

**EVELYN DRIELLE DA SILVA**

**EXPRESSÃO DE GENES REGULADORES DO CICLO CELULAR E  
APOPTOSE EM EXPLANTES DE TUMORES MAMÁRIOS DE FÊMEAS CANINAS  
TRATADOS COM DIFERENTES ISÔMEROS DE ÁCIDO LINOLEICO  
CONJUGADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, Área de Concentração: Produção Animal.

Orientador: Dimas Estrasulas de Oliveira

**LAGES**

**2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo(a) autor(a), com  
auxílio do programa de geração automática da  
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC

Silva, Evelyn Drielle da

Expressão de genes reguladores do ciclo celular  
e apoptose em explantes de tumores mamários de  
fêmeas caninas tratados com diferentes isômeros de  
ácido linoleico conjugado / Evelyn Drielle da  
Silva. - Lages , 2018.

64 p.

Orientador: Dimas Estrasulas de Oliveira  
Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado de  
Santa Catarina, Centro de Ciências  
Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em  
Ciência Animal, Lages, 2018.

1. Anticarcinogênico. 2. Nutrigenômica. 3. Câncer.  
4. Mastectomia. I. Estrasulas de Oliveira, Dimas.  
II. Universidade do Estado de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação. III. Título.

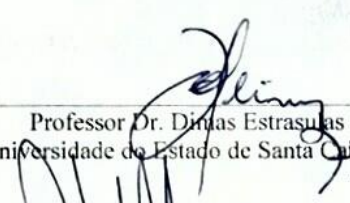
**EVELYN DRIELLE DA SILVA**

**EXPRESSÃO DE GENES REGULADORES DO CICLO CELULAR E  
APOPTOSE EM EXPLANTES DE TUMORES MAMÁRIOS DE FÊMEAS  
CANINAS TRATADOS COM DIFERENTES ISÔMEROS DE ÁCIDO  
LINOLEICO CONJUGADO**

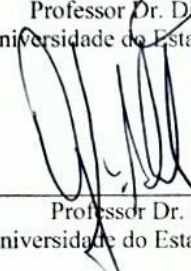
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, Área de Concentração: Produção Animal.

**Banca examinadora:**

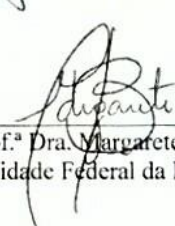
**Orientador:**

  
\_\_\_\_\_  
Professor Dr. Dirlas Estrassulas de Oliveira  
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

**Membro:**

  
\_\_\_\_\_  
Professor Dr. Gustavo Felipe da Silva  
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

**Membro:**

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª Dra. Margarete Dulce Bagatini  
Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

**Lages, 26 de Março de 2018**



Dedico aos meus pais  
Joelma e Vanderlei e as minhas  
avós, Divina e Maria.

Ofereço ao meu avô  
Sebastião (*in memoriam*)



## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar força, saúde, foco e perseverança para realização dos meus projetos, e por renová-los diariamente!

À toda minha família, em especial a minha mãe Joelma e ao meu irmão Marcus, pelo amor, carinho, ajuda e confiança depositada.

Ao professor Dr. Dimas Estrasulas de Oliveira pela orientação e exemplo, seus ensinamentos e colaboração serão para a vida!

À todos os amigos que fizeram desses anos de mestrado mais alegres, em especial, Márcia Oziemblowski, Joilson Echeverria, Matheus Bogger, Lorena Gomes, João Francisco, Juliana Martins, Fran Sordi, Marcos Migliorini, Amanda Carvalho e Cleverson de Souza, obrigada pelo companheirismo e parceria de sempre, levarei cada um de vocês no coração.

Ao Maurício Camêra, que mesmo distante está mais próximo que qualquer pessoa nos meus dias, antes de tudo obrigada pela nossa amizade, pelos nossos momentos compartilhados e pelo zelo que você tem comigo, você me inspira a ser uma pessoa melhor.

As amigas do grupo de pesquisa NUTRIGER que ajudaram a tornar as análises laboratoriais mais leves. Agradeço a cada uma, Priscila Carraro, Rafaella Horstman, Georgia de Aguiar, Lais Batalha, Eveline Sandri, pelos momentos de descontração e tempo disponível. Desejo sucesso a todas vocês.

Aos colegas do Cedima, Cláudia Duarte, Karine Dalmina, Fernanda Melo e Ricardo Sfaciote, obrigada por sempre me ajudarem quando precisei.

À Nathalia Calomeno e Valéria Isaias, por me ensinar a partilhar um lar. Agradeço vocês por todo esse tempo que convivemos juntas e por tudo que se dispuseram a fazer por mim.

À Universidade do Estado de Santa Catarina pela oportunidade e estrutura disponível para realização deste Mestrado e a todos os professores e colaboradores.

Ao professor Nilson Oleskovicz e seus orientados Felipe Comassetto e Carina Freccia que gentilmente cederam os tumores provenientes das cirurgias de mastectomia do Hospital Veterinário do CAV/UDESC para utilizarmos em nosso projeto.

ÀCAPES pela concessão da bolsa de Mestrado.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Santa Catarina (FAPESC) pela concessão dos recursos financeiros pelo Edital Universal 01/2014, convênio nº 2015TR329.

Muito obrigada





“O homem não é nada além  
daquilo que a educação faz dele”  
— *Immanuel Kant*



## RESUMO

O CLA *cis-9, trans-11* é considerado um agente anticarcinogênico em determinados tipos de câncer através da inibição da proliferação celular e por induzir a apoptose das células tumorais. Objetivou-se com este estudo analisar a expressão de genes responsáveis pela regulação do ciclo celular e apoptose em explantes tumorais de glândula mamária de cadelas, cultivados com os isômeros *cis-9, trans-11* e *trans-10, cis-12* do ácido linoleico conjugado (CLA). Os explantes dos tumores (Tumor I: carcinoma anaplásico de mama e Tumor II: carcinoma tubulopapilar), foram obtidos de duas cadelas, adultas, provenientes de cirurgias de mastectomia da rotina do Hospital Veterinário do Centro de Ciências Agroveterinárias. Os explantes foram cultivados por 24h com os seguintes tratamentos: a) 75µMol/L *cis-9, trans-11* CLA; b) 75 µMol/L *trans-10, cis-12* CLA e; c) Controle: Meio de cultivo + albumina sérica bovina (BSA). Posteriormente foi extraído o RNA total, sintetizado o DNA complementar (cDNA) e realizada a análise quantitativa da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR). Os dados foram analisados pelo programa estatístico SAS, utilizando o procedimento MIXED. O tratamento CLA *trans-10, cis-12*, quando comparado ao controle, aumentou a expressão do gene que codifica a proteína quinase CDK1 em ambos os tumores e o tratamento CLA *cis-9, trans-11* aumentou em 110% quando comparado ao controle a expressão gênica do gene que codifica a proteína pró-apoptótica BAX no tumor II (P=0,0001). Não houve efeito dos tratamentos sobre a expressão do gene anti-apoptótico Bcl-2 em ambos os tumores (P=0,3, tumor I; e P=0,2 tumor II). O CLA *cis-9, trans-11* estimula a apoptose no carcinoma tubulopapilar e o CLA *trans-10, cis-12* estimula a progressão do ciclo celular no carcinoma anaplásico de mama e no carcinoma tubulopapilar.

**Palavras-chave:** Anticarcinogênico. Nutrigenômica. Câncer. Mastectomia.



## ABSTRACT

The *cis*-9, *trans*-11 CLA is an anticarcinogenic in some types of cancer by inhibiting the cell proliferation and inducing apoptosis of tumor cells. The objective of this study was to measure the expression of genes responsible for cell cycle regulation and apoptosis in mammary tumor explants of female canine cultured with *cis*-9, *trans*-11 and *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid isomers (CLA). Tumor mammary explants (Tumor I: anaplastic breast carcinoma and Tumor II: tubulopapillary carcinoma) were obtained from two adult female canine from the routine mastectomy surgeries at the Veterinary Hospital of the Agroveterinary Sciences Center. The explants were cultured for 24h with the following treatments: a) 75  $\mu$ mol/L *cis*-9, *trans*-11 CLA; b) 75  $\mu$ Mol/L *trans*-10, *cis*-12 CLA and; c) Control (Culture medium + BSA). Subsequently, total RNA was extracted, complementary DNA (cDNA) was synthesized and carried out the real-time quantitative polymerase chain reaction analysis (RT-qPCR). The data were analyzed using the SAS software with the MIXED procedure. The *trans*-10, *cis*-12 CLA treatment, when compared to control, increased the expression of the gene that encodes the CDK1 protein kinase in both tumors. The *cis*-9, *trans*-11 CLA treatment increased by 110% when compared to the control, the expression of the gene encoding the pro-apoptotic BAX protein in tumor II (P=0.0001). There was no effect of the treatments on the expression of the anti-apoptotic Bcl-2 gene in both tumors (P=0.3), tumor I, and P=0.2 tumor II). The *cis*-9, *trans*-11 CLA stimulates apoptosis in tubulopapillary carcinoma and the *trans*-10, *cis*-12 CLA stimulates tumor cell cycle progression in anaplastic breast carcinoma and tubulopapillary carcinoma.

**Keywords:** Anticarcinogenic. Nutrigenomics. Cancer. Mastectomy.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Características do câncer.....	29
Figura 2 -	Características morfológicas entre necrose e apoptose.....	30
Figura 3 -	Via intrínseca da apoptose.....	32
Figura 4 -	Microambiente do tumor.....	34
Figura 5 -	Vias da ciclooxigenase e lipooxigenase.....	36
Figura 6 -	Isômeros de CLA <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 e <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12.....	38
Figura 7 -	Histologia dos explantes de tumores mamários de fêmeas caninas....	48
Figura 8 -	Expressão gênica da CDK1 (A) e p53 (B) no tumor I.....	49
Figura 9 -	Expressão gênica da BAX no tumor I.....	50
Figura 10 -	Expressão gênica da BAX no tumor II.....	51
Figura 11 -	Expressão gênica da CDK1 no tumor II.....	51
Figura 12 -	Expressão gênica da MDM-2 no tumor II.....	52





## LISTA DE ABREVIATURAS

Apaf-1	Ativador de protease apoptótica
ATP	Trifosfato de adenosina
Bax	Bcl-2 associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BCL-xL	B-cell lymphoma-extra large
BSA	Albumina Sérica Bovina
CAV	Centro de ciências agroveterinárias
CDK1	Quinase dependente de ciclina 1
Cdna	DNA complementar
CEDIMA	Centro de Diagnóstico Microbiológico animal
CLA	Ácido linoleico conjugado
DISC	Complexo do sinalizador de indutor de morte
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ErbB2	Gene da proteína HER-2
GLN	Ácido $\gamma$ -linolênico
HER-2	Receptor do fator de crescimento epidérmico humano-tipo2
LPA	Laboratório de Patologia Animal
Mdm-2	Murine double minute 2
mRNA	RNA mensageiro
NAG-1	Non-steroidal anti-inflammatory drug activated gene
p21	Proteína inibidora de CDK
p53	Proteína supressora de tumor
RNA	Ácido Ribonucleico
RPS18	Proteína ribossômica S18
RPS19	Proteína ribossômica S19
TUMOR I	Carcinoma anaplásico de mama
TUMOR II	Carcinoma tubulopapilar
UDESC	Universidade do Estado de Santa Catarina



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Primers utilizados para PCR real time.....	47
<b>Tabela 2</b> – Expressão dos genes responsáveis pelo ciclo celular e apoptose no Tumor I....	50
<b>Tabela 3</b> – Expressão dos genes responsáveis pelo ciclo celular e apoptose no tumor II....	52



## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
$\Gamma$	Gama
$\Delta$	Delta
$\mu\text{Mol}$	Micro mol



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>25</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>27</b>
2.1	CÂNCER DE MAMA EM CADELAS.....	27
2.2	SURGIMENTO DO CÂNCER.....	28
2.3	ÁCIDOS GRAXOS E CÂNCER.....	35
2.4	DESCOBERTA DO CLA.....	37
2.5	ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO (CLA) E CÂNCER.....	37
<b>3</b>	<b>HIPÓTESES.....</b>	<b>41</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>43</b>
4.1	OBJETIVO GERAL.....	43
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>
<b>6</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>49</b>
6.1	TUMOR I – CARCINOMA ANAPLÁSICO DE MAMA.....	49
6.2	TUMOR II – CARCINOMA TUBULOPAPILAR DE MAMA.....	51
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>53</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>55</b>
<b>9</b>	<b>CONSIDERAÇÕES GERAIS.....</b>	<b>57</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>59</b>





## 1 INTRODUÇÃO

Os ácidos linoleicos conjugados (CLA) são uma mistura de isômeros geométricos e de posição do ácido octadecadienóico com ligações duplas conjugadas, sendo os isômeros *cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12 os mais estudados.

