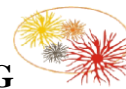




UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS -

FISIOLOGIA ANIMAL COMPARADA - PPGCF-FAC

**ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE EXTRATOS LIPÍDICOS
DE MICROALGAS MARINHAS EM CÉLULAS DE MELANOMA:
PARTICIPAÇÃO DO ÔMEGA-3 E/OU ÔMEGA-6?**

Renata Ottes Vasconcelos

Dissertação defendida no âmbito do Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Animal Comparada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE em Fisiologia Animal Comparada.

Orientadora: Dr.^a Gilma Santos Trindade

Co-orientadora: Dr.^a Ana Paula de Souza Votto

RIO GRANDE

2012

AGRADECIMENTOS

Agradeço do fundo do coração à minha família. Por estar sempre presente, mesmo distante. Mãe e Pai, muito obrigada pelo amor, pelo carinho, pela atenção, pela força em todos os momentos! À minha irmã querida, companheira de todas as horas, obrigada pelas conversas, pelos mates, pelo carinho! Aos meus maninhos gêmeos, por saberem entender a ausência da “Nana”. E a todos os outros integrantes, não menos importantes. Vocês são tudo para mim, amo muito vocês!!!

À minha turminha, ATBio 2009, Fabi, Gabi, Luara, Tamy, Pedro, Rêh, Cássia, Marcinha..., que estão sempre por perto, é muito bom poder contar com vocês, obrigada pela amizade, pelas risadas, pela força!!

Aos meus amigos da fisiologia, que não são poucos: Camila Wally, Camila Dalmolin, Rêh, Laís, Laura, Luís, Vinícius, Bia, Maiara, Cássia, Marcinha, Isabel, Graci, Daza, André, Dani, Márcio Oliveira, Michele, Karine, Nathália... Obrigada, de verdade, pela força, pela atenção, pelas conversas, pelos passeios, pela amizade, pelo companheirismo, pelos mates, pelas festas, vocês tornam meus dias mais alegres!! Adoro vocês!!

Aos meus amigos queridos: Aline, Tchana, Fran, Camila, Gagui, Luci, Julini, Raíssa, Michel, Gabriel... Obrigada pelo apoio, pelos conselhos sinceros! Especialmente, às minhas vizinhas queridas, Fran e Camila, gurias, eu não tenho palavras para descrever o quanto vocês são importantes para mim, obrigada por sempre me ouvirem, pelos conselhos sinceros, pelos mates, pelas festas, pelas risadas, pela amizade, pelo companheirismo, pela força!! Ao Gabriel, que mesmo conhecendo há

pouco tempo, é uma pessoa que me faz muito bem, obrigada pela força, pelos passeios, pelas conversas Ga!!

À minha Professora do Pilates, Cíntia Maass, por entender as minhas faltas e por me apoiar sempre.

Em especial também, ao meu querido médico espírita, Dr. Armando Hamud, que me curou das minhas fortes dores de cabeça, mas mais que isso, me transmitiu pensamentos e sentimentos bons todo o tempo. Agradeço pela preocupação comigo, pela atenção, pelo carinho, pela força!!

À minha orientadora querida, Gilma, te agradeço pela confiança em mim, por sempre me tranquilizar, pela tua preocupação, pela tua amizade, porque tu és uma pessoa muito iluminada, alegre, vibrante, que eu quero ter sempre por perto!! E uma profissional, que admiro muito, porque tu és realmente especial, pelo teu jeitinho de ser, tão carismática, dedicada assim! É muito bom poder trabalhar e conviver contigo!! Obrigada mesmo pela oportunidade!!

À minha doce co-orientadora, Ana, sem palavras para agradecer, por acreditar em mim, por me ouvir sempre, por estar sempre disposta a ajudar e com um jeitinho meigo que só tu tens, por me tranquilizar!! Também agradeço pela amizade, claro, pelos passeios divertidos, pelas conversas, pela tua preocupação comigo. Admiro-te muito, és uma profissional exemplar e uma pessoa muito querida, é muito bom poder compartilhar todos os momentos contigo, de verdade!!

Às minhas estagiárias e amigas, Ju e Milene, pela ajuda, pelo comprometimento, pela força, pela amizade!

Aos laboratórios que contribuíram para a realização deste trabalho, além do Laboratório de Cultura Celular, Laboratório de Fitoplâncton e Microorganismos

Marinhos, agradeço ao Professor Paulo Abreu e à Vanessa Oliveira Britto pela colaboração, e ao Laboratório de Micotoxinas, agradeço pela paciência e atenção da Professora Eliana Furlong, da Michele de Souza e da Jaqueline Buffon, que foram muito queridas comigo o tempo todo.

Aos membros da banca, Professores Danilo Giroldo, Marta Marques de Souza e Cristina Gevehr Fernandes, sinceramente, agradeço muito por terem aceito avaliar e contribuir para este trabalho. Porque eu fazia questão mesmo que cada um de vocês estivesse presente!

Ao professor Robert, que está sempre disposto a ajudar, que fez a revisão do inglês no nosso trabalho, muito obrigada!

A Deus, por me iluminar sempre e por possibilitar que pessoas tão especiais estejam no meu caminho!!

