AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO E DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO DE LINHAGENS NEURONAIS TRATADAS COM ÁCIDOS GRAXOS POLINSATURADOS

Letícia Borges (PIBIC/Fundação Araucária/UEPG), Marcia Helena Appel (Orientador), e-mail: marciaappel@yahoo.com.br.

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética.

Área e subárea do conhecimento 2.00.00.00-6 Ciências Biológicas, 2.06.00.00-3 Morfologia, 2.06.01.00-0 Citologia e Biologia Celular

Palavras-chave: nutracêutico, óleo de peixe, óleo de fígado de tubarão, oro inca

Resumo

Para entender a relação dos AGPI e proliferação celular foram cultivadas linhagens diferentes (SHSY-5Y, B16F10, B16F1, HeLa e MDCK) na presença de concentrações diferentes (T1e T2) de 3 óleos polinsaturados (óleo de peixe, óleo de fígado de tubarão e oro inca). Em conclusão, os diferentes óleos testados foram capazes de aumentar a taxa proliferativa sendo influenciada pela dose e tipo celular.

Introdução

Os AGPI estão se consolidando como importantes nutracêuticos, adjuvantes em vários tratamentos modulando o sistema imunológico e favorecendo o restabelecimento de funções orgânicas prejudicados por tratamentos como uso de quimioterápicos. Nosso grupo, mostrou recentemente, que mulheres sob tratamento quimioterápico tiveram melhora importante no desempenho pulmonar quando receberam óleo de peixe em comparação ao grupo que não recebeu esta suplementação (SUZUMURA et al., 2016).

Os ácidos graxos polinsaturados (AGPI), em especial os extraídos de peixes, tem sido alvo de diversas pesquisas gerando muitas publicações. Sendo apontados como importantes moduladores da resposta imunológica, além de terem efeitos antitumorais e serem associados a diminuição da caquexia que pode estar presente em determinadas patologias crônicas (HARBIGE, 2003; IAGHER et al., 2013). Foi demonstrado que em eventos traumáticos com comprometimento do sistema nervoso a suplementação com AGPI pode ter um efeito neuroprotetor, levando a uma recuperação funcional importante (MICHAEL-TITUS; PRIESTLEY, 2014).

Tentando determinar o benefício ou não da suplementação com AGPI. E se este benefício está relacionado com o tipo celular estudado, é que se faz necessária uma busca mais aprofundada sobre os efeitos e mecanismos celulares disparados pela presença (suplementação) deste nutracêutico.

Materiais e Métodos

Cultivo celular

As diferentes linhagens celulares estudadas (SHSY-5Y, HeLa, B16F10, B16F1, MDCK) foram mantidas segundo as instruções específicas para cada linhagem. Em linhas gerais: foram cultivadas em meio de cultura líquido apropriado com suplementação com soro fetal bovino (SFB 10%) em estufa com umidade controlada e 5% de CO_2.

Proliferação celular

Os ensaios de proliferação foram realizados utilizando o corante Alamar Blue. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços ($1X10^5$ a $5x10^5$). Foram distribuídas em grupos controle (sem AGPI) e tratados (com OP, OF e OI) mas concentrações 1:100 e 1:200 e foi adicionado o corante vital Alamar Blue (AB) (concentração final 10% v/v). Nos tempos 6h, 24h, 48h e 72h foi realizado o monitoramento da fluorescência (excitação 530nm e emissão 590) ou da mudança de coloração do corante (570nm e 600nm) (AHMED; GOGAL; WALSH, 1994).

Preparação dos tratamentos

Um mililitro de cada um dos AGPI testados e 9 ml de soro fetal bovino (SFB) foram complexados por 16 horas. Deste complexado foi retirado uma quantidade suficiente para preparar uma solução 1:100 ou 1:200 (v/v) (meio de cultura com SFB e os óleos) em meio de cultura apropriado sempre mantendo uma concentração final de SFB de 10%.