O CLA é um anticarcinogênico natural encontrado na gordura corporal e do leite dos animais ruminantes em função da bio-hidrogenação parcial dos ácidos graxos poliinsaturados presentes na dieta dos animais. Embora o CLA *cis*-9, *trans*-11 seja intermediário comum na bio-hidrogenação ruminal do ácido linoleico este isômero é principalmente formado na glândula mamária e outros tecidos que possuem a enzima esteroil-CoA-dessaturase ( $\Delta^9$ -dessaturase) (GRINARI et al., 2000).

Vários estudos utilizando linhagens de células cancerígenas, modelos animais e animais transgênicos têm mostrado os efeitos anticarcinogênicos do CLA por meio de alterações na iniciação, promoção, progressão e metástase de tumores malignos, devido a alterações na expressão gênica de genes e/ou fatores de transcrição que regulam o ciclo celular, proliferação de células tumorais e/ou apoptose celular.

Em grande parte desses estudos, os quais envolveram diferentes modelos animais e culturas de células humanas, foram demonstrados, os efeitos inibitórios do CLA sobre diversos tipos de câncer, como mama, pele, estômago, intestino e próstata (PARODI, 1997; OCHOA et al., 2004).

Objetivou-se com esse estudo verificar o efeito dos isômeros de CLA, *cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12 sobre explantes de tumores mamários de fêmeas caninas usando técnicas moleculares para medir a expressão gênica de genes envolvidos no ciclo celular e apoptose de células neoplásicas.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

A palavra “câncer” é uma denominação usualmente utilizada com o intuito de caracterizar um conjunto de estado patológico, heterogêneo, nos quais as células se multiplicam anormalmente invadindo os tecidos circundantes (VOGELSTEIN; KINZLER, 1992).

A associação entre as causas que originam o câncer e as mutações genéticas são cada vez mais notórias. No caso de neoplasias, as células anormais tendem a se dividir um incontável número de vezes destruindo os tecidos do corpo, esse tipo de mutação acontece por meio da ativação de proto-oncogenes e a inativação de genes supressores de tumor permitindo um desequilíbrio na regulação do ciclo celular.

Entender os mecanismos moleculares na desregulação da progressão do ciclo celular no câncer torna-se uma via de acesso importante para compreender como células normais se tornam tumorigênicas e em paralelo a isso, a forma como novas estratégias de supressão dessa doença podem ser projetadas (PARK; LEE, 2003).

### 2.1 CÂNCER DE MAMA EM CADELAS

As neoplasias mamárias constituem aproximadamente 50% dos tumores diagnosticados em cadelas (FONSECA; ALECK, 2000). Pesquisas com câncer de mama canino têm sido recorrentes por se tratar de um fenômeno altamente incidente e por apresentarem similaridades em relação ao câncer de mama humano.

Os cânceres de ocorrência natural em cachorros e humanos compartilham muitas características, incluindo aparência histológica, genética tumoral, alvos moleculares, biológicos, comportamento e resposta a terapias convencionais (PAOLONI; KHANNA, 2008).

Os cânceres espontâneos em cães de estimação representam um dos melhores modelos de câncer para serem estudados, por apresentarem características naturais e heterogêneas, capturando a essência de câncer de mama humano, ao contrário dos modelos de roedores geneticamente modificados ou de xenotransplantes (LIU et al., 2014) e por estarem expostos ao mesmo meio ambiente que os humanos, os cães também podem compartilhar dos mesmos carcinógenos.

Os cães melhor se assemelham aos humanos na biologia, por exemplo, por apresentarem atividades similares de telômeros e telomerase, sendo esses, fundamentais para a compreensão do envelhecimento e das doenças relacionadas à idade, como o câncer (NASIR et al., 2001).

A complexidade biológica dos cânceres em animais de estimação capta a essência do câncer em humanos. Essa complexidade é baseada em grande parte pela heterogeneidade intratumoral “célula-célula” observada em diversos tipos de cânceres, como leucemia, osteossarcoma, próstata, mama, pulmão e carcinomas da bexiga. As consequências naturais dessa heterogeneidade são as mesmas características mortais dos cânceres humanos, incluindo resistência adquirida à terapia, recorrência e metástase (PAOLONI; KHANNA, 2008). Esses mesmos autores sugerem que mais importante que as semelhanças histológicas, à medida que as comparações foram feitas, as alterações moleculares genéticas que impulsionam câncer em humanos e em cães também são altamente análogas. Os carcinomas simples caninos representam fielmente em nível molecular os carcinomas de mama humano, baseado nisso, estes fornecem modelos indispensáveis para a pesquisa básica e translacional de câncer de mama (LIU et al., 2014).

## 2.2 SURGIMENTO DO CÂNCER

As linhagens de células somáticas crescem e se dividem certo número de vezes, até que ocorra, quando necessário, a morte celular em prol do bem estar do organismo. Esse processo de morte é denominado apoptose ocorrendo durante várias situações fisiológicas ou patológicas, sendo um mecanismo de remoção de células lesadas e de renovação celular, possuindo assim um papel essencial na manutenção da homeostase tecidual (ANAZETTI; MELLO, 2007).

O crescimento descontrolado das células de câncer é resultado de anormalidades acumuladas que afetam muitos dos mecanismos reguladores. As células cancerosas tipicamente mostram anormalidades nos mecanismos que regulam a proliferação, a diferenciação e a sobrevivência de células normais. O início do tumor é tido como sendo o resultado de uma alteração genética que leva a proliferação anormal de uma única célula (COOPER, 2001). As células de um organismo multicelular têm o comprometimento de colaborar entre si, utilizando sinais para sua comunicação ditando a cada uma como devem operar. Se surgir alguma alteração molecular, essa harmonia celular é prejudicada em um

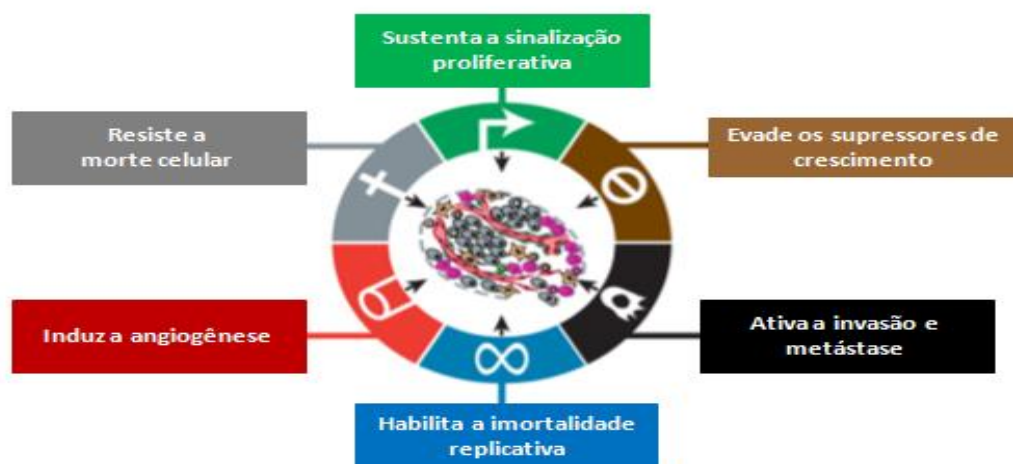
passo que bilhões de células podem sofrer mutações, rompendo assim o controle social (ALBERTS et al., 2010). Mais preocupante ainda é se uma mutação der certa vantagem seletiva a uma única célula, possibilitando que ela cresça e se divida mais vigorosamente que suas vizinhas, tornando-a fundadora de um clone mutante, sendo possível o seu crescimento fora do contexto.

A progressão do câncer é sucedida por intermédio de uma cascata de eventos complexos que estão de certa forma envolvida com a regulação do ciclo celular (PARK; LEE, 2003).

Pelo menos duas classes distintas de genes demonstraram estar envolvidos na carcinogênese. Entre eles estão os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor. Os proto-oncogenes parecem estar envolvidos no crescimento e desenvolvimento celular normal e quando expressos de forma inadequada resulta em sinais proliferativos envolvidos no crescimento neoplásico, tornando-os oncogenes. Em contraposição, os genes supressores de tumor também podem atuar no controle da divisão celular e possivelmente na diferenciação, porém, suas funções podem ser inativadas ou perdidas pelo desenvolvimento do tumor, controlando o crescimento neoplásico de forma negativa (BARRETT; WISEMAN, 1987).

Há a existência de pelo menos seis alterações biológicas (ver Figura 1) na célula para que ela apresente um fenótipo maligno, sendo elas, manutenção da sinalização proliferativa; evasão dos supressores de crescimento, resistência à morte celular programada (apoptose), potencial replicativo ilimitado; angiogênese sustentada para importar nutrientes e exportar resíduos; invasão tecidual e metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Figura 1 - As características do câncer

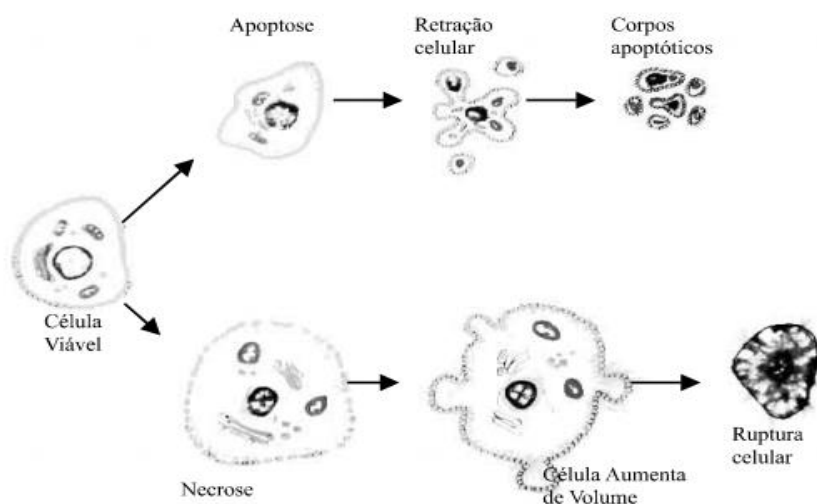


Fonte: adaptado de Hanahan e Weinberg (2000).

