

Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Programa de Pós-graduação em Nutrição Humana

EFEITOS DO ÁCIDO DOCOSAHEXAENOICO (DHA) E DO ÁCIDO
ARAQUIDÔNICO (AA) SOBRE A MORTE CELULAR DA LINHAGEM CELULAR
DE CÂNCER DE MAMA MDA-MB-231

Beatriz Christina Luzete
Orientadora: Prof. Dra. Nathalia Marcolini Pelucio Pizato

Brasília – 2015

Beatriz Christina Luzete

**EFEITOS DO ÁCIDO DOCOSAHEXAENOICO (DHA) E DO ÁCIDO
ARAQUIDÔNICO (AA) SOBRE A MORTE CELULAR DA LINHAGEM CELULAR
DE CÂNCER DE MAMA MDA-MB-231**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição Humana da Faculdade de Ciências da 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

Beatriz Christina Luzete

EFEITOS DO ÁCIDO DOCOSAHEXAENOICO (DHA) E DO ÁCIDO
ARAQUIDÔNICO (AA) SOBRE A MORTE CELULAR DA LINHAGEM CELULAR
DE CÂNCER DE MAMA MDA-MB-231

Data: 01 de outubro 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. Élide Geralda Campos (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

“Dois homens juntos são mais felizes que um isolado” Ecle 4, 9a.

“Se um vem a cair, o outro o levanta. Mas ai do homem solitário:

Se ele cair não há ninguém para levantá-lo” Ecle 4, 10.

Durante o mestrado eu tive muitas quedas, mas também muitos que me ajudaram a levantar e a seguir em frente. Sem eles, esse trabalho não seria o mesmo e eu só tenho a agradecer a cada um

Agradeço a Deus por me fortalecer a cada dia, guiar o meu caminho e estar sempre ao meu lado me abençoando.

Agradeço à minha família por todo o apoio, pelo constant incentivo, pelas orações e pelo amor incondicional.

Agradeço à Nat que me acolheu em 2011 e durante todos esses anos foi mais que uma orientadora, foi uma companheira. Obrigada pela confiança, pelo incentivo, pela disponibilidade e por todos os ensinamentos.

Agradeço à Kelly por me acolher no seu laboratório, por me apoiar, me direcionar e me ensinar tanto. E a todos os integrantes do LIMI durante esse período de dois anos, pois vocês foram essenciais no desenvolvimento desse trabalho. Obrigada por toda ajuda, pelas contribuições, pelo incentivo e pela companhia. Em especial, agradeço à Lari que esteve presente em todos os momentos de dificuldade e alegria com os experimentos, sempre me apoiando e me ajudando.

Agradeço aos integrantes do GPRO, do LIA, do LIPH, do Laboratório de Bioquímica Nutricional e do Laboratório de Microscopia Eletrônica por toda ajuda e disponibilidade.

Agradeço às professoras Marina, Élide e Kelly por aceitarem participar da banca e contribuirem no desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço de coração a todos os meus amigos. O carinho, a preocupação, as orações e os incentivos foram muito importantes nessa caminhada. Vocês são os melhores.

Agradeço à CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todos que tiveram uma participação direta ou indireta no trabalho, muito obrigada.

Resumo

Introdução: O ácido docosahexaenóico (DHA) possui efeito antitumoral em células de câncer de mama pela diminuição da proliferação celular e pelo aumento da morte por apoptose. Já o ácido araquidônico (AA) está relacionado ao crescimento e à progressão tumoral. Nenhuma pesquisa até o momento indicou a indução de morte por piroptose pelo DHA. O presente estudo buscou avaliar o efeito do DHA e do AA na indução de morte por apoptose e piroptose em células de câncer de mama triplo-negativo MDA-MB-231.

Metodologia: MDA-MB-231 foi tratada com diferentes concentrações de DHA ou AA. A quantificação da morte por apoptose foi feita por marcação com Anexina-V/PI. Foram analisadas a integridade da membrana, a expressão de caspase 1 ativa e clivada, a secreção de IL-1 β e a translocação de NF κ B e de HMGB1 para avaliar a morte por piroptose.

Resultados: O DHA levou ao aumento da morte por apoptose em 50, 100 e 200 μ M e o AA, apenas em 200 μ M. O DHA aumentou a perda da integridade da membrana, a ativação e a clivagem de caspase 1, a secreção de IL-1 β e a translocação de HMGB1 na concentração de 100 μ M, indicando ativação da morte por piroptose. **Conclusão:** O DHA induz morte por apoptose e piroptose em células de câncer de mama triplo-negativo e leva a um maior aumento da apoptose quando comparado ao AA.

Palavras-chave: Câncer de mama, piroptose, DHA, ômega 3

Abstract

Introduction: Docosahexaenoic acid (DHA) decreases breast cancer cell proliferation and increases cell death by apoptosis. Arachidonic acid (AA) is known to promote tumor growth and progression. No study to date has indicated the induction of pyroptosis by DHA. This study evaluated the effect of DHA and AA on apoptosis and pyroptosis in triple negative breast cancer cells MDA-MB-231. **Method:** MDA-MB-231 were supplemented with different concentrations of DHA and AA. The quantification of cell death by apoptosis was made by Annexin-V / PI. Membrane integrity, active and cleaved caspase 1, secreted IL-1 β and translocated NF κ B and HMGB1 were analysed to check pyroptosis. **Results:** DHA increased apoptosis at 50, 100 and 200 μ M. AA also increased apoptosis in a higher concentration (200 μ M). DHA increased loss of membrane integrity, caspase 1 activation and cleavage, IL-1 β secretion and HMGB1 translocation at 100 μ M, indicating pyroptosis activation. **Conclusion:** DHA induce apoptosis and pyroptosis in triple negative breast cancer cells and promotes a higher increase in apoptosis than do AA.

Keywords: Breast cancer, pyroptosis, DHA, omega 3

Lista de Figuras

Dissertação

Figura 1 - Metabolismo dos ácidos graxos ômega-3 (ω -3) e ômega-6 (ω -6)..... 14

Figura 2 – Fluxograma dos experimentos in vitro..... 24

Artigo

Figura 1 –DHA e AA diminuem a viabilidade celular de MDA-MB-231 em 24 horas. 39

Figura 2 –DHA e AA não afetam a viabilidade celular de monócitos humanos em 24 horas. 40

Figura 3 – O DHA induz maior percentual de morte por apoptose e necrose quando comparado ao AA. 41

Figura 4 –DHA induz perda da integridade da membrana de MDA-MB-231..... 42

Figura 5 –DHA não induz a translocação de NFkB..... 43

Figura 6 – AA não induz a translocação de NFkB..... 44

Figura 7 –DHA ativa a caspase-1 em MDA-MB-231..... 45

Figura 8 – Efeito do DHA e do AA na expressão de caspase-1 clivada em MDA-MB-231. 46

Figura 9 – DHA aumenta a secreção de IL-1 β por MDA-MB-231..... 47

Figura 10 – DHA induz a translocação de HMGB1..... 48

Figura 11 – AA induz translocação de HMGB1..... 49

Figura 12 - Ação do DHA em células de câncer de mama triplo-negativo MDA-MB-231 55

Figura Suplementar 1 – Etanol e DMSO não alteram viabilidade celular de MDA-MB-231. 61

Figura Suplementar 2 –Etanol e do DMSO não alteram integridade da membrana de MDA-MB-231. 62

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Classificação molecular do câncer de mama 12

Tabela 2 - Características de estudos epidemiológicos, in vivo e in vitro que buscaram relação entre os ácidos graxos ômega-3 e o câncer de mama. 16

Siglas e Abreviações

AA	Ácido araquidônico
AAL	Ácido alfa-linolênico
AGPI	Ácidos graxos poli-insaturados
AIM2	Ausente no melanoma 2
AL	Ácido linoleico
ASC	Proteína tipo particular associada à apoptose contendo domínio de recrutamento de caspase
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina sérica bovina
CNE	Controle não estimulado
CO ₂	Dióxido de carbono
DAPI	4' 6-diamidino-2-fenilindol
DHA	Ácido docosaheptaenóico
DMSO	Dimetilssulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EPA	Ácido eicosapentaenoico
ERE	Estresse do Retículo Endoplasmático
FACS	Classificação de células ativadas por fluorescência
FL-1	Fluorescência 1 (verde)
FL-2	Fluorescência 2 (laranja)
FLICA	Inibidor fluorescente de caspase
HMGB1	Proteína do grupo de alta mobilidade B1
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-18	Interleucina 18
LPS	Lipopolissacarídeo
MDA-MB-231	Linhagem de células epiteliais provenientes de adenocarcinoma mamário
MOMP	Permeabilização da membrana mitocondrial externa
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio brometo
NF κ B	Fator nuclear kappa B
NLR	Receptor do tipo NOD

NLRC	Receptor do tipo NOD contendo domínio domínio de recrutamento de caspase
NLRP	Receptor do tipo NOD contendo domínio pirina
NOD	Domínio de oligomerização e ligação de nucleotídeo
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico humano
PBS	Tampão fosfato-salino
PI	Iodeto de propídeo
PPAR	Receptor ativador da proliferação de peroxissomos
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
TBS	Tampão salino Tris
TN	Tumores triplo-negativos
ω -3	Ômega-3
ω -6	Ômega-6

Sumário

1.Introdução.....	11
2.Revisão da literatura.....	12
2.1.Câncer de mama.....	12
2.2.Ácidos Graxos Poli-insaturados (AGPI).....	13
2.3.AGPI e câncer de mama.....	16
2.4. Morte celular.....	18
2.4.1.Apoptose.....	18
2.4.2.Piroptose.....	20
3.Justificativa.....	22
4.Objetivos.....	23
4.1. Objetivo geral.....	23
4.2. Objetivos específicos.....	23
5. Materiais e métodos.....	24
5.1.Delineamento do estudo.....	24
5.2.Células.....	24
5.3.Estímulo.....	25
5.4.Análise da viabilidade celular.....	26
5.5. Análise de apoptose e necrose.....	26
5.6. Análise de integridade da membrana celular.....	27
5.7. Análise de caspase 1 ativa por citometria de fluxo.....	28
5.8. Extração de proteínas.....	28
5.9.Análise da expressão de caspase 1 clivada.....	29
5.10. Análise de secreção de IL-1 β	30
5.11.Análise de HMGB1 e NF κ B por imunofluorescência.....	31
5.12.Análise estatística.....	31
6. Resultado - Artigo: “Ácido docosahexaenóico induz o aumento da ativação da morte por piroptose em células de câncer de mama MDA-MB-231”	32
7.Conclusões	63
8. Referências.....	64

1. Introdução

O câncer de mama possui alta incidência e mortalidade na população feminina (INCA, 2014). Ele possui diversos subtipos e por isso está associado a diferentes prognósticos e a diferentes respostas terapêuticas. Dentre eles, o subtipo triplo-negativo representa de 10 a 20% dos casos e apresenta pior prognóstico e maior taxa de recorrência (YERSAL, et al. 2014; LEHMANN, et al. 2011; CIRQUEIRA, et al. 2011)

Estudos vêm mostrando que o ácido eicosapentaenoico (EPA) e o ácido docosahexaenóico (DHA), ambos representantes da família ômega-3, possuem efeito antitumoral através da diminuição da proliferação celular e do aumento da morte por apoptose em células de câncer de mama (LEE, et al. 2014; CAO, et al. 2012; XIONG, et al. 2012).

A apoptose é um tipo de morte celular programada caracterizada por fragmentação nuclear e formação de corpos apoptóticos (WU, et al. 2012). Além dela, outros mecanismos de morte já foram descritos na literatura. Um exemplo é a piroptose, caracterizada por fragmentação nuclear, aumento do volume celular e rompimento da membrana celular com liberação dos componentes intracelulares (KEPP, et al. 2010; BERGSBAKEN, et al. 2009).

Ainda não há estudos que mostrem se o EPA e o DHA aumentam a piroptose em células de câncer de mama, sendo esta mais uma via de morte celular em que estes ácidos graxos podem atuar. Assim, o presente estudo buscou avaliar se o DHA leva à piroptose nas células de câncer de mama triplo-negativo MDA-MB-231. Como controle, também foi verificado o efeito de um ácido graxo da família ômega-6, o ácido araquidônico (AA), sobre a morte dessas células.

2. Revisão da literatura

2.1. Câncer de mama

O câncer de mama é a neoplasia mais comum em mulheres e, no Brasil, foram previstos 57.120 novos casos para o ano de 2014. Ele é responsável por aproximadamente 14% de todas as mortes por câncer na população feminina e atualmente é a principal causa de morte por neoplasia maligna neste grupo (INCA, 2014; WHO, 2012).

Esse tipo de câncer é heterogêneo e possui diferentes classificações como a histológica e a molecular. A classificação molecular é feita de acordo com expressão gênica (Tabela 1) e, a partir dela, são obtidos cinco subtipos do câncer de mama: Luminal

A, luminal B, HER2+, basal e *claudin-low*. Devido às diferenças na expressão gênica, diferentes prognósticos e diferentes respostas terapêuticas podem estar associadas a essa neoplasia. (HOLLIDAY, et al. 2011).

Tabela 1 – Classificação molecular do câncer de mama. Adaptado de Holliday et al. 2011. ER: Receptor de estrogênio, PR: Receptor de progesterona, HER2: Fator de crescimento epidérmico humano tipo 2.

Classificação	Características	Linhagens celulares
Luminal A	ER ⁺ , PR ^{+/-} , HER2 ⁻	MCF-7, T47D, SUM185
Luminal B	ER ⁺ , PR ^{+/-} , HER2 ⁺	BT474, ZR-75
Basal	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁻	MDA-MB-468, SUM190
<i>Claudin-low</i>	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁻ , claudin-3, claudinin-4 e claudinin-7 low	BT549, MDA-MB-231, Hs578T, SUM1315
HER2+	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁺	SKBR3, MDA-MB-453

Os receptores de estrogênio (ER) são um alvo terapêutico e a principal terapia endócrina para o câncer de mama é justamente o uso de antiestrogênicos. No caso dos subtipos que possuem baixa ou nenhuma expressão desse receptor, as escolhas terapêuticas são limitadas (CORSETTO, et al. 2011; CIRQUEIRA, et al. 2011).

Tumores triplo-negativos (TN) são denominados como aqueles que não expressam receptores de estrogênio e de progesterona e o fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 (HER2). Eles são encontrados em todos os subtipos moleculares do câncer de mama tendo maior prevalência no subtipo basal (PRAT, et al. 2013; LEHMANN, et al. 2011; HOLLIDAY, et al. 2011).

Os tumores TN são biologicamente mais agressivos, estão associados à maior taxa de recorrência e possuem pior prognóstico. Eles representam de 10 a 20% das neoplasias na mama (LEHMANN, et al. 2011; CIRQUEIRA, et al. 2011).

O subtipo *Claudin-low* foi descoberto em 2007. Ele é classificado como TN em 61-71% dos casos e se difere do subtipo basal por apresentar baixa expressão gênica de algumas proteínas envolvidas nas junções celulares, as claudinas 3, 4 e 7 e a E-caderina (PEROU, et al. 2010; PRAT, et al. 2010).

O cultivo de linhagens celulares é uma ferramenta importante na pesquisa do câncer para investigação de mecanismos de ação. Através dele é possível estudar uma população relativamente homogênea de células capazes de se autorreplicar em um meio de cultura

padrão (HOLLIDAY, et al. 2011). Algumas linhagens já descritas de câncer de mama são MCF-7, MDA-MB-231, SUM159, SUM 149 e MDA-MB-453 (Tabela 1). As células MDA-MB-231 são triplo-negativas e correspondem à classificação *Claudin-low* de acordo com as análises de Holliday et al., 2011 e Prat et al, 2010.

2.2. Ácidos Graxos Poli-insaturados (AGPI)

Os AGPI são classificados nas famílias ômega-3 (ω -3) e ômega-6 (ω -6) de acordo com a posição da primeira insaturação contada a partir do grupo metil terminal (SCHIMITZ, et al. 2008). Os principais representantes da família ômega-3 são o ácido alfa-linolênico (AAL, C18:3 ω -3), o ácido docosaexaenoico (DHA, C22:6 ω -3) e o ácido eicosapentaenoico (EPA, C20:5 ω -3). Na família ômega-6 temos o ácido linoleico (AL, C18:2 ω -6) e o ácido araquidônico (AA, C20:4 ω -6) (CALDER, et al. 2009). O AAL e o AL são considerados ácidos graxos essenciais por não serem sintetizados pelo organismo humano e por células eucarióticas em geral, sendo necessária a sua ingestão via alimentação (CALDER, et al. 2012). O AAL, o EPA e o DHA são encontrados principalmente em peixes e na linhaça. Já o AL está presente nos óleos vegetais, como soja, canola e milho (MARTIN, et al. 2006; CALDER, et al. 2009).

Depois de consumido e absorvido, o AAL pode ser convertidos em EPA, DHA e o AL, em AA por reações de alongação e dessaturação (Figura 1). Os AGPI ω -3 e ω -6 competem pelas mesmas enzimas no seu metabolismo e a ingestão dietética desses nutrientes pode influenciar a conversão de AAL em ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (AGPI-CL). A eficiência global da conversão do AAL para EPA e DHA em seres humanos é de 0,2% e 0,05% respectivamente e, apesar desse percentual ser limitado, é possível que ele seja suficiente para manutenção da função dos tecidos em indivíduos saudáveis consumindo uma dieta balanceada (SCHIMITZ, et al. 2008; BURDGE, et al. 2005).

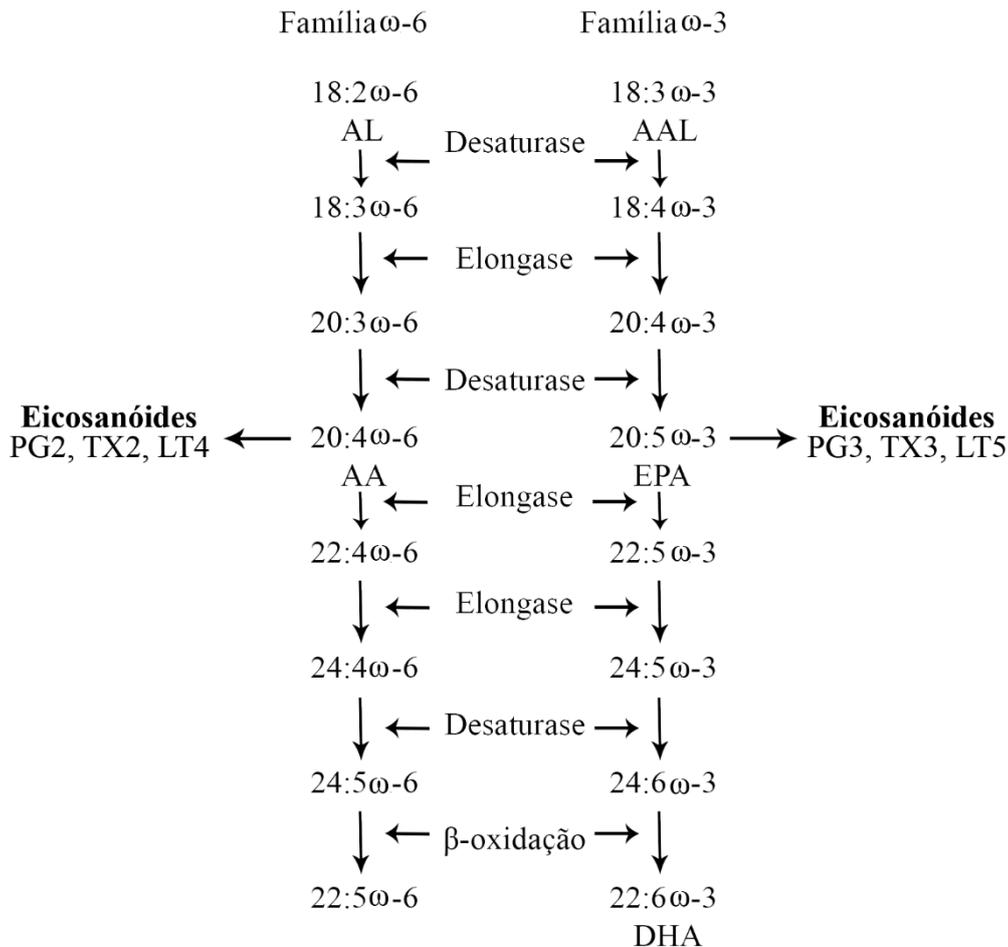


Figura 1. Metabolismo dos ácidos graxos ômega-3 (ω-3) e ômega-6 (ω-6). Adaptado de Schimitz et al. 2008. PG: Prostaglandina, TX: Tromboxano, LT: Leucotrieno, AL: Ácido linoleico, AAL: Ácido alfa-linolênico, AA: Ácido araquidônico, DHA: Ácido docosaenoico, EPA: Ácido eicosapentaenoico.