Lista de abreviaturas

AA - Ácido Araquidônico/Arachidonic Acid (Ômega-6)

ALA - Ácido α -linolênico/ α -linolenic Acid (Ômega-3)

CLA - Ácido Linoleico Conjugado/Conjugated Linoleic Acid (Ômega-6)

COX – Ciclooxygenase/Cicloxygenase

DHA - Ácido Docosahexaenóico/Docosahexaenoic Acid (Ômega-3)

EPA – Ácido Eicosapentaenóico/Eicosapentaenoic Acid (Ômega-3)

FAs – Fatty Acids

GLA – Ácido γ -linolênico/ γ -linolenic acid (Ômega-6)

ILE - Lipidic Extract of *Isochrysis galbana*

LA – Ácido Linoleico/Linoleic Acid (Ômega-6)

LOX – Lipooxygenase/Lipoxygenase

LT – Leucotrienos/Leukotrienes

MUFAs – Monounsaturated Fatty Acids

PG – Prostaglandinas/Prostaglandins

PLA₂ – Fosfolipase A₂

PUFAs – Ácidos Graxos Poliinsaturados/Polyunsaturated Fatty Acids

SFAs – Saturated Fatty Acids

TLE - Lipidic Extract of *Thalassiosira pseudonana*

TX - Tromboxanos

UFAs - Unsaturated Fatty Acids

ω -3 PUFAs - Ácidos Graxos Poliinsaturados Ômega-3/ Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids

ω -6 PUFAs - Ácidos Graxos Poliinsaturados Ômega-6/ Omega-6 Polyunsaturated Fatty
Acids

Índice

| | |
|--|-----------|
| Resumo Geral | 9 |
| 1. Introdução Geral | 10 |
| 1.1 Produtos naturais marinhos: Fonte de substâncias bioativas | 10 |
| 1.1.1 Microalgas | 11 |
| 1.2 PUFAs ω -3: Atividades biológicas..... | 14 |
| 1.2.1 PUFAs ω -3: Atividade antitumoral | 15 |
| 1.3 PUFAs ω -6: Atividades biológicas..... | 20 |
| 2. Objetivos..... | 23 |
| 2.1 Objetivo geral | 23 |
| 2.2 Objetivos Específicos | 23 |
| Antiproliferative activity of lipidic extracts of marine microalgae on a melanoma cell line: participation of ω-3 PUFA? | 25 |
| Abstract | 26 |
| Introduction | 27 |
| Materials and Methods | 29 |
| Microalgae and cultive conditions..... | 29 |
| Lipids extraction | 30 |
| Esterification method..... | 30 |
| Cell culture | 31 |
| Cells and treatments with total lipidic extract of the microalgae | 31 |
| Cells and treatments with α -linolenic and linoleic acids | 31 |
| Cellular viability | 32 |
| Statistical analysis | 32 |

| | |
|--|----|
| Results | 32 |
| Lipids total content and fatty acids profile of the microalgae | 32 |
| Table 1 | 34 |
| Table 2 | 35 |
| Effect of lipidic extracts of the microalgae on melanoma cell line | 35 |
| Figure 1 | 36 |
| Figure 2 | 37 |
| Effect of α -linolenic and linoleic acids on B16F10 and Melan-A cells | 37 |
| Figure 3 | 38 |
| Figure 4 | 38 |
| Figure 5 | 39 |
| Figure 6 | 39 |
| Discussion | 40 |
| Conclusions | 42 |
| References | 43 |
| Conclusões Gerais | 49 |
| Perspectivas | 50 |
| Referências Bibliográficas..... | 51 |

Resumo Geral

Nas últimas décadas, muito interesse tem sido focado no potencial biotecnológico das microalgas, principalmente devido à identificação de diversas substâncias bioativas sintetizadas por estas, especialmente ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs). PUFAs ômega-3 (PUFAs ω -3) têm sido estudados pela promoção de efeitos benéficos em muitas doenças crônicas, incluindo o câncer, ao contrário de PUFAs ômega-6 (PUFAs ω -6) que, de forma geral, são conhecidos por agravar o desenvolvimento destes quadros. Este estudo objetivou testar a atividade antiproliferativa de extratos lipídicos de duas microalgas marinhas, *Isochrysis galbana* e *Thalassiosira pseudonana*, ricas principalmente em PUFAs ω -3, em uma linhagem celular de melanoma, B16F10. Adicionalmente, o efeito dos precursores dos PUFAs ω -3, α -linolênico (ALA), e dos PUFAs ω -6, linoleico (LA) na proliferação celular, foi avaliado nesta linhagem e em uma linhagem melanocítica normal, Melan-A, pelo método MTT. Foi demonstrado que os extratos lipídicos estudados são capazes de induzir inibição de proliferação tempo e concentração dependente na linhagem B16F10 e esta atividade foi também exercida pelo ALA de forma independente das concentrações testadas. Além disso, o extrato lipídico da microalga *Thalassiosira pseudonana* também induziu citotoxicidade na linhagem B16F10. Desse modo, é possível sugerir que o efeito antiproliferativo dos extratos possa estar relacionado com a alta concentração de ω -3 PUFAs em relação a ω -6 PUFAs, especialmente para a *Thalassiosira pseudonana*. Adicionalmente, a linhagem Melan-A não foi sensível ao tratamento com o ALA, sugerindo, dessa forma, um efeito antitumoral para este composto. Este estudo ainda indica a possibilidade do uso de microalgas como fontes promissoras de substâncias antitumorais.

