



Universidade de Brasília – UnB

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular

## **Análise da modulação de parâmetros carcinogênicos de células de câncer de ovário pelo Ômega-3 (ácido docosaheptaenoico – DHA)**

**Gabriel Pasquarelli do Nascimento**

**Orientadora:**

**Profa. Dra. Kelly Grace Magalhães**

Brasília

Maio, 2018



Universidade de Brasília – UnB  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular

**Gabriel Pasquarelli do Nascimento**

**Análise da modulação de parâmetros carcinogênicos de células de  
câncer de ovário pelo Ômega-3 (ácido docosahexaenoico – DHA)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular,  
para a obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular.

**Orientadora:**

**Profa. Dra. Kelly Grace Magalhães**

Brasília  
Maio, 2018

**Gabriel Pasquarelli do Nascimento**

**Análise da modulação de parâmetros carcinogênicos de células de câncer de ovário pelo Ômega-3 (ácido docosahexaenoico – DHA)**

Data: 25 de maio de 2018

**Banca Examinadora**

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Kelly Grace Magalhães (Presidente)  
Programa de Pós-graduação de Biologia Molecular- Universidade de Brasília

---

Sônia Nair Bão (Membro)  
Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular - Universidade de Brasília

---

João Paulo Figueiró Longo (Membro)  
Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia – Universidade de Brasília

---

Tatiana Karla Borges (Membro Suplente)  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas – Universidade de Brasília

## **Agradecimentos**

Gostaria de agradecer em primeiro lugar a Deus. Sem sua iluminação e suas bênçãos, não seria possível finalizar esse trabalho.

Agradeço à Professora Kelly por toda paciência e confiança depositada em mim. Sem sua magnífica orientação eu não teria conseguido finalizar esse trabalho. Considero a Professora Kelly minha mãe na ciência pelo fato de que quando erramos ela corrige com firmeza, mas quando acertamos ela elogia com entusiasmo e alegria, assim como fazem as mães. Por ser uma pessoa tão dedicada a orientar seus “filhotes”, ela nos ensina a amar a pesquisa e a biologia.

Agradeço aos meus pais, Elias e Wânia, por estarem sempre do meu lado e me apoiarem em minhas decisões. Minhas carreiras acadêmica e científica estão apenas começando, mas tenho plena certeza que vocês me darão suporte ao longo de toda essa jornada. Agradeço aos meus irmãos Henrique e João Luís que, mesmo após tantas brigas e desentendimentos, sempre buscam me orientar nas escolhas da vida.

Agradeço à minha cunhada Livia e sua filha Giovanna por trazerem à nossa família alegria e amor. Agradeço ao meu sobrinho Bernardo por nos trazer a alegria na forma de pureza e por nos fazer mais felizes a cada dia.

Agradeço aos meus avós João, Geralda, Judith e Luiz (que está nos iluminando junto ao Pai) por me trazerem palavras de confiança, apoio e experiência. Agradeço aos meus tios Wany, Paulo, Enauro, Hélia, Luciano, Lucélia e Luiz Júnior por estarem sempre dispostos a dar suporte. Agradeço aos meus primos Arthur e Mateus por terem me ensinado muito enquanto crescíamos e por continuar me ensinando.

Agradeço ao meu companheiro Vinícius por estar sempre ao meu lado, me dando apoio e me trazendo alegrias. Agradeço a Karoline, Gustavo, Rodrigo, Alessa, Hanri, Luiza, Rafaela, Paula, Letícia, Ana Cubas, Caterina, Amanda, Luane, Guilherme, Guilherme Sperândio, Vinícius Nattan, Lucas Macedo, Gabriela, Bruna por fazerem ou terem feito parte da minha história. Agradeço de forma especial ao Daniel, Dani, Aline, Yuri e Bruno por nunca me deixarem desanimar e por estarem sempre por perto, trazendo palavras de apoio.

Agradeço a todos os integrantes do LIMI, Rafael, Dalila, Gabriella, Gabriel H, Heloísa, Livia, Luís H, Nathalia, Raquel, Ravena, Sabrina, Milena, Carine, Débora, Júnior, Isabela e aos ex-integrantes Igor, Tiago e Adrielle. Gostaria de agradecer de forma especial aos meus

colaboradores Rafael, Dalila, Gabriella, Luís Henrique e Nathalia por toda ajuda fornecida a mim durante o desenvolvimento desse trabalho. Gostaria de agradecer também ao pessoal do GPRO pela amizade e apoio e aos integrantes do LIA, do LAMP, da microscopia e da Biofísica por estarem sempre dispostos a ajudar.

Agraço ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular por ter possibilitado que eu realizasse esse trabalho, à UnB por me trazer a sensação de segunda casa e às agências de fomento CNPq e FAPDF pelo suporte financeiro prestado.

# Sumário

<b>1. Introdução</b> .....	12
<b>1.1. Câncer</b> .....	12
<b>1.2. Câncer de ovário</b> .....	14
<b>1.3. Ácidos graxos poli-insaturados</b> .....	15
<b>1.4. Ácido docosahexaenoico (DHA)</b> .....	17
<b>1.5. Morte celular</b> .....	18
<b>1.6. Piroptose</b> .....	20
<b>2. Justificativa</b> .....	21
<b>3. Objetivos</b> .....	21
<b>3.1. Objetivo geral</b> .....	21
<b>3.2. Objetivos específicos</b> .....	21
<b>4. Metodologia</b> .....	22
<b>4.1. Cultivo celular e estímulos</b> .....	22
<b>4.2. Viabilidade celular</b> .....	22
<b>4.3. Perfil de morte celular</b> .....	23
<b>4.4. Formação de poros na membrana plasmática</b> .....	23
<b>4.5. Ativação de caspase 1</b> .....	24
<b>4.6. Detecção de Gasdermin D</b> .....	24
<b>4.7. Ciclo celular e fragmentação nuclear</b> .....	25
<b>4.8. Proliferação celular</b> .....	26
<b>4.9. Produção de espécies reativas de oxigênio</b> .....	26
<b>4.10. Secreção de óxido nítrico</b> .....	27
<b>4.11. Biogênese de corpúsculos lipídicos</b> .....	27
<b>4.12. Formação de colônias</b> .....	28
<b>4.13. Dosagens de citocinas</b> .....	28

<b>5. Resultados</b> .....	29
<b>5.1. Análise de viabilidade celular</b> .....	29
<b>5.2. Análise do perfil de morte celular</b> .....	30
<b>5.3. Ensaio de formação de poros</b> .....	34
<b>5.4. Ativação de caspase-1</b> .....	36
<b>5.5. Clivagem de Gasdermin-D</b> .....	38
<b>5.6. Fragmentação nuclear</b> .....	40
<b>5.7. Análise de proliferação celular</b> .....	42
<b>5.8. Ciclo celular</b> .....	44
<b>5.9. Espécies reativas de oxigênio</b> .....	46
<b>5.10. Análise de biogênese de corpúsculo lipídico</b> .....	48
<b>5.11. Formação de colônias</b> .....	50
<b>5.12. Secreção de óxido nítrico</b> .....	52
<b>5.13. Secreção de citocinas</b> .....	52
<b>6. Discussão</b> .....	58
<b>7. Conclusão</b> .....	64
<b>8. Referências</b> .....	65

Análise da modulação de parâmetros carcinogênicos de células de câncer de ovário pelo  
Ômega-3 (ácido docosaheptaenoico – DHA)

**Resumo**

**Dissertação de Mestrado**

Gabriel Pasquarelli do Nascimento

O ácido docosaheptaenoico (DHA) é um ácido graxo da família dos Ômega-3 obtido principalmente a partir do óleo de peixe. O consumo em quantidades adequadas desse ácido graxo está associado à diminuição do risco de desenvolvimento de diversas patologias, incluindo doenças neurológicas, cardiovasculares e câncer. Por apresentar ações inibitórias sobre proliferação, angiogênese e metástase e por favorecer morte de células de diversos modelos de câncer, o DHA vem se mostrando eficiente na diminuição de riscos de desenvolvimento de diversos tipos de tumores. No entanto, pouco é conhecido sobre a ação do DHA sobre o câncer de ovário. O objetivo desse estudo é analisar os efeitos do ácido graxo ômega-3 DHA sobre parâmetros celulares e perfil de morte de células de câncer de ovário humano A2780 *in vitro*. Nossos resultados indicaram que o DHA induz citotoxicidade sobre células de câncer de ovário humano A2780, favorecendo a ocorrência de poros na membrana plasmática dessas células, morte lítica, fragmentação nuclear, ativação de caspase-1 e clivagem de Gasdermin-D. Além disso, nossos resultados sugeriram que o DHA inibe proliferação, progressão do ciclo celular e formação de colônias em células A2780. O DHA aumenta biogênese de corpúsculos lipídicos (CLs) e secreção de interleucina-6 (IL-6) nessas células. O DHA não modula os níveis de espécies reativas de oxigênio nem a secreção de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  em células A2780. Portanto, esse trabalho caracterizou o impacto do DHA sobre vários parâmetros celulares de células A2780, além de indicar o efeito indutor de piroptose do DHA sobre essas células de câncer.



Analysis of the modulation of ovarian cancer cell carcinogenic parameters by Omega-3  
(docosahexaenoic acid – DHA)

**Abstract**

**Dissertação de Mestrado**

Gabriel Pasquarelli do Nascimento

Docosahexaenoic acid (DHA) is a fatty acid from the omega-3 family obtained mainly from fish oil. The adequate consumption of this fatty acid is associated with decreased risk of development of many pathologies, including neurological and cardiovascular diseases and cancer. Because it presents inhibitory actions over proliferation, angiogenesis and metastasis and favor cell death of many cancer models, DHA is shown as efficient on decreasing the risk of development of several types of tumors. However, little is known about the action of DHA on ovarian cancer. The objective of this study is to analyse the effects of the omega-3 fatty acid DHA on carcinogenic parameters and death profile of human ovarian cancer cells A2780 *in vitro*. Our results indicated that DHA induces cytotoxicity on human ovarian cancer cells A2780, favoring the occurrence of pores in the plasma membrane of these cells, cell death, nuclear fragmentation, caspase-1 activation and Gasdermin-D cleavage. In addition, our results suggested that DHA inhibits proliferation, cell cycle progression and colony formation in A2780 cells. DHA increases lipid droplet (LD) biogenesis and interleukin-6 secretion (IL-6) in these cells. DHA modulate neither the levels of reactive oxygen species nor the secretion of interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in A2780 cells. Therefore, this work characterized the impact of DHA on many carcinogenic parameters of A2780 cells and indicated the pyroptosis-inducing effect of DHA on these cancer cells.

## Lista de abreviaturas, acrônimos, siglas e símbolos

µg	Micrograma
µM	Micromolar
A2780	Linhagem de célula de câncer de ovário humano
AA	Ácido araquidônico
AIF	Fator indutor de apoptose
ALA	Ácido α-linoleico
ASC	Proteína associada à apoptose contendo domínio de recrutamento de caspase
ATP	Adenosina Trifosfato
BRCA	Genes associados à epidemiologia de tumores de mama e ovário
CARD	Domínio para recrutamento de caspa
cDAMPs	Padrões associados à morte celular
CFSE	Carboxifluoresceína succinimidil ester
CL	Corpúsculo lipídico
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DAMPs	Padrões moleculares associados ao dano
DCF-DA	2',7' Diclorodihidrofluoresceína-diacetato
DHA	Ácido docosahexaenoico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPA	Ácido eicosapentanoico
GPX4	Glutathione peroxidase 4
GSDMD	Gasdermin-D
H	Hora
HMGB1	Proteína do grupo de alta mobilidade B1
IL	Interleucina
LA	Ácido linoleico
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
MDA-MB231	Linhagem de células de câncer de mama invasivo
MFI	Mediana de intensidade de fluorescência
MLKL	Proteína efetora da morte por necrose
mM	Milimolar
mTOR	Proteína central em vias de sobrevivência celular
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio brometo
NFκB	Fator nuclear κB
NLRP	Receptor do tipo NOD que contém domínio pirina
Nm	Nanômetro
PARP	Poli-[ADP-ribose]-polimerase

PEG	Propilenoglicol
Pg	Picograma
PI	Iodeto de propídeo
PIT	Armadilha formada após morte por piroptose
PRR	Receptor de reconhecimento padrão
RFU	<i>Relative fluorescence unit</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RIPK	Proteínas indutoras da morte por necroptose
RPMI	Meio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
TNFR	Receptor de fator de necrose tumoral
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$
TRAIL	Receptor de morte celular
UNS	Não-estimulado

# 1. Introdução

## 1.1. Câncer

Câncer é a segunda causa de morte mais comum, sendo superado apenas por doenças cardiovasculares. Segundo a organização mundial de saúde (do inglês WHO) uma a cada seis mortes é devido aos diversos tipos de malignidades, apresentando maior impacto em países de menor desenvolvimento econômico por questões de acessibilidade ao diagnóstico e tratamento. Como consequência da alta taxa de ocorrência, o câncer vem impactando a economia mundial de forma crescente, tendo mobilizado cerca de um trilhão de dólares em diagnóstico e tratamento no ano de 2010 (WHO, 2018).

O câncer se desenvolve como consequência de alterações no controle da proliferação celular, morte, angiogênese, invasão e metástase. A manutenção dessas alterações é influenciada pelo processo de seleção natural darwiniana, favorecendo os clones com maior vantagem frente aos obstáculos impostos pelo organismo (Shen & Laird 2013). A causa para essas alterações de fenótipos celulares no câncer frequentemente reside no fato de ocorrerem mutações ou alterações epigenéticas que modificam a expressão de genes somáticos. Mutações se referem a modificação na sequência de nucleotídeos que compõe um gene (Hanahan & Weinberg 2011). As alterações epigenéticas se caracterizam por serem processos de metilação de DNA, modificação de histonas, remodelamento de nucleossomo e modulações mediadas por RNAs (Dawson & Kouzarides 2012).

A desregulação de tradução do RNA mensageiro é descrita como extremamente comum em células cancerígenas. Isso ocorre porque a síntese proteica elevada é necessária para a manutenção do crescimento do tumor. Essa alteração em vias de síntese proteica normalmente é associada ao aumento da atividade da proteína mTOR, a qual atua de forma central em processos de sobrevivência e crescimento celular (Leibovitch & Topisirovic 2018). Estudos vêm indicando que RNAs não-codificantes interagem entre si e com outras espécies de ácidos ribonucleicos na modulação dos processos celulares no desenvolvimento do tumor, indicando que processos associados ao RNA mensageiro não são os únicos a estarem relacionados ao desenvolvimento de tumores (Ragusa et al. 2017).

Diversos estudos vêm mostrando que tumores são extremamente heterogêneos como resultado das alterações genética e epigenéticas que ocorrem no desenvolvimento da doença. Mais de 250 tipos clínico-patológicos e centenas de neoplasias já foram descritas. Um dos fatores que levam a essa enorme variedade é consequência da heterogeneidade apresentada pelos tumores estabelecidos em indivíduos (Ramón y Cajal et al. 2017). Outro importante fator

relacionado à heterogeneidade de tumores é o fato de eles interagirem e modularem o microambiente ao seu redor. Apesar de vários estudos apresentarem uma visão centrada no tumor, é cada vez mais claro que o desenvolvimento e sobrevivência tumoral também estão associados ao microambiente no qual as células transformadas estão inseridas. Ao passo que o câncer progride, o microambiente tumoral co-evolue a um estado que favorece o desenvolvimento e crescimento do tumor. Células endoteliais, fibroblastos, diversos leucócitos e a matriz extracelular são exemplos de componentes desse microambiente (Pietras & Östman 2010).

Estratégias anticâncer atualmente utilizadas incluem quimioterapia, imunoterapia, radioterapia, ou a combinação destas. No entanto, essas abordagens terapêuticas vêm se mostrando pouco eficazes e extremamente tóxicas para células saudáveis (Kopeina et al. 2017). Um ponto que vem preocupando as autoridades na área de saúde e a população em geral é a resistência a drogas anti-câncer que muitos tumores vêm apresentando. Segundo alguns estudos, a ineficiência das terapias convencionais atualmente empregadas na busca pelo tratamento do câncer reside em parte no processo de resistência tumoral a agentes empregados para eliminar essa doença. Essa resistência pode ser mediada por mecanismos de inibição de morte celular, modificações no metabolismo da droga, alterações epigenéticas e no alvo da droga, aumento no processo de reparo de DNA e amplificação gênica (Mansoori et al. 2017).

Uma das consequências da ocorrência de resistência a drogas anti-tumorais é o favorecimento ao processo metastático. A metástase se caracteriza por ser um processo de colonização de locais distantes do foco inicial de desenvolvimento do tumor. Sabe-se que noventa por cento dos casos de metástase levam à morte como consequência da natureza sistêmica e resistência à terapias disponíveis, dando um caráter incurável à doença metastática (Valastyan & Weinberg 2011). Um outro ponto que especialistas vêm enfocando é o ressurgimento do tumor devido à dormência. O processo de ressurgimento do tumor anos e até décadas após a eliminação é chamado de dormência tumoral. Como descrito, essa dormência é causada por uma parada mitótica e de crescimento. A parada do crescimento está relacionada a um equilíbrio entre divisão e morte celular. Estudos vêm demonstrando que células-tronco tumorais possuem um importante papel no processo de reincidência do câncer. Essas células caracterizam-se por serem mais resistentes à quimioterapia e radioterapia comparadas às outras células tumorais (Gao et al. 2017).

## 1.2. Câncer de ovário

O termo câncer de ovário se refere a alguns tipos histológicos de câncer. O mais comum, o epitelial, representa de setenta a oitenta por cento dos casos de câncer ovariano (Sundar et al. 2015). Câncer de ovário é a quinta malignidade mais comum em mulheres (Cornelison et al. 2017), sendo a causa de mais de cento e vinte mil mortes por ano (Jones et al. 2017) e a malignidade de sistema reprodutor mais letal (Zhu et al. 2017). O câncer de ovário apresenta um alto índice de letalidade por ser assintomático em estágios precoces e frequentemente ser diagnosticado em etapas mais tardias do desenvolvimento do tumor (Khan et al. 2017), quando as taxas de sobrevivência por mais de cinco anos são de 30 % (Jones et al. 2017), e por possuir alta taxa de recorrência após cirurgia e quimioterapia (Li et al. 2014). Paridade, amamentação, histórico de ligação da tuba e histerectomia são fatores que diminuem a chance de desenvolvimento de câncer de ovário (Lowry & Lee 2017). Por outro lado, fatores genéticos, idade, terapia hormonal pós-menopausa, infertilidade e nuliparidade estão entre os fatores de risco para a ocorrência de tumores no órgão sexual feminino (Matulonis et al. 2016).