E o progresso conceitual da última década acrescentou duas marcas emergentes de potencialidade geral a esta lista, sendo elas, reprogramação do metabolismo energético e evasão da destruição imune (HANAHAN; WEINBERG, 2011). No decorrer desua progressão a célula tumoral obtém resistência à apoptose (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

O termo apoptose surgiu no início dos anos 70 pelo grupo de estudos de Kerr e colaboradores e foi definido por ser considerado um tipo de morte celular distinto da necrose (ver Figura 2) (KERR et al., 1972).

Figura 2 - Características morfológicas de apoptose e necrose



Fonte: Grivicich et al. (2007).

Apoptose sucede como um mecanismo de defesa, como em reações imunes ou quando as células são danificadas por doenças ou agentes nocivos. Durante o processo de apoptose, ocorre uma retração da célula causando perda de aderência com a matriz extracelular e com as células vizinhas, porém, a maioria das organelas celulares mantém sua morfologia (KERR et al., 1972).

No entanto, de acordo com Ziegler e Groscurth (2004) e BeikzadeheDelirezh (2014), pode ocorrer: (1) ruptura na membrana externa das mitocôndrias; (2) condensação da cromatina que se concentra junto à membrana celular; (3) formação de prolongamentos (*blebs*) na membrana nuclear; (4) desintegração do núcleo em fragmentos envoltos pela membrana celular; (6) formação dos corpos apoptóticos (porções celulares envoltas pela membrana celular, resultado do rompimento dos prolongamentos da membrana celular

contendo o conteúdo celular); (7) fagocitose dos corpos apoptóticos por macrófagos (remoção sem causar algum processo inflamatório).

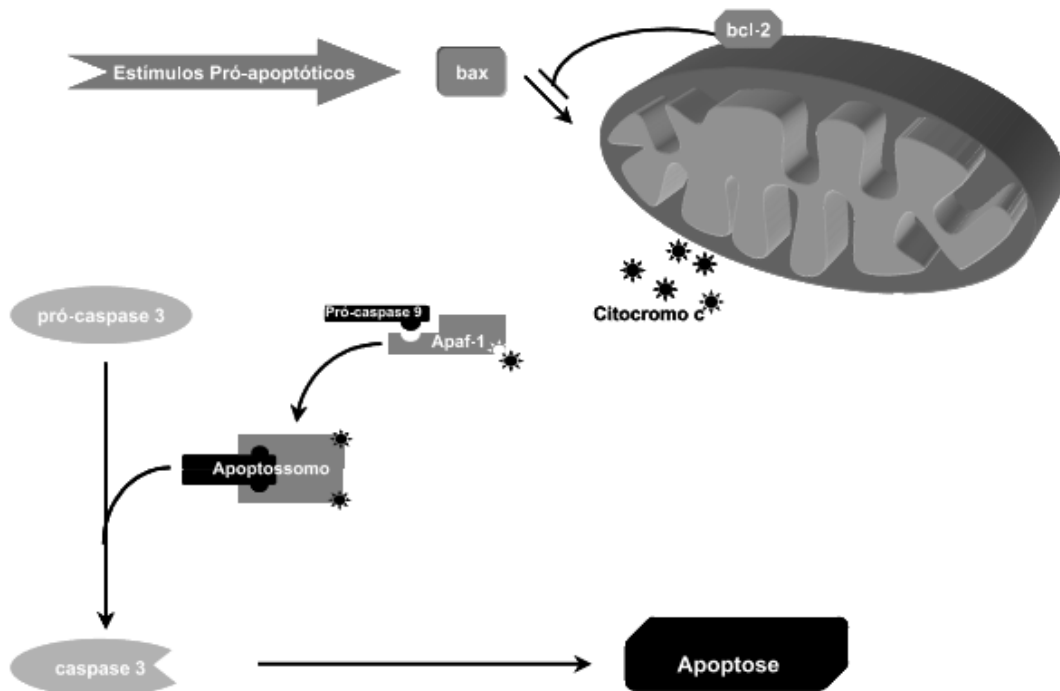
Para que ocorra a coordenada ativação da cascata de apoptose, são necessárias muitas moléculas exercendo diversas funções, dentre estas, estão às proteínas anti-apoptóticas, pró-apoptóticas e as caspases.

Os membros da família de proteínas Bcl-2 (B-celllymphoma 2) são integradores cruciais de sinais de sobrevivência e morte gerados dentro e fora das células em eucariotos superiores (BORNER, 2003). Essa família de proteínas é subdividida em duas classes: membros anti-apoptóticos como Bcl-2 e Bcl-xL (B-celllymphoma-extra large), que atuam como fatores de sobrevivência, tendo como função inibir as células a entrar em apoptose por intermédio da prevenção da liberação do citocromo-c da mitocôndria para o citoplasma, e membros pró-apoptóticos como Bax (Bcl-2 associated X protein) e Bak (Bcl-2-antagonist/killer), (BORNER, 2003). O controle da quantidade de proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas estabelecem o limiar que determina se uma célula deve ou não morrer e é este equilíbrio que fornece a homeostase tecidual (GRIVICICH et al., 2007). Assim, os membros dessa família Bcl-2 operam como pontos de controle através dos quais os sinais de sobrevivência e morte devem passar antes de determinar o destino das células.

Geralmente, a ativação das caspases desempenha um papel central nos estímulos que provocam a apoptose. As caspases são uma família de proteases que possuem uma cisteína no seu sítio ativo e apresentam habilidade em identificar e clivar substratos que contém resíduos de aspartato (NICHOLSON; THORNBERRY, 1997), atuando como iniciadoras ou efetoras da apoptose. As caspases humanas que participam do processo de apoptose são classificadas em seis, sendo elas: caspases:3, 6, 7,8, 9 e 10. A apoptose pode ser desencadeada por duas rotas distintas: via extrínseca(via do receptor da morte de superfície celular) via intrínseca (mitocondrial). Na via extrínseca a ativação da caspase-8 após o recrutamento do complexo do sinalizador de indutor de morte (DISC) é o evento crítico que transmite o sinal de morte. Os receptores de morte reconhecem um ligante específico e esse indutor de morte interage com moléculas que recrutam a caspase-8 (BUDIHardjo et al., 1999) que irá ativar a caspase-3a executar a morte por apoptose. A caspase-3 é a via final comum de quase todas as vias apoptóticas, sendo a caspase final e ativa nessas duas vias aqui mencionadas. A via intrínseca é ativada por estresse intra ou extracelular e é iniciado pela mitocôndria, e a ativação das caspases é desencadeada pela formação de um complexo multimérico Apaf-1 (Fator de ativação de protease associada a apoptose I)/Citocromo-c que é totalmente funcional

no recrutamento e ativação da pró-caspase-9. A caspase-9 ativada, então, cliva e ativa caspases jusante, como caspase-3, 6 e 7 (BUDIARDJO et al., 1999) (ver Figura 3).

Figura 3 -Via intrínseca de ativação da apoptose



Fonte: Grivicich et al. (2007).

A irradiação ou drogas usadas para a quimioterapia contra o câncer resultam em dano no DNA em algumas células, o que pode levar à morte apoptótica por intermédio de uma via dependente de p53 (tumor protein 53) (ELMORE, 2007). De modo geral, quando os mecanismos celulares falham ocorre à progressão do tumor e em algum momento dessa progressão a célula ganha resistência a apoptose. O que se tem notado referente a esse tipo de ocorrência é a alta frequência de mutações em p53 que atesta sua potencial importância na patogênese, diagnóstico e tratamento do câncer humano (HARRIS, 1996).

Por ser considerada uma supressora de tumor, a proteína p53 desempenha um papel crítico na carcinogênese, por estar associada à mutação em mais de 50% de todos os cânceres humanos (OREN, 2003; ELMORE, 2007). Com a função de monitorar a integridade do genoma (ARRUDA et al., 2008), a p53 está diretamente envolvida na transcrição de genes que regulam o ciclo celular, na ativação das proteínas de reparo, quando o DNA sofre algum dano, na capacidade de manter o ciclo celular no ponto de regulação G1/S no reconhecimento ao dano do DNA e induzir a célula a entrar em apoptose caso o dano seja



irreversível,(VOGELSTEIN; KINZLER, 1992 ; HARRIS, 1993; OREN, 2003; ELMORE, 2007).

Se não houver estresse celular, a proteína p53 é mantida em baixos níveis, em estado estacionário, exercendo muito pouco, se houver, efeito sobre o destino das células. Porém, em resposta a vários tipos de estresse, a p53 torna-se ativa e níveis elevados da proteína bem como a capacidade bioquímica aumentada são observados (OREN, 2003).

A maioria das células cancerosas acumula anormalidades genômicas a uma taxa notavelmente rápida, pois não conseguem manter sua estrutura e número de cromossomos (PAMPLONA et al., 2012). Segundo Hanahan e Weinberg (2000), a maioria dos tipos de células tumorais que se propagam em cultura parece ser imortalizada, sugerindo que o seu potencial replicativo ilimitado é uma característica adquirida ‘*in vivo*’ durante a progressão do tumor e que é essencial para o desenvolvimento do seu estado de crescimento maligno e isso, pode em parte, ser associado à capacidade que a célula desenvolve em manter ativada a função dos seus telômeros.

Os telômeros são seqüências ricas em guanina que se encontram nas extremidades dos cromossomos e são encolhidos ao longo de cada processo de replicação, até chegar a um limiar em que a célula não consegue mais se replicar e por fim entra em apoptose. Na maioria dos cânceres, a atividade da enzima telomerase geralmente se correlaciona com o estado de proliferação, pois a presença da enzima é quase sempre necessária para a proliferação ilimitada, (SHAY; BACCHETTI, 1997), sendo assim, durante a replicação do DNA na fase S do ciclo celular está enzima mantém a estrutura da seqüência telomérica e promove a formação de proteínas com estrutura de quepe que protegem as extremidades dos cromossomos (ALBERTS et al., 2010).