1. Introdução Geral

1.1 Produtos naturais marinhos: Fonte de substâncias bioativas

Mesmo com o desenvolvimento de processos sintéticos para a obtenção de novas moléculas a partir do final do século XIX, os produtos naturais sempre tiveram papel importante na pesquisa de novos compostos farmacologicamente ativos. Este fato se deve à complexidade estrutural de alguns de seus princípios ativos. Grande parte dos fármacos clinicamente viáveis e comercialmente disponíveis com ação antitumoral, por exemplo, têm sua origem em produtos naturais (Shu, 1998). Estudos com produtos naturais marinhos tornaram-se atrativos devido à presença de metabólitos secundários estruturalmente muito diferentes dos encontrados em plantas terrestres, com novos esqueletos carbônicos e com combinações de grupos funcionais pouco comuns (Jha & Zi-rong, 2004).

As algas ocupam uma imensa variedade de nichos ecológicos, e devido às mais diversas condições ambientais, a biossíntese de metabólitos secundários tornou-se uma estratégia de sobrevivência (Cardozo *et al.*, 2007). Estes organismos são principalmente encontrados no meio marinho, mas também em água doce e no solo, sendo considerados responsáveis por pelo menos 60% da produção primária da Terra (Chisti, 2004). Inúmeras atividades biológicas de algas foram relatadas, incluindo atividades antioxidantes, antiinflamatórias, imunomodulatórias, antivirais, antimicrobianas e anticarcinogênicas, demonstrando o potencial destes organismos (Smit, 2004; Plaza *et al.*, 2008).

1.1.1 Microalgas

É estimado que existam 200.000 espécies de microalgas (Derner *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2008), contudo, apenas um número limitado tem sido estudado e analisado. O termo microalgas não tem valor taxonômico, engloba microorganismos algais com clorofila a e outros pigmentos fotossintéticos, os quais são capazes de realizar a fotossíntese oxigênica, e sua caracterização (sistemática) implica na consideração de uma série de critérios (Hoek *et al.*, 1995; Raven *et al.*, 2001). Estes microrganismos têm sido tradicionalmente classificados quanto aos tipos de pigmentos, a natureza química dos produtos de reserva e pelos constituintes da parede celular. Também têm sido considerados aspectos citológicos e morfológicos, além de técnicas de biologia molecular (Derner *et al.*, 2006).

Sob a denominação microalgas, estão incluídos organismos com dois tipos de estrutura celular: estrutura procariótica, com representantes nas Divisões Cyanophyta (cianobactérias) e Prochlorophyta; e estrutura celular eucariótica, com representantes nas Divisões Chlorophyta, Euglenophyta, Rhodophyta, Haptophyta (Prymnesiophyta), Heterokontophyta (Bacillariophyceae, Chrysophyceae, Xantophyceae, entre outras), Cryptophyta e Dinophyta, segundo Hoek *et al.* (1995).

Alguns pesquisadores têm explorado a promissora possibilidade destes organismos como fonte potencial de compostos biologicamente ativos, incluindo carotenóides, polifenóis e outros pigmentos antioxidantes, além de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) (Plaza *et al.*, 2010). Os PUFAs predominantemente encontrados na natureza pertencem às classes ômega-3 (ω -3) e ômega-6 (ω -6) (fig. 1). PUFAs ω -3 incluem o ácido α -linolênico (ALA; 18:3n-3), precursor dos ácidos eicosapentaenóico (EPA; 20:5n-3) e docosahexaenóico (DHA; 22:6n-3), enquanto o

que são facilmente cultiváveis. Diferentemente de peixes marinhos, também considerados atualmente como uma boa fonte de PUFA ω -3, estes microorganismos não têm apresentado contaminação por compostos carcinogênicos, como pesticidas, o que reforça ainda mais a sua utilização como uma fonte alternativa segura (Calviello & Serini, 2010). Além disso, é importante também considerar que os ácidos graxos EPA e DHA não são produzidos pelo pescado, mas sim pelas microalgas marinhas e acumulados ao longo da cadeia trófica (Cardozo *et al.*, 2007).

O conteúdo de lipídios da biomassa das microalgas pode variar entre 1 a 40% do peso seco e, em certas condições de cultivo, pode alcançar até 85% (Becker, 1994; Becker, 2004). Os ácidos graxos correspondem à maior fração dos lipídios e, em algumas espécies, os PUFA representam entre 25 e 60% dos lipídios totais (Becker, 2004). Os lipídios de algumas espécies (quase sempre marinhas) contêm quantidades relativamente altas de PUFA de cadeia longa, notadamente de EPA e DHA (Volkman *et al.*, 1989; Zhukova & Aizdaicher, 1995).

Entre inúmeras espécies, *Isochrysis galbana* (fig. 2) é de particular interesse, graças à sua favorável composição lipídica, rica em PUFA ω -3 (Saoudi-Helis *et al.*, 1994; Sánchez *et al.*, 2000). Sua composição química é também conhecida por variar durante a sua fase de crescimento, particularmente com respeito a seus componentes lipídicos (Lin *et al.*, 2007). Liu & Lin (2001) observaram formação e acumulação de corpos lipídicos nesta microalga, propriamente quando as células entraram na fase estacionária. Adicionalmente, na espécie *Thalassiosira pseudonana* (fig. 3) também foi demonstrada a capacidade de síntese de PUFA com quantidades variáveis, não apenas quando comparada a outras espécies, mas também durante as suas várias fases de

crescimento. Esta microalga ainda converte os ácidos graxos EPA e DHA, a triacilgliceróis (TAGs) durante a fase estacionária (Mata *et al.*, 2010).