A alimentação humana sofreu alterações significativas em relação à qualidade e à quantidade dos nutrientes consumidos nos últimos tempos (SIMOPOULOS, et al. 2011). O aumento da produção de óleos refinados após a industrialização e a diminuição da ingestão de frutas e hortaliças gerou uma deficiência de ômega-3 na dieta da população e, hoje em dia, o consumo de AGPI chega à proporção de 10:1 a 20:1 de ω-6: ω-3. Não há um consenso sobre a recomendação para estes ácidos graxos e ela pode variar de acordo com a doença estudada. Uma razão de 2,5:1 de ω-6: ω-3 reduziu a proliferação celular em pacientes com câncer colorretal e a proporção de 5:1 foi benéfica para indivíduos com asma (SIMOPOULOS, et al. 2008; MARTIN, et al. 2006).

A proporção de ômega-3 e ômega-6 nos tecidos é reflexo da ingestão alimentar visto que as enzimas responsáveis pela digestão, absorção, transporte, dessaturação, alongação

e esterificação desses AGPI não discriminam entre as estruturas ω -3 e ω -6 (LANDS, et al. 2012).

Após a absorção, os ácidos graxos são armazenados na forma de fosfolipídios nas membranas ou de triglicerídeos nos corpúsculos lipídicos, organelas responsáveis pelo armazenamento de substratos energéticos lipídicos e que também apresentam funções no metabolismo lipídico (SCHIMITZ, et al. 2008; BOZZA, et al. 2010). Fosfolipases são responsáveis por hidrolisar os ácidos graxos dos fosfolipídios e liberá-los para atuarem na sinalização celular ou serem convertidos em mediadores bioativos (SCHIMITZ, et al. 2008; DAI, et al. 2013; LANDS, et al. 2012).

As ciclooxigenases (COX-1 e COX-2), lipooxigenases (5-LO, 12-LO e 15-LO) e o citocromo P450 são enzimas que convertem os ácidos graxos em mediadores bioativos, entre eles os eicosanóides. Essas enzimas são capazes de distinguir entre as duas famílias de AG. Por exemplo, COX-1 tem maior afinidade com o ω -6 do que com o ω -3. Esta intensa formação de mediadores derivados do ω -6 é diminuída quando o tecido acumula ω -3 (LANDS, et al. 2012).

Os produtos oxigenados sintetizados a partir dos AGPI de 20 carbonos são denominados eicosanóides. Dentre eles, temos prostaglandinas (PG), leucotrienos (LT) e tromboxanos (TX). Os eicosanóides derivados do AA (20:4 ω -6) são de séries pares e os formados a partir do EPA (20:5 ω -3), séries ímpares. Além dos eicosanóides, são mediadores bioativos derivados dos AGPI as resolvinas, as lipoxinas, as neuroprotectinas e os docosatrienos (LANDS, et al. 2012; SCHIMITZ, et al. 2008).

Os metabólitos derivados do AA possuem ação pró-inflamatória e anti-inflamatória, sendo que a maioria deles favorece a inflamação. Já os derivados do EPA são conhecidos pelo seu efeito anti-inflamatório. Isso se dá pela produção de mediadores anti-inflamatórios, menor produção de eicosanóides derivados do AA e ação menos potente de alguns metabólitos do EPA em relação àqueles formados pelo ω -6 (CALDER, et al. 2009; SCHIMITZ, et al. 2008).

Os ácidos graxos ω -3 são capazes de modular a inflamação não só pela produção de mediadores bioativos, como também pela interação com fatores de transcrição (CALDER, et al. 2012). Estudos já mostraram que o DHA e o EPA diminuem a produção de citocinas pró-inflamatórias em células dendríticas e macrófagos através da maior ativação do receptor ativador da proliferação de peroxissomos (PPAR) e menor ativação do fator nuclear kappa B (KONG, et al. 2010; NOVAK, et al. 2003)

2.3. AGPI e câncer de mama

Dentre os lipídios, os AGPI da família ômega-3 parecem exibir melhor efeito antitumoral (ZHENG, et al. 2013). Apesar de alguns ácidos graxos da família ômega-6, como o AL, terem sido associados a uma ação antitumoral, o AA está relacionado com o crescimento e a progressão tumoral (XU, et al. 2014; CABRAL, et al. 2015; BROWN, et al. 2010).

Vários estudos epidemiológicos têm buscado associações entre o EPA, o DHA ou o AAL e o risco de desenvolver câncer de mama sendo que, até o momento, os resultados são inconclusivos (Tabela 2). A ingestão dietética dos ácidos graxos EPA e DHA já foi indicada como fator de proteção do câncer de mama em alguns estudos e, em outros, mostrou não ter associação significativa com o tumor (Tabela 2).

Kort e colaboradores (1987) e Wu e colaboradores (2005) mostraram redução significativa do crescimento tumoral em camundongos suplementados com ômega-3 em relação aos que receberam ômega-6. Os resultados *in vitro* demonstram que o EPA e o DHA, sozinhos, são capazes de diminuir a proliferação e induzir aumento da morte celular em diferentes linhagens de câncer de mama (Tabela 2).

Tabela 2 – Características de estudos epidemiológicos, *in vivo* e *in vitro* que buscaram relação entre os ácidos graxos ômega-3 e o câncer de mama. RR: Risco relativo, IC: Intervalo de confiança, DHA: Ácido docosaexaenoico, DPA: Ácido docosapentaenoico, EPA: Ácido eicosapentaenoico, AAL: Ácido alfa-linolênico, AA: Ácido araquidônico, AL: Ácido linoleico.

Modelo	Tratamento	Resultados	Referência
Estudos epidemiológicos			
Meta-análise: 8 estudos sendo 6 coortes	Consumo de peixe, EPA, DHA e/ou AAL	<ul style="list-style-type: none">• Sem associação com o câncer de mama em 4 estudos• Risco aumentado para mulheres no maior quartil de consumo de peixe em relação ao menor deles (Incidência RR 1,47, IC 95%, 1,10-1,98)	MAC LEAN, et al. 2006
Meta-análise: 21 coortes	<ul style="list-style-type: none">• Consumo de peixe, EPA, DHA, DPA e/ou AAL• Biomarcador de tecido	<ul style="list-style-type: none">• Sem associação significativa entre o consumo de peixe ou AAL e o risco• Consumo de EPA, DHA e DPA foi inversamente associado ao risco (RR 0,86, IC95%, 0,78-0,94): 16 estudos	ZHENG, et al. 2013

Estudos <i>in vivo</i>			
Camundongos F344 com transplante de adenocarcinoma mamário R3230AC	EPA e DHA	Redução significativa do peso e volume do tumor após 4 semanas de tratamento.	KARMALI, et al. 1984
Camundongos BN/Bi com transplante de adenocarcinoma mamário	Ômega-3 e Ômega-6	Crescimento do tumor na dieta com ômega-3 foi significativamente menor que na dieta com ômega-6.	KORT, et al. 1987
Camundongos nude e implantação de MDA-MB-231	Ômega-3 e Ômega-6	Redução significativa do peso e volume do tumor no grupo recebendo ômega-3 em relação ao recebendo ômega-6.	WU, et al. 2005
Camundongos nude e implantação de MDA-MB-231 expressando fat-1	Ômega-3 endógeno	Redução significativa do peso e volume do tumor	CHEN, et al. 2014
Estudos <i>in vitro</i>			
MCF-7	EPA e DHA	Inibição da proliferação celular e aumento de morte celular por apoptose em 72h	CAO et al. 2012
MCF-7 e MDA-MB-231	EPA, DHA e AA	<ul style="list-style-type: none"> • EPA e DHA inibiram a proliferação celular e aumentaram morte celular por apoptose em 72h • AA não alterou a viabilidade celular de MCF-7 	CORSETTO, et al. 2011
MDA-MB-231	DHA	Redução da proliferação celular em 72h e aumento de apoptose a partir de 24h	BLANCKAERT, et al. 2010
MDA-MB-231	Co-estímulo de EPA e DHA ou EPA, DHA e AL	Diminuição do crescimento celular em 72h	SCHLEY et al., 2005
MDA-MB-231, SUM159 e SUM 149	DHA	Aumento de morte celular por apoptose em 24h	XIONG, et al. 2012

MDA-MB-231	EPA e DHA	Inibição do crescimento celular e aumento de morte celular por apoptose em 24h	LEE, et al. 2014
MCF-7, MDA-MB-231 e MDA-MB-435	EPA e DHA	Diminuição da viabilidade celular em 72h e aumento de apoptose a partir de 48h.	KANG, et al. 2010

2.4. Morte celular

Como mostrado na tabela 2, o EPA e o DHA são capazes de induzir aumento da morte celular em diferentes linhagens celulares de câncer de mama. Classicamente, a morte celular é dividida em programada (apoptose) e não programada (necrose), entretanto já se sabe que a necrose pode ocorrer de forma controlada e que outros mecanismos também podem levar à morte (YAN, et al. 2015; WU, et al. 2012; GALLUZZI, et al. 2012).

A apoptose apresenta como características morfológicas o encolhimento celular, a fragmentação nuclear e a formação de corpos apoptóticos. Já a necrose é caracterizada por aumento do volume celular e rompimento da membrana celular com liberação dos componentes intracelulares (WU, et al. 2012). Outro tipo de morte celular já conhecido é a piroptose. Ela foi primeiramente descrita em macrófagos infectados com *Salmonella typhimurium* e é caracterizada por rompimento da membrana celular e fragmentação nuclear (HERSH, et al. 1999; BERGSBAEKN, et al. 2009)

2.4.1. Apoptose

Apoptose é o mecanismo de morte celular programada mediado por caspases pró-apoptóticas e caracterizado por encolhimento celular, fragmentação nuclear, condensação da cromatina e formação de corpos apoptóticos. Esse processo é considerado não inflamatório por não apresentar rompimento da membrana e é necessário para manutenção da homeostase celular (TAIT, et al. 2010; HANAHAN, et al. 2011).

As caspases consistem em uma família de proteases classicamente dividida em dois grupos de acordo com a sua função: Apoptóticas (caspases 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10) e inflamatórias (caspases 1, 4 e 5). Essas enzimas são amplamente expressas em sua pró-forma inativa e são ativadas por clivagem ou dimerização (CREAGH, et al. 2014; WU, et al. 2014; POP, et al. 2009).

Dentre as caspases humanas apoptóticas temos as iniciadoras (2, 8, 9, 10), que são responsáveis por clivar e ativar as caspases efetoras 3, 6 e 7. Aquelas chamadas iniciadoras são recrutadas por complexos multiproteicos como o apoptossoma e o DISC (Complexo de Sinalização Indutor de Morte) e são ativadas devido à sua dimerização (CREAGH, et al. 2014; FUCHS, et al. 2015; WU, et al. 2014).

Duas vias são descritas para a ativação da apoptose: A extrínseca e a intrínseca. A via extrínseca pode ser iniciada pela ligação de receptores de morte de superfície celular ou pelos receptores de dependência que só levam à morte quando a concentração dos seus ligantes específicos fica abaixo de um limiar crítico (SAGULENKO, et al. 2013; GALLUZZI, et al. 2012; GUENENEAUD, et al. 2010).

A via intrínseca é ativada por condições de estresse intracelular e é mediada pela permeabilização da membrana mitocondrial externa (MOMP). Essa permeabilização leva à liberação do citocromo c e à formação de um complexo chamado apoptossoma, capaz de ativar a caspase 9 (SAGULENKO, et al. 2013; GALLUZZI, et al. 2012; BLANDER, et al. 2014).

Como desfecho da ativação da apoptose, os corpos apoptóticos são fagocitados. Entretanto, se eles não completarem essa via, eles podem entrar em uma fase denominada apoptose tardia ou necrose secundária com o rompimento da membrana celular e liberação dos seus componentes (SAGULENKO, et al. 2013; MAGNA, et al. 2014).

Estudos sugerem que a via de morte celular induzida pelos AGPI no câncer de mama é a apoptose intrínseca e extrínseca (CAO, et al. 2012, CORSETTO, et al. 2011, XIONG, et al. 2012, KANG, et al. 2010 e BLANCKAERT, et al. 2010). Vários mecanismos de indução já foram citados, mas esse processo ainda não é completamente compreendido.

Xiong e colaboradores (2012) propuseram que o DHA induz níveis elevados de espécies reativas de oxigênio em MDA-MB-231 e leva ao estresse do retículo endoplasmático. Por meio desse estresse, o DHA aumenta a expressão do receptor de morte 5 (DR5) que ativa a cascata de apoptose dependente das caspases 8 e 9.

2.4.2. **Piroptose**

A piroptose foi primeiramente descrita como a morte celular dependente de caspase 1 em macrófagos infectados com *Salmonella typhimurium* (HERSH, et al. 1999). Hoje já se sabe que ela pode ser mediada por outras caspases inflamatórias (caspases 4, 5 e 11) assim como ocorrer em outros tipos celulares por meio de diferentes estímulos (BERGSBAKEN, et al. 2009).

Os critérios que definem esse tipo de morte são: Atividade proteolítica de uma caspase inflamatória, aumento do volume celular, rompimento da membrana celular, fragmentação nuclear e condensação da cromatina (JORGENSEN, et al. 2015).

A piroptose possui algumas semelhanças com a apoptose: A condensação da cromatina e a fragmentação nuclear. Entretanto, os efeitos delas são diferentes. A piroptose é considerada pró-inflamatória por apresentar rompimento da membrana celular e liberação dos componentes intracelulares pró-inflamatórios enquanto que a apoptose é descrita como não-inflamatória por manter a integridade da membrana (KEPP, et al. 2010; BERGSBAKEN, et al. 2009). Outras diferenças dizem respeito à Poli [ADP-ribose] polimerase (PARP) e ao núcleo da célula. A clivagem de PARP é determinante para a apoptose, mas não é necessária para a piroptose. Além disso, o núcleo das células em piroptose permanece intacto diferentemente das células apoptóticas (JORGENSEN, et al. 2015).

As caspases são produzidas em sua pró-forma inativa e ativadas através do inflamassoma ou piroptossoma (GUO, et al. 2015; FERNANDES-ALNEMRI, et al. 2007). A ativação das caspases inflamatórias leva à formação de poros na membrana que permitem a entrada de água e íons na célula e geram o aumento do volume celular e o rompimento da membrana (JORGENSEN, et al. 2015).

A caspase 1 cliva e ativa as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18 e leva à secreção de HMGB1, IL-1 β , IL-18 entre outras proteínas celulares (KELLER, et al. 2008; LAMKANFI, et al. 2010). HMGB1 é uma proteína altamente expressa no câncer de mama (BREZNICEANU, et al. 2003). Ela é considerada uma proteína nuclear e sua função inclui determinar a estrutura da cromatina e regular a transcrição. Entretanto, ela pode ser secretada da célula por processo de morte celular ou ativação do inflamassoma (BELL, et al. 2006; LAMKANFI et al, 2010; MAGNA, et al. 2014).

Além de agir sobre a ativação de citocinas, a caspase 1 pode induzir a morte por piroptose por um mecanismo ainda desconhecido (TAIT, et al. 2014). Ainda são necessários estudos para esclarecer porque a ativação de caspase 1 ativa ou não a morte celular (GALUZZI, et al. 2012).

O inflamassoma é um complexo multi-proteico capaz de ativar caspases inflamatórias. Na via canônica ele é formado por receptores de reconhecimento padrão, uma caspase inflamatória e, se necessário, a proteína adaptadora ASC (Proteína tipo particular associada à apoptose contendo domínio de recrutamento de caspase). A ativação dos receptores leva ao recrutamento das proteínas do inflamassoma e à

oligomerização da pró-caspase 1, o que promove sua autoproteólise e consequente ativação (KEYEL, et al. 2014; GUO, et al. 2015). Já na via não-canônica, a caspase murina 11 ou a sua homóloga humana, a caspase 4, se liga diretamente ao estímulo microbiano, oligomeriza e é ativada (SHI, 2014).

Diferentes inflamassomas canônicos já foram descritos e eles são nomeados de acordo com o seu receptor de reconhecimento padrão. Receptores do tipo NOD (NLR) podem conter um domínio pirina (NLRP) ou um domínio de recrutamento de caspase (NLRC). Alguns exemplos de inflamassoma são o NLRP1, o NLRP3 e o NLRC4 (SCHRODER, et al. 2010; LAMKANFI, et al. 2014).

Os receptores de reconhecimento padrão reconhecem padrões moleculares associados a patógenos ou a danos celulares do hospedeiro, como ATP extracelular ou cristais de ácido úrico (LAMKANFI, et al. 2010).

O inflamassoma mais estudado é o da família NLRP3 que é composto pelo receptor NLRP3, pelo adaptador ASC e pela pró-caspase-1 (SCHRODER, et al. 2010). Para montagem desse inflamassoma são necessários dois sinais: (I) Primeiro sinal que irá estimular a translocação do fator nuclear kappa B (NFkB) para o núcleo e (II) Segundo sinal que irá ativar o NLRP3 e levar ao recrutamento das proteínas do inflamassoma (BAUERNFEIND, et al. 2009; TSCHOPP, et al. 2010). Os exemplos mais comuns são o lipopolissacarídeo (LPS) como primeiro sinal e ATP extracelular como segundo (SCHRODER, et al. 2010). A ativação do NFkB e sua translocação para o núcleo são eventos importantes visto que ele é fator de transcrição dos genes de NLRP3 e de pró-IL-1 β (BAUERNFEIND, et al. 2009).

Estudos mostram que os ácidos graxos da família ômega-3 diminuem a ativação do inflamassoma em macrófagos. Eles diminuem a translocação de NFkB para o núcleo, a ativação de caspase 1 e a produção de citocinas pró-inflamatórias induzidas por ativadores do inflamassoma (WILLIAMS-BEY, et al. 2014; YAN, et al. 2013). Em células de hepatocarcinoma, o DHA diminuiu significativamente a expressão de mRNA de NLRC4, a ativação de caspase 1 e a secreção de citocinas pró-inflamatórias induzidas pelo palmitato (LUO, et al. 2012). Já no câncer de mama, não há nenhum estudo que mostre a ação do ômega 3 na ativação do inflamassoma.

O piroptossoma é um outro complexo multiproteico capaz de ativar a caspase 1. Ele consiste em um oligômero formado apenas por proteínas ASC que ativa a caspase por dimerização e leva à piroptose (FERNANDES-ALNEMRI, et al. 2007).

Estudos vêm indicando que a caspase 8, uma enzima pró-apoptótica, promove a ativação do inflamassoma e que a caspase 7 seria um substrato da caspase 1 ativa. Visto isso, são necessários mais estudos para estabelecer a piroptose como um real tipo de morte celular ou como um subtipo da apoptose (GALLUZZI, et al. 2012; GUO, et al. 2015; LAMKANFI, et al. 2008). Estudos recentes mostram que um estímulo pode ativar a apoptose e a piroptose em uma mesma célula (LEBEAUPIN, et al. 2015; SAGULENKO, et al. 2013). Além disso, sugere-se que o inflamassoma leve à apoptose, associando assim esses dois tipos de morte (SAGULENKO, et al. 2013).

3. **Justificativa**

Sabe-se que o DHA é capaz de modular a inflamação e que ele possui ação antitumoral *in vitro* através do aumento da morte e da diminuição da proliferação de células de câncer de mama. O único mecanismo de morte relacionado com a ação do DHA até o momento foi a apoptose. A piroptose é um tipo de morte mediado por caspases inflamatórias e caracterizado por rompimento da membrana e liberação de componentes intracelulares. Visto que a piroptose ainda não foi estudada como mecanismo de ação *in vitro* do DHA, o presente estudo buscou avaliar se o DHA leva à morte por piroptose nas células de câncer de mama triplo-negativo MDA-MB-231.

4. **Objetivos**

4.1. **Objetivo geral**

Avaliar o efeito do ácido docosahexaenóico (DHA) ou do ácido araquidônico (AA) sobre a morte celular por piroptose em células de câncer de mama triplo-negativo MDA-MB-231.

4.2. **Objetivos específicos**

- Analisar o efeito citotóxico dos ácidos graxos através da quantificação da viabilidade celular;
- Quantificar o percentual de morte por apoptose e necrose;
- Analisar a ocorrência da piroptose através da:
 - Análise da perda da integridade da membrana,
 - Expressão de caspase 1 ativa e clivada,
 - Secreção da citocina IL-1 β ,
 - Localização dos marcadores nucleares NF κ B e HMGB1.

5. Materiais e métodos

5.1. Delineamento do estudo

Nesse estudo foi avaliado o efeito do DHA e do AA na indução de morte celular em células de câncer de mama triplo-negativo (MDA-MB-231). Como controle da pesquisa, observou-se a ação desses ácidos graxos sobre células não cancerosas (monócitos humanos). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Imunologia e Inflamação do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília/DF a cuidado da prof. Dr. Kelly Grace Magalhães.