Os genes BRCA1 e BRCA2 foram descritos na década de 90 como participantes principais na hereditariedade do câncer de ovário. As proteínas codificadas por esses genes atuam em processos de manutenção da integridade genômica, principalmente no reparo de quebra de fita dupla de DNA e recombinação homóloga. Como consequência de estudos envolvendo esses genes, BRCA1 e BRCA2 são considerados supressores de tumor (Takaoka & Miki 2018). Mutações que inativam as funções das proteínas BRCAs aumentam o risco de desenvolvimento de câncer de ovário. O risco de desenvolvimento de tumor ovariano em portadores do gene BRCA1 alterado é de 16 % a 68 %, enquanto as chances de indivíduos que apresentam o gene BRCA2 mutado é de 11 a 30 %. Análises de epidemiologia genética demonstraram que BRCA1 e BRCA2 são genes de alta penetrância, enquanto que outros genes como BRIP1, MSH6 e RAD51C/D apresentam menor penetrância (Jones et al. 2017). Em termos epidemiológicos, penetrância se refere à proporção de indivíduos que apresentam um genótipo específico associado a uma doença que também apresentam a patologia correspondente (Cooper et al. 2013).

Assim como em outros tipos de câncer, o tumor de ovário também apresenta um estroma ou microambiente tumoral. Estudos vêm indicando que o estroma tumoral ovariano se assemelha em termos endocrinológicos e morfológicos ao ambiente encontrado no ovário de uma adulta saudável, o qual tende a favorecer a progressão tumoral. Assim como outros

microambientes tumorais, o estroma ovariano é composto por fibroblastos, adipócitos, leucócitos infiltrantes, pericitos, células neuroendócrinas e endoteliais (Zhang et al. 2017).

A abordagem mais utilizada no tratamento do câncer de ovário é a cirurgia redutiva seguida por tratamento quimioterápico baseado em taxano e platina (Cornelison et al. 2017). No entanto, um crescente número de tumores ovarianos vem apresentando resistência a esse tratamento (Khan et al. 2017). Terapias alternativas vêm sendo estudadas afim de se superar a resistência e melhorar o prognóstico de pacientes com câncer de ovário. Essas terapias não-convencionais enfocam em imunoterapia e anticorpos monoclonais que interagem com alvos específicos da célula cancerígena (Gadducci & Guerrieri 2017; Padayachee et al. 2017).

Alguns estudos vêm apresentando o efeito de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 sobre o câncer de ovário. Em análises *in vitro*, dois estudos mostraram que ácidos graxos da família dos ômega-3 inibem o crescimento de células de ovário (Wan et al. 2016; Hopkins & Meier 2017). Já Merritt e colaboradores e Ibiebele e outros, em uma abordagem epidemiológica possibilitada pelo emprego de questionários relativos a fatores de risco e à alimentação de indivíduos saudáveis e com câncer de ovário, mostraram dados divergentes. O primeiro estudo mostrou que o consumo de ômega-3 está associado à diminuição de risco de desenvolvimento de câncer de ovário (Merritt et al. 2014), enquanto que o segundo trabalho afirmou que a obtenção desses ácidos graxos poli-insaturados pela alimentação não apresenta como consequência a diminuição de risco de ocorrência de tumores ovarianos (Ibiebele et al. 2012).

### **1.3. Ácidos graxos poli-insaturados**

Ômega-6 e ômega-3 são duas classes de ácidos graxos poli-insaturados derivados do ácido linoleico e  $\alpha$ -linoleico, respectivamente. Metabolismo enzimático do ácido linoleico (LA) leva a formação do ácido araquidônico (AA), enquanto que a ação de enzimas específicas sobre o ácido  $\alpha$ -linoleico (ALA) leva à formação do ácido eicosapentanoico (EPA). Reações de alongação e dessaturação do EPA têm como produto o ácido docosahexaenoico (DHA) (Mori 2017).

Ácidos graxos poli-insaturados da família dos ômega-3 se caracterizam por apresentarem uma dupla ligação iniciada no terceiro carbono em relação ao metil da extremidade da cadeia carbônica (ômega). As formas predominantes de ácidos graxos ômega-3 são o ALA, o EPA e o DHA, os quais são classificados como ácidos graxos essenciais por não serem sintetizados em mamíferos de forma geral (Maskrey et al. 2013). Pesquisas envolvendo ômega-3 indicam que esses ácidos graxos apresentam ação benéfica contra várias patologias. Doenças

cardiovasculares (Sharp et al. 2018) e metabólicas (Guo et al. 2017) estão entre as condições que são evitadas com suplementação de ômega-3 na dieta.

Diversos estudos vêm mostrando que ácidos graxos ômega-3 modulam alterações epigenéticas necessárias para a formação e diferenciação de células neurais, indicando um papel central dos ômega-3 no processo de maturação do sistema nervoso (Isaac et al. 2018). Outro benefício que os ácidos graxos ômega-3 apresentam é a capacidade de modular mecanismos moleculares das células por interagirem com as propriedades de dinâmica de membrana, regular a expressão de genes e serem usados como substratos para a produção de mediadores inflamatórios ativos (Rodríguez-Cruz & Serna 2017). Esses mediadores ativos são as moléculas anti-inflamatórias resolvinas protectinas e maresinas, que são produzidas a partir do DHA. Esses compostos lipídicos atuam em processos de resolução da inflamação e são necessários para a manutenção da homeostase (Zárate et al. 2017). É sabido que outro importante grupo de moléculas derivadas de ácidos graxos ômega-3 são os epoxieicosanoides. Estudos pré-clínicos mostram que esses compostos lipídicos apresentam propriedades cardioprotetoras, vasodilatadoras, anti-inflamatórias e anti-alérgicas (Schunck et al. 2018).

Apesar de os ácidos graxos ômega-3 possuírem diversos benefícios, o lipídeo da família dos ômega-6 ácido araquidônico também demonstra ser importante para o desenvolvimento físico e mental (Mashavave et al. 2016), modulação da membrana plasmática e da expressão de genes (Huerta-Yépez et al. 2016), e na modulação de processos inflamatórios na forma de lipoxinas (Molfino et al. 2017). No entanto, o consumo de ácidos graxos poli-insaturados do grupo dos ômega-6 deve ser moderado, pois esses compostos são usados como substratos para a produção de mediadores pró-inflamatórios (Patterson et al. 2012).

Segundo Huerta-Yépez e colaboradores, a quantidade de ácidos graxos ômega-3 consumidos deve ser maior que a de ômega-6. Eles ressaltaram os obstáculos que existem para se conseguir cumprir esse objetivo: competição por enzima e dietas ocidentais. Os derivados dos ácidos graxos poli-insaturados dependem da mesma enzima para serem produzidos e a síntese destes é limitada pela ação das enzimas. Em indivíduos que seguem a dieta ocidental, a qual é rica em carnes vermelhas e ovos e pobre em carnes brancas e óleos vegetais, o consumo de ômega-6 é pelo menos dez vezes maior que o de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3. Além disso, dietas ricas em glicose, álcool, glicocorticoides, redução dos níveis de insulina, deficiência de proteínas e idade diminuem a ação de enzimas necessárias para a produção de DHA. Esses dados demonstram a importância de se suplementar a dieta para se obter uma proporção ideal (Huerta-Yépez et al. 2016). Outro fator que dificulta o enriquecimento de



alimentos com ômega-3 e a absorção desses ácidos graxos é o fato de eles serem relativamente instáveis e propensos à oxidação (Taneja & Singh 2012).

#### **1.4. Ácido docosahexaenoico (DHA)**

O ácido docosahexaenoico (DHA) é encontrado em altas concentrações no salmão, na sardinha e na truta (Yamagata 2017). O DHA é gerado a partir do EPA por meio de uma cadeia de alongação catalisada pelas enzimas *elongase 5* e *elongase 2*, seguida por uma reação de dessaturação mediada por  $\Delta 6$ -desaturase (Calder 2017). O DHA se caracteriza por ser uma molécula altamente flexível, podendo atuar afetando propriedades biofísicas de membrana, como fluidez, flexibilidade e espessura (Hishikawa et al. 2017). É sabido que o DHA é encontrado de forma enriquecida nos fosfolípidos no cérebro e na retina, apresentando funções centrais na manutenção da saúde cerebral e em doenças associadas ao sistema nervoso. Estudos com animais e humanos evidenciam que o consumo inadequado materno de DHA pode levar ao desenvolvimento e funcionamento aberrantes do sistema nervoso central (Sun et al. 2016). Acredita-se que essa ação benéfica do DHA sobre o sistema nervoso central deriva do fato de que esse ácido graxo melhora as atividades antioxidantes e cognitivas do tecido cerebral, além de ser fixado na membrana plasmática de células nervosas (Hashimoto et al. 2017).

Os metabólitos do DHA podem ser divididos em diversos grupos, incluindo mediadores pró-resolução derivados de DHA, epóxidos de DHA, neuroprostanos, etalonaminas, acilglicerois. Esses metabólitos apresentam efeitos pleiotrópicos como aumento do gasto de energia, estímulo de catabolismo lipídico, modulação da resposta imune, resolução da inflamação, reparo e regeneração tecidual (Kuda 2017).

O DHA é convertido pela enzima 15-lipoxigenase em resolvinas e neuroprotectinas (Sun et al. 2016). A neuroprotectina D-1 em específico atua protegendo o cérebro do envelhecimento, doenças neurodegenerativas e injúrias causadas por isquemia-reperfusão (Echeverría et al. 2017). As ações neuroprotetoras do DHA são suportadas por estudos observacionais, que indicaram que o consumo de DHA está associado à diminuição de risco de desenvolvimento de doença de Alzheimer (Yassine et al. 2017). Outras desordens associadas ao sistema nervoso como depressão, bipolaridade, doença de Parkinson e Esclerose Amiotrófica Lateral também podem ser evitadas com suplementação de DHA (Zárate et al. 2017).

Uma dieta rica em DHA também está associada a menores riscos de desenvolvimento de diversos tumores (Slagsvold et al. 2010). Além disso, já foi mostrado que o consumo de DHA

tende a ter ação potencializadora de tratamentos quimioterápicos. Isso ocorre pois esse ácido graxo apresenta propriedades anti-proliferativas, pró-apoptóticas, anti-angiogênicas e anti-metastáticas, podendo ser utilizado como eficiente adjuvante em tratamentos quimioterápicos (Merendino et al. 2013).

## 1.5. Morte celular

O processo de morte celular pode ser dividido em dois grupos: morte celular regulada ou programada e morte celular acidental. A morte celular regulada ou programada envolve a ativação de maquinarias moleculares codificadas geneticamente que levam à morte da célula. Alguns exemplos de morte celular programada são apoptose, necroptose e piroptose. Por outro lado, morte acidental como consequência de injúrias químicas ou físicas, ocorre independentemente de vias de sinalização molecular (Fearnhead et al. 2017).

Estudos vêm demonstrando que existem diversos tipos de morte celular programada. Necroptose, ferroptose, oxitose, piroptose, pironecrose, *parthanatos* são alguns nomes das diversas modalidades de morte celular regulada descritas até o momento (Fuchslocher Chico et al. 2017). A morte celular programada é necessária em processos de desenvolvimento e homeostase, tendo um papel central no processo de resolução da resposta imune inata e adaptativa (Bliss-Moreau et al. 2017). Essa modalidade de morte também é benéfica para o organismo como um mecanismo de defesa contra infecção por patógenos (Kolb et al. 2017). É sabido que a morte celular programada pode ser considerada lítica ou não-lítica, dependendo da via de sinalização ativada (Jorgensen et al. 2017). As mortes são nomeadas dessa forma porque a morte lítica apresenta alteração na permeabilidade da membrana, enquanto que a morte não-lítica apresenta membrana plasmática intacta (Zhang et al. 2018). Mortes líticas estão associadas à liberação de diversas proteínas e compostos químicos provenientes do núcleo, retículo endoplasmático, mitocôndria e citosol celulares. Essas moléculas são chamadas de cDAMPs (*cell death-associated molecular-patterns*) DAMPs (*Damage-associated molecular patterns*) e alarminas (Sangiuliano et al. 2014).

Apoptose é uma morte celular que não induz inflamação e se caracteriza por apresentar diminuição do volume celular, fragmentação nuclear e formação de corpos apoptóticos. Esse fenótipo celular ocorre como consequência da ativação de enzimas intracelulares, principalmente as caspases. A ativação dessas enzimas ocorre por meio de duas vias: vias extrínseca e intrínseca (Orzalli & Kagan 2017). A via extrínseca é induzida por sinais provenientes do meio extracelular, os quais interagem com receptores de membrana específicos (Fas, TNFR e TRAIL), também conhecidos como receptores de morte. Uma vez que ocorre

essa interação, um complexo composto por proteínas adaptadoras é formado, ativando a protease caspase-8, a qual atuará clivando a enzima efetora da apoptose (Wilson et al. 2009). Essa enzima então atua clivando e ativando caspases efetores, as quais clivam diversos alvos celulares, levando ao fenótipo apoptótico (Fischer et al. 2003). A via intrínseca é mediada pelo desbalanço de proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas da família Bcl-2 (*B-cell lymphoma-2*). Uma vez que essa via é ativa, citocromo C e moléculas pró-apoptóticas são liberadas da mitocôndria. Citocromo C participa então da formação do apoptossomo e maturação de caspases que induzirão a morte por apoptose (Opferman & Kothari 2017).

A morte celular por necrose se caracteriza por ganho de volume celular e das organelas, ruptura da membrana plasmática e perda do conteúdo intracelular (Kroemer et al. 2009). Disfunção mitocondrial, aumento da geração de espécies reativas de oxigênio, depleção de ATP, proteólise generalizada e ruptura da membrana plasmática de forma precoce são outras características dessa morte pró-inflamatória (Golstein & Kroemer 2007).

Outra morte lítica é a necroptose. A necroptose é uma morte celular programada caracterizada pela formação de um poro iônico na membrana da célula em processo de morte. A necroptose se inicia pela ativação de receptores de morte e receptores do tipo *Toll-like* e é mediada por RIPK1, RIPK3 e MLKL (Grootjans et al. 2017). Um outro exemplo de morte celular programada de caráter lítico é a piroptose. A piroptose é uma forma inflamatória de morte celular programada. A ativação da piroptose ocorre por meio da caspase-1, das caspases-4 e 5 em humanos e da caspase 11 no modelo murino. Durante esse processo de morte celular ocorre clivagem e ativação da proteína formadora de poro, a Gasdermin-D. Ruptura física, liberação de citocinas pró-inflamatórias, alarminas e DAMPs ocorrem como consequência da morte piroptótica (Man et al. 2017). Outros tipos de morte celular programada menos conhecidos já foram descritos. De forma similar à piroptose, a pironecrose é uma morte lítica com participação das moléculas NLRP3 e ASC; no entanto ela ocorre independentemente da atividade de caspase-1 (de Vasconcelos et al. 2016). Parthanatos é uma morte dependente do fator mitocondrial AIF. Aumento da expressão de PARP em resposta à produção de espécies reativas de oxigênio levam à translocação de AIF ao núcleo, levando à fragmentação do DNA e condensação da cromatina (Fatokun et al. 2014). Outra modalidade de morte celular programada, a ferroptose é um processo não-apoptótico oxidativo ferro-dependente. Pode ser induzida por depleção do aminoácido cisteína ou por inibir glutathiona peroxidase 4 (GPX4)

## 1.6. Piroptose

A piroptose é uma morte celular programada de caráter lítico induzida por caspases. É sabido que a piroptose pode ser induzida por duas vias: a via canônica e a não-canônica. A via canônica se inicia pela ativação de Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs) por meio de DAMPs ou PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos). Uma vez ativados, os PRRs induzem a formação de complexos multiproteicos chamados inflamassomas. O domínio de pirina presente no inflamassoma induz o recrutamento de adaptadores para ativação de caspase-1. A caspase-1 ativada processa formas inativas das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-18, além de clivar e ativar a proteína formadora de poro Gasdermin-D (GSDMD) (Mills & Neill 2015). A clivagem de GSDMD libera a porção N-terminal da proteína, a qual interage com a face interna da membrana plasmática celular e oligomeriza-se formando um poro não-seletivo de aproximadamente 15 nanômetros de diâmetro (Qiu et al. 2017a). Gasdermin-D interage com a membrana plasmática por meio de interações fortes com cardiolipinas e fosfatidilinosídeos presentes na membrana plasmática (Aglietti & Dueber 2017).

Estudos mostram que como consequência da formação de poros, ocorre ruptura de membrana. No entanto essa ruptura não é suficiente para liberação de organelas e bactérias infectantes, ocorrendo a formação de uma armadilha induzida por poro (Pore-induced intracellular trap – PIT), a qual evita que esses patógenos sejam liberados ao meio e favorece a eliminação destes por fagócitos pelo processo de eferocitose (Jorgensen et al. 2016). A ruptura de membrana também favorece que ocorra a secreção de HMGB1, um fator transcricional que é liberado durante a morte piroptótica e atua amplificando o processo inflamatório por se ligar a receptores de reconhecimento padrão de células adjacentes (LaRock & Cookson 2013).

A via não canônica ocorre mediada pela interação entre o lipopolissacarídeo citoplasmático e caspase-11 e seus ortólogos em humanos caspase-4/caspase-5. No caso dessa via alternativa, caspase-11 atua como sensor citoplasmático de LPS. Uma vez que ocorre a detecção de LPS pela pró-caspase-11, há o estabelecimento de um complexo composto por pró-caspase-11 e LPS. Essa interação se dá pela ligação do domínio CARD da caspase-11 com o lipídeo A do LPS. Esse complexo formado oligomeriza-se e cliva as formas inativas de IL-1 $\beta$ , IL-18 e Gasdermin-D para progressão da morte por piroptose (Yi 2017).

## **2. Justificativa**

O DHA apresenta-se como um composto lipídico com diversas ações benéficas, incluindo anti-tumorais. Estudos prévios mostraram que o DHA induz piroptose em células de câncer de mama (Pizato et al. 2018) e inibe crescimento de células de ovário (Wan et al. 2016; Hopkins & Meier 2017). Entretanto, pouco se sabe sobre a ação do DHA especificamente sobre parâmetros celulares e indução de morte de células de câncer de ovário. Este trabalho visou analisar se o DHA também modula parâmetros celulares de células de câncer de ovário humano A2780 e se ocorre morte por piroptose também nessas células de câncer ovariano *in vitro*.

## **3. Objetivos**

### **3.1. Objetivo geral:**

Avaliar se o DHA modula parâmetros celulares de células de câncer de ovário humano A2780 e induz morte celular por piroptose nessas células *in vitro*.