Fig. 2: Microalga *Isochrysis galbana*

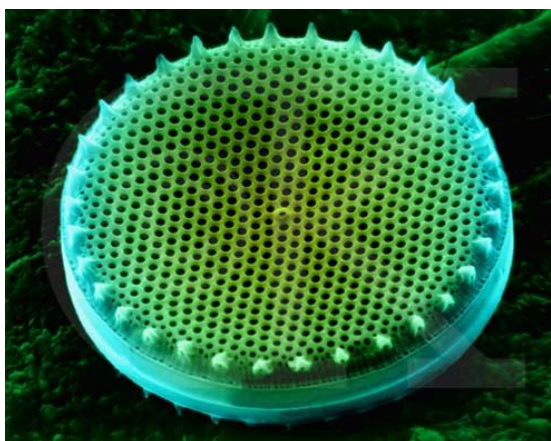


Fig. 3: Microalga *Thalassiosira pseudonana*

1.2 PUFAs ω -3: Atividades biológicas

Recentemente, é bem estabelecido que os ácidos graxos EPA e DHA possam exercer atividades benéficas por inibir a incidência e desenvolvimento de uma série de doenças crônicas, incluindo desordens cardiovasculares, neurodegenerativas, imunes e

inflamatórias, bem como câncer (Calviello *et al.*, 2005; Calder, 2006; Sijben & Calder, 2007). Atualmente, existem poucos componentes da dieta que sejam tão amplamente reconhecidos como capazes de influenciar de forma benéfica em processos celulares desregulados como PUFAs ω -3. Entretanto, apesar da sua extrema popularidade e fácil disponibilidade comercial, muitas questões sobre as atividades biológicas destes compostos ainda permanecem não respondidas. Em particular, há uma necessidade urgente de um melhor entendimento do seu possível papel como agente antineoplásico (Calviello & Serini, 2010).

1.2.1 PUFAs ω -3: Atividade antitumoral

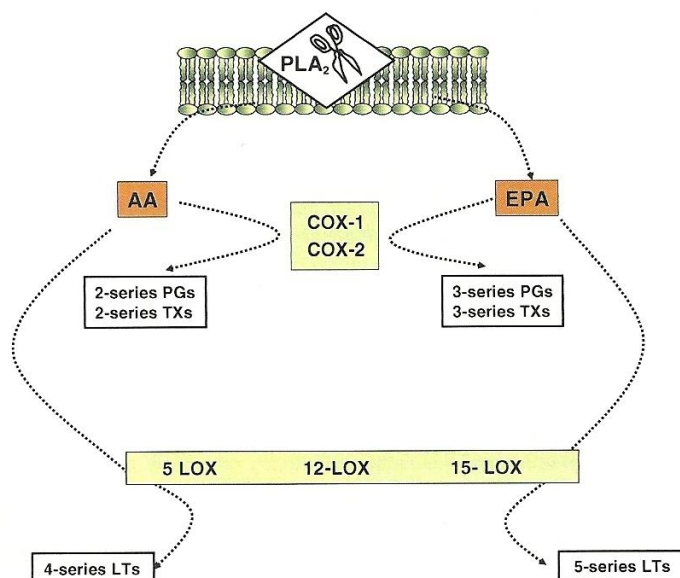
Esta família de ácidos graxos tem sido estudada por promover imunidade antitumoral e inibir a iniciação do câncer, angiogênese tumoral e metástase (Larsson *et al.*, 2004; Calviello *et al.*, 2007; Berquin *et al.*, 2008; Chapkin *et al.*, 2008, Spencer *et al.*, 2009). Os possíveis mecanismos pelos quais PUFAs ω -3 impedem o crescimento de células tumorais podem envolver uma diminuição na proliferação celular, indução de morte celular, ou uma combinação de ambos (Calviello & Serini, 2010). Estudos conduzidos em cultura de células têm claramente demonstrado que DHA e EPA podem induzir a apoptose em diferentes linhagens celulares tumorais, incluindo mamária (Hawkins *et al.*, 1999; Yamamoto *et al.*, 1999; Schley *et al.*, 2005), de cólon (Chen & Istfan, 2000; Narayanan *et al.*, 2001; Latham *et al.*, 2001), de pulmão (Mannini *et al.*, 2009), de próstata (Narayanan *et al.*, 2005), de linfoma (Heimli *et al.*, 2001), leucêmica (Chiu & Wan, 1999; Chiu *et al.*, 2000), hepática (Calviello *et al.*, 1998), pancreática (Lai *et al.*, 1996; Hawkins *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2007), de laringe (Colquhoun, 1998), de neuroblastoma e de melanoma (Calviello & Serini, 2010). Além disso, os

efeitos pró-apoptóticos de PUFAs ω -3 da dieta também têm sido confirmados em uma variedade de modelos de câncer animal. Interessantemente, a maioria dos trabalhos tem revelado que PUFAs ω -3 são pró-apoptóticos em concentrações de 50-250 μ M, as quais poderiam ser encontradas *in vivo* no plasma através da suplementação. Contudo, apesar da crescente evidência de que PUFAs ω -3 modulam crescimento e morte celular em linhagens tumorais humanas e em modelos de câncer animal, até o momento, os mecanismos moleculares e celulares não estão completamente entendidos (Calviello & Serini, 2010).