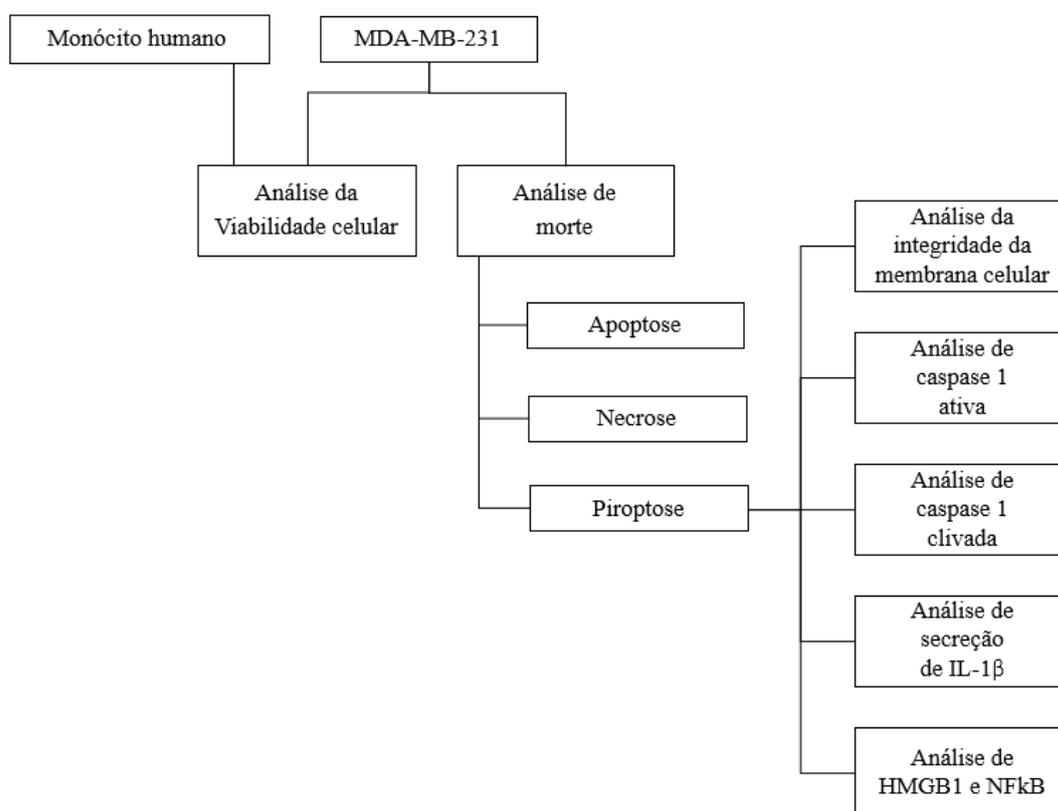


Figura 2 – Fluxograma dos experimentos in vitro

5.2. Células

A linhagem celular de câncer de mama humano MDA-MB-231 foi fornecida pelo prof. Dr. José Raimundo Corrêa do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília/DF. Ela foi cultivada em meio L-15 (Sigma-Aldrich, USA) enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB – GIBCO, USA) e 1% de antibiótico/antimicótico (GIBCO, USA) e incubada em estufa a 37°C livre de CO₂.

A MDA-MB-231 foi cultivada em garrafas estéreis e o seu crescimento foi acompanhado diariamente por microscópio de luz invertida. Ao atingir 80-90% de confluência, ela foi lavada com PBS (Tampão fosfato-salino) e tripsinizada com 0,25% Tripsina/EDTA (GIBCO, USA) a 37°C por aproximadamente 5 minutos. A tripsina é uma protease que foi utilizada para dissociação das células aderidas no fundo da garrafa.

Após os 5 minutos, meio L-15 foi utilizado para inibir essa protease e impedir que ela gerasse lise celular. A suspensão de células já desaderidas foi recolhida da garrafa e centrifugada a 300G por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e um destes três procedimentos foi realizado: (a) congelamento de células em solução de meio L-15 enriquecido e 5% de dimetilssulfóxido (DMSO - Sigma-Aldrich, USA) e armazenamento a -80°C, (b) contagem de células em Câmara de Neubauer (KASVI) e plaqueamento para posteriores experimentos ou (c) recolocação das células na garrafa de cultura celular.

Os monócitos humanos foram obtidos do isolamento de PBMC (Células mononucleares do sangue periférico humano). O sangue periférico de doadores foi coletado e, em seguida, colocado em tubos falcon com Histopaque na proporção 1:1. Os tubos foram centrifugados a 2000 rpm por 20 minutos e, dentre as quatro fases formadas, foi coletado o anel branco correspondente ao PBMC. As células foram lavadas duas vezes com PBS (Tampão fosfato-salino) e plaqueadas na concentração de 3×10^3 células/ μL em placas de 96 poços. Para os experimentos, o sobrenadante foi descartado e somente os monócitos que aderiram ao fundo da placa foram analisados.

A cada novo experimento, foi feito um novo isolamento de PBMC. Com isso, as células não foram cultivadas, apenas preservadas em meio RPMI-1640 (GIBCO, USA) enriquecido com 10% de SFB e 1% de antibiótico/antimicótico a 37° e 5% CO₂.

Toda manipulação celular foi feita em capela de fluxo laminar (ESCO Labculture classe II, tipo A2) em condições estéreis.

5.3. Estímulo

Os ácidos graxos DHA e AA (Sigma-Aldrich, USA), diluídos em etanol absoluto (J.T.Baker®) ou dimetilssulfóxido (Sigma-Aldrich, USA) e armazenados a -20°C protegidos da luz em um frasco de vidro previamente autoclavado.

Para o estímulo das células, o estoque de ácidos graxos foi retirado do freezer, vortexado por 60 segundos para homogeneização da solução e levado ao sonicador (BRANSONIC, USA) por 30 segundos para abertura da cadeia lipídica. O DHA e o AA foram usados em diferentes concentrações: 12,5; 25; 50; 100 e 200 μM .

5.4. Análise da viabilidade celular

O reagente MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio brometo) foi utilizado para análise de viabilidade celular. Ele é um sal de tetrazólio que é convertido em cristais de formazan quando clivado na mitocôndria ativa. A quantidade de formazan produzida é diretamente proporcional ao número de células viáveis e, por isso, esse método é utilizado em análises de viabilidade e citotoxicidade (MOSMANN, et al. 1983).

No ensaio, 1×10^4 células de câncer de mama ou 6×10^5 PBMC foram plaqueadas por poço em uma placa de 96 poços e deixadas na estufa por 24h. Após esse tempo as células foram estimuladas com diferentes concentrações de DHA ou AA variando entre 12,5 e 200 μ M. O maior volume pipetado por poço para alcançar a concentração final de DHA e AA correspondeu a 1% de DMSO ou a 2% de etanol. Para controlar o efeito desses diluentes, o volume máximo de DMSO ou etanol utilizado também foi analisado no experimento.

Após o tempo de estímulo, o sobrenadante foi substituído por uma solução de 10% MTT 5mg/mL (Sigma-Aldrich, USA) diluído no próprio meio de cultura celular. Em seguida, a placa foi incubada por 3h protegida da luz na estufa de cultivo. O sobrenadante foi descartado e os cristais de formazan formados foram diluídos em 100 μ L de DMSO. A absorbância foi lida a 570nm no espectrofotômetro SpectraMax M3 (Molecular Devices, USA). Para o cálculo da viabilidade, as células não estimuladas foram consideradas como 100% viáveis e os demais estímulos foram calculadas proporcionalmente. Foram feitos três experimentos em triplicata com a célula MDA-MB-231 e dois experimentos em triplicata para os monócitos.

5.5. Análise de apoptose e necrose

Para análise de morte celular por apoptose e necrose, as células foram marcadas com Anexina-V e PI (Life Technologies, USA) e analisadas em citômetro FACS Calibur (BD Biosciences, USA). Em células saudáveis, a fosfatidilserina está localizada na parte interior da membrana plasmática. A externalização dessa molécula ocorre quando elas entram em apoptose, sendo esse um marcador desse tipo de morte. A Anexina se liga à fosfatidilserina enquanto que o PI permanece como um controle da integridade da membrana celular nas células positivas para Anexina (FINK, et al. 2005).

Com esse método, as células positivas apenas para PI são consideradas necróticas (perda da integridade da membrana) e as positivas só para Anexina, apoptóticas. Células duplamente positivas podem estar tanto em apoptose tardia quanto em necrose.

Um total de 6×10^4 células de câncer foi plaqueado por poço em uma placa de 24 poços e incubado por 24h para adesão celular. Após esse período, 50, 100 ou $200 \mu\text{M}$ de DHA ou AA foi colocado por poço. Depois do tempo de estímulo, o sobrenadante foi retirado dos poços e centrifugado para análise do precipitado.

As células que permaneceram aderidas na placa foram lavadas com PBS e tripsinizadas. O precipitado e as células já desaderidas foram agrupados e lavados com PBS. Em seguida, foi feita marcação com $1,25 \mu\text{L}$ de Anexina e $0,25 \mu\text{L}$ de solução de Iodeto de Propídeo – PI ($100 \mu\text{g}/\text{mL}$) em $25 \mu\text{L}$ de *Binding Buffer*. As células foram incubadas por 10 minutos protegidas da luz à temperatura ambiente e, em seguida, quantificadas por citometria de fluxo.

Foram adquiridos 10.000 eventos nos canais FL-1 e FL-2. Para controle experimental de morte celular, células foram aquecidas por 15 minutos a 100°C . A análise dos dados foi realizada no programa FlowJo v.7.6.5 (Tree Star, USA) e o resultado apresentado foi representativo de dois experimentos.

5.6. Análise de integridade da membrana celular

O Iodeto de propídeo (PI) é um fluorocromo impermeável à membrana plasmática e por isso é utilizado na detecção de células com perda da integridade da membrana. Para esse ensaio, 6×10^4 células de câncer foram plaqueadas por poço em uma placa de 24 poços e deixadas na estufa por 24h para adesão celular. Após esse período, 50, 100 ou $200 \mu\text{M}$ de DHA ou AA foi colocado por poço. Como esses ácidos graxos estavam diluídos em etanol ou DMSO, o maior volume pipetado para alcançar a concentração final de DHA e AA foi analisado como um controle do experimento (1% DMSO e 2% de etanol).

Após o tempo de estímulo, o sobrenadante foi centrifugado a 300G por 5 minutos para análise do precipitado – células que já tinham desaderido do poço por processo de morte celular e estavam no sobrenadante. As células que permaneceram aderidas na placa foram lavadas com PBS e tripsinizadas com tripsina/EDTA (GIBCO, USA). O precipitado e as células já desaderidas foram agrupados e lavados com PBS. Em seguida, foi feita marcação com $0,5 \mu\text{L}$ de solução de PI ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) em $20 \mu\text{L}$ de *Binding Buffer* (ENZO, USA). As células foram incubadas por 10 minutos protegido da luz e, em seguida, quantificadas por citometria de fluxo em citômetro FACS Verse (BD Biosciences, USA). Foram adquiridos 10.000 eventos no canal FL-2 e os dados foram analisados no programa FlowJo v.7.6.5 (Tree Star, USA). O resultado apresentado foi representativo de dois experimentos.

5.7. Análise de caspase 1 ativa por citometria de fluxo

A caspase 1 é produzida em sua forma inativa e é ativada por meio do inflamassoma (CREAGH, et al. 2014). O reagente FLICA se liga à caspase 1 ativa e pode ser quantificado por citometria de fluxo. Para essa análise, 6×10^4 células foram plaqueadas por poço em uma placa de 24 poços e deixadas por 24h na estufa para adesão celular. Após esse período, 50, 100 ou 200 μ M de DHA ou AA foi colocado por poço. Como controle de ativação do inflamassoma, foram utilizados 1 μ g/mL de LPS (mesmo tempo de estímulo dos ácidos graxos) e 1mM de ATP (60 minutos).

Após 6h, o sobrenadante dos poços foi centrifugado e as células que permaneceram no fundo da placa foram lavadas e desaderidas. O precipitado e as células já desaderidas foram agrupados e lavados com PBS. Foi feita a diluição do FLICA (ImmunoChemistry) em meio de cultura na proporção de 1:30 e marcação das células. Essas foram incubadas por 30 minutos na estufa a 37° e, em seguida, lavadas duas vezes. Foram adquiridos 10.000 eventos no canal FL-1 do citômetro FACS Calibur (BD Biosciences, EUA). O histograma apresentado é representativo de dois experimentos. A análise de dados foi feita no programa FlowJo v.7.6.5 (Tree Star, EUA).

5.8. Extração de proteínas

A extração de proteínas celulares foi realizada para posterior análise da expressão de caspase 1 clivada. Um total de 1×10^6 células foi plaqueado por poço em placas de 6 poços e deixado na estufa por 24 horas para adesão. Após esse período, 100 ou 200 μ M de DHA ou AA foi colocado por poço. Como controle de ativação do inflamassoma, foram utilizados 1 μ g/mL de LPS (mesmo tempo de estímulo dos ácidos graxos) e 1mM de ATP (60 minutos).

Após o tempo de estímulo, as células foram lavadas e desaderidas da placa. O inibidor de protease foi diluído em solução de lise celular (Tris 50mM, NaCl 150mM, EDTA 5mM e 1% de Triton X-100 – pH 7,4) na proporção de 1:100 e as células foram incubadas com essa solução por 30 minutos no gelo, vortexando-se a cada 5 minutos. Em seguida elas foram centrifugadas a 17000G por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante com a amostra de proteína foi coletado e armazenado a -80°C.

A dosagem de proteínas foi feita pelo método descrito por Bradford e colaboradores (1976). Segundo ele, o reagente *Comassie Brilliant Blue* (Sigma-Aldrich, USA) na sua forma vermelha se liga à proteína e se torna azul podendo ser lido por espectrofotometria.

No ensaio, 250µL do reagente (0,01% de *Coomassie Brilliant Blue G-250*, 4,7% de etanol e 8,5% de ácido fosfórico) foi colocado com 10µL de amostra e lido em espectrofotômetro SpectraMax M3 (Molecular Devices, USA) a 595nm após 5 minutos. Albumina sérica bovina (AMRESCO, USA) foi utilizada para se estabelecer a curva-padrão em diferentes concentrações de 1400µg/mL a 200µg/mL. O branco da curva foi feito com água.

Para análise da quantidade de proteínas, as amostras foram comparadas à curva-padrão ($R^2 > 0,9$) e calculadas proporcionalmente. Quando necessário, foi feita concentração de proteínas. Para isso, o volume equivalente a 20µg de proteína da amostra foi separado e colocado em solução de acetona: metanol (8:1) na proporção de 1:9 *overnight* a 4°C. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 10000G por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. O precipitado formado foi armazenado então a -20°C.

5.9. Análise da expressão de caspase 1 clivada

A análise de expressão de Caspase 1 clivada (p20) foi feita por *Western Blot*. Por essa metodologia, as proteínas da amostra foram separadas de acordo com o seu peso molecular por eletroforese e, depois, transferidas para uma membrana de nitrocelulose por eletrotransferência. Essa membrana foi incubada com o anticorpo específico da proteína-alvo e revelada no Image Quant LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences, UK).

O anticorpo primário foi adquirido da Santa Cruz Biotechnology (USA) enquanto que o anticorpo secundário conjugado à peroxidase horseradish, da Jackson ImmunoResearch (USA).

O gel de poliacrilamida-SDS foi feito em sistema BioRad (USA) com a concentração de 12% no gel separador e 5% no gel concentrador. As amostras de proteína foram diluídas em tampão (Tris 125mM, 20% de glicerol, 10% de 2-mercaptoetanol, 4% de SDS e 0,004% de azul de bromofenol) e fervidas por 3 minutos antes de serem colocadas no gel. As amostras correram em tampão Tris-Glicina (Tris 25mM; Glicina 192mM; 1% SDS – pH 8,3) a 100V no gel concentrador e a 150V no gel separador à temperatura ambiente.

Em seguida foi feita a transferência da proteína do gel para a membrana de nitrocelulose (0,45µM). Foi utilizado sistema *semi-dry* com tampão de transferência (Tris 25mM, Glicina 192mM, 20% Metanol – pH 8,3) a 10V por 20 minutos à temperatura ambiente. A membrana foi bloqueada por 1 hora sob agitação com solução de TBS (Sigma-Aldrich, EUA), 0,05% de Tween20 e 5% de leite desnatado. Após esse período,

foi feita lavagem (TBS e 0,05% de Tween20) e incubação *overnight* sob agitação com o anticorpo primário a 4°C na proporção de 1:2000. Em seguida, foram feitas mais lavagens e incubação de 2 horas à temperatura ambiente com o anticorpo secundário na diluição de 1:20000.

A β -actina (Sigma-Aldrich, EUA) foi utilizada como um controle interno do experimento para confirmar se houve um carregamento igual de proteína das amostras.

Para a revelação, foi utilizado reagente de detecção para *Western Blot* da GE Healthcare Life Sciences (ING). Após a captura das imagens, a análise foi realizada no programa ImageJ (NIH, EUA)

5.10. Análise de secreção de IL-1 β

Através do inflamassoma, a IL-1 β é processada e secretada da célula (KEYEL, et al. 2014). E para dosar a quantidade dessa citocina no sobrenadante da cultura celular, foi utilizado o método ELISA com kit da BD Biosciences, EUA.

Um total de 6×10^4 células de câncer foram plaqueadas por poço em uma placa de 24 poços e deixadas na estufa por 24h para adesão celular. Após esse período, 50, 100 ou 200 μ M de DHA ou AA foi colocado por poço. Como controle de ativação do inflamassoma, foram utilizados 1 μ g/mL de LPS (mesmo tempo de estímulo dos ácidos graxos) e 1mM de ATP (60 minutos). Alcançado o tempo de estímulo, o sobrenadante da cultura celular foi retirado e armazenado a -20°C.

Para a análise, o anticorpo de captura foi colocado em uma placa de 96 poços e incubado *overnight* a 4°C. No dia seguinte, foram feitas 3 lavagens com PBS e 0,05% de Tween e bloqueio por 1 hora à temperatura ambiente com *Assay Diluent*. As diferentes amostras de sobrenadante, assim como a solução padrão, foram colocadas nos poços e a placa foi incubada novamente *overnight* a 4°C.

Em seguida, os poços foram lavados e foi colocado o anticorpo de detecção para IL-1 β . A placa foi incubada por 1 hora em temperatura ambiente. Foi feita lavagem, adição da solução de streptavidina e incubação por 30 minutos à temperatura ambiente protegido da luz. Mais lavagens foram realizadas e 50 μ L da solução de substrato foi adicionada por poço. Após 10 minutos, foi colocada a solução de parada e a absorbância foi lida a 450nm pelo espectrofotômetro SpectraMax M3 (Molecular Devices, EUA). Para análise da quantidade de citocinas, as amostras foram comparadas à curva-padrão ($R^2 > 0,9$) e calculadas proporcionalmente. Foi realizado um experimento em triplicata.

5.11. Análise de HMGB1 e NFkB por imunofluorescência

Para verificar a localização das proteínas HMGB1 e NFkB na célula de câncer foi feita imunomarcção intracelular e análise por microscopia de fluorescência confocal. Os anticorpos primários foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA) e Santa Cruz (EUA), respectivamente.

A HMGB1 é comumente considerada uma proteína nuclear (MAGNA, et al. 2014). A ativação do inflamassoma leva à translocação dessa proteína para o citoplasma e à sua secreção (LAMKANFI, et al. 2010).

O NFkB é um fator de transcrição presente no citoplasma em sua forma inativa. Ao ser ativado através de estímulos extracelulares inflamatórios, ele transloca para o núcleo para exercer sua função (PERKINS, 2007)

Nesse ensaio, $1,5 \times 10^5$ células de câncer foram plaqueadas por poço em placas de 24 poços com lamínulas. A placa foi deixada na estufa por 24h para adesão e, após esse período, DHA ou AA foi adicionado no poço. Como controle da expressão de NFkB e HMGB1, um poço foi estimulado com $1 \mu\text{g/mL}$ de LPS e 1mM de ATP.

Alcançado o tempo de estímulo, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% por 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida foram lavadas por três vezes e permeabilizadas em Triton a 0,2% por 20 minutos em temperatura ambiente. Após novas lavagens, foi adicionada solução de bloqueio (2% de BSA, 5% de SFB e PBS) por 20 minutos à temperatura ambiente.

O anticorpo primário foi diluído em solução de bloqueio na proporção de 1:200 e incubado *overnight* a 4°C . Após esse período, as células foram lavadas e incubadas com o anticorpo secundário conjugado a Alexa Fluor 488 (1:2000 em PBS) por 1 hora à temperatura ambiente. Foram feitas novas lavagens e, em seguida, incubação com o DAPI (1:5000 em PBS) por 5 minutos à temperatura ambiente.