Resultados e Discussão

Padronização para os ensaios de proliferação dos tempos e concentração dos AGPI

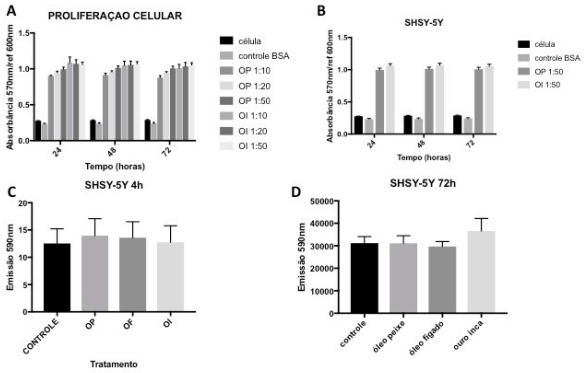


Figura 1 – Ensaio para padronização de tempo e das concentrações de AGPI para tratamento diferentes linhagens celulares. A) Ensaio de proliferação pelo método colorimétrico com Alamar Blue (550nm ref 600nm). Foram testadas diferentes concentrações (1:10, 1:20 e 1:50) dos AGPI OP e OI. B) Ensaio de proliferação com as concentrações mais diluídas dos tratamentos. Método colorimétrico com AB (550nm ref 600nm). C) Ensaio de proliferação no tempo de 4h de tratamento com OP, OF e OI na concentração de 1: 50. Método fluorimétrico com AB. D) Ensaio de proliferação no tempo de 4h de tratamento com OP, OF e OI na concentração de 1: 50. Método fluorimétrico com AB.

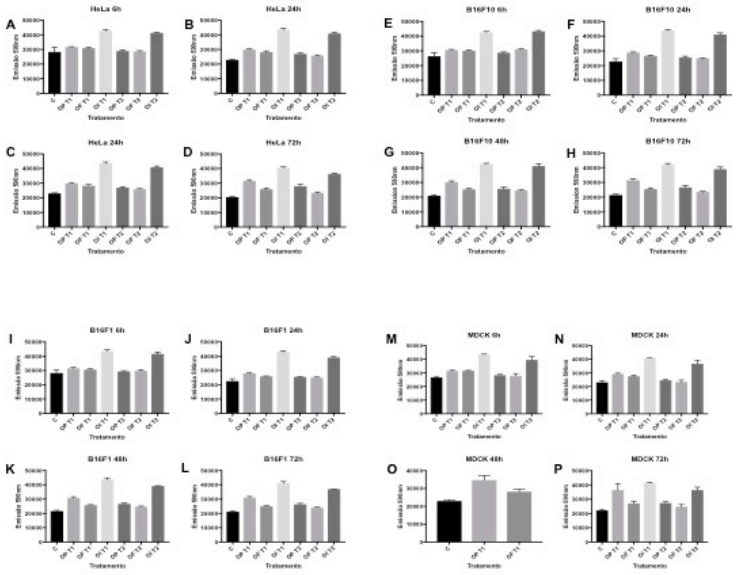


Figura 2 – Ensaio de proliferação celular. A a D) HeLa em 6, 24, 48 e 72h. E a H) B16F10 em 6, 24, 48 e 72h. I a L) B16F1 em 6, 24, 48 e 72h. M a P) MDCK em 6, 24, 48 e 72h. Método AB.

Tabela 1 – Valores de significância dos tratamentos com diferentes AGPI

HeLa

	6h	24h	48h	72h
C vs. OP T1	***	****	****	****
C vs. OF T1	**	****	****	****
C vs. OI T1	****	****	****	****
C vs. OP T2	ns	****	****	****
C vs. OF T2	ns	****	****	****
C vs. OI T2	****	****	****	****
OP T1 vs. OF T1	ns	***	****	****
OP T1 vs. OI T1	****	****	****	****
OP T1 vs. OP T2	**	****	****	****
OP T1 vs. OF T2	**	****	****	****
OP T1 vs. OI T2	****	****	****	****
OF T1 vs. OI T1	****	****	****	****
OF T1 vs. OP T2	ns	**	ns	****
OF T1 vs. OF T2	*	****	****	****
OF T1 vs. OI T2	****	****	****	****
OI T1 vs. OP T2	****	****	****	****
OI T1 vs. OF T2	****	****	****	****
OI T1 vs. OI T2	ns	****	****	****
OP T2 vs. OF T2	ns	*	****	****
OP T2 vs. OI T2	****	****	****	****
OF T2 vs. OI T2	****	****	****	****