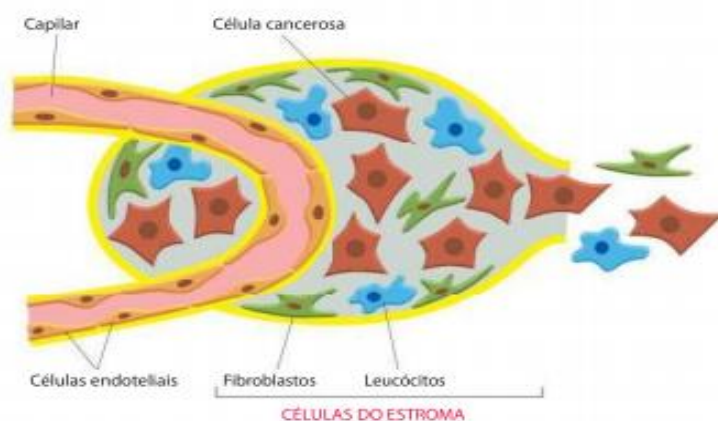
Está estabelecido que a progressão de um fenótipo de tumor pré-maligno para maligno depende da angiogênese (CARMELIET; JAIN, 2000). Dessa maneira, as células tumorais conseguem se manter no microambiente tumoral, por intermédio de alguns genes específicos que irão estimular essa neovascularização (HANAHAN; WEINBERG, 2000) que é necessária para que o tumor cresça além de um determinado tamanho. Esse processo de neovascularização nada mais é que a capacidade da célula em induzir seu próprio suprimento de sangue e prossegue por intermédio da produção combinada de sinais indutivos de todo o constituinte celular do tumor (ZIYAD; IRUELA-ARISPE, 2011). Tais sinais são produzidos em resposta à hipoxia, que começa a afetar as células à medida que o tumor se expande além de um milímetro ou dois em diâmetro (ALBERTS et al., 2010). Para isso, as células tumorigênicas criam uma instabilidade local em seus sinais angiogênicos e esse “interruptor

angiogênico” é um equilíbrio complexo de múltiplos fatores pró e anti-angiogênicos secretados pelas células do hospedeiro e do tumor, que quando equilibrado a favor de fatores pró-angiogênicos desencadearão nova formação de vasos sanguíneos (CARMELIET; JAIN, 2000). A formação de novos vasos sanguíneos não só contribuem no suprimento de oxigênio e nutrientes, como também criam uma via de escape para as células cancerosas formarem metástase (ALBERTS et al., 2010). A capacidade adquirida que uma célula tumoral possui em se tornar metastática surge no decorrer do desenvolvimento da maioria dos tipos de câncer humano, em que, as massas de tumores primários, geram células pioneiras que se afastam, desenvolvem capacidade de invadir os tecidos adjacentes, e em seguida, viajam para locais distantes para formar novas colônias (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Em relação à complexidade do câncer que de certa forma engloba a biologia dos tumores, esta não pode ser compreendida enumerando somente os traços das células cancerosas e, portanto envolve as cooperações do “microambiente tumoral” para a tumorigênese (HANAHAN; WEINBERG, 2000), pois, há interações entre as células cancerosas e o estroma tumoral, sendo um componente importante no desenvolvimento do tumor. O estroma é o arcabouço do tumor, sendo constituídos de tecido conectivo normal, contendo fibroblastos, miofibroblastos, leucócitos inflamatórios e células musculares lisas (ver Figura 4).

As células do estroma agem nas células tumorais secretando proteases que remodelam a matriz extracelular. Assim, o tumor e seu estroma se desenvolvem juntos, tornando-se o tumor dependente das células do estroma (ALBERTS et al., 2010).

Figura 4 - O microambiente do tumor



Fonte: Alberts et al. (2010).

### 2.3 ÁCIDOS GRAXOS E CÂNCER

Os lipídios são essenciais para o organismo por possuírem a capacidade de exercer diversas funções, sendo componentes não-proteicos de membranas biológicas, precursores de compostos essenciais, agentes emulsificantes, isolantes, solubilizantes das vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K), fonte e transporte de combustível metabólico, além de componentes de bio-sinalização intra e extracelulares.

Os ácidos graxos são cadeias hidrocarbonadas acíclicas, não-polares, sem ramificações e, em geral, com 4 a 24 átomos de carbono. Podem ser saturados, monoinsaturados (contém uma ligação dupla) ou poliinsaturados (contêm duas ou mais ligações duplas) (MOTTA, 2005). Embora a gordura dietética tenha sido implicada em alterar a carcinogênese, os pesquisadores têm agora focado em ácidos graxos específicos e seu possível mecanismo de ação.

A gordura dietética integra ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6 os quais desempenham papéis importantes em processos biológicos. Nos últimos anos houve um crescente interesse nos estudos desses ácidos graxos e se haveria alguma propriedade em ambos que estaria relacionado com o risco de desenvolvimento de câncer ou combate do mesmo (ROSE; CONNOLLY, 1999 ; JACK et al., 2000, STREEP et al, 2003 ; SIDDIQUI et al., 2004 ; MCENTEE et al., 2008).

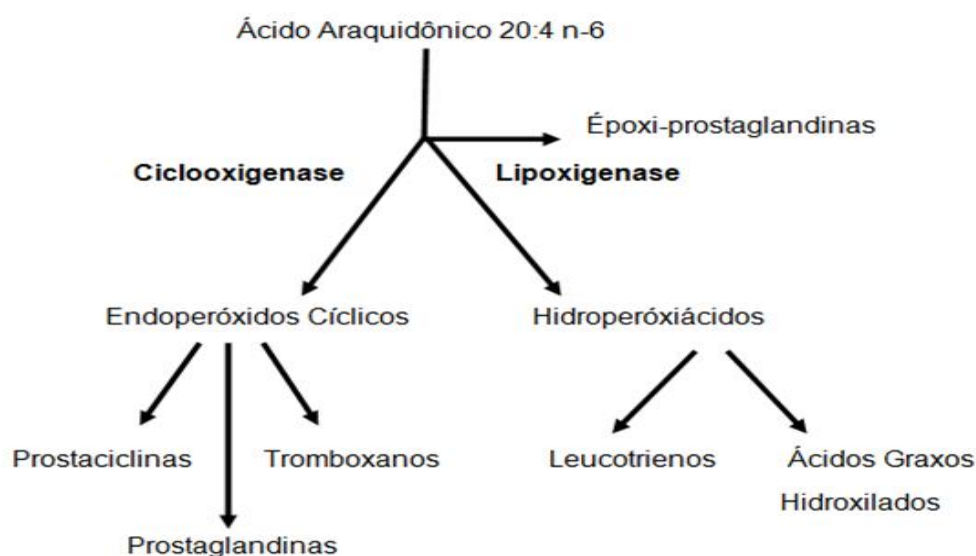
O consumo de gorduras tem sido atribuído por diversos pesquisadores como sendo um agente que aumentaria o risco da incidência de câncer de próstata entre outros tipos de câncer, mais especificamente os ácidos graxos ômega-6 (KELAVKAR et al., 2006).

O ácido linoleico é um ácido graxo de 18 carbonos com duas insaturações e classificado como ômega-6, sendo um precursor do ácido araquidônico. Por se tratar de um ácido graxo essencial precisa ser suprido pela alimentação. Ácidos graxos essenciais são importantes precursores na biossíntese de vários metabólitos (MOTTA, 2005). Após a sua ingestão, o ácido linoleico pode ser oxidado, armazenado em triglicerídeos, incorporado em fosfolípidos de membrana ou alongado e dessaturado em ácido graxo mais insaturado (MARTINS; GRUEZO, 2007).

O metabolismo do ácido araquidônico tem sido estudado como regulador de crescimento neoplásico (HAMMAMIEH et al., 2007), por estimular a formação de eicosanóides e sua sinalização contribui com a propagação do dano celular (SOBERMAN; CHRISTMAS, 2003).

Eicosanóides são substâncias sinalizadoras que atuam como mediadoras do processo inflamatório (FUNK, 2001) e que modulam biologicamente um grande número de processos fisiológicos e patológicos, incluindo a carcinogênese, por intermédio das vias lipoxigenase e ciclooxigenase, (NATHOO et al., 2004), estando estas relacionadas com a iniciação, promoção do câncer, proliferação celular de células tumorais e metástase (BARTSCH, et al. 1999). Estes fatores ocorrem, pois, a atividade de ciclooxigenase (COX) em ácido araquidônico permite a produção de prostaglandinas ou tromboxanos e a atividade lipoxigenase (LOX) produz leucotrienos (ver Figura 5). Duas classes de enzimas são responsáveis pela produção dos eicosanóides, ciclooxigenases (COX) 1 e 2, e lipoxigenases (LOX), 5, 12 e 15 (SOBERMAN; CHRISTMAS, 2003).

Figura 5 - Vias da Ciclooxigenase e Lipoxigenase



Fonte: Adaptado de Martins e Gruezo (2008).

Em experimento com ratos inoculados com células de câncer de mama humano, recebendo dietas contendo 16 ou 24% da energia provenientes do ácido linoleico, houve um incremento no peso do tumor comparado com a dieta que continha o mesmo valor de gordura total, mas somente 4% da energia advinda do ácido linoleico (ROSE et al., 1993; ROSE et al., 1994).

Estudos com humanos e ratos indicaram que uma dieta rica em ácido linoleico pode ser um dos fatores de maior risco para desenvolvimento de câncer de próstata, principalmente naqueles indivíduos com altas concentrações da enzima 15-lipoxigenase-1 no epitélio prostático (KELAVKAR et al., 2006).

Recentemente, estudos demonstraram que a incubação com CLA *trans*-10, *cis*-12 está associada com uma redução na expressão do receptor de membrana HER-2 (Human Epidermal growth factor Receptor-type 2) na proteína HER-2 expresso em linhagem de células de câncer de mama SKBr3 (FLOWERS et al., 2009).

Apesar de o ácido linoleico ter sido considerado um fator para o aumento de câncer de mama, outros ácidos graxos ômega-6, como o ácido linoleico conjugado e ácido  $\gamma$ -linolênico (GLN) têm demonstrado capacidade de inibir o crescimento de câncer *in vivo* e *in vitro* através de vários mecanismos de ação (DOMINGUEZ et al., 2007).

## 2.4 DESCOBERTA DO CLA

Pariza et al. (1979) sugeriram que a carne bovina grelhada possuía um componente carcinogênico. Pouco tempo depois, esse mesmo grupo de pesquisadores identificou que a carne bovina possuía tanto componentes mutagênicos como componentes antimutagênicos, ao contrário do que se acreditava anteriormente (PARIZA et al., 1983).

Em 1985, Pariza e Hargraves em estudos com esta fração da carne bovina administrado para camundongos, observaram efeito capaz de inibir a progressão de tumor em células epiteliais. Posteriormente, o isolamento dessa fração do extrato da carne foi obtido por Ha et al. (1987) onde encontraram quatro isômeros derivados do ácido linoleico e que cada um continha dupla ligação conjugada sendo denominados ácidos linoleicos conjugados (CLA).

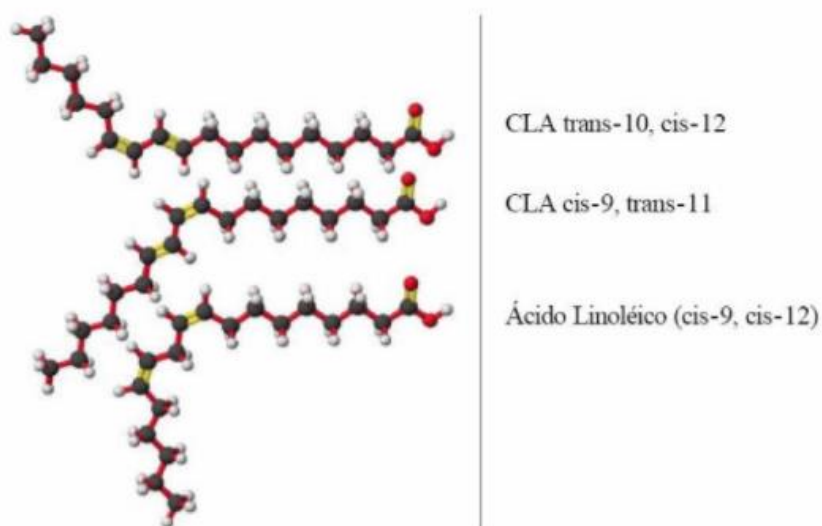
Esses ácidos graxos (CLA) são encontrados em produtos de ruminantes, sendo oriundos da bio-hidrogenação ruminal parcial dos ácidos graxos poliinsaturados que fazem parte da dieta ou, sintetizados endogenamente pelo animal por ação de uma enzima chamada estearoil-CoA-dessaturase ( $\Delta 9$ -dissaturase) a partir do ácido vacênico (*trans*-C18:1), outro intermediário da bio-hidrogenação ruminal dos lipídios da dieta.