As lâminas foram montadas com meio de montagem anti-decaimento da fluorescência e as imagens foram obtidas no microscópio Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, DEU) com lente no aumento de 63x e zoom de 4x.

5.12. Análise estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente pelo programa GraphPad Prism 6.0, GraphPad Software, Inc. Os testes utilizados foram one-way ou two-way ANOVA seguido do pós-teste de Turkey. Significância estatística foi assumida com valor de $p \leq 0,05$.

6. Resultado

Artigo: “Ácido docosahexaenóico induz o aumento da ativação da morte por piroptose em células de câncer de mama MDA-MB-231”

Artigo original

Revista: Nutrition and Cancer

Apoio/financiamento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) processo nº 482674/2012-1.

Resumo

Introdução: A modulação das vias reguladas de morte, como a apoptose e a piroptose, pode contribuir para o controle da progressão tumoral. O ácido docosahexaenóico (DHA) tem mostrado ação antitumoral devido ao aumento da apoptose no câncer de mama e ainda não havia sido relacionado à piroptose. O presente estudo buscou avaliar o efeito do DHA (ômega-3) ou do AA (ômega-6) sobre a morte por apoptose e piroptose em células de câncer de mama. **Metodologia:** A linhagem celular de câncer de mama MDA-MB-231 foi estimulada com diferentes concentrações de DHA ou AA. A quantificação da morte por apoptose foi feita por marcação com Anexina-V/PI. Foram analisadas a integridade da membrana, a expressão de caspase 1 ativa e clivada, a secreção de IL-1 β e a translocação de NF κ B e HMGB1 para avaliar a morte por piroptose. **Resultados:** Concentrações acima de 200 μ M para o DHA e o AA foram consideradas citotóxicas para MDA-MB-231. O DHA aumentou o percentual de apoptose e necrose a partir de 50 μ M e levou à maior perda da integridade da membrana quando comparado à mesma concentração de AA. A apoptose foi induzida pelo AA somente a partir de 200 μ M. A caspase-1 ativa e a translocação de HMGB1 foram observadas nas células tratadas com dosagens menores de DHA (100 μ M) quando comparado ao AA (200 μ M). O DHA levou à secreção de IL-1 β a partir 50 μ M. **Conclusão:** O DHA foi capaz de induzir aumento da morte celular por apoptose a partir de 50 μ M e, a partir de 100 μ M, levou à morte por piroptose em células de câncer de mama MDA-MB-231. Ele levou a um maior percentual de apoptose quando comparado ao AA.

Palavras-chave: Câncer de mama, piroptose, DHA, ômega 3

Abstract

Introduction: Modulation of apoptosis and pyroptosis may contribute to the control of tumor progression. Docosahexaenoic acid (DHA) increase apoptosis in breast cancer cells and this study investigated the effect of DHA (omega-3 fatty acid) and AA (omega-6 fatty acid) on breast cancer cells death by pyroptosis. **Method:** MDA-MB-231 breast cancer cells were supplemented with different concentrations of DHA and AA. The quantification of death by apoptosis was made by Annexin-V / PI staining. Membrane integrity, active and cleaved caspase 1, secreted IL-1 β and NF κ B and HMGB1 translocation were analysed to check pyroptosis. **Results:** DHA and AA were cytotoxic for MDA-MB-231 at 200 μ M. DHA increased apoptosis and necrosis and induced loss of membrane integrity. AA had the same effect at a higher concentration. DHA-treated cells showed active caspase 1 and cytoplasmatic HMGB1 at lower concentrations when compared to AA. DHA led to IL-1 β secretion at 50 μ M. **Conclusion:** DHA increased cell death by apoptosis at 50 μ M and led to pyroptosis at 100 μ M in MDA-MB-231 breast cancer cells. It led to a higher percentage of apoptosis compared to AA.

Keywords: Breast cancer, pyroptosis, DHA, omega 3

Introdução

O ácido docosahexaenóico (DHA - 22:6 ω -3), membro da família dos ácidos graxos poli-insaturados ômega 3, tem mostrado uma ação antitumoral tanto *in vivo* quanto *in vitro*, diminuindo a proliferação e aumentando a morte por apoptose em células de câncer de mama (1-5). Já o ácido araquidônico (AA - 20:4 ω -6), da família ômega-6, está associado ao crescimento e à progressão tumoral (6,7).

Apoptose é o mecanismo de morte celular programada mediado por caspases pró-apoptóticas e caracterizado por encolhimento celular, fragmentação nuclear, condensação da cromatina e formação de corpos apoptóticos (8). Esse processo é considerado não-inflamatório por não apresentar rompimento da membrana e é necessário para manutenção da homeostase celular (9).

Além da apoptose, outros tipos de morte são citados na literatura como a necroptose (10), a piroptose (11) e a pironecrose (12). A piroptose foi primeiramente descrita em macrófagos infectados com *Salmonella typhimurium* (13) e hoje já se sabe que ela pode ocorrer em outros tipos celulares (14, 15) assim como ser ativada por diferentes estímulos como etanol (14) e lipoproteína de baixa densidade oxidada (16). Ainda não há estudo descrevendo a ação de ácidos graxos poli-insaturados na indução desse tipo de morte.

A piroptose apresenta características morfológicas similares às da apoptose e da necrose (17). Ela apresenta aumento do volume celular, rompimento da membrana com liberação de componentes intracelulares e fragmentação nuclear (18). Esse tipo de morte é mediado pelas caspases humanas inflamatórias 1, 4 e 5 (19) que são produzidas em sua pró-forma inativa e, em seguida, ativadas pelo inflamassoma ou piroptossoma (18-22). Dentre os diferentes tipos de inflamassoma, o melhor caracterizado é aquele composto pelo receptor do tipo *NOD* contendo domínio pirina 3 (NLRP3), pela proteína tipo particular associada à apoptose contendo *CARD* (ASC) e pela pró-caspase-1 (23).

Dois sinais são necessários para ativação do inflamassoma NLRP3: (I) Primeiro sinal que irá estimular a translocação do fator nuclear *kappa* B (NF κ B) para o núcleo e a transcrição dos genes de NLRP3 e pró-IL-1 β e (II) Segundo sinal que irá induzir a formação do complexo do inflamassoma (24, 25) e a consequente ativação da pró-caspase-1 (22, 26). Após esse processamento, a caspase 1 cliva e ativa as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18 e leva à secreção de proteína do grupo de alta mobilidade B1 (HMGB1), IL-1 β , IL-18 entre outras proteínas celulares (27,28).

Estudos prévios mostraram que o DHA diminui a ativação induzida do inflamassoma em macrófagos (29, 30). Até o momento não existiam estudos que mostrassem o efeito do DHA na ativação do inflamassoma ou na indução de piroptose em células tumorais da mama. Visto que o ômega-3 possui ação antitumoral através do aumento de morte celular, o presente estudo buscou analisar se o DHA levaria ao aumento da morte por piroptose em células de câncer de mama MDA-MB-231. O efeito do AA sobre a morte celular também foi analisado.

Materiais e Métodos

Materiais e Reagentes

Ácido docosahexaenóico (DHA), ácido araquidônico (AA), meio L-15, 2-mercaptoetanol e dimetilssulfóxido foram adquiridos de Sigma-Aldrich (USA). Soro fetal bovino, antibiótico/antimicótico e meio RPMI-1640 foram adquiridos de GIBCO (USA). As células MDA-MB-231 foram gentilmente fornecidas pelo prof. Dr. José Raimundo Correa. Os reagentes para MTT, o DAPI e o Anti-HMGB1 foram adquiridos de Sigma-Aldrich (USA). O kit de Anexina/PI foi adquirido da Life Technologies (USA). O Iodeto de Propídeo e o *Binding Buffer* foram adquiridos de ENZO (USA). Anti-Caspase 1 clivada, Anti- β -actina e Anti-NF κ B foram adquiridos de Santa Cruz Biotechnology (USA). Anticorpo secundário conjugado à peroxidase horseradish foi adquirido de Jackson ImmunoResearch (USA). Anticorpo secundário conjugado a Alexa Fluor 488 foi adquirido da Invitrogen (USA). O sistema utilizado para eletroforese foi o da BioRad (USA). O reagente FLICA foi adquirido da ImmunoChemistry (USA). O kit de ELISA para IL-1 β foi adquirido da BD Biosciences (USA).

Cultivo celular e tratamento

A célula MDA-MB-231 foi cultivada em meio L-15 enriquecido com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico/antimicótico e incubada em estufa a 37°C livre de CO₂. Os monócitos humanos foram obtidos do isolamento de células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC). O sangue periférico de doadores foi coletado e, em seguida, colocado em tubos falcon com Histopaque na proporção 1:1. Os tubos foram centrifugados e, dentre as quatro fases formadas, foi coletado o anel branco correspondente ao PBMC. As células foram plaqueadas e, após estímulo com os ácidos

graxos, o sobrenadante foi descartado. Assim, somente os monócitos que aderiram ao fundo da placa foram analisados.

O ácido docosahexaenóico foi diluído em dimetilssulfóxido e o ácido araquidônico, em etanol absoluto J.T.Baker®. Os dois foram armazenados a -20°C protegidos da luz em um frasco de vidro previamente autoclavado. Antes do estímulo das células, o estoque de ácidos graxos foi retirado do freezer, vortexado por 60 segundos e levado ao sonicador por 30 segundos.

Viabilidade celular

O reagente MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio brometo) foi utilizado para análise de viabilidade celular. As células foram estimuladas com diferentes concentrações de DHA ou AA e, após o tempo de estímulo, o sobrenadante dos poços foi substituído por uma solução de 10% MTT 5mg/mL diluído no próprio meio de cultura celular. Em seguida, a placa foi incubada por 3h protegida da luz na estufa de cultivo. O sobrenadante foi descartado e os cristais de formazan formados foram diluídos em 100µL de DMSO. A absorbância foi lida a 570nm pelo espectrofotômetro SpectraMax M3 (Molecular Devices, USA).

Análise de apoptose e necrose

Para análise de morte celular por apoptose e necrose, as células foram marcadas com Anexina-V e PI e analisadas em citômetro FACS Calibur (BD Biosciences, USA). Tanto as células aderidas no fundo do poço, quanto aquelas no sobrenadante foram analisadas. Após o tratamento com o ácido graxo, as células foram marcadas com 1,25µL de Anexina e 0,25µL de solução de Iodeto de Propídeo – PI (100 µg/mL) em 25µL de *Binding Buffer*. Em seguida foi feita incubação por 10 minutos protegida da luz e quantificação no citômetro.

Integridade da membrana celular

O Iodeto de Propídeo (PI) foi utilizado para análise da integridade da membrana celular. As células foram estimuladas com diferentes concentrações de DHA ou AA e, após o tempo de estímulo, o sobrenadante dos poços foi centrifugado a 300G por 5 minutos para análise do precipitado. As células desaderidas do poço e o precipitado foram marcados com 0,5µL de solução de PI (100 µg/ml) em 20µL de *Binding Buffer* por 10

minutos protegido da luz. Em seguida, foi feita quantificação por citometria de fluxo em citômetro FACS Verse (BD Biosciences, USA).

Preparação do lisado celular

Depois de estimuladas, as células foram lisadas com solução de Tris 50mM, NaCl 150mM, EDTA 5mM, 1% de Triton X-100 e inibidor de protease 1x por 30 minutos a 4°C. Em seguida elas foram centrifugadas a 17000G por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante com a amostra de proteína foi coletado e armazenado a -80°C. A dosagem de proteínas foi feita pelo método descrito anteriormente (31). Quando necessária, foi feita concentração de proteínas. Para isso, o volume equivalente a 20µg de proteína da amostra foi separado e colocado em solução de acetona: metanol (8:1) na proporção de 1:9 *overnight* a 4°C. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 10000G por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi armazenado a -20°C.

Análise da expressão de proteínas

A análise de expressão da Caspase 1 clivada foi feita por *Western Blot*. As amostras de proteína foram diluídas em tampão (Tris 125mM, 20% de glicerol, 10% de 2-mercaptoetanol, 4% de SDS e 0,004% de azul de bromofenol) e fervidas por 3 minutos antes de serem colocadas no gel de poliacrilamida-SDS. As amostras correram em tampão Tris-Glicina a 100V no gel concentrador e a 150V no gel separador à temperatura ambiente. Em seguida foi feita a transferência da proteína do gel para a membrana de nitrocelulose em sistema *semi-dry* a 10V por 20 minutos à temperatura ambiente. A membrana foi bloqueada por 1 hora sob agitação com solução de TBS (Sigma-Aldrich, USA), 0,05% de Tween20 e 5% de leite desnatado. Após esse período, foi feita lavagem (TBS e 0,05% de Tween20) e incubação *overnight* sob agitação com o anticorpo primário a 4°C. Em seguida, foram feitas mais lavagens e incubação de 2 horas à temperatura ambiente com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase horseradish. A β-actina foi utilizada como um controle interno do experimento para confirmar se houve um carregamento igual de proteína das amostras. Para a revelação, foi utilizado reagente de detecção para *Western Blot* da GE Healthcare Life Sciences (UK).

Análise de caspase 1 ativa e secreção de IL-1β

O reagente FLICA foi utilizado para análise da caspase 1 ativa por citometria de fluxo. A análise foi feita segundo as recomendações do kit. Para dosar a quantidade de

IL-1 β secretada pela célula, foi utilizado o método ELISA. Após o estímulo celular, o sobrenadante dos poços foi guardado a -20°C até a análise por ELISA. No dia do experimento, o anticorpo de captura foi colocado em uma placa de 96 poços e incubado *overnight* a 4°C. Em seguida, foram feitas 3 lavagens com PBS e 0,05% de Tween e bloqueio por 1 hora à temperatura ambiente com *Assay Diluent*. As diferentes amostras de sobrenadante, assim como a solução padrão, foram colocadas nos poços e a placa foi incubada novamente *overnight* a 4°C. Em seguida, os poços foram lavados e foi colocado o anticorpo de detecção para IL-1 β . A placa foi incubada por 1h em temperatura ambiente. Foi feita lavagem, adição da solução de streptavidina e incubação por 30 minutos à temperatura ambiente protegido da luz. Mais lavagens foram realizadas e 50 μ L da solução de substrato foi adicionada por poço. Após 10 minutos, foi colocada a solução de parada e a absorbância foi lida a 450nm pelo espectrofotômetro SpectraMax M3 (Molecular Devices, USA).

Análise de HMGB1 e NF κ B por imunofluorescência

Para verificar a localização das proteínas HMGB1 e NF κ B na célula de câncer foi feita imunomarcagem intracelular e análise por microscopia de fluorescência confocal. Alcançado o tempo de estímulo, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% por 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida foram lavadas por três vezes e permeabilizadas em Triton a 0,2% por 20 minutos em temperatura ambiente. Após novas lavagens, foi adicionada solução de bloqueio (2% de BSA, 5% de SFB e PBS) por 20 minutos à temperatura ambiente. O anticorpo primário foi diluído em solução de bloqueio e incubado *overnight* a 4°C. Após esse período, as células foram lavadas e incubadas com o anticorpo secundário conjugado a Alexa Fluor 488 (1:2000 em PBS) por 1 hora à temperatura ambiente. Foram feitas novas lavagens e, em seguida, incubação com o DAPI (1:5000 em PBS) por 5 minutos à temperatura ambiente. As imagens foram obtidas no microscópio Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, DEU).

Análise estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando programa GraphPad Prism 6.0, GraphPad Software, Inc. Os testes utilizados foram one-way ou two-way ANOVA para comparação de médias, seguido do pós-teste de Turkey. Significância estatística foi assumida com valor de $p \leq 0,05$.

Resultados

Viabilidade celular de MDA-MB-231

Para avaliar se o DHA e o AA possuíam efeito citotóxico em células de câncer de mama triplo-negativo, foi feito ensaio de viabilidade por MTT. A figura 1 mostra que o DHA e o AA diminuíram a viabilidade de MDA-MB-231 na concentração de 200 μ M ($p < 0,05$). Esse efeito não foi tempo nem dose-dependente. Após 24 horas de tratamento, a redução da viabilidade celular por 200 μ M de DHA e AA foi de 52,4% e 38,8% respectivamente. O etanol e o DMSO não alteraram a viabilidade celular de MDA-MB-231 em 24 horas e, por isso, podem ser utilizados como veículos de diluição dos ácidos graxos (Figura Suplementar 1).

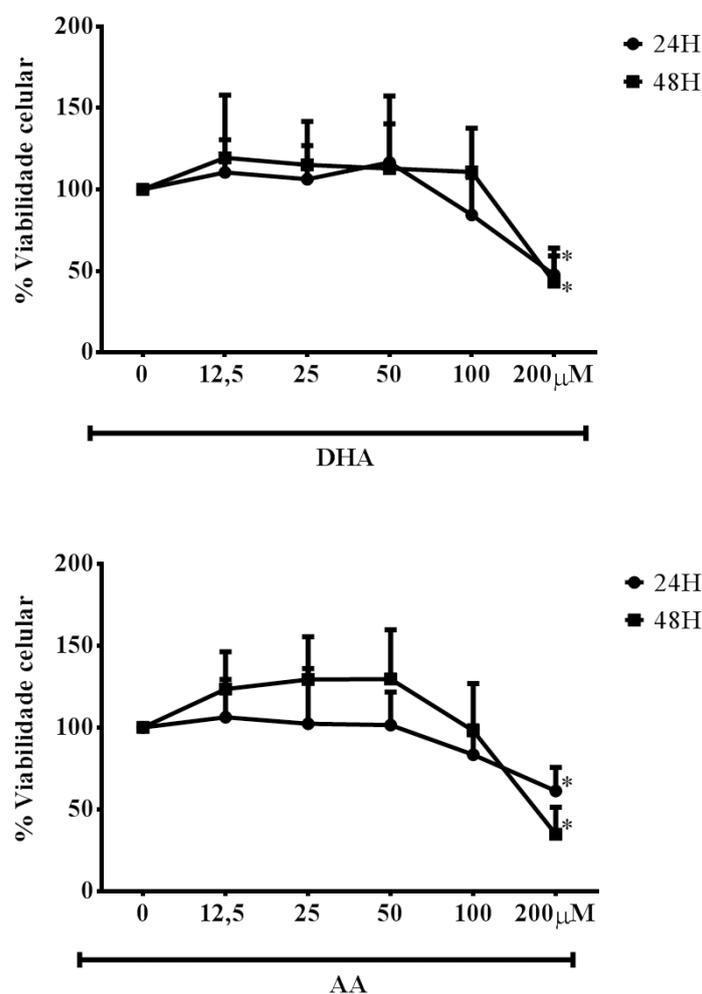


Figura 1 –DHA e AA diminuem a viabilidade celular de MDA-MB-231 em 24 horas. As células foram tratadas com diferentes concentrações de DHA ou AA por 24 e 48 horas e a viabilidade celular foi avaliada por marcação com MTT. Os dados estão apresentados como percentual de viabilidade celular em relação às células não marcadas. Cada ponto representa a média do percentual \pm DP. (n=3) * $p < 0,05$ em relação às células não estimuladas (0 μ M).

Viabilidade celular de monócitos humanos

Com o objetivo de avaliar a sensibilidade de células não tumorais ao efeito citotóxico do DHA e do AA, foi feita análise de viabilidade celular de monócitos humanos após tratamento com esses ácidos graxos. Em 24 horas de estímulo não houve diferença significativa da viabilidade celular. Entretanto, após 48 horas, o número de células viáveis diminuiu significativamente com as maiores concentrações dos ácidos graxos (Figura 2). O AA mostrou-se mais citotóxico pois foi capaz de diminuir a viabilidade das células na dosagem de 100 μ M, efeito não visto no DHA a 100 μ M (Figura 2).