### **3.2. Objetivos específicos:**

- a) Analisar o efeito do DHA sobre a viabilidade de células A2780;
- b) Investigar a influência do DHA sobre formação de poros na membrana plasmática e perfil de morte celular em células de câncer de ovário (A2780) *in vitro*;
- c) Avaliar o efeito do DHA na ativação de caspase-1 e clivagem de Gasdermin-D;
- d) Caracterizar o efeito do DHA sobre proliferação, progressão do ciclo celular e fragmentação nuclear em células A2780;
- e) Verificar se DHA modula biogênese de corpúsculo lipídico, produção de espécies reativas de oxigênio e secreção de óxido nítrico em células A2780;
- f) Determinar a influência do DHA sobre formação de colônia e secreção de citocinas pró-inflamatórias em células de câncer de ovário.

## 4. Metodologia

### 4.1. Cultivo celular e estímulos

Buscando testar os efeitos do DHA sobre células de câncer de ovário humano, as células derivadas de carcinoma ovariano humano A2780 foram utilizadas. A2780 foram cultivadas em meio RPMI (GIBCO) suplementado com 5 % de Soro Fetal Bovino (GIBCO) e 1 % Penicilina/Estreptomicina (GIBCO) e mantidas em estufa úmida a 37 °C e 5 % de CO<sub>2</sub>.

O ácido graxo DHA (Sigma-Aldrich) foi diluído em etanol absoluto (J.T.Baker) e armazenado a -20 °C em frasco de vidro previamente autoclavado.

A fim de se realizar o estímulo das células, os volumes de DHA necessários para se obter as concentrações desejadas foram transferidos para frascos de vidro autoclavados. Após o volume de etanol evaporar por completo, o DHA foi ressuscitado em meio RPMI contendo 1 % de Penicilina/Estreptomicina e 2% de Soro Fetal Bovino, homogeneizado e sonicado por 10 minutos à temperatura ambiente. A seguir, os volumes adequados de solução de DHA em meio de cultura foram transferidos para poços contendo células aderidas. As concentrações de DHA utilizadas foram 10, 25, 50, 100 e 200 µM.

### 4.2. Viabilidade celular

A fim de se verificar o efeito do DHA sobre a viabilidade de células de carcinoma ovariano A2780, foi realizado um ensaio com MTT. Essa análise baseia-se no fato de que o MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio brometo), quando reduzido por enzimas mitocondriais, apresenta-se com coloração roxeada na forma de cristais de formazan. 5x10<sup>3</sup> células foram semeadas em placa de 96 poços e estimuladas com crescentes concentrações de DHA por 24, 48 e 72 h. Após o tempo de estímulo, as células foram expostas à uma solução de 6,66 % MTT (Life Technologies). O sobrenadante foi descartado e os cristais de formazan foram dissolvidos utilizando-se 100 µL de DMSO. A leitura da absorbância foi realizada em 570 nm utilizando o espectrofotômetro *Spectramax M3*. A análise dos dados de viabilidade foi feita utilizando o software *GraphPad Prism*, considerando a média do valor de absorbância do não-estimulado como 100% de viabilidade e analisando os outros grupos de forma proporcional. O controle experimental foi obtido expondo as células ao agente citotóxico DMSO.

### 4.3. Perfil de morte celular

A análise de perfil de morte celular foi realizada por citometria de fluxo utilizando os agentes fluorescentes Anexina V-FITC e Iodeto de propídeo e baseou-se nos fatos de que Anexina V interage com o fosfolípido exposto na face externa da membrana de células apoptóticas fosfatidilserina e que Iodeto de propídeo interage com ácidos nucleicos de células mortas em vias não-apoptóticas, e é impermeável à célula com membranas plasmáticas íntegras.  $10^5$  células foram semeadas em placas de 24 poços e após adesão foram estimuladas por 24 e 48 horas. Após os tempos de estímulo, as células foram coletadas e lavadas duas vezes com PBS 1X em centrifugação à 1500 rpm. As células foram então ressuspensas em 100  $\mu$ L de tampão de ligação 1 X (10 mM de HEPES/NaOH pH 7,4 140 mM de NaCl e 2,5 mM de  $\text{CaCl}_2$ ), 2  $\mu$ L de Anexina V-FITC (quatroG) e 2  $\mu$ L de iodeto de propídeo (quatroG) e incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente ao abrigo de luz. Após essa etapa, as células foram lavadas uma vez com PBS 1 X, ressuspensas em 400  $\mu$ L de tampão de ligação 1 X e imediatamente analisadas em citômetro de fluxo (FACS VERSE, BD Biosciences) utilizando os canais FL-1 e FL-3, ambos em escala exponencial. Os dados obtidos foram analisados utilizando o software *FlowJo V10* (Tree Star Inc). Como controle experimental foram utilizadas células aquecidas à 100 °C por 10 minutos.

### 4.4. Formação de poros na membrana plasmática

A investigação do efeito do DHA sobre a formação de poros na membrana plasmática das células tratadas foi realizada por meio de um ensaio de poros, que consiste na análise de emissão de fluorescência de forma cinética pelo iodeto de propídeo, um composto que fluoresce quando interage fisicamente com ácidos nucleicos e é impermeável à membrana.  $10^4$  células foram plaqueadas em placas de 96 poços de paredes escuras, então foram expostas à Iodeto de propídeo 3  $\mu$ g/mL e diferentes concentrações de DHA em RPMI sem vermelho de fenol suplementado com 5 % de soro fetal bovino e 1 % de Penicilina/Estreptomicina. Logo após o estabelecimento do estímulo, os valores de fluorescência do iodeto de propídeo foram detectados em espectrofotômetro Spectramax durante 6 horas em intervalos de 5 minutos entre as leituras utilizando comprimentos onda de excitação de 538 nm e de emissão de 617 nm. Os dados obtidos foram analisados utilizando o software *GraphPad Prism*.

#### **4.5. Ativação de caspase-1**

Buscando verificar se ocorre ativação de caspase-1 em células A2780 em resposta ao tratamento com crescentes concentrações de DHA, foi realizado ensaio utilizando um kit específico contendo uma sonda fluorescente FLICA FAM-YVAD-FMK (Immunochemistry) e seguindo as instruções do fabricante. Essa análise baseia-se no fato de que esse fluoróforo liga-se aos quatro resíduos de aminoácidos expostos pela caspase-1 quando ativa (YVAD) e fluoresce durante essa interação.  $10^5$  células foram semeadas em placas de 24 poços e estimuladas por 24 horas. Após o tempo de estímulo, as células foram coletadas, lavadas duas vezes em PBS 1X, submetidas à marcação com o fluoróforo e analisadas em citômetro de fluxo (FACS VERSE, BD Biosciences). Os dados obtidos foram analisados utilizando o software *FlowJo* V10 (Tree Star Inc).

#### **4.6. Detecção de Gasdermin D**

Visando investigar se ocorre produção e clivagem do marcador de piroptose Gasdermin-D, foi realizada marcação por Western Blotting dessa proteína. Para esse ensaio,  $10^6$  células foram introduzidas em placas de 6 poços contendo 2 mL de meio de cultura por poço. Após aderência, células foram tratadas por 3 e 6 horas com diferentes concentrações de DHA, sendo que cada poço representou uma condição experimental. As células foram então lavadas uma vez com PBS 1X e as proteínas foram extraídas utilizando tampão de lise celular (Tris 50 mM, NaCl 150 mM e 1 % de Triton X -100 – pH 7,4) contendo inibidor de protease, com o auxílio de raspador de células. Buscando se manter a integridade das proteínas contidas no lisado, este foi mantido em gelo e intensamente homogeneizado por 30 minutos em intervalos de 5 minutos entre cada agitação. Ao fim do processo de extração de proteínas totais, as amostras foram submetidas à centrifugação à 14000 rpm por 10 minutos em um processo de clarificação. O sobrenadante resultante da centrifugação foi coletado e distribuído em dois tubos de microcentrífuga por condição experimental.

Para quantificação de proteínas, foi utilizado o método BCA (Pierce™ BCA Protein Assay Kit). 50 µg de proteína total foram expostos à solução precipitadora (Acetona 8:1 metanol) *overnight* a 4 °C. Após esse tempo, as amostras foram centrifugadas à 10000 G por 10 minutos e deixadas para secar completamente em capela de exaustão. As proteínas foram ressuspensas em tampão de amostra 1X (Tris 125 mM, 20 % glicerol, 5 % 2-mercaptoetanol, 4 % de SDS e 0,004 % azul de bromofenol). As amostras foram então fervidas por 5 minutos à 100 °C e logo em seguida aplicadas em géis de poliacrilamida



com concentração de 12 %. As amostras correram em tampão Tris-Glicina (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, 1% SDS – pH 8,3) a 120 V por 2 horas à temperatura ambiente. Após a corrida, o gel foi transferido para membrana de nitrocelulose utilizando sistema *semi-dry* em tampão de transferência (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, 20 % metanol – pH 8,3) por 15 minutos a 15 V. A seguir, as membranas foram bloqueadas por 1 hora utilizando solução de bloqueio (5 % leite desnatado em 50 mM Tris, 150 mM NaCl – pH 7,4, 0.05% Tween 20). As membranas foram incubadas com anticorpo primário anti-Gasdermin-D (Abcam) diluído 1/500 em solução TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl – pH 7,4) *overnight* em agitação a 4 °C. Em seguida as membranas foram lavadas em solução TBS/T (50 mM Tris, 150 mM NaCl – pH 7,4, 0.05% (v/v) Tween 20) por três vezes em agitação de 10 minutos entre cada lavagem a 4 °C, e então foram incubadas com anticorpo anti-rabbit (GE Healthcare) diluído 1/10000 em solução TBS por 1 hora a 4 °C . Após novas lavagens, as membranas foram incubadas com proporções iguais de solução para revelação.

A obtenção de imagens foi possibilitada pelo ImageQuant e a análise de densitometria das bandas relativas à Gasdermin- D foi realizada com normalização para bandas de  $\beta$ -actina. A quantificação relativa de bandas foi realizada utilizando o software *ImageJ*.

#### **4.7. Ciclo celular e fragmentação nuclear**

O efeito de diferentes concentrações de DHA sobre ciclo celular e a fragmentação nuclear foram investigados utilizando o agente fluorescente intercalante de nucleotídeos Iodeto de propídeo, e a interpretação dessas análises baseou-se no fato de que a intensidade de fluorescência do Iodeto de propídeo é diretamente proporcional à quantidade de DNA no interior da célula.  $10^5$  células foram introduzidas em placas de 24 poços e estimuladas por 24 e 48 horas. As células foram coletadas, lavadas duas vezes com PBS 1 X e expostas a etanol 70 % por 2 horas a 4 °C. As células foram então lavadas uma vez com PBS 1X em centrifugação à 1000 G por 10 minutos e expostas à solução de Iodeto de propídeo (20  $\mu$ g/mL de Iodeto de propídeo, 50  $\mu$ g/mL de RNase, 0,1 % citrato de sódio, 0,1 % Triton) por 30 minutos à temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, as células foram ressuspensas em 1 mL de PBS 1X e centrifugadas à 1000 G por 10 minutos. As células foram então ressuspensas em 400  $\mu$ L de PBS 1X e analisadas em citômetro de fluxo (FACS VERSE, BD Biosciences) em canal FL-2 em escala linear. Os picos relativos às células em G0/G1 e G2/M e o platô associado à fase S foram obtidos e os valores de porcentagem foram analisados. Eventos que

apresentaram fluorescência inferior à encontrada nas células em G0/G1 foram considerados casos de fragmentação nuclear. Dados foram analisados utilizando os softwares *FlowJo V10* (Tree Star Inc) e *ModFit LT™*.

#### **4.8. Proliferação celular**

Tendo-se como objetivo analisar o efeito de diferentes concentrações de DHA sobre a proliferação de células A2780 foi realizado um ensaio utilizando o CFSE. Esse composto fluorescente e permeável à membrana caracteriza-se por interagir com aminas citoplasmáticas. Uma vez que a célula realiza o processo de divisão celular, as moléculas de CFSE são igualmente divididas entre as células filhas, diluindo assim a fluorescência presente em cada célula gerada.  $10^5$  células foram introduzidas em placas de 24 poços, após completa adesão foram lavadas uma vez com PBS 1 X e expostas à  $5 \mu\text{M}$  de CFSE (eBioscience) diluído em PBS 1 X por 15 minutos à temperatura ambiente. Após incubação com o agente fluorescente, as células foram expostas a Soro Fetal Bovino à  $4^\circ\text{C}$  a fim de se eliminar o CFSE extracelular, lavadas uma vez com PBS 1X e estimuladas por 24 horas e 48 horas. As células foram então coletadas, lavadas uma vez com PBS 1 X em centrifugação à 1500 rpm e fixadas em  $400 \mu\text{L}$  de paraformaldeído 1 X. As células foram analisadas em citômetro de fluxo (FACS VERSE, BD Biosciences) em canal FL-1 em escala exponencial e os dados foram analisados utilizando o software *FlowJo V10* (Tree Star Inc). O controle experimental foi obtido expondo células marcadas com CFSE à  $5 \mu\text{M}$  de colchicina por 24 horas.

#### **4.9. Produção de espécies reativas de oxigênio**

Visando verificar se o DHA modula a produção de espécies reativas de oxigênio em células A2780 realizou-se ensaio com a sonda DCF-DA. Esse ensaio se baseia no fato de que o DCF-DA é convertido em um composto não-fluorescente no interior da célula. Esse composto quando oxidado por espécies reativas de oxigênio gera um composto fluorescente (DCF).  $10^5$  células foram plaqueadas em placas de 24 poços e estimuladas por 1, 3 e 6 horas. Após tempo de estímulo, as células foram expostas a  $20 \mu\text{M}$  de DCF-DA por 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$  ao abrigo da luz. Depois marcação, as células foram coletadas, lavadas três vezes com PBS 1 X e ressuspensas em  $400 \mu\text{L}$  de PBS 1 X. As amostras foram imediatamente analisadas em citômetro de fluxo (FACS VERSE, BD Biosciences) utilizando o canal FL-1 em escala exponencial. Os dados foram analisados utilizando o software *FlowJo V10* (Tree Star Inc).

#### **4.10. Secreção de óxido nítrico**

Buscando se detectar se o DHA altera secreção de óxido nítrico pelas células de câncer de ovário A2780, foi conduzida dosagem utilizando o reagente de Griess. Esse ensaio possibilita a quantificação de nitrito, um subproduto do instável óxido nítrico.  $10^5$  células foram semeadas em placa de 24 poços e, quando aderidas, estimuladas com crescentes concentrações de DHA por 24, 48 e 72 horas. Após os tempos de estímulo, os sobrenadantes de cultura foram coletados, transferidos para placa de cultura e expostos à solução de Griess (Sulfanilamida 14,5 M, N-1-naftiletilediamina 9,64 M, ácido fosfórico 0,0125 % em água destilada). A curva padrão, composta por crescentes concentrações de nitrito de sódio diluído em meio de cultura RPMI 1640, também foi exposta ao reagente de Griess. Após incubação por 10 minutos à temperatura ambiente, os valores de absorvância das amostras foram obtidos à 540 nm utilizando o espectrofotômetro *Spectramax M3*.

#### **4.11. Biogênese de corpúsculos lipídicos**

A fim de se analisar por citometria se o tratamento com diferentes concentrações de DHA afetam a biogênese de corpúsculo lipídico em células de carcinoma ovariano humano A2780, utilizou-se a sonda fluorescente lipofílica BODIPY 493/503 (Life technologies), a qual interage com lipídeos neutros, abundantes no interior de corpúsculo lipídico.  $10^5$  células foram semeadas em placas de 24 poços e estimuladas por 24 e 48 horas. Após tempo de estímulo, as células foram coletadas, lavadas duas vezes com PBS 1X e incubadas numa solução de Bodipy/PBS em uma proporção de 1/5000 a 4 °C ao abrigo de luz. Em seguida as células foram lavadas duas vezes com PBS 1 X e ressuspensas para fixação em 400  $\mu$ L de paraformaldeído 1 X. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (FACS VERSE, BD Biosciences) utilizando o canal FL-1 em escala exponencial. Os dados foram analisados utilizando o software *FlowJo V10* (Tree Star Inc).

Tendo em vista verificar por microscopia óptica se o estímulo com DHA afeta a biogênese de corpúsculo lipídico em células de câncer de ovário humano A2780, foi realizada marcação com os corantes Oil Red O e hematoxilina. Essa marcação tem por base o fato de o Oil Red O ser um corante lipofílico de coloração avermelhada enquanto que a hematoxilina é um composto acidófilo roxeado que cora o núcleo celular.  $10^5$  células foram plaqueadas em placas de 24 poços contendo lamínulas tratadas para cultura celular. Depois de estarem aderidas nas lamínulas, as células foram tratadas com 25  $\mu$ M de DHA por 48 horas. Após estímulo, as células foram fixadas utilizando formalina 3,7 % por 10 minutos. A seguir as células foram lavadas três vezes com água destilada e expostas por 2 minutos a PEG 100 %. No passo

seguinte, o excesso de PEG 100 % foi retirado e as células foram incubadas com Oil Red O 0,5 % por 15 minutos. As células foram novamente lavadas três vezes com água destilada e marcadas com hematoxilina por 3 segundos. Após novas lavagens, as lamínulas foram montadas em lâminas com o auxílio de esmalte transparente e as imagens foram adquiridas utilizando microscópio de luz (ZEISS) e o software *Zen*.

#### **4.12. Formação de colônias**

Visando investigar se diferentes concentrações do DHA alteram a capacidade de formação de colônia pelas células A2780, foi conduzido um ensaio clonogênico. 500 células foram introduzidas em cada poço de placas de 6 poços. Estando completamente aderidas, as células foram tratadas por 3 horas com diferentes concentrações do DHA e em seguida foram expostas a meio RPMI suplementado contendo 1 % Penicilina/Estreptomicina e 5 % de soro fetal bovino por 48 horas. Após esse tempo, as células foram fixadas com formalina neutra tamponada 10 % por 16 horas e expostas à solução de cristal violeta 0,01 % em etanol por 60 minutos. O excesso de cristal violeta foi eliminado com água destilada e as colônias formadas foram contadas utilizando o software *ImageJ*.

#### **4.13. Dosagens de citocinas**

Afim de se verificar se o tratamento com ácido docosahexaenoico de A2780 alterava o perfil de citocinas secretadas por essas células, foram realizadas dosagens de IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  a partir dos sobrenadantes resultantes de cultura pelo método de ELISA, utilizando-se kits comerciais (BD). As instruções do fabricante foram seguidas e os níveis de citocinas foram apresentados em níveis absolutos (pg/mL).