B16F10

	6h	24h	48h	72h
C vs. OP T1	****	****	****	****
C vs. OF T1	****	****	****	****
C vs. OI T1	****	****	****	****
C vs. OP T2	**	****	****	****
C vs. OF T2	****	***	****	***
C vs. OI T2	****	****	****	****
OP T1 vs. OF T1	ns	***	****	****
OP T1 vs. OI T1	****	****	****	****
OP T1 vs. OP T2	*	****	****	****
OP T1 vs. OF T2	ns	****	****	****
OP T1 vs. OI T2	****	****	****	****
OF T1 vs. OI T1	****	****	****	****
OF T1 vs. OP T2	ns	ns	ns	ns
OF T1 vs. OF T2	ns	*	ns	**
OF T1 vs. OI T2	****	****	****	****
OI T1 vs. OP T2	****	****	****	****
OI T1 vs. OF T2	****	****	****	****
OI T1 vs. OI T2	ns	****	ns	****
OP T2 vs. OF T2	**	ns	ns	****
OP T2 vs. OI T2	****	****	****	****
OF T2 vs. OI T2	****	****	****	****

B16F1

	6h	24h	48h	72h
C vs. OP T1	****	****	****	****
C vs. OF T1	**	****	****	****
C vs. OI T1	****	****	****	****
C vs. OP T2	ns	****	****	****
C vs. OF T2	ns	****	****	****
C vs. OI T2	****	****	****	****
OP T1 vs. OF T1	ns	****	****	****
OP T1 vs. OI T1	****	****	****	****
OP T1 vs. OP T2	*	****	****	****
OP T1 vs. OF T2	ns	****	****	****
OP T1 vs. OI T2	****	****	****	****
OF T1 vs. OI T1	****	****	****	****
OF T1 vs. OP T2	ns	ns	ns	**
OF T1 vs. OF T2	ns	ns	*	*
OF T1 vs. OI T2	****	****	****	****
OI T1 vs. OP T2	****	****	****	****
OI T1 vs. OF T2	****	****	****	****
OI T1 vs. OI T2	*	****	****	****
OP T2 vs. OF T2	ns	ns	****	****
OP T2 vs. OI T2	****	****	****	****
OF T2 vs. OI T2	****	****	****	****

MDCK

	6h	24h	48h	72h
C vs. OP T1	****	****	****	****
C vs. OF T1	****	****	****	***
C vs. OI T1	****	****		****
C vs. OP T2	ns	ns		***
C vs. OF T2	ns	ns		ns
C vs. OI T2	****	****		****
OP T1 vs. OF T1	ns	ns	****	****
OP T1 vs. OI T1	****	****		***
OP T1 vs. OP T2	***	****		****
OP T1 vs. OF T2	****	****		****
OP T1 vs. OI T2	****	****		ns
OF T1 vs. OI T1	****	****		****
OF T1 vs. OP T2	***	***		ns
OF T1 vs. OF T2	****	****		ns
OF T1 vs. OI T2	****	****		****
OI T1 vs. OP T2	****	****		****
OI T1 vs. OF T2	****	****		****
OI T1 vs. OI T2	****	****		***
OP T2 vs. OF T2	ns	ns		ns
OP T2 vs. OI T2	****	****		****
OF T2 vs. OI T2	****	****		****

ns = não significante; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01, *** p ≤ 0,001 **** p ≤ 0,0001.