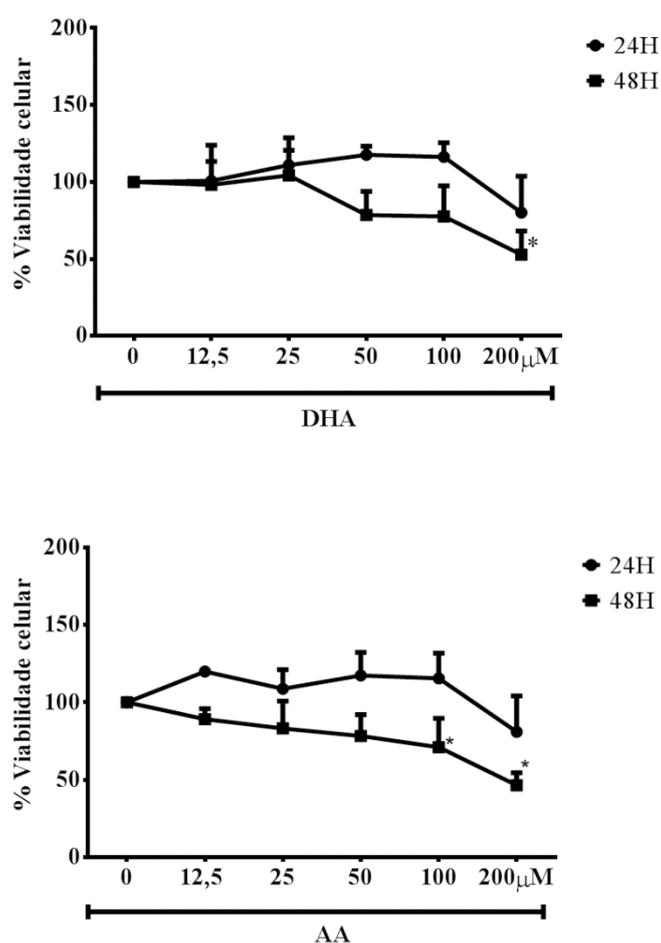


Figura 2 –DHA e AA não afetam a viabilidade celular de monócitos humanos em 24 horas. As células foram tratadas com diferentes concentrações de DHA ou AA por 24 e 48 horas e a viabilidade celular foi avaliada por marcação com MTT. Os dados estão apresentados como percentual de viabilidade celular em relação às células não marcadas. Cada ponto representa a média do percentual \pm DP. (n=2) * $p < 0,05$ em relação às células não estimuladas (0 μ M).

Morte por apoptose e necrose

Para investigar se a diminuição da viabilidade celular induzida pelos ácidos graxos aconteceu por aumento da morte celular, foram feitas análises de apoptose e necrose. A figura 3 mostra que o DHA, a partir de 50 μ M, desencadeia aumento de apoptose e necrose em MDA-MB-231. O AA também aumentou o percentual de morte, porém seu efeito só foi visto com 200 μ M.

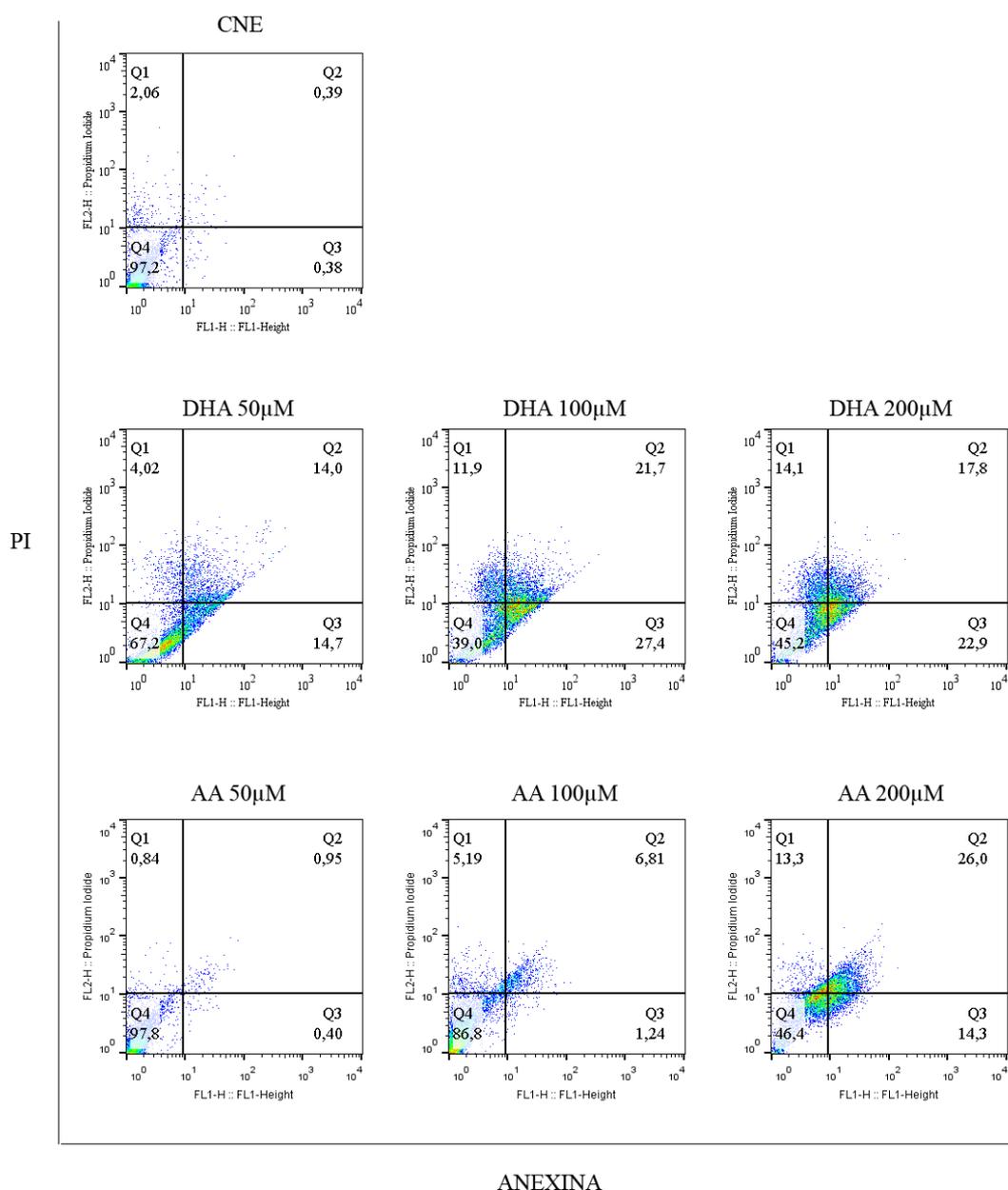


Figura 3 – O DHA induz maior percentual de morte por apoptose e necrose quando comparado ao AA. As células MDA-MB-231 foram tratadas com diferentes concentrações de DHA ou AA por 24 horas e marcadas com Anexina-V e PI. Os dados estão apresentados como percentual de células por quadrante (Q), sendo Q1 correspondente à necrose, Q2 à apoptose tardia, Q3 à apoptose e Q4 às células vivas. Os dados são representativos de dois experimentos.

Na concentração de 100 μ M de DHA, o percentual de morte aumentou aproximadamente 20 vezes quando comparado ao controle e 4 vezes quando comparado ao AA na mesma concentração.

Perda da integridade da membrana

Visto que o DHA foi capaz de induzir aumento de morte por necrose, a perda da integridade da membrana foi avaliada após estímulo com os ácidos graxos. Após 6 horas de tratamento, não houve alteração dessa integridade (dado não mostrado). A figura 4 mostra que, após 24 horas, o DHA foi capaz de aumentar a perda da integridade da membrana a partir de 50 μ M. Já o AA só apresentou esse efeito em uma concentração quatro vezes maior (200 μ M) que o DHA. Os veículos em que os ácidos graxos estavam diluídos não alteraram esse aspecto (Figura Suplementar 3).

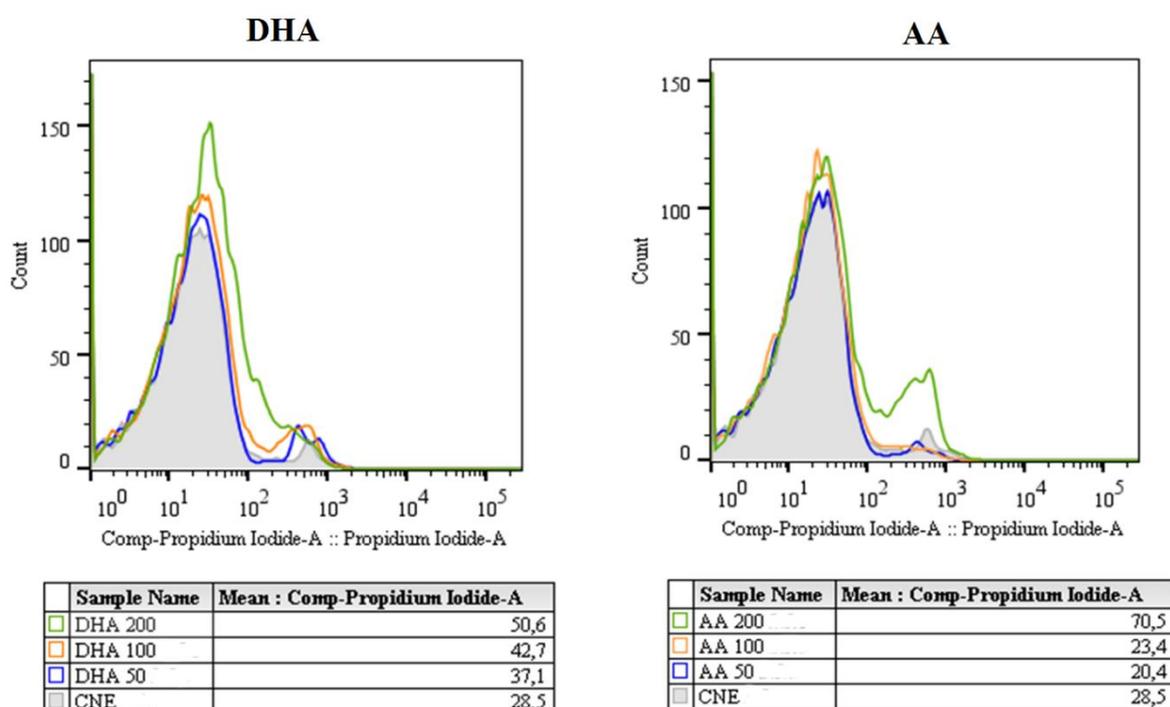


Figura 4 –DHA induz perda da integridade da membrana de MDA-MB-231. As células foram estimuladas nas concentrações indicadas de DHA (A) ou AA (B) 24 horas e a integridade da membrana celular foi avaliada por marcação com Iodeto de propídeo. A média da intensidade de fluorescência está indicada ao lado de cada estímulo. Os histogramas são representativos de dois experimentos. Os histogramas são equivalentes à análise da população total de células.

Translocação de NFkB

O DHA e o AA não foram capazes de induzir a translocação de NFkB para o núcleo em células MDA-MB-231 após 18 horas de tratamento (Figuras 5 e 6).

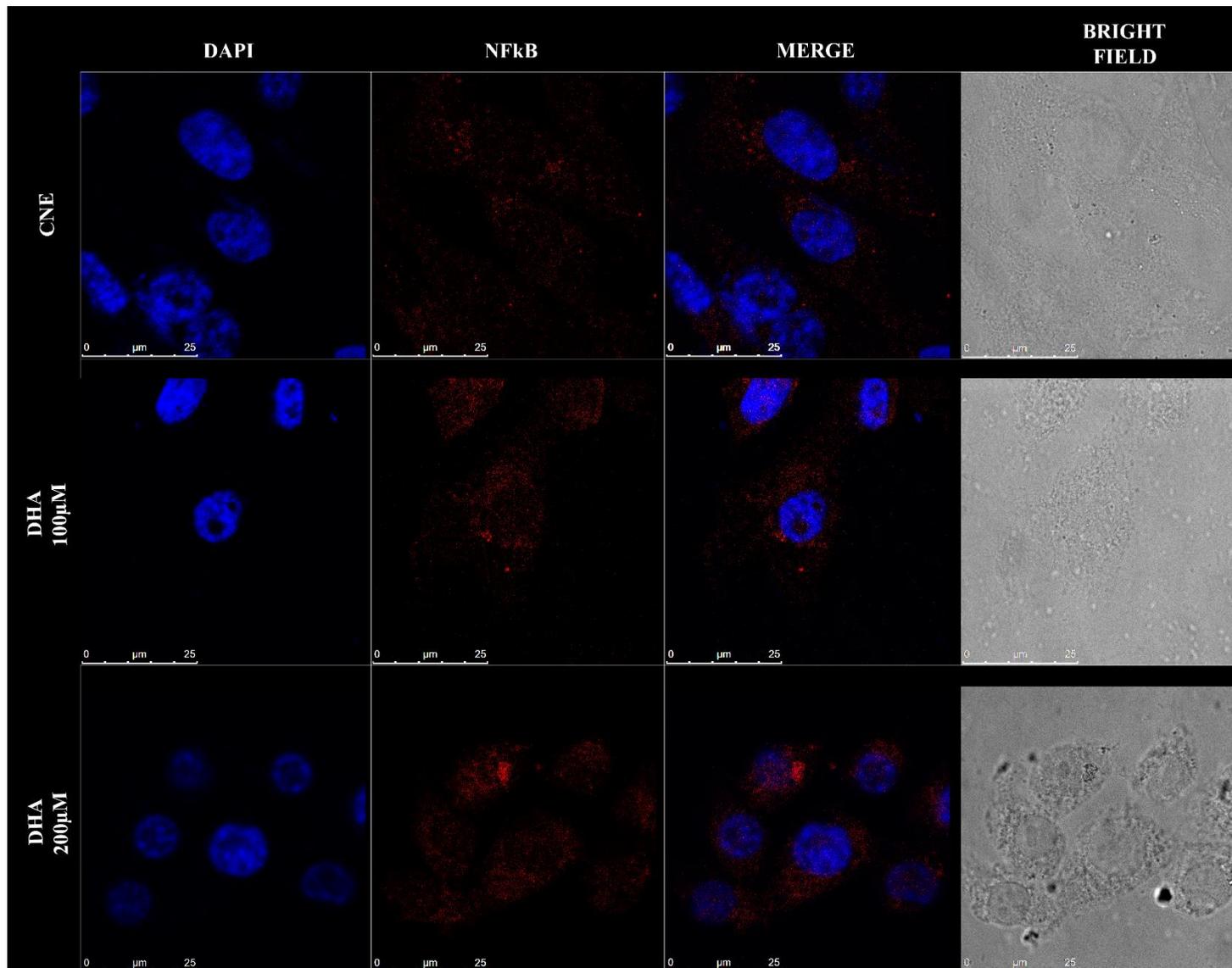


Figura 5 –DHA não induz a translocação de NFkB. As células foram estimuladas nas concentrações indicadas de DHA por 18 horas e, em seguida, foi feita imunomarcção e análise por microscopia confocal. O núcleo está corado em azul e o NFkB, em vermelho.

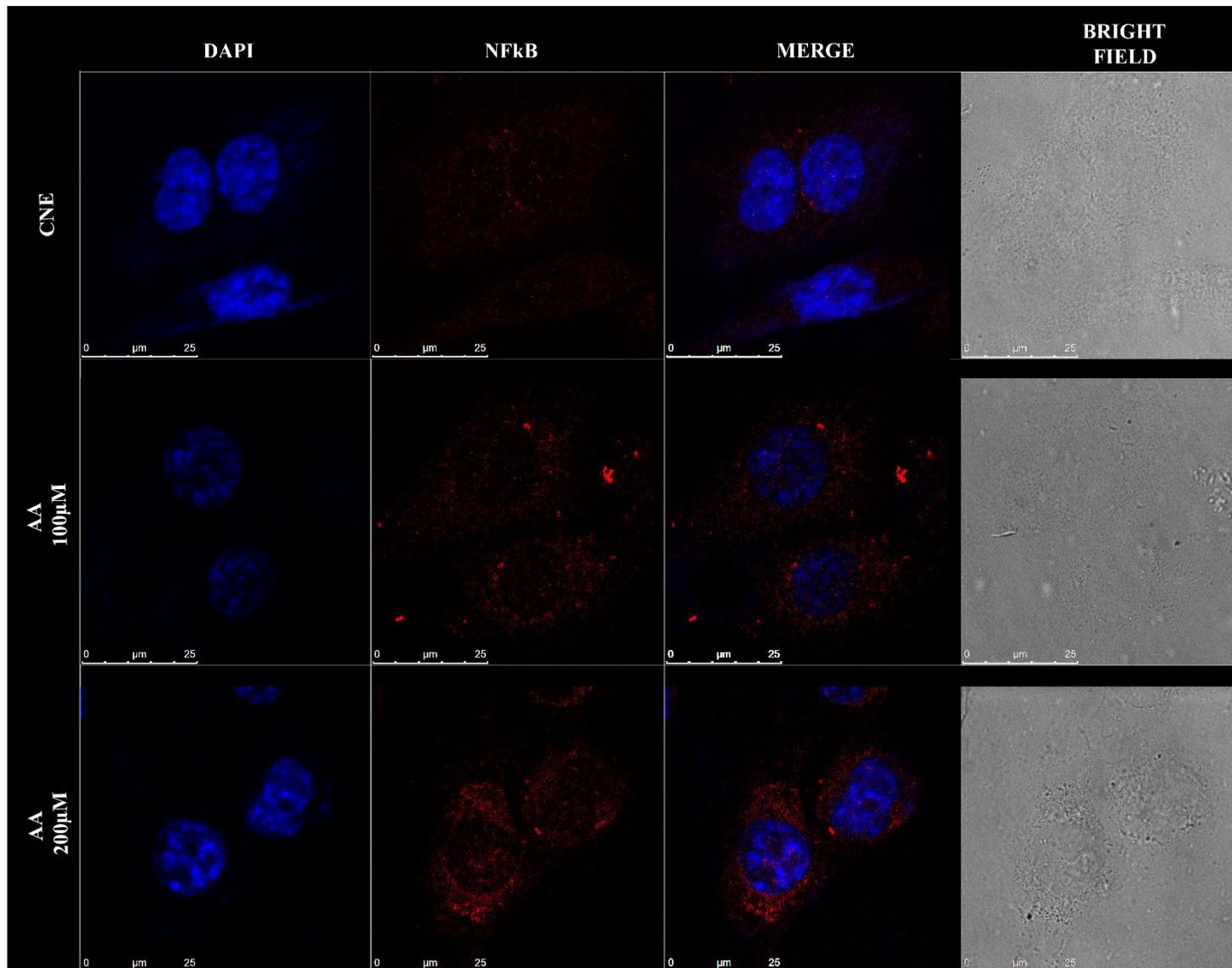


Figura 6 – AA não induz a translocação de NFkB. As células foram estimuladas nas concentrações indicadas de AA por 18 horas e, em seguida, foi feita imunomarcagem e análise por microscopia confocal. O núcleo está corado em azul e o NFkB, em vermelho.

Ativação de caspase 1

Tanto o DHA quanto o AA aumentaram os níveis de caspase-1 ativa (Figura 7) após 6 horas de tratamento, sendo que esse aumento foi significativo para as concentrações de 100 e 200 μ M de DHA e apenas na concentração de 200 μ M de AA.

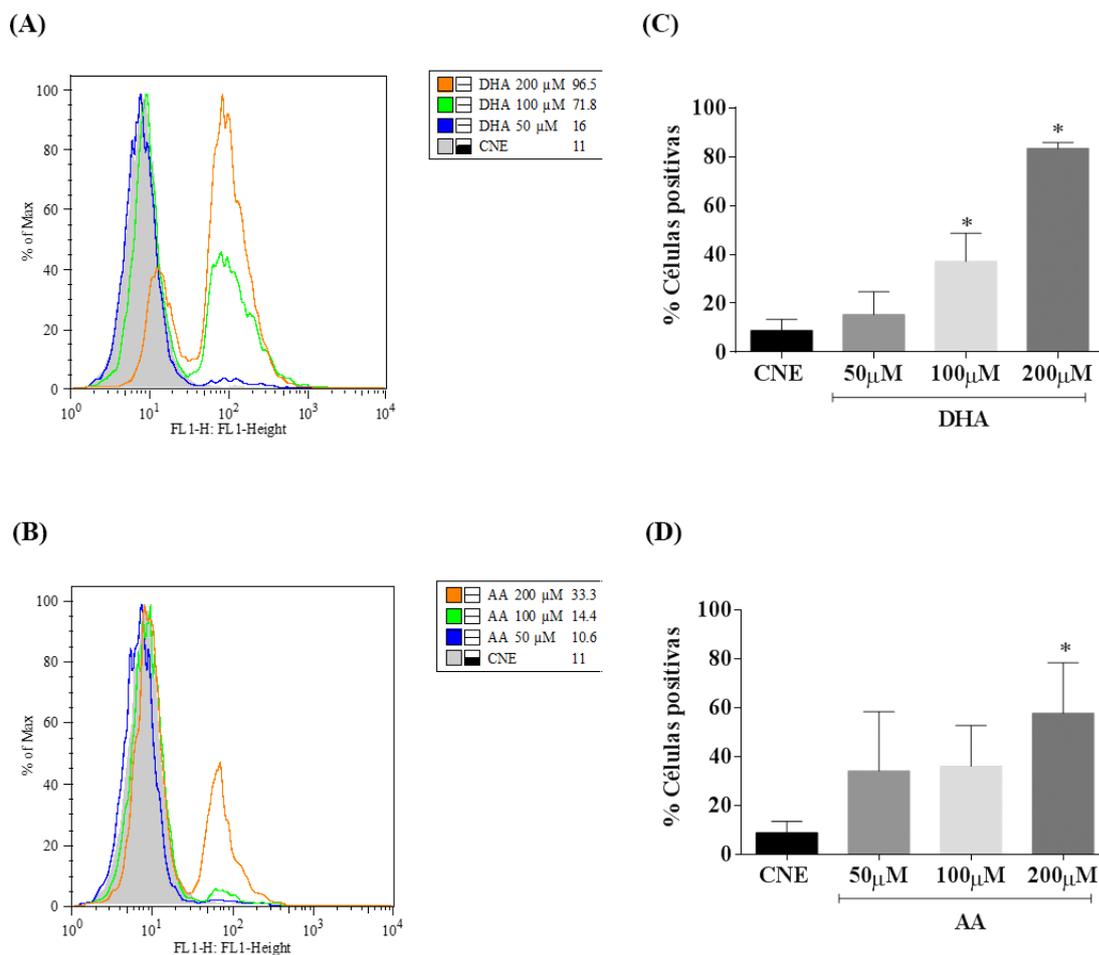


Figura 7 –DHA ativa a caspase-1 em MDA-MB-231. As células foram estimuladas nas concentrações indicadas de DHA (A) ou AA (B) por 6 horas e a quantidade de caspase-1 ativa foi avaliada por marcação com FLICA. A média da intensidade de fluorescência está indicada ao lado de cada estímulo. Os histogramas são representativos de dois experimentos. Os histogramas são equivalentes à análise de células vivas. Foi feita análise do percentual de células positivas para o FLICA após estímulo com DHA (C) ou AA (D). Cada barra representa a média do percentual \pm DP. CNE: Controle de células não estimuladas com ácido graxo. * $p < 0,05$ em relação ao CNE.