## 5. Resultados

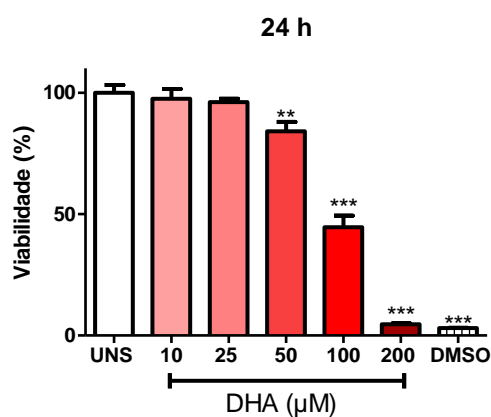
### 5.1. Análise de viabilidade celular

A fim de ser analisado o efeito do DHA sobre a viabilidade de células de câncer de ovário A2780, foi realizado o ensaio do MTT 24, 48 e 72 horas após o estímulo com esse ácido graxo. Como apresentado na figura 1A, o DHA diminuiu a viabilidade de células de câncer de ovário A2780 *in vitro* 24 horas após tratamento nas concentrações de 50, 100 e 200  $\mu\text{M}$  de forma dose-dependente. Verifica-se que a viabilidade de células tratadas com 200  $\mu\text{M}$  de DHA é comparável ao grupo de células tratadas com DMSO, sugerindo que essa concentração é extremamente tóxica para as células A2780.

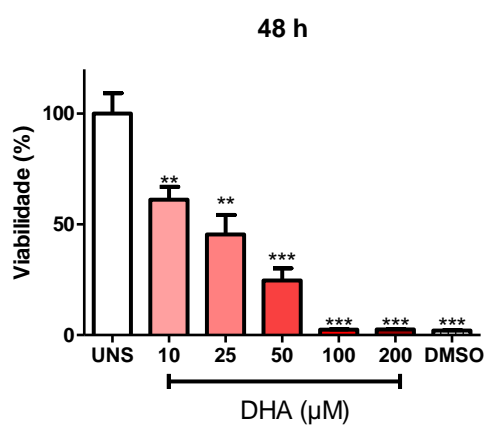
O DHA também diminuiu a viabilidade de células de câncer de ovário A2780 48 horas após tratamento com todas as concentrações testadas de forma dose-dependente (figura 1B). É também possível se verificar que a viabilidade de todos os grupos tratados por 48 horas é menor comparado com os valores de viabilidade apresentados pelos mesmos grupos tratados por 24 horas, indicando que a ação citotóxica do DHA em células de câncer de ovário A2780 aumenta de acordo com o tempo de tratamento. Nesse tempo de estímulo, é possível se notar que o tratamento com 100 e 200  $\mu\text{M}$ , as quais são as maiores concentrações testadas, induziram diminuição de viabilidade em A2780 de forma similar ao tratamento com DMSO, indicando que após esse tempo de tratamento essas concentrações são extremamente citotóxicas para a célula.

De forma semelhante, como demonstrado pelas figuras 1 A e B, o DHA diminuiu a viabilidade de células de câncer de ovário A2780 *in vitro* 72 horas após tratamento com todas as concentrações testadas de forma dose-dependente (figura 1C). A exemplo do tempo de estímulo de 48 horas comparado ao tempo de 24 horas de estímulo, a viabilidade das células A2780 é ainda menor após 72 horas de tratamento, mostrando valores de viabilidade comparáveis às células expostas à DMSO. Esse fato confirma a ação tóxica tempo-dependente do DHA sobre células A2780. Portanto, o DHA diminuiu a viabilidade de células de câncer de ovário A2780 *in vitro* de forma tempo- e dose-dependente.

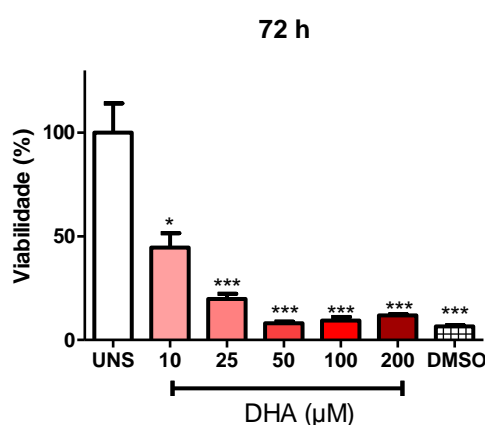
A)



B)



C)



**Figura 1: DHA diminui viabilidade de células de câncer de ovário A2780.** A2780 foram plaqueadas e estimuladas com DHA nas concentrações de 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM e 200 µM por 24 horas (A), 48 horas (B) e 72 horas (C). Após os estímulos, as células foram expostas ao MTT e a citotoxicidade foi calculada a partir das médias dos percentuais de células vivas em relação às células não-estimuladas (UNS), a quais foram consideradas 100 % vivas. Cada barra representa a média do percentual  $\pm$  DP (n=3), e um asterisco (\*), dois asteriscos (\*\*) e três asteriscos representam a diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ , respectivamente) em relação ao Não-estimulado (UNS) indicada por Teste T.

## 5.2. Análise do perfil de morte celular

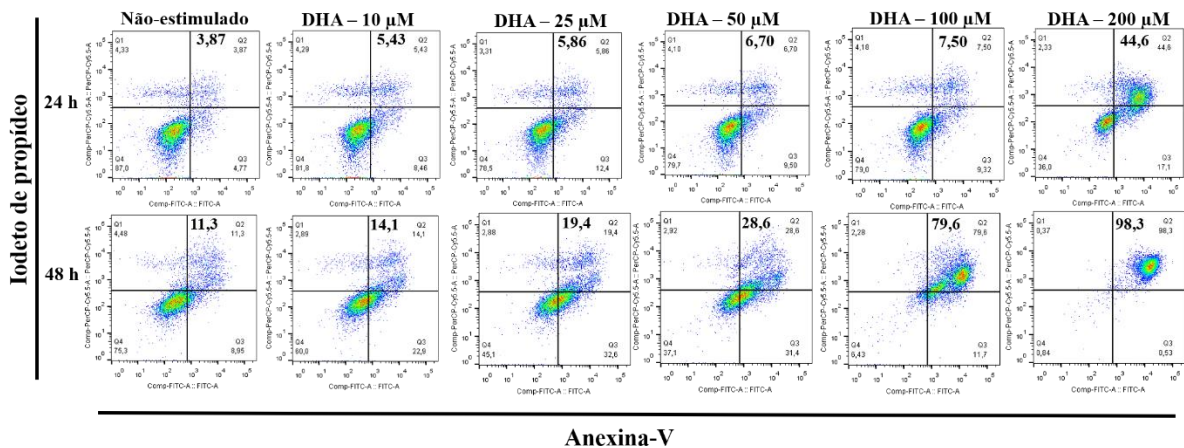
Tendo como objetivo avaliar o impacto do ácido graxo em estudo sobre o perfil de morte de células de câncer de ovário, foi conduzida uma dupla marcação com Anexina-V fluorescente e iodeto de propídeo. Como resultado dessa análise por citometria de fluxo, o DHA induz morte com perda de integridade de membrana em células de câncer de ovário A2780 *in vitro* 24 horas após tratamento de forma dose-dependente.

A figura 2 mostra que a porcentagem de células mortas por perda de integridade de membrana, ou seja, células marcadas tanto com Anexina-V fluorescente (FL-1) como com Iodeto de propídeo (FL-3), aumenta de 3,87 % na condição não-estimulada para 5,43 % em células tratadas com 10  $\mu\text{M}$  de DHA. O aumento de porcentagem de células com dupla-marcação também é visualizado comparando o não-estimulado com células estimuladas com 25  $\mu\text{M}$  de DHA, mostrando uma porcentagem de 5,83 % de células mortas marcadas com os dois marcadores. Os tratamentos com 50 e 100  $\mu\text{M}$  de DHA também induziram aumento no número de células mortas de forma lítica, apresentando valores de 6,70 e 7,50 %, respectivamente, no quadrante relativo à essas células. A maior concentração investigada, 200  $\mu\text{M}$  apresentou alto grau de citotoxicidade, sendo responsável pelos valores de 44,6 % de células mortas com alteração de permeabilidade de membrana, mostrando ser uma concentração extremamente tóxica para as células estudadas.

O efeito citotóxico do DHA também é encontrado em células tratadas com as mesmas concentrações do ácido graxo por 48 horas. Nesse tempo de estímulo, o padrão de aumento no número de células mortas de forma dependente da dose também é verificado, apresentando valores maiores de porcentagem de células com marcação dupla em comparação aos valores encontrados no tratamento por 24 horas. Nesse caso, o não-estimulado apresentou porcentagem de células marcadas com Anexina-V e iodeto de propídeo de 11,3 %. As células tratadas com 10 e 25  $\mu\text{M}$  de DHA mostraram 14,1 e 19,4 % de eventos associados à morte lítica, respectivamente. O estímulo com 50  $\mu\text{M}$  induziu novo aumento no número de células com dupla-marcação (28,6 %). Um salto no número de células mortas com perda de integridade de membrana é verificado no grupo tratado com 100  $\mu\text{M}$  de DHA, mostrando um valor de porcentagem de 79,6 %. Quase a totalidade das células expostas a 200  $\mu\text{M}$  de DHA morreram como consequência desse estímulo, contabilizando 98,3 % de células com alteração na permeabilidade de membrana plasmática.

Verifica-se também que ocorre uma leve indução de morte por apoptose nas células tratadas, mas esse efeito não se mostrou dose-dependente e apresentou-se menos intenso comparada à indução de mortes por perda de integridade de membrana, indicando não ser a principal via de morte celular induzida em células A2780 por DHA. Os resultados obtidos nessa análise de citometria de fluxo indica que as células A2780 morrem por alguma via que induz perda de integridade de membrana de forma dose e tempo-dependente.





Anexina-V

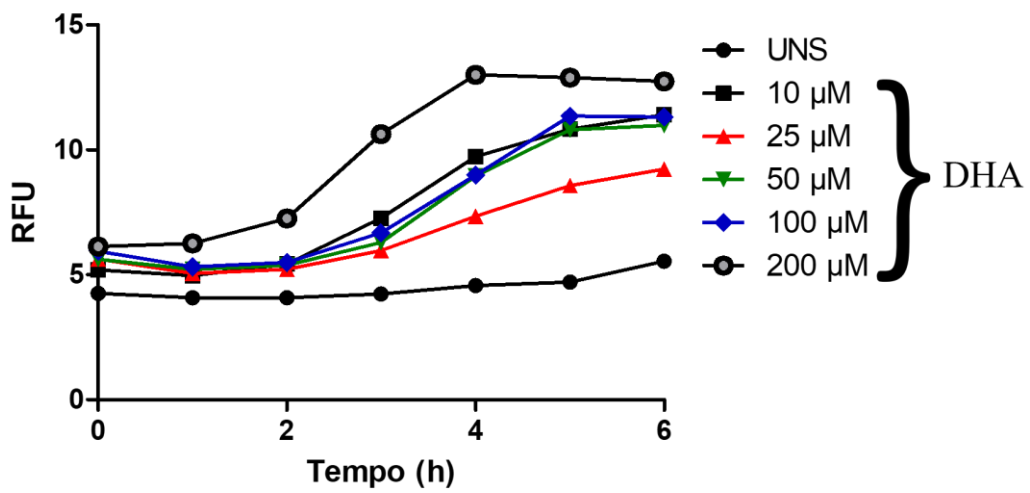
**Figura 2: DHA induz morte por perda de integridade de membrana em células A2780.** A2780 foram plaqueadas e estimuladas com DHA nas concentrações de 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM e 200 µM por 24 horas e 48 horas. Após os estímulos, as células foram marcadas com Anexina-V fluorescente (FL-1) e Iodeto de propídeo (FL-3) e analisadas em citômetro FACS Verse.

### 5.3. Ensaio de formação de poros

Buscando investigar o efeito do DHA sobre a integridade de membrana em célula de câncer de ovário A2780 em tempos precoces de estímulo, foi conduzido ensaio de formação de poro utilizando o fluoróforo ligante de DNA iodeto de propídeo. Nesse ensaio, se a célula apresentar alteração na permeabilidade de membrana plasmática ou qualquer outro tipo de modificação na integridade da membrana, o iodeto de propídeo invade a célula por meio dessas descontinuidades, interage com os ácidos nucleicos no interior das células e fluoresce.

A figura 3 mostra que o DHA induz alteração de integridade de membrana em células de câncer de ovário A2780 *in vitro* em tempos iniciais de tratamento. É possível se verificar que os valores de fluorescência apresentados no ponto inicial do ensaio em resposta à todas as concentrações de DHA foram maiores comparado ao não-estimulado, sendo que o estímulo com 200  $\mu\text{M}$  foi a condição experimental que apresentou os maiores valores de fluorescência durante todo o ensaio.

Verifica-se também que o efeito sobre a permeabilidade de membrana é dose-dependente, exceto pela concentração de 10  $\mu\text{M}$ , que apresentou valores de fluorescência superiores em grande parte do ensaio. Outro ponto que pode ser visualizado a partir desse ensaio é que a alteração de permeabilidade de membrana nos grupos tratados aumenta a partir de 2 horas de estímulo. Esse resultado demonstra que o DHA já é tóxico para as células em estudo em tempos precoces de tratamento, e que essa toxicidade induz alteração de integridade de membrana plasmática.

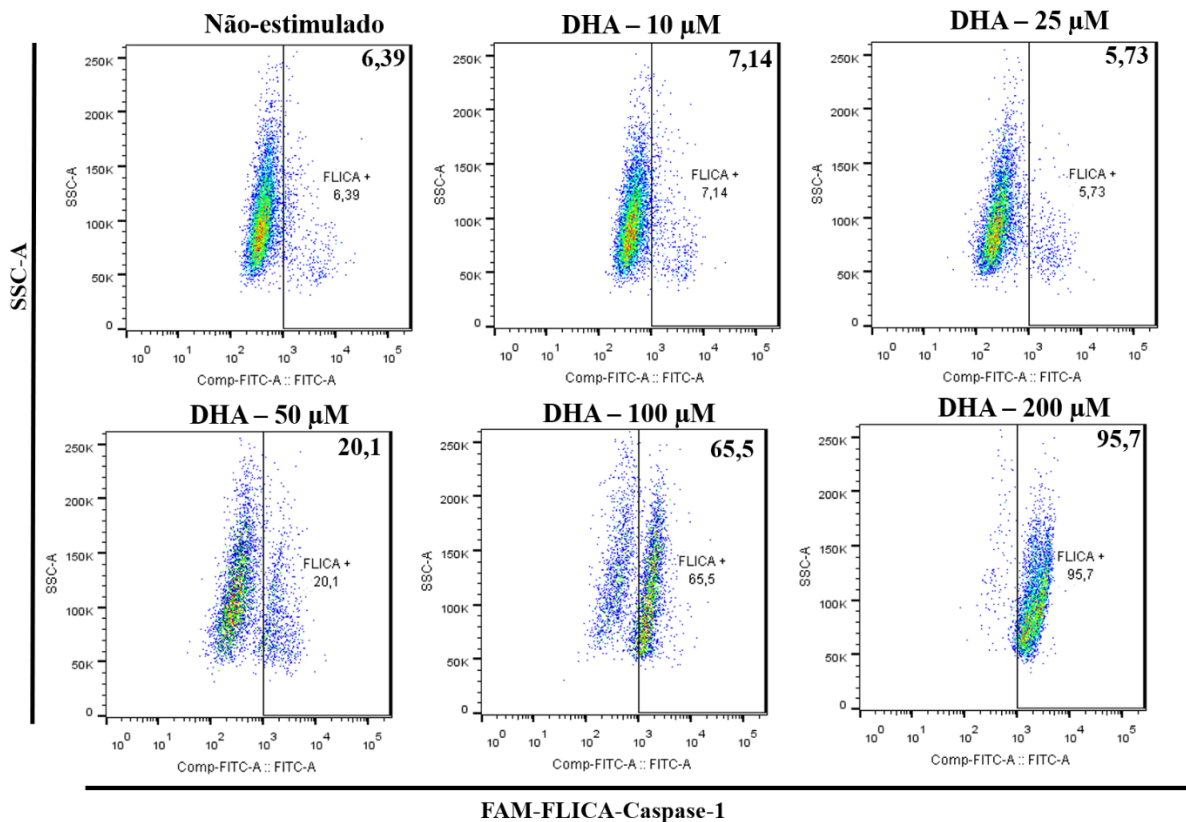


**Figura 3: DHA induz formação de poros na membrana plasmática de células A2780.** A2780 foram plaqueadas e estimuladas com DHA nas concentrações de 10 μM, 25 μM, 50 μM, 100 μM e 200 μM e expostas a iodeto de propídeo. Valores de fluorescência foram adquiridos em espectrofotômetro por 6 horas.

#### 5.4. Ativação de caspase-1

A fim de se analisar se o DHA induz ativação de caspase-1 em células de câncer de ovário A2780 *in vitro*, foi realizado um ensaio utilizando o agente fluorescente FAM-FLICA. A análise de ativação de caspase-1 foi realizada após 24 horas de tratamento com o ácido graxo DHA (figura 4). As células não-estimuladas apresentaram um valor de fluorescência do FLICA associado a 6,39 % de células. Os grupos tratados com 10 e 25  $\mu\text{M}$  de DHA apresentaram 7,14 e 5,73 % de células que emitiam fluorescência em FL-1, respectivamente. A porcentagem de células A2780 que possuíam caspase-1 ativa aumentou para 20,1 % em resposta ao tratamento com 50  $\mu\text{M}$  de DHA. Em 100  $\mu\text{M}$ , houve a detecção de 65,5 % de células fluorescentes, enquanto que 200  $\mu\text{M}$  induziu ativação de caspase-1 em quase a totalidade das células adquiridas (95,7 %).

É possível se verificar que o aumento da ativação de caspase-1 se inicia nas células tratadas com 50  $\mu\text{M}$ , a partir da qual detectou-se um efeito dose-dependente. Portanto, esses resultados indicam que as concentrações de 50, 100 e 200  $\mu\text{M}$  induzem ativação de caspase-1 em células de câncer de ovário A2780 após 24 horas de tratamento de forma dose-dependente.

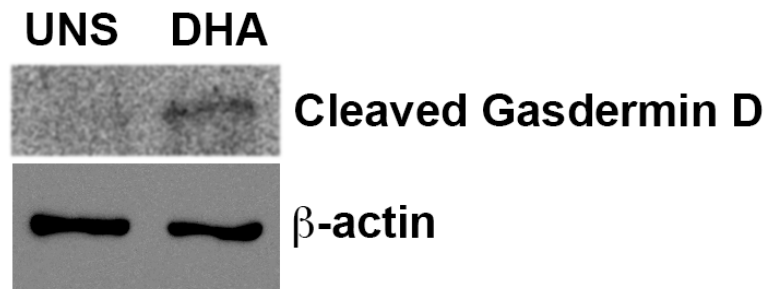


**Figura 4: DHA induz ativação de caspase-1 em células de câncer de ovário A2780.** A2780 foram plaqueadas e estimuladas com DHA nas concentrações de 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M e 200  $\mu$ M por 24 horas. Após os estímulos, as células foram marcadas com a sonda FAM-FLICA (FL-1) e analisadas em citômetro FACS Verse.