Muitos mecanismos de ação de PUFAs ω -3 na prevenção e tratamento do câncer têm sido propostos por estudos *in vitro* e *in vivo*. PUFAs ω -3 podem mediar os efeitos benéficos referidos anteriormente por afetar a expressão e/ou função de lipídios, proteínas e genes que regulam processos de proliferação e morte celular. PUFAs ω -3 afetam muitas vias potenciais que podem promover apoptose/morte celular. Este fato pode ser explicado pelas alterações na composição lipídica das membranas e a função que ocorre quando estes compostos são incorporados nos tumores e em diversos modelos celulares utilizados (Calviello & Serini, 2010), já que a presença destes PUFAs na membrana plasmática resulta em propriedades físico-químicas únicas que afetam numerosas características de membrana. Dentre estas características, podemos incluir permeabilidade, deformabilidade (Stillwell *et al.*, 1997), fluidez (Ehringer *et al.*, 1990), e mais recentemente, sabe-se também que influenciam na formação de microdomínios lipídicos (Shaikh *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2004; Schley *et al.*, 2007). Estas mudanças induzidas por PUFAs ω -3 na função da membrana, logicamente, podem alterar de forma significativa sinais e processos de morte celular, por exemplo, levando a uma diminuição na expressão/atividade do fator de transcrição NF-kappaB em muitas células

tumorais, permitindo, assim, a indução da apoptose. PUFAs ω -3 também podem inibir o crescimento de linhagens tumorais através da alteração no nível de ciclinas, quinases dependentes de ciclinas, proteína retinoblastoma (pRB) e da modulação de sinais derivados de lipídios (Calviello & Serini, 2010). Além disso, PUFAs ω -3 são altamente suscetíveis à peroxidação e é sugerido que a sua incorporação em fosfolipídios de membrana plasmática e mitocondrial possa sensibilizar as células tumorais ao ataque de espécies reativas de oxigênio (ERO), induzindo, dessa forma, um estresse oxidativo (Maziere *et al.*, 1999; Chapkin *et al.*, 2002). Assim, os produtos de peroxidação gerados de PUFAs ω -3 são considerados cruciais para explicar o efeito destes lipídios na morte de células tumorais em muitos modelos de câncer (Dommels *et al.*, 2003; Dupertuis *et al.*, 2007). PUFAs ω -3 também são conhecidos por seus efeitos antiinflamatórios que são, em parte, relacionados à sua competição com PUFAs ω -6 como substratos para as enzimas ciclooxigenase (COX) e lipooxigenase (LOX), resultando na formação de prostaglandinas e leucotrienos menos ativos. Neste ponto, a descrição do metabolismo oxidativo do AA e EPA, e, em particular, da influência de PUFAs ω -3 no metabolismo oxidativo do AA, parece interessante para entender os possíveis benefícios derivados da substituição do AA por estes ácidos graxos nas membranas. Seguindo uma série de estimulações celulares, o AA é liberado das membranas pela ação da fosfolipase A₂ (PLA₂) e metabolizado pelas enzimas COX e LOX a metabólitos oxigenados, prostaglandinas (PG), tromboxanos (TX) e leucotrienos (LT), coletivamente conhecidos como eicosanóides (fig. 4). Os eicosanóides derivados do AA são altamente bioativos, agindo em baixas concentrações. Eles têm o potencial de influenciar em eventos-chave de processos fisiológicos e patológicos, incluindo proliferação, sobrevivência e inflamação. A formação de produtos derivados do AA é normalmente controlada, mas

em algumas condições patológicas, como o câncer, quantidades excessivas são produzidas. Os ácidos EPA e DHA são capazes de induzir uma diminuição na produção de eicosanóides originados do AA e, dessa forma, reduzir todas as respostas moleculares relacionadas ao metabolismo oxidativo do AA de diferentes maneiras, incluindo: a substituição parcial do AA nas membranas celulares, já que eles competem por acilação na posição Sn-2 dos fosfolipídios de membrana; a competição direta de EPA e AA para COX e 5-LOX, e produção de eicosanóides derivados do EPA, os quais mostram uma menor atividade biológica que eicosanóides derivados do AA (fig. 4); a redução da COX-2, a qual é expressa principalmente durante a inflamação e crescimento do tumor, induzida por EPA e DHA. É provável que uma combinação destes efeitos seja responsável pelos efeitos antitumorais promovidos pelos PUFAs ω -3 (Calviello & Serini, 2010).



Calviello & Serini, 2010

Fig. 4: Competição entre AA e EPA por COX e LOX.

O câncer é uma doença caracterizada por uma desregulação entre proporção de divisão e morte celular (Hanahan & Weinberg, 2000). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que, no ano de 2030, são esperados 27 milhões de casos incidentes de câncer, com mortalidade de 17 milhões e morbidade anual de 75 milhões. Somente no Brasil, as estimativas para o ano de 2012, válidas também para o ano de 2013, apontam a ocorrência de aproximadamente 520 mil novos casos de câncer (INCA, 2012). Neste sentido, a prevenção e o controle da progressão de neoplasias estão entre os mais importantes desafios científicos e de saúde pública da nossa época.