Clivagem de caspase 1

Análise da caspase 1 clivada foi feita por *Western Blot*. A figura 8 mostra maior expressão da caspase 1 clivada após tratamento com DHA por 12 horas.

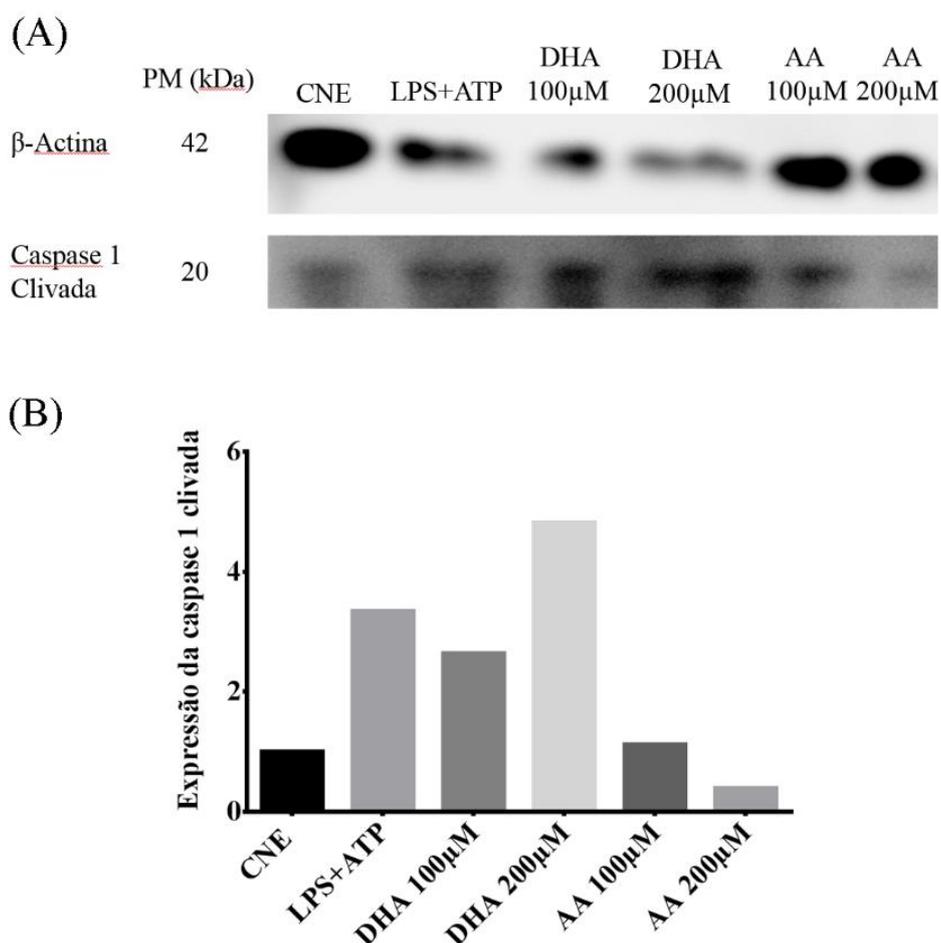


Figura 8 – Efeito do DHA e do AA na expressão de caspase-1 clivada em MDA-MB-231. As células foram estimuladas nas concentrações indicadas de DHA ou AA por 12 horas e a quantidade de caspase-1 clivada foi avaliada por *Western Blot* (A). A intensidade das bandas foi normalizada de acordo com a β -actina. O gráfico (B) mostra o nível de expressão da caspase 1 clivada em unidades arbitrárias. CNE: Controle de células não estimuladas com ácido graxo. Lipopolissacarídeo (LPS) e ATP foram utilizados como controle da ativação do inflamassoma.

Secreção de IL-1 β

A caspase 1 ativa é responsável pela ativação e secreção de IL-1 β sendo esse evento necessário para desencadear a morte por piroptose (27, 32). O tratamento com DHA e AA por 6 horas não induziu secreção da IL-1 β . Já com 18 horas de tratamento, apenas o DHA, em todas as concentrações testadas, foi capaz de aumentar significativamente a secreção de IL-1 β .

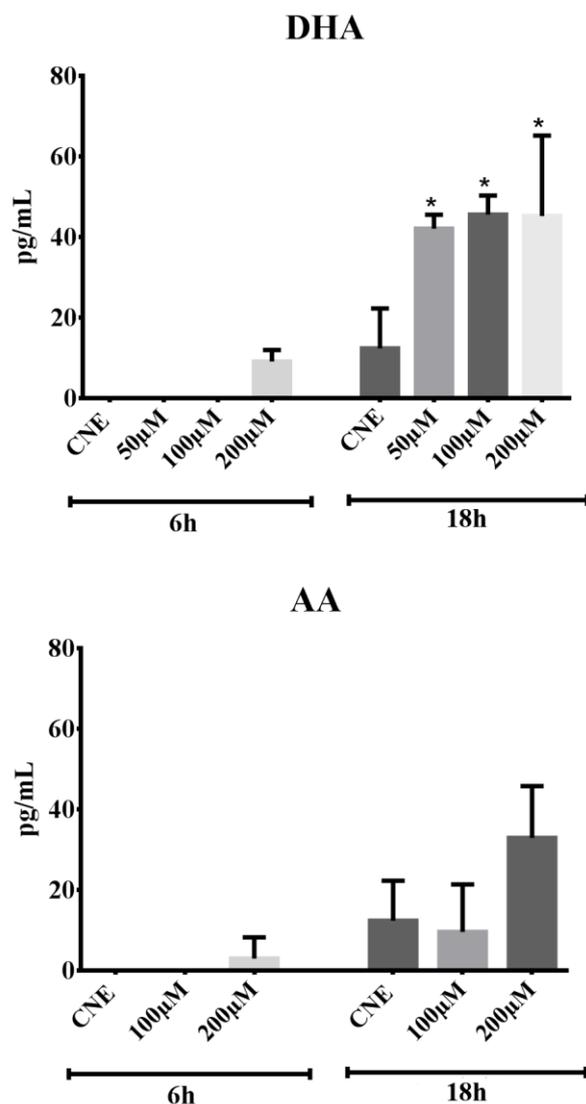


Figura 9 – DHA aumenta a secreção de IL-1 β por MDA-MB-231. As células foram estimuladas nas concentrações indicadas de DHA ou AA por 6 ou 18 horas e a secreção da citocina foi avaliada por ELISA. Os dados estão apresentados em pg/mL de IL-1 β no sobrenadante celular. Cada barra representa a média da concentração \pm DP. Os dados são de um experimento em triplicata. CNE: Controle de células não estimuladas com ácido graxo. * $p < 0,05$ em relação ao CNE de 18 horas de tratamento.

Secreção de HMGB1

O tratamento com DHA induziu translocação de HMGB1 do núcleo para o citoplasma (Figura 10) nas concentrações de 100 e 200 μ M. O mesmo efeito foi visto com o AA, porém, apenas na concentração de 200 μ M (Figura 11).

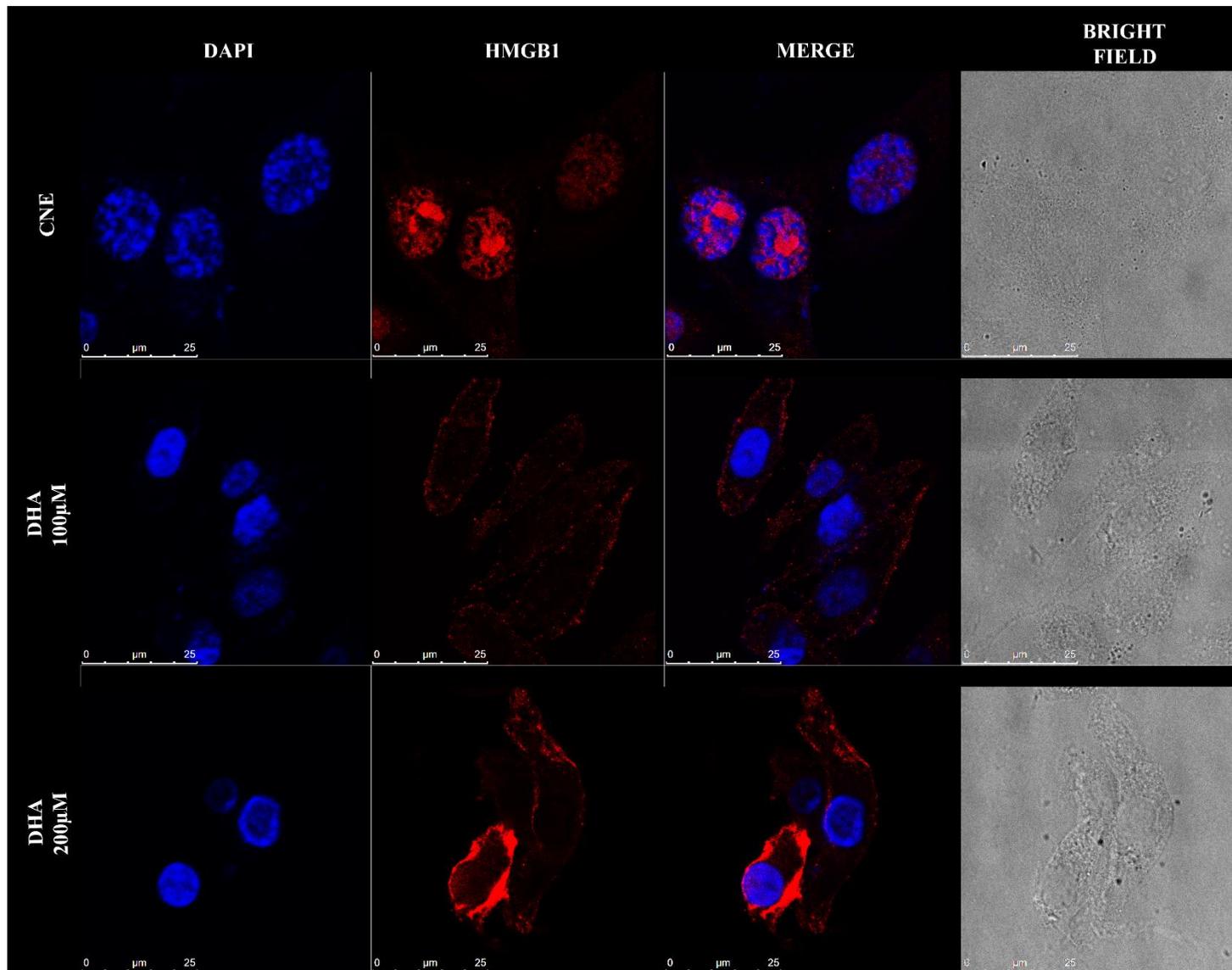


Figura 10 – DHA induz a translocação de HMGB1. As células foram estimuladas nas concentrações indicadas de DHA por 18 horas e, em seguida, foi feita imunomarcção e análise por microscopia confocal. O núcleo está corado em azul e a HMGB1, em vermelho.

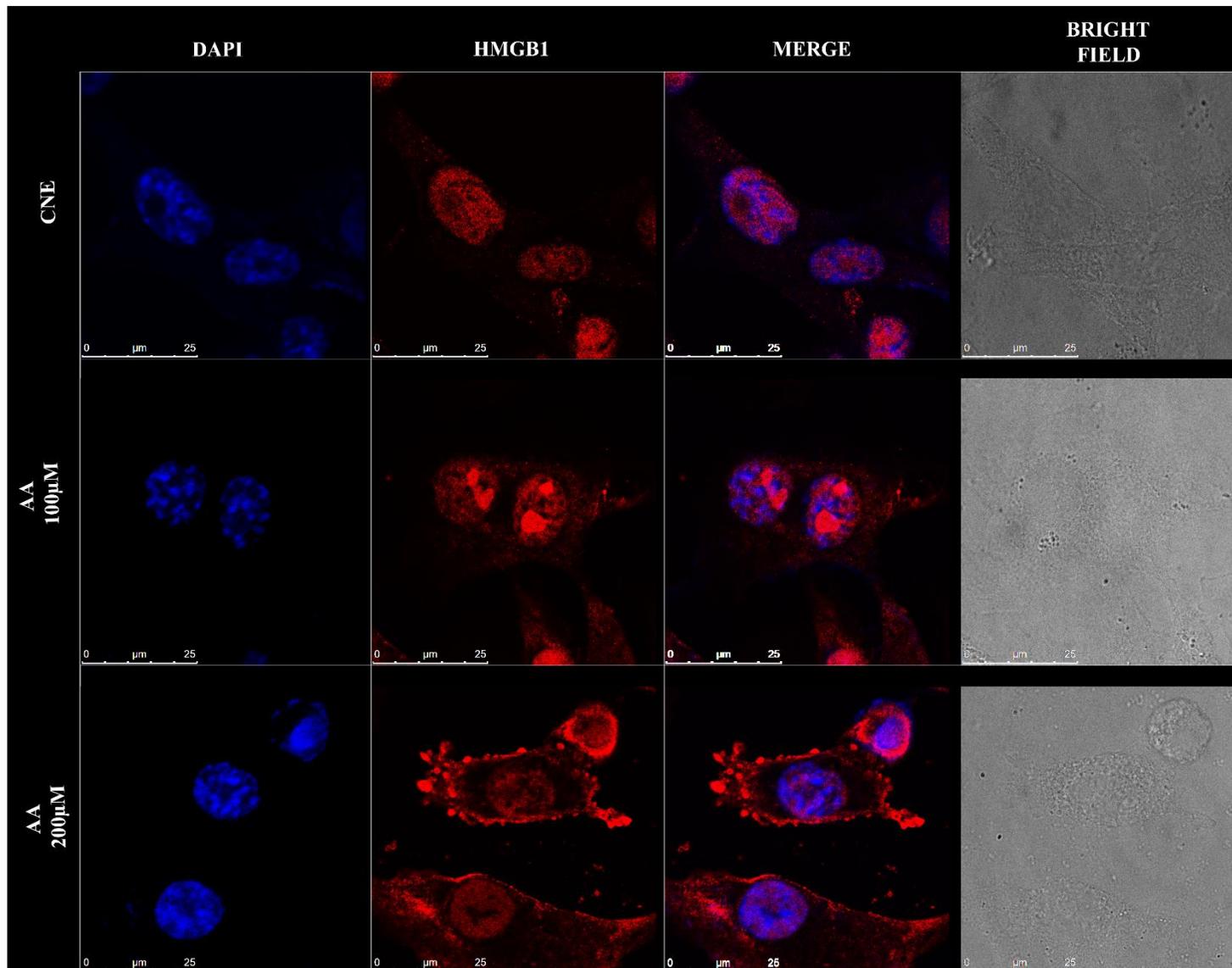


Figura 11 – AA induz translocação de HMGB1. As células foram estimuladas nas concentrações indicadas de AA por 18 horas e, em seguida, foi feita imunomarcagem e análise por microscopia confocal. O núcleo está corado em azul e a HMGB1, em vermelho.

Discussão

Considerando o nosso conhecimento, esta é a primeira vez em que é mostrado que na presença de DHA ocorre o aumento da secreção de IL-1 β , a ativação e clivagem de caspase 1, a perda da integridade da membrana celular e a translocação do HMGB1 em células de câncer de mama triplo-negativo. Diversas pesquisas já mostraram o efeito antitumoral *in vitro* e *in vivo* desse ácido graxo, porém, nenhuma delas avaliou a indução dos marcadores citados no presente estudo. (4, 33-35).

O efeito citotóxico do DHA e do AA foi avaliado sobre células de câncer de mama triplo-negativo e foi verificado que os dois diminuíram significativamente a viabilidade dessas células a 200 μ M. Entretanto, visto que o AA não possui ação antitumoral (6) e ainda assim diminuiu a viabilidade celular, sugere-se que esse efeito tenha sido devido à alta concentração de ácido graxo no meio de cultura. O AA pode ter um efeito tóxico e levar à morte celular se estiver acumulado no citoplasma celular em sua forma não esterificada (36).

Mansara e colaboradores (37) relataram que o DHA só foi capaz de diminuir a viabilidade de MDA-MB-231 a partir de 280 μ M, uma concentração maior do que a verificada em nossos dados. Já Blanckaert e colaboradores (38) verificaram efeito citotóxico desse ácido graxo com apenas 100 μ M na mesma linhagem celular.

No tratamento do câncer, é interessante que os agentes terapêuticos utilizados tenham efeito citotóxico específico para as células tumorais, não afetando a viabilidade das células saudáveis. A concentração de 200 μ M de DHA, que reduziu em 50% a viabilidade de MDA-MB-231, não afetou a viabilidade de monócitos humanos em 24 horas, mostrando que essa dosagem foi citotóxica apenas para as células tumorais. Outras pesquisas confirmaram esta ação com a MCF-10, uma linhagem de células não tumorais da mama (37, 39).

A diminuição da viabilidade pode ocorrer por diminuição da proliferação e/ou aumento da morte celular (40). Foi verificado que o DHA a partir 50 μ M induz aumento de morte tanto por apoptose quanto por necrose. Estudos anteriores também mostraram que o DHA aumenta a morte por apoptose devido à maior ativação das caspases 3, 8 e 9, ao aumento da condensação nuclear, à clivagem de poli(ADP-ribose)polimerase e à externalização de fosfatidilserina em MDA-MB-231 (3-5, 28).

Xiong e colaboradores (4) e Lee e colaboradores (5) observaram maior percentual de morte via apoptose induzido pelo DHA em MDA-MB-231, entretanto, eles consideraram

as células duplamente positivas para Anexina-V e PI como células apoptóticas, o que não foi feito no presente estudo. Nossos dados mostram que o DHA leva à um maior percentual de morte em células de câncer de mama quando comparado à mesma concentração de AA.

Além da apoptose, o DHA levou ao aumento de necrose, indicando que outros mecanismos de morte também podem estar envolvidas no efeito antitumoral *in vitro* desse ácido graxo. A necrose mostra que a célula já morreu e atingiu o equilíbrio com o ambiente, mas não indica o mecanismo pelo qual isso aconteceu (41). Uma possibilidade é a morte por piroptose visto que ela é caracterizada pelo rompimento da membrana e pela liberação dos componentes intracelulares (17).

O DHA a 50 e a 100 μ M levou à perda da integridade da membrana de MDA-MB-231 após 24 horas de estímulo. Visto que esse é o evento final da piroptose, e que em 6 horas de tratamento não houve alteração da integridade, sugere-se que o desencadeamento da morte através da ativação do inflamassoma se inicie antes de 24 horas.

O inflamassoma pode levar à morte por piroptose por um mecanismo ainda desconhecido (42). Sabe-se que os inflamassomas canônicos recrutam a pró-caspase 1 levando à sua ativação, e que essa enzima ativa citocinas pró-inflamatórias e pode induzir a morte celular (43). As caspases humanas 4 e 5 são homólogas à caspase murina 11 e podem ser ativadas por inflamassoma não-canônico e levar à piroptose (44).