Os resultados sugerem que o OP e OI podem influenciar a proliferação nas primeiras horas. O OF teve um efeito proliferativo menos intenso. Na comparação quanto ao tipo celular percebeu-se pequenas diferenças quando comparamos dois tipos celulares relacionados (linhagens B16F10 e F1).

O OP é rico em AGPI n-3, enquanto o OI é rico em ácido graxo alfa-linolênico (ALA), considerado um AGPI parental, isto é, é um precursor de AGPI n-3 (SCHIESSEL et al., 2016) O OF é uma fonte de alquilgliceróis, o qual tem sido estudado como um agente antitumoral em vários testes clínicos (IANNITTI; PALMIERI, 2010). A figura 1 mostra os ensaios com SHSY-5Y para padronização do ensaio de proliferação. Escolheu-se a dose de 1:100 e 1:200, pois a dose 1:50 apresentava gotículas de gordura que poderiam interferir nas leituras.

A Hela (adenocarcinoma humano) apresentou taxa proliferativa aumentada com 6h para o T1 com OP, OF e OI e para o T2 com OI. A taxa proliferativa passa a ser significante para todos os tratamentos a partir de 24h (figura 1 e tabela 1).

B16-F1, quando comparada a B16F10 tem menor potencial metastático (BOIA-FERREIRA et al., 2017). B16F10 também são mais resistentes a tratamento com quimioterápicos como o metotrexate (CILLO et al., 1987) . Assim, espera-se que B16F1 apresente uma resposta mais branda quando estimulada a proliferar.

Conclusões: O OI inca teve maior capacidade de induzir proliferação em todas as linhagens, seguida pelo OP. O PF foi o tratamento com menor taxa proliferativa. Os tratamentos apresentaram efeito proliferativo dose dependente.

Agradecimentos
Agradecemos à Fundação Araucária e a UEPG pelo suporte financeiro desta pesquisa e pagamento de bolsa de iniciação científica

Referências

AHMED, S. A; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. **Journal of immunological methods**, v. 170, n. 2, p. 211–224, 1994.
BOIA-FERREIRA, M. et al. TCTP as a therapeutic target in melanoma treatment. **British Journal of Cancer**, v. 117, n. 5, p. 656–665, 22 ago. 2017.
CILLO, C. et al. Generation of drug-resistant variants in metastatic B16 mouse melanoma cell lines. **Cancer research**, v. 47, n. 10, p. 2604–8, 15 maio 1987.
HARBIGE, L. Fatty acids, the immune response, and autoimmunity: A question of n− 6 essentiality and the balance between n− 6 and n− 3. **Lipids**, v. 38, n. 4, p. 323–341, 2003.
IAGHER, F. et al. Antitumor and anti-cachectic effects of shark liver oil and fish oil: comparison between independent or associative chronic supplementation in Walker 256 tumor-bearing rats. **Lipids in health and disease**, v. 12, p. 146, 2013.
IANNITTI, T.; PALMIERI, B. An update on the therapeutic role of alkylglycerols. **Marine Drugs**, v. 8, n. 8, p. 2267–2300, 2010.
MICHAEL-TITUS, A. T.; PRIESTLEY, J. V. Omega-3 fatty acids and traumatic neurological injury: From neuroprotection to neuroplasticity? **Trends in Neurosciences**, v. 37, n. 1, p. 30–38, 2014.
SCHIESSEL, D. L. et al. Does Oil Rich in Alpha-Linolenic Fatty Acid Cause the Same Immune Modulation as Fish Oil in Walker 256 Tumor-Bearing Rats? **Nutrition and Cancer**, v. 68, n. 8, p. 1369–1380, 2016.
SUZUMURA, D. N. et al. Fish Oil Supplementation Enhances Pulmonary Strength and Endurance in Women Undergoing Chemotherapy. **Nutrition and Cancer**, v. 68, n. 6, p. 935–942, 17 ago. 2016.