é a quimioterapia. Esse câncer compreende 15-20% da incidência dos cânceres de mama humano disgnosticados (BUZDAR *et al.*, 2005). Mesmo assim, ainda se tem um prognóstico ruim, devido à resistência às drogas e a sua toxicidade (IRSHAD *et al.*, 2011). Esse tipo de CA de mama tem altas taxas de recorrência, de metástases nos sistemas nervoso periférico e central, e de morte precoce (DENT *et al.*, 2009).

Os subtipos moleculares de CA de mama ajudam a explicar as diferenças no comportamento dos tumores em sua resposta ao tratamento, apesar de suas similaridades morfológicas (SORLIE *et al.*, 2003). Mas, apesar dos avanços na classificação dos subtipos moleculares do CA de mama esse tipo de classificação ainda é caro e, por isso, não é utilizado como rotina na prática clínica. Diante disso, novos tipos de classificação são propostas como a quantificação de lipídios intracelulares, por ser um método preciso e menos oneroso. Alguns estudos tem mostrado que células de câncer de mama possuem um acúmulo maior de lipídios do que células saudáveis da mama, e quanto maior o grau de agressividade do subtipo de câncer de mama maior a quantidade de lipídios intracelulares (ABRAMCZYK; SURMACKI *et al.*, 2015).

2.2- Corpúsculo lipídico:

O aumento da biogênese de lipídios em tecidos cancerígenos foi mostrado como um evento importante no metabolismo destas células. Entretanto o papel dos lipídios na transformação celular, no desenvolvimento e progressão tumoral, assim como seu potencial em facilitar a migração de células tumorais para sítios secundários (metástase), ainda não é totalmente entendido (BAENKE; PECK; MIESS; SCHULZE, 2013).

O corpúsculo lipídico (CL) é uma organela intracelular especializada em acumular, armazenar e fornecer lipídios. O CL é uma organela intracelular formada por uma monocamada de fosfolípidos que é decorada com muitas proteínas, entre as quais a proteína relacionada com a diferenciação dos adipócitos (ADRP) e a família perilipin são bem caracterizada (GREENBERG *et al.*, 2011; MACPHERSON *et al.*, 2012). Por décadas os CLs foram considerados organelas passivas, mas agora já é descrito que trata-se de uma organela

complexa e dinâmica, com um papel central na regulação da homeostase dos lipídios (POL, GROSS *et al.*, 2014).

Essa organela é especializada em armazenar lipídios neutros, incluindo triglicerídeos e ésteres de colesterol, são formados sob duas condições ambientais diferentes. Em primeiro lugar, as células acumulam CLs em resposta a disponibilidade exógena de lipídios e pensa-se que os ácidos graxos armazenados nos CLs são utilizados como substrato para o metabolismo energético, síntese de membranas celulares e produção de moléculas derivadas de lipídios tais como lipoproteínas, sais biliares, hormônios e mediadores lipídicos do sistema imune os eicosanóides (POL, GROSS *et al.*, 2014). Em segundo lugar, muitos tipos de estresses celulares, incluindo a inflamação e estresse oxidativo, também podem induzir a biogênese de CLs (YOUNCE; KOLATTUKUDY, 2012) o que reflete o papel dos CL em processos não diretamente relacionados com o metabolismo lipídico, tais como na degradação de proteínas ou na imunidade. O acúmulo de CLs também ocorre durante a progressão de patologias não obviamente relacionadas com lipídios como: cardiopatias, neuropatias, ou durante a hepatite viral (VALLET-PICHARD *et al.*, 2012).

O armazenamento de lipídios celulares é variável, e reflete o balanço entre a chegada dos lipídios nas células e o seu consumo por elas; um acúmulo excessivo de CLs também ocorre em doenças relacionadas com a gordura como a obesidade e a aterosclerose (KRAHMER *et al.*, 2013). Então, o balanço entre a oferta e o consumo de lipídios determina os níveis de CLs, e estes níveis podem ser bastante heterogêneos mesmo em células idênticas (HERMS *et al.*, 2013).

Além disso, os CLs apresentam uma grande quantidade de ácidos graxos dentre eles o ácido araquidônico, pertencente a família ômega-6, que é o principal substrato utilizado na síntese dos eicosanóides, que são mediadores lipídicos participantes da resposta imunológica. Os CLs também possuem uma grande quantidade de proteínas relacionadas com o processo de sinalização celular e endereçamento de vesículas (WAN *et al.*, 2007). E também podem apresentar enzimas diretamente relacionadas à síntese de eicosanóides, como as ciclooxigenases e as lipooxigenases (BOZZA *et al.*, 2011).

Portanto, os CL, são organelas dinâmicas, funcionalmente ativas, que tanto contribuem para a gênese da resposta inflamatória como agem no controle de doenças inflamatórias. Embora os CLs tenham um papel central na inflamação e sejam considerados marcadores estruturais de células inflamatórias em uma variedade de doenças (BOZZA *et al.*, 1997) sua ação do ambiente tumoral ainda não é totalmente conhecida.

As células cancerígenas frequentemente apresentam alterações específicas em sua atividade metabólica. Esta reprogramação metabólica ocorre para suprir o aumento da produção de intermediários metabólicos para a síntese de proteínas e lipídios, e é um pré-requisito para a rápida proliferação de células cancerígenas (BAENKE, PECK, MIESS e SCHULZE, 2013). As alterações metabólicas mais proeminentes no câncer são o aumento da absorção de glicose e a utilização da glicólise, denominado o efeito de Warburg. No entanto, outros processos metabólicos incluindo a biossíntese de proteínas, ácidos nucleicos e lipídios também são aumentadas como parte da progração metabólica associada ao câncer (BAENKE, PECK, MIESS e SCHULZE, 2013).

A maioria dos tecidos mamíferos adultos satisfazem as suas necessidades de lipídios através a absorção de ácidos graxos livres (AGLs) e lipoproteínas, tais como a lipoproteína de muito baixa densidade VLDL, a partir da corrente sanguínea. A biossíntese de ácidos graxos e do colesterol é restrita a um subconjunto de tecidos, incluindo o fígado, o tecido adiposo e tecidos mamários. No entanto, no tecido cancerígeno é frequentemente observada a ativação da biossíntese de lipídios (MENENDEZ e LUPU, 2007). Por isso, ao longo dos últimos anos, tem se dado cada vez mais atenção aos estudos dos processos metabólicos envolvidos na biossíntese de lipídios e sua regulação no contexto do câncer (BAENKE, PECK, MIESS e SCHULZE, 2013)

Desde o século passado estudos já demonstravam que células cancerígenas são capazes de sintetizar lipídios através da lipogênese (MEDES *et al.*, 1953). Desde aquela época já era descrito que o tecido tumoral apresenta níveis de biossíntese de lipídios comparáveis ao tecido do fígado, que possui uma alta taxa de síntese lipídica. Embora Medes e seus colaboradores já tenham observado que o tecido tumoral era capaz de utilizar lipídios presentes no ambiente tecidual, eles já sabiam que a síntese de lipídios *de novo* fornece a maioria dos lipídios necessários para a rápida proliferação das células cancerígenas.

Sendo assim, uma das características mais importantes das células cancerígenas é a reforçada lipogênese. Dependendo do tipo de câncer, as células tumorais produzem até 95% de ácidos graxos saturados e monoinsaturados através da síntese de novo de lipídios, mesmo com fornecimento dietético suficiente. Essa síntese de lipídios *de novo* começa cedo, quando as células se tornam cancerígenas e têm uma elevada taxa de expansão, quando as células se tornam mais malignas conforme possuem uma maior capacidade de proliferação. É sugerido que a ativação da síntese de lipídios é necessária para a carcinogênese e para sobrevivência das células cancerígenas. Recentemente, foi relatado que os tumores mamários e o lipossarcoma estão equipados tanto para a síntese *de novo* de ácidos graxos, bem como para

lipólise extracelular e estas observações indicam que os ácidos graxos adquiridos podem fornecer uma fonte adicional de lipídios para o câncer (ZAIDI, LUPIEN e KUEMMERLE *et al.*, 2013).

Mais evidências de que a síntese de lipídios *de novo* é importante no ambiente tumoral é que a inibição de enzimas participantes da biossíntese de ácidos graxos, como a ácido graxo sintase (Fatty acid synthase FAS), pode bloquear o crescimento de células cancerígenas (ABRAMSON, 2011; IGAL, 2010; MENENDEZ e LUPU, 2007; SANTOS e SCHULZE, 2012;. SWINNEN *et al.*, 2006; ZAIDI *et al.*, 2012). A maioria dos esforços para inibir a síntese de lipídios farmacologicamente centraram-se na enzima FAS, e os efeitos dos inibidores desta enzima são investigados em diferentes modelos pré-clínicos de câncer (KUHAJDA *et al.*, 2000;. LI *et al.*, 2001;. PUIG *et al.*, 2009; ZHAN *et al.*, 2008). Esse inibidores da FAS têm demonstrado boa eficiência na quimioprevenção do cancer de mama em camundongos transgênicos para o receptor do fator de crescimento epidermal (HER-2) (ALLI *et al.*, 2005).

Sabendo-se também que o dano oxidativo é um dos mecanismos que levam a morte de células tumorais (DING *et al.*, 2004; APPOLINÁRIO *et al.*, 2011; SKENDER *et al.*, 2012) e que alterações na saturação dos ácidos graxos pode alterar drasticamente essas propriedades e afetar alguns aspectos da maquinaria celular. Se tem descrito que a mudança no acúmulo de lipídios e na síntese *de novo* de lipídios através da gênese de CLs em células de câncer leva ao aumento da saturação dos lipídios de membrana, resultando em altos níveis de fosfolipídios saturados e monoinsaturados, o que potencialmente protege as células cancerígenas dos possíveis danos causados pelo aumento do estresse oxidativo por reduzir a peroxidação lipídica (RYSMAN *et al.*, 2010). Além disso, o aumento dos níveis de ácidos graxos saturados, associados com a redução da fluidez da membrana, são também encontrados em cânceres de mama agressivos, sugerindo que a redução da fluidez da membrana é uma característica da doença avançada (HILVO *et al.*, 2011) e protege a célula de danos oxidativos.

Partindo do conhecimento de que o aumento do estresse oxidativo pode favorecer a biogênese de corpúsculos lipídicos o estudo da atuação de antioxidantes na modulação da biogênese dessa organela é interessante, pouco se sabe sobre a atuação da vitamina E antioxidante na modulação da biogênese de CLs, alguns estudos publicados têm dado foco aos tocotrienóis, uma vez, que estes foram relatados por suprimirem a diferenciação de adipócitos via fosforilação do Akt, uma proteína A serina-treonina quinase Akt (também conhecida como PKB) que é uma proteína efetora central do fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato e tem

atividade supressora de tumores (SOUZA *et al.*, 2014) quando é ativada pode inibir a apoptose e a autofagia através da proteína mTOR (BAEHRECKE *et al.*, 2005). E também por exercer atividades importantes como agente antiinflamatório ao atenuar a ativação do fator nuclear “kappa be” (NFkB) e na expressão de adipocinas inflamatórias em adipócitos, no entanto, as vias de modulação do metabolismo lipídico são muito mais complexas e apenas regular a produção de adipocinas inflamatórias não mostra um grande potencial dos T3 na modulação na biogênese de corpúsculos lipídicos, assim a escassez de dados relativos ao impacto dos T3 como um regulador potencial do acúmulo intracelular de lipídico abre um novo campo de investigação da atividade biológica desses compostos.

Burdeos e colaboradores (2014) estudaram a atividade dos tocotrienos (T3) no metabolismo lipídico através da investigação de genes envolvidos na diferenciação de preadipócitos 3T3-L1 e acúmulo ou β -oxidação de lipídio nessas células. As células 3T3-L1 foram tratadas com diferentes isômeros dos tocotrienos (Alfa-T3, Delta-T3, Gama-T3 e Beta-T3) e também com o Alfa-Tocoferol, nesse estudo os triglicerídeos (TG) celulares foram extraídos e quantificados, e ao contrario do observado em nosso modelo estes autores observaram que os tocotrienos reduziram acentuadamente a quantidade de triglicerídeos nas células diferenciadas, e que o Delta-T3, o Gama-T3 e o Beta-T3 reduziram os TG e o Alfa-T não possuía esta capacidade, interessante eles notaram que não existia diferença na concentração celular de ambos os T3 e o Alfa-T e apesar disso apenas os T3 reduziram TG, o que os levou a concluir que a estrutura molecular dos T3 tem papel fundamental na sua atividade biológica.

Além disso, estes autores encontram que os tocotrienos reduzem de forma significativa o acúmulo de corpúsculos lipídicos em pré-adipócitos diferenciados, todas as isoformas de T3 reduziram CL enquanto a alfa-Tocoferol não mostrou redução na biogênese de CLs, doses menores de T3 (0-5 μ M) não reduziram o acúmulo de TG provavelmente porque nessa dosagem foi observada maior proliferação celular, mostrando um potencial dessa isoforma de vitamina E na modulação da gênese de CLs.

2.3-Autofagia e Lipofagia

Estudos recentes tem relacionado o metabolismo lipídico com a autofagia, esta é uma via de degradação que inclui a macroautofagia, microautofagia e a autofagia mediada por chaperonas (MIZUSHIMA e KOMATSU, 2011). É utilizada pelas células para remover proteínas e organelas defeituosas, promover a sobrevivência celular, ou sua morte, participa do metabolismo, do desenvolvimento, da infecção, da imunidade e do envelhecimento

(MEHRPOUR *et al.*, 2010), além disso também é requerida em condições de privação de nutrientes para oxidação dos lipídios celulares para o suprimento de energia. Sendo assim, os lipídios são componentes integrais do processo autofágico e podem impactá-lo em diferentes níveis (DALL'ARMI *et al.*, 2013).

A degradação de lipídios dos corpúsculos em resposta a falta de nutrientes requer componentes da maquinaria autofágica, e a inibição da autofagia leva a um acúmulo de corpúsculos lipídicos e essa mobilização de lipídios intracelulares foi denominada de microautofagia (SINGH *et al.*, 2009). A ligação entre o metabolismo lipídico e autofagia é particularmente interessante porquê cada vez mais evidências confirmam a importância da autofagia no câncer. Estudo tem demonstrado que a autofagia é um mecanismo que permite que as células tumorais mantenham seu suprimento de energia durante a privação de nutrientes e na tumorigênese (GUO *et al.*, 2011). Então a autofagia pode funcionar como uma via de sobrevivência para as células tumorais (WHITE, 2012).

O processo de autofagia se caracteriza pela formação de um autofagossomo formado por uma dupla membrana que se fundem com os lisossomos, que são uma estrutura funcional, a qual recicla e degrada componentes celulares em um ambiente ácido que possui hidrolases lisossomais (KROEMER, 2005). Esse processo é regulado geneticamente por uma família de proteínas chamadas Atg (Autophagy genes), que são diferenciadas da sigla por meio de números. As Atg5, Atg7, Atg8, Atg10 e Atg12, são as primeiras recrutadas durante a autofagia e são responsáveis pela formação do autofagossomo. A Atg8, conhecida como LC3 (Light Chain 3), se apresenta em duas formas, a LC3-I (localizada no citosol) e a forma proteolítica LC3-II (localizada na membrana do autofagossoma) (KOGEL *et al.*, 2010). A LC3 é uma proteína ubiquitina-ligase, que pode ser conjugada com a fosfatidiletalona (PE). Inicialmente a LC3 é sintetizada em uma forma não processada, a proLC3, que é clivada no carbono terminal, o que resulta em LC3-I, só depois ela é conjugada a PE, e forma a LC3-II. A LC3-II é a única proteína marcadora fielmente associada ao estágio completo de formação do autofagossomo (KLIONKY *et al.*, 2012) e também é nomeada com LC3-B.

Como já descrito os lipídios intracelulares são armazenados nos corpúsculos lipídicos (CLs) e podem ser metabolizados por enzimas hidrolases para fornecer energia para a célula. Recentemente, tem sido descrito uma via alternativa para o metabolismo de lipídios através autofagia que é um tipo de degradação lisossômica denominada lipofagia. Nessa via os triglicerídeos (TG) e ésteres de colesterol (EC) são engolfados for autofagossomas e entregues para os lisossomos para sua degradação por hidrolases ácidas. Os ácidos graxos (AG) livres gerados por lipofagia pela quebra de TGs servem como combustível para a β -oxidação

mitocondrial. Portanto a lipofagia tem como uma de suas funções regular o fornecimento de lipídios intracelulares para manter a homeostase energética (LIU e CZAJA, 2013).

A quantidade de lipídios metabolizados por lipofagia varia em resposta ao fornecimento extracelular de nutrientes. Os mecanismos celulares que regulam os níveis de autofagia são pouco claros, sabe-se que se a autofagia for prejudicada pode ocorrer um acúmulo excessivo de lipídios e doenças como esteatose hepática, alteração da liberação de neuropeptídios do hipotálamo o que pode afetar a massa corporal, pode também alterar mecanismos de transdiferenciação celular e levar as células a morte programada. Futuros estudos poderão identificar mais mecanismos regulados pela lipofagia, fazendo com que essa via se torne um potencial alvo terapêutico em uma variedade de doenças (LIU e CZAJA, 2013).

A ocorrência da lipofagia no microambiente tumoral ainda é pouco esclarecida, em algumas circunstâncias a autofagia pode suprimir a tumorigênese, porém na maioria dos contextos a autofagia tem uma atuação mais favorável à tumorigênese (WHITE, 2015).

No microambiente tumoral pode ocorrer um aumento da autofagia como um mecanismo de sobrevivência ao estresse microambiental e para favorecer o crescimento e agressividade do tumor. Um dos mecanismos pelos quais o câncer promove a autofagia inclui a não expressão da proteína p53, uma proteína supressora de tumoral, como um mecanismo de manutenção da função metabólica das mitocôndrias de células cancerígenas. Por isso, os esforços para inibir a autofagia como parte da terapia contra o câncer tem atraído grande interesse (WHITE, 2015). Uma característica de células cancerígenas deficientes de p53, e incapacidade de realizarem a autofagia com conseqüente acúmulo lipídios (GUO et al., 2013). Uma vez que na ausência da proteína p53, a autofagia é necessária para manter a oxidação mitocondrial dos ácidos graxos, e sem a autofagia, células tumorais contêm mitocôndrias que não conseguem metabolizar os substratos lipídicos (GUO et al., 2013). Assim, a deficiência de p53 promover o armazenamento de lipídios (CHEUNG e VOUSDEN, 2010; ZHU e PRIVES, 2009). Se o catabolismo de lipídios pela oxidação mitocondrial dos ácidos graxos significativa cativamente contribui para o metabolismo destes tumores deficiente p53, preservação da função mitocondrial através mitofagia pode ser essencial para a degradação de lipídios, sua utilização, e homeostase (WHITE, 2015).

Estas descobertas recentes que mostram que a autofagia promove a tumorigênese suportam o conceito de que a inibição autofagia pode ser uma potencial abordagem para a prevenção e tratamento do câncer. Dado que o suprimento de substratos metabólicos via autofagia são essenciais para a sobrevivência da célula da cancerígena, e a identificação dos

substratos exatos que são fornecidos e os processos pelos quais eles são produzidos também pode revelar um novo alvo para terapia do câncer. Uma vez que já foi demonstrado que o bloqueio da autofagia pode impedir o desenvolvimento ou retardar a progressão de cânceres de mama e outros tipos de câncer (WHITE, 2015).

2.5- PPAR- γ

O PPAR γ é expresso tanto no tecido mamário normal como em muitos subtipos de câncer de mama primários (YEE, GUO *et al.*, 2003; PAPADAKI, MYLONA *et al.*, 2005). No câncer de mama o aumento da expressão de PPAR γ aumenta a degradação de proteínas envolvidos no ciclo celular como a Ciclina D1 que leva à interrupção do ciclo, interfere também na sinalização do receptor de estrógeno e nas cascatas de sinalização do NF κ B (JARRAR *et al.*, 2007). Mutações no genes de expressão do PPAR γ são raros em cânceres humanos (IKEZOE, MILLER *et al.*, 2001), e estudos para diferenciar sua expressão em tecidos mamários saudáveis e tumorais são controversos (WATKINS, DOUGLAS-JONES *et al.*, 2004; JIANG, DOUGLAS-JONES *et al.*, 2003) e acredita-se que as células de câncer de mama apresentam expressão de PPAR γ (JARRAR *et al.*, 2015).

O uso de drogas indutoras de PPAR γ é empregado no tratamento do câncer de mama como as tiazolidinedionas e são conhecidas por induzirem interrupção do ciclo celular, apoptose e resposta a danos no DNA, e também por influenciar nas fases iniciais do desenvolvimento do câncer de mama, em particular, na imortalização das células tumorais. Também interagem com o RE α reduzem a proliferação celular, a migração e a angiogênese no câncer de mama (JARRAR *et al.*, 2015).

O PPAR γ existe em duas formas o PPAR γ 1 e o PPAR γ 2 (ZHU, QI, KORENBERG, CHEN, NOYA e Rao 1995). O PPAR γ 1 é mais encontrado no tecido adiposo, intestino grosso, e células hematopoiéticas e em menor quantidade no rim, fígado, músculos, pâncreas e no intestino delgado. O PPAR γ 2 é restrito ao tecido adiposo castanho e branco sob condições fisiológicas (MEDINA-GOMEZ, GRAY, YETUKURI *et al.*, 2007).

No corpo humano, o PPAR γ é o principal regulador da diferenciação dos adipócitos, e desempenha um papel importante no metabolismo dos lipídios e na homeostase da glicose, além disso, modula a inflamação em células do sistema imunológico, bem como controla a proliferação de células (TONTONNOZ e SPIEGELMA, 2008), ativa diretamente vários genes envolvidos no armazenamento de lipídios nos adipócitos (CHRISTODOULIDES e VIDAL-PUIG, 2010).

Além das suas propriedades metabólicas e anti-inflamatórias. O PPAR γ também modula a proliferação e a apoptose de muitos tipos de células de câncer, é expresso em muitos tumores humanos, incluindo pulmão, mama, cólon, próstata e bexiga. Como ativadores naturais e sintéticos de PPAR γ mostraram atividade inibidora do crescimento de células de câncer “*in vitro*” e em modelos animais, o PPAR γ também pode ser um alvo para novas terapias contra o câncer (TONTONNOZ e SPIEGELMAN, 2008; REKA, KURAPATI, NARALA, BOMMER, CHEN e STANDIFORD, 2010). PPAR- γ é altamente expresso em tecido adiposo e macrófagos e regula principalmente adipogênese. O PPAR- γ controla uma variedade de genes envolvidos no metabolismo dos lipídico, incluindo o transporte de ácido graxos, sua absorção pelas células, assim como o catabolismo (β -oxidação) ou seu armazenamento. Ele é efetivamente ativado por ácidos graxos, os AG insaturados possuem melhor afinidade com os PPARs, em comparação com os AGs saturados, AGs saturados se ligam mais fracamente aos PPARs (DESVERGNER et al., 2013).

Sendo assim o PPAR γ possui um importante papel no metabolismo lipídico e a vitamina E modula a expressão dessa molécula em células de câncer de mama (SMOLAREK et al., 2009; LEE et al., 2009). Quando o receptor nuclear PPAR γ é ativado por um ligante ele forma um heterodímero com o receptor do ácido retinóico (MICHALIK, DESVERGNE, WAHLI, 2004) e o anel cromanol dos tocoferóis e tocotrienóis possui estrutura semelhante ao troglitazona, um conhecido ligante e ativador de PPAR γ (CAMPBELL, STONE, WHALEY et al., 2003). Devido essa semelhança as vitaminas E podem funcionar como um ligante do PPAR γ .

Especificamente no câncer de mama o aumento da expressão de PPAR γ esta relacionado com aumento da degradação de proteínas envolvidas na progressão do ciclo celular (Ciclina D1), assim a ativação de PPAR γ pelas vitaminas E no tecido mamário pode inibir a progressão do ciclo celular e induzir apoptose e prevenir o câncer de mama (SMOLAREK, YOUNG, PAUL, THOMAS, LEE et al., 2013).

2.6- Vitamina E:

Devido às suas propriedades antioxidantes, a ingestão dietética de vitamina E é estudada como um fator de proteção contra o câncer (TAYLOR, QIAO, ABNET et al., 2003). No entanto, estudos recentes têm mostrado efeitos adversos desta vitamina no ambiente tumoral (MILLER et al, 2005; HERCBERG et al, 2007) sendo necessárias mais pesquisas para elucidar sua atuação em diferentes tipos de câncer.

Para estudar a potencialidade desta vitamina, é importante destacar que trata-se de um composto hidrofóbico, solúvel em gordura, e que existem 8 isoformas diferentes desta vitamina. Apresenta-se em quatro modelos na forma de tocoferóis (α , γ , β e δ) com uma cauda fitil saturada, e quatro formas de tocotrienóis (α , γ , β e δ) com uma cadeia lateral isoprenóide insaturada (Figura-1) ambas as isoformas apresentam um anel cromanol e a posição dos grupos metil dentro desse anel determinam qual é a isoforma da vitamina (CARDENAS e GHOSH, 2013).

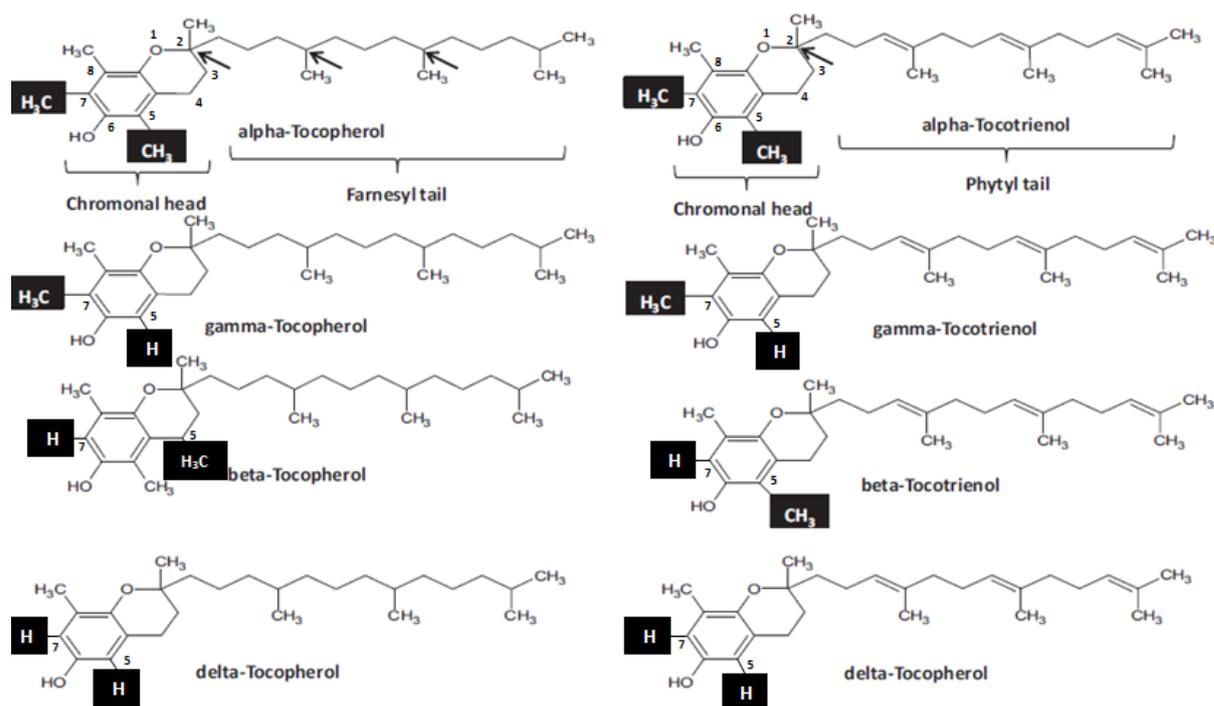


Figura 1- Vitamina E: Os grupos metil dentro do anel cromanol determinam qual é a isoforma da vitamina: alfa, gama, beta ou delta (realçado em preto). As setas apontam para os centros quirais onde são localizadas as caudas fitil e farnesilo dos tocoferóis e tocotrienóis respectivamente. Uma cauda insaturado distingue os tocotrienóis da cauda saturada das isoformas dos tocoferóis. (Adaptado de Cardenas e Ghosh, Vitamin E: A dark horse at the crossroad of cancer management, 2013).