O câncer da pele é o mais frequente no Brasil, correspondendo a 25% de todos os tumores malignos registrados no país. Dentre eles, o melanoma representa 4% das neoplasias malignas cutâneas (INCA, 2012). Embora o estágio inicial de desenvolvimento deste câncer da pele, ou seja, quando é restrito à epiderme ou derme superficial, seja curável, o prognóstico para indivíduos com invasão da derme é preocupante, apresentando uma taxa de sobrevivência de cinco anos em apenas 10% dos pacientes (Calviello & Serini, 2010). Cabe ainda salientar que as maiores taxas de frequência estimadas para este tipo de câncer da pele encontram-se na região sul (INCA, 2012).

Muitos estudos demonstraram que agentes quimioterápicos ou combinação de terapias têm muitos efeitos colaterais e uma resposta não satisfatória no tratamento do melanoma. Compostos naturais podem ser considerados uma forma alternativa para prevenção do melanoma devido à baixa toxicidade relacionada à sua história como importantes medicamentos fitoterápicos. Muitos estudos recentes analisaram o uso de compostos naturais para o tratamento do melanoma, como por exemplo, PUFA ω -3 (Hsan *et al.*, 2010).

1.3 PUFAs ω -6: Atividades biológicas

Ao contrário de PUFAs ω -3, PUFAs ω -6, de forma geral, têm sido amplamente reconhecidos como fatores que agravam o desenvolvimento de doenças inflamatórias, neurodegenerativas e neoplásicas. Visto que PUFAs são considerados substratos para a síntese de eicosanóides, os PUFAs ω -6 são convertidos em eicosanóides pró-inflamatórios, ao contrário de PUFAs ω -3, os quais são transformados em eicosanóides antiinflamatórios (Williams *et al.* 2011). Neste sentido, alguns estudos mostram evidências de que a dieta pode influenciar o risco de desenvolver o melanoma. Sabe-se que o alto consumo de PUFAs ω -6 estimula o crescimento deste câncer da pele, ao contrário dos PUFAs ω -3, que podem inibir o seu desenvolvimento (Albino *et al.*, 2000). Por exemplo, quando a dieta ocidental é adotada, na qual PUFAs ω -6 estão presentes em maiores concentrações que PUFAs ω -3, o LA se torna preferencialmente dessaturado para formação do AA. Como resultado, a produção endógena de EPA e DHA pelo ALA diminui, o que leva a uma produção excessiva de eicosanóides derivados do AA, estimulando, assim, o desenvolvimento do câncer (fig. 5) (Schumacher *et al.*, 2011).

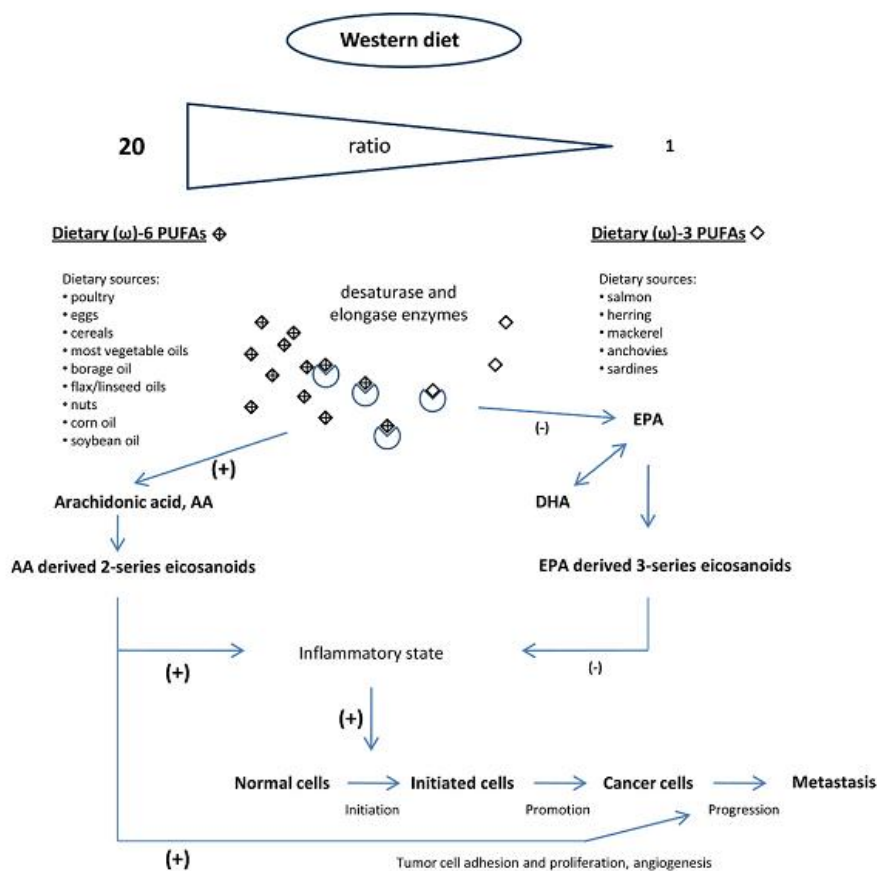
Schumacher *et al.*, 2011

Fig. 5: Influência de PUFAs no desenvolvimento do câncer.