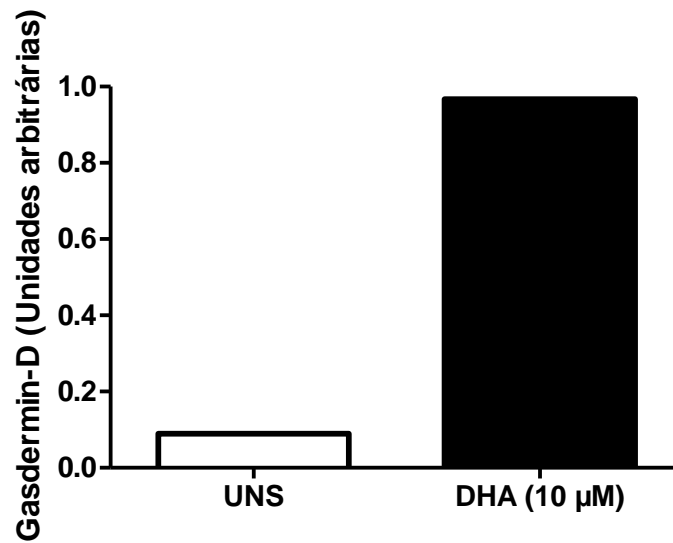
### **5.5. Clivagem de Gasdermin-D**

Tendo em vista avaliar se ocorre indução de clivagem de Gasdermin-D em células A2780 em resposta ao estímulo com DHA, foi realizada análise por imunomarcação do lisado celular. Como apresentado pela figura 5, 10  $\mu$ M de DHA induz clivagem de Gasdermin-D em células de câncer de ovário humano A2780 24 horas após início do estímulo.

A)



B)



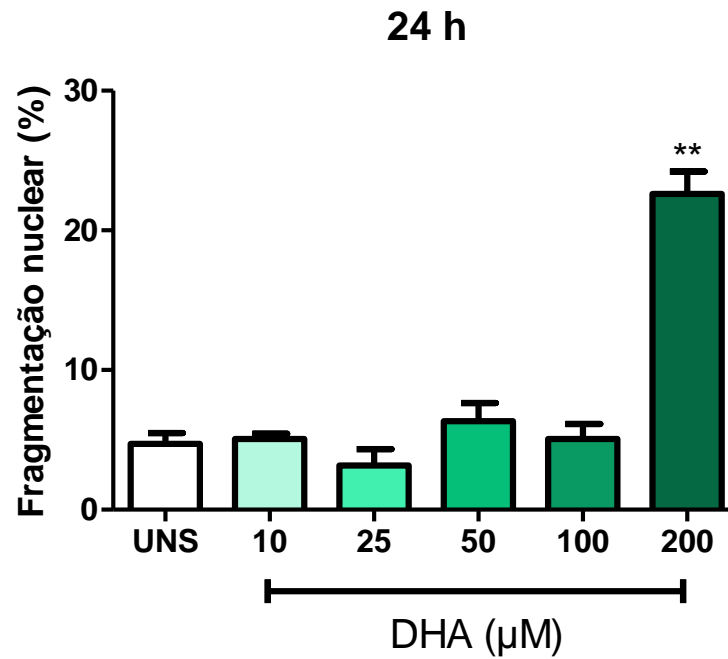
**Figura 5: DHA induz clivagem de Gasdermin-D em células de câncer de ovário A2780.** A2780 foram plaqueadas e estimuladas com DHA na concentração de 10  $\mu$ M por 24 horas. Após os estímulos, as células foram lisadas com tampão Triton, as proteínas foram quantificadas, separadas em gel de poliacrilamida, transferidas para membrana de nitrocelulose, bloqueadas e marcadas com anticorpos correspondentes.

## **5.6. Fragmentação nuclear**

Buscando investigar se ocorre indução de fragmentação nuclear em células A2780 em resposta ao DHA, foi realizada uma análise de marcação com iodeto de propídeo para citometria de fluxo. Eventos que apresentaram quantidade de DNA inferiores ao de uma célula em intérfase foram contabilizados como células com fragmentação nuclear.

Como apresentado na figura 5, as células não-estimuladas e as células expostas a 10, 25, 50 e 100  $\mu\text{M}$  apresentaram valores inferiores a 10 % de fragmentação nuclear, enquanto que as células estimuladas com 200  $\mu\text{M}$  mostraram valores superiores a 20 % desse evento, um efeito próximo a triplicação na porcentagem de células com fragmentação nuclear. Esse resultado sugere que a concentração de 200  $\mu\text{M}$  induz fragmentação nuclear em células A2780 24 horas após o início do tratamento.





**Figura 6: 200 µM de DHA induz fragmentação nuclear em células A2780.** A2780 foram plaqueadas e estimuladas com DHA nas concentrações de 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM e 200 µM por 24 horas. Após os estímulos, as células foram marcadas com iodeto de propídeo (FL-2) e analisadas em citômetro FACS Verse. Cada barra representa a média do percentual  $\pm$  DP (n=3), e um asterisco (\*), dois asteriscos (\*\*) e três asteriscos representam a diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ , respectivamente) em relação ao Não-estimulado (UNS) indicada por Teste T.

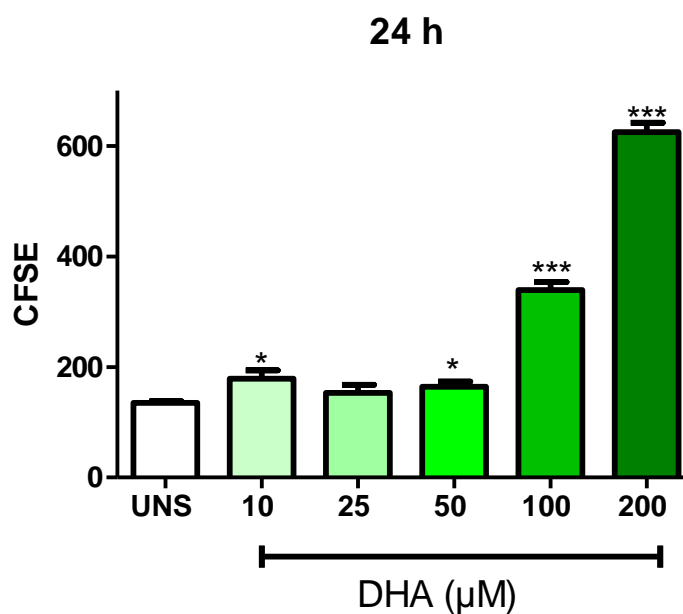
## 5.7. Análise de proliferação celular

O efeito do DHA sobre a proliferação celular foi também investigado utilizando o agente fluorescente permeável a membrana ligante de aminas citoplasmáticas CFSE. Como apresentado pela figura 6A, DHA inibe proliferação de células de câncer de ovário A2780 *in vitro* 24 horas após tratamento nas concentrações de 10, 50, 100 e 200  $\mu\text{M}$ , demonstrado pelos valores de fluorescência (*MFI*) superiores em comparação às células não-estimuladas.

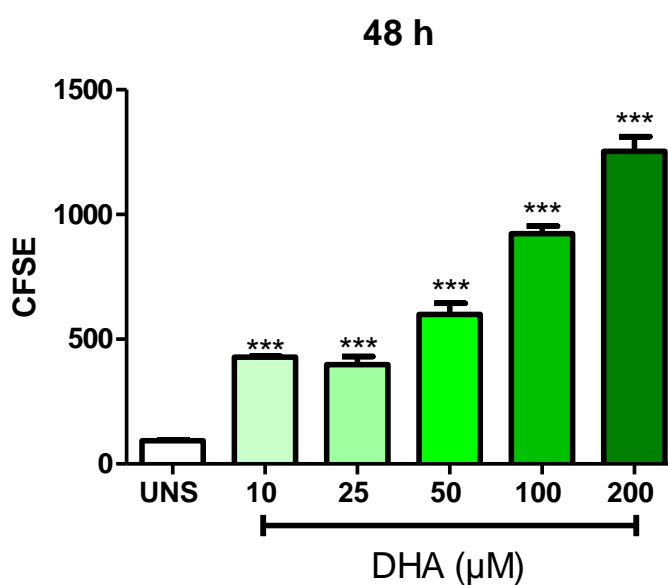
A influência do DHA sobre A2780 também foi analisada após 48 horas de estímulo. O aumento dos valores de fluorescência em todas as condições experimentais tratadas sugere que o DHA inibe proliferação também nesse tempo de tratamento (figura 6B). É visível que essa inibição é dose-dependente. Portanto, o DHA inibe proliferação de células de câncer de ovário A2780 *in vitro* 48 horas após tratamento de forma dose-dependente.

Levando em consideração os valores de fluorescência adquiridos para as condições estimuladas por 24 e 48 horas, o DHA inibe a proliferação de células de câncer de ovário A2780 de forma dose e tempo-dependente.

A)



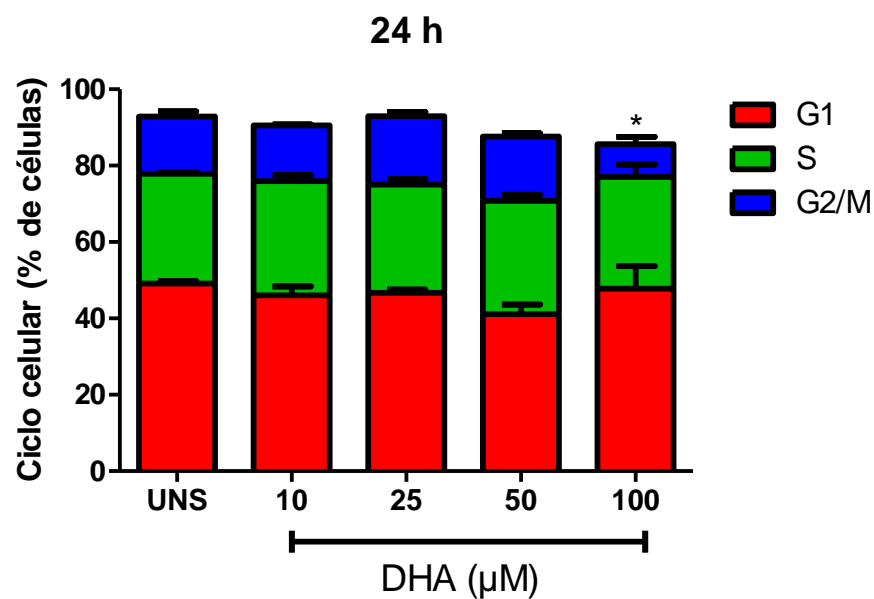
B)



**Figura 7: DHA inibe proliferação de células A2780.** A2780 foram plaqueadas e estimuladas com DHA nas concentrações de 10 μM, 25 μM, 50 μM, 100 μM e 200 μM por 24 horas (A) e 48 horas (B). Antes dos estímulos, as células foram marcadas com CFSE (FL-1) e analisadas em citômetro FACS Verse. Cada barra representa a média do percentual ± DP (n=3), e um asterisco (\*), dois asteriscos (\*\*), e três asteriscos (\*\*\*) representam a diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ , respectivamente) em relação ao Não-estimulado (UNS) indicada por Teste T.

## **5.8. Ciclo celular**

Tendo como objetivo analisar se o DHA altera a progressão do ciclo celular em A2780, as células foram expostas ao marcador iodeto de propídeo para aquisição em citometro de fluxo. Como ilustrado pela figura 8, 100  $\mu$ M de DHA inibe progressão do ciclo celular em células A2780. Essa conclusão pode ser tomada por ocorrer diminuição no número de células em fase G2/M.

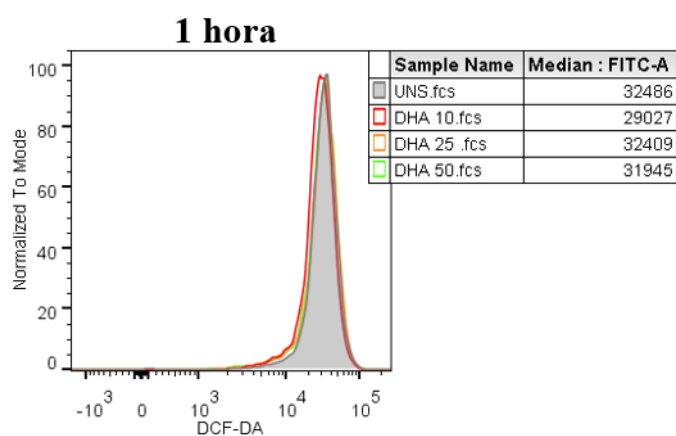


**Figura 8: DHA inibe progressão do ciclo celular em células A2780.** A2780 foram plaqueadas e estimuladas com DHA nas concentrações de 10 μM, 25 μM, 50 μM e 100 μM por 24 horas. Após os estímulos, as células foram marcadas com Iodeto de propídeo (FL-2) e analisadas em citômetro FACS Verse. Cada barra representa a média do percentual ± DP (n=3), e um asterisco (\*), dois asteriscos (\*\*), e três asteriscos representam a diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ , respectivamente) em relação ao Não-estimulado (UNS) indicada por Teste T.

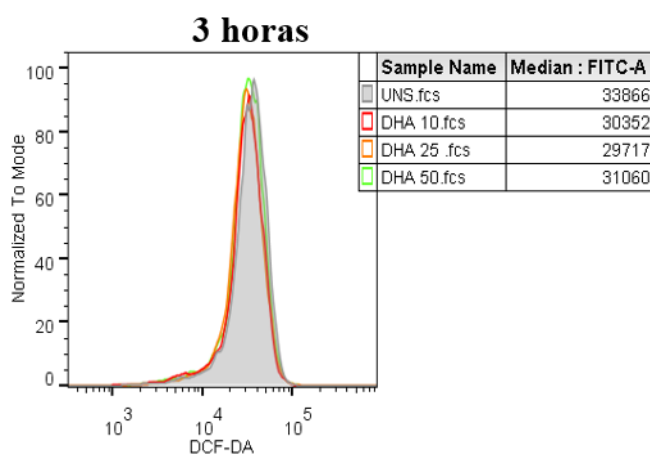
## **5.9. Espécies reativas de oxigênio**

A fim de se avaliar se o DHA altera a produção de espécies reativas de oxigênio 1, 3 e 6 horas após estímulo, foi realizada marcação para citometria de fluxo. Os valores de fluorescência (*MFI*) obtidos a partir da aquisição de células A2780 tratadas com as concentrações de 10, 25 e 50  $\mu\text{M}$  foram similares aos valores relacionados às células não-estimuladas. Esse resultado sugere que as concentrações investigadas de DHA não alteram a produção de espécies reativas de oxigênio em células de câncer de ovário A2780 após 1, 3 e 6 horas de tratamento.

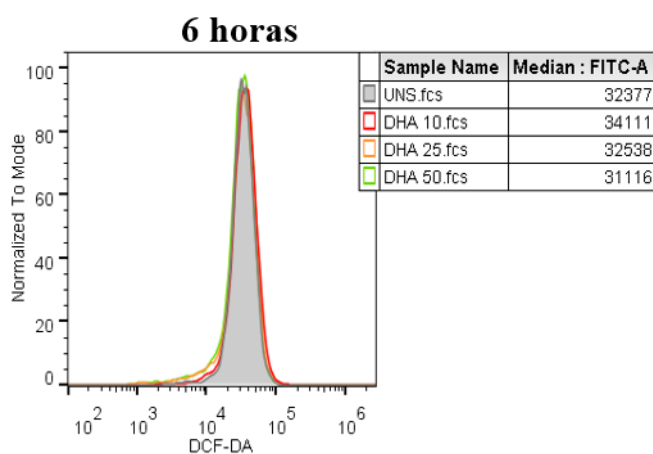
A)



A)



B)



**Figura 9: Figura 6: DHA inibe proliferação de células A2780.** A2780 foram plaqueadas e estimuladas com DHA nas concentrações de 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M e 50  $\mu$ M por 1 hora (A) 3 horas (B) e 6 horas (C). Após os estímulos, as células foram marcadas com DCF-DA (FL-1) e analisadas em citômetro FACS Verse.

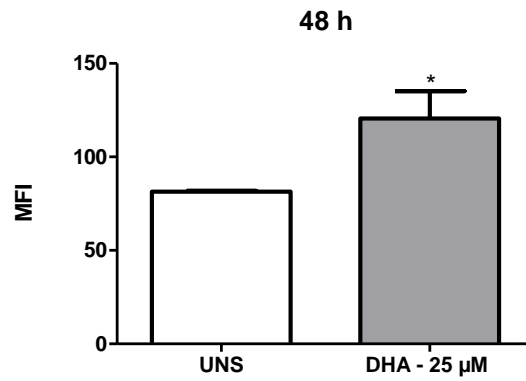
### **5.10. Análise de biogênese de corpúsculo lipídico**

Alterações no processo de biogênese de corpúsculo lipídico em células A2780 em resposta ao DHA também foram investigadas. Após 48 horas de tratamento, o não-estimulado apresentou valor de fluorescência (*MFI*) próximo a 80, enquanto que as células expostas a 25  $\mu\text{M}$  de DHA apresentaram fluorescência superior a 100, apresentando diferença estatística comparado ao grupo que não foi tratado com o ácido graxo em estudo (figura 7A).

Esse aumento de biogênese de corpúsculo lipídico é confirmado pela utilização de Oil Red O. Esse corante lipofílico marcador de lipídeos neutros mostrou maior coloração em células tratadas com 25  $\mu\text{M}$  de DHA. Essas análises experimentais mostram que o tratamento por 48 horas de 25  $\mu\text{M}$  de DHA induz aumento de biogênese de corpúsculo lipídico em células de câncer de ovário A2780 (figuras 10 A e B).