## 2.5 ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO (CLA) E CÂNCER

Nos últimos anos, o CLA tem despertado o interesse de muitos pesquisadores devido a sua ação anticarcinogênica. Os dois isômeros mais pesquisados são o *cis*-9, *trans*-11 e o *trans*-10, *cis*-12 (ver Figura 6) e, os modelos mais estudados incluem estudos com células *in*

*vitro* ou *in vivo* utilizando modelos animais, sendo fornecidos via alimentação como isômeros puros, misturas de isômeros ou produtos enriquecidos com CLA.

Figura 6 - Isômeros de CLA *cis* 9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12



Fonte: Adaptado de Pariza et al. (2000).

Várias propriedades fisiológicas têm sido atribuídas ao CLA e sobre os mecanismos pelo qual ele age no organismo inibindo a carcinogênese.

Os dois isômeros principais agem de forma diferente no organismo e o meio pelo qual os isômeros atuam e quais rotas metabólicas estão envolvidas têm sido o principal objetivo para entender sua ação anticarcinogênica.

Os isômeros do CLA podem alterar a iniciação, promoção, progressão e metástase de tumores malignos (ARAB et al., 2016). Esses efeitos podem, em alguns casos, ser atribuídos a alterações na peroxidação lipídica, na composição dos ácidos graxos dos tecidos, no metabolismo de eicosanóides, na expressão gênica, na regulação do ciclo celular, na proliferação de células e apoptose (KELLEY et al., 2007).

Sobre isso, a suplementação com o isômero *cis*-9, *trans*-11 levou ao aumento nos produtos da peroxidação lipídica sendo indicativo do aumento do estresse oxidativo sugerindo que este isômero poderia matar as células cancerosas através desse mecanismo (DEVERY; STANTON, 2001).

Em um estudo com o objetivo de avaliar o efeito de cada isômero sobre os tumores mamários HUBBARD et al. (2002) incorporaram na dieta de ratos, duas doses diferentes (0,1 ou 0,25%) de *cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12 purificados e uma mistura de ambos (0,125%

de cada isômero). Esses autores demonstraram que apesar do *cis-9, trans-11* alterar a tumorigênese e o *trans-10, cis-12* o metabolismo, ambos agiram na redução das metástases tumorais.

A relação entre ciclo celular e apoptose é reconhecida pelos genes que codificam as proteínas c-Myc (fator de transcrição que estimula a progressão do ciclo celular e a apoptose), p53 (bloqueia o ciclo celular em resposta ao DNA danificado), pRb (inibe a progressão do ciclo celular), Ras (induz o crescimento anormal de células de câncer), Bcl-2 (inibidores de ativação das caspases e apoptose), NF- $\kappa$ B (fator de transcrição na regulação da resposta inflamatória capaz de provocar tumorigênese). Após estimulação, essas proteínas podem induzir proliferação celular, parada do ciclo ou morte celular (ANAZETI; MELO, 2007; COOPER, 2001). O CLA atua principalmente nessas proteínas que regulam o ciclo celular (KELLEY et al., 2007).

Ip et al. (2001), observaram redução na morfogênese da glândula mamária, na atividade proliferativa, bem como na proporção de expressão das ciclinas D1 e A no epitélio mamário de ratas suplementadas com CLA e aumentaram os níveis das proteínas p16 e p27 as quais são inibidoras do processo de divisão celular. Através desse estudo, sugeriram que o CLA reduz a proliferação celular bloqueando síntese do DNA e proteínas do ciclo celular que regulam esse processo.

Kemp et al. (2003) trabalharam *in vitro* com células de câncer de mama e observaram o efeito de uma mistura de isômeros do CLA sobre a p53, que é a proteína amplamente conhecida como indutora de parada do ciclo celular e de apoptose e onde mais frequentemente acontecem mutações quando se desencadeia um tumor. Em concentrações citostáticas, o CLA provocou parada do ciclo celular em G1 e induziu o acúmulo dos supressores de tumor p53, p27 e proteína p21.

Lee et al. (2006) observaram que o isômero *trans-10, cis-12* e não o *cis-9, trans-11*, induziu a expressão do gene pro-apoptótico NAG-1 (Non-steroidal anti-inflammatory drug activated gene) em células de câncer coloretal humano. Entre os dois isômeros do CLA testados nesse estudo, apenas o *trans-10, cis-12* foi um inibidor eficaz do crescimento celular e indutor de apoptose.

O efeito do CLA sobre células de câncer de mama foi estudado por Wang et al. (2008,) onde relataram que cerca de 75% dos cânceres de mama possuíam o receptor de estrogênio (ER $\alpha$ ) positivo. O estrogênio causa iniciação, promoção e progressão destes tumores. Nesse estudo o CLA foi testado como tratamento único e em associação com o anti-estrógenotomoxifeno (TAM), uma droga usada no combate de câncer, sendo observado efeito

maior na indução de apoptose quando da presença do CLA e do TAM, sugerindo uma possível associação benéfica do CLA com outras drogas no combate ao câncer. Vale destacar que o isômero do CLA usado neste experimento foi o *trans*-10, *cis*-12.

O estágio de vida dos animais e o momento de administração do CLA podem interferir na magnitude da resposta ao câncer. Ip et al. (1995) observaram que o fornecimento de CLA a ratas antes ou após a administração do carcinogênico apresentou a mesma eficácia antitumor, no qual os melhores resultados foram observados com a alimentação contínua dos animais. Isso foi confirmado quando ratas que receberam CLA durante todo o período de experimento tiveram redução de 50% na incidência do tumor e 70% de redução no número total de tumores (IP et al., 1997). A eficácia do CLA aparentemente resultou da sua habilidade em reduzir a densidade do epitélio mamário durante o estágio proliferativo do desenvolvimento da glândula mamária (THOMPSON et al., 1997).



### **3 HIPÓTESES**

Os isômeros do CLA irão reduzir a expressão gênica dos genes anti-apoptóticos;

Os isômeros do CLA irão aumentar a expressão gênica dos genes pró-apoptóticos e responsáveis pela regulação do ciclo celular;



## 4 OBJETIVOS

A seguir, explicita-se o objetivo geral e os objetivos específicos do trabalho.

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Determinar se os isômeros de CLA têm efeitos benéficos sobre a expressão de genes envolvidos no ciclo celular e apoptose das células neoplásicas.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) avaliar se os diferentes isômeros de CLA são capazes de alterar a expressão de genes responsáveis pela regulação do ciclo celular: (inibidora de quinase dependente de ciclina 1 – p21, proteína supressora de tumor - p53, quinase dependente de ciclina – CDK1, reguladora negativa de p53 – Mdm-2);
- b) avaliar se os diferentes isômeros de CLA são capazes de alterar a expressão de genes responsáveis pela regulação da apoptose: proteína pró-apoptótica – BAX, proteína anti-apoptótica BCL-2, fator de ativação de protease apoptótica 1 – Apaf-1 e Caspase-3.



## 5 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do CAV/UDESC sob o protocolo nº 01.13.14, e foi realizado no Laboratório de Virologia do Centro de Diagnóstico Microbiológico (CEDIMA) do Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC). O material biológico foi obtido das cirurgias feitas em duas fêmeas caninas, adultas, após realização de exame clínico, exame oncológico, hemograma completo, bioquímica sérica, provenientes da rotina do Hospital de Clínica Veterinária do CAV/UDESC, os quais foram encaminhados para mastectomia.

Foram realizados dois experimentos, nos quais foram analisados dois tipos diferentes de tumores, porém, ambos sendo malignos. O primeiro tumor (TUMOR I) é caracterizado como Carcinoma anaplásico de mama e o segundo tumor (TUMOR II) é um Carcinoma tubulopapilar de mama (ver Figura 7 A e B). As análises foram realizadas igualmente para os dois tumores.

Cada explante foi separado com uma agulha fina em 18 pequenos pedaços ( $n = 6$  por tratamento), com peso médio de  $80 \pm 2$  mg e cultivado em placas de 35 mm (Nunc - Nunc, Roskilde, Denmark), em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM-Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil), por 24h em incubadora a 37°C com 5% CO<sub>2</sub> e umidade saturada utilizando os seguintes tratamentos: a) Controle: meio de cultivo + BSA livre de ácidos graxos; b) CLA *cis*-9, *trans*-11 (75 μmol de ácido linoleico conjugado *cis*-9, *trans*-11); c) CLA *trans*-10, *cis*-12 (75 μmol de ácido linoleico conjugado *trans*-10, *cis*-12), complexados a albumina sérica bovina (BSA) livre de ácidos graxos. Após as 24h de cultivo, os explantes foram retirados das placas, alocados em tubos contendo QiAzol Lysis Reagent (Qiagen Sciences; Germantown, MD, EUA) e submetidos a "moagem" com homogeneizador de tecidos portátil (Scienlabor - Ribeirão Preto, SP, Brasil) para posterior extração do RNA total, que foi realizado com a utilização do Kit RNeasy Lipid Tissue (Qiagen Sciences). A possível contaminação por DNA foi removida por tratamento com DNase (Sigma-Aldrich) "oncolumn". A pureza do RNA foi verificada utilizando-se espectrofotômetro NanoDrop, ND-2000 (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, EUA) e a qualidade avaliada através da relação A260/280 nm que foi  $\sim 2,10 (\pm 0,02)$ .

Posteriormente realizou-se a síntese do DNA complementar (cDNA) utilizando o Kit GeneAmp (Applied Biosystems; Foster City, CA, EUA) com "random primers" em aparelho termociclador (MJ96+, Biocycler; Biosystems Importadora, Curitiba - PR, Brasil).

O RT-qPCR foi realizado em triplicatas, em placa de 48 poços (Micro Amp, AppliedBiosystems), com volume de reação de 15  $\mu$ L, sendo 5  $\mu$ L (30 ng) de cDNA e 10  $\mu$ L de GoTaqPCR Master Mix (Promega; Madison, WI, EUA), no aparelho StepOne Real-Time (AppliedBioSystems), com o uso de “primers” específicos para cada um dos genes avaliados (ver Tabela 1), testados previamente. Os dados foram analisados com o software StepOne versão 2.1 (AppliedBiosystems). As curvas de dissociação foram geradas no final de cada execução para verificar a presença de um único produto. Todas as amostras foram executadas com uma curva padrão de sete pontos com um “pool” de cDNA de todas as amostras com diluição seriada (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 e 1,5625%). Posteriormente, uma equação de regressão foi gerada ao traçar os valores de limiar do ciclo de RT-qPCR em relação ao log de cada valor da curva padrão. A inclinação (b) da equação descreveu a eficiência da reação. Todas as reações apresentaram coeficiente de determinação superior a 0,98 e eficiência entre 90 e 110%. Os genes de interesse foram: p53 (Proteína supressora de tumor 53); p21 (Inibidora de quinase dependente de ciclina 1); Cdk1 (Quinase dependente de ciclina 1); Bcl2 (Proteína anti-apoptótica); Apaf-1 (Fator-1 de ativação de protease apoptótica); Mdm2 (Reguladora negativa de p53); Bax (Proteína pró-apoptótica); Caspase-3. Os dados foram analisados pelo programa estatístico SAS (SAS Institute; Cary, NC, EUA, versão 9.2, 2009), utilizando o procedimento MIXED. O modelo utilizado incluiu o tratamento e as amostras como efeitos fixos. Foi utilizado como co-variável a média geométrica dos “housekeeping” proteína ribossômica S18 (RPS18) e proteína ribossômica S19 (RPS19) (VANDESOMPELE et al., 2002). Os valores de resíduos estudentizados fora de  $\pm 2,5$  foram considerados “outliers” e excluídos da análise. Quando necessário, os dados foram transformados para  $\log_2$  e reportados transformados de volta aos valores originais. O LSMEANS foi usado para comparar os tratamentos, sendo a significância declarada em  $P < 0,05$  e a tendência em  $P < 0,10$ .