Contudo, para alguns PUFAs ω -6 como o ácido γ -linolênico (GLA), e ácido linoleico conjugado (CLA), uma ação benéfica potencial na saúde tem sido relatada. Sendo que a atividade do GLA é considerada, por muitos autores, altamente seletiva para células tumorais, e é decorrente da habilidade deste ácido graxo ou de seus derivados peroxidados se ligarem ao DNA, resultando na supressão do oncogene anti-apoptótico ErB-2 e no seu efeito pró-apoptótico em muitas linhagens celulares de câncer. Já o CLA tem sido demonstrado por ativar principalmente uma via intrínseca da apoptose em uma variedade de células tumorais. Também o AA, apesar de ser

facilmente metabolizado a séries de eicosanóides pró-inflamatórios e pró-neoplásicos, pode exercer ação pró-apoptótica e antineoplásica quando seu metabolismo oxidativo é inibido e este é acumulado intracelularmente em uma forma não-esterificada (Serini *et al.*, 2009).

Assim, considerando a importância e a controvérsia de algumas atividades biológicas destes PUFAs em determinadas células malignas, estudamos os efeitos de diferentes concentrações de extrato lipídico total das microalgas *Isochrysis galbana* e *Thalassiosira pseudonana* na proliferação da linhagem de melanoma de camundongo B16F10. Também avaliamos o efeito de precursores dos PUFAs ω -3 (ALA) e dos PUFAs ω -6 (LA) no crescimento desta mesma linhagem celular. Nesta última análise, os resultados foram comparados com aqueles obtidos por uma linhagem celular melanocítica não tumoral da mesma espécie, Melan-A.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Estudar a atividade antiproliferativa de extratos lipídicos totais das microalgas marinhas *Isochrysis galbana* e *Thalassiosira pseudonana* em uma linhagem celular de melanoma, bem como investigar a relação deste possível efeito com os precursores dos PUFAs ω -3, ácido α -linolênico (ALA), e ω -6, ácido linoleico (LA) nesta mesma linhagem e em uma linhagem celular melanocítica não-tumoral.

2.2 Objetivos Específicos

- Extrair o conteúdo lipídico total das microalgas *Isochrysis galbana* e *Thalassiosira pseudonana* na fase estacionária de crescimento;
- Identificar o perfil de ácidos graxos destas espécies por cromatografia gasosa;
- Avaliar o efeito de diferentes concentrações do extrato lipídico total de cada microalga na linhagem celular B16F10 a fim de construir uma curva dose-resposta;
- Avaliar o efeito de diferentes concentrações dos precursores dos PUFAs ω -3 (ALA) e ω -6 (LA) na linhagem celular B16F10.
- Avaliar o efeito de diferentes concentrações dos precursores dos PUFAs ω -3 (ALA) e ω -6 (LA) na linhagem celular melanocítica não-tumoral, Melan-A.

Artigo a ser submetido à revista “Melanoma Research”

**Antiproliferative activity of lipidic extracts of marine microalgae on a melanoma
cell line: participation of ω -3 PUFA?**

Renata Ottes Vasconcelos^b, Michele Moraes de Souza^c, Jaqueline Garda Buffon^c,
Eliana Badiale Furlong^c, Paulo César Oliveira Vergne de Abreu^d, Milene Medeiros de
Moraes^a, Ana Paula de Souza Votto^{ab}, Gilma Santos Trindade^{ab*}

^a Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, (96203-900), Brazil.

^b Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Fisiologia Animal Comparada, FURG, Rio Grande, (96203-900), Brazil.

^c Escola de Química e Alimentos, FURG, Rio Grande, (96203-900), Brazil.

^d Instituto de Oceanografia, FURG, Rio Grande, (96203-900), Brazil.

* Corresponding author: Phone/Fax: (+55 53) 32935195/ (+55 53) 32336850

E-mail address: gilma.trindade@gmail.com

Abstract

The present investigation deals with the fatty acid composition of total lipids of *Isochrysis galbana* (ILE) and *Thalassiosira pseudonana* (TLE) marine microalgae, since both are rich mainly in omega-3 polyunsaturated fatty acids (ω -3 PUFAs). An effort was made to show the growth inhibitory activity of these lipidic extracts on the murine melanoma cell line, B16F10. Additionally, we also investigated the effects of α -linolenic (ALA) ω -3 and linoleic (LA) ω -6 PUFAs precursors, in this cell line, derived from a normal melanocyte cell line, Melan-A by MTT assay. We demonstrated that lipidic extracts of microalgae are able to induce a concentration and time dependent inhibition of proliferation on the B16F10 cell line, especially the TLE, which also showed a cytotoxic effect. The antiproliferative activity was also exhibited by ALA in a concentration independent, but time dependent manner. So these results could be related to high ω -3 PUFAs concentrations compared to ω -6 PUFAs in TLE. Whereas, for LA, we did not observe any effect in any cell lines. Also, normal melanocyte cells were not sensible to tested ALA concentrations, suggesting an antitumoral effect for this compound. So, this study also indicates the possibility of the use of microalgae as potential sources of antitumoral substances.