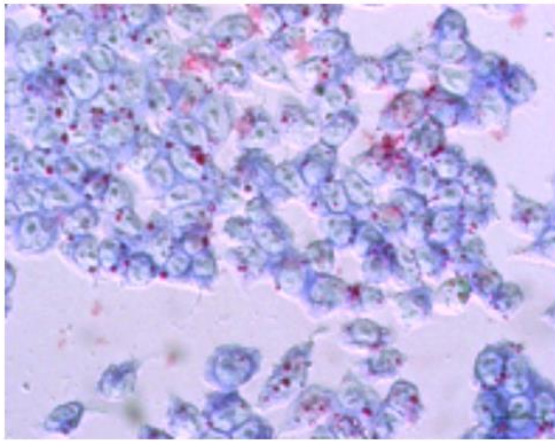


A)

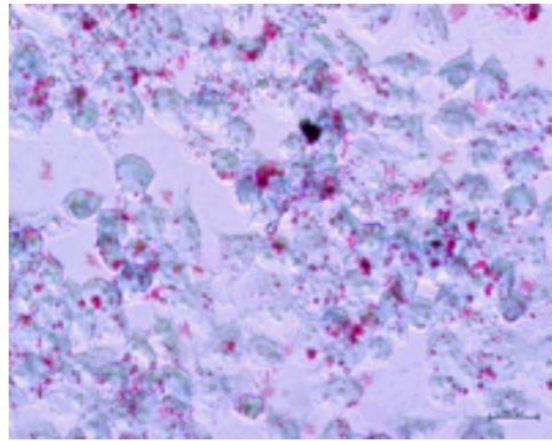


B)

**NÃO-ESTIMULADO**



**DHA**



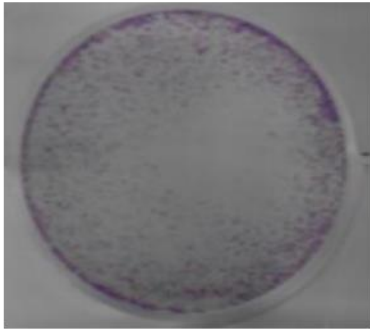
**Figura 10: DHA (25 μM) induz biogênese de corpúsculo lipídico em células A2780.** A2780 foram plaqueadas e estimuladas por 48 horas com DHA na concentração de 25 μM. Células foram marcadas com a sonda lipofílica Bodipy (FL-1) e adquirida em citômetro FACS Verse (A). Cada barra representa a média do percentual ± DP (n=3) e o asterisco (\*) representa a diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao Não-estimulado (UNS) indicada por Teste T. Células foram marcadas com corante marcador de lipídeos neutros Oil Red O e o composto marcador de núcleo hematoxilina: Não-estimulado e de DHA (25 μM) (B).

### **5.11. Formação de colônias**

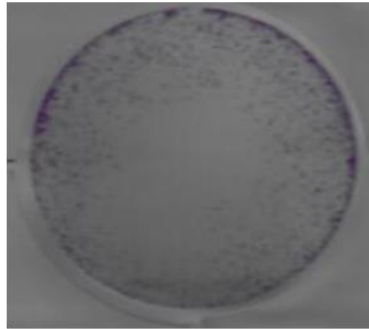
Buscando analisar o efeito do tratamento com DHA sobre a capacidade de formação de colônias em células A2780 foi conduzido um ensaio clonogênico, o qual consiste na avaliação de formação de colônia a partir da marcação com o corante cristal violeta. O efeito do DHA sobre as células de câncer de ovário em estudo foi investigado após 3 horas de estímulo com esse ômega-3.

Como ilustrado pela figura 8, as células tratadas com 10  $\mu\text{M}$  de DHA apresentaram números inferiores de colônias em relação às células não-estimuladas. O número de colônias formadas na condição de 25  $\mu\text{M}$  de DHA mostrou-se drasticamente inferior à condição não-estimulada. As células estimuladas com 50, 100 e 200  $\mu\text{M}$  de DHA não formaram colônias após 3 horas de tratamento, sendo que nenhuma marcação com cristal violeta foi visualizada nessas condições.

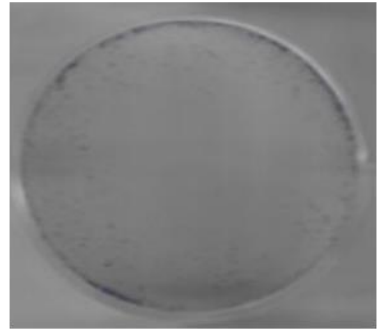
**Não-estimulado**



**DHA – 10  $\mu$ M**



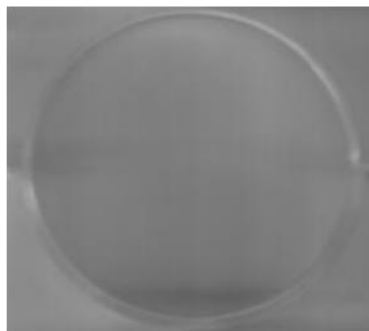
**DHA – 25  $\mu$ M**



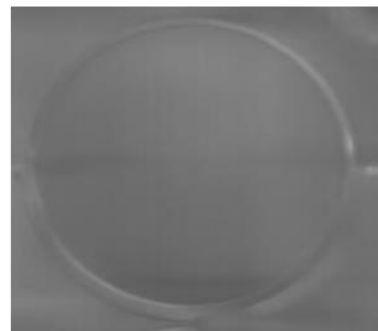
**DHA – 50  $\mu$ M**



**DHA – 100  $\mu$ M**



**DHA – 200  $\mu$ M**



**Figura 11: DHA inibe formação de colônias pelas células A2780.** A2780 foram plaqueadas e estimuladas com DHA nas concentrações de 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M e 200  $\mu$ M por 3 horas. Após 48 horas em meio na ausência de DHA, as células foram coradas com cristal violeta.

### **5.12. Secreção de óxido nítrico**

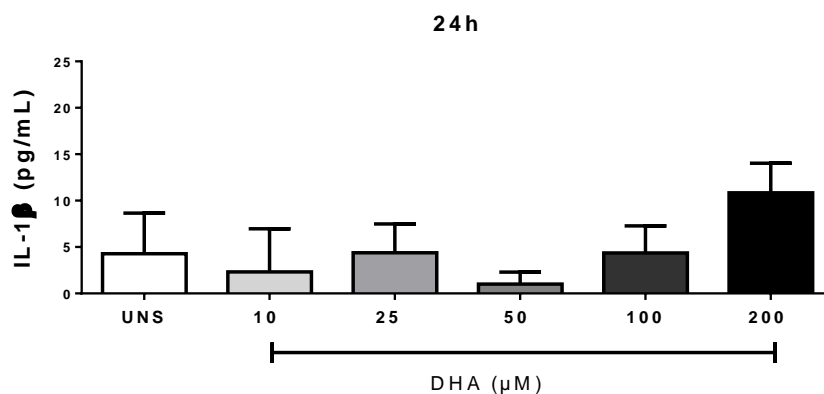
Buscando investigar se o DHA modula a secreção de óxido nítrico pelas células A2780, foi realizada dosagem a partir de sobrenadante de cultura. No entanto, não foram obtidos valores detectáveis de óxido nítrico em nenhuma das condições, sugerindo que a célula de câncer de ovário A2780 secreta níveis muito baixos desse óxido.

### **5.13. Secreção de citocinas**

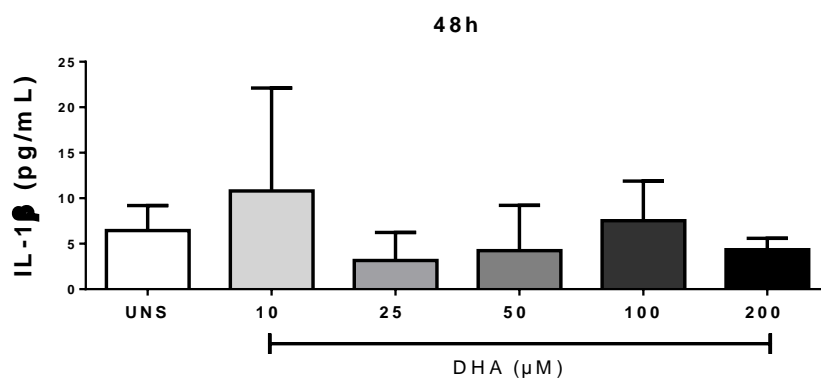
Tendo como objetivo investigar o efeito do DHA sobre secreção das citocinas Interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Interleucina 6 (IL-6) e Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), foi realizada análise de sobrenadante de cultura utilizando a técnica do ELISA. A coleta dos sobrenadantes ocorreu 24, 48 e 72 horas após o início do estímulo.

A quantificação da citocina IL-1 $\beta$  mostrou que as células A2780 secretam valores que variam de 2 a 20 pg/mL dessa proteína. A figura 13 sugere que, apesar de apresentar alto grau de variação, o DHA não modula a secreção de IL-1 $\beta$  pelas células A2780 após 24, 48 e 72 horas de estímulo.

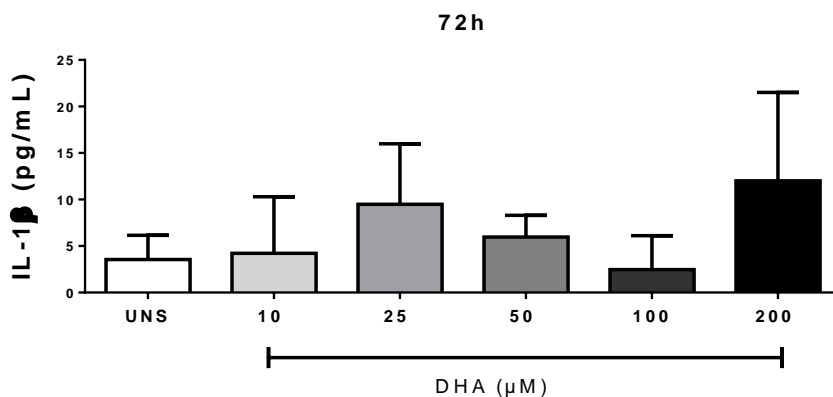
A)



B)



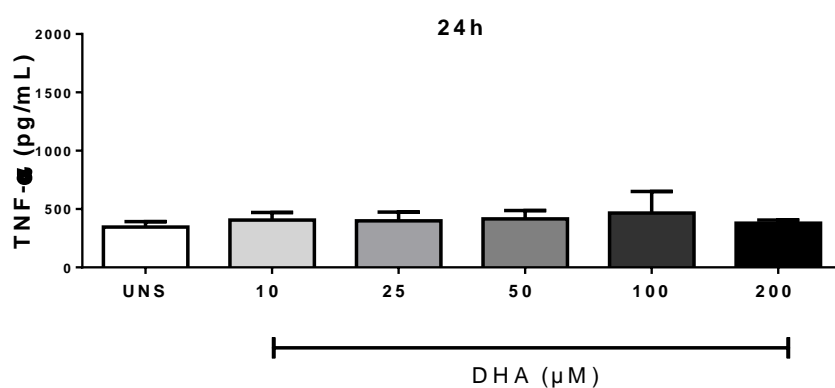
C)



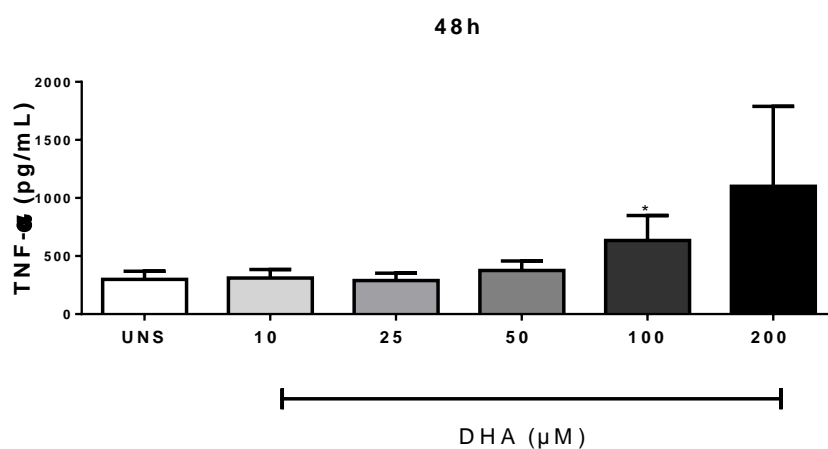
**Figura 12: DHA não altera secreção de IL-1 $\beta$  em células A2780 após 24, 48 e 72 horas de estímulo.** A2780 foram plaqueadas e estimuladas com DHA nas concentrações de 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M e 200  $\mu$ M por 24 horas (A), 48 horas (B) e 72 horas (C). Após os estímulos, os sobrenadantes de cultura foram coletados e a quantidade de IL-1 $\beta$  foi dosada por ELISA. Cada barra representa a média do percentual  $\pm$  DP (n=3), e um asterisco (\*), dois asteriscos (\*\*), e três asteriscos (\*\*\*) representam a diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ , respectivamente) em relação ao Não-estimulado (UNS) indicada por Teste T, ANOVA e pós-teste de Tukey.

A dosagem de TNF- $\alpha$  indicou que as células de câncer de ovário A2780 secretam valores relativamente altos dessa molécula. No entanto, como ilustrado pela figura 13, o DHA não modula a secreção dessa citocina pelas células A2780 após 24, 48 e 72 horas de estímulo.

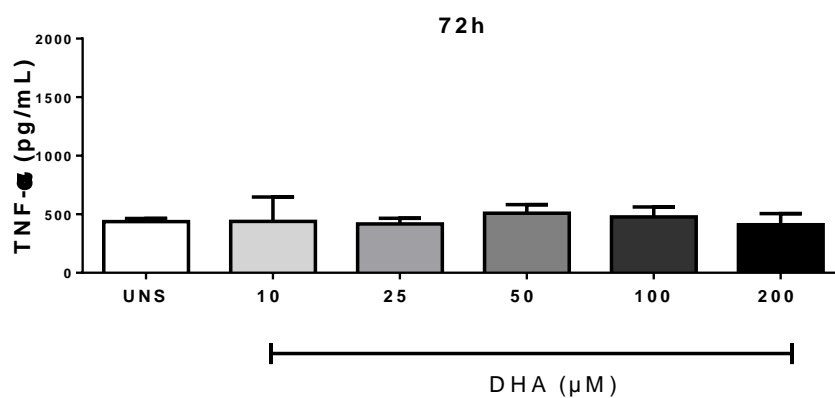
A)



B)



C)



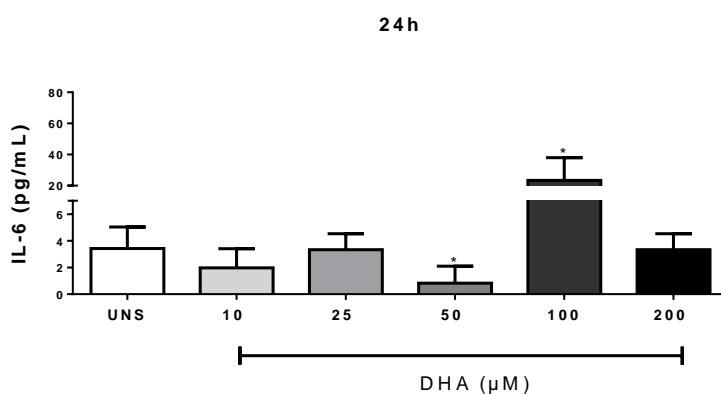
**Figura 13: DHA não altera secreção de TNF- $\alpha$  em células A2780 após 24, 48 e 72 horas de estímulo.** A2780 foram plaqueadas e estimuladas com DHA nas concentrações de 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M e 200  $\mu$ M por 24 horas (A), 48 horas (B) e 72 horas (C). Após os estímulos, os sobrenadantes de cultura foram coletados e a quantidade de TNF- $\alpha$  foi dosada por ELISA. Cada barra representa a média do percentual  $\pm$  DP (n=3), e um asterisco (\*), dois asteriscos (\*\*) e três asteriscos (\*\*\*) representam a diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ , respectivamente) em relação ao Não-estimulado (UNS) indicada por Teste T, ANOVA e pós-teste de Tukey.

Verifica-se que o DHA induz modulação na secreção da citocina IL-6. Como mostrado pela figura 14A, 24 horas após estímulo com 50  $\mu\text{M}$  de DHA ocorre diminuição da secreção dessa citocina, enquanto que há aumento da exportação desta em resposta ao estímulo com 100  $\mu\text{M}$  de DHA. Em 48 horas, como ilustrado pela figura 14B, ocorre aumento na secreção dessa interleucina em resposta ao tratamento com 25, 50 e 100  $\mu\text{M}$  de DHA. Por outro lado, após 72 horas de estímulo com 50  $\mu\text{M}$  de DHA verifica-se diminuição do transporte dessa citocina para fora da célula (figura 14C).

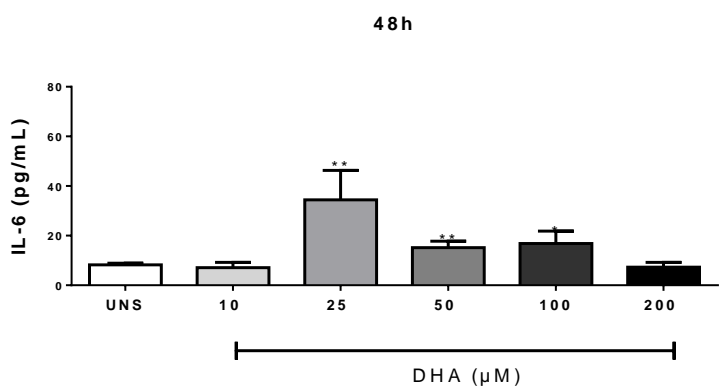
Esses resultados sugerem que o DHA não modula a secreção de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  em células de câncer de ovário A2780 nos tempos testados, enquanto que esse ácido graxo modula a secreção de IL-6 por A2780 em todos os tempos de estímulo investigados.



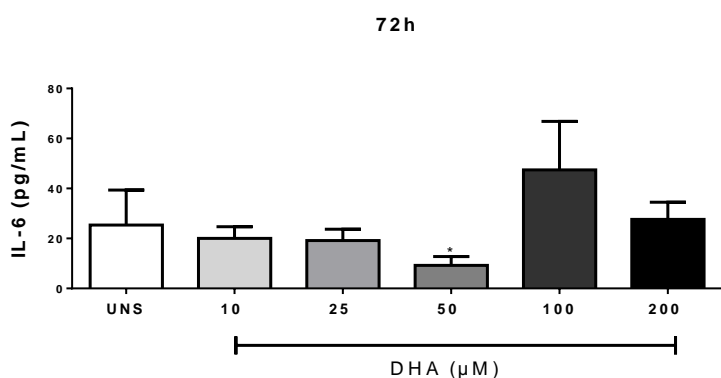
A)



B)



C)



**Figura 14: DHA aumenta a secreção de IL-6 em células A2780 após 24, 48 e 72 horas de estímulo.** A2780 foram plaqueadas e estimuladas com DHA nas concentrações de 10 μM, 25 μM, 50 μM, 100 μM e 200 μM por 24 horas (A), 48 horas (B) e 72 horas (C). Após os estímulos, os sobrenadantes de cultura foram coletados e a quantidade de IL-6 foi dosada por ELISA. Cada barra representa a média do percentual ± DP (n=3), e um asterisco (\*), dois asteriscos (\*\*), e três asteriscos (\*\*\*) representam a diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ , respectivamente) em relação ao Não-estimulado (UNS) indicada por Teste T, ANOVA e pós-teste de Tukey.

## 6. Discussão

O presente trabalho visou caracterizar os efeitos do Ômega-3 ácido docosahexaenoico (DHA) sobre células de câncer de ovário humano A2780, analisando parâmetros celulares e investigando a morte celular induzida por esse ácido graxo.