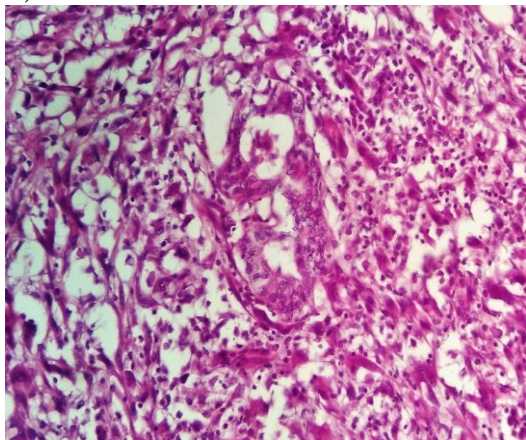
Tabela 1. Primers caninos usados na análise de PCR quantitativo em tempo real

<b>Gene</b>	<b>Forward Primer</b>	<b>Reverse Primer</b>
<b>p53</b>	CCGCGCTATGGCCATCTAT	GGCAAGACCGTCACTACTGTCA
<b>p21</b>	CAGCTGAACAAGGAGTCAGATGTT	GGGCCAGAAGAGACAATAACTCA
<b>Cdk1</b>	AGATTCCATCCCTCCTGGTCA	TGCAGAACTCTTCTGGAGTGG
<b>Mdm2</b>	ATCAGGCAGGGGAGAGTGAT	CACGAAGGGCCCAACCTCTA
<b>Apaf-1</b>	GAAGACAGTCCTGTGTGAGGG	CCCAACAACCTGCCATTCCACAT
<b>Bax</b>	GCCCTTTTGCTTCAGGGTTTC	CGATGCGCTTGAGACATTCG
<b>Bcl-2</b>	AATCAAGTGTTCCGCGTGACT	GGCCCCGAAGGTAAGGAATA
<b>Caspase-3</b>	TTCATTATTCAGGCCTGCCGAGG	TTCTGACAGGCCATGTCATCCTCA
<b>RPS19</b>	CTCTGGCAGCCTTCCTCA	TCATCGTAGGGAGCAAGCT
<b>S18</b>	GCCTTTGCCATCACAGCAAT	TGAGCTCTCCTGCTCTCTTGGT

Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

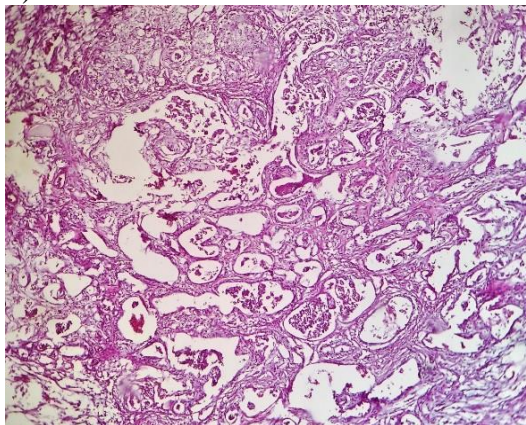
Figura 7 - Histologia dos explantes de tumores mamários de fêmeas caninas (A) Carcinoma anaplásico de mama (B) Carcinoma tubulopapilar de mama

A)



Carcinoma anaplásico de mama (40x, hematoxilina e eosina)

B)



Carcinoma tubulopapilar de mama (20x, hematoxilina e eosina)

Fonte: Lâminas histológicas cedidas pelo laboratório de Patologia Animal (LPA), CAV/UDESC, 2017.



## 6 RESULTADOS

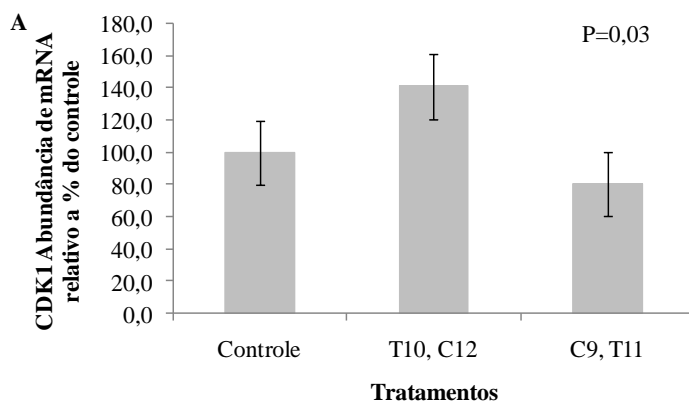
A seguir explicitam-se os resultados do trabalho.

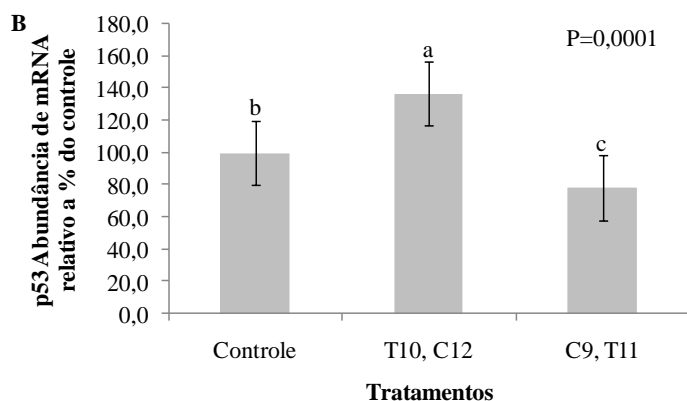
### 6.1 TUMOR I – CARCINOMA ANAPLÁSICO DE MAMA

Foi medida a expressão de oito genes que codificam as proteínas reguladoras do ciclo celular e apoptose, sendo elas: p53, p21, Mdm-2 e Cdk1 (Ciclo celular); Bax, Bcl-2, Apaf-1 e Caspase-3 (Apoptose).

Na Figura 8 (A) pode-se observar que o tratamento CLA *trans*-10, *cis*-12 aumentou em 41% ( $P=0,03$ ) a expressão da quinase dependente de ciclina (CDK1) quando comparado ao controle. Similarmente, quando comparado ao controle, este mesmo tratamento aumentou em 36% a expressão gênica da proteína p53 (Figura 8B). Em contraste, quando comparado ao controle, os tratamentos CLA (*trans*-10, *cis*-12 e *cis*-9, *trans*-11) não alteraram a expressão gênica dos outros genes que codificam as proteínas avaliadas e envolvidas na regulação do ciclo celular como a p21 ( $P=0,8$ ) e Mdm-2 ( $P=0,7$ ) (ver Tabela 2).

Figura 8 - Expressão gênica da CDK1 (A) e p53 (B) no TUMOR I





Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

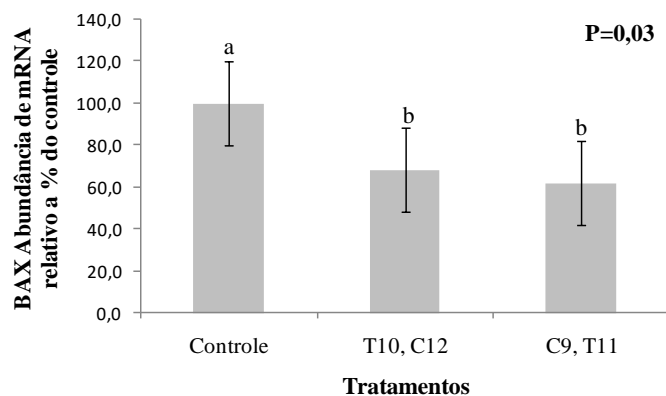
Tabela 2–Expressão dos genes responsáveis pelo ciclo celular e apoptose no TUMOR I

Gene	Tratamentos			SEM	Valor - P
	Controle	T10, C12	C9, T11		
<b>p21</b>	0,7844	0,8197	0,7564	0,92	0,89
<b>Mdm-2</b>	1,1501	0,9736	1,0053	0,15	0,71
<b>Bcl2</b>	0,6618	0,8766	0,8008	0,10	0,35
<b>Apaf-1</b>	0,854	0,8178	0,7312	0,09	0,64
<b>Caspase-3</b>	1,1467	1,3231	1,1632	0,13	0,59

Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Em relação aos genes envolvidos na regulação da apoptose ambos os isômeros de CLA *trans*-10, *cis*-12 e *cis*-9, *trans*-11, quando comparados ao controle, reduziram a expressão gênica do gene que codifica a proteína pró-apoptótica BAX em 32 e 38% respectivamente (ver Figura 9). Com relação à expressão gênica dos genes codificadores das outras proteínas apoptóticas analisadas, os tratamentos não tiveram efeito, sendo elas: Bcl-2 (P=0,3), Apaf-1 (P=0,6) e Caspase-3 (P=0,5) (ver Tabela 2).

Figura 9 – Expressão gênica da BAX no TUMOR I

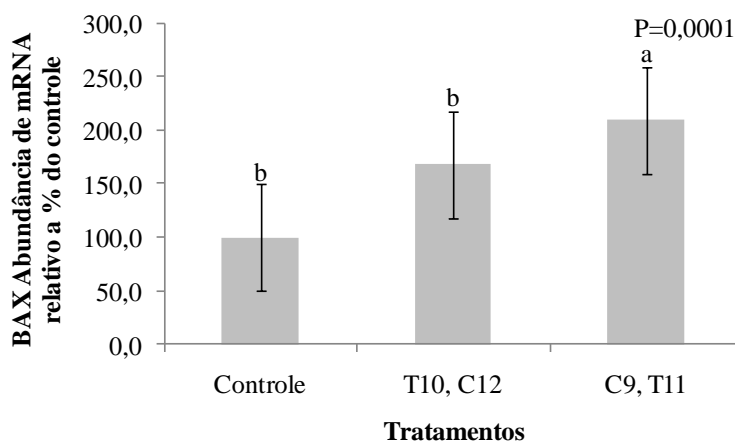


Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

## 6.2 TUMOR II – CARCINOMA TUBULOPAPILAR DE MAMA

O tratamento CLA *cis*-9, *trans*-11 aumentou a expressão gênica ( $P=0,0001$ ) do gene que codifica a proteína pró-apoptótica BAX em 110% (ver Figura 10) quando comparado ao controle.

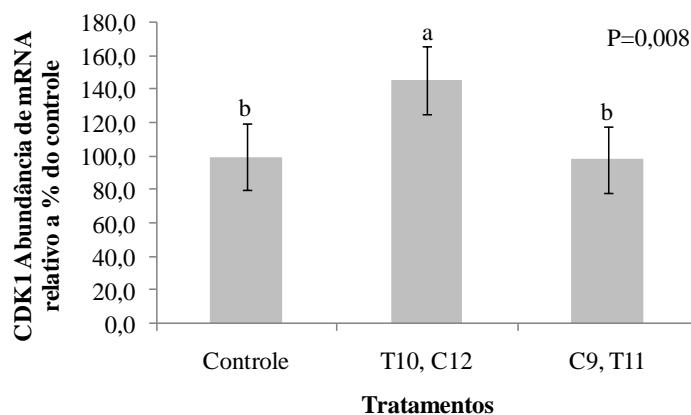
Figura 10 – Expressão gênica da BAX no tumor II



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Os outros genes que codificam as outras proteínas que estão diretamente relacionadas a apoptose não sofreram efeito dos tratamentos quando comparados ao controle (Bcl-2,  $P=0,2$ ; Apaf-1,  $P=0,8$  e Caspase-3,  $P=0,5$ ) (ver Tabela 3). Já o tratamento com o isômero CLA *trans*-10, *cis*-12 aumentou em 45% a expressão gênica do gene codificador da proteína CDK1 (ver Figura 11) quando comparado ao controle.