Keywords: Antiproliferative activity; Lipidic extracts of marine microalgae; Melanoma; ω -3 PUFAs; ω -6 PUFAs.

Introduction

Marine organisms are potentially prolific sources of highly bioactive secondary metabolites that might represent useful leads in the development of new pharmaceutical agents. During the last four decades, numerous novel compounds have been isolated from marine organisms and many of these substances have been demonstrated to possess interesting biological activities [1]. More recently, some researchers have envisioned the enormous possibilities of algae and microalgae as potential source of bioactive compounds. Particularly, some microalgae have been studied as a potential natural source of different functional compounds, including carotenoids, polyphenols and other antioxidant pigments, polyunsaturated fatty acids (PUFAs) among others [2].

The prevalent PUFAs found in nature belong to the ω -3 and ω -6 classes. The three main dietary ω -3 PUFAs are α -linolenic (ALA; C18:3n-3), which is precursor of eicosapentaenoic (EPA; C20:5n-3) and docosahexaenoic (DHA; C22:6n-3) acids, whereas linoleic (LA; 18:2n-6), that is precursor of arachidonic (AA; 20:4n-6) acid, are representative of the ω -6 series [3].

It is largely known that the incidence and progression of several chronic diseases, including inflammatory, neurodegenerative and neoplastic disorders, may be strongly influenced by some PUFAs [4, 5]. As a whole, ω -6 PUFAs have been widely recognized as factors worsening the development of these diseases [6]. However, a potential beneficial action on health has been reported for some of them (γ -linolenic (GLA) and conjugated linoleic acid (CLA)). Also the ω -6 PUFA AA, even though easily metabolized to a series of pro-inflammatory and pro-neoplastic eicosanoids, may exert pro-apoptotic and anti-neoplastic action when its oxidative metabolism is inhibited

and it accumulates intracellularly in an unesterified form. In relation to the major ω -3 PUFAs, EPA and DHA, several studies are available on the health benefits [7].

In spite of the fact that few dietary components are so widely recognized as able to improve human health such as ω -3 PUFAs, so that their sector in the nutritional market has been increasingly growing worldwide, many unresolved questions still remain about them. In particular, there is urgent need for better understanding their possible role as anti-neoplastic agents [3].

In fact, there is a growing body of data indicating that dietary fat influences the development and progression of many cancers [8-10], including malignant melanoma [3, 11-14]. Malignant melanoma is the most aggressive form of skin cancer, showing high tendency to metastasize. According to recent statistics, during the past few decades there has been a considerable increase in its incidence worldwide [15]. Several risk factors have been identified, including exposure to sunlight, naevus count, phototype, family history of melanoma, and, hypothetically, exposure to artificial light [16]. Several studies demonstrated that chemotherapeutic agents or combination therapies had many side effects and low response rate in the treatment of melanoma. Natural compounds may be considered alternative means for melanoma prevention because of low or little toxicity due to their dietary properties or their long history as herbal medicines. Several recent studies examined the use of natural compounds for treating melanoma as targeted treatment or their efficacy in combination with clinical chemotherapeutic drugs for cutaneous melanoma, such as ω -3 PUFAs [17]. To this aim, alternative and safe, and still natural, ω -3 PUFA sources, such as cultured microalgae have been proposed [18, 19]. Among these microorganisms, *Isochrysis galbana* and

Thalassiosira pseudonana have a favorable lipid composition since both are rich in ω -3 PUFAs, such as EPA and DHA, particularly in the stationary phase of growth [20-24].

Thus, in this study we investigated whether marine microalgae extract above mentioned could exert an anti-proliferative activity on a cell line of melanoma, B16F10, and furthermore we also explored whether a relationship could exist with the effect of ω -3 and ω -6 PUFAs precursors, ALA and LA, respectively, in this cell line, relating to a melanocytic normal cell line, Melan-A.

Materials and Methods

Microalgae and cultive conditions

Isochrysis galbana and *Thalassiosira pseudonana* microalgae were obtained from Phytoplankton and Marine Microorganisms Laboratory of Universidade Federal do Rio Grande - FURG. These microalgae were grown in Guillard's F/2 medium [25], widely used in experiments with microalgae. The cultures were maintained in Erlenmeyer flasks, under constant aeration, at 20°C with 12 hour light/darkness photoperiod and in 28‰ salinity [26]. *Isochrysis galbana* and *Thalassiosira pseudonana* microalgae were kept growing until stationary phase of growth. The cultures of microalgae (7500 mL) were centrifuged at 2500 rpm for 15 min. So, the biomass of the microalgae was incubated at 60°C for 48h and it was stored at -20°C until the extraction of lipids to be realized.

Lipids extraction

The lipids total content of the microalgae was extracted in chloroform and methanol (2:1) [27], in separatory funnel. After phase separation and solvent evaporation, the lipids were quantified gravimetrically.

Esterification method

An esterification method [28] was performed with boron trifluoride (BF_3) reagent to establish the profiles of fatty acids. A derivatization of the fatty acids was realized to obtain methyl esters by adding 5 mL of methanolic solution of KOH 0.5 M, heating for 15 min, addition of 7.5 mL of BF_3 , reflux for 15 min and extracted with petroleum ether. The fatty acids were analyzed by gas chromatography, using a Varian Star chromatography 3400