O inflamassoma canônico formado por NLRP3, ASC e pró-caspase 1 é o melhor descrito até o momento (23). A translocação de NF κ B para o núcleo é importante para a ativação desse inflamassoma porque esse fator é responsável pela transcrição dos genes de pró-IL-1 β e NLRP3 (24). No presente estudo não foi verificada a translocação dessa proteína após estímulo com DHA por 18 horas. Pesquisas mostram que o DHA e o EPA diminuem significativamente a ligação de NF κ B ao DNA em células MDA-MB-231 (45,46), corroborando com os nossos achados. Além disso, Horia e colaboradores (47) mostraram que o DHA é capaz de diminuir a expressão gênica de NF κ B em MDA-MB-231.

Diversos inflamassomas estão envolvidos na ativação de caspase 1, entre eles o NLRP3, o NLRP1 e o AIM2 (23). O DHA foi capaz de aumentar a caspase 1 ativa na concentração de 100 μ M após 6 horas de estímulo ($p < 0,05$). Apesar do DHA e do AA terem levado à perda da integridade da membrana celular e à ativação de caspase na concentração de 200 μ M, esse efeito pode ser resultado de uma alta concentração utilizada.

Snodgrass e colaboradores (48) mostraram que monócitos humanos privados de soro fetal bovino tiveram maior expressão de caspase 1 ativa após estímulo com baixas concentrações de DHA. Esse dado mostra o mesmo padrão de resposta encontrado na MDA-MB-231, porém, em menor dosagem. Até o momento, a literatura ainda não havia mostrado a maior expressão de caspase 1 ativa induzida pelo DHA em células de câncer de mama.

Depois de ativada, a caspase 1 age sobre a pró-IL-1 β , ativando-a e induzindo a sua secreção (20). Como esperado, o DHA a 100 μ M induziu aumento significativo da secreção dessa citocina em um tempo posterior (18 horas) à ativação da caspase (6 horas). Um achado interessante é que a concentração de 50 μ M de DHA foi capaz de aumentar a secreção de IL-1 β sem a ativação prévia de caspase-1. Assim, sugere-se que outras caspases também possam estar envolvidas na secreção desta citocina induzida. Estudos já mostraram que a interação entre as caspase 1 e 5 (20) e entre as caspases 1 e 4 levam à maior ativação da pró- IL-1 β (49).

O fato de que o DHA levou à ativação de caspase 1 e à secreção de IL-1 β , mas não induziu a translocação de NF κ B para o núcleo sugere que o inflamassoma ativado por esse ácido graxo pode não ter sido o NLRP3.

Nossos dados indicam que o desencadeamento da piroptose pelo DHA a 100 μ M inicia-se a partir de 6 horas de tratamento e estende-se até 24 horas. A ativação da caspase 1 já foi visível em 6 horas de estímulo e a secreção de IL-1 β , em 18 horas. Já a perda da integridade da membrana ocorreu no tempo de 24 horas.

A secreção de HMGB1 ocorre após a ativação da caspase 1 por diferentes inflamassomas (28) e a translocação dessa proteína do núcleo para o citoplasma é um evento necessário para a sua posterior secreção em células imunológicas (28, 50). Nossos dados mostraram que o DHA a 100 μ M induziu a translocação de HMGB1 após 18 horas de estímulo e, em maior concentração, ela mostrou-se acumulada próxima à membrana celular de MDA-MB-231. Ainda não há dados na literatura que corroborem este resultado. Assim, este acúmulo pode representar o processo de secreção da HMGB1, sendo necessários outros experimentos para confirmar esse dado.

Inicialmente, pensava-se que as células apoptóticas não secretavam HMGB1 (51), mas um estudo recente mostrou que essa proteína é secretada pelas células em apoptose tardia (52). Assim, a translocação de HMGB1 induzida pelo DHA pode ter ocorrido pela indução de piroptose e pelo aumento da apoptose tardia.

Nossos dados mostram que, na presença de DHA, ocorre maior aumento de morte celular quando comparado ao AA e que a ação *in vitro* do DHA no câncer de mama envolve a ativação das vias de morte por apoptose e piroptose. Sugere-se que o mecanismo pelo qual o DHA modula a ativação da piroptose não envolva os mediadores lipídicos anti-inflamatórios ou a modulação de genes envolvidos da inflamação. A via mais indicada seria através da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e/ou estresse do retículo endoplasmático (ERE) visto que eles medeiam a ação antitumoral *in vitro* do DHA pela indução de um outro tipo de morte, a apoptose (4, 34).

Em macrófagos, o DHA diminui a ativação do inflamassoma induzida por LPS/ATP através da menor translocação de NFκB, menor ativação de caspase 1 e menor secreção de citocinas pró-inflamatórias (29, 30). No câncer, um único estudo mostrou que o DHA inibiu a ativação do inflamassoma induzida por palmitato em células de carcinoma hepatocelular (53). A ativação do inflamassoma NLRP3 se dá por diversas moléculas derivadas de patógenos ou do próprio hospedeiro, enquanto que o NLRP1b, o NLRC4 e o AIM2 são ativados por componentes bacterianos ou virais. Outras vias de ativação ainda estão sendo estudadas, assim como novos inflamassomas (43).

Estudos recentes mostram que os ácidos graxos saturados também são capazes de ativar esse complexo multiproteico. O ácido graxo saturado palmítico leva à heterodimerização dos receptores do tipo *Toll* 1 e 2 e consequente expressão de pró-IL-1β que é clivada e secretada por monócitos, e ainda aumenta a expressão de NLRP3 contribuindo para a ativação dessa citocina (48). Outro estudo mostrou que o palmitato atua como um segundo sinal na ativação do NLRP3 em macrófagos através da geração de ROS mitocondrial (54). Os monócitos possuem caspase 1 ativa constitutivamente e o primeiro sinal é suficiente para a ativação das citocinas pró-inflamatórias, já os macrófagos necessitam de dois sinais para a ativação do inflamassoma (55)

O palmitato é capaz de ativar o inflamassoma NLRC4 em células de carcinoma hepatocelular e a diminuição da expressão dessa proteína não anula a secreção de IL-1β induzida pelo ácido graxo. Isso mostra que outros inflamassomas também são ativados pelo palmitato na célula tumoral (53).

Visto que o ácido graxo poli-insaturado DHA difere do palmitato e não induz a dimerização de receptores do tipo *Toll* (48) e que o seu efeito antitumoral *in vitro* ocorre por meio de ROS e ERE (4, 34), sugere-se que a ativação do inflamassoma por esse ácido graxo também envolva a indução de ROS e/ou do ERE. O tratamento com DHA induz o ERE em células MDA-MB-231 (4) e esse estresse ativa o inflamassoma NLRP3 em

macrófagos (56, 57) e hepatócitos (58). O DHA também aumenta a quantidade de ROS em células de câncer de mama (4, 34) e estudos sugerem que as espécies reativas de oxigênio estejam envolvidas na ativação do inflamassoma, sendo que os resultados ainda são controversos (59).

Mais estudos são necessários para mostrar o mecanismo pelo qual o DHA aumenta a ativação do inflamassoma em células MDA-MB-231, qual complexo está sendo ativado, quais caspases estão envolvidas e como a ativação desse complexo leva à morte.

Os nossos dados indicam que o DHA leva à morte por piroptose nas células MDA-MB-23. A maior perda da integridade da membrana, a ativação da caspase 1, a secreção de IL-1 β e a translocação de HMGB1 para o citoplasma foram indicadores desse tipo de morte. É sabido que estes marcadores também participam da sinalização de outras vias de morte (12, 60), por isso, mais estudos são necessários para demonstrar as ações do DHA na piroptose. O ácido graxo DHA ainda levou a um maior percentual de morte por apoptose quando comparado ao AA. Os principais achados do estudo estão esquematizados na figura 12.

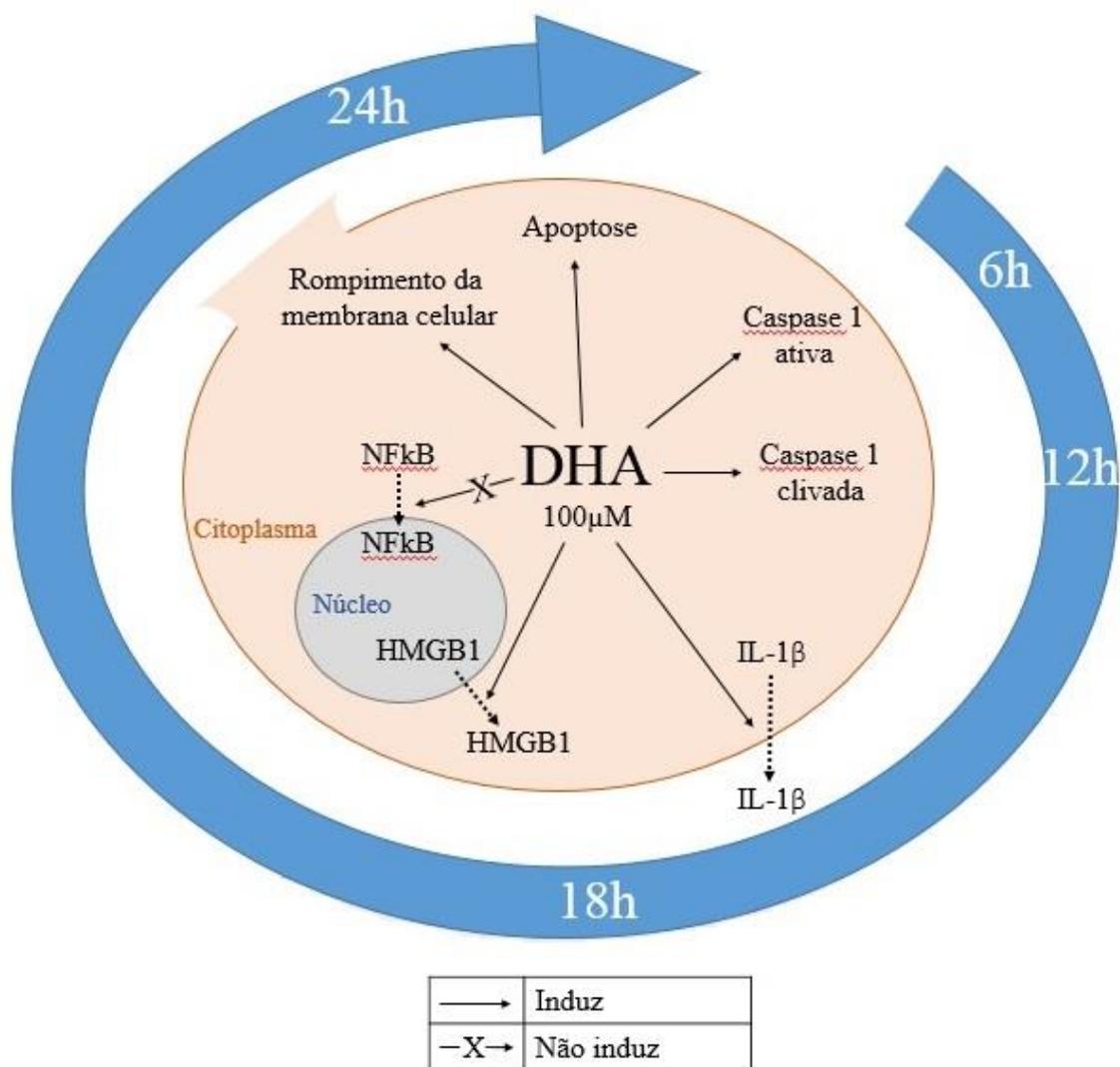


Figura 12 – Ação do DHA em células de câncer de mama triplo-negativo MDA-MB-231. O DHA a 100µM induz aumento da morte por apoptose e piroptose em MDA-MB-231. A piroptose foi avaliada pela ativação da caspase 1 em 6 horas, clivagem dessa enzima em 12 horas, maior secreção de IL-1β e translocação de HMGB1 para o citoplasma em 18 horas e rompimento da membrana celular em 24 horas. O DHA não foi capaz de induzir a translocação de NFκB em 18 horas.

Referências

1. Chen Z, Zhang Y, Jia C, Wang Y, Lai P, et al.: mTORC1/2 targeted by n-3 polyunsaturated fatty acids in the prevention of mammary tumorigenesis and tumor progression. *Oncogene* **33**, 4548-4557, 2014.
2. Cao W, Ma Z, Rasenick MM, Yeh S, Yu J. N-3 poly-unsaturated fatty acids shift estrogen signaling to inhibit human breast cancer cell growth. *PLoS One* **7**, 2012.
3. Corsetto PA, Montorfano G, Zava S, Jovenitti IE, Cremona A, et al.: Effects of n-3 PUFAs on breast cancer cells through their incorporation in plasma membrane. *Lipids Health Dis* **10**, 2011.
4. Xiong A, Yu W, Tiwary R, Sanders BG, Kline K. Distinct roles of different forms of vitamin E in DHA-induced apoptosis in triple-negative breast cancer cells. *Mol Nutr Food Res* **56**, 923-34, 2012.
5. Lee EJ, Yun UJ, Koo KH, Sung JY, Shim J, et al.: Down-regulation of lipid raft-associated onco-proteins via cholesterol-dependent lipid raft internalization in docosahexaenoic acid-induced apoptosis. *Biochim Biophys Acta* **1841**, 190-203, 2014.
6. Xu Y, Qian SY. Anti-cancer activities of ω -6 polyunsaturated fatty acids. *Biomed J* **37**, 112-9, 2014.
7. Li Y, Zhao H, Wang Y, Zheng H, Yu W, et al. Isoliquiritigenin induces growth inhibition and apoptosis through downregulating arachidonic acid metabolic network and the deactivation of PI3K/Akt in human breast cancer. *Toxicol Appl Pharmacol* **272**, 37-48, 2013.
8. Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 621-32, 2010.
9. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674, 2011.
10. Degtarev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, et al.: Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol* **1**, 112-9, 2005.
11. Brennan MA, Cookson BT. Salmonella induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis. *Mol Microbiol* **38**, 31-40, 2000.
12. Willingham SB, Bergstralh DT, O'Connor W, Morrison AC, Taxman DJ, et al.: Microbial Pathogen-Induced Necrotic Cell Death Mediated by the Inflammasome

- Components CIAS1/Cryopyrin/NLRP3 and ASC. *Cell Host Microbe* **2**, 147-159, 2007.
13. Hersh D, Monack DM, Smith MR, Ghori N, Falkow S, et al.: The Salmonella invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2396-401, 1999.
 14. Alfonso-Loeches S, Ureña-Peralta JR, Morillo-Bargues MJ, Oliver-De La Cruz J, Guerri C. Role of mitochondria ROS generation in ethanol-induced NLRP3 inflammasome activation and cell death in astroglial cells. *Front Cell Neurosci* **8**, 2014.
 15. Wree A, Eguchi A, McGeough MD, Pena CA, Johnson CD, et al.: NLRP3 inflammasome activation results in hepatocyte pyroptosis, liver inflammation and fibrosis. *Hepatology* **59**, 898-910, 2014.
 16. Lin J, Shou X, Mao X, Dong J, Mohabeer N, et al.: Oxidized Low Density Lipoprotein Induced Caspase-1 Mediated Pyroptotic Cell Death in Macrophages: Implication in Lesion Instability? *PLoS One* **8**, 2013.
 17. Kepp O, Galluzzi L, Zitvogel L, Kroemer G. Pyroptosis - a cell death modality of its kind? *Eur J Immunol* **40**, 627-30, 2010.
 18. Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol* **7**, 99-109, 2009.
 19. Blander JM. A long-awaited merger of the pathways mediating host defence and programmed cell death. *Nat Rev Immunol* **14**, 601-18, 2014.
 20. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* **10**, 417-26, 2002.
 21. Fernandes-Alnemri T, Wu J, Yu JW, Datta P, Miller B, et al.: The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. *Cell Death Differ* **14**, 1590-604, 2007.
 22. Guo H, Callaway JB, Ting JP. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med* **21**, 677-87, 2015.
 23. Schroder K, Tschopp J. The Inflammasomes, *Cell* **140**, 821-832, 2010.
 24. Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, et al.: Cutting Edge: NF- κ B Activating Pattern Recognition and Cytokine Receptors License NLRP3 Inflammasome Activation by Regulating NLRP3 Expression. *J Immunol* **183**, 787-91, 2009.

25. Tschopp J, Schroder K. NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nat Rev Immunol* **10**, 210-5, 2010.
26. Keyel PA. How is inflammation initiated? Individual influences of IL-1, IL-18 and HMGB1. *Cytokine* **69**, 136-45, 2014.
27. Keller M, Rüegg A, Werner S, Beer HD. Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell* **132**, 818-31, 2008.
28. Lamkanfi M, Sarkar A, Vande Walle L, Vitari AC, Amer AO, et al. Inflammasome-dependent release of the alarmin HMGB1 in endotoxemia. *J Immunol* **185**, 4385-92, 2010.
29. Williams-Bey Y, Boularan C, Vural A, Huang N, Hwan I, et al.: Omega-3 Free Fatty Acids Suppress Macrophage Inflammasome Activation by Inhibiting NF-kB Activation and Enhancing Autophagy. *PLoS One* **9**, 2014.
30. Yan Y, Jiang W, Spinetti T, Tardivel A, Castillo R, et al.: Omega-3 fatty acids prevent inflammation and metabolic disorder through inhibition of NLRP3 inflammasome activation. *Immunity* **38**, 1154-63, 2013.
31. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54, 1976.
32. Brough D, Rothwell NJ. Caspase-1-dependent processing of pro-interleukin-1beta is cytosolic and precedes cell death. *J Cell Sci* **120**, 772-81, 2007.
33. Shin S, Jing K, Jeong S, Kim N, Song K, et al.: The Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid DHA Induces Simultaneous Apoptosis and Autophagy via Mitochondrial ROS-Mediated Akt-mTOR Signaling in Prostate Cancer Cells Expressing Mutant p53. *Biomed Res Int* **2013**, 2013.
34. Kang KS, Wang P, Yamabe N, Fukui M, Jay T, et al.: Docosahexaenoic Acid Induces Apoptosis in MCF-7 Cells In Vitro and In Vivo via Reactive Oxygen Species Formation and Caspase 8 Activation. *PLoS One* **5**, 2010.
35. Kim N, Jeong S, Jing K, Shin S, Kim S, et al.: Docosahexaenoic Acid Induces Cell Death in Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells by Repressing mTOR via AMPK Activation and PI3K/Akt Inhibition. *Biomed Res Int* **2015**, 2015.
36. Zajdel A, Wilczok A, Chodurek E, Gruchlik A, Dzierzewicz Z. Polyunsaturated fatty acids inhibit melanoma cell growth in vitro. *Acta Pol Pharm* **70**, 365-9, 2013.
37. Mansara PP, Deshpande RA, Vaidya MM, Kaul-Ghanekar R. Differential Ratios of Omega Fatty Acids (AA/EPA+DHA) Modulate Growth, Lipid Peroxidation and

- Expression of Tumor Regulatory MARBPs in Breast Cancer Cell Lines MCF7 and MDA-MB-231. *Plos ONE* **10**, 2015.
38. Blanckaert V, Ulmann L, Mimouni V, Antol J, Brancquart L, et al.: Docosahexaenoic acid intake decreases proliferation, increases apoptosis and decreases the invasive potential of the human breast carcinoma cell line MDA-MB-231. *Int J Oncol* **36**, 737-42, 2010.
 39. Bernard-Gallon DJ, Vissac-Sabatier C, Antoine-Vincent D, Rio PG, Maurizis J, et al.: Differential effects of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids on BRCA1 and BRCA2 gene expression in breast cell lines. *British Journal of Nutrition* **87**, 281-289, 2002.
 40. Mosmann T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods* **65**, 55-63, 1983.
 41. Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun* **73**, 1907-16, 2005.
 42. Lamkanfi M, Dixit VM. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell* **157**, 1013-22, 2014.
 43. Vanaja SK, Rathinam VA, Fitzgerald KA. Mechanisms of inflammasome activation: recent advances and novel insights. *Trends Cell Biol* **25**, 308-15, 2015.
 44. Shi J, Zhao Y, Wang Y, Gao W, Ding J, et al.: Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature* **514**, 187–192, 2014.
 45. Schley PD, Jijon HB, Robinson LE, Field CJ. Mechanisms of omega-3 fatty acid-induced growth inhibition in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment* **92**, 187-195, 2005.
 46. Ghosh-Choudhury T, Mandal CC, Woodruff K, St Clair P, Fernandes G, et al.: Fish oil targets PTEN to regulate NFκB for downregulation of anti-apoptotic genes in breast tumor growth. *Breast Cancer Res Treat* **118**, 213-228, 2009.
 47. Horia E, Watkins BA. Complementary actions of docosahexaenoic acid and genistein on COX-2, PGE2 and invasiveness in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Carcinogenesis* **28**, 809-15, 2007.
 48. Snodgrass RG, Huang S, Choi I, Rutledge JC, Hwang DH. Inflammasome-Mediated Secretion of IL-1β in Human Monocytes through TLR2 Activation; Modulation by Dietary Fatty Acids. *The Journal of Immunology* **191**, 4337-4347, 2013.