As pequenas diferenças estruturais entre as isoformas de vitamina E também tem um impacto significativo sobre seu metabolismo, absorção e armazenamento nos tecidos. Como o Alfa-T e o Delta-T são as isoformas de vitamina E mais abundantes na dieta, essas formas são as mais encontradas nos tecidos. No entanto, apesar do Gama-T ser a forma predominante nas dietas típicas americanas, o Alfa-T, é a forma predominante de vitamina E no organismo (JIANG, 2001), por isso, o Alfa-T é considerado a vitamina E “clássica”(SMOLAREK e SUH, 2011).

As formas naturais de vitamina E são sintetizadas em vegetais e consumidas através da alimentação, por isso, os hábitos alimentares podem desempenhar um papel significativo no tipo de vitamina E que é consumida através da dieta (CÁRDENAS e GHOSH, 2013). O alfa-

tocoferol (α -T) é predominantemente encontrado em amendoins, amêndoas e sementes de girassol, enquanto gama-tocoferol (γ -T) é a principal vitamina E nas nozes, pistaches, e sementes de gergelim (DREHER, 2012). Devido a isso o α -T e o γ -T são encontradas em muitos óleos alimentares tais como óleo de milho, soja, e amendoim. Devido ao uso generalizado do óleo de milho e de soja, o γ -T representa aproximadamente 60-70% da vitamina E consumida na dieta típica norte americana, enquanto o α -T é responsável por 20-25% do consumo desta vitamina. Além dessas duas isoformas de vitamina E, boas fontes de Delta-tocoferol (δ -T) incluem sementes de tomate, gérmen de arroz e óleo de soja (MCLAUGHLIN *et al.*, 1979). Já para os tocotrienóis existem poucas fontes alimentares, eles são consumidos mais facilmente em dietas do Leste-Sul da Ásia (TAN, 2010), as fontes mais ricas de tocotrienol são os farelo de arroz, óleo de palma, óleos e urucu, centeio, cevada, amaranto, noz, avelã, papoila, cártamo, milho, e as sementes de linho, de uva, e abóbora (KANNAPPAN *et al.*, 2012). Nos estudos “*in vitro*” e “*in vivo*”, são utilizadas formas sintéticas dessas vitaminas encontradas na forma de DL-Tocoferóis ou DL-Tocotrienóis (BURTON *et al.*, 1998).

A atuação da vitamina E no tratamento e prevenção do câncer é bastante estudada devido a uma possível ação anticancerígena relacionada à sua atividade antioxidante, através da qual, protegeria o DNA das células dos danos causados pelos radicais livres (CÁRDENAS, GHOSH, 2013). As propriedades antioxidantes dessa vitamina são na sua maioria devido aos hidrogênios fenólicos no anel cromanol que são doados à radicais livres (BURTON e INGOLD. 1989). O α -tocoferol é trimetilado nas posições 5-, 7- e -8 do anel cromanol, o γ -tocoferol é dimetilada nas posições 7 e 8, e o δ -tocoferol é monometilado na posição 8 do anel cromanol. A diferença estrutural no anel cromanol pode ser responsável pela diferença na atividade antioxidante de cada forma de tocoferol. As orto-posições (posições 5 e 7) para os grupos metil no anel cromanol melhoram suas propriedades antioxidantes e aumentam sua solubilidade em substratos lipídicos (KAMAL-ELDIN e APPELQVIST. 1996). Assim, α -tocoferol com dois grupos orto-metilo é esperado ser um doador de hidrogênio mais potente do que o γ -tocoferol (que tem um grupo orto metilo) e o δ -tocoferol (que não possui grupo orto metilo) (KAMAL-ELDIN e APPELQVIST. 1996).

Embora α -tocoferol tenha uma atividade antioxidante melhor que as demais isoformas de vitamina E, o α -tocoferol, por conseguinte, também tem uma capacidade maior do que o γ -tocoferol e o δ -tocoferol para atuar como um pró-oxidante, quando presente em elevadas concentrações em óleos vegetais (CILLARD; CILLARD, 1980) O α -tocoferol é a forma mais amplamente estudada de vitamina E para a prevenção e tratamento de câncer (BAIRATI;

MEYER; GELINAS; FORTIN; NABID; BROCHET; MERCIER; TETU; HAREL; MASSE *et al.*, 2005). Porém, apesar dos efeitos biológicos do α -tocoferol serem investigados ao longo de muitas décadas, a nossa atual compreensão do seu papel na inibição da carcinogênese mamária continua incompleta (BRIGELIUS-FLOH; KELLY; SALONEN; NEUZIL; ZINGG; AZZI, 2002).

Estudos recentes de mecanismos de ação indicaram que em comparação com Alfa-T, as outras isoformas da vitamina E parecem ter propriedades biológicas diferentes e superiores que podem ser úteis para a prevenção e tratamento contra doenças crônicas como o câncer (JIANG, 2014). Acredita-se que os tocotrienóis exibam atividade antioxidante mais forte quando comparado com os tocoferóis (MULLER *et al.*, 2010). O armazenamento dos tocotrienóis nas células da mama é superior que os tocoferóis, devido essa isoforma ser transportada através dos quilomícrons e seu armazenamento se dá primariamente no tecido adiposo, que por sua vez, é abundante no tecido mamário, o que pode ser um dos motivos pelos quais os tocotrienóis tem efeito fisiológico mais significativo no câncer de mama (NOGUCHI *et al.*, 2003).

O T3 é relatado por ter muitas atividades específicas, tais como a supressão do crescimento e na indução de apoptose em diferentes células de câncer de mama humano e de camundongos (AZZI *et al.*, 2001, KLINE *et al.*, 2004, MCINTYRE *et al.*, 2000, NESARETNAM *et al.*, 2000, SCHWENK *et al.*, 2002, SHAH *et al.*, 2003; SYLVESTER *et al.*, 2002, SYLVESTER *et al.*, 2005) e em outras células cancerígenas humanas (CONTE *et al.*, 2004, EITSUKA *et al.*, 2006, NESARETNAM *et al.*, 2004, SRIVASTAV *et al.*, 2006, WADA *et al.*, 2005). Em geral, se tem proposto que os T3 possuem diversas propriedades que muitas vezes não são exibidas pelos tocoferóis (SEM *et al.*, 2006) e estão associadas com uma atividade "anti-tumoral", independente das suas propriedades antioxidantes.

Sendo assim, enquanto os tocoferóis mostram poucos resultados na proteção contra o desenvolvimento de vários tipos de câncer, os tocotrienóis, em particular, Alfa, Delta, e Gama tocotrienóis têm demonstrado propriedades anticancerígenas mais eficientes (SEM *et al.*, 2006).

2.7-Ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) ômega-3 e ômega-6

Os PUFAs ômega-3 (ω -3) e ômega-6 (ω -6) têm várias funções vitais no organismo humano, atuam como componentes de fosfolípidos estruturais na membrana celular, na sinalização celular, na interação celular, e na fluidez das membranas (ROYNETTE; CALDER *et al.*, 2004). Além de regularem o sistema imunológico, agindo como precursores de eicosanóides que são potentes metabólitos imunológicos, esses eicosanóides são

principalmente sintetizados a partir do ácido araquidônico (AA, 20: 4n-6) que pertence a família ω -6 e do ácido eicosapentaenoico (EPA) da família ω -3 (STEPHENSON *et al.*, 2013) e participam ativamente no sistema imune. Por isso, esses PUFAs são bastante estudados no ambiente tumoral (KANG *et al.*, 2010; MICHAEL *et al.*, 2012).

O ácido docosahexaenóico (DHA) é um composto bioativo natural também bastante estudado em pesquisas com câncer, este, é altamente enriquecido em óleos de peixes de água fria como salmão, arenque, cavala e sardinha e é amplamente utilizado como um suplemento dietético em pacientes com câncer (XIONG *et al.*, 2012). O DHA tem uma vasta gama de atividades biológicas (KAUR *et al.*, 2011) com funções anti-inflamatórias e cardioprotetoras bem documentadas (CALDER *et al.*, 2011; ABEYWARDENA *et al.*, 2011).

O ácido araquidônico (AA) tem particular e importante papel para as células do sistema imunológico, por isso, em leucócitos e em outras células da resposta inflamatória o AA é discretamente armazenado em organelas citosólicas conhecidas como corpúsculos lipídicos ou corpos lipídicos (CLs), que servem como precursores para mediadores eicosanóides inflamatórios, produzidos a partir do AA. Para tanto nos CLs são encontradas as enzimas necessárias para a síntese dos eicosanóides, incluindo ciclooxigenases (COX), 5- e 15-lipoxigenase (LOX), e leucotrienos C4-sintase (LTC4) (MELO *et al.*, 2006). Já o ácido docosahexaenoico (DHA) e o ácido eicosapentaenoico (EPA) pertencentes a família ω -3 possuem atividade anti-inflamatória e já são estudados como agentes antitumorais (DIGGLE, 2002; MOYAD, 2005), porém sua atividade na modulação da biogênese de corpúsculos lipídicos ainda não é bem compreendida (LEE *et al.*, 2013).

A inflamação crônica propicia um ambiente ideal para o desenvolvimento do câncer (MOREIRA, 2007). Uma vez, que nela existe insuficiência ou perda dos mecanismos requeridos para resolução do processo inflamatório, e conseqüentemente persistência dos fatores inflamatórios como citocinas e mediadores lipídicos (COUSSENS *et al.*, 2002) que induzem a proliferação celular, o recrutamento de células inflamatórias e o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio levando a danos oxidativos no DNA concomitante com a redução do seu reparo (COUSSENS *et al.*, 2002) e surgimento de células cancerígenas.

Vários estudos têm sugerido que um dos mecanismos envolvidos no efeito anti-cancerígeno dos PUFAs ω -3 é através da sua peroxidação (oxidação) (XIONG *et al.*, 2012; MERENDINO *et al.*, 2013; VAUGHAN *et al.*, 2013). As grandes cadeias poliinsaturadas dos ácidos graxos EPA com vinte átomos de carbono e 5 insaturações (20:5-3n) e do DHA com vinte e dois carbonos e 6 insaturações (22:6-3n), os tornam altamente peroxidáveis na

presença de radicais livres que são comumente encontrados no ambiente tumoral. Quando esses radicais se ligam as cadeias poliinsaturadas dos ácidos graxos levam à sua oxidação (peroxidação), o que pode causar distúrbios na camada de fosfolípidos da membrana plasmática das células, consequentemente provocando dano celular e morte celular subsequente (XIONG *et al.*, 2012).

Dados a partir de cultura de células e estudos com animais, bem como os ensaios clínicos em humanos sugerem que o DHA pode reduzir a tumorigênese e o desenvolvimento do tumor numa variedade de cânceres, incluindo o câncer da mama (KANG *et al.*, 2010). Mecanismos anticancerígenos do DHA incluem a inibição da proliferação, da metástase e da angiogênese, além da indução da apoptose (BLANCKAERT *et al.*, 2010) e vários trabalhos relataram que os diferentes ω -3 levam a um aumento da peroxidação lipídica e da produção de ROS em células cancerígenas tratadas com PUFA's associados com a paragem do crescimento celular e apoptose (KANG *et al.*, 2010).

Alguns ácidos graxos como o DHA e o EPA são capazes de reduzir a proliferação de células de tumor de mama inicial, por exercerem toxicidade sob elas (BOZZA e VIOLA, 2010; ERICKSON e HUBBARD, 2010). Sabe-se que os alguns ácido graxos livres exercem um potencial tóxico para as células tumorais em comparação com lípidios neutros como triglicerídeos esterificados, nesse sentido, o acúmulo e corpúsculos lipídicos parece desempenhar um papel de proteção contra a lipotoxicidade, sendo assim, os corpúsculos fornecem um mecanismo de proteção para evitar apoptose quando as células tumorais são expostas a um excesso de ácidos graxos não esterificados (LISTENBERGER, HAN, LEWIS, CASES, FARESE, ORY e SCHAFFER, 2003) No entanto, a atividade de poucos ácidos graxos já foi descrita na modulação da biogênese de CLs em diferentes células tumorais.

3. OBJETIVOS

3.1-Objetivo geral:

Avaliar o efeito das isoformas de vitamina E (alfa-tocoferol, delta-tocoferol e delta-tocotrienol) na modulação da biogênese de corpúsculos lipídicos e na tumorigênese, associadas ou não ao ácido graxo docosahexaenóico (DHA), na linhagem celular de câncer de mama MDA-MB-231.

3.2-Objetivos específicos:

1. Mensurar a citotoxicidade de diferentes concentrações do alfa-tocoferol, do delta-tocoferol e do delta-tocotrienol e do ácido docosahexaenóico (DHA).
2. Avaliar se o alfa-tocoferol, o delta-tocoferol e o Delta-Tocotrienol alteram a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) induzida pelo DHA.
3. Quantificar a formação de corpúsculos lipídicos nas células tratadas na presença das diferentes isoformas de vitamina E ou DHA ou coestímulos destes.
4. Verificar expressão de PPAR- γ nas células tratadas na presença do DHA ou nos coestímulos com a vitamina E.
5. Observar se os compostos bioativos DHA e vitaminas E induzem lipofagia.
6. Determinar se o DHA, ou as vitaminas E ou o coestímulos de DHA como as diferentes isoformas de vitamina interferem na proliferação, sobrevivência e migração das células MDA-MB-231.

4. METODOLOGIA

4.1- Células e Reagentes

A linhagem de célula de câncer de mama humana MDA.MB.231 foi doada pelo Professor Doutor Raimundo Correa, do Departamento de Patologia Celular da Universidade de Brasília. A linhagem THP1 de monócitos humanos utilizada, foi doada pelo Laboratório de Imunologia Aplicada do Departamento de Biologia da Universidade de Brasília.

O meio de cultura L15 (Leibovitz) e RPMI foram adquiridos da Sigma Aldrich. Soro fetal Bovino (SFB) e antibiótico-antimicótico (10,000 unidades/mL de penicilina, 10,000 µg/mL of streptomycin, e 25 µg/mL of Fungizone®) da Gibco® comprados da Life Technologies, solução salina tamponada com fosfato (PBS) composta por 137 mM de NaCl; 2,7 mM de KCl; 4,3 mM de Na₂HPO₄; 1,5 mM de KH₂PO₄, reagentes cedidos pelo professor Doutor Marcelo Hermes do Laboratório Radicais Livres do departamento de Biologia da Universidade de Brasília. Enzima Tripsina, Dimetil Sulfoxido (DMSO), Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (Mtt), Alfa-tocoferol, delta-tocoferol e o ácido docosahexaenóico (DHA) da Sigma Aldrich. Sonda fluorescente para corpúsculos lipídicos Bodipy (4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentametil-4-bora-3',4'-diazas-Bodipy) e *Lipopolissacarídeo* (LPS) da Escherichia coli e CellROX Deep Red da Life Technologies. Anticorpo primário anticorpo humano para o PPAR-γ e o LC3-β, assim como o anticorpo secundário Alexa fluor 488 e Alexa fluor 456 e o prolong foram da Invitrogen, Life technologies.

4.2-Cultura de células

As células de câncer de mama triplo negativo da linhagem MDA-MB-231 foram mantidas em meio de cultura L15 (Leibovitz) com L-glutamina, e para o cultivo de monócitos foi utilizado o meio de cultura RPMI, os meios de cultura foram devidamente suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico-antimicótico (10,000 unidades/mL de penicilina, 10,000 µg/mL of streptomycin, e 25 µg/mL of Fungizone®). As linhagens de células foram mantidas em estufa a 37 °C, os monócitos foram mantidos também a 37°C, mas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ sendo tripsinizadas após crescimento confluyente e utilizadas nos experimentos.

4.3- Delineamento do estudo

As diferentes linhagens de células foram tratadas com o ácido docosahexaenóico (DHA) na concentração de 50µM, ou com as vitaminas “E” na concentração de 5 µM, ou com coestímulos de DHA com as diferentes isoformas de vitamina E: Alfa-Tocoferol (Alfa-T), Delta-Tocoferol (Delta-T) ou Delta-Tocotrienol (Delta-T3). A Tabela 1 mostra os diferentes grupos de tratamento. Para todos os experimentos as diferentes linhagens de células foram

tratadas por um período de 24 horas, exceto para o experimento que avaliou a produção de espécies reativas de oxigênio, para o qual as células foram tratadas por um período de apenas uma hora e os ensaio de migração com duração de 3 dias e de sobrevivência que necessitou de um período de 16 dias de cultivo. O esquema abaixo mostra as etapas do estudo.

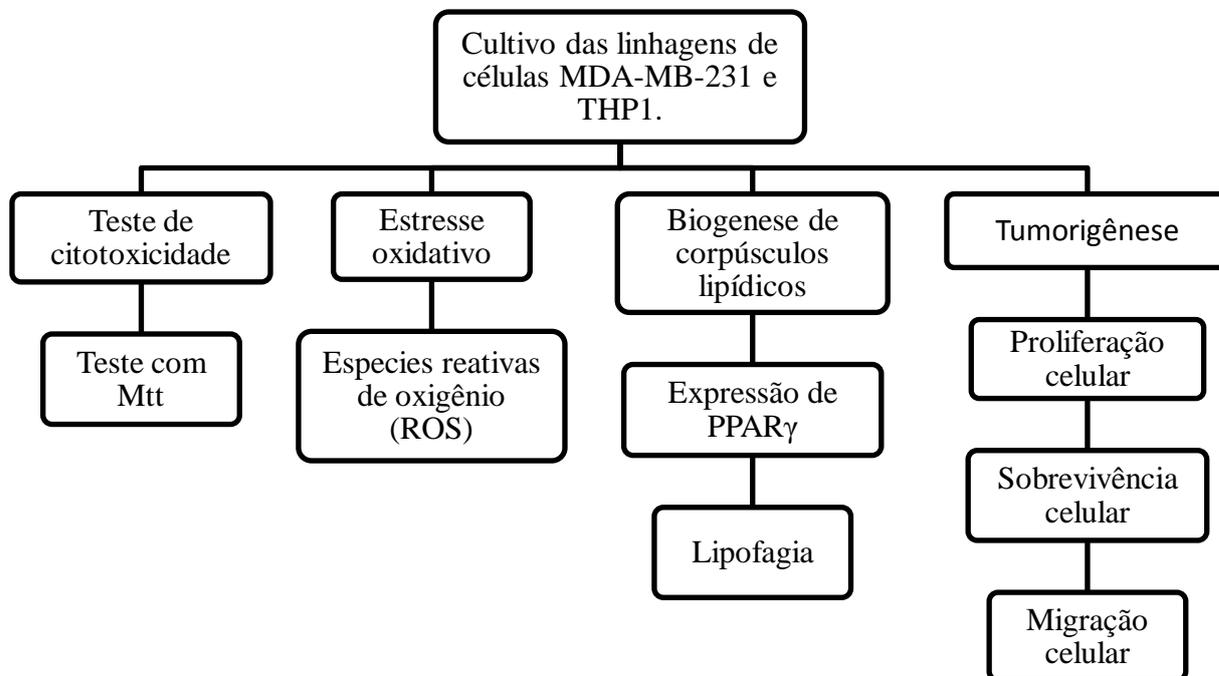


Tabela 1- Grupos de tratamentos e as concentrações dos compostos nos experimentos.

Grupos de tratamento	Concentração (μM)
DHA	12,5 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM e 200 μM
Alfa-Tocoferol	2,5 μM , 5 μM , 10 μM , 20 μM e 40 μM
Delta-Tocoferol	2,5 μM , 5 μM , 10 μM , 20 μM e 40 μM
Delta-Tocotrienol	2,5 μM , 5 μM , 10 μM , 20 μM e 40 μM
DHA + Alfa-Tocoferol	50 μM + 5 μM
DHA + Delta-Tocoferol	50 μM + 5 μM
DHA + Delta-Tocotrienol	50 μM + 5 μM

4.4-Curva de citotoxicidade

Para verificar a citotoxicidade dos compostos bioativos estudados foi utilizado o método com MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) que é um sal tetrazólico solúvel em água, quando absorvido pelas células esse sal é metabolizado por enzimas desidrogenases ativas nas mitocôndrias de células vivas que clivam o seu anel tetrazólio formando um cristal formazano insolúvel de cor púrpura. Em células mortas essa clivagem não ocorre, por isso, esse ensaio é utilizado para avaliar a viabilidade celular.

O produto da clivagem do MTT, o cristal de formazano é insolúvel em água, mas pode ser solubilizado utilizando-se o Dimetil Sulfoxido (DMSO) que é um solvente orgânico polar. A solução tem uma coloração púrpura que foi quantificada por espectrofotometria, obtendo-se a absorbância da coloração, e quanto maior a absorbância maior o número de células vivas nas culturas de células o comprimento de onda utilizado para a detecção da coloração emitida pelos cristais de formazano foi 570nm.

Para esse experimento as células foram tratadas por 24 horas com as vitaminas E alfa-tocoferol, delta-tocoferol e delta-tocotrienol e o DHA, as células foram incubadas por um período de 3 horas com uma solução de meio de cultura L15 com o MTT na quantidade de 5 mg/mL, sendo o MTT correspondente a 10% do volume do poço. Após a formação dos cristais de formazano foi adicionado 40µl DMSO 99% correspondente a 20% do volume do poço, por um período de 5 minutos e em seguida essa solução foi transferida para a placa de leitura. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (SpectraMax) na absorbância de 570nm, o valor das absorbâncias foi transformado em percentual tendo como 100% a média das absorbâncias obtidas para as células não estimuladas (CNE). Para obtenção do resultado final as demais absorbâncias obtidas para os diferentes tratamentos foram comparadas com o CNE considerado ter 100% de células vivas.

4.5-Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Para análise da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi utilizado o o kit *Cell Rox Deep Red* para análise de ROS localizado no citoplasma de células vivas. Esse reagente é uma sonda não fluorescente quando em estado reduzido e se oxidado por ROS torna-se fluorescente e visível por citometria de fluxo ou por microscopia confocal. Possui comprimentos de onda de emissão/excitação de 655/644nm respectivamente.

Para esse experimento as culturas de células MDA-MB-231, foram tratadas com o DHA e as vitaminas E por um período de 1 hora, logo após as culturas de células foram incubadas a 37°C, protegidas da luz por 30 minutos com o fluoróforo *Cell Rox Deep Red* dissolvido em meio de cultura Leibovitz (L15) na concentração final de 5µM. Após esse período as células foram lavadas com PBS 3 vezes, resuspensas em 500 µL de PBS e mantidas a 4°C até a leitura por citometria de fluxo (FACS verse) no canal APC, a leitura foi realizada imediatamente com o objetivou de manter as células viáveis durante a análise.

4.6-Biogênese de corpúsculos lipídicos

Para análise da biogênese de corpúsculos lipídicos (CLs) foi utilizado o fluoróforo lipofílico Bodipy usado para a identificação de lipídios neutros intracelulares (triglicerídeos e

ésteres de colesterol) presentes em grandes quantidades em CLs. O Bodipy é uma sonda fluorescente detectada por citometria de fluxo.

Para esse experimento as culturas de células MDA-MB-231 foram plaqueadas em placas de 24 poços com meio de cultura L15 e após uma noite para aderirem as placas foram tratadas com DHA e as vitaminas E por um período de 24 horas. Após isso, as células foram desaderidas com a enzima tripsina e incubadas em tubos eppendorf com o fluoróforo bodipy dissolvido em PBS em uma solução estoque de 1mg/ml, para esta marcação foi utilizada uma quantidade de 1:7000 do volume da solução estoque de bodipy em PBS (v/v). As células foram incubadas com a solução de bodipy/PBS por 30 minutos a 4°C protegido da luz. Após esse período as mesmas foram lavadas com PBS 2 vezes, resuspensas em 500µL de PBS e mantidas a 4°C até leitura por citometria de fluxo (FACS verse) utilizando o canal FITC.

De forma semelhante as células MDA-MB-231 também foram tratadas com DHA e vitaminas E para a análise de CLs por microscopia confocal. Para tanto, as células foram plaqueadas em placas de 24 poços com uma lamínula circular em cada poço, as placas foram mantidas em estufa a 37°C por uma noite para as células aderirem as lamínulas, após as células aderirem elas foram tratadas com DHA e vitaminas E por 24 horas. Em seguida o meio de cultura com os tratamentos foi retirado, as células em cada poço foram lavadas com PBS 1 vez e foram fixadas com paraformaldeído 4% diluído em água destilada (v/v) por 10 minutos e em seguida foram lavadas 3 vezes com PBS. Após isso foram incubadas com o fluoróforo Bodipy dissolvido em PBS na concentração de 1/300 (v/v), por um período de 30 minutos a temperatura ambiente e protegido da luz. Após o tempo de incubação com a sonda as células foram lavadas 3 vezes com PBS. Após isso foi acrescentado 300 µL de solução de azul de Evans (1/1000) em PBS (v/v) as células foram incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente em seguida cada poço foi lavado 3 vezes com PBS. Logo após foi acrescentada 300µL de uma solução de 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) que é um corante fluorescente que se liga fortemente a regiões ricas em Adenina-Timina no DNA e atravessa facilmente a membrana das células, esse corante é amplamente utilizado na microscopia de fluorescência para demarcar o núcleo da célula nas imagens e possui coloração azul nas imagens. A solução de DAPI foi diluída na concentração de 1/5000 de DAPI em PBS (v/v) e as células foram incubadas com essa solução por 5 minutos. Após isso foram lavadas 3 vezes com PBS. Após a coloração com Bodipy, Azul de *Evans* e com o DAPI as lâminas para a análise por microscopia foram montadas.

Para isso, foi colocada uma gota de meio de montagem (Prolong) na lâmina histológica de microscopia para fixar a lamínula preparada com as células, de modo que a

face da lamínula com as células ficasse em contato com o meio de montagem, as laminas foram deixadas para secar na posição horizontal overnight e foram armazenadas protegidas da luz a 4°C em geladeira até a captação das imagens por microscopia fluorescente Leica TCS SP5 com aumento de 63X e Zoom de 4.

4.7- Expressão de PPAR- γ

Para a análise do PPAR- γ , foi utilizado o microscópio confocal Leica TCS SP5, para observar a translocação do PPAR- γ do núcleo para o citoplasma das células MDA-MB-231. Para a técnica foi utilizado o anticorpo primário para PPAR- γ anticorpo secundário alexa 488.

As células foram cultivadas em placas de 24 poços com uma lamínula circular em cada poço, as placas foram mantidas em estufa a 37°C por uma noite para as células aderirem às lamínulas, após isso foram tratadas com DHA 50 μ M e as vitaminas E na concentração de 5 μ M por 24 horas. Em seguida, o meio de cultura com os tratamentos foi retirado, as células em cada poço foram lavadas com PBS 1 vez e foram fixadas com paraformaldeído 4% diluído em água destilada (v/v) por 10 minutos, após isso foram lavadas 3 vezes com PBS. Em seguida foram permeabilizadas com triton 0,2% diluído em PBS, por 20 minutos, após isso foram novamente lavadas 3 vezes com PBS, após as células foram incubadas com solução de bloqueio por 20 minutos, essa solução é composta por Albumina bovina (BSA) 2% e 5% de soro fetal bovino (SFB) em PBS 1x. Em seguida a solução de bloqueio foi retirada e o anticorpo primário para PPAR γ foi adicionado aos poços na diluição de 1:500 v/v diluídos em solução de bloqueio e permaneceram em contato com as células a 37°C e protegidos da luz overnight. Após esse período as células foram lavadas 3 vezes com PBS, e em seguida foram incubadas com anticorpo secundário alexa 488 diluído em PBS 1:2000 (v/v) por 60min na temperatura ambiente e protegido da luz. Após esse passo as células foram novamente lavadas 3 vezes com PBS 1x e incubadas com DAPI diluído em PBS 1:5000 (v/v) para a marcação do núcleo, por 5 minutos a temperatura ambiente, após isso mais uma vez as células foram lavadas com PBS 1x três vezes. As lâminas foram montadas com a superfície da lamínulas em contato com a solução de montagem prolong, as lâminas foram mantidas na horizontal overnight na temperatura de 4°C para a sua fixação e foram armazenadas a essa mesma temperatura em caixas para armazenamento de laminas até a captação das imagens no microscópio confocal Leica TCS SP5 com aumento de 63X e Zoom de 4.