Sabe-se que a inflamação é uma resposta biológica a perturbações na homeostase de tecidos (Medzhitov 2008). Esse processo pode ser induzido pela invasão de patógenos ou por células danificadas, é mediado por alterações na vascularização local (Ashley et al. 2012), e se caracteriza pela secreção de diversos mediadores e moléculas de ação citotóxica, além de migração intensa de células da resposta imune (Kotas & Medzhitov 2015). Por isso, a inflamação pode ser danosa ao tecido no qual ocorre, e a ineficiência ou incapacidade de resolver esse processo pode levar ao estabelecimento de um quadro persistente crônico, o qual favorece o desenvolvimento de diversas patologias, incluindo o câncer (Sugimoto et al. 2016). 20 % dos casos de desenvolvimento tumoral em humanos está relacionado à inflamação crônica (Crusz & Balkwill 2015). Isso ocorre porque o microambiente inflamatório apresenta intensa ativação de NFκB, altos níveis de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, citocinas, mediadores lipídicos e microRNAs (Munn 2017), fatores que favorecem ativação de oncogenes, genes associados ao favorecimento de proliferação celular, sobrevivência e angiogênese, os quais possibilitam iniciação tumoral (Mantovani et al. 2008).

No contexto da progressão tumoral, sabe-se que a influência da inflamação sobre a tumorigênese não é linear e depende do balanço de citocinas e quimiocinas presentes no microambiente tumoral. Quando há poucas citocinas secretadas ou citocinas anti-inflamatórias em abundância, há limitação de respostas inflamatória e vascular, apresentando como resultado diminuição do crescimento tumoral. Em contrapartida, quando há secreção abundante de citocinas pró-inflamatórias no estroma tumoral, a inflamação induzida favorece a ocorrência de angiogênese, possibilitando o crescimento do tumor. Após crescimento tumoral em resposta a fatores pró-tumorigênicos, alterações do perfil de citocinas e quimiocinas locais podem acontecer, com favorecimento de infiltração intensa de monócitos e neutrófilos, resultando em regressão tumoral e angiostasia.

O impacto do processo inflamatório sobre o risco de iniciação tumoral no ovário também é bastante relevante, visto que a ovulação é um processo associado à inflamação. A superfície do epitélio ovariano adjacente ao local da ovulação é continuamente exposta a um

ambiente inflamatório e oxidativo. Durante o processo de liberação do ovócito e no processo de reparo do tecido, diversos fatores pró-inflamatórios são liberados. Outra hipótese recentemente apresentada sugere que o ferro derivado de menstruação retrógrada induz estresse oxidativo nas células da região. Segundo os pesquisadores, nesse processo ocorre hemólise mediada por macrófagos ativados e pelas citocinas secretadas por eles (Macciò & Madeddu 2012). Portanto, assim como em outros tipos de câncer, a iniciação e a progressão do tumor ovariano também são influenciadas pela inflamação.

Visto que a inflamação é um processo que pode aumentar os riscos de desenvolvimento de tumores, as ações anti-inflamatórias do ácido docosahexaenoico (DHA) vêm se apresentando aplicáveis. Estudos vêm demonstrando que o DHA e seus produtos são capazes de inibir quimiotaxia de leucócitos, expressão de moléculas de adesão, produção de eicosanoides derivados do ácido graxo Ômega-6 Ácido araquidônico (AA) e síntese de citocinas pró-inflamatórias. Essa ação anti-inflamatória do DHA deriva principalmente do fato de ele ser matéria-prima na produção de mediadores lipídicos que atuam favorecendo o processo de resolução da inflamação (Calder 2017).

Diversos trabalhos vêm informando que o DHA não só apresenta propriedades anti-inflamatórias, mas esse ácido graxo poli-insaturado também diminui a viabilidade de células de câncer. Estudos mostraram que células de câncer de mama (Hwang et al. 2015), pulmão (Yin et al. 2017) e cólon (Pettersen et al. 2016) tratadas com DHA *in vitro* apresentaram diminuição na viabilidade de forma dose- dependente. O efeito de redução da viabilidade de células de origem tumoral de forma dependente da concentração do DHA utilizado para estímulo também foi verificado no trabalho em discussão, mostrando efeito dependente da dose e do tempo de tratamento.

A influência do DHA sobre a viabilidade de células cancerígenas provavelmente deriva do fato de esse ácido graxo apresentar ações inibitórias sobre proliferação celular e favorecer o acontecimento de morte dessas células. Diversos trabalhos vêm sugerindo que o ácido docosahexaenoico inibe proliferação em células de câncer, incluindo derivadas de mama (Altenburg et al. 2011), próstata (Oono et al. 2017), cólon (Skender et al. 2012), estômago (Dai et al. 2013), pâncreas (Zhang et al. 2007), fígado (Wan 2010) e pulmão (YAO et al. 2014). O ensaio com o composto CFSE nos mostrou que, de forma similar a esses trabalhos, o DHA também inibe proliferação de células de câncer de ovário humano *in vitro*.

Estudos analisando o efeito de 100 e 200  $\mu\text{M}$  de DHA sobre células de câncer de mama (Rescigno et al. 2016) e fígado (Wan 2010) mostraram que essas concentrações inibiram a progressão do ciclo celular nessas células de câncer. O efeito inibitório de 100  $\mu\text{M}$  de DHA sobre o ciclo celular de células A2780 também foi verificado no presente estudo. Segundo os estudos citados acima, a ação inibitória sobre o ciclo celular que o DHA apresenta se dá por meio da diminuição dos níveis de proteínas associados à regulação do ciclo celular em células tratadas com esse ômega-3.

A ação de indução de morte de células cancerígenas mediada pelo Ômega-3 ácido docosahexaenoico também vem sendo descrita. Indução de morte de células de câncer de cólon (Skender et al. 2012), pâncreas (Zhang et al. 2007), mama (Geng et al. 2017) e células da glia (Kim et al. 2017) ocorrem como consequência do tratamento dessas células com o DHA. No presente trabalho foi possível se verificar que o DHA também induz morte em células derivadas de tumor ovariano A2780, indução que se apresentou como sendo tempo e dose-dependente. No entanto, o perfil de morte celular apresentado pelas células de câncer de ovário em resposta ao estímulo com crescentes concentrações de DHA mostrou que a morte lítica é o principal tipo de morte induzida nessas células. Por outro lado, o DHA induz principalmente morte apoptótica nos trabalhos citados.

A fragmentação nuclear é caracterizada por ocorrer como consequência da morte apoptótica. Durante esse processo, o material genético encontrado no núcleo celular é clivado por nucleases gerando fragmentos menores de tamanhos constantes (He et al. 2009). No trabalho em discussão, verificamos por marcação com iodeto de propídeo que o estímulo por 24 horas com 200  $\mu\text{M}$  de DHA induziu a formação de sequências de DNA de tamanhos inferiores aos encontrados em células vivas. Esse fato sugere que nessa concentração e após esse tempo de tratamento o DHA também induziu morte apoptótica nas células de câncer de ovário humano A2780, indicando que tal concentração é tão alta que atua induzindo diversas vias de morte celular. Estudos mostraram que pode ocorrer na mesma célula indução de morte por apoptose e piroptose dependendo da dose do estímulo utilizada (Sagulenko et al. 2013; Lebeaupin et al. 2015).

O ensaio clonogênico possibilita a avaliação da viabilidade reprodutiva de uma célula em resposta a um tratamento. Ou seja, esse ensaio analisa a capacidade de uma célula de produzir progenia. A análise de formação de colônia é importante por possibilitar a investigação de parâmetros carcinogênicos como proliferação e migração (Rafehi et al. 2011).

Yin e colaboradores (2017) mostraram que o tratamento de células de câncer de pulmão A459 com DHA inibiu a formação de colônias dessas células, fato também verificado no presente trabalho.

Corpúsculo lipídico é considerada uma organela dinâmica e funcional que participa do armazenamento de moléculas lipídicas, biossíntese de membranas, metabolismo lipídico, sinalização celular e inflamação (Tirinato et al. 2017). É sabido que o DHA é notavelmente armazenado nessas organelas quando encontrado em excesso no interior da célula ou na região exógena (Chen & Li 2017; Tremblay et al. 2016). Em estudo avaliando o efeito do DHA sobre a biogênese de corpúsculo lipídico de células de câncer de mama não-invasivo humano (MCF-7), se verificou que houve aumento de mais de 50 % de acúmulo de corpúsculo lipídico nas células tratadas com o ácido graxo comparadas ao grupo controle (Chamras et al. 2002). O efeito de aumento de biogênese de corpúsculo também foi verificado no presente trabalho por meio de marcação com o fluoróforo BODIPY 493/503 e com o corante lipofílico Oil Red O.

Sabe-se que um dos principais modos de interação entre a célula tumoral e o microambiente inflamatório é pela secreção de citocinas e outros mediadores. A capacidade invasiva de células malignas tende a aumentar em presença das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 (Balkwill et al. 2005). Essas citocinas foram dosadas por ELISA e níveis detectáveis foram obtidos (figuras 9, 10 e 11). É possível se afirmar a partir da figura 11 que o DHA apresentou modulação apenas da citocina IL-6.

É sabido que alterações de permeabilidade de membrana ocorre em mortes de natureza lítica, como a piroptose. Torna-se cada vez mais claro que esse efeito sobre a integridade de membrana é devido a formação de poros de forma regulada. Na morte por piroptose, a formação de poros na membrana é mediada pela porção N-terminal da Gasdermin-D, a qual é a principal executora no processo de eliminação de integridade de membrana por formação de poros. No presente trabalho, utilizando o marcador iodeto de propídeo, foi possível se verificar que o DHA induziu formação de poros em células de câncer de ovário A2780 *in vitro*. O aumento na formação de poros de membrana se inicia 2 horas após o início do estímulo com o ácido graxo, indicando que o processo de morte celular induzido pelo DHA é precoce apresentando formação de descontinuidades de membrana. Um trabalho publicado pelo grupo mostrou que DHA induziu formação de poros em células de câncer de mama invasivo humano (MDA-MB-231). Nesse trabalho foi possível verificar que a fluorescência do iodeto de propídeo no ponto inicial do ensaio, indicativa de formação de poro de membrana, era superior

comparada ao grupo não-estimulado e se manteve superior ao grupo controle durante todo o período analisado (Pizato et al. 2018). O mesmo efeito foi verificado no estudo em discussão.

A caspase-1 se caracteriza por ser uma enzima citoplasmática que possui papel central na maturação das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-18 e na clivagem e ativação da proteína executora da piroptose Gasdermin-D (Bliss-Moreau et al. 2017). Portanto ativação de caspase-1 pode indicar progressão de morte piroptótica. Um trabalho recente do grupo mostrou que o DHA induz ativação de caspase-1 em células de câncer de mama MDA-MB231 (Pizato et al. 2018). O mesmo efeito de ativação dessa enzima foi verificado no presente trabalho, ocorrendo ativação de caspase-1 em células de câncer de ovário humano A2780 de forma dose-dependente 24 horas após início do estímulo com DHA. Essa ativação sugere que há indução de morte celular por piroptose nas células investigadas.

A Gasdermin-D é uma proteína cuja clivagem pela ação da caspase-1 está associada à liberação da porção executora N-terminal, interação com componentes lipídicos da membrana plasmática e formação de poro (Qiu et al. 2017). O estudo já citado publicado por Pizato e colaboradores (2018) apresentou que o DHA induz clivagem de Gasdermin-D em células de câncer de mama humano invasivo. A indução de clivagem de Gasdermin-D em resposta ao estímulo com o DHA também foi verificada em células de câncer de ovário humano A2780.

O presente trabalho mostrou que o DHA induz diminuição de viabilidade de células de câncer de ovário humano A2780, mostrando que esse ácido graxo apresenta ação citotóxica à essas células. Os ensaios de perfil de morte celular por Anexina/PI e formação de poros de membrana indicaram que as células derivadas de tumor ovariano quando tratadas com o DHA indicaram que as células em estudo apresentam morte com perda de integridade de membrana de forma precoce. O fato de ocorrer ativação de caspase-1 bem como formação de poros na membrana plasmática e clivagem de Gasdermin-D nas células A2780 sugere que a morte induzida pelo DHA nas células de câncer de ovário é a piroptose.

A morte celular por piroptose está associada à ativação de diversos inflamassomas, inclusive o NLRP3 (Sharma & Kanneganti 2016). O inflamassoma NLRP3 necessita de dois sinais para ser ativado: um primeiro sinal, associado a ativação de receptores de reconhecimento de padrões moleculares (PRRs), e um segundo sinal, normalmente relacionado a indicadores de dano celular, como liberação de catepsina. (Guo et al. 2015). A possibilidade do DHA atuar como agonista de PRRs em células de câncer foi apresentada em células de câncer de mama, nas quais esse ácido graxo poli-insaturada interage com TLR4 e induz a

ativação deste, atuando como primeiro sinal para a ativação do inflamassoma NLRP3 (Geng et al. 2017). Outro estudo sugeriu que o DHA apresenta sua ação citotóxica no contexto da indução de morte por piroptose por atuar como segundo sinal, indicado pelo fato de que inibição de produção de espécies reativas de oxigênio e de liberação de catepsina induzem diminuição de formação de poros em células de câncer de mama (Pizato et al. 2018). Frente a essas informações, nós sugerimos que a citotoxicidade do DHA em células de câncer de ovário pode ser devido a ação deste composto lipídico como primeiro e segundo sinais. Análises adicionais são necessárias afim de descobrir os mecanismos moleculares do DHA sobre a indução da morte por piroptose em células de câncer de ovário.

O trabalho em discussão caracterizou o efeito do DHA sobre alguns parâmetros de células de câncer de ovário humano A2780, mostrando que esse ácido graxo diminui viabilidade, proliferação, progressão do ciclo celular e formação de colônias por essas células, favorece indução de morte por piroptose, induz aumento de biogênese de corpúsculo lipídico, não altera os níveis de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  secretados e de espécies reativas de oxigênio, modula a secreção de IL-6 e favorece fragmentação nuclear em altas concentrações.

## **7. Conclusão**

Pode-se concluir a partir desse trabalho que o DHA apresenta características anti-tumorais em células de câncer de ovário humano *in vitro* por induzir morte celular por piroptose em células A2780 e inibir crescimento dessas células.



## 8. Referências

- Aglietti, R.A. & Dueber, E.C., 2017. Recent Insights into the Molecular Mechanisms Underlying Pyroptosis and Gasdermin Family Functions. *Trends in Immunology*, 38(4), pp.261–271. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2017.01.003>.
- Altenburg, J.D. et al., 2011. A synergistic antiproliferation effect of curcumin and docosahexaenoic acid in SK-BR-3 breast cancer cells: Unique signaling not explained by the effects of either compound alone. *BMC Cancer*, 11(1), p.149. Available at: <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/11/149>.
- Ashley, N.T., Weil, Z.M. & Nelson, R.J., 2012. Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 43(1), pp.385–406. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-ecolsys-040212-092530>.
- Balkwill, F., Charles, K.A. & Mantovani, A., 2005. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell*, 7(3), pp.211–217.
- Bliss-Moreau, M. et al., 2017. A motive for killing: Effector functions of regulated lytic cell death. *Immunology and Cell Biology*, 95(2), pp.146–151.
- Calder, P.C., 2017. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: from molecules to man. *Biochemical Society Transactions*, (5), pp. 1105–1115. Available at: <http://biochemsoctrans.org/lookup/doi/10.1042/BST20160474>.
- Chamras, H. et al., 2002. Fatty acid modulation of MCF-7 human breast cancer cell proliferation, apoptosis and differentiation. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(12), pp.711–716. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955286302002309>.
- Chen, T. & Li, H., 2017. Fatty acid metabolism and prospects for targeted therapy of cancer. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119(10), pp.1–11. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/ejlt.201600366>
- Cooper, D.N. et al., 2013. Where genotype is not predictive of phenotype: towards an understanding of the molecular basis of reduced penetrance in human inherited disease. *Human Genetics*, 132(10), pp.1077–1130. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00439-013-1331-2>.
- Cornelison, R., Llana, D.C. & Landen, C.N., 2017. Emerging therapeutics to overcome chemoresistance in epithelial ovarian cancer: A mini-review. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10), pp.1–20. Available at: <http://www.mdpi.com/1422-0067/18/10/2171>
- Crusz, S.M. & Balkwill, F.R., 2015. Inflammation and cancer: Advances and new agents. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 12(10), pp.584–596. Available at: <http://www.nature.com/articles/nrclinonc.2015.105>
- Dai, J. et al., 2013. Effects of polyunsaturated fatty acids on the growth of gastric cancer cells in vitro. *Lipids in Health and Disease*, 12(1), p.1. Available at:

<http://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-511X-12-71>

- Dawson, M.A. & Kouzarides, T., 2012. Cancer epigenetics: From mechanism to therapy. *Cell*, 150(1), pp.12–27. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.013>.
- Echeverría, F. et al., 2017. Docosahexaenoic acid (DHA), a fundamental fatty acid for the brain: New dietary sources. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 124, pp.1–10. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plefa.2017.08.001>.
- Fatokun, A.A., Dawson, V.L. & Dawson, T.M., 2014. Parthanatos: Mitochondrial-linked mechanisms and therapeutic opportunities. *British Journal of Pharmacology*, 171(8), pp.2000–2016. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/bph.12416>
- Fearnhead, H.O., Vandenabeele, P. & Berghe, T. Vanden, 2017. How do we fit ferroptosis in the family of regulated cell death? *Cell Death and Differentiation*, 24(12), pp.1991–1998. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2017.149>.
- Fischer, U., Jänicke, R.U. & Schulze-Osthoff, K., 2003. Many cuts to ruin: A comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death and Differentiation*, 10(1), pp.76–100. Available at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/sj.cdd.4401160>
- Fuchslocher Chico, J., Saggau, C. & Adam, D., 2017. Proteolytic control of regulated necrosis, *Elsevier B.V.*, 1864(11), pp. 2147-2161. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.05.025>.
- Gadducci, A. & Guerrieri, M.E., 2017. Immune Checkpoint Inhibitors in Gynecological Cancers: Update of Literature and Perspectives of Clinical Research. *Anticancer Research*, 37(11), pp.5955–5965. Available at: <http://ar.iijournals.org/content/37/11/5955.abstract>.
- Gao, X. et al., 2017. Cancer cell dormancy: Mechanisms and implications of cancer recurrence and metastasis. *Oncotargets and Therapy*, 10, pp.5219–5228. Available at: <https://www.dovepress.com/cancer-cell-dormancy-mechanisms-and-implications-of-cancer-recurrence--peer-reviewed-article-OTT>.
- Geng, L. et al., 2017. DHA induces apoptosis of human malignant breast cancer tissues by the TLR-4/PPAR- $\alpha$  pathways. *Oncology Letters*, 15, pp.2967–2977. Available at: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2017.7702>.
- Golstein, P. & Kroemer, G., 2007. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(1), pp.37–43. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968000406003185>
- Grootjans, S., Vanden Berghe, T. & Vandenabeele, P., 2017. Initiation and execution mechanisms of necroptosis: An overview. *Cell Death and Differentiation*, 24(7), pp.1184–1195. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2017.65>.
- Guo, H., Callaway, J.B. & Ting, J.P.Y., 2015. Inflammasomes: Mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nature Medicine*, 21(7), pp.677–687. Available at: <http://www.nature.com/articles/nm.3893>
- Guo, X. et al., 2017. n-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Metabolic Syndrome Risk: A Meta-Analysis. *Nutrients*, 9(7), p.703. Available at: <http://www.mdpi.com/2072-6643/9/7/703>.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*,

144(5), pp.646–674. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.