49. Sollberger G, Strittmatter GE, Kistowska M, French LE, Beer H. Caspase-4 Is Required for Activation of Inflammasomes. *The Journal of Immunology* **188**, 1992-2000, 2012.
50. Gauley J, Pisetsky DS. The translocation of HMGB1 during cell activation and cell death. *Autoimmunity* **42**, 2009.
51. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* **418**, 191-195, 2002.
52. Bell CW, Jiang W, Reich CF 3rd, Pisetsky DS. The extracellular release of HMGB1 during apoptotic cell death. *Am J Physiol Cell Physiol* **6**, 1318-25, 2006.
53. Luo X, Yang Y, Shen T, Tang X, Xiao Y, et al.: Docosahexaenoic acid ameliorates palmitate-induced lipid accumulation and inflammation through repressing NLRC4 inflammasome activation in HepG2 cells. *Nutr Metab* **9**, 2012.
54. Wen H, Gris D, Lei Y, Jha S, Zhang L, et al.: Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nat Immunol* **12**, 408-15, 2011.
55. Netea MG, Nold-Petry CA, Nold MF, Joosten LAB, Opitz B, et al.: Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1 β in monocytes and macrophages. *Blood* **113**, 2009.
56. Menu P, Mayor A, Zhou R, Tardivel A, Ichijo H, et al.: ER stress activates the NLRP3 inflammasome via an UPR-independent pathway. *Cell Death and Disease* **3**, 2012.
57. Bronner DN, Abuaita BH, Chen X, Fitzgerald KA, Nuñez G, et al.: Endoplasmic Reticulum Stress Activates the Inflammasome via NLRP3- and Caspase-2-Driven Mitochondrial Damage. *Immunity* **43**, 1-12, 2015.
58. Lebeaupin C, Proics E, de Bievville CH, Rousseau D, Bonnafous S, et al.: ER stress induces NLRP3 inflammasome activation and hepatocyte death. *Cell Death Dis* **6**, 2015.
59. Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nature Reviews Immunology* **13**, 397–411, 2013.
60. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al.: Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* **19**, 107-20, 2012.

Figuras suplementares

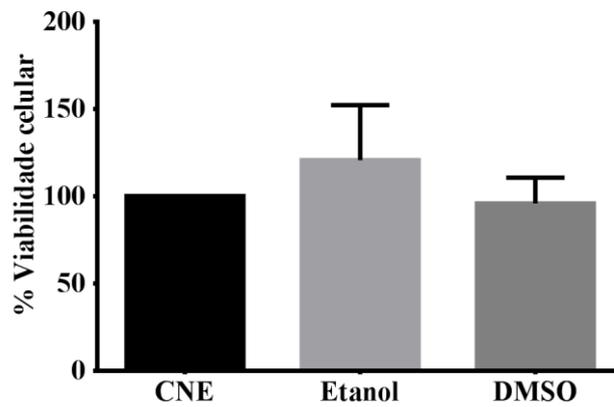
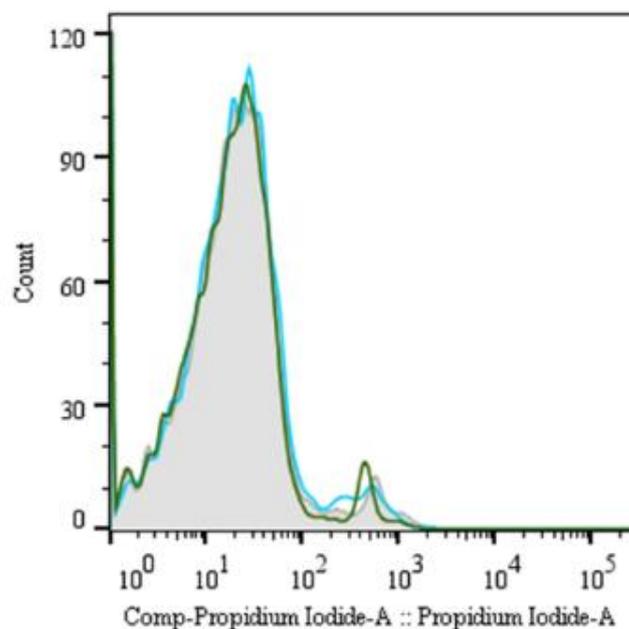


Figura Suplementar 1 – Etanol e DMSO não alteram viabilidade celular de MDA-MB-231. As células foram tratadas com 2% de etanol ou 1% DMSO por 24h e a viabilidade celular foi avaliada por marcação com MTT. Os dados estão apresentados como percentual de viabilidade celular em relação às células não marcadas. Cada barra representa a média do percentual \pm DP. (n=3) CNE: Controle de células não estimuladas com ácido graxo. * $p < 0,05$ em relação ao CNE



	Sample Name	Mean : Comp-Propidium Iodide-A
■	ET	22,1
■	DMSO	28,8
■	CNE	28,5

Figura Suplementar 2 –Etanol e do DMSO não alteram integridade da membrana de MDA-MB-231. As células foram tratadas com 2% de etanol (ET) ou 1% DMSO por 24h e a integridade da membrana foi avaliada por marcação com PI. Os histogramas são representativos de dois experimentos. Os histogramas são equivalentes à análise da população total de células.

7. Conclusões

Conclui-se que, além da apoptose, o DHA induz piroptose em células de câncer de mama triplo-negativo MDA-MB-231. Estudos prévios já haviam descrito a ação antitumoral do DHA através da indução de apoptose, entretanto, nenhum deles havia indicado a indução de piroptose.

O presente estudo mostrou que o DHA leva a um maior percentual de morte por apoptose quando comparado à mesma concentração de AA. Além disso, o AA não foi associado à morte por piroptose.

A maior perda da integridade da membrana, a maior ativação de caspase 1, a clivagem da caspase 1, a secreção de IL-1 β e a translocação de HMGB1 induzidas pelo DHA a 100 μ M indicam que esse ácido graxo induz piroptose em células de câncer de mama triplo-negativo e esse resultado abre portas para a investigação de novos mecanismos da ação antitumoral do DHA.

8. Referências

BAUERNFEIND, F.G.; HORVATH, G.; STUTZ, A. et al. Cutting Edge: NF- κ B Activating Pattern Recognition and Cytokine Receptors License NLRP3 Inflammasome Activation by Regulating NLRP3 Expression. *The Journal of Immunology*. V. 183. N. 2. P. 787-791. 2009.

BELL, C.W.; JIANG, W.; REICH III, C.F. et al. The extracellular release of HMGB1 during apoptotic cell death. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. V. 291. N. 6. 2006.

BERGSBAKEN, T.; FINK, S.L.; COOKSON, B.T. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Ver Microbiol*. V. 7. N. 2. P. 99-109. 2009.

BLANCKAERT, V.; ULMANNI, L.; MIMOUNI, V. et al. Docosahexaenoic acid intake decreases proliferation, increases apoptosis and decreases the invasive potential of the human breast carcinoma cell line MDA-MB-231. *International Journal of Oncology*. V. 36. P. 737-742. 2010.

BLANDER, J. M. A long-awaited merger of the pathways mediating host defence and programmed cell death. *Nature Reviews Immunology*. V.14. P.601–618. 2014.

BOZZA, P. T.; VIOLA, J.P.B. Lipid droplets in inflammation and cancer. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*. V. 82. P. 243-250. 2010.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. V. 72. P. 248-54. 1976.

BREZNICEANU, M.; VÖLP, K.; BÖSSER, S. et al. HMGB1 inhibits cell death in yeast and mammalian cells and is abundantly expressed in human breast carcinoma. *The FASEB Journal*. V. 17. N. 10. 1295-1297. 2003.

BROWN, M.D.; HART, C.; GAZI, E. et al. Influence of omega-6 PUFA arachidonic acid and bone marrow adipocytes on metastatic spread from prostate cancer. *Br J Cancer*. V. 102. N. 2. P. 403-13. 2010.

BURDGE, G.C.; CALDER, P.C. Conversion of α -linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults. *Reprod. Nutr. Dev*. V. 45. P. 581-597. 2005.

CALDER, P.C. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists in na old tale. *Biochimie*. V.91. P. 791–795. 2009.

CALDER, P.C. Mechanisms of Action of (n-3) Fatty Acids. *J. Nutr*. V. 142. N. 3. 2012.

CABRAL, M.; MARTÍN-VENEGAS, R.; MORENO, J.J. Leukotriene D4-induced Caco-2 cell proliferation is mediated by prostaglandin E2 synthesis. *Physiol Rep*. V. 3. N. 7. 2015.

- CAO, W.; MA, Z.; RASENICK, M.M. et al. N-3 Poly-Unsaturated Fatty Acids Shift Estrogen Signaling to Inhibit Human Breast Cancer Cell Growth. *Plos One*. 2012.
- CHEN, Z.; ZHANG, Y.; JIA, C. et al. mTORC1/2 targeted by n-3 polyunsaturated fatty acids in the prevention of mammary tumorigenesis and tumor progression. *Oncogene*. V. 33. P. 4548-4557. 2014.
- CHIPUK, J.E.; MOLDOVEANU, T.; LLAMBI, F. et al. The BCL-2 Family Reunion. *Molecular Cell*. V. 37. N. 3. P. 299–310. 2010.
- CIRQUEIRA, M.B.; MOREIRA, M.A.R.; SOARES, L.R.; FREITAS-JÚNIOR, R. Subtipos moleculares do câncer de mama. *FEMINA*. V. 39. 2011.
- CORSETTO, P.A.; MONTORFANO, G.; ZAVA, S; et al. Effects of n-3 PUFAs on breast cancer cells through their incorporation in plasma membrane. *Lipids in Health and Disease*. V. 10. 2011.
- CREAGH, E.M. Caspase crosstalk: integration of apoptotic and innate immune signalling pathways. *Trends in Immunology*. V. 35. N. 12. P. 631-640. 2014.
- DAI, J.; SHEN, J.; PAN, W. et al. Effects of polyunsaturated fatty acids on the growth of gastric cancer cells in vitro. *Lipids in Health and Disease*. V. 12. 2013.
- FERNANDES-ALNEMRI, T.; WU, J.; YU, J-W., et al. The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. *Cell Death and Differentiation*. V. 14. P. 1590–1604. 2007.
- FINK, S.L.; COOKSON, B.T. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infection and Immunity*. 2005.
- FUCHS, Y.; STELLER, H. Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. V. 16. P. 329–344. 2015
- GALLUZZI, L.; VITALE, I.; ABRAMS, J.M. et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death and Differentiation*. V. 19. P. 107-120. 2012.
- GUENENEAUD, C.; GOLDSCHNEIDER, D.; CASTETS, M. et al. The Dependence Receptor UNC5H2/B Triggers Apoptosis via PP2A-Mediated Dephosphorylation of DAP Kinase. *Molecular Cell*. V. 40. N. 6. P. 863–876. 2010.
- GUO, H.; CALLAWAY, J.B.; TING, J. P-Y. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nature Medicine*. V.21. N.7. P.677–687. 2015.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. V. 144. 2011.

HERSH, D.; MONACK, D.M.; SMITH, M.R. The Salmonella invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proc Natl Acad Sci.* V. 96. N. 5. P. 2396-401. 1999.

HOLLIDAY, D.L.; SPEIRS, V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Research.* V.13. 2011.

INCA. Estimativas 2014: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer, 2014.

JORGENSEN, I.; MIAO, E.A. Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens. *Immunological Reviews.* V. 265. P. 130-142. 2015.

KANG, K.S.; WANG, P.; YAMABE, N. et al. Docosahexaenoic Acid Induces Apoptosis in MCF-7 Cells In Vitro and In Vivo via Reactive Oxygen Species Formation and Caspase 8 Activation. *Plos One.* V. 5. N. 4. 2010.

KARMALI, R.A.; MARSH, J.; FUCHS, C. Effect of omega-3 fatty acids on growth of a rat mammary tumor. *J Natl Cancer Inst.* V. 73. N. 2. P. 457-61. 1984

KELLER, M.; RUEHH, A.; WERNER, S. et al. Active Caspase-1 Is a Regulator of Unconventional Protein Secretion. *Cell.* V. 132. N. 5. P.818–831. 2008.

KEPP, O.; GALLUZZI, L. ZITVOGEL, L.; KROEMER, G. Pyroptosis – a cell death modality of its kind? *Eur J Immunol.* V. 40. P.627–630. 2010.

KEYEL, P.A. How is inflammation initiated? Individual influences of IL-1, IL-18 and HMGB1. *Cytokine.* V. 69. P. 136-145. 2014.

KONG, W.; YEN, J.H.; VASSILIOU, E. et al. Docosahexaenoic acid prevents dendritic cell maturation and in vitro and in vivo expression of the IL-12 cytokine family. *Lipids Health Dis.* V. 9. N. 12. 2010.

KORT, W.J.; WEIJMA, I.M.; BIJMA, A.M. et al. Omega-3 fatty acids inhibiting the growth of a transplantable rat mammary adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst.* V. 79. N. 3. P. 593-9. 1987.

LAMKANFI, M.; KANNEGANTI, T.; DAMME, P.V. et al. Targeted Peptidecentric Proteomics Reveals Caspase-7 as a Substrate of the Caspase-1 Inflammasomes. *Molecular & Cellular Proteomics.* V. 7. P. 2350-2363. 2008.

LAMKANFI, M.; SARKAR, A.; VANDE WALLE, L. et al. Inflammasome-dependent release of the alarmin HMGB1 in endotoxemia. *J Immunol.* V. 185. N. 7. 2010.

LANDS, B. Consequences of Essential Fatty Acids. *Nutrients.* V. 4. P. 1338-1357. 2012.

LEBEAUPIN, C.; PROICS, E.; BIEVILLE, C.H.D. et al. ER stress induces NLRP3 inflammasome activation and hepatocyte death. *Cell Death and Disease.* V. 6. 2015.

LEE, E.J.; YUN, U.J.; KOO, K.H. et al. Down-regulation of lipid raft-associated oncoproteins via cholesterol-dependent lipid raft internalization in docosahexaenoic acid-induced apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. V. 1841. N. 1. P. 190–203. 2014.

LEHMANN, B.D.; BAUER, J.A.; CHEN, X. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *The Journal of Clinical Investigation*. V. 121. N. 7. 2011.

LI, Y.; ZHAO, H.; WANG, Y. Isoliquiritigenin induces growth inhibition and apoptosis through downregulating arachidonic acid metabolic network and the deactivation of PI3K/Akt in human breast cancer. *Toxicol Appl Pharmacol*. V. 272. N. 1. P. 37-48. 2013.

LUO, X.; YANG, Y.; SHEN, T. et al. Docosahexaenoic acid ameliorates palmitate-induced lipid accumulation and inflammation through repressing NLRC4 inflammasome activation in HepG2 cells. *Nutr Metab (Lond)*. V. 9. N. 1. 2012.

MAC LEAN, C.H.; NEWBERRY, S.J.; MOJICA, W.A. et al. Effects of Omega-3 Fatty Acids on Cancer Risk. *JAMA*. V. 295. N. 4. 2006.

MAGNA, M.; PISETSKY, D.S. The Role of HMGB1 in the Pathogenesis of Inflammatory and Autoimmune Diseases. *Molecular Medicine*. V. 20. N. 1. 2014.

MARTIN, C.A. ALMEIDA, V.V.; RUIZ, M.R. et al. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. *Rev. Nutr., Campinas*, V. 19. N.6. P.761-770. 2006.

MARTINON, F.; BURNS, K.; TSCHOPP, J. The Inflammasome: A Molecular Platform Triggering Activation of Inflammatory Caspases and Processing of proIL- β . *Molecular Cell*. V. 10. N. 2. P. 417-426. 2002.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*. V.65. P.55-63.1983.

NOVAK, T.E.; BABCOCK, T.A.; JHO, D.H. et al. NF-kappa B inhibition by omega -3 fatty acids modulates LPS-stimulated macrophage TNF-alpha transcription. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. V. 284. 2003.

PEROU, C.M. Molecular Stratification of Triple-Negative Breast Cancers. *The oncologist*. V. 15. N. 5. P. 39-48. 2010.

PERKINS, N.D. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and I κ B function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. V. 8. P.49– 62. 2007.

POP, C.; SALVESEN, G.S. Human Caspases: Activation, Specificity, and Regulation. *J Biol Chem*. V. 284. N. 33. P. 21777-21781. 2009.

PRAT, A.; PARKER, J.S.; KARGINOVA, O. et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Research*. V. 12. 2010.

PRAT, A.; ADAMO, B.; CHEANG, M.C. Molecular characterization of basal-like and non-basal-like triple-negative breast cancer. *Oncologist*. V. 18. N. 2. P. 123-33. 2013.

SAGULENKO, V.; THYGESEN, S.J.; SESTER, D.P. et al. AIM2 and NLRP3 inflammasomes activate both apoptotic and pyroptotic death pathways via ASC. *Cell Death and Differentiation*. V. 20. P.1149–1160. 2013.

SCHIMITZ, G.; ECKER, J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Progress in Lipid Research*. V. 47. P.147–155. 2008.

SCHLEY, P.D.; JIJON, H.B.; ROBINSON, L.E.; FIELD, C.J. Mechanisms of omega-3 fatty acid-induced growth inhibition in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*. V. 92. P. 187-195. 2005.

SCHRODER, K.; TSCHOPP, J. The Inflammasomes. *Cell*. V. 140. P. 821–832. 2010.

SHI, J.; ZHAO, Y.; WANG, Y. et al. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature*. V. 514. P. 187–192. 2014.

SIMOPOULOS, A.P. The Importance of the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio in Cardiovascular Disease and Other Chronic Diseases. *Exp Biol Med (Maywood)*. V. 233. N. 6. P. 674-88. 2008.

SIMOPOULOS, A.P. Evolutionary Aspects of Diet: The Omega-6/Omega-3 Ratio and the Brain. *Mol Neurobiol*. 2011.

The Cancer Genome Atlas Network (TCGA). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. V. 490. P. 61–70. 2012.

TAIT, S. W. G.; GREEN, D. R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. V. 11. P. 621–632. 2010.

TAIT, S.W.G.; ICHIM, G.; GREEN, D.R. Die another way – non-apoptotic mechanisms of cell death. *The company of biologists*. V. 127. P. 2135 – 2144. 2014.

TSCHOPP, J.; SCHRODER, K. NLRP3 inflammasome activation: the convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nature Reviews Immunology*. V. 10. P. 210-215. 2010.

World Health Organization (WHO). International Agency for Research on Cancer (IARC). GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx> Acessado em 27/07/2014 às 19h.

WILLIAMS-BEY, Y.; BOULARAN, C.; VURAL, A. et al. Omega-3 Free Fatty Acids Suppress Macrophage Inflammasome Activation by Inhibiting NF-κB Activation and Enhancing Autophagy. *PLOS ONE*. V.9. n. 6. 2014.

WU, M.; HARVEY, K.A.; RUZMETOV, N. Omega-3 polyunsaturated fatty acids attenuate breast cancer growth through activation of a neutral sphingomyelinase-mediated pathway. *Int J Cancer*. V.117. N.3. 2005.

WU, W.; LIU, P.; LI, J. Necroptosis: An emerging form of programmed cell death. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. V. 82. P. 249–258. 2012.

WU, H.; CHE, X.; ZHENG, Q. et al. Caspases: A Molecular Switch Node in the Crosstalk between Autophagy and Apoptosis. *Int J Biol Sci*. V. 10. N. 9. 2014.

XIONG, A.; YU, W.; TIWAR, R. et al. Distinct roles of different forms of vitamin E in DHA-induced apoptosis in triple-negative breast cancer cells. *Mol. Nutr. Food Res*. V. 56. P. 923-934. 2012.

XU, Y.; QIAN, S.Y. Anti-cancer Activities of ω -6 Polyunsaturated Fatty Acids. *Biomed J*. V. 37. N. 3. P. 112-119. 2014.

YAN, Y.; JIANG, W.; SPINETTI, T. et al. Omega-3 fatty acids prevent inflammation and metabolic disorder through inhibition of NLRP3 inflammasome activation. *Immunity*. V. 38. N. 6. P. 1154-63. 2013.

YAN, Y.; JIANG, G.; ZHANG, P. et al. Programmed cell death and its role in inflammation. *Military Medical Research*. V. 2. N. 12. 2015.

YERSAL, O.; BARUTCA, S. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World J Clin Oncol*. V. 5. N. 3. 2014.

ZHENG, J.S.; HU, X.J.; ZHAO, Y.M., et al. Intake of fish and marine n-3 polyunsaturated fatty acids and risk of breast cancer: meta-analysis of data from 21 independent prospective cohort studies. *BMJ*. 2013.