4.8- Análise da lipofagia

Semelhante a técnica utilizada para a análise da expressão de PPAR- γ , o marcador de autofagia LC3-B foi observado com auxílio do microscópio confocal Leica TCS SP5, para observar sua colocalização com os corpuúsculos lipídicos e inferir a existência de lipofagia

nas células MDA-MB-231. Para a técnica foi utilizado o anticorpo primário humano para LC3-B e anticorpo secundário alexa 456, para a marcação do núcleo foi utilizado o corante DAPI e os CLs foram marcados com a sonda fluorescente Bodipy.

As células foram cultivadas em placas de 24 poços com uma lamínula circular em cada poço, as placas foram mantidas em estufa a 37°C por uma noite para as células aderirem às lamínulas, após aderirem foram tratadas com DHA 50µM e as vitaminas E na concentração de 5 µM ou seus coestimulos por 24 horas. Em seguida, o meio de cultura com os tratamentos foi retirado, as células em cada poço foram lavadas com PBS 1 vez e foram fixadas com paraformaldeído 4% em água destilada (v/v) por 10 minutos e em seguida foram lavadas 3 vezes com PBS. Depois de fixadas as células foram permeabilizadas com triton 0,2% diluído em PBS, por 20 minutos, após isso foram novamente lavadas 3 vezes com PBS, em seguida foram incubadas com solução de bloqueio por 20 minutos. Em seguida a solução de bloqueio foi retirada e o anticorpo primário para LC3-B foi adicionado aos poços na diluição de 1:500 v/v diluídos em solução de bloqueio e permaneceram em contato com as células a 37°C e protegidos da luz overnight. Após esse período as células foram lavadas 3 vezes com PBS, e em seguida foram incubadas com anticorpo secundário alexa 456 1:2000 (v/v) e com a sonda bodipy 1:300 (v/v) diluídos em PBS por 60min na temperatura ambiente e protegido da luz. Após esse passo as células foram novamente lavadas 3 vezes com PBS 1x e incubadas por 5 minutos as temperatura ambiente com DAPI diluído em PBS 1:5000 (v/v) para a marcação do núcleo, após isso mais uma vez as células foram lavadas com PBS 1x três vezes. As lâminas foram montadas com a superfície da lamínulas em contato com a solução de montagem prolong, as lâminas foram mantidas na horizontal overnight na temperatura de 4°C para a sua fixação e foram armazenadas a essa mesma temperatura em caixas para armazenamento de laminas até a captação das imagens no microscópio confocal Leica TCS SP5 com aumento de 63X e Zoom de 4.

4.9- Proliferação celular

Para verificar a proliferação celular as células foram coradas com cristal violeta. Primeiramente as células MDA-MB.231 foram plaqueadas (10^4 células por poço) em placa de 96 poços e tratadas por 24 horas com 50µM de DHA ou 5µM das vitaminas E: α -T, δ -T ou δ -T3 sozinhos ou seus coestímulos. Em seguida as células foram fixadas com etanol 99,5% por 10 minutos, e coradas com cristal violeta 0,05% diluído em etanol 20% também por 10 minutos. Logo após os poços foram lavados 5 vezes com água milli-q e as células foram solubilizadas em metanol por 5 minutos e transferidas para a placa de leitura. A leitura foi realizada por espectrofotometria (EspectraMax) no comprimento de onda de 595nm. A média

das triplicatas dos poços com células não tratadas, os controles não estimulados (CNE), foram comparadas com os diferentes tratamentos.

4.10- Ensaio de sobrevivência celular

Para a análise de sobrevivência celular foi realizado o ensaio clonogenico. Para tanto, 500 células de adenocarcinoma de mama (MDA-MB-231) foram plaqueadas em placas de 6 poços de fundo chato, após aderirem overnight foram tratadas com DHA 50 μ M ou as vitaminas E (Alfa-Tocoferol, Delta-Tocoferol e Delta-Tocotrienol) na concentração de 5 μ M sozinhos, ou seus coestimulos (DHA + Alfa-T, DHA + Delta-T ou DHA + Delta-T3). O número de células em cada um dos poços foram contadas cuidadosamente utilizando câmara de Neubauer com azul de tripan e foram diluídas de tal modo que o número de células adequadas (500 células por poço) foram cultivadas em cada poço em estufa umidificada a 37° C para a formação de colônias. Após 24 de tratamento com o DHA e as vitaminas E o meio de cultura com os tratamentos foi retirado e substituído por meio de cultura L15 completo, o meio de cultura foi trocado a cada 3 dias até completar 14 dias de cultivo. O tempo de incubação para a formação de colônias varia de 1-3 semanas para as diferentes linhas celulares; aceita-se que o tempo deve ser equivalente a, pelo menos, seis divisões celulares. Neste período esperávamos que as células controle sem tratamento formassem colônias com 50 ou mais células. Após esse período de 14 dias as células foram fixadas como metanol: acetona na concentração de 1:1 v/v, em seguida as colônias foram coradas com cristal violeta 0,05% em etanol 20% overnight, logo após o cristal violeta foi retirados dos poços e os mesmos foram lavados com água milli-q cinco vezes. As placas foram então fotografadas e a imagem digital foi analisada para a contagem das colônias usando software de imagem ImageJ (Fiji versão 1.44a), pelo qual a área da colônias foi contabilizada, e o valor foi analisado pelo *software graphpad prism* para a análise estatística.

4.11- Ensaio de migração celular

Foi utilizado o ensaio de *wound healing* que é muito utilizado para o estudo das características da migração celular (YARROW et al., 2004). Utilizou-se esse experimento com o objetivo de analisar a ação do DHA e das vitaminas E (α -Tocoferol, δ -Tocoferol e δ -Tocotrienol) sobre a migração das células de adenocarcinoma mamário humano, linhagem MDA-MB-231. Para tanto, as células foram plaqueadas em placas de 24 poços, e, ao alcançarem confluência foi feita a ferida (risca), utilizando ponteiros de 100 μ L e com auxílio de uma régua. Os poços foram então lavados uma vez, com meio de cultura L15 contendo 10% de soro fetal bovino. As células foram tratadas com DHA 50 μ M ou as vitaminas E (Alfa-T, Delta-T e Delta-T3) na concentração de 5 μ M sozinhos, ou com seus coestimulos

(DHA + Alfa-T, ou DHA + Delta-T ou DHA + Delta-T3). As placas foram fotografadas nos tempos de 0, 24 e 48 horas em microscópio de luz invertida (GOLUBKOV *et al.*, 2003; GALÁN *et al.*, 2008).

A análise dos resultados foi realizada com o auxílio do software ImageJ, a partir da medida da área do risco utilizando a fórmula: $(\text{Área inicial} - \text{Área final}) / (\text{Área inicial}) \times 100 = \% \text{ de fechamento da ferida}$, sendo a Área, a medida da área entre as bordas (YUE *et al.*, 2010).

4.12-Análise Estatística

Para a análise de viabilidade, produção de espécies reativas de oxigênio, biogênese de corpúsculos lipídicos, proliferação celular e migração e sobrevivência celular foi utilizado o teste paramétrico one-way ANOVA para múltiplas comparações, foi utilizado o pós teste de Tukey e os resultados foram expressos em diferenças nas médias dos valores em relação as células controle não tratadas. Para as análises foi utilizado o programa estatístico *Graph Pad Prism* versão 5.00 (Trial).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1-Citotoxicidade

Primeiramente foi verificado o efeito citotóxico das diferentes isoformas de vitamina E e do DHA em células de câncer de mama triplo negativo, linhagem MDA-MD-231 por 24 horas (Figura 4), o teste de Mtt também foi realizado com os diluentes utilizados para solubilizar esse compostos bioativos (Figura 2), com o objetivo de verificar ação citotóxico.

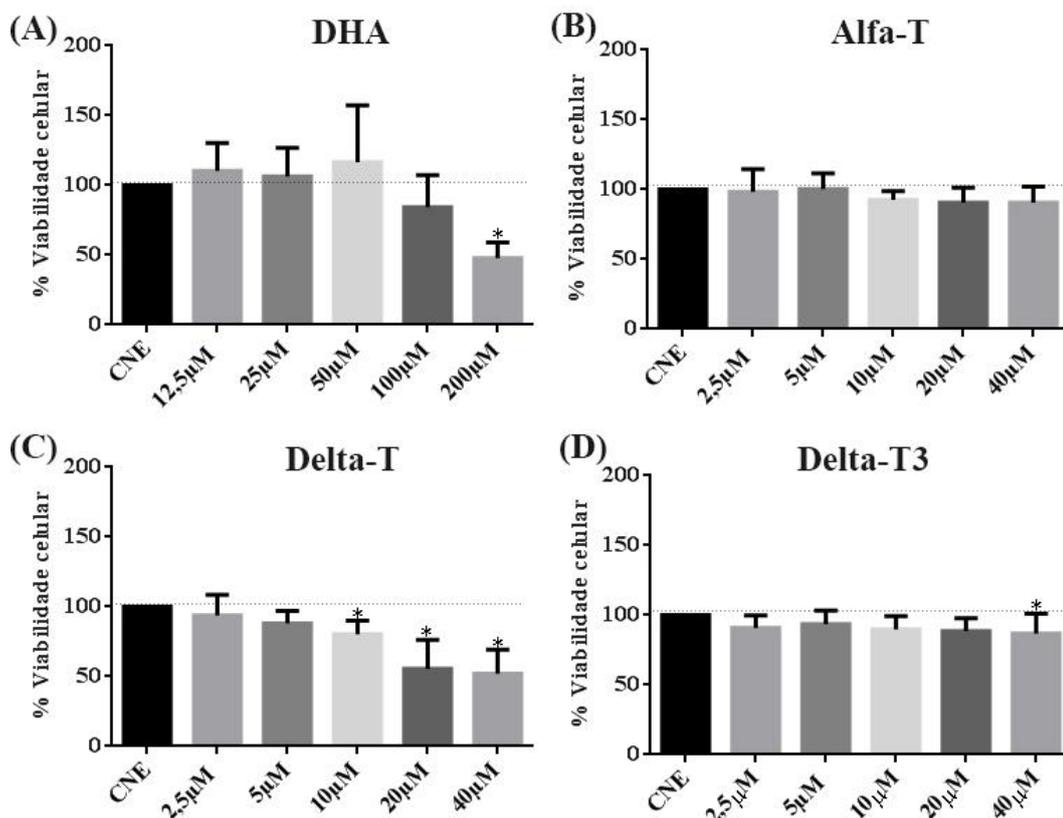


Figura 2- (A) Citotoxicidade dos do DHA nas concentrações de 12,5µM, 25µM, 50µM, 100M e 200µM e das isiformas de vitamina E: (B) Alfa-Tocoferol (Alfa-T), (C) Delta-Tocoferol (Delta-T) e (D) Delta-Tocotrienol (Delta-T3), sobre células de câncer de mama humano triplo negativas MDA-MB-231 tratadas por 24 horas, avaliada pelo teste de MTT (n=3) três experimentos cada um em triplicata. A citotoxicidade foi analisada pelas médias dos percentuais de células vivas em relação as células controle não estimuladas (CNE) (consideradas 100% vivas). Os valores foram expressos em media \pm SD, os resultados considerados estatísticos tiveram $p < 0,05$ (*) em relação ao CNE.

A figura 2A mostra que o DHA apenas na concentração de 200µM após 24 horas de tratamento reduziu a viabilidade das células MDA-MB-231 de forma significativa ($p < 0,05$), levando a morte de aproximadamente 52,4% das células em relação ao controle não estimulado (Figura-2A). O Alfa-T (Figura 2B) não apresentou efeito citotóxico para as células MDA.MB.231 em nenhuma das concentrações testadas. Já o Delta-T (Figura 2C) foi citotóxico nas maiores concentrações, levou a 20%, 45% e 48% de morte celular nas concentrações de 10µM, 20µM e 40µM, respectivamente. O Delta-T3 (Figura 2D) apenas na

concentração de 40 μ M reduziu a viabilidade celular, com taxa de morte celular de 20% quando comparado ao CNE ($p < 0,05$). A partir desses dados optou-se utilizar para experimentos subsequentes as concentrações de 50 μ M para o DHA e 5 μ M para as vitaminas Alfa-T, Delta-T e Delta-T3 por serem concentrações consideradas não citotóxicas para a linhagem celular em estudo.

Como esperado doses maiores de DHA foram citotóxicas para as células de câncer de mama, a literatura já mostrou a boa capacidade do DHA em desencadear diferentes vias de morte celular em células tumorais (TURLAN *et al.*, 2003; DING *et al.*, 2007; XIONG *et al.*, 2012), os resultados de citotoxicidade das isoformas de vitamina E também são condizentes com a literatura que mostrou que o Alfa-T não reduz a viabilidade celular, enquanto o Delta-T e o Delta-T3 podem ter efeitos bioativos mais eficientes no microambiente tumoral (KANG *et al.*, 2010; JIANG, 2014).

Ainda corroborando com os achados de citotoxicidade estudos sugerem o potencial individual dos tocoferóis (T) e tocotrienóis (T3), em suprimir o crescimento de células tumorais e induzir a apoptose em células neoplásicas do epitélio mamário com maior potencial de atividade na ordem de Delta-T3 > Gama-T3 > Alfa-T3 > Delta-T > Gama-T > Alfa-T (MCINTYRE *et al.*, 2000; XIONG *et al.*, 2012; CARDENAS; GHOSH, 2013; JIANG, 2014), sendo, o alfa tocoferol, menos potente do que os delta tocoferol e tocotrienol, o que também justifica os achados deste trabalho.

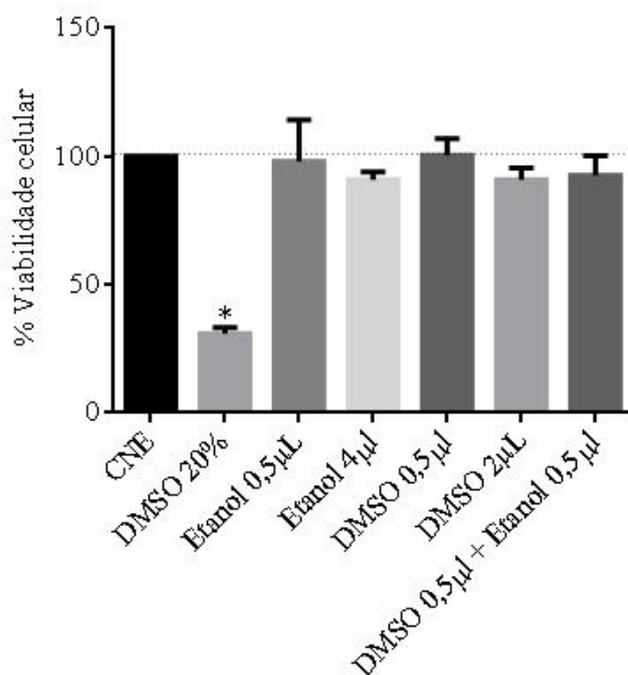


Figura 3- Citotoxicidade dos diluentes etanol (0,5µL e 4µL) e DMSO (0,5µL e 2µL) ou DMSO (0,5µL) + Etanol (0,5µL) sobre células de câncer de mama humano triplo negativas MDA-MB-231 tratadas por 24horas com os volumes pipetados correspondentes aos diferentes tratamentos com DHA e as vitaminas E, avaliada pelo teste de MTT (n=3) três experimentos cada um em triplicata. A citotoxicidade foi analisada pelas médias dos percentuais de células vivas em relação as células controle não estimuladas (CNE) (100% de células vivas). Os valores foram expressos em media ±SD, os resultados considerados estatísticos tiveram $p < 0,05$ (*) em relação ao CNE. O DMSO 20% foi utilizado como controle positivo para citotoxicidade.

A citotoxicidade do DHA e das diferentes isoformas de vitamina E também foi analisada em células não cancerígenas, foi utilizada a linhagem de monócitos humanos imortalizados THP1. As concentrações também foram analisadas pelo teste do MTT e não mostraram decréscimo na viabilidade das células após o taratamento com as três isoformas da vitaminas E (5µM) ou com o DHA (50µM) (Figura 4). Pode-se observar um aumento significativo na viabilidade das células nas culturas tratadas com 5µM de Alfa-T e Delta-T3 ($p < 0,05$) em relação as células controle não estimuladas (CNE), Assim, verificou-se que tanto o Alfa-T como os Deltas tocoferol e tocotrienol na concentração de 5µM e o DHA 50µM por um período de 24h de exposição não são citotóxico para os monócitos humanos.

Ainda na figura 4 têm-se os resultados da citotoxicidade dos coestimulos associando o DHA com as vitaminas E. Nenhum dos cotratamentos reduziu a viabilidade dos monócitos após 24 horas de exposição.

Pôde-se observar um aumento significativo da viabilidade das culturas de células tratadas com o Alfa-T e o Delta-T3 e também com o coestimulo de DHA+ Delta-T ($p < 0,05$) quando comparados com as CNE. O DHA sozinho não foi capaz aumentar a viabilidade das células e o coestimulo de DHA com o Alfa-T ou com o Delta-T3 não aumentaram a viabilidade celular quando comparado ao CNE. Com esses resultados concluiu-se que as diferentes isosoformas de vitamina E, Alfa-T, Delta-T e Delta-T3 e o DHA tanto sozinhos como em coestimulo não apresentam efeito citotóxico sob as células não tumorais THP1, mostrando que as concentrações de tratamendo com os compostos bioativos são fisiológicas também para os monócitos humanos de linhagem.

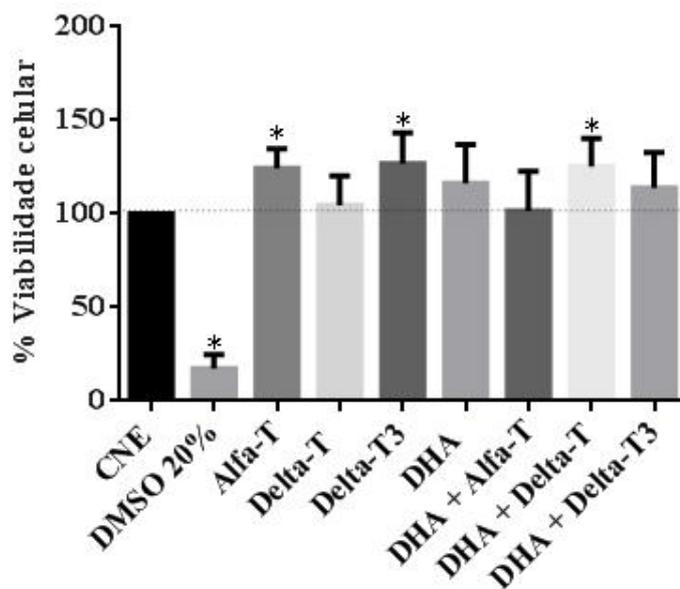


Figura 4- Citotoxicidade do Alfa-tocoferol (Alfa-T), delta-Tocoferol (Delta-T) e do Delta-Tocotrienol (Delta-T3) ambos na concentração de 5 μ M, e do Ácido Docosahexaenóico (DHA) na concentração de 50 μ M e dos coestimulos de DHA com as vitaminas E sobre a linhagem de células mononucleares (monócitos) humanos tratadas por 24horas, (n=2) dois experimentos cada um em n=6. Avaliadas pelo teste de MTT. A citotoxicidade foi analisada pelas médias dos percentuais de células vivas em relação as células controle não estimuladas (CNE) (100% de células vivas). Os valores foram expressos em media \pm SD, os resultados considerados estatísticos tiveram $p < 0,05$ (*) em relação ao CNE. O DMSO 20% foi utilizado como controle positivo para citotoxicidade

Para avaliar se os diluentes DMSO e etanol utilizados na solubilização dos compostos bioativos DHA e das Vitaminas E exerciam alguma influencia na sua possível citotoxicidade, tratamos as células THP1 com os mesmo volumes pipetados para os compostos por um período também de 24 horas, analisados pelo teste do MTT (Figura 5). Os resultados mostraram que os diluentes não são citotóxicos para monócitos humanos, uma vez que após estímulo por 24 horas não reduziram a viabilidade das células quando comparados com as células controle não estimuladas (CNE).

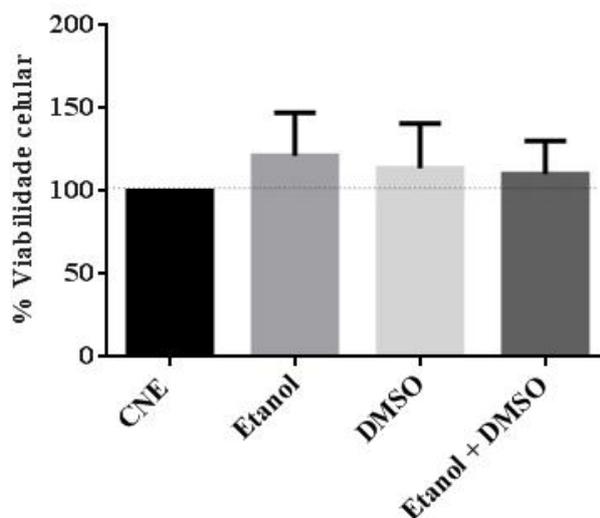


Figura 5- Citotoxicidade dos diluentes etanol (0,5µL) ou DMSO (0,5µL) ou etanol (0,5µL) + DMSO (0,5µL) sobre a linhagem de células mononucleares (monócitos) humanos tratadas por 24horas, (n=2) dois experimentos cada um em n=6. Avaliadas pelo teste de MTT. A citotoxicidade foi analisada pelas médias dos percentuais de células vivas em relação as células controle não estimuladas (CNE) (100% de células vivas). Os valores foram expressos em media ±SD, os resultados considerados estatísticos tiveram $p < 0,05$ (*) em relação ao CNE. O DMSO 20% foi utilizado como controle positivo para citotoxicidade.

5.2-Geração de espécies reativas de oxigênio (ROS)

As concentrações selecionadas foram testadas para avaliar a capacidade do DHA e das vitaminas E em modular a geração de ROS. Uma vez que a geração de ROS com consecutivo dano ao DNA é um passo inicial na carcinogênese e podem contribuir para o aumento do estresse oxidativo, e assim também aumentar a biogênese de CLs. Como mostrado na figura 6 apenas o DHA 50µM com tratamento por uma hora apresentou um aumento significativo de ROS ($p < 0,05$), as demais concentrações testadas não aumentaram a geração de ROS possivelmente por exercerem citotoxicidade e reduzirem o número de células viáveis na cultura. No período de 3 horas de tratamento não existiu aumento significativo na geração de ROS provavelmente devido a rápida capacidade redox da linhagem de célula MDA-MB-231, através da qual consegue reverter a superprodução de ROS como um mecanismo de defesa da célula tumoral para manter a sua homeostase. A literatura mostra que o DHA é hábil em aumentar a geração de ROS em células MDA-MB-231 (VIBET *et al.*, 2008; XIONG *et al.*, 2012) e em outros tipos de câncer (MAHÉO *et al.*, 2005; VIBET *et al.*, 2008; KANG *et al.*, 2010; KIKAWA *et al.*, 2011) o que corrobora com os nossos resultados.

Alguns estudos têm sugerido que um dos mecanismos envolvidos no efeito anticancerígeno dos PUFAs ω -3 é através da sua peroxidação (oxidação) (XIONG *et al.*, 2012; SKENDER *et al.*, 2012). As grandes cadeias poliinsaturados do DHA com vinte e dois carbonos e 6 instaurações (22:6-3n), o torna altamente peroxidável na presença de radicais livres que são comumente encontrados no ambiente tumoral (MERENDINO *et al.*, 2013; VAUGHAN *et al.*, 2013). Quando esses radicais sequestram um elétron nas cadeias poliinsaturadas dos ácidos graxos levam à sua oxidação (peroxidação), o que pode causar distúrbios na camada de fosfolípidos da membrana plasmática das células, consequentemente provocando dano celular e morte celular pelo aumento do estresse oxidativo (DING *et al.*, 2004; APPOLINÁRIO *et al.*, 2011). Além disso também já foi demonstrado que o DHA é capaz de reduzir a expressão de enzimas da maquinaria antioxidante em células MDA-MB-231 mostrando que a geração de ROS induzida pelo tratamento com o DHA supera alta capacidade redox das células MDA-MB-231 (MAHÉO *et al.*, 2005; VIBET *et al.*, 2008), o que mais uma vez corrobora com os resultados do nosso modelo.

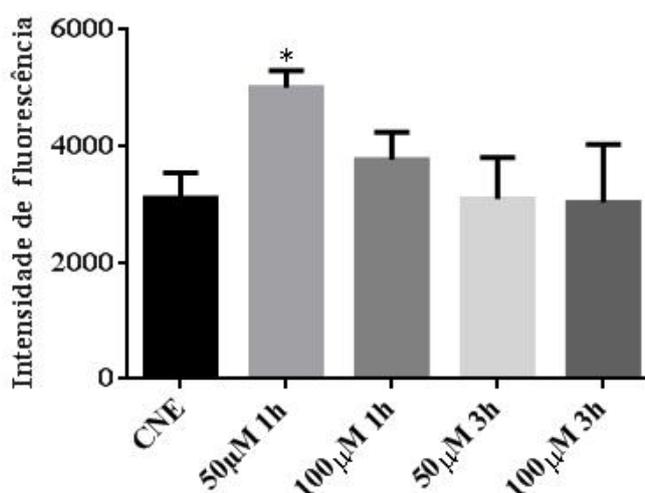


Figura 6- Formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelo DHA em células de câncer de mama MDA-MB-231 tratadas por 1 hora ou 3 horas com DHA 50µM e 100 µM. Avaliado pelo fluoróforo *cell ROX deep red* por citometria de fluxo (FACS Verse) (n=1) um experimento em triplicata. Valores expressos em média ±SD, os resultados considerados estatísticos tiveram $p < 0,05$ (*) em relação ao CNE.

A figura 7 apresenta os resultados dos coestímulos de DHA 50µM com as vitaminas E Alfa-T, Delta-T e Delta-T3 5µM por uma hora. O DHA 50µM foi capaz de estimular a produção de ROS tendo um aumento significativo ($*p < 0,05$) em relação ao CNE. A figura 6 também mostra que as vitaminas E Delta-T e Delta-T3 reduziram a geração de ROS ($*p < 0,05$), e o Delta-T3 foi a isoforma com maior capacidade em reduzir ROS possivelmente

devido a sua atividade antioxidante já bem descrita (TAYLOR, QIAO, ABNET *et al.*, 2003; CÁRDENAS, GHOSH, 2013). Estes resultados são condizentes com a literatura que relata que os tocotrienóis exibem atividade antioxidante mais forte quando comparado com os tocoferóis (PACKER *et al.*, 2001; BHARAT *et al.*, 2010; MULLER *et al.*, 2010; WONG *et al.*, 2012). O Alfa-T não foi capaz de reduzir ROS de forma significativa ($p > 0,05$), estudos recentes de mecanismos de ação indicaram que em comparação com Alfa-T, as outras isoformas da vitamina E parecem ter propriedades biológicas diferentes e superiores que podem ser úteis para a prevenção e tratamento contra doenças crônicas como o câncer (CONSTANTINO *et al.*, 2008; FU *et al.*, 2009; CARDENAS *et al.*, 2013; JIANG, 2014). Isso pode explicar o fato dessa isoforma não ter uma atividade antioxidante tão boa no microambiente tumoral apesar de ser a isoforma de vitamina E com atividade mais antioxidante entre os tocoferóis (TAYLOR, QIAO, ABNET *et al.*, 2003). Acredita-se que os tocotrienóis exibam atividade antioxidante mais forte quando comparado com os tocoferóis (MULLER *et al.*, 2010; CARDENAS *et al.*, 2013; JIANG, 2014), dado que explica a isoforma Delta-Tocotrienol ter tido o melhor resultado em diminuir ROS quando comparado ao Alfa e ao Delta tocoferóis.