- Hashimoto, M. et al., 2017. Docosahexaenoic acid: one molecule diverse functions. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(5), pp.579–597. Available at: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07388551.2016.1207153>
- He, B., Lu, N. & Zhou, Z., 2009. Cellular and nuclear degradation during apoptosis. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(6), pp.900–912. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955067409001550>.
- Hishikawa, D. et al., 2017. Metabolism and functions of docosahexaenoic acid-containing membrane glycerophospholipids. *FEBS Letters*, 591(18), pp.2730–2744. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/1873-3468.12825>
- Hopkins, M.M. & Meier, K.E., 2017. Free fatty acid receptor (FFAR) agonists inhibit proliferation of human ovarian cancer cells. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 122, pp.24–29. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plefa.2017.06.013>.
- Huerta-Yépez, S., Tirado-Rodriguez, A.B. & Hankinson, O., 2016. Role of diets rich in omega-3 and omega-6 in the development of cancer. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 73(6), pp.1–11. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1665114616301423>.
- Hwang, S. et al., 2015. Effect of Docosahexaenoic Acid ( DHA ) on Breast Cancer Cells., 30, pp.103–107. Available at: <http://dx.doi.org/10.7180/kmj.2015.30.2.103>
- KMJ
- Ibiebele, T.I. et al., 2012. Intake of omega-3 and omega-6 fatty acids and risk of ovarian cancer. *Cancer Causes and Control*, 23(11), pp.1775–1783. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s10552-012-0053-4>
- Isaac, A.R. et al., 2018. Low omega-6/omega-3 ratio in a maternal protein-deficient diet promotes histone-3 changes in progeny neural cells and favors leukemia inhibitory factor gene transcription. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 55, pp.229–242. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955286317303777>.
- Jones, M.R. et al., 2017. Genetic epidemiology of ovarian cancer and prospects for polygenic risk prediction. *Gynecologic Oncology*, 147(3), pp.705–713. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0090825817313616>
- Jorgensen, I. et al., 2016. Pyroptosis triggers pore-induced intracellular traps ( PITs ) that capture bacteria and lead to their clearance by efferocytosis, 213(10), pp.2113–2128. Available at: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20151613>
- Jorgensen, I., Rayamajhi, M. & Miao, E.A., 2017. Programmed cell death as a defence against infection. *Nature Reviews Immunology*, 17(3), pp.151–164. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nri.2016.147>.
- Khan, I.U. et al., 2017. Co-delivery strategies to overcome multidrug resistance in ovarian cancer. *International Journal of Pharmaceutics*, 533(1), pp. 111-124. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517317309262>
- Kim, S. et al., 2017.  $\omega$ 3-polyunsaturated fatty acids induce cell death through apoptosis and autophagy in glioblastoma cells: In vitro and in vivo. *Oncology Reports*, (12), pp.239–246. Available at: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2017.6101>.

- Kolb, J.P. et al., 2017. Programmed Cell Death and Inflammation : Winter Is Coming. *Trends in Immunology*, 38(10), pp.705–718. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2017.06.009>.
- Kopeina, G.S., Senichkin, V. V. & Zhivotovsky, B., 2017. Caloric restriction - A promising anti-cancer approach: From molecular mechanisms to clinical trials. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1867(1), pp.29–41. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2016.11.002>.
- Kotas, M.E. & Medzhitov, R., 2015. Homeostasis, Inflammation, and Disease Susceptibility. *Cell*, 160(5), pp.816–827. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.010>.
- Kroemer, G. et al., 2009. Classification of Cell Death 2009. *Cell death and differentiation*, 16(1), pp.3–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2744427/>.
- Kuda, O., 2017. Bioactive metabolites of docosahexaenoic acid. *Biochimie*, 136, pp.12–20. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2017.01.002>.
- LaRock, C.N. & Cookson, B.T., 2013. Burning Down the House: Cellular Actions during Pyroptosis. *PLoS Pathogens*, 9(12), pp.1–3. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1003793>
- Lebeaupin, C. et al., 2015. ER stress induces NLRP3 inflammasome activation and hepatocyte death. *Cell Death and Disease*, 6(9), p.e1879. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/cddis.2015.248>.
- Leibovitch, M. & Topisirovic, I., 2018. Dysregulation of mRNA translation and energy metabolism in cancer. *Advances in Biological Regulation*, 67, pp.30–39. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbior.2017.11.001>.
- Li, J. et al., 2014. Distinct plasma lipids profiles of recurrent ovarian cancer by liquid chromatography-mass spectrometry. *Oncotarget*, 8(29), pp.46834–46845. Available at: <http://www.oncotarget.com/abstract/11603>.
- Lowry, K.P. & Lee, S.I., 2017. Imaging and Screening of Ovarian Cancer. *Radiologic Clinics of North America*, 55(6), pp.1251–1259. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0033838917301136>
- Macciò, A. & Madeddu, C., 2012. Inflammation and ovarian cancer. *Cytokine*, 58(2), pp.133–147. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043466612000300>
- Man, S.M., Karki, R. & Kanneganti, T.D., 2017. Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases. *Immunological Reviews*, 277(1), pp.61–75. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/imr.12534>
- Mansoori, B. et al., 2017. The different mechanisms of cancer drug resistance: A brief review. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 7(3), pp.339–348. Available at: <http://dx.doi.org/10.15171/apb.2017.041>.
- Mantovani, A. et al., 2008. Cancer-related inflammation. *Nature*, 454(7203), pp.436–444. Available at: <http://www.nature.com/articles/nature07205>
- Mashavave, G. et al., 2016. Dried blood spot omega-3 and omega-6 long chain polyunsaturated fatty acid levels in 7-9 year old Zimbabwean children: A cross sectional

- study. *BMC Clinical Pathology*, 16(1). Available at: <http://dx.doi.org/10.1186/s12907-016-0035-7>.
- Maskrey, B.H. et al., 2013. Emerging importance of omega-3 fatty acids in the innate immune response: Molecular mechanisms and lipidomic strategies for their analysis. *Molecular Nutrition and Food Research*, 57(8), pp.1390–1400. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/mnfr.201200723>
- Matulonis, U.A. et al., 2016. Ovarian cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 2, pp.1–22. Available at: <http://www.nature.com/articles/nrdp201661>
- Medzhitov, R., 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), pp.428–435. Available at: <http://www.nature.com/articles/nature07201>
- Merendino, N. et al., 2013. Dietary omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid DHA: A Potential Adjuvant in the Treatment of Cancer. *BioMed Research International*, 2013, pp.1–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3676987/pdf/BMRI2013-310186.pdf>.
- Merritt, M.A. et al., 2014. Dietary fat intake and risk of epithelial ovarian cancer by tumour histology. *British Journal of Cancer*, 2014, 110(5), pp.1392–1401. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2014.16>.
- Mills, E.L. & Neill, L.A.O., 2015. A brain in flame; do inflammasomes and pyroptosis influence stroke pathology?. *Brain Pathology*, 2017, 27(2), pp.1–28. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/bpa.12476>
- Molfino, A. et al., 2017. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Critical Illness: Anti-Inflammatory, Proresolving, or Both? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, pp.1–6. Available at: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2017/5987082/>
- Mori, T.A., 2017. Marine OMEGA-3 fatty acids in the prevention of cardiovascular disease. *Fitoterapia*, 123(September), pp.51–58. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2017.09.015>.
- Munn, L.L., 2017. Cancer and inflammation. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 9(2). Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/wsbm.1370>
- Oono, K. et al., 2017. Inhibition of PC3 human prostate cancer cell proliferation, invasion and migration by eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. *Molecular and clinical oncology*, 7(2), pp.217–220. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28781788> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5532687>.
- Opferman, J.T. & Kothari, A., 2017. Anti-apoptotic BCL-2 family members in development. *Cell Death and Differentiation*, pp.1–9. Available at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/cdd.2017.170>.
- Orzalli, M.H. & Kagan, J.C., 2017. Apoptosis and Necroptosis as Host Defense Strategies to Prevent Viral Infection. *Trends in Cell Biology*, 27(11), pp.800–809. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2017.05.007>.
- Padayachee, E.R. et al., 2017. Human Antibody Fusion Proteins/Antibody Drug Conjugates in Breast and Ovarian Cancer. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 44(5), pp.303–310. Available at: <https://www.karger.com/Article/FullText/479979>

- Patterson, E. et al., 2012. Health Implications of High Dietary Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2012(11), pp.1–16. Available at: <http://www.hindawi.com/journals/jnme/2012/539426/>.
- Pettersen, K. et al., 2016. DHA-induced stress response in human colon cancer cells - Focus on oxidative stress and autophagy. *Free Radical Biology and Medicine*, 90, pp.158–172. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.11.018>.
- Pietras, K. & Östman, A., 2010. Hallmarks of cancer: Interactions with the tumor stroma. *Experimental Cell Research*, 316(8), pp.1324–1331. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.02.045>.
- Pizato, N. et al., 2018. Omega-3 docosahexaenoic acid induces pyroptosis cell death in triple-negative breast cancer cells. *Scientific Reports*, 8(1), pp.1–12. Available at: <http://www.nature.com/articles/s41598-018-20422-0>
- Qiu, S., Liu, J. & Xing, F., 2017a. “Hints” in the killer protein gasdermin D: Unveiling the secrets of gasdermins driving cell death. *Cell Death and Differentiation*, 24(4), pp.588–596. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2017.24>.
- Qiu, S., Liu, J. & Xing, F., 2017b. “Hints” in the killer protein gasdermin D: Unveiling the secrets of gasdermins driving cell death. *Cell Death and Differentiation*, 24(4), pp.588–596. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2017.24>.
- Rafehi, H. et al., 2011. Clonogenic Assay: Adherent Cells. *Journal of Visualized Experiments*, (49), pp.15–17. Available at: <http://www.jove.com/index/Details.stp?ID=2573>.
- Ragusa, M. et al., 2017. Molecular Crosstalking among Noncoding RNAs: A New Network Layer of Genome Regulation in Cancer. *International Journal of Genomics*, pp. 1-17. Available at: <https://www.hindawi.com/journals/ijg/2017/4723193/>
- Ramón y Cajal, S. et al., 2017. Cancer as an ecomolecular disease and a neoplastic consortium. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1868(2), pp.484–499. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2017.09.004>.
- Rescigno, T., Capasso, A. & Tecce, M.F., 2016. Effect of Docosahexaenoic Acid on Cell Cycle Pathways in Breast Cell Lines With Different Transformation Degree. *Journal of Cellular Physiology*, 231(6), pp.1226–1236. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcp.25217>
- Rodríguez-Cruz, M. & Serna, D.S., 2017. Nutrigenomics of  $\omega$ -3 fatty acids: Regulators of the master transcription factors. *Nutrition*, 41, pp.90–96. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2017.04.012>.
- Sagulenko, V. et al., 2013. AIM2 and NLRP3 inflammasomes activate both apoptotic and pyroptotic death pathways via ASC. *Cell Death and Differentiation*, 20(9), pp.1149–1160. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2013.37>.
- Sangiuliano, B.A. et al., 2014. Cell Death-Associated Molecular-Pattern Molecules : Inflammatory Signaling and Control Cell Death-Associated Molecular-Pattern Molecules : Inflammatory Signaling and Control. *Mediators of Inflammation*, pp. 1-14 Available at: [www.hindawi.com/journals/mi/2014/821043/](http://www.hindawi.com/journals/mi/2014/821043/)
- Schunck, W.H. et al., 2018. Therapeutic potential of omega-3 fatty acid-derived epoxyeicosanoids in cardiovascular and inflammatory diseases. *Pharmacology and*

- Therapeutics*, 183(xxxx), pp.177–204. Available at:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.10.016>.
- Sharma, D. & Kanneganti, T.D., 2016. The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation. *Journal of Cell Biology*, 213(6), pp.617–629.
- Sharp, R.P., Gales, B.J. & Sirajuddin, R., 2018. Comparing the Impact of Prescription Omega-3 Fatty Acid Products on Low-Density Lipoprotein Cholesterol. *American Journal of Cardiovascular Drugs*, 18(2), pp.83–92.
- Shen, H. & Laird, P.W., 2013. Interplay between the cancer genome and epigenome. *Cell*, 153(1), pp.38–55. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.008>.
- Skender, B., Vaculova, A.H. & Hofmanova, J., 2012. Docosahexaenoic fatty acid (DHA) in the regulation of colon cell growth and cell death: A review. *Biomedical Papers*, 156(3), pp.186–199. Available at: <http://biomed.papers.upol.cz/doi/10.5507/bp.2012.093.html>
- Slagsvold, J.E. et al., 2010. DHA Alters Expression of Target Proteins of Cancer Therapy in Chemotherapy Resistant SW620 Colon Cancer Cells. *Nutrition and Cancer*, 62(5), pp.611–621. Available at:  
<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01635580903532366>.
- Sugimoto, M.A. et al., 2016. Resolution of inflammation: What controls its onset? *Frontiers in Immunology*, 7, Available at:  
<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fimmu.2016.00160/abstract>
- Sun, G.Y. et al., 2016. Docosahexaenoic acid (DHA): An essential nutrient and a nutraceutical for brain health and diseases. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plefa.2017.03.006>.
- Sundar, S., Neal, R.D. & Kehoe, S., 2015. Diagnosis of ovarian cancer. *BMJ*, 4443(September), pp.1–7. Available at: <http://dx.doi.org/doi:10.1136/bmj.h4443>.
- Takaoka, M. & Miki, Y., 2018. BRCA1 gene: function and deficiency. *International Journal of Clinical Oncology*, 23(1), pp.36–44. Available at:  
<http://link.springer.com/10.1007/s10147-017-1182-2>
- Taneja, A. & Singh, H., 2012. Challenges for the Delivery of Long-Chain n-3 Fatty Acids in Functional Foods. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3(1), pp.105–123. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-food-022811-101130>.
- Tirinato, L. et al., 2017. An Overview of Lipid Droplets in Cancer and Cancer Stem Cells. *Stem Cells International*, pp. 1-17 Available at:  
<https://www.hindawi.com/journals/sci/2017/1656053/>
- Tremblay, M.-E. et al., 2016. Remodeling of lipid bodies by docosahexaenoic acid in activated microglial cells. *Journal of Neuroinflammation*, 13(1), p.116. Available at:  
<http://jneuroinflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12974-016-0580-0>.
- Valastyan, S. & Weinberg, R.A., 2011. Tumor metastasis: Molecular insights and evolving paradigms. *Cell*, 147(2), pp.275–292. Available at:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.024>.
- de Vasconcelos, N.M., Van Opdenbosch, N. & Lamkanfi, M., 2016. Inflammasomes as polyvalent cell death platforms. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(11–12), pp.2335–2347. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-016-2204-3>

- Wan, 2010. The cell cycle effects of docosahexaenoic acid on human metastatic hepatocellular carcinoma proliferation. *International Journal of Oncology*, 36(4), pp.414–420. Available at: <http://www.spandidos-publications.com/ijo/36/4/991>.
- Wan, X.-H., Fu, X. & Ababaikeli, G., 2016. Docosahexaenoic Acid Induces Growth Suppression on Epithelial Ovarian Cancer Cells More Effectively than Eicosapentaenoic Acid. *Nutrition and Cancer*, 68(2), pp.320–327. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01635581.2016.1142581>.
- Wilson, N.S., Dixit, V. & Ashkenazi, A., 2009. Death receptor signal transducers: Nodes of coordination in immune signaling networks. *Nature Immunology*, 10(4), pp.348–355. Available at: <http://www.nature.com/articles/ni.1714>
- Yamagata, K., 2017. Docosahexaenoic acid regulates vascular endothelial cell function and prevents cardiovascular disease. *Lipids in Health and Disease*, 16(1), pp.1–13. Available at: <http://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12944-017-0514-6>
- YAO, Q.-H. et al., 2014.  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids inhibit the proliferation of the lung adenocarcinoma cell line A549 in vitro. *Molecular Medicine Reports*, 9(2), pp.401–406. Available at: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2013.1829>.
- Yassine, H.N. et al., 2017. Association of docosahexaenoic acid supplementation with Alzheimer disease stage in Apolipoprotein e  $\epsilon$ 4 carriers: A review. *JAMA Neurology*, 74(3), pp.339–347. Available at: <http://archneur.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jamaneurol.2016.4899>
- Yi, Y.S., 2017. Caspase-11 non-canonical inflammasome: a critical sensor of intracellular lipopolysaccharide in macrophage-mediated inflammatory responses. *Immunology*, 152(2), pp.207–217. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/imm.12787>
- Yin, Y. et al., 2017. The omega-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid inhibits proliferation and progression of non-small cell lung cancer cells through the reactive oxygen species-mediated inactivation of the PI3K /Akt pathway. *Lipids in Health and Disease*, 16(1), pp.1–9. Available at: <http://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12944-017-0474-x>
- Zárate, R. et al., 2017. Significance of long chain polyunsaturated fatty acids in human health. *Clinical and Translational Medicine*, 6(1), p.25. Available at: <http://clintransmed.springeropen.com/articles/10.1186/s40169-017-0153-6>.
- Zhang, B. et al., 2017. Revisiting ovarian cancer microenvironment: a friend or a foe? *Protein and Cell*, pp.1–19. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s13238-017-0466-7>
- Zhang, W. et al., 2007. Modulatory effects of EPA and DHA on proliferation and apoptosis of pancreatic cancer cells. *Journal of Huazhong University of Science and Technology - Medical Science*, 27(5), pp.547–550. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s11596-007-0518-y>
- Zhang, Y. et al., 2018. Plasma membrane changes during programmed cell deaths. *Cell Research*, 28(1), pp.9–21. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2017.133>.
- Zhu, X. et al., 2017. CAR-T cell therapy in ovarian cancer: from the bench to the bedside. *Oncotarget*, 8(38), pp.64607–64621. Available at:



<http://www.oncotarget.com/fulltext/19929>.