Figura 11– Expressão gênica da CDK1 no tumor II



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

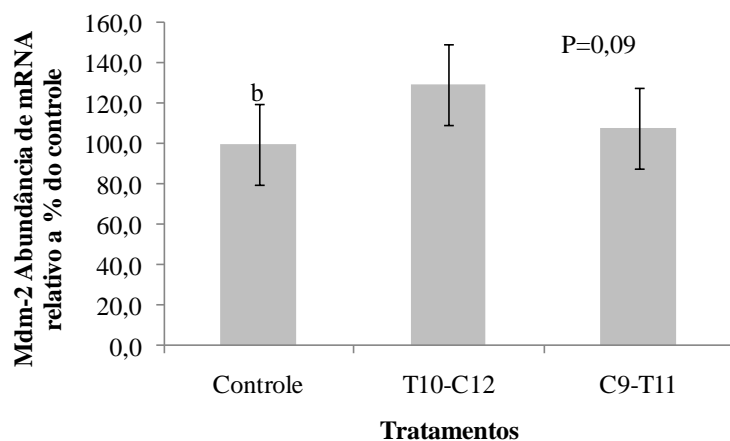
Os dois tratamentos não exerceram efeito na expressão gênica dos genes codificadores das demais proteínas diretamente relacionadas ao ciclo celular, como p53 (P=0,3), p21 (P=0,1), (ver Tabela 3) mas houve uma tendência em aumentar a expressão do gene que codifica a proteína Mdm-2 (P=0,09) em 29% para o tratamento CLA *trans*-10, *cis*-12, quando comparado ao controle (ver Figura 12).

Tabela 3 – Expressão dos genes responsáveis pelo ciclo celular e apoptose no TUMOR II

Gene	Tratamentos			SEM	Valor - P
	Controle	T10, C12	C9, T11		
<b>p21</b>	0,8506	0,6483	0,8945	0,09035	0,15
<b>p53</b>	0,7623	0,7555	0,9055	0,08134	0,36
<b>Bcl2</b>	0,4959	0,7502	0,6594	0,1112	0,29
<b>Apaf-1</b>	1,1273	1,0132	1,0998	0,1357	0,82
<b>Caspase-3</b>	0,6983	0,7347	0,8256	0,08953	0,54

Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Figura 12 - Expressão gênica da MDM-2 no tumor II



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

## 7 DISCUSSÃO

Apesar da frequente incidência de tumores mamários caninos, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares de sua progressão maligna. A respeito disso, o que vários estudos têm demonstrado, é que o descontrole na progressão do ciclo celular seja uma das causas na qual está malignidade é estabelecida (KLOPFLEISCH; GRUBER, 2008).

O tratamento CLA *trans*-10, *cis*-12 aumentou a expressão gênica do gene codificador da quinase dependente de ciclina CDK1 em ambos os tumores avaliados. Essas proteínas quinases quando associadas às suas ciclinas fosforilam uma variedade de substratos alvos impulsionando a progressão do ciclo celular. Em especial, a CDK1 associada à ciclina B impulsiona a célula a entrar em mitose. Isso é um indício de que a célula tenha recebido estímulo para prosseguir a fase mitótica do ciclo celular quando cultivada com este isômero de CLA, o que repercute de forma negativa por estimular o ciclo celular nas células tumorais. Sobre o efeito do CLA *trans*-10, *cis*-12, Ip et al. (2007) com o intuito de avaliar a eficácia de isômeros (*cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12) de CLA em um modelo de câncer de mama clinicamente relevante, incorporaram na dieta de camundongos transgênicos (com uma alta expressão do gene ErbB2 no epitélio mamário) a partir do desmame, uma mistura dos isômeros ou os dois separadamente e verificaram que o tratamento com CLA *trans*-10, *cis*-12 estimulou a hiperplasia lobular do epitélio mamário e o desenvolvimento do tumor, diminuindo a latência para 168 dias de idade em comparação com 256 e 270 dias nos grupos dos tratamentos CLA *cis*-9, *trans*-11 e controle (sem CLA), respectivamente. Após esses resultados os autores sugeriram que seria prudente evitar suplementos de CLA contendo o isômero *trans*-10, *cis*-12, pois os efeitos deste isômero não eram específicos para os camundongos transgênicos como também aumentou a proliferação do epitélio mamário em ambos, ratos FVB/tipo selvagem e FVB/ErbB2. De forma similar, Meng et al. (2008), com o objetivo de estender o trabalho realizado por Ip et al. (2007), propuseram avaliar se o efeito estimulador de tumorigênese no epitélio mamário de ratos ErbB2 seria mantido com a administração prolongada de CLA *trans*-10, *cis*-12 na dieta e verificaram que este isômero estimulou a sobrevivência e a proliferação celular dos tumores. Neste estudo, sugerimos que esse isômero de CLA estimulou a proliferação celular nos explantes do carcinoma anaplásico, mesmo tendo sido observado o aumento na expressão do gene que codifica a proteína p53, possivelmente não se estabilizando a ponto de permitir um bloqueio do ciclo celular ou induzir a apoptose, visto que, nesse tratamento não se observou efeito tanto para o gene que codifica a proteína inibidora de CDK, p21, quanto para o gene que codifica a proteína pró-

apoptótica Bax. Ainda, Ip et al. (2007), discutiram que apesar do CLA *cis-9, trans-11* não ter sido eficaz no modelo ErbB2, sua capacidade de inibir o desenvolvimento de tumores mamários de ratos sugere que este isômero possa ter atividade para prevenção de alguns tipos de câncer de mama.

Neste estudo, o tratamento CLA *cis-9, trans-11* quando comparado ao controle, aumentou em 110% a expressão do gene que codifica a proteína pró-apoptótica BAX no carcinoma túbulopapilar atuando contrariamente à proliferação celular. Sendo a morte celular apoptótica governada por um grande número de genes cujos produtos proteicos atuam como interruptores moleculares de forma positiva ou negativa (IP et al., 2000), a indução de apoptose por CLA pode ser associada à redução da proteína anti-apoptótica Bcl-2 dentro das lesões (BELURY, 2002). No presente estudo, não foi observado um efeito de tratamento para ambos isômeros de CLA sobre a expressão do gene que codifica a proteína Bcl-2 nos dois experimentos, sugerindo que essa proteína não desempenhou um papel crítico em inibir a apoptose nas células tumorais. A expressão *p53* após o tratamento com CLA *cis-9, trans-11* não sofreu efeito de tratamento, o que nos sugere que os explantes do carcinoma tubulopapilar possam ter recebido estímulo para apoptose por intermédio de um mecanismo independente de *p53*. Sendo as proporções relativas entre a proteína anti-apoptótica Bcl-2 com os análogos pró-apoptóticos Bax e Bcl-Xs que determinam a apoptose (MAJUNDER et al. 2002) e tendo sido observado um aumento na expressão da Bax por intermédio do tratamento CLA *cis-9, trans-11* no tumor II, sinaliza que este isômero de CLA induz a célula tumoral a entrar em apoptose.

De maneira semelhante, em um estudo para avaliar a indução de apoptose em ratas com estruturas mamárias normais versus pré-malignas, alimentadas com CLA *cis-9,trans-11*, Ip et al. (2000), utilizaram o método de imunohistoquímica para verificar a expressão das proteínas que regulam a apoptose (Bcl-2, Bax e Bak). Os autores citados anteriormente não observaram um efeito de CLA em Bak e Bax, no entanto, detectaram uma baixa regulação da proteína anti-apoptótica Bcl-2 pelo CLA nas células pré-malignas e sendo o aumento da expressão da Bcl-2 associada a não ocorrência de apoptose nas células, estes autores sugerem que este isômero de CLA induziu apoptose por intermédio deste mecanismo.

No presente estudo, a utilização de métodos por intermédio de teste de apoptose para verificação de morte celular dos explantes cultivados com os diferentes isômeros de CLA em ambos os tumores se faz necessário para definirmos os pontos finais biológicos que definem esse processo.

## 8 CONCLUSÕES

O CLA *cis*-9, *trans*-11 estimula a apoptose no carcinoma tubulopapilar de mama e o CLA *trans*-10, *cis*-12 estimula a progressão do ciclo celular tumoral no carcinoma carcicnoma anaplásico de mama e carcinoma tubulopapilar de mama.





## 9 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O método de PCR quantitativa em tempo real é uma ferramenta de extrema importância na quantificação de RNA's mensageiros em baixos níveis, tornando a quantificação rápida, com alta sensibilidade, praticidade e exatidão. Neste estudo, a escolha dos genes para terem sua expressão quantificada foi baseada em dados de literatura e informações sobre as vias de regulação do ciclo celular e apoptose das células. A obtenção dos nossos resultados ocorreu por intermédio de um ensaio bem delineado levando em consideração controle, número de repetições para uma maior acurácia que foram posteriormente validadas por métodos estatísticos.

Neste estudo, mesmo com a aplicação desta técnica que nos propiciou melhores compreensões dos mecanismos celulares e fisiológicos que ocorreram com as amostras expostas aos diferentes tratamentos, fazer uso de outras análises para obtermos um maior entendimento e clareza dos nossos resultados seria de grande valia. Muitas são as alterações morfológicas que ocorrem na célula durante a apoptose e baseada na detecção de tais alterações, diferentes metodologias são amplamente empregadas para esta avaliação. Para ambos os tumores foi retirada uma amostra referente a cada tratamento e armazenadas em freezer -80°C para essas posteriores possíveis análises. Por exemplo, o teste de apoptose seja ele pelo uso da técnica de citometria de fluxo com kit apoptótico específico ou por intermédio de outras técnicas como western-blot para verificação da ativação das caspases, entre outros, seria de grande valia para observamos uma possível indução de apoptose pelos nossos tratamentos nos diferentes tipos de tumores avaliados.

Ainda, avaliar a expressão gênica das ciclinas que estão envolvidas nas fases de síntese de DNA e mitose das células nos daria um maior aporte para identificarmos se os respectivos isômeros de CLA avaliados neste estudo estimularam ou inibiram a proliferação celular em ambos os tumores. Um exemplo disso seria a avaliação das ciclina E responsável pela Fase - G1/S, ciclina A (Fase - S) e ciclina B (Fase M).



## REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. et al. Câncer: In:\_\_\_\_\_. **Biologia Molecular da Célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. cap. 23.
- ANAZETTI, M. C.; MELO, P. S. Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **MetroCamp. Pesquisa**, Campinas, v. 1, p. 37-58, 2007.
- ARAB, A. et al. The effects of conjugated linoleic acids on breast cancer: A systematic review. **Advanced Biomedical Research**, [S.l.], v. 5, 2016.
- ARRUDA, J. T. et al. Proteína P53 e o Câncer: controvérsias e esperanças. **Estudos**, Goiânia, GO, v. 35, n. 1, p. 123-141, 2008.
- BARRETT, J. C.; WISEMAN, R. W. Cellular and molecular mechanisms of multistep carcinogenesis: relevance to carcinogen risk assessment. Local: PMC. **Environmental Health Perspectives**, [S.l.], v. 76, p. 65, 1987.
- BEIKZADEH, B.; DELIREZH, N. Morphological features of cell death through microscopic view. Local: **Research in Molecular Medicine**, [S.l.], v. 2, n. 4, p. 1-2, 2014.
- BELURY, M. A. Inhibition of carcinogenesis by conjugated linoleic acid: potential mechanisms of action. **The Journal of nutrition**, [S.l.], v. 132, n. 10, p. 2995-2998, 2002.
- BUDIARDJO, I. et al. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Annual review of cell and developmental biology**, [S.l.], v. 15, n. 1, p. 269-290, 1999.
- CARMELIET, P; JAIN, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nature**, [S.l.], v. 407, n. 6801, p. 249-257, 2000.
- COOPER, G. M. **A célula: uma abordagem molecular**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.
- DEVERY, R., MILLER, A., STANTON, C. Conjugated linoleic acid and oxidative behaviour in cancer cells. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 29, p. 341-344, 2001.
- DOMINGUEZ, M. G., JIANG, X., CASTELAO. Lipid peroxidation, oxidative stress genes and dietary factors in breast cancer protection: a hypothesis. **Breast Cancer Research**, [S.l.], v. 9, p. 201, 2007.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic pathology**, [S.l.], v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

FLOWERS M, THOMPSON P.A. t10c12 Conjugated Linoleic Acid Suppresses HER2 Protein and Enhances Apoptosis in SKBr3 Breast Cancer Cells: Possible Role of COX. **PLosone** [S.l.], v. 4, p. 1-9, 2009.

FONSECA, C. S., DALECK, C. R. Neoplasias mamárias em cadelas: Influência hormonal e efeitos da ovário-histerectomia como terapia adjuvante. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, p. 731-735, 2000.

FUNK, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. **Science**, [S.l.], v. 294, n. 5548, p. 1871-1875, 2001.

GRIINARI, J. M. et al. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by  $\Delta 9$ -desaturase. **The Journal of Nutrition**, [S.l.], v. 130, n. 9, p. 2285-2291, 2000.

GRIVICICH, I. et al. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

HAMMAMIEH, R et al. Control of the growth of human breast cancer cells in culture by manipulation of arachidonate metabolism. **BMC cancer**, [S.l.], v. 7, p. 138, 2007.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, [S.l.], v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HARRIS, C. C. p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic-an abridged historical perspective. **Carcinogenesis**, [S.l.], v. 17, n. 6, p. 1187-1198, 1996.

HUBBARD, N. E., LIM, D., ERICKSON, K.L. Effect of separate conjugated linoleic acid isomers on murine mammary tumorigenesis. **Cancer Letters**, [S.l.], v. 190, p. 13-19, 2002.

IP, C. et al. Induction of apoptosis by conjugated linoleic acid in cultured mammary tumor cells and premalignant lesions of the rat mammary gland. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, Philadelphia, v. 9, n. 7, p. 689-696, 2000.

- IP, C. et al. Retention of conjugated linoleic acid in the mammary gland is associated with tumor inhibition during the post-initiation phase of carcinogenesis. **Carcinogenesis**, [S.l.], v. 18, p. 755–759, 1997.
- IP, C., SCIMECA, J.A., THOMPSON, H. Effect of timing and duration of dietary conjugated linoleic acid on mammary cancer prevention. **Nutrition and Cancer**, [S.l.], v. 24, p. 241–247, 1995.
- IP, M. M. et al. The t10, c12 isomer of conjugated linoleic acid stimulates mammary tumorigenesis in transgenic mice over-expressing erbB2 in the mammary epithelium. **Carcinogenesis**, [S.l.], v. 28, n. 6, p. 1269-1276, 2007.
- JACK, G.S et al. Reduced 15-lipoxygenase-2 immunostaining in prostate adenocarcinoma: correlation with grade and expression in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. **Human Pathology**, [S.l.], v. 31, p. 1146-1154, 2000.
- KELAVKAR et al. Prostate Tumor Growth and Recurrence Can Be Modulated by the N-6:N-3 Ratio in Diet: Athymic Mouse Xenograft Model Simulating Radical Prostatectomy. **Neoplasia**, [S.l.], v. 8, p. 112-124, 2006.
- KELLEY, N. S., HUBBARD, N. E., ERICKSON, K. L. Conjugated Linoleic Acid Isomers and Cancer. **Journal of Nutrition**. [S.l.], v. 137, p. 2599–2607, 2007.
- KEMP, M. Q., JEFFY, B. D., ROMAGNOLO, D. F. Conjugated Linoleic Acid Inhibits Cell Proliferation through a p53-Dependent Mechanism: Effects on the Expression of G1-Restriction Points in Breast and Colon Cancer Cells1. **Journal of Nutrition**, [S.l.], v. 133, p. 3670–3677, 2003.
- KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British journal of cancer**, [S.l.], v. 26, n. 4, p. 239, 1972.
- KLOPFLEISCH, R.; GRUBER, A. D. Differential expression of cell cycle regulators p21, p27 and p53 in metastasizing canine mammary adenocarcinomas versus normal mammary glands. **Research in veterinary science**, [S.l.], v. 87, n. 1, p. 91-96, 2009.
- LEE, S. et al. Conjugated linoleic acid stimulates an anti-tumorigenic protein NAG-1 in an isomer specific manner. **Carcinogenesis**, [S.l.], v. 27, p. 972–981, 2006.

LIU, D. et al. Molecular Homology and Difference between Spontaneous Canine Mammary Cancer and Human Breast Cancer. **CancerResearch**, [S.l.], v. 74, n.18, p. 5045-5056, 2014.

MAJUMDER, B et al. Conjugated linoleic acids (CLAs) regulate the expression of key apoptotic genes in human breast cancer cells. **The FASEB Journal**, [S.l.], v. 16, n. 11, p. 1447-1449, 2002.

MARTINS, J. M.; GRUEZO, N. D. Ácido graxo W-6 na etiologia do câncer de cólon e reto. **Revista Brasileira De Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 55, n. 1, p. 69-74, 2009.

MCENTEE, M. F et al. Dietary n-3 Polyunsaturated Fatty Acids Enhance Hormone Ablation Therapy in Androgen- Dependent Prostate Cancer. **American Journal Pathology**, [S.l.], v. 173, p. 229–241, 2008.

MENG, X. et al. t10, c12-Conjugated linoleic acid stimulates mammary tumor progression in Her2/ErbB2 mice through activation of both proliferative and survival pathways. **Carcinogenesis**, [S.l.], v. 29, n. 5, p. 1013-1021, 2008.

MOTTA, V. T. **Bioquímica**. Caxias do Sul: EDUCS, 2005. 332 p. v. 1.

NASIR, L. et al. Telomere Lengths and Telomerase Activity in Dog Tissues: A Potential Model System to Study Human Telomere and Telomerase Biology. **Neoplasia**, [S.l.], v. 3, n. 4, p. 351-359, 2001.

NATHOO, N.; BARNETT, G. H.; GOLUBIC, M. The eicosanoid cascade: possible role in gliomas and meningiomas. **Journal of clinical pathology**, [S.l.], v. 57, n. 1, p. 6-13, 2004.

NICHOLSON, D. W.; THORNBERRY, N. A. Caspases: killer proteases. **Trends in biochemical sciences**, [S.l.], v. 22, n. 8, p. 299-306, 1997.

OCHOA, J. et al. Conjugated linoleic acids (CLAs) decrease prostate cancer cell proliferation: different molecular mechanisms for *cis*-9, *trans*-11 and *trans*-10, *cis*-12 isomers. **Carcinogenesis**, [S.l.], v. 25, 1185–1191, 2004.

OREN, M. Decision making by p53: life, death and cancer. **Cell Death & Differentiation**, [S.l.], v. 10, n. 4, p. 431-442, 2003.

PAMPLONA et al. Progressive telomere dysfunction causes cytokinesis failure and leads to the accumulation of polyploid cells. **PLoS Genetics**, [S.l.], v. 8, n.4, p. 1-11, 2012.

PAOLONI, M.; KHANNA, C. Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. **Nature Reviews Cancer**, [S.l.], v. 8, n. 2, p. 147-156, 2008.

PARIZA, M. W. et al. Mutagens and modulator of mutagenis in fried ground beef. **CancerResearch**, [S.l.], v. 43, p. 2444-2446, 1983.

PARIZA, M. W.; PARK, Y; COOK, M. E. Mechanisms of action of conjugated linoleic acid: evidence and speculation. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, [S.l.], v. 223, n. 1, p. 8-13, 2000.

PARIZA, M. W.; HARGRAVES, W.A. A beef derived mutagenesis modulator inhib its initiation of mouse epidermal tumor by 7,12-dimethylbenz [a]anthracene. **Carcinogenesis**, [S.l.], v.6, p. 591-593, 1985.

PARK, M., LEE, S. Cell cycle and cancer. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, [S.l.], v. 36, p. 60-65, 2003.

PARODI, P.W. Cow's milk fat components as potential anticarcinogenicagents. **Journal Nutrition**, [S.l.], v. 127, p. 1055-1060, 1997.

ROSE, D. P., CONNOLLY, J. M., LIU, X. H. Effects of Linoleic Acid on the Growth and Metastasis of Two Human Breast Cancer Cell Lines in Nude Mice and the Invasive capacity of These Cell Lines in Vitro1. **Cancer Research**, [S.l.], v. 54, p. 6557-6562, 1994.

ROSE, D. P. et al. Effects of diets containing different levels of linoleico acid on humam breast cancer growth and lung metastasis in nude mice. **Cancer Research**, [S.l.], v. 53, p. 4686-4690, 1993.

ROSE, D. P.; CONNOLLY, J. M. Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. **Pharmacology & therapeutics**, [S.l.], v. 83, n. 3, p. 217-244, 1999.

SHAY, J. W.; BACCHETTI, S. A survey of telomerase activity in human cancer. **European journal of cancer**, [S.l.], v. 33, n. 5, p. 787-791, 1997.

SIDDIQUI, R.A. et al. Omega 3-fatty acids: health benefits and cellular mechanisms of action. **Medicinal Chemistry**, [S.l.], v. 4, p. 859-871, 2004.

SOBERMAN, R. J.; CHRISTMAS, P. The organization and consequences of eicosanoid signaling. **Journal of Clinical Investigation**, [S.l.], v. 111, n. 8, p. 1107, 2003.

STRIPP, C. et al. Fish Intake Is Positively Associated with Breast Cancer Incidence Rate. **Journal of Nutrition**, [S.l.], v. 133, p. 3664–3669, 2003.

THOMPSON, H. et al. Morphological and biochemical status of the mammary gland as influenced by conjugated linoleic acid: Implication for a reduction in mammary cancer risk. **Cancer Research**, [S.l.], v. 57, p. 5067–5072. 1997.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, [S.l.], v. 3, p.1-12, 2002.

VOGELSTEIN, B., KINZLER, K.W. p53 function and dysfunction. **Cell**, [S.l.], v. 70, p. 523-526, 1992.

WANG, L. et al. Conjugated linoleic acid induces apoptosis through estrogen receptor alpha in human breast tissue. **BMC Câncer**, [S.l.], v. 8. 2008.

ZIEGLER U, GROSCURTH P. Morphological features of cell death. **News Physiology Science**, [S.l.], v. 19, n.3, p.124-128, 2004.

ZIYAD, S.; IRUELA-ARISPE, M. L. Molecular mechanisms of tumor angiogenesis. **Genes & Câncer**, [S.l.], v. 2, n. 12, p. 1085-1096, 2011.