Ainda na figura 7 foi observado que o coestimulo de DHA com Delta-T teve uma produção de ROS maior do que o Delta-T3 ($bP < 0,05$), assim com o coestimulo de DHA + Delta-T teve uma produção de ROS maior do que o Delta-T ($cP < 0,05$), mas mesmo assim apenas do Delta-T3 foi capaz de inibir de maneira significativa a geração de ROS induzida pelo DHA ($aP < 0,05$), uma vez, que o coestimulo com DHA 50 μ M mais 5 μ M de Delta-T3 levou a uma produção de ROS estatisticamente menor ($aP < 0,05$) quando comparado com a geração de ROS do DHA 50 μ M sozinho, A isoforma Alfa-T não foi capaz de inibir a produção de ROS induzida pelo DHA enquanto o Delta-T em coestimulo com o DHA não apresentou aumento de significativo de ROS ($*p < 0,05$), mas sem diferença significativa ($ap > 0,05$) com o tratamento com o DHA sozinho mostrando apenas um potencial em inibir o aumento de ROS induzido pelo DHA, uma vez que o DHA sozinho nessa mesma concentração aumentou ROS de forma significativa ($*p < 0,05$), estes dados condizem com os relatos de estudos com as diferentes isoformas de vitamina E que têm mostrado que os tocotrienóis possuem atividade mais antioxidante quando comparados com os tocoferóis ((MULLER *et al.*, 2010; CARDENAS *et al.*, 2013; JIANG, 2014).

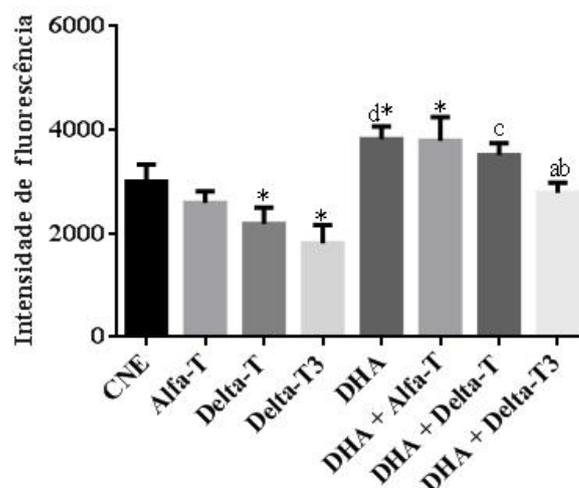


Figura 7- Formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelo DHA 50 μ M, Alfa-Tocoferol (Alfa-T) 5 μ M, Delta-Tocoferol (Delta-T) 5 μ M e Delta-Tocotrienol (Delta-T3) 5 μ M ou seus coestimulos nessas mesmas concentrações em células de câncer de mama MDA.MB.231 tratadas por 1hora. Avaliado pelo fluoróforo *cell ROX Deep Red* por citometria de fluxo (FACS Verse) (n=2) dois experimentos em triplicata. Valores expressos em mediana \pm SD, os resultados considerados estatísticos tiveram $p < 0,05$ e foram marcados com (*). Para resultados estatísticos $p < 0,05$ em relação ao DHA sozinho foram marcados com a letra (a), para $p < 0,05$ em relação ao Delta-T3 sozinho a marcação foi feita com a letra (b) e para $p < 0,05$ em relação ao Delta-T sozinho a identificação foi feita com a letra (c), para $p < 0,05$ (d) em relação ao Alfa-T, Delta-T ou ao Delta-T3 sozinhos.

5.3-Biogênese de corpúsculos lipídicos

A Figura 8 apresenta os resultados de intensidade de fluorescência obtidos com o tratamento pelo DHA. A média da intensidade de fluorescência da formação de CLs aumentou em relação ao CNE. O DHA 100 μ M foi a concentração que mais aumentou a biogênese de corpúsculos com uma intensidade de fluorescência duas vezes maior do que a intensidade de fluorescência do CNE (Figura complementar 1). Sabe-se que alguns ácidos graxos livres exercem um potencial tóxico para as células tumorais em comparação com lipídios neutros como triglicerídeos esterificados (POL, GROSS *et al.*, 2014). Nesse sentido, o acúmulo e corpúsculos lipídicos parece desempenhar um papel de proteção contra a lipotoxicidade, sendo assim, os corpúsculos fornecem um mecanismo de proteção para evitar apoptose quando as células tumorais são expostas a um excesso de ácidos graxos não esterificados (LISTENBERGER *et al.*, 2003) o que pode justificar o aumento da biogênese de CLs encontrada neste estudo no qual as células foram tratadas com o DHA que é um ácido graxo com potencial citotoxicidade para as células tumorais (WU *et al.*, 2005; LU *et al.*, 2009;

JIANG *et al.*, 2011), nossos dados mostram pela primeira vez que o DHA é hábil em aumentar a biogênese de CLs em células de câncer de mama invasivo MDA-MB-231.

Semelhante ao nosso estudo, porém em linhagens celulares diferentes Ruiz-Vela e colaboradores (2011) observaram que os ácidos graxos insaturados palmitoleico, oleico e linoleico levavam a um aumento de até 6 vezes na quantidade de corpúsculos lipídicos (CLs) em diferentes linhagens de cânceres humanos incluindo carcinoma hepatocelular Huh-7, carcinoma do ovário SK-OV-3, adenocarcinoma de mama MCF-7 e de melanoma MALME-3M. Outros autores mostraram que o ácido oleico aumenta CLs em macrófagos (CHEN *et al.*, 2002) e em monócitos (SUZUKI *et al.*, 1991) humanos, mostrando que outros ácidos graxos insaturados podem modular a biogênese de CLs. Esses dados sugerem que a suplementação com ácidos graxos exógenos pode aumentar a biogênese de corpúsculos (POL, GROSS *et al.*, 2014).

Embora o acúmulo de CLs nos tecidos já tenha considerado notório para os transtornos relacionados com a obesidade, a formação CLs é realmente um evento citoprotetivo, uma vez que a incapacidade de armazenar lipídios nos CLs pode causar estresse celular e resistência à insulina (MEEEX *et al.*, 2009; SOETERS *et al.*, 2012). Outro fator que pode explicar esse aumento na quantidade de CLs em nosso modelo é o fato do DHA ser hábil em aumentar a geração de ROS (XIONG *et al.*, 2012; MERENDINO *et al.*, 2013; VAUGHAN *et al.*, 2013), a figura 6 e 7 mostraram que o DHA foi capaz de aumentar espécies reativas de oxigênio (ROS) na linhagem celular em estudo. Isso pode em parte explicar o aumento de CLs induzido pelo DHA encontrado em nosso estudo, uma vez que o estresse oxidativo causado pelos ROS pode favorecer a gênese de CLs (YOUNCE; KOLATTUKUDY, 2012). Uma outro fato interessante é que a β -oxidação de ácidos graxos (AG) é uma importante fonte de ROS, o FADH₂ gerado durante a β -oxidação dos ácidos graxos aumenta a produção de ROS através da inversão do fluxo de elétrons nos complexo I e II da cadeia transportadora de elétrons nas mitocôndrias. Portanto, o armazenamento de ácidos graxos dentro dos CLs, pode reduzir os níveis de ácidos graxos disponíveis para a β -oxidação, e pode ser uma estratégia de sobrevivência e um mecanismo plausível para proteger a integridade celular contra o estresse oxidativo gerado pelo excesso de ROS (SEKIYA *et al.*, 2008), então sugere-se que a suplementação com o DHA também pode levar ao aumento da biogênese de CLs devido a seu armazenamento como mecanismo de defesa da célula tumoral contra a toxicidade desse AG e também para evitar uma maior geração de ROS quando esses AG são β -oxidados.

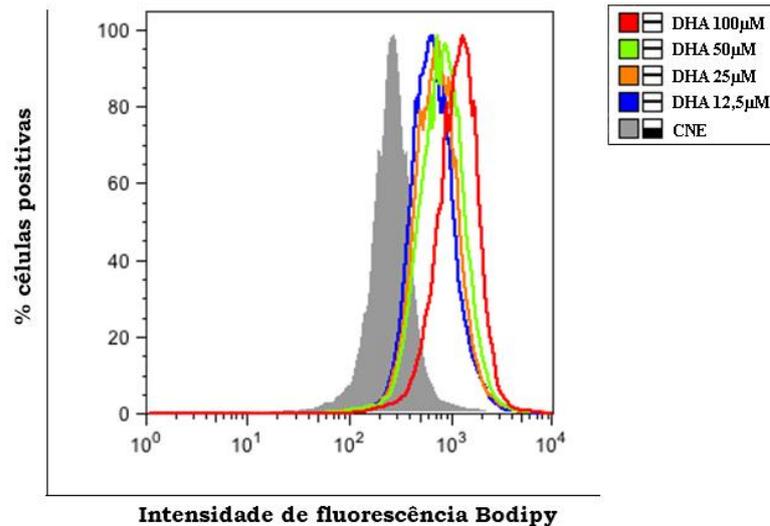


Figura 8- Formação de corpúsculos lipídicos induzido pelo Ácido Docosahexaenóico (DHA) em células de câncer de mama MDA-MB-231 tratadas por 24 horas com 12,5 μM, 25 μM, 50 μM e 100 μM de DHA. A intensidade de fluorescência emitida pelo fluoróforo Bodipy foi avaliada por citometria de fluxo (FACS Verse) (n=1) um experimento em triplicata. A figura mostra os histogramas representativos das intensidades de fluorescência da incorporação do fluoróforo Bodipy obtidos por citometria de fluxo (FACS Verse). O histograma cinza representa a intensidade de fluorescência emitida pelas células controle não estimuladas (CNE), os histogramas coloridos mostram as intensidades de fluorescência emitidas pelas células tratadas com as diferentes concentrações de DHA, sendo o azul o DHA 12,5 μM, o laranja o DHA 25 μM, o verde o DHA 50 μM e o vermelho o DHA 100 μM.

Após verificar que o DHA a partir de 12,5 μM já era capaz de induzir uma maior biogênese de CLs foi escolhido a concentração de DHA 50 μM para os coestimulos, por também ser uma concentração capaz de aumentar a geração de ROS como (Figura 6 e 7) e por ser uma dose fisiológica para essa linhagem celular (Figura 2A).

A figura 9A mostra as imagens de microscopia confocal e pela primeira vez na literatura foi observado que DHA é capaz de aumentar a biogênese de corpúsculos lipídicos (CLs) nas células de cancer de mama invasivo MDA-MB-231 em comparação com as células não tratadas o (CNE).

A figura 9B mostra o histograma representativo de três experimentos (n=3) em triplicata da intensidade de fluorescência confirmando os dados mostrados na figura 9A, indicando que o DHA sozinho, aumentou a biogênese de corpúsculo em relação ao CNE, O alfa-T, apesar de formar CLs menores (Figura 12) também aumentou a biogênese de corpúsculo em relação as células CNE, no entanto o aumento foi menor do que o DHA sozinho. É interessante notar que o coestímulo de DHA + Alfa-T, mostrou um aumento menor

do que o DHA sozinho, o que sugere que essa isoforma de vitamina E mesmo na dose fisiológicas de $5\mu\text{M}$ modula a biogênese de corpúsculos induzida pelo DHA.

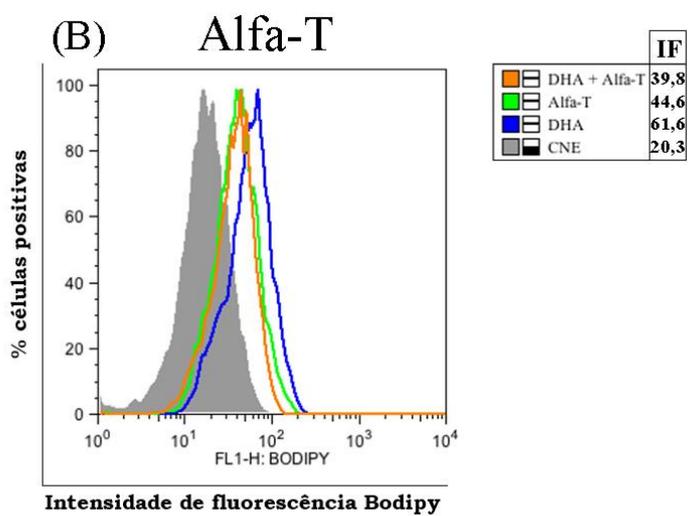
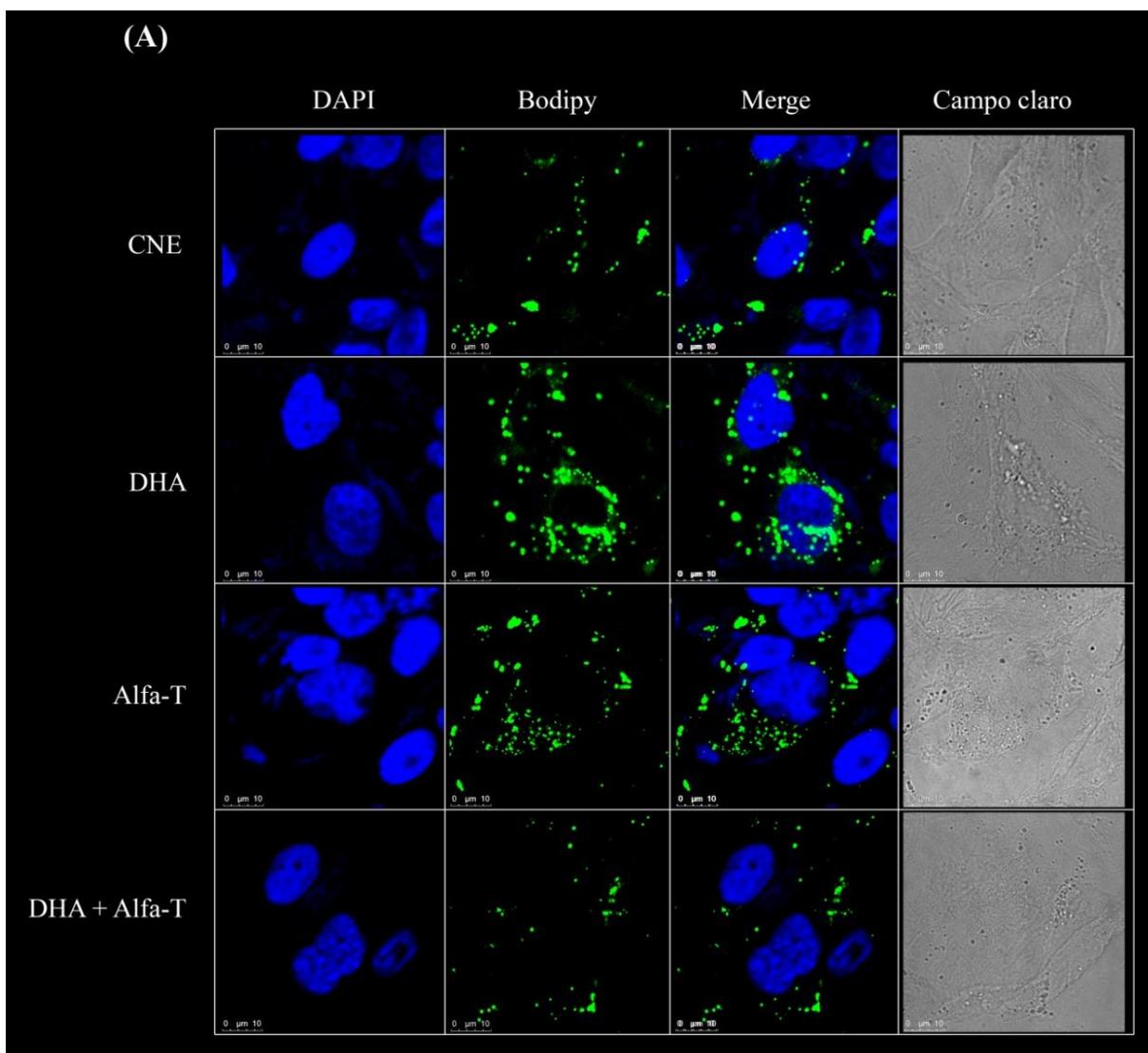


Figura 9- Formação de corpúsculos lipídicos induzido pelo Ácido Docosahexaenóico (DHA), alfa-Tocoferol (Alfa-T) e pelo coestimulo de DHA + Alfa-T em células de câncer de mama MDA-MB-231 tratadas por 24 horas com 50µM do DHA e/ou 5µM do Alfa-T. **(A)** mostra imagens obtidas por microscópio confocal Leica TCS SP5 com aumento de 63X e Zoom de 4, as imagens são representativas de toda população das lâminas de três experimentos realizados separadamente (n=3). O Núcleo das células foi corado em azul com o DAPI, os corpúsculos lipídicos foram corados em verde com Bodipy, na figura nomeada Merge estão expostas as sobreposições das imagens do DAPI com o bodipy para mostrar a localização dos corpúsculos no citoplasma da célula e o Campo claro mostra as imagens das células sem marcadores fluorescentes para observação da morfologia da célula. **(B)** Traz os histogramas representativos das intensidades de fluorescência da incorporação do fluoróforo Bodipy obtidos por citometria de fluxo (FACS Calibur) (n=3) três experimentos em triplicata. **(IF)** Intensidade de fluorescência, o histograma cinza representa a média de intensidade de fluorescência das células controle não estimulado (CNE), a linha azul representa o histograma do DHA 50µM, a verde o Alfa-T 5µM e a linha laranja o coestimulo de DHA50µM + Alfa-T 5µM.

A figura 10A mostra as imagens obtidas por microscopia confocal, indicando que ambos os estímulos e o coestimulo aumentaram a biogênese de corpúsculos quando comparados ao CNE, porém é interessante notar que o Delta-T sozinho teve uma menor formação de CLs do que o DHA e que o coestimulo de DHA + Delta-T também mostrou uma menor biogênese do que o DHA sozinho.

A figura 10B mostra o histograma da intensidade de fluorescência indicando que o coestimulo de DHA + Delta-T leva a uma menor formação de CLs do que o tratamento apenas com o DHA.

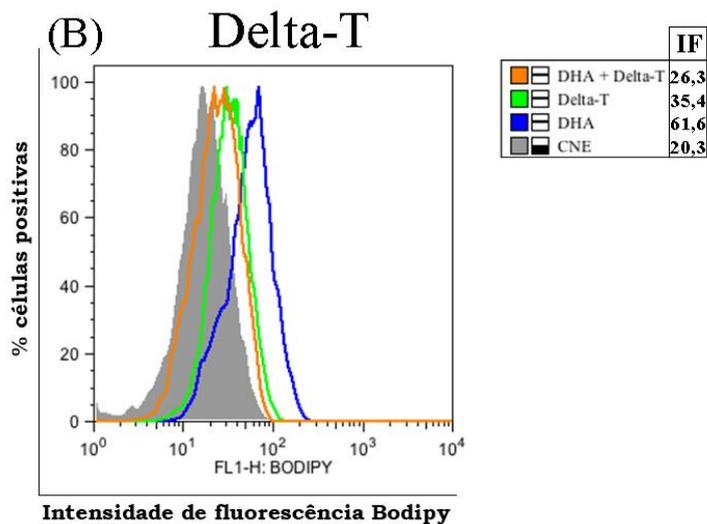
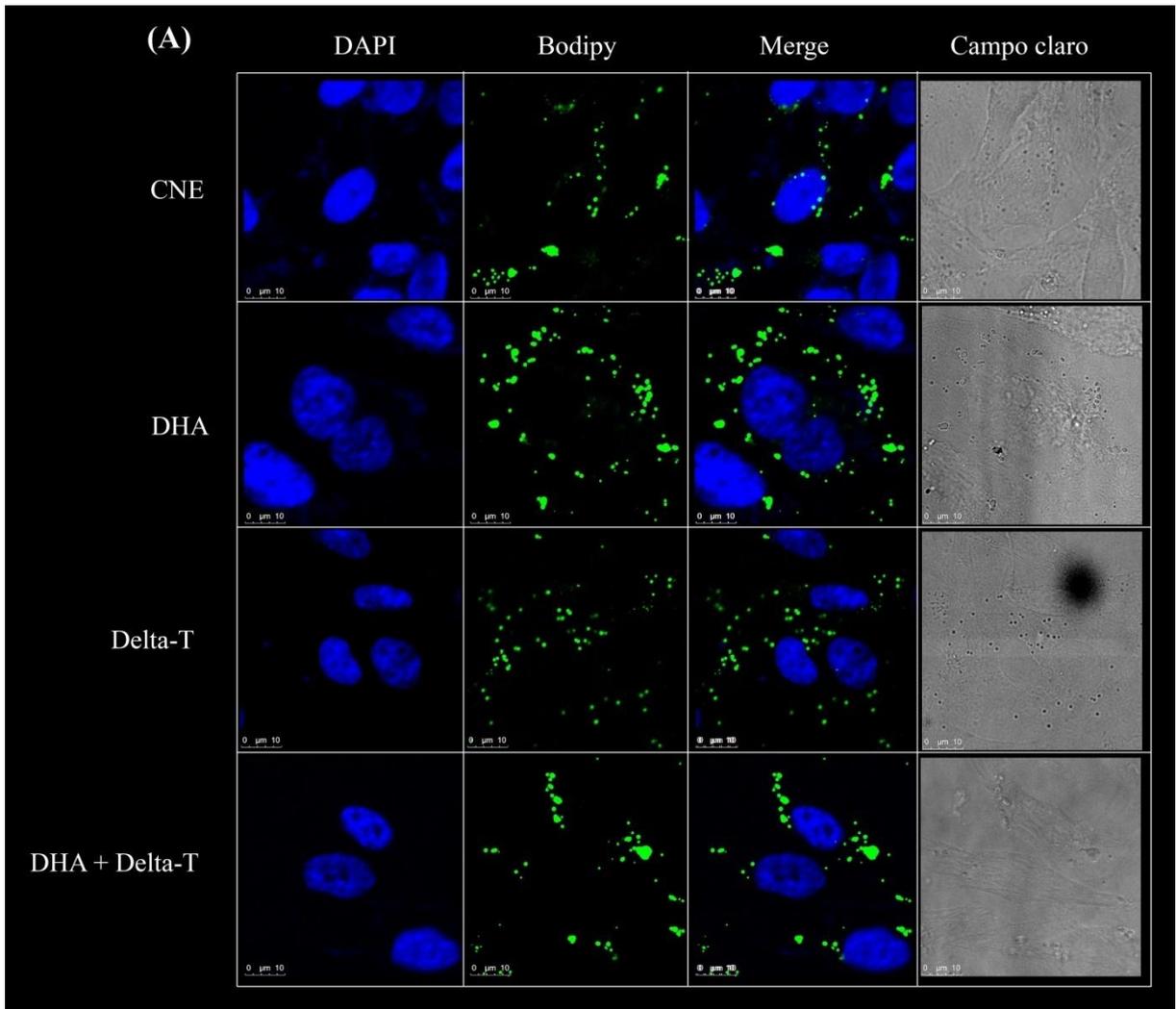


Figura 10- Formação de corpúsculos lipídicos induzido pelo Ácido Docosahexaenóico (DHA), Delta-Tocoferol (Delta-T) e pelo coestímulo de DHA + Delta-T em células de câncer de mama MDA-MB-231 tratadas por 24horas com 50 μ M do DHA e/ou 5 μ M do Delta-T. (A) mostra imagens obtidas por microscópio confocal Leica TCS SP5 com aumento de 63X e Zoom de 4, as imagens são representativas de toda população das lâminas de três experimentos realizados separadamente (n=3). O Núcleo das células foi corado em azul com o DAPI, os corpúsculos lipídicos foram corados em verde com Bodipy, na figura nomeada Merge estão expostas as sobreposições das imagens do DAPI com o bodipy para mostrar a localização dos corpúsculos no citoplasma da

célula e o Campo claro mostra as imagens das células sem marcadores fluorescentes para observação da morfologia da célula. **(B)** Traz os histogramas representativos das intensidades de fluorescência da incorporação do fluoróforo Bodipy obtidos por citometria de fluxo (FACS Calibur) (n=3) três experimentos em triplicata. **(F)** Intensidade de fluorescência, o histograma cinza representa a média de intensidade de fluorescência das células controle não estimulado (CNE), a linha azul representa o histograma do DHA 50 μ M, a verde o Delta-T 5 μ M e a linha laranja o coestimulo de DHA50 μ M + Delta-T 5 μ M.

A figura 11 retrata os resultados da formação de CLs das células MDA-MB-231 tratadas com o DHA e/ou com o Delta-Tocotrienol (Delta-T3) sozinhos. A figura 11A mostra as imagens de microscopia de fluorescência indicando que tanto o DHA quanto o Delta-T3 sozinhos e seus coestimulos aumentaram a biogênese de corpúsculos mesmo em doses fisiológicas, quando comparadas com as imagens das (CNE). A figura 11B mostra que o coestímulo de DHA com a vitamina Delta-T3 leva a uma menor formação de CLs do que o DHA sozinho, representado deslocamento menor quando comparado ao DHA sozinho.

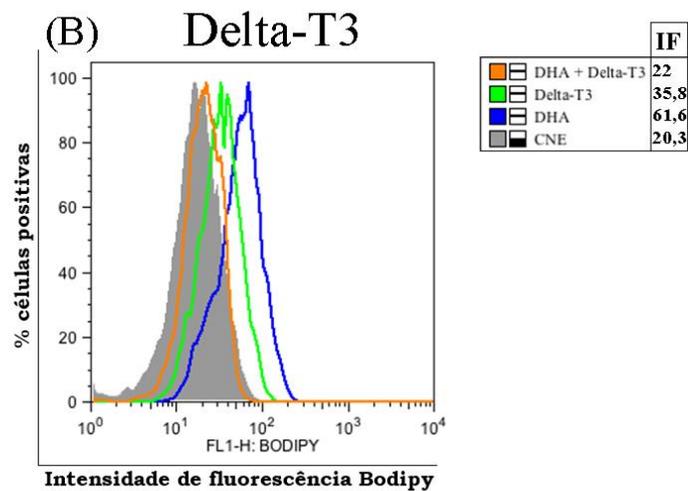
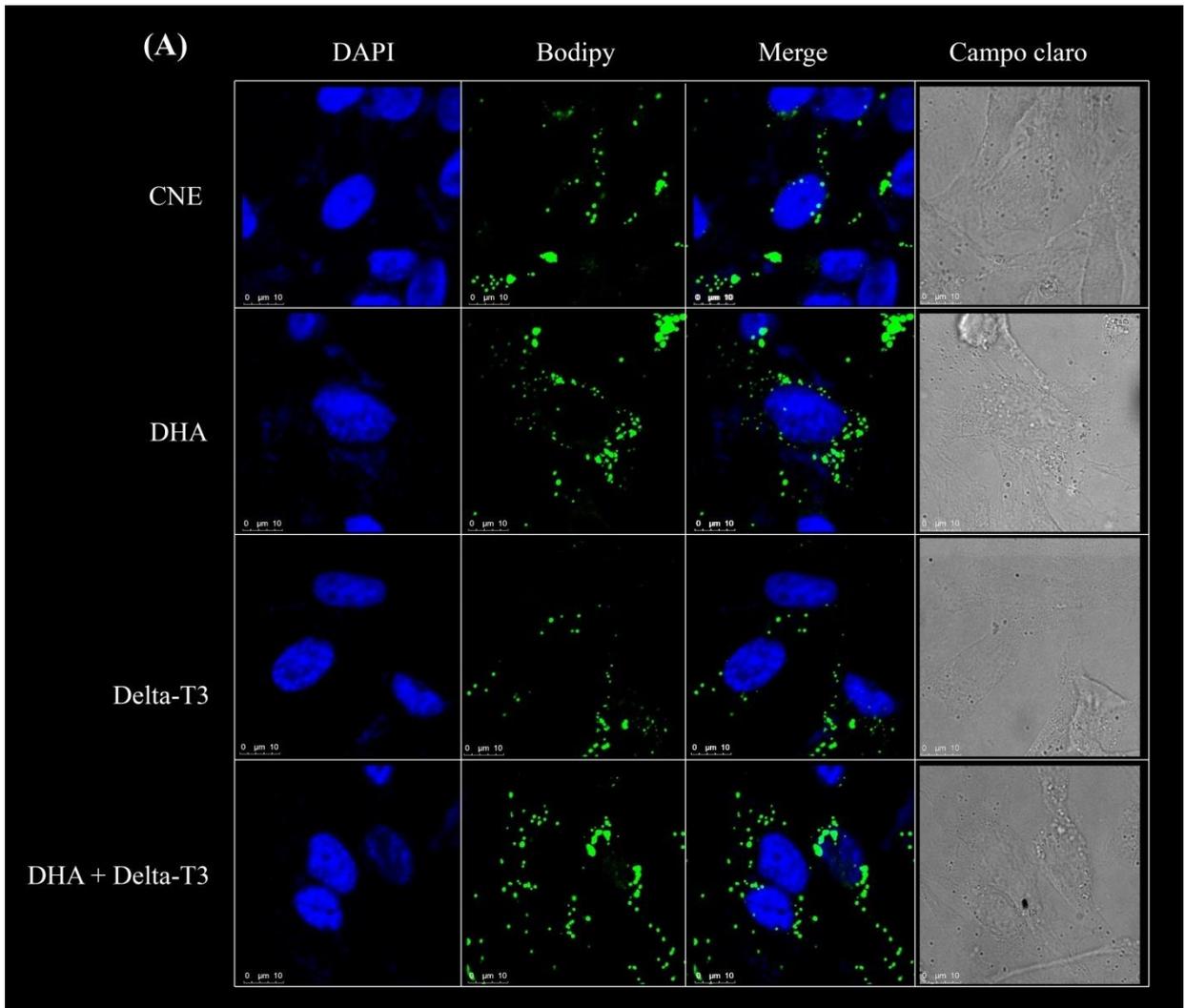


Figura 11- Formação de corpúsculos lipídicos induzido pelo Ácido Docosahexaenóico (DHA), Delta-Tocotrienol (Delta-T3) e pelo coestimulo de DHA + Delta-T3 em células de câncer de mama MDA-MB-231 tratadas por 24horas com 50 μ M do DHA e/ou 5 μ M do Delta-T. (A) mostra imagens obtidas por microscópio confocal Leica TCS SP5 com aumento de 63X e Zoom de 4, as imagens são representativas de toda população das lâminas de três experimentos realizados separadamente (n=3). O Núcleo das células foi corado em azul com

o DAPI, os corpúsculos lipídicos foram corados em verde com Bodipy, na figura nomeada Merge estão expostas as sobreposições das imagens do DAPI com o bodipy para mostrar a localização dos corpúsculos no citoplasma da célula e o Campo claro mostra as imagens das células sem marcadores fluorescentes para observação da morfologia da célula. (B) Traz os histogramas representativos das intensidades de fluorescência da incorporação do fluoróforo Bodipy obtidos por citometria de fluxo (FACS Calibur) (n=3) três experimentos em triplicata. (IF) Intensidade de fluorescência, o histograma cinza representa a média de intensidade de fluorescência das células controle não estimulado (CNE), a linha azul representa o histograma do DHA 50 μ M, a verde o Delta-T3 5 μ M e a linha laranja o coestimulo de DHA50 μ M + Delta-T3 5 μ M.

Esses resultados trazem uma nova função da vitamina E e do DHA na modulação da biogênese de corpúsculos lipídicos na linhagem celular MDA-MB-231, uma vez que ainda não foi descrito na literatura o papel desses compostos na biogênese de CLs, estes resultados abrem o campo para estudos mais aprofundados para a caracterização do mecanismo de ação desses compostos na modulação da gênese de CLs. Interessantemente os antioxidantes Alfa-tocoferol e Delta-tocoferol e Delta-Tocotrienol apresentaram um menor efeito no aumento da gênese de CLs, provavelmente devido a sua capacidade em reduzir a geração ROS (CÁRDENAS, GHOSH, 2013) que é um radical livre com potencial ação na indução do estresse oxidativo que como já dito é um parâmetro que iduz a biogênese de CLs.

Existem poucos estudos que avaliaram o efeito das diferentes isoformas de vitamina E na biogênese de corpúsculos lipídicos em células em cultura, por isso, há escassas informações sobre os mecanismos de atuação dessa vitamina no acúmulo ou no consumo de lipídios no micrombiente celular (BAEHRECKE *et al.*, 2005; UTO-KONDO, OHMORI, KIYOSE *et al.*, 2009). Nossos resultados trazem uma nova informação a respeito da atuação na vitamina E na modulação da biogênese de CLs na presença do DHA, e esses dados alertam para a importancia de melhor avaliar a atuação do DHA no microambiente tumoral uma vez que o aumento de lipídios intracelulares armazenados nos CLs pode ser um parâmetro de mal prognóstico do cancer de mama, visto que a maior malignidade do cancer de mama pode esta relacionada com um maior conteúdo de lipídios intracelular, uma vez que esses lipídios podem ser utilizados como substrato energético para a proliferação celular e aumento da tumorigênese (NIEVA *et al.*, 2013).

Em nosso modelo a vitamina E foi capaz de reduzir a gênese de CLs quando em coestimulo com o DHA, mostrando um potencial positivo dessas vitaminas na redução do acúmulo de lipídios gerado pelo tratamento com o DHA, dado que torna essa vitamina um alvo de estudo interessante no tratamento clínico do câncer de mama, uma vez que é capaz de modular a quantidade de CLs nas células de câncer de mama MDA-MB-231 e deve ser melhor estudada para sua utilização como adjuvante no tratamento clínico da doença.

Nossos dados mostraram uma resposta diferente dos estudos que observaram a biogênese de CLs em outras linhagens celulares, destaca-se que os estudos que observaram que os tocotrienóis reduziram a biogênese de CLs utilizaram concentrações maiores que 20 μ M (BURDEOS et al., 2012; BURDEOS et al., 2014), em nosso modelo o Delta-tocotrienol e os tocoferóis Alfa e Delta aumentaram a biogênese de CLs, porém a dosagem utilizada foi de 5 μ M, por isso sugere-se novos ensaios com dosagens maiores a fim de observar se concentrações maiores dessas vitaminas podem modular de maneira diferente a biogênese de CLs em células tumorais, uma vez que já se tem descrito que essas células possuem uma alta capacidade de síntese *de novo* de lipídios, e a concentração utilizada em nossos ensaios pode não ter sido suficiente para superar essa síntese *de novo* de lipídios aumentada. Também sugere-se a realização de ensaios mais robustos a fim de melhor caracterizar o efeito da isoformas de vitamina E sob a biogênese de CLs na presença do DHA, através da do bloqueio de proteínas importantes na formação dos CLs como a ADRP e as perilipins e avaliação de parâmetros de carcinogênese como proliferação e sobrevivência celular.

Além da análise da quantidade de CLs também foi avaliado o tamanho dos corpúsculos formados, a Figura 12 mostra imagens de microscopia confocal, nas quais é possível observar uma diferença no tamanho dos corpúsculos dado que até então não tinha sido descrito na literatura mostrando que o DHA e a vitamina E além de modularem a gênese dos CLs também interferem no tamanho dos corpúsculos formados. Em nosso estudo tanto as células tratadas com DHA e como os coestimulos apresentam corpúsculos maiores do que o CNE, e o Alfa-T foi a isoforma da vitamina E que apresentou CLs com tamanhos menores quando comparados com as células não tratadas, com o DHA e os coestimulos e também com as isoformas Delta tocoferol e tocotrienol.

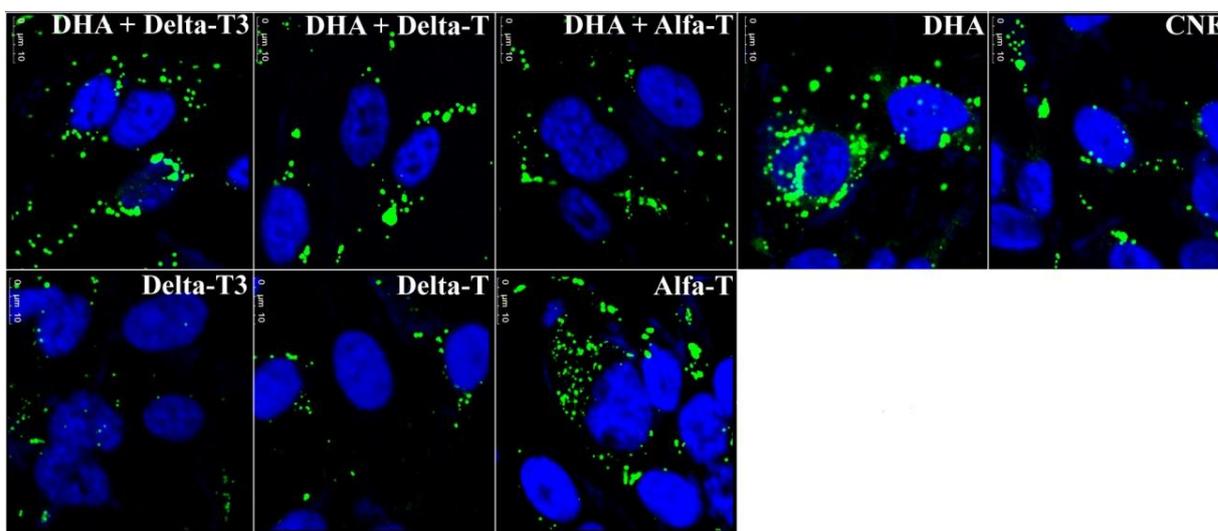


Figura 12- Tamanho dos corpúsculos lipídicos formados a partir do tratamento com o Ácido Docosahexaenóico (DHA) 50 μ M e vitaminas “E”: Alfa-Tocoferol (Alfa-T), Delta-Tocoferol (Delta-T), Delta-Tocotrienol (Delta-

T3) ambos à 5 μ M e pelo coestimulo de DHA + Alfa-T, DHA + Delta-T e DHA + Delta-T3 em células de câncer de mama MDA-MB-231 tratadas por 24 horas. As imagens foram obtidas por microscópio confocal Leica TCS SP5 com aumento de 63X e Zoom de 4, e são representativas de toda população das lâminas de três experimentos realizados separadamente (n=3). O Núcleo das células foi corado em azul com o DAPI, os corpúsculos lipídicos foram corados em verde com Bodipy. Controle não estimuladas (CNE).

Dados da literatura em células *Drosophila Schneider* (S2) tratadas com 1mM do ácido graxo insaturado aleato mostraram que alguns genes estão envolvido no tamanho e na distribuição de corpúsculos lipídicos, e descreveram que após o tratamento das células com o ácido graxo, primeiro existiu um aumento no número de corpúsculos com um volume pequeno distribuídos de forma dispersa no citoplasma da célula. E após 24 horas de exposição ao tratamento com o ácido graxo os corpúsculos aumentaram de tamanho e depois se agregaram uns aos outros formando estruturas parecidas com cachos de uva e se localizavam perto do núcleo da célula (GUO *et al.*, 2008), o que corrobora com os achados deste trabalho, nos quais observou-se que as células MDA-MB-231 tratadas com o ácido graxo DHA apresentavam corpúsculos maiores do que as células não tratadas ou do que as células tratadas apenas com as vitaminas E após 24 horas de tratamento (Figura 12).

Estes autores descreveram que uma falha em sintetizar fosfolipídios de membrana pode levar a formação de corpúsculos maiores, pois ao invés das células sintetizarem novos corpúsculos lipídicos o mesmo CLs passa a armazenar mais lipídios aumentando seu volume. Os autores destacaram que a fosfatidilcolina é utilizada para a síntese de fosfolipídios de membrana, então uma maior disponibilidade de fosfatidilcolina poderia levar a formação de mais corpúsculos com um tamanho menor, uma vez que a redução de fosfatidilcolina levou a um aumento de fosfatidiletalonamina que proporcionou maior fusão e aumento no tamanho dos corpúsculos (GUO *et al.*, 2008).

O alfa-tocoferol sabidamente forma complexos com a fosfatidilcolina e por isso pode influenciar na estabilidade das membranas celulares (WANG *et al.*, 1999). O alfa-T levou a formação de corpúsculos menores do que os formados com o estímulo com o DHA e os seu coestimulos com as três isoformas de vitamina E (Figura 12) isso pode ter ocorrido devido a interação pouco conhecida do alfa-T com a formação de membranas que pode ter favorecido a dispersão e a formação de mais corpúsculos com uma tamanho menor, mais experimentos são necessários para explicar a atuação do alfa tocoferol em diminuir o tamanho dos CLs.

5.4-Expressão de PPAR γ

A figura 13 mostram as imagens de microscopia confocal para as células tratadas com DHA e seus coestimulos com a vitaminas E. A marcação com PPAR γ em verde mostra que as células tratadas tanto com o DHA como com os coestimulos 3 aumentaram a expressão do

PPAR γ em relação as imagens do CNE. Atravez da observação das imagens não é possível diferenciar a quantidade de PPAR expressa nos diferentes tratamentos, mas nítidamente pode-se observar que a coloração verde dispersa pelo citoplasma das células tratadas é maior do que o CNE indicando que os tratamentos estimularam a expressão do PPAR γ .

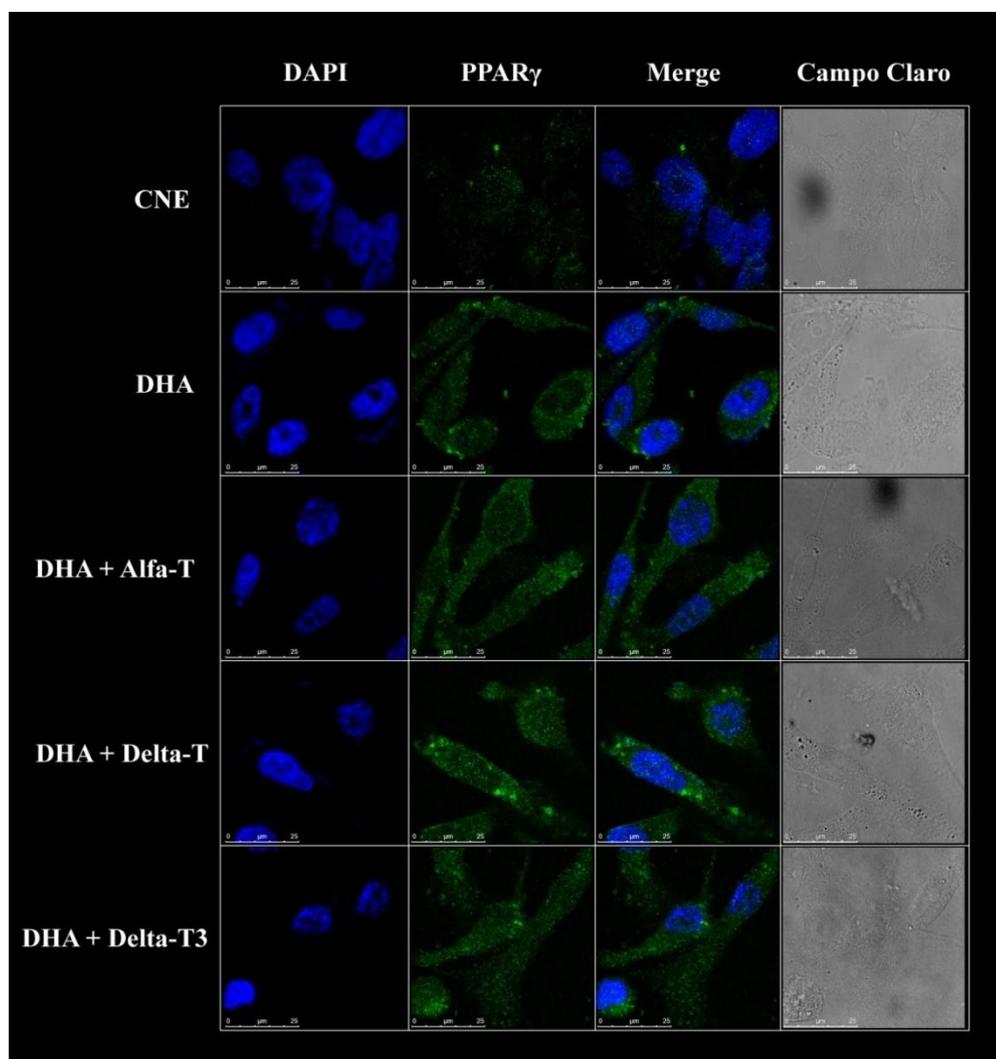


Figura 13- Expressão do PPAR γ nas células MDA-MB-231 tratadas por 24 horas com o Ácido Docosahexaenóico (DHA) 50 μ M e/ou com seu coestimulo com Alfa-T, ou Delta-T ou Delta-T3. As foram imagens obtidas por microscópio confocal Leica TCS SP5 com aumento de 63X e Zoom de 4, são representativas de toda população das lâminas de um experimento (n=1). O Núcleo das células foi corado em azul com o DAPI, o PPAR γ foi marcado em verde com o anticorpo AlexaFluor 488, na figura nomeada Merge estão expostas as sobreposições das imagens do DAPI com o PPAR γ para mostrar a localização do PPAR γ no citoplasma das células e o campo claro mostra as imagens das células sem marcadores fluorescentes para observação da morfologia da célula.

Alguns fatores de transcrição estão envolvidos na biogênese de CLs, dentre eles o PPAR γ já foi mostrado como regulador da expressão de genes relacionados com o consumo e acúmulo de lipídios nas células, assim como da formação de mediadores inflamatórios (BOZZA et al., 2010). Observou-se que o DHA e seus coestimulos com as vitaminas E aumentaram a expressão de PPAR γ e isso pode estar associado ao aumento na biogênese de

corpúsculos com esses tratamentos. O PPAR γ está envolvido na síntese de lipídios por estimular a expressão de genes relacionados à enzima ácido graxo sintase que participa da lipogênese (CHAWLA *et al.*, 2001). Já foi descrito que ácidos graxos livres estimulam a expressão de PPAR γ (XU *et al.*, 1999; COMBA *et al.*, 2012; DESVERGNER *et al.*, 2013), assim como o DHA e as vitaminas E (CAMPBELL, STONE, WHALEY *et al.*, 2003). O PPAR γ também está associado a biogênese de CLs em hepatocitos, células de câncer cervical, macrófagos e em pré adipocitos tratados com drogas indutoras de PPAR γ (MCDONOUGH *et al.*, 2009).

5.4- Lipofagia

A figura 14 e 15 mostram as imagens de microscopia confocal para as células tratadas com DHA e as vitaminas E. As setas brancas indicam as colocalizações entre os marcadores Bodipy e LC3, sugerindo que no tratamento com DHA sozinho há a ocorrência da lipofagia enquanto que nos tratamentos com Delta-T e Delta-T3 não foram identificadas as colocalizações entre os marcadores. Nas análises para o coestimulo do DHA + Delta-T (Figura 14) não foi identificado a indicação da lipofagia enquanto que para o coestímulo de DHA + Delta-T3 (Figura 15) pode-se observar a existência de colocalização entre o Bodipy e o LC3 indicando a existência da lipofagia.

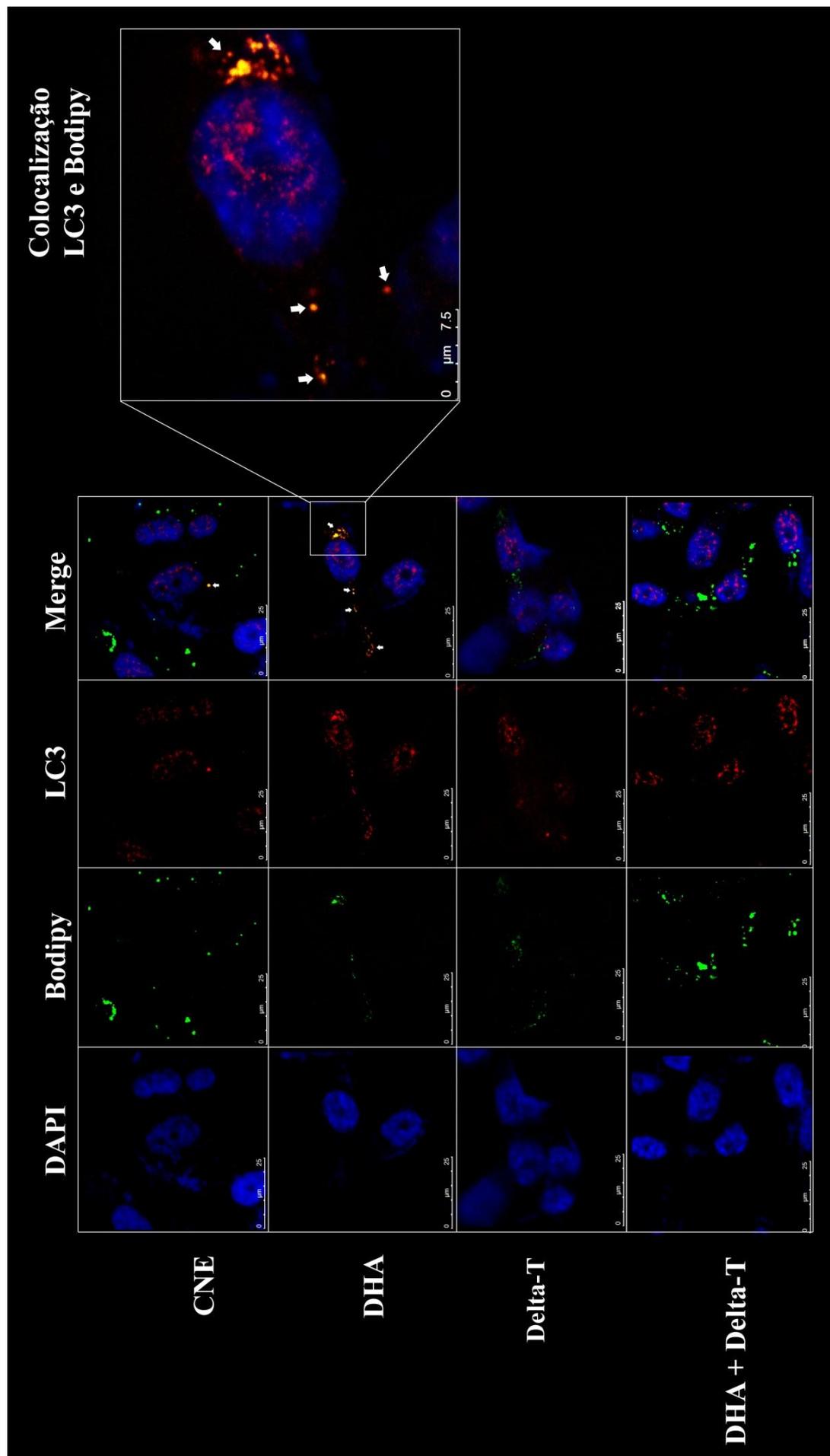


Figura 14- Indicação de lipofagia em células MDA-MB-231 tratadas com Ácido Docosahexaenóico (DHA), Delta-Tocoferol (Delta-T) e pelo coestimulo de DHA + Delta-T 24horas com 50μM do DHA e/ou 5μM do Delta-T. As imagens foram obtidas por microscópio confocal Leica TCS SP5 com aumento de 63X e Zoom de 4 e 8, as imagens representativas de toda população das lâminas de um (n=1). O Núcleo das células foi corado em azul com o DAPI, os corpúsculos lipídicos foram corados em verde com Bodipy LC3 marcador do autofagossomo da lipofagia marcado em vermelho, na figura nomeada Merge estão expostas as sobreposições das imagens do DAPI com o bodipy e LC3 mostrar a colocalização dos corpúsculos com o LC3 em amarelo, as setas brancas indicam os pontos indicativo de lipofagia pela de colocalização bo Bodipy com o LC3. Controle : estimulado (CNE).

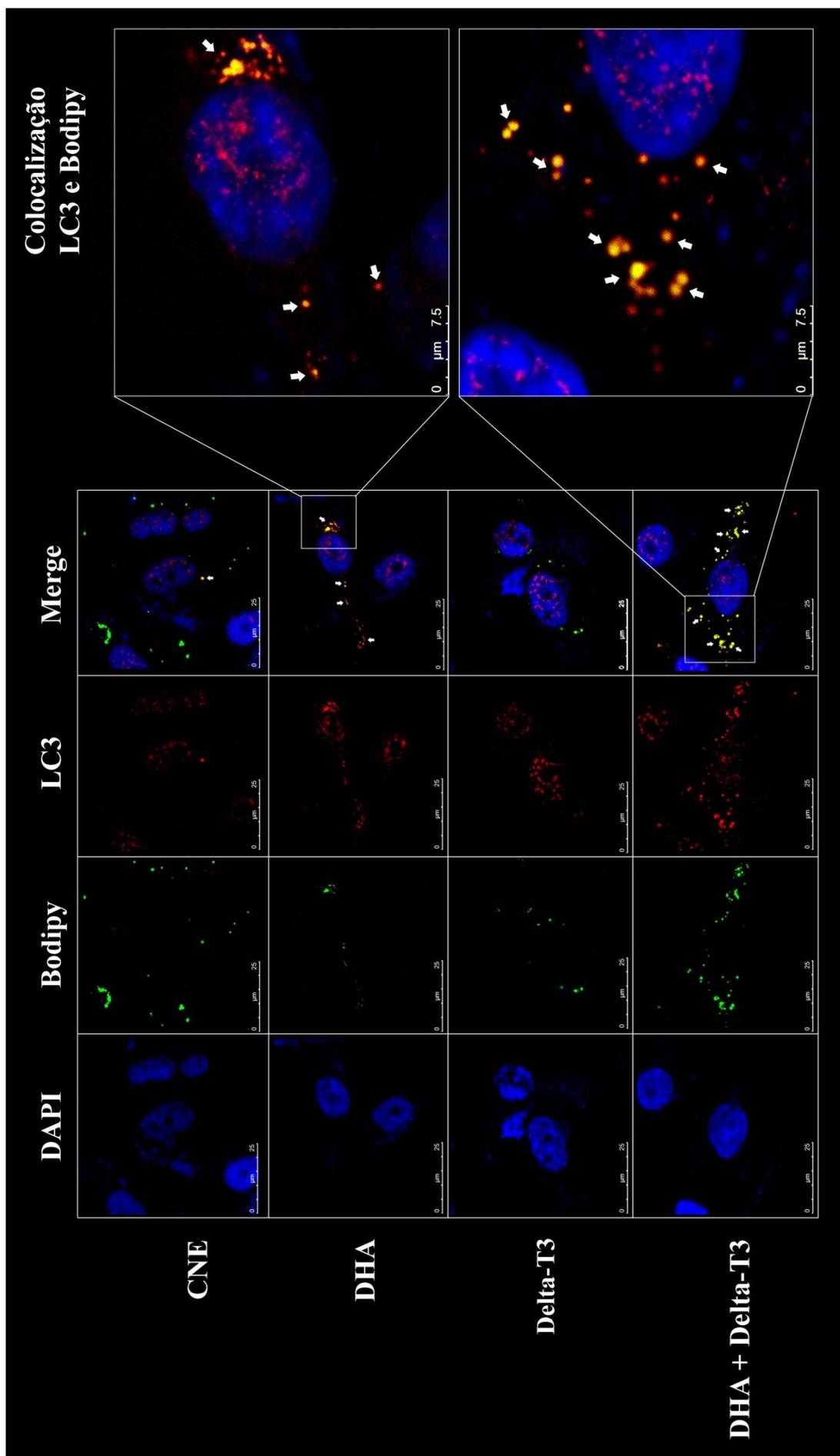


Figura 15- Indicação de lipofagia em células MDA-MB-231 tratadas com Ácido Docosahexaenóico (DHA), Delta-Tocotrienol (Delta-T3) e pelo coestimulo de DHA + Delta-T3 por 24horas com 50µM do DHA e/ou 5µM do Delta-T3. As imagens foram obtidas por microscópio confocal Leica TCS SP5 com aumento de 63X e Zoom de 4 e 8, as imagens são representativas de toda população das lâminas de um (n=1). O Núcleo das células foi corado em azul com o DAPI, os corpúsculos lipídicos foram corados em verde com Bodipy e o LC3 marcador do autofagossomo da lipofagia marcado em vermelho, na figura nomeada Merge estão expostas as sobreposições das imagens do DAPI com o bodipy e LC3 para mostrar a colocalização dos corpúsculos com o LC3 em amarelo, as setas brancas indicam os pontos indicativo de lipofagia pela de colocalização bo Bodipy com o LC3. Controle não estimulado (CNE).

Pouco se sabe sobre a ocorrência da lipofagia no microambiente tumoral, nossos dados trazem mais um nova atuação da vitamina E e do DHA em células de câncer de mama invasivo MDA-MB-231 que ainda não foi descrito na literatura. Observa-se na figura 15 que existiu colocalização do LC3-B com o corpúsculo lipídico nas células tratadas com DHA e no coestimulo de DHA com o DeltaT3. A figura 15 indica que no coestimulo de DHA com Delta-T3 a colocalização do Bodipy com LC3 ocorreu com maior intensidade, quase todos os CLs presentes no citoplasma das células estavam colocalizados com o LC3 o que sugere que o Delta-T3 pode potencializar a ocorrência da lipofagia nas células também tratadas com DHA. Ainda não foi encontrado na literatura, estudos que indiquem a ocorrência de lipofagia em células tumorais MDA-MB-231 tratadas com DHA e com o Delta-T3, assim este estudo traz uma nova perspectiva para os efeitos desse do DHA e do Delta-T3 na modulação dos corpúsculos lipídicos no microambiente tumoral.

Sabe-se que a lipofagia tem como uma de suas funções regular o fornecimento de lipídios intracelulares para manter a homeostase energética (SINGH *et al.*, 2009; LIU e CZAJA, 2013), porém pouco se sabe sobre esse mecanismo no ambiente tumoral. Dupon e colaboradores (2014) estudaram se os estoques de lipídios neutros armazenados nos CLs poderiam ter outra utilidade no ambiente celular e observam que em células de câncer cervical (HELA) tratadas com o ácido graxo monoinsaturado ácido oleico ocorria aumento na gênese de corpúsculos lipídicos concomitante com a autofagia, indicando que a lipofagia pode ocorrer em ambientes onde não existia privação de nutrientes, como uma maneira de manter um equilíbrio entre o armazenamento de lipídios e lipólise, a lipofagia também pode ocorrer para a síntese de fosfolipídios de membrana para a formação do autofagossoma necessário para o processo de autofagia (RUGGLES *et al.*, 2013; KRAHMER *et al.*, 2013).

Outros estudos ligaram a autofagia com utilização dos CLs (SINGH *et al.*, 2009; KHALDOUN *et al.*, 2013; VAN ZUTPHEN *et al.*, 2013) e mostram a importância dessa relação entre autofagia e consumo dos CLs com uma série de doenças associadas com baixa capacidade de armazenamento de lipídios e a necessidade do organismo em lidar com excesso de ácidos graxos não esterificados como AG livres e o colesterol que possuem atividade tóxica (RUGGLES *et al.*, 2013) como na aterosclerose, na obesidade, no diabetes e na resistência à insulina nas quais ocorre uma elevada deposição intracelular de lipídios nos adipócitos e em células musculares lisas. Outro exemplo no qual essa relação deve ser melhor estudada é na caquexia no câncer, na qual existe lipólise descoordenada ou excessiva (DAS *et al.*, 2011). Estas condições podem ser influenciadas pela função de consumo dos CLs na biogênese de membranas autofágicas (DUPON *et al.*, 2014). É provável que, sob condições

fisiológicas ambos os processos, biogênese do autofagossoma e lipólise através autofagia, ocorram de uma forma equilibrada (DUPON *et al.*, 2014).

A literatura dá mais enfoque a lipofagia que ocorre em células que estão em privação de nutrientes, as quais utilizam os CLs como substrato energético para suprir as necessidades celulares (RAMBOLD *et al.*, 2015; D'ANDREA, 2015; CHITRAJU *et al.*, 2012). Os resultados encontrados sugerem que a lipofagia não ocorra devido a privação de nutrientes, pois as células foram cultivadas em meio de cultura completo com composição de aminoácidos, glicose, sais e soro fetal bovino suficientes para a manutenção de suas necessidades. As culturas com os diferentes tratamentos e com as células não tratadas foram mantidas sob as mesmas condições, e nelas não foi encontrada colocalização, outro achado que sustenta essa hipótese é que em neste modelo não ocorreu aumento da proliferação, nem da migração e da sobrevivência celular processos que poderiam levar a um maior consumo dos lipídios celulares (LIU e CZAJA, 2013).

5.5-Tumorigênese

5.5.1-Proliferação celular

Nenhum dos tratamentos no período de 24h reduziu ou aumentou a proliferação das células tumorais de mama MDA-MB-231 ($p>0,05$) como mostrado na Figura 16.

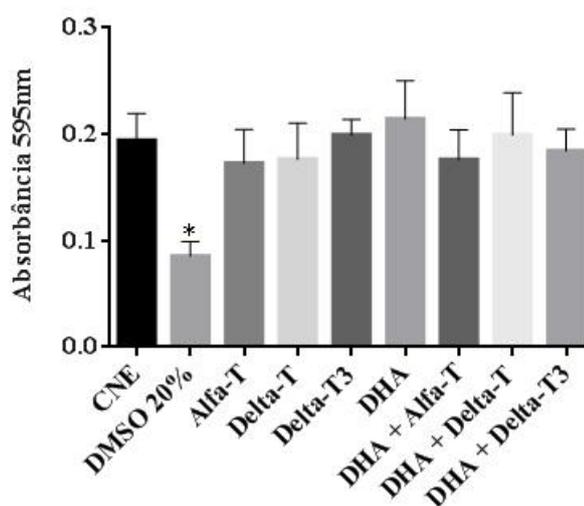


Figura 16- Quantificação da proliferação celular das células de câncer de mama MDA-MB-231 tratadas com Alfa-T, Delta-T, Delta-T3 ambos a 5 μ M e o DHA a 50 μ M e os coestimulos de DHA também a 50 μ M com a diferentes vitaminas E a 5 μ M, todos por um período de 24 horas. A incorporação do cristal violeta foi avaliada em espectraMax no comprimento de onda de 595nm. (n=3) três experimentos

cada um em n=3. A proliferação foi analisada pelas médias das absorbâncias em relação as células controle não estimuladas (CNE) e os valores expressos em média \pm SD, os resultados considerados estatísticos tiveram $p < 0,05$ (*) em relação ao Controle não estimulado (CNE) e o DMSO 20% foi utilizado como controle positivo.

5.5.2-Sobrevivência Celular

A figura 17A mostra a imagem das colônias formadas pelas células MDA-MB-231 e foi verificado que os tratamentos nas concentrações fisiológicas de $5\mu\text{M}$ das vitaminas e $50\mu\text{M}$ do ácido graxo ω -3 DHA sozinho ou em coestímulos não influenciam na sobrevivência das células de câncer de mama triplo negativo MDA-MB-231 ($p > 0,05$).

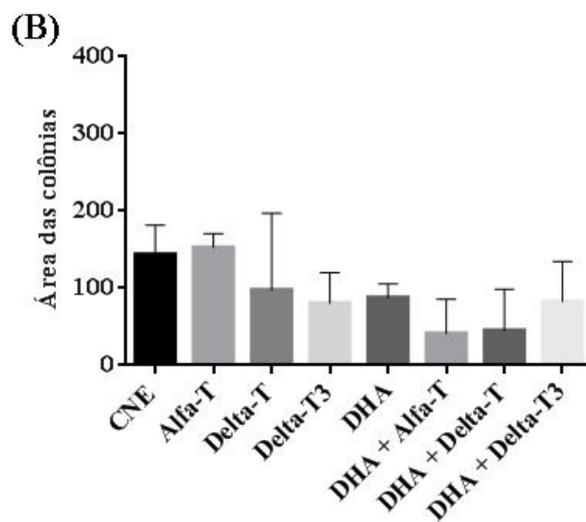
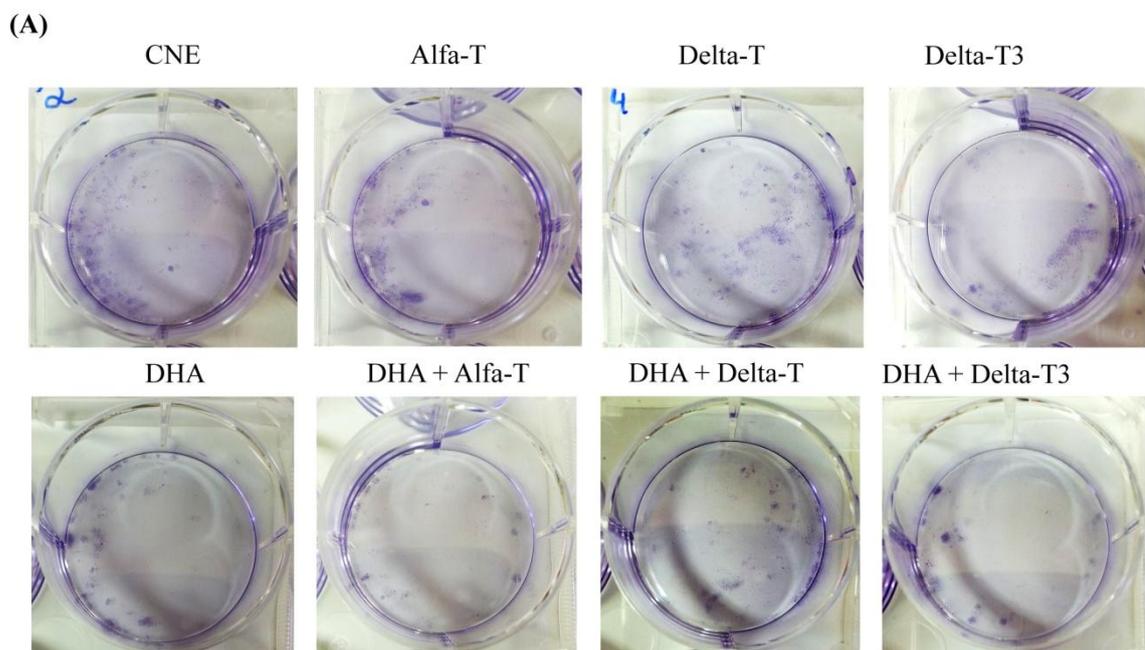
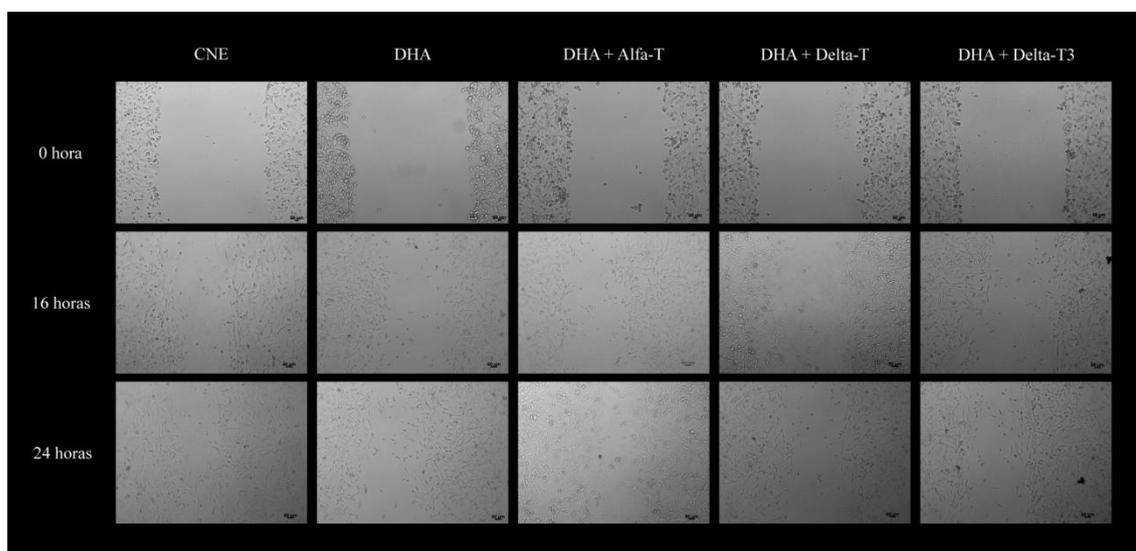


Figura 17- Sobrevivência das células de câncer de mama MDA-MB-231 tratadas com Alfa-Tocoferol (Alfa-T), Delta-Tocoferol (Delta-T) e Delta-Tocotrienol (Delta-T3) ambos a 5 μ M, o Ácido Docosahexaenóico (DHA) a 50 μ M e os coestimulos de DHA também a 50 μ M com a diferentes vitaminas E a 5 μ M, todos por um período de 24 horas. (A) mostra as imagens representativas das colônias em placa de 6 poços. (B) mostra o gráfico das médias das áreas das colônias quantificadas pelo software ImageJ calculadas pelo grafpad prism. (n=1) um experimento em duplicata. A sobrevivências foi analisada pelas médias das áreas das colonias em relação as células controle não estimuladas (CNE) e os valores expressos em media \pm SD, os resultados considerados estatísticos tiveram $p < 0,05$ (*) em relação ao CNE.

5.5.3-Migração celular

A Figura 18A mostra as imagens de microscopia de luz do fechamento do risco realizado nas culturas de células no período de 0 hora, 16 horas e 24 horas. A Figura 18B mostra os dados quantitativos das imagens e revela que no período de 16 horas de tratamento a migração das células tratadas com DHA e/ou com as vitaminas E não foram diferentes da migração das células (CNE) ($p > 0,05$), indicando que não houve aumento nem redução da migração celular. Já após 24 horas de tratamento existiu um redução significativa ($p < 0,05$) da migração das células tratadas com DHA, DHA + Delta-T e DHA + Delta-T3 quando comparadas com as células não tratadas (CNE) cultivadas pelo mesmo período de tempo, já o coestimulo do DHA + Alfa-T não reduziu a migração mesmo após 24 horas de tratamento mostrando que o Alfa-T pode ter inibido a ação do DHA em reduzir a migração das células MDA-MB-231 após 24 horas de tratamento concomitante com o DHA, uma vez que o DHA sozinho foi capaz de reduzir a migração de maneira significativa ($p < 0,05$) no mesmo período.



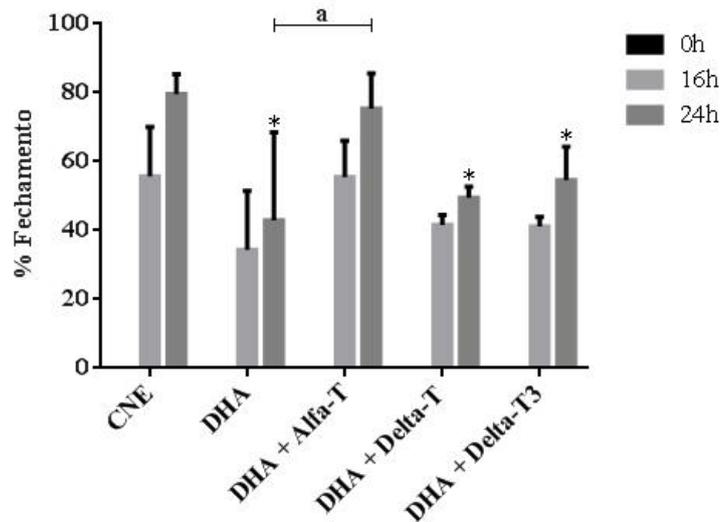
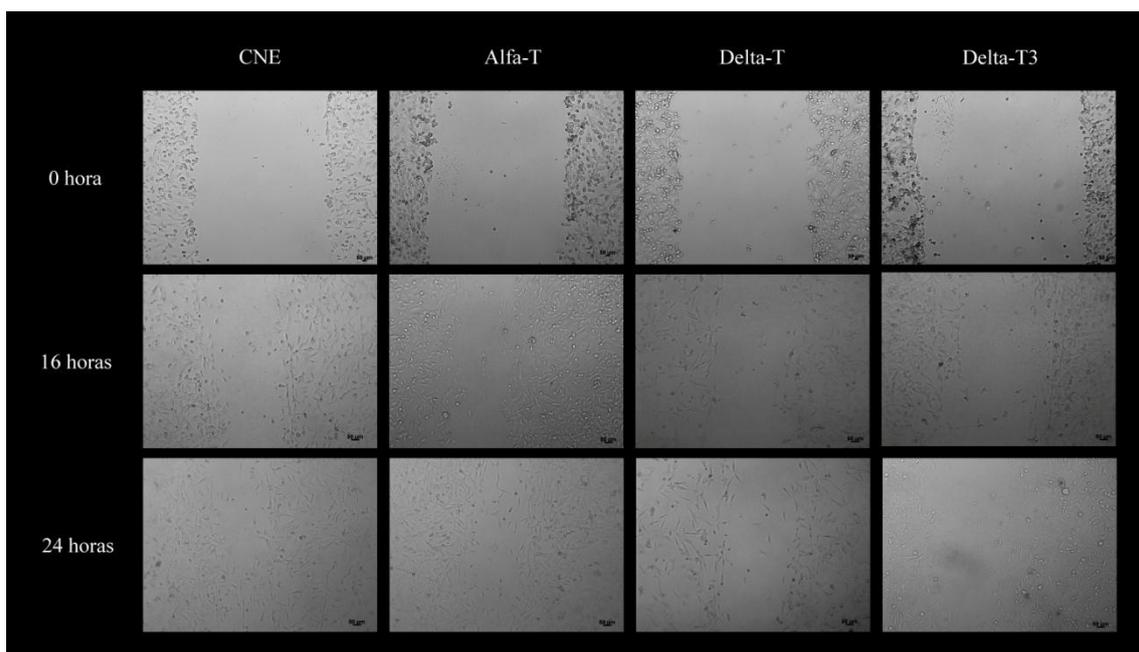


Figura 18- (A) Imagens de microscopia eletrônica das células de câncer de mama MDA-MB-231 tratadas com DHA 50µM e coestimulos de DHA 50µ com Alfa-Tocoferol (Alfa-T), ou Delta-Tocoferol (Delta-T) ou Delta-Tocotrienol (Delta-T3) ambos a 5µM, por um período de 0hora, 16horas e 24 horas. (B) Percentual de migração das células de câncer de mama MDA-MB-231 tratadas com DHA 50µM e coestimulos de DHA 50µ com Alfa-Tocoferol (Alfa-T), ou Delta-Tocoferol (Delta-T) ou Delta-Tocotrienol (Delta-T3) ambos a 5µM, por um período de 0hora, 16horas e 24 horas. O % de migração foi calculado a partir da área de fechamento com auxílio do programa ImageJ. (n=1) um experimentos em triplicata. A migração foi analisada pelas médias da áreas em relação as células controle não estimuladas (CNE) e os valores expressos em media ±SD, os resultados considerados estatísticos tiveram $p < 0,05$ (*) em relação ao Controle não estimulado (CNE) e $p < 0,05$ (a) em relação ao estímulo com DHA sozinho. O DMSO 20% foi utilizado como controle positivo.

A figura 19A mostra as imagens de microscopia de luz do fechamento do risco realizado nas culturas de células no período de 0 hora, 16 horas e 24 horas, a área de fechamento, assim como nas células tratadas apenas com as vitaminas E. A Figura 18A mostra os resultados da migração das células tratadas com as vitaminas E, as quais não aumentaram nem diminuiram a migração das células ($p > 0,05$).



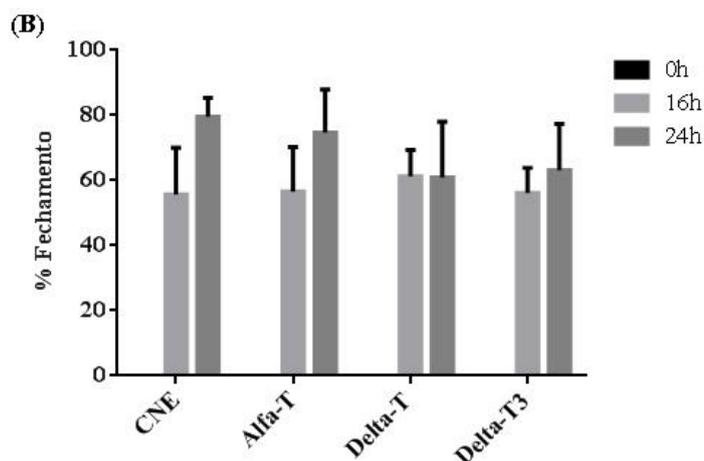


Figura 19- (A) Imagens de microscopia eletrônica das células de câncer de mama MDA-MB-231 tratadas com Alfa-Tocoferol (Alfa-T), ou Delta-Tocoferol (Delta-T) ou Delta-Tocotrienol (Delta-T3) ambos a 5 μ M, por um período de 0 hora, 16 horas e 24 horas. (B) Percentual de migração das células de câncer de mama MDA-MB-231 tratadas com Alfa-Tocoferol (Alfa-T), ou Delta-Tocoferol (Delta-T) ou Delta-Tocotrienol (Delta-T3) ambos a 5 μ M, por um período de 0 hora, 16 horas e 24 horas. O % de migração foi calculado a partir da área de fechamento com auxílio do programa ImageJ. (n=1) um experimentos em triplicata. A migração foi analisada pelas médias da áreas em relação as células controle não estimuladas (CNE) e os valores expressos em média \pm SD, os resultados considerados estatísticos tiveram $p < 0,05$ (*) em relação ao Controle não estimulado (CNE) e $p < 0,05$ (#) em relação ao estímulo com DHA sozinho. O DMSO 20% foi utilizado como controle positivo.

Tendo em vista que na lipofagia os lipídios livres formados poderiam ser utilizados como substrato energético para um maior crescimento celular (LIU e CZAJA, 2013) foi investigado se os tratamentos com DHA e a vitaminas ou com seus costimulos aumentavam a proliferação, a sobrevivência e a migração celular, por serem parâmetros relacionados com a progressão tumoral (KOHJIMA *et al.*, 2013; D'ANDREA, 2015).

Alguns estudos já descreveram que DHA é capaz de reduzir parâmetros de tumorigênese como a proliferação, a migração e a sobrevivência de células de câncer (WU *et al.*, 2005; KANG *et al.*, 2010; BLANCKAERT *et al.*, 2015) o que corrobora com os achados deste estudo. O tratamento com DHA levou a uma migração menor quando comparado às células não tratadas após 24 horas de exposição, o que indica que o DHA é hábil em reduzir a migração das células MDA-MB-231 mesmo aumentando a quantidade de CLs que poderiam ser utilizados como substrato energético para o crescimento celular (KOHJIMA *et al.*, 2013; D'ANDREA, 2015). Esse dado leva a crer que o aumento de CLs induzido pelo DHA não tem relação com o aumento da carcinogênese uma vez que não foi encontrado aumento da proliferação celular (Figura 16), nem da sobrevivência (Figura 17), e da migração das células (Figura 18) e (Figura 19), tratadas com o DHA e as vitaminas E e com seus coestimulos.

Os efeitos da vitamina E na tumorigênese do câncer de mama também já é estudado há algum anos. Loganathan e colaboradores (2013) avaliaram a atividade anticancerígena de uma fração rica em tocotrienóis (FRT), de uma solução de óleo de palma como 32% de alfa-tocoferol, 25% alfa-tocotrienol, 29% de gama-tocotrienol e 14% delta-tocotrienol (OP), e com

o Alfa, Gama e Delta tocotrienóis e o Alfa-tocoferol isolados em células de câncer de mama invasivo MDA-MB-231 e não invasivo MCF-7. Foi observado que o alfa-T não reduz a proliferação de células MDA-MB-231, o que corrobora os resultados encontrados neste estudo. No entanto 15µg/ml do FRT, OP e as isoformas isoladas de Alfa, Delta e Gama Tocotrienóis reduziram a proliferação de ambas as linhagens. Em nosso modelo, o Delta Tocoferol e tocotrienol não reduziram a proliferação celular provavelmente devido a baixa dose utilizada (5µM), uma vez que só foi encontrada citotoxicidade a partir de 10µM do delta-Tocoferol e 40µM do Delta-Tocotrienol como mostra os dados de citotoxicidade (Figura 5).

Os efeitos antiproliferativos e apoptóticos de diferentes isoformas de tocotrienóis também foram observados em células pré-neoplásicas (CL-S1), neoplásicas (-SA), e altamente malignas (+SA). E o tratamento com tocotrienóis tem exibido forte efeito antiproliferativo e apoptótico (NESARETNAM *et al.*, 2007). McIntyre e colaboradores (2000) observaram que o potencial de inibição do crescimento de células cancerígenas do Delta-tocotrienol foi superior em comparação com as isoformas tocotrienóis. E as células altamente malignas (+SA) foram as mais sensíveis aos efeitos antiproliferativos e apoptóticos dos tocotrienóis, enquanto as menos sensíveis foram as células pré-neoplásicas (CL-S1). Foi sugerido que a maior biopotência dos tocotrienóis pode ser atribuída à presença de cadeias de fitilo insaturadas que aumentam sua absorção pelas células, o que, eventualmente, poderia levar a uma maior resposta biológica na redução do risco de câncer de mama (MCLNTYRE *et al.*, 2000). Outro estudo realizado por Esmolarek e colaboradores (2013) avaliaram o crescimento de tumor de mama em animais tratados com um mix de tocoferóis contendo 58% de gama-tocoferol e observaram uma menor proliferação celular com o tratamento com o mix de vitamina E, assim como a redução de marcadores inflamatórios. Não foi observada redução da proliferação das células tratadas com as vitaminas E, possivelmente devido às baixas concentrações testadas.

Outro parâmetro avaliado, foi a migração celular, uma vez que as células MDA-MB-231 são caracterizadas por um grande potencial metastático (JONES *et al.*, 2004). Observou-se que apenas o DHA e o seu coestimulo com o delta tocoferol e tocotrienol reduziram a migração das células após 24h de tratamento em relação às células não tratadas, assim como estudo Sun e colaboradores (2013), que observaram que o DHA reduzia a migração de células de câncer hepatocelular. Interessantemente o coestimulo de DHA com Alfa-T não reduziu a migração das células MDA-MB-231 após 24 horas de tratamento, isso sugere que o alfa-T inibiu a capacidade de reduzir a migração celular induzida pelo DHA. Alguns estudos

corroboram esse achado mostrando que o alfa tocoferol pode inibir a atividade do DHA em levar a morte de células MDA-MB-231 (XIONG *et al.*, 2012) e em outros tipos de células de câncer (DING *et al.*, 2007; STURLAN *et al.*, 2003; YAM *et al.*, 2001) .

Estes achados abrem o interesse para mais pesquisas como objetivo de melhor correlacionar o acúmulo de CLs com a carcinogênese do câncer de mama, uma vez que observou-se que as vitaminas E e o DHA, mesmo em doses fisiológicas, modulam a biogênese de corpúsculos lipídicos na células MDA-MB-231, estudos com dosagens maiores podem mostrar resultados mais promissores quanto a redução da proliferação, migração e sobrevivência dessas células.

A figura 19 sugere um possível mecanismo de ação pelo qual DHA e o Delta-T3 modulam a biogênese dos CLs em células de câncer de mama MDA-MB-231, uma vez que esta isoforma de vitamina E foi a que apresentou maior efeito sobre a geração de ROS e a lipofagia.

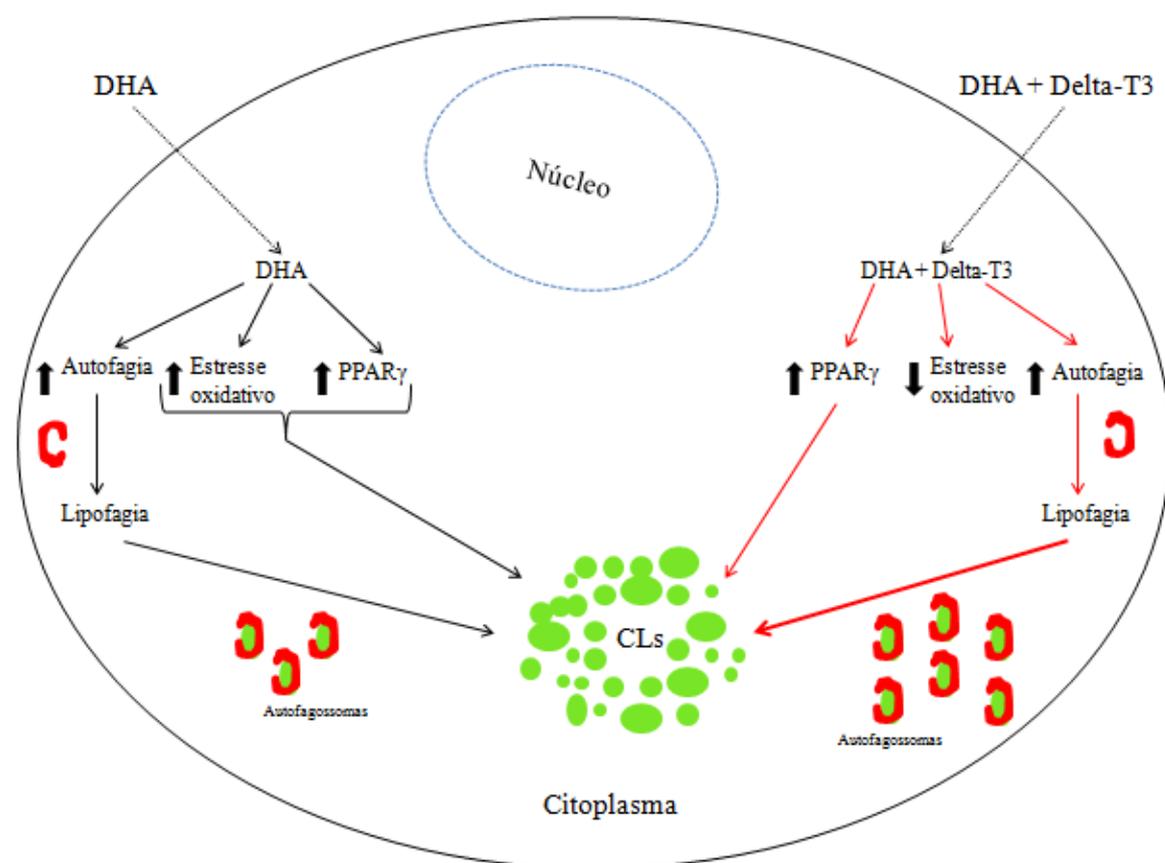


Figura 20- Esquema do possível mecanismo pelo qual o DHA e o Delta-T3 modulam a quantidade de corpúsculos lipídicos (CLs) em células de câncer de mama MDA-MB-231. As setas pretas indicam o mecanismo pelo qual o Ácido docosahexaenóico (DHA) modula a biogênese de CLs e as linhas e setas vermelhas indicam a ação do DHA + Delta-Tocotrienol (Delta-T3) e modula a quantidade de CLs.

Sabendo que células cancerígenas possuem uma aumentada síntese *de novo* de lipídios e que esses lipídios são armazenados nos corpúsculos e podem ser utilizados tanto como substrato energético para aumentada proliferação celular e também para a síntese de

mediadores lipídicos. Acredita-se que a vitamina E e o DHA têm um papel importante na prevenção do câncer de mama, por modularem o a produção de ROS e a gênese de CLs.

A literatura mostra que a inibição da formação de corpúsculos lipídicos é benéfica para o tratamento e prevenção do câncer, uma vez que essa organela armazena e fornece lipídios para o metabolismo energético, além de serem fontes de substrato para a produção de mediadores inflamatórios, proliferação, migração e sobrevivência de células tumorais. O fato do DHA aumentar o conteúdo de CLs intracelulares mostra que a atuação desse ácido graxo precisa ser melhor estudada no microambiente tumoral, uma vez que o aumento da biogênese de CLs é correlacionada com uma maior agressividade do CA de mama e pode levar a um mal prognóstico da doença.

Ainda existe um vasto campo a ser estudado a fim de melhor elucidar a atuação de compostos como a vitamina E e o DHA na biogênese de corpúsculos lipídicos em células de câncer de mama e este estudo pode sugerir mais uma via de ação desses compostos no microambiente tumoral, dado que foi demonstrado pela primeira vez que a vitamina E é capaz de modular a biogênese de CLs na presença do DHA.

6. CONCLUSÃO

Estudo foi pioneiro em mostra que a vitamina E é capaz de modular a biogênese de corpúsculos lipídicos na linhagem celular de câncer de mama invasivo MDA-MB-231 na presença do DHA, e a concentração de 5 μ M para o Delta-T3 é a isoforma com melhor capacidade em modular o geração de espécies reativas de oxigênio, a lipofagia e a biogênese de corpúsculos lipídicos no modelo em estudo.

7. REFERENCIAS

1. ABEYWARDENA, M. Y., PATTEN, G. S., Role of ω -3 longchain polyunsaturated fatty acids in reducing cardio-metabolic risk factors. **Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets**, v.11, p.232–246, 2011.
2. ABRAMCZYK, BROZEK-PLUSKA, SURMACKI, JABLONSKA e KORDEK, The label-free Raman imaging of human breast cancer, **J. Mol. Liq.**, v.164, p.123–131, 2011.
3. ABRAMCZYK; SURMACKI; KOPEĆ; LUBECKA-PIETRUSZEWSKA & FABIANOWSKA-MAJEWSKA, The role of lipid droplets and adipocytes in cancer. Raman imaging of cell cultures: MCF10A, MCF7, and MDA-MB-231 compared to adipocytes in cancerous human breast tissue. **Analyst**, v.7, n.140, Abr, 2015.
4. ABRAMSON. The lipogenesis pathway as a cancer target. **J. Med. Chem.** v.54, p.5615-5638, 2011.
5. ALLI; PINN; JAFFEE; MCFADDEN, et al., Fatty acid synthase inhibitors are chemopreventive for mammary cancer in neu-N transgenic mice. **Oncogene**,v.24, p.39-46, 2005.
6. AMANDA, SMOLAREK, YOUNG et al., Tocopherols inhibit cell proliferation, regulate expression of ER α , PPAR γ and Nrf2, and decrease serum inflammatory markers during the development of mammary hyperplasia, **Mol Carcinog.** v.52, n.7, p.514-25, jul, 2013.
7. APPOLINÁRIO, Derogis et al., Metabolismo, oxidação e implicações biológicas do ácido docosahexaenoico em doenças neurodegenerativas, **Quim. Nova**, v.34, n.8, p.1409-1416, 2011.
8. AUBOEUF, RIEUSSET, FAJAS, VALLIER, FRERING, RIOU, Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. **Diabetes**, n.46, p.1319–1327, 1997.
9. BAEHRECKE et al., Autophagy: dual roles in life and death?. **Nat Ver Mol Cell Biol.**, n.6, v. 6, p. 505-510, 2005.
10. BAENKE; PECK; MIESS e SCHULZE. Hooked on fat: the role of lipid synthesis in cancer metabolism and tumour development, **Disease Models & Mechanisms**, n.6, p.1353-1363, 2013.
11. BAIRATI; MEYER; GELINAS; FORTIN, et al., A randomized trial of antioxidant vitamins to prevent second primary cancers in head and neck cancer patients. **J Natl Cancer Inst.**, v.6, n.97, p.481-8, 2005.
12. BARVE, A.; KHOR, T.O.; NAIR, S.; REUHL, K.; SUH, N.; REDDY, B.; NEWMARK, H.; KONG, A.N. Gamma-tocopherol-enriched mixed tocopherol diet inhibits prostate carcinogenesis in TRAMP mice. **Int. J. Cancer**, v.124, p.1693–1699, 2009.
13. BARVE; KHOR; NAIR; REUHL; SUH REDDY, et al., Gamma-tocopherol-enriched mixed tocopherol diet inhibits prostate carcinogenesis in TRAMP mice. **Int. J. Cancer**, 2009, n.124, p.1693–1699, abr., 2009.
14. BAUER; HATZIVASSILIOU; ZHAO; ANDREADIS e THOMPSON, ATP citrate lyase is an important component of cell growth and transformation. **Oncogene**, n.24, p.6314-6322, 2005.
15. BHARAT, AGGARWAL, SUNDARAM, PRASAD, AND KANNAPPAN. Tocotrienols, the Vitamin E of the 21st Century: It's Potential Against Cancer and Other Chronic Diseases. **Biochem Pharmacol.**, v.80, n.11, p.1613–1631. Ago, 2010.
16. BLANCKAERT, KERVIEL, LÉPINAY et al., Docosahexaenoic acid inhibits the invasion of MDA-MB-231 breast cancer cells through upregulation of cytokeratin-1. **Int J Oncol.**, n.46, v.6, p.2649-55. Jun., 2015.

17. BLANCKAERT; ULMANN; MIMOUNI; ANTOL et al., Docosaehaenoic acid intake decreases proliferation, increases apoptosis and decreases the invasive potential of the human breast carcinoma cell line MDA-MB-231. **Int. J. Oncol.**, n.36, p.737–742, 2010.
18. BLOWS; DRIVER; SCHMIDT; BROEKS; VAN LEEUWEN; WESSELING; CHEANG; GELMON; NIELSEN; BLOMQVIST, et al. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: A collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. **PLoS Med.**, n.7, 2010.
19. BOZZA et al., “Lipid body function in eicosanoid synthesis: an update,” **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.85, n.5, p.205–213, 2011.
20. BOZZA et al., Eosinophil lipid bodies: specific, inducible intracellular sites for enhanced eicosanoid formation. **J. Exp. Med.**, v.186, p.909–920, 1997.
21. BOZZA, VIOLA, Lipid droplets in inflammation and cancer. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**. v.82, n.4–6, p.243–250, April–June, 2010.
22. BRIGELIUS-FLOHE; KELLY; SALONEN; NEUZIL; ZINGG; AZZI, The European perspective on vitamin E: Current knowledge and future research. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.76, p.703–716. 2002.
23. BURDEOS, NAKAGAWA, ABE, KIMURA e MIYAZAWA, Tocotrienol modulates crucial lipid metabolism related genes in differentiated 3T3-L1 preadipocytes, **Food Funct.**, v.5, p.2221, 2014.
24. BURTON et al., Human plasma and tissue alpha-tocopherol concentrations in response to supplementation with deuterated natural and synthetic vitamin E. **Am J Clin Nutr.**, v.67, n.4, p.669-84, 1998.
25. BUZDAR et al. Significantly higher pathologic complete remission rate after neoadjuvant therapy with trastuzumab, paclitaxel, and epirubicin chemotherapy: results of a randomized trial in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer. **J Clin Oncol.**, v.23, n.16, p.3676–85, 2005.
26. CALDER, Fatty acids and inflammation: the cutting edge between food and pharma. **Eur. J. Pharmacol.**, v.668, p.50–58, 2011.
27. CALDER, Polyunsaturated fatty acids and inflammation. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.75, p.197–202. 2006.
28. CAMPBELL *et al.*, Gamma (gamma) tocopherol upregulates peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) gamma (gamma) expression in SW 480 human colon cancer cell lines. **BMC Cancer**, v.3, p.2 -13, 2003,
29. CAMPBELL; STONE; WHALEY, *et al.* Gamma (gamma) tocopherol upregulates peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) gamma (gamma) expression in SW 480 human colon cancer cell lines. **BMC Cancer**, v.3, n.25, 2003.
30. CARDENAS e GHOSH. Vitamin E: A Dark Horse at the Crossroad of Cancer Management. **Biochem Pharmacol.**, v.86, n.7, p.845–852, 2013.
31. CHAMRAS; BARSKY; ARDASHIAN; NAVASARTIAN; HEBER; GLASPY, Novel interactions of vitamin E and estrogen in breast cancer. **Nutr. Cancer**, v.52, p.43–48, 2005.
32. CHEN et al., Oleic acid-induced PKC isozyme translocation in RAW 264.7 macrophages. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.86, n.4, p.784–91, 2002.
33. CHEN; EDWARDS; KRIDEL; THORNBURG, BERQUIN. Dietary fat-gene interactions in cancer. **Cancer Metastasis Rev.**, v.26, n.3-4, p.535–51, 2007.
34. CHITRAJU; TRÖTZMÜLLER; HARTLER, et al., Lipidomic analysis of lipid droplets from murine hepatocytes reveals distinct signatures for nutritional stress. **Journal of Lipid Research**, v. 53, 2012.
35. CHRISTODOULIDES C., VIDAL-PUIG A. PPARs and adipocyte function. **Mol Cell Endocrinol**. 318:61–68, 2010.

36. CILLARD, J.; CILLARD, P. Prooxidant effect of alpha-tocopherol on essential fatty acids in aqueous media. **Ann. Nutr. Aliment.** 34, 579–591, 1980
37. COCKBAIN et al., Omega-3 polyunsaturated fatty acids for the treatment and prevention of colorectal cancer, *gut*.2010.233718v1, 2010.KNÆVELSRUD et al., Lipids in autophagy: Constituents, signaling molecules and cargo with relevance to disease, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* Volume 1821, Issue 8, August 2012, Pages 1133–1145, 2012.
38. COMBA *et al.*, Basic Aspects of Tumor Cell Fatty Acid-Regulated Signaling and Transcription Factors. **Cancer Metastasis Rev.**, v.30, n.3-4, p.325–342, 2011.
39. COMITATO, NESARETNAM, LEONI, AMBRA, CANALI BOLLI, MARINO, VIRGIL. A novel mechanism of natural vitamin E tocotrienol activity: involvement of ERbeta signal transduction. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** Aug; 297(2):E427-37, 2009.
40. CONSTANTINO C, PAPAS A, CONSTANTINO AI. Vitamin E and cancer: An insight into the anticancer activities of vitamin E isomers and analogs. **Int J Cancer.**, v.15, n.4, p.739–752, 2008.
41. CREIGHTON, C. J. *et al.* Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v.106, p.13820–13825, 2009.
42. D'ANDREA, Lipid droplet mobilization: The different ways to loosen the purse strings Sabine, **Biochimie**, 2015.
43. DAS SK, EDER S, SCHAUER S, DIWOKY C, TEMMEL H, GUERTL B, GORKIEWICZ G, TAMILARASAN KP, KUMARI P, TRAUNER M, et al. Adipose triglyceride lipase contributes to cancer-associated cachexia. **Science.**, 333:233–238, 2011.
44. DENT et al. Pattern of metastatic spread in triple-negative breast cancer. **Breast Cancer Res Treat.**, v.115, n.2, p.423–8, 2009.
45. DESVERGNE, B.; WAHLI, W. Peroxisome proliferator-activated receptors: Nuclear control of metabolism. **Endocr. Rev.**, v.20, p.649–688, 1999.
46. DIGGLE. In vitro studies on the relationship between polyunsaturated fatty acids and cancer: tumour or tissue specific effects? **Prog Lipid Res.**, v.41, p.240-53, 2002.
47. DING, VAUGHT *et al.*, Differential sensitivity of cancer cells to docosahexaenoic acid-induced cytotoxicity: The potential importance of down-regulation of superoxide dismutase 1 expression. **Mol Cancer Ther Sep.**, 3; 1109, 2004.
48. DREHER, M.L. Pistachionuts: composition and potential health benefits. **Nutr. Rev.** v.70, p.234–240, 2012.
49. EVANS R.M., BARISH G.D., WANG Y.X. PPARs and the complex journey to obesity. **Nat Med.**, v.10, p.355–361. 2004.
50. FRUCHART J.C. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPARalpha): at the crossroads of obesity, diabetes and cardiovascular disease. **Atherosclerosis.**, v.205, p.1–8, 2009.
51. FU JY, BLATCHFORD DR, TETLEY L, DUFÈS C. Tumor regression after systemic administration of tocotrienol entrapped in tumor-targeted vesicles. **J Control Release**, v.3, n.2, p.95–99, 2009.
52. GALÁN, J. A. et al., Inhibition of lung tumor colonization and cell migration with the disintegrin crotatroxin 2 isolated from the venom of crotalus atrox. **Toxicon**, v.51, n.7, p.1186-1196, 2008.
53. GOLUBKOV, V. et al. Anti-angiogenic activity of contortrostatin, a disintegrin from Agkistrodon contortrix snake venom. *Angiogenesis*, v.6, n.3, p.213-224, 2003.
54. GREENBERG, COLEMAN, KRAEMER et al., “The role of lipid droplets in metabolic disease in rodents and humans,” **Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 6, p. 2102–2110, 2011.

55. GUO, WALTHER *et al.*, Functional genomic screen reveals genes involved in lipid-droplet formation and utilization, *Nature*, v.29, n.453(7195), p.657–661, 2008.
56. HENNESSY, B. T. *et al.* Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics. **Cancer Res.** 69, 4116–4124, 2009.
57. HERCBERG S, EZZEDINE K, GUINOT C, PREZIOSI P, GALAN P, BERTRAIS S, *et al.* Antioxidant supplementation increases the risk of skin cancers in women but not in men. **J Nutr.**, v.137, n.9, p.2098–105, 2007.
58. HERMS, M. BOSCH, N. ARIOTTI, B.J. REDDY, A. FAJARDO, A. FERNÁNDEZ-VIDAL, A. ALVAREZ-GUAITA, M.A. FERNÁNDEZ-ROJO, C. RENTERO, F. TEBAR, *et al.* Cell-to-cell heterogeneity in lipid droplets suggests a mechanism to reduce lipotoxicity. **Curr. Biol.**, v. 23, p.1489–1496, 2013.
59. HERSCHKOWITZ, J. I. *et al.* Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. **Genome Biol.**, v.8, 2007.
60. HIDIROGLOU, N., HAYWARD, S., BEHRENS, W., AND MADERE, R., Vitamin E levels in superficial and intra-abdominal locations of white adipose tissue in the rat, **J. Nutr. Biochem.**, v.8, p.392-396, 1997.
61. HILVO, M., DENKERT, C., LEHTINEN, L., MÜLLER, B., BROCKMÖLLER, S., SEPPÄNEN-LAAKSO, T., BUDCZIES, J., BUCHER, E., YETUKURI, L., CASTILLO, S. *et al.* Novel theranostic opportunities offered by characterization of altered membrane lipid metabolism in breast cancer progression. **Cancer Res.** v.71, p.3236-3245, 2011.
62. IKEZOE T, MILLER CW, KAWANO S, HEANEY A, WILLIAMSON EA, HISATAKE J, GREEN E, HOFMANN W, TAGUCHI H, KOEFFLER HP. Mutational analysis of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene in human malignancies. **Cancer Res.**, v.61, p.5307–1042, 2001.
63. INSTITUTE OF MEDICINE, Food and Nutrition Board, Panel on Dietary Antioxidants and Related Compounds. Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. National Academy Press, Washington, DC. 2000.
64. JIANG, Natural forms of vitamin E:metabolism, antioxidant, and anti-inflammatory activities and their role in disease prevention and therapy, **Free Radical Biology and Medicine**, v.72, p.76–90, 2014.
65. JIANG, Q.; CHRISTEN,S.;SHIGENAGA,M.K.;AMES,B.N.gamma-Tocopherol,the major form of vitamin E in the US diet,deserves more attention. **Am. J.Clin. Nutr.**, v.74, p.714–722, 2001.
66. JONES, C. *et al.* Expression profiling of purified normal human luminal and myoepithelial breast cells: identification of novel prognostic markers for breast cancer. **Cancer Res.**, v.64, p.3037–3045, 2004.
67. JONES, C. *et al.* Molecular cytogenetic identification of subgroups of grade III invasive ductal breast carcinomas with different clinical outcomes. **Clin. Cancer Res.**, v.10, p.5988–5997, 2004.
68. JUNG; PARK; KIM *et al.*, Prognostic relevance of biological subtype overrides that of TNM staging in breast cancer: discordance between stage and biology, **International Society of Oncology and BioMarkers**, 2014.
69. KAMAL-ELDIN, A.; APPELQVIST, L.A. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. **Lipids**, v.31, p.671–701, 1996.
70. KANG, H. J. *et al.* HER2 confers drug resistance of human breast cancer cells through activation of NRF2 by direct interaction. **Sci. Rep.**, v.4, p.7201, 2014.
71. KAUR, G., CAMERON-SMITH, D., GARG,M., SINCLAIR, A. J., Docosapentaenoic acid (22;5n-3): a review of its biological effects. *Prog. Lipid Res.*, v.50, p.28–34, 2011.

72. KHALDOUN SA, EMOND-BOISJOLY MA, CHATEAU D, CARRIERE V, LACASA M, ROUSSET M, DEMIGNOT S, MOREL E. Autophagosomes contribute to intracellular lipid distribution in enterocytes. *Molecular biology of the cell*. 2013.
73. KIKAWA, HERRICK, TATEO, MOURADIAN *et al.*, Induced oxidative stress and cell death in the A549 lung adenocarcinoma cell line by ionizing radiation is enhanced by supplementation with docosahexaenoic acid. **Nutr Cancer.**, v.62, n.8, p.1017-24, 2010.
74. KLINE, K.; LAWSON, K.A.; YU, W.; SANDERS, B.G. Vitamin E and breast cancer prevention: Current status and future potential. **J. Mammary Gland Biol. Neoplasia**, v.8, p.91–102, 2003.
75. KLINE, K.; LAWSON, K.A.; YU, W.; SANDERS, B.G. Vitamin E and cancer. **Vitam. Horm.**, v.76, p.435–461, 2007.
76. KLIONKY, ADDALLA, ABELIOVICH, ABRAHAM *et al.*, Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. **Autophagy**. 8(4):445-544, 2012.
77. KOGEL, FULDA, MITTELBRONN, Therapeutic exploitation of apoptosis and autophagy of glioblastoma. **Anticancer Agents Med Chem**. 10(6): 438:49, 2010.
78. KOHJIMA, TSAI, TACKETT *et al.*, Delayed liver regeneration after partial hepatectomy in adipose differentiation related protein-null mice, **J. Hepatol**. V.59, p. 1246-1254, 2013.
79. KRAHMER, N., R.V. FARESE JR., AND T.C. WALTHER, Balancing the fat: lipid droplets and human disease. **EMBO Mol Med.**, v.5, p.905–915, 2013.
80. KROEMER, EL-DEIRY, GOLSTEIN *ET al.*, Classification of cell death: recommendation of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ. Suppl* v.2, p.1463-7, 2005.
81. KUHAJDA, F. P., PIZER, E. S., LI, J. N., MANI, N. S., FREHYWOT, G. L. AND TOWNSEND, C. A. Synthesis and antitumor activity of an inhibitor of fatty acid synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v.97, p.3450-3454, 2000.
82. LEE *et al.*, Lee, H.J.; Ju, J.; Paul, S.; So, J.Y.; DeCastro, A.; Smolarek, A.; Lee, M.J.; Yang, C.S.; Newmark, H.L.; Suh, N. Mixed tocopherols prevent mammary tumorigenesis by inhibiting estrogen action and activating PPAR-gamma. **Clin. Cancer Res.**, v.15, p.4242–4249, 2009.
83. LI, G.X.; LEE, M.J.; LIU, A.B.; YANG, Z.; LIN, Y.; SHIH, W.J.; YANG, C.S. delta-tocopherol is more active than alpha- or gamma-tocopherol in inhibiting lung tumorigenesis *in vivo*. **Cancer Prev. Res. (Phila.)**, v.4, p.404–413, 2011.
84. LINHART *et al.*, The role of reactive oxygen species (ROS) and cytochrome P-450 2E1 in the generation of carcinogenic etheno-DNA adducts, **RedoxBiology**, v.3, p.56–62 2014.
85. LISTENBERGER, X. HAN, S. E. LEWIS, S. CASES, R. V. FARESE, D. S. ORY AND J. E. SCHAFFER, **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v.100, p.3077–3082, 2003.
86. LIU e CZAJA, Regulation of lipid stores and metabolism by lipophagy, **Nature: Cell Death and Differentiation.**, v.20, p.3–11, 2013.
87. LIU e DAVID. Ma The Role of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids in the Prevention and Treatment of Breast Cancer, **Nutrients**, n.6, p.5184-5223, 2014.
88. LIU, H., FAN, Q., ZHANG, Z., YU, H. & MENG, F. Basal-HER2 phenotype shows poorer survival than basal-like phenotype in hormone receptor-negative invasive breast cancers. **Hum. Pathol.** v.39, p.167–174, 2008.
89. MACPHERSON, HERBST, REYNOLDS, VANDENBOOM, ROY, and S. J. PETERS, “Subcellular localization of skeletal muscle lipid droplets and PLIN family proteins OXPAT and ADRP at rest and following contraction in rat soleus muscle,” **The American Journal of Physiology—Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 302, n. 1, p. R29–R36, 2012.

90. MACPHERSON, HERBST, REYNOLDS, VANDENBOOM, ROY, and S. J. PETERS, "Subcellular localization of skeletal muscle lipid droplets and PLIN family proteins OXPAT and ADRP at rest and following contraction in rat soleus muscle," **The American Journal of Physiology—Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 302, n. 1, p. R29–R36, 2012.
91. MAHÉO, VIBET et al., Differential sensitization of cancer cells to doxorubicin by DHA: a role for lipoperoxidation. **Free Radic Biol Med**. Sep., 15;39(6):742-51. 2005.
92. MANSURE, NASSIM, KASSOUF. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in bladder cancer: A promising therapeutic target. **Cancer Biol Ther.**, v.8, p.6–15, 2009.
93. MANTOVANI *et al.*, Cancer-related inflammation, **Nature**, Vol 454, 24 July, 2008.
94. MCDONOUGH *et al.*, Quantification of Lipid Droplets and Associated Proteins in Cellular Models of Obesity via High-Content/High-Throughput Microscopy and Automated Image Analysis. **ASSAY and Drug Development Technologies**, 2009.
95. MCINTYRE, K.P. BRISKI, A. GAPOR, P.W. SYLVESTER, Antiproliferative and apoptotic effects of tocopherols and tocotrienols on preneoplastic and neoplastic mouse mammary epithelial cells, **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** V.224, p. 292–301, 2000.
96. MCLAUGHLIN, P.J.;WEIHRAUCH,J.L.VitaminEcontentoffoods. **J. Am.Diet. Assoc.** 75:647–665, 1979.
97. MEDES, G., THOMAS, A. AND WEINHOUSE, S. Metabolism of neoplastic tissue. IV. A study of lipid synthesis in neoplastic tissue slices in vitro. **Cancer Res.** 13, 27-29, 1953.
98. MEEEX, SCHRAUWEN, and HESSELINK, "Modulation of myocellular fat stores: lipid droplet dynamics in health and disease," **The American Journal of Physiology—Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 297, n. 4, p. R913–R924, 2009.
99. MEEEX, SCHRAUWEN, and HESSELINK, "Modulation of myocellular fat stores: lipid droplet dynamics in health and disease," **The American Journal of Physiology—Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 297, n. 4, p. R913–R924, 2009.
100. MELO, DVORAK. Lipid body-phagosome interaction in macrophages during infectious diseases: host defense or pathogen survival strategy? **PLoS Pathog.** 2012.
101. MENENDEZ, J. A. AND LUPU, R., Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. **Nat. Rev. Cancer** 7, 763-777, 2007.
102. MERENDINO *et al.*, Dietary ω -3 Polyunsaturated Fatty Acid DHA: A Potential Adjuvant in the Treatment of Cancer, **BioMed Research International**, Volume 2013, Article ID 310186, 11 pages, 2013.
103. MICHAEL; KING, Effects of Omega-3 Fatty Acids on Progestin Stimulation of Invasive Properties in Breast Cancer. **HORM CANC** (2012) 3:205–217.
104. MICHALIK L, DESVERGNE B, WAHLI W. Peroxisome-proliferator-activated receptors and cancers: Complex stories. **Nat Ver Cancer** 2004;4:61–70
105. MILLER 3rd ER, PASTOR-BARRIUSO R, DALAL D, RIEMERSMA RA, APPEL LJ, GUALLAR E. Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. **Ann Intern Med** 2005;142(January (1)):37–46.
106. MOYAD. An introduction to dietary/supplemental omega-3 fatty acids for general health and prevention: part II. **Urol Oncol** 2005;23:36-48.
107. MULLER L, THEILE K, BOHM V. In vitro antioxidant activity of tocopherols and tocotrienols and comparison of vitamin E concentration and lipophilic antioxidant capacity in human plasma. **Mol Nutr Food Res** 2010;54(May (5)):731–42.
108. NIEVA C, MARRO M, SANTANA-CODINA N, RAO S, PETROV D, *et al.*, The Lipid Phenotype of Breast Cancer Cells Characterized by Raman Microspectroscopy: Towards a Stratification of Malignancy. **PLoS ONE**, v.7, n.10, p.e46456, 2013.
109. NOGUCHI N, HANYU R, NONAKA A, OKIMOTO Y, KODAMA T, Inhibition of THP-1 cell adhesion to endothelial cells by alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol is

dependent on intracellular concentration of the antioxidants. **Free Radic Biol Med**, v.34, n.12, p.1614–162, 2003.

110. OWENS, M.A.; HORTEN, B.C.; DA SILVA, M.M. HER2 amplification ratios by fluorescence *in situ* hybridization and correlation with immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues. **Clin. Breast Cancer**, v.5, p.63–69, 2004.

111. PACKER L, WEBER SU, RIMBACH G. Molecular aspects of alpha-tocotrienol antioxidant action and cell signalling. **The Journal of nutrition**. 2001;131:369S–373S.

112. PAPADAKI I, MYLONA E, GIANNOPOULOU I, MARKAKI S, KERAMOPOULOS A, NAKOPOULOU L. PPARgamma expression in breast cancer: clinical value and correlation with ERbeta. **Histopathology**, v.46, p.37–42, 2005.

113. PEROU, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**. V. 406, p.747–752, 2000.

114. POL; GROSS, Biogenesis of the multifunctional lipid droplet: Lipids, proteins, and sites, **J. Cell Biol.**, v. 204, n. 5, p.635–646, 2014.

115. PRAT, KARGINOVA ET al., Characterization of cell lines derived from breast cancers and normal mammary tissues for the study of the intrinsic molecular subtypes, **Breast Cancer Res Treat.**, 142:237–255, 2013.

116. PUIG, T., TURRADO, C., BENHAMÚ, B., AGUILAR, H., RELAT, J., ORTEGA-GUTIÉRREZ, S., CASALS, G., MARRERO, P. F., URRUTICOECHEA, A., HARO, D. et al., Novel inhibitors of fatty acid synthase with anticancer activity. **Clin. Cancer Res.** 15, 7608-7615. 2009.

117. QUINN, Is the Distribution of α -Tocopherol in Membranes Consistent with Its Putative Functions?, **Biochemistry (Moscow)**, Vol. 69, No. 1, 2004, pp. 58-66, 2004.

118. REKA A.K., KURAPATI H., NARALA V.R., BOMMER G., CHEN J., STANDIFORD T.J. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation inhibits tumor metastasis by antagonizing Smad3-mediated epithelial-mesenchymal transition. **Mol Cancer Ther.**, v.9:3221–3232, 2010.

119. ROYNETTE, P. C. CALDER, Y. M. DUPERTUIS, AND C. PICHARD, “n-3 polyunsaturated fatty acids and colon cancer prevention,” **Clinical Nutrition**, vol. 23, no. 2, pp. 139–151, 2004.

120. RUGGLES KV, TURKISH A, STURLEY SL. MAKING, BAKING, AND BREAKING: the synthesis, storage, and hydrolysis of neutral lipids. **Annual review of nutrition.**, v.33, p.413–451, 2013.

121. RUIZ-VELA et al., Specific Unsaturated Fatty Acids Enforce the Transdifferentiation of Human Cancer Cells toward Adipocyte-like Cells. **Stem Cell Rev and Rep.**, 7:898–909, 2011.

122. RUSSO et al., Russo, J.; Hasan Lareef, M.; Balogh, G.; Guo, S.; Russo, I.H. Estrogen and its metabolites are carcinogenic agents in human breast epithelial cells. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.** 2003, 87, 1–25. 2003.

123. RYSMAN, E., BRUSSELMANS, K., SCHEYS, K., TIMMERMANS, L., DERUA, R., MUNCK, S., VAN VELDHoven, P. P., WALTREGNY, D., DANIËLS, V. W., MACHIELS, J. et al., De novo lipogenesis protects cancer cells from free radicals and chemotherapeutics by promoting membrane lipid saturation. **Cancer Res.** 70, 8117-8126, 2010.

124. SANTOS, C. R. AND SCHULZE, A. (2012). Lipid metabolism in cancer. **FEBS J.** 279, 2610-2623, 2010.

125. SARRIÓ, D. *et al.* Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. **Cancer Res.** 68, 989–997, 2008.

126. SCHNEIDER C. An update on products and mechanisms of lipid peroxidation. **Mol Nutr Food Res.**, v.53, n.3, p.315–21. 2009.

127. Schrader, M. & Fahimi, H. D. Peroxisomes and oxidative stress. **Biochim. Biophys. Acta** 1763, 1755–1766, 2006.
128. SCHULZ TJ, THIERBACH R, VOIGT A *et al.* Induction of oxidative metabolism by mitochondrial frataxin inhibits cancer growth: Otto Warburg revisited. **J Biol Chem.**, v.281, p.977–981, 2006.
129. SEEDORF U., ABERLE J. Emerging roles of PPARdelta in metabolism. **Biochim Biophys Acta.**, v.1771:1125–113, 2007.
130. SEKIYA, HIRAISHI, TOUYAMA, and SAKAMOTO, “Oxidative stress induced lipid accumulation via SREBP1c activation in HepG2 cells,” **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 375, n. 4, p. 602–607, 2008.
131. SEKIYA, HIRAISHI, TOUYAMA, and SAKAMOTO, “Oxidative stress induced lipid accumulation via SREBP1c activation in HepG2 cells,” **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 375, n. 4, p. 602–607, 2008.
132. SHAH, R., ROSSO, K. e NATHANSON, S. D. Pathogenesis, prevention, diagnosis and treatment of breast cancer. **World J. Clin. oncol.**, v.5, p.283–298, 2014.
133. SIDDIQUI *et al.*, Docosahexaenoic acid: a natural powerful adjuvant that improves efficacy for anticancer treatment with no adverse effects, **Biofactors.**, v.37, n.6, p.399-412, 2011.
134. SINGH R, KAUSHIK S, WANG Y, XIANG Y, NOVAK I, KOMATSU M, TANAKA K, CUERVO AM, CZAJA MJ. Autophagy regulates lipid metabolism. **Nature.**, v.458, p.1131–1135, 2009.
135. SMOLAREK, YOUNG, PAUL, THOMAS, LEE *et al.*, Dietary Tocopherols Inhibit Cell Proliferation, Regulate Expression of ERa, PPARg, and Nrf2, and Decrease Serum Inflammatory Markers During the Development of Mammary Hyperplasia, **Molecular Carcinogenesis**, 52:514–525, 2013.
136. SMOLAREK, SO *et al.*, Dietary administration of δ - and γ -tocopherol inhibits tumorigenesis in the animal model of estrogen receptor-positive, but not HER-2 breast cancer. **BMC Cancer**. V.1, n.3, p.25. 2003.
137. SOETERS and SOETERS, “The evolutionary benefit of insulin resistance,” **Clinical Nutrition**, v. 31, n. 6, p. 1002–1007, 2012.
138. SOETERS and SOETERS, “The evolutionary benefit of insulin resistance,” **Clinical Nutrition**, v. 31, n. 6, p. 1002–1007, 2012.
139. SORLIE T, TIBSHIRANI R, PARKER J, HASTIE T, MARRON JS, NOBEL A, *et al.* Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v.100, p.8418-8423, 2003.
140. SOUZA, Waldemir Fernandes de *et al.* Sinalização celular em câncer. **Cienc. Cult.**, São Paulo, v. 66, n. 1, 2014 .
141. STEPHENSON. The Multifaceted Effects of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids on the Hallmarks of Cancer. **Journal of Lipids**, 2013.
142. STONE, W.L.; KRISHNAN, K.; CAMPBELL, S.E.; QUI, M.; WHALEY, S.G.; YANG, H. Tocopherols and the treatment of colon cancer. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.1031, p.223–233, 2004.
143. STURLAN *et al.*, Docosahexaenoic acid enhances arsenic trioxidemediated apoptosis in arsenic trioxide-resistant HL-60 cells, **Blood**, v. 101, n. 12, p. 4990–4997, 2003.
144. SUN Y *et al.* Luminal breast cancer classification according to proliferative indices: clinicopathological characteristics and short-term survival analysis. **Med Oncol.**, v.31(7):55, 2014.

145. SUN, JIA, CHEN *et al.*, Docosahexaenoic acid (DHA) induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. **Int J Clin Exp Pathol**, v.6, n.2, p.281-289. 2013.
146. SUZUKI *et al.*, Flow cytometric analysis of lipid droplet formation in cells of the human monocytic cell line, U937. **Biochemistry and Cell Biology**, 69 (8), 571–6. 1991.
147. SWINNEN, J. V., BRUSSELMANS, K. AND VERHOEVEN, G. Increased lipogenesis in cancer cells: new players, novel targets. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care** 9, 358-365, 2006.
148. SYLVESTER, A. THERIAULT, A role of tocotrienols in the prevention of cardiovascular disease and breast cancer, **Curr.Top. Nutraceutical Res.** v.1, p.121–136. 2003.
149. SYLVESTER, SHAH: Mechanisms mediating the antiproliferative and apoptotic effects of vitamin e in mammary cancer cells. **Frontiers in Bioscience** 10, 699-709, January 1, 2005.
150. TAYLOR, P.R.; QIAO, Y.L.; ABNET, C.C.; DAWSEY, S.M.; YANG, C.S.; GUNTER, E.W.; WANG, W.; BLOT, W.J.; DONG, Z.W.; MARK, S.D. Prospective study of serum vitamin E levels and esophageal and gastric cancers. **J. Natl. Cancer Inst.** v.95, p.1414–1416, 2003.
151. TENG, A. A., WONG, N. S., TAN, P. H., Therapeutic targets in triple negative breast cancer-where are we now? **Recent Pat. Anticancer Drug Discov.**, v.6, 196–209.*et al.*, 2011.
152. TONTONOZ P., SPIEGELMAN B.M. Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. **Annu Rev Biochem.** V.77, p.289–312, 2008.
153. TORRISI R *et al.* Potential impact of the 70-gene signature in the choice of adjuvant systemic treatment for ER positive, HER2 negative tumors: a single institution experience. **Breast.**, v.22, n.4, p.419–24, 2013.
154. UTO-KONDO, OHMORI, KIYOSE, KISHIMOTO, SAITO, IGARASHI e KONDO, Tocotrienol suppresses adipocyte differentiation and Akt phosphorylation in 3T3-L1 preadipocytes, **J. Nutr.**, v.139, p.51–57, 2009.
155. VALLET-PICHARD, A., V. MALLET, e S. POL. Nonalcoholic fatty liver disease and HIV infection. **Semin. Liver Dis.** 32:158–166. 2012.
156. VAN ZUTPHEN T, TODDE V, DE BOER R, KREIM M, HOFBAUER H, WOLINSKI H, VEENHUIS M, VAN DER KLEI IJ, KOHLWEIN SD. Lipid droplet autophagy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular biology of the cell.** 2013.
157. VAUGHAN *et al.*, Marine polyunsaturated fatty acids and cancer therapy, **British Journal of Cancer**, v.108, p.486–492, 2013.
158. VIBET, GOUPILLE *et al.*, Sensitization by docosahexaenoic acid (DHA) of breast cancer cells to anthracyclines through loss of glutathione peroxidase (GPx1) response. **Free Radic Biol Med.**, v.1, n.44(7), p.1483-91, 2008.
159. VIBET, GOUPILLE, BOUGNOUX, STEGHENS, GORÉ, MAHÉO. Sensitization by docosahexaenoic acid (DHA) of breast cancer cells to anthracyclines through loss of glutathione peroxidase (GPx1) response. **Free Radic Biol Med.**, v.1, n.44(7), p.1483-91. 2008.
160. WANG, QUINN. Vitamin E and its function in membranes. **Prog Lipid Res.**, v.38, n.4, p.309-36, 1999.
161. WATKINS G, DOUGLAS-JONES A, MANSEL RE, JIANG WG. The localisation and reduction of nuclear staining of PPARgamma and PGC-1 in human breast cancer. **Oncol Rep.**, v.12, p.483–8, 2004
162. WEIGELT B, GLAS AM, WESSELS LFA, WITTEVEEN AT, PETERSE JL, VAN'T VEER LJ. Gene expression profiles of primary breast tumors maintained in distant metastases. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v.100, p.15901-15905, 2003.

163. WONG RS, RADHAKRISHNAN AK. Tocotrienol research: past into present. **Nutrition reviews**. V.70, p.483–490, 2012.
164. Wu, Harvey et al., Omega-3 polyunsaturated fatty acids attenuate breast cancer growth through activation of a neutral sphingomyelinase-mediated pathway. **International Journal of Cancer**, v.117, n.3, p.340–348, 10, 2005.
165. XIONG *et al.*, Distinct roles of different forms of vitamin E in DHA-induced apoptosis in triple-negative breast cancer cells, **Mol. Nutr. Food Res.**, n. 56, p.923–934, 2012.
166. XU, LAMBERT, *et al.*, Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. **Molecular cell.**, v.3, n.3, p.397–403, 1999.
167. YADAV, B. S., SHARMA, S. C., CHANANA, P. & JHAMB, S. Systemic treatment strategies for triple-negative breast cancer. **World J. Clin. oncol.** 5, 125–133 (2014)
168. YAM et al., Suppression of tumor growth and metastasis by dietary fish oil combined with vitamins E and C and cisplatin, **Cancer Chemother Pharmacol.** 2001;47(1):34-40. 2001
169. YARROW, J. C. et al. A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods. **BMC Biotechnol**, v.4, n.21, 2004.
170. YEE LD, GUO Y, BRADBURY J, SUSTER S, CLINTON SK, SEEWALDT VL. The antiproliferative effects of PPARgamma ligands in normal human mammary epithelial cells. **Breast Cancer Res Treat.** 2003; 78: 179–92.
171. YILMAZ, M.; CHRISTOFORI, G. Mechanisms of motility in metastasizing cells. **Mol Cancer Res**, v. 8, n.5, p.629-642, 2010.
172. YOUNCE AND P. KOLATTUKUDY, “MCP-1 induced protein promotes adipogenesis via oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and autophagy,” **Cellular Physiology and Biochemistry**, v.30, n. 2, p. 307–320, 2012.
173. YOUNCE AND P. KOLATTUKUDY, “MCP-1 induced protein promotes adipogenesis via oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and autophagy,” **Cellular Physiology and Biochemistry**, v.30, n. 2, p. 307–320, 2012.
174. YUE P. Y. *et al.* A Simplified method for quantifying cell migration/wound healing in 96-well plates. **J Biomol Screen**, v.15, n.4, p.427-433, 2010.
175. ZAIDI, LUPIEN e KUEMMERLE *et al.*, Lipogenesis and lipolysis: the pathways exploited by the cancer cells to acquire fatty acids, **Prog Lipid Res.** 2013 October ; 52(4): 585–589, 2013
176. ZAIDI, N., SWINNEN, J. V. AND SMANS, K. ATP-citrate lyase: a key player in cancer metabolism. **Cancer Res.** v.72, p.3709-3714, 2012.
177. ZHAN, Y., GINANNI, N., TOTA, M. R., WU, M., BAYS, N. W., RICHON, V. M., KOHL, N. E., BACHMAN, E. S., STRACK, P. R. AND KRAUSS, S., Control of cell growth and survival by enzymes of the fatty acid synthesis pathway in HCT-116 colon cancer cells. **Clin. Cancer Res.** v.14, p.5735-5742, 2008.
178. ZHU Y., QI C., KORENBERG J.R., CHEN X.N., NOYA D., RAO M.S. Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms. **Proc Natl Acad Sci USA.** V.92, p.7921–7925, 1995.

8. FIGURAS SUPLEMENTARES

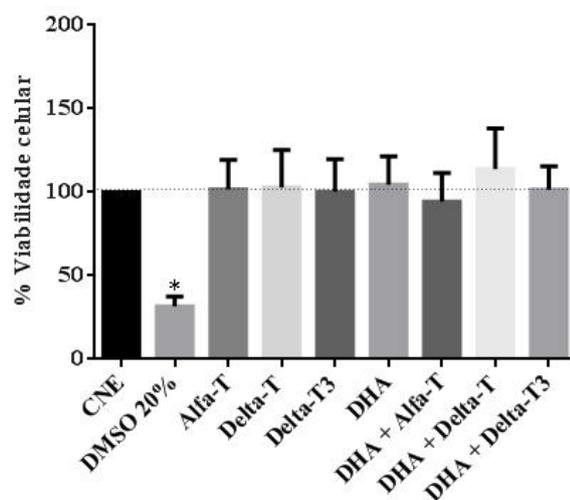


Figura Suplementar 1- Citotoxicidade dos coestimulos com o ácido docosahexaenóico (DHA) e as vitaminas E Alfa-T, Delta-T e Delta-T3 sobre células de câncer de mama humano triplo negativas MDA-MB-231 tratadas por 24 horas com 50 μ M de DHA, ou 5 μ M de Alfa-T, Delta-T e Delta-T3, avaliada pelo teste de MTT (n=3) três experimentos cada um em triplicata. A citotoxicidade foi analisada pelas médias dos percentuais de células vivas em relação as células controle não estimuladas (CNE) (100% vivas) e os valores expressos em média \pm SD, os resultados considerados estatísticos tiveram $p < 0,05$ (*) em relação ao CNE. O DMSO 20% foi utilizado como controle positivo para citotoxicidade.

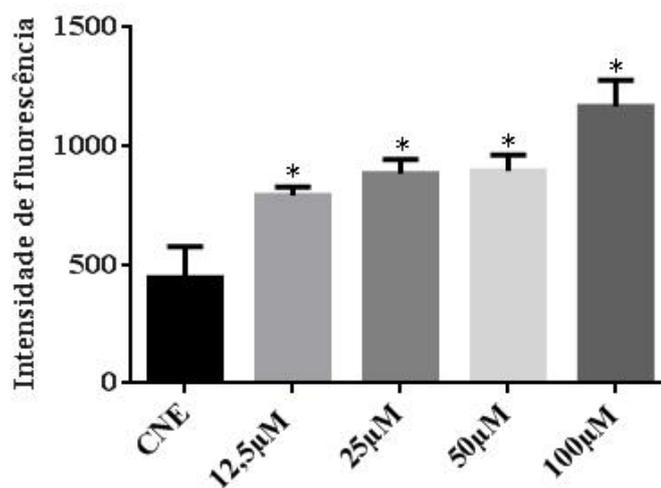


Figura suplementar 2- Formação de corpúsculos lipídicos induzido pelo Ácido Docosahexaenóico (DHA) em células de câncer de mama MDA-MB-231 tratadas por 24 horas com 12,5 μ M, 25 μ M, 50 μ M e 100 μ M de DHA. A intensidade de fluorescência emitida pelo fluoróforo Bodipy foi avaliada por citometria de fluxo (FACS Verse) (n=1) um experimento em triplicata. Os gráfico mostram os valores expressos em média \pm SD, os resultados considerados estatísticos em relação ao controle não estimulado (CNE) tiveram $p < 0,05$ (*).

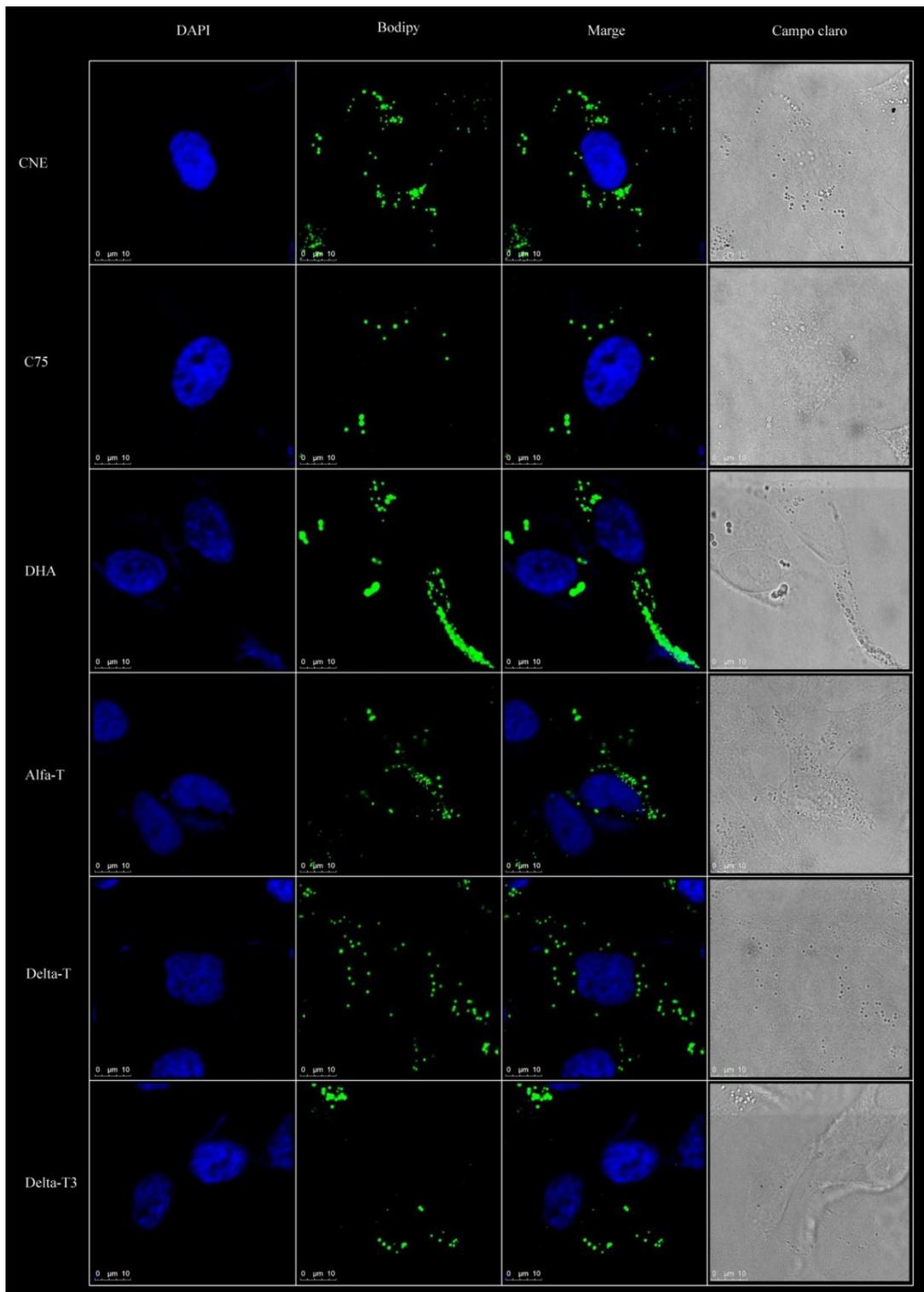


Figura suplementar 3: Imagens obtidas por microscópio confocal Leica TCS SP5 com aumento de 63X e Zoom de 4, as imagens são representativas de toda população das lâminas de três experimentos realizados separadamente (n=3). O Núcleo das células foi corado em azul com o DAPI, os corpúsculos lipídicos foram corados em verde com Bodipy, na figura nomeada Merge estão expostas as sobreposições das imagens do DAPI com o bodipy para mostrar a localização dos corpúsculos no citoplasma da célula e o Campo claro mostra as imagens das células sem marcadores fluorescentes para observação da morfologia da célula.

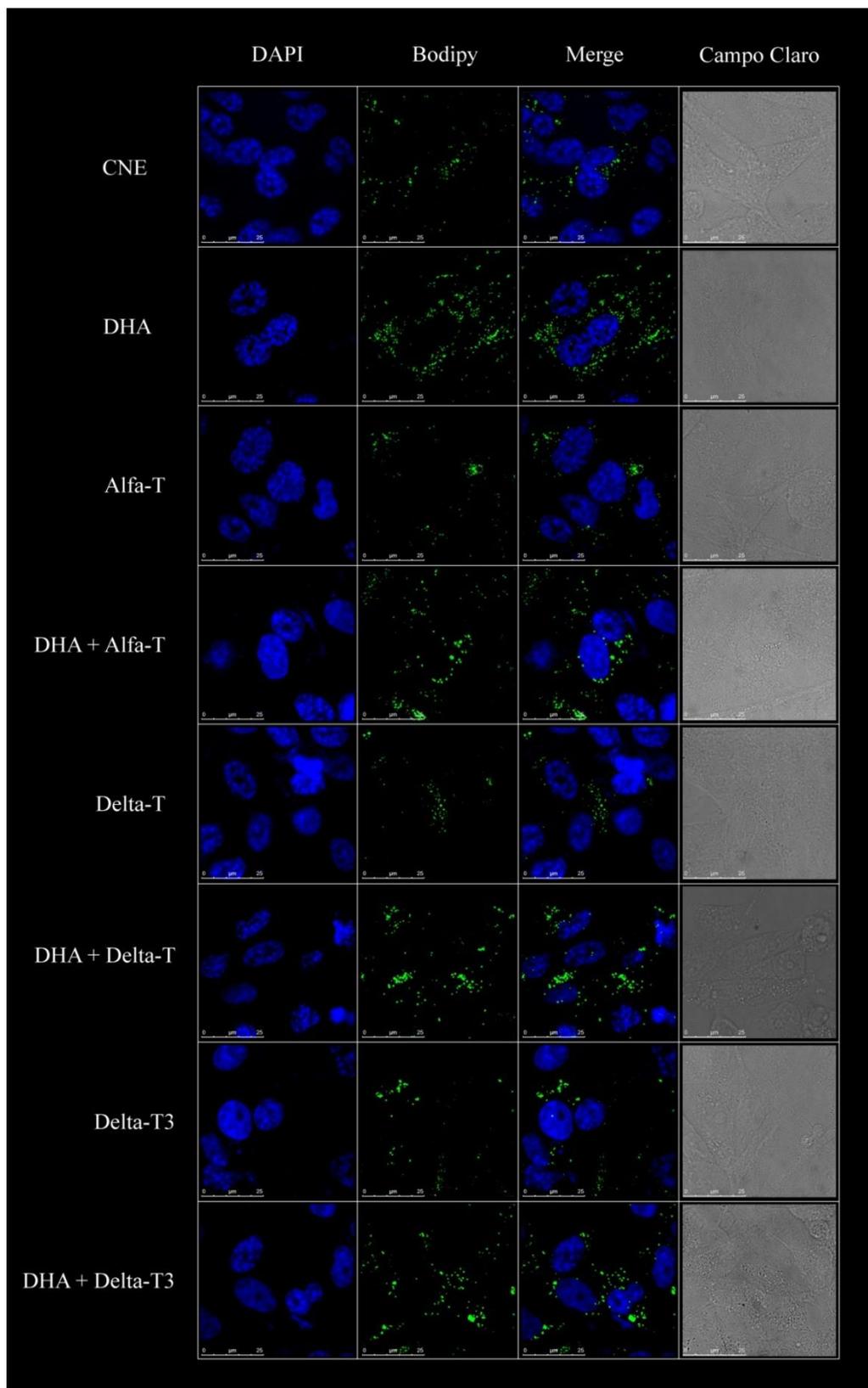


Figura suplementar 4: Imagens obtidas por microscópio confocal Leica TCS SP5 com aumento de 63X e Zoom de 4, as imagens são representativas de toda população das lâminas de três experimentos realizados separadamente (n=3). O Núcleo das células foi corado em azul com o TOPRO3, os corpúsculos lipídicos foram corados em verde com Bodipy, na figura nomeada Merge estão expostas as sobreposições das imagens do DAPI com o bodipy para mostrar a localização dos corpúsculos no citoplasma da célula e o Campo claro mostra as imagens das células sem marcadores fluorescentes para observação da morfologia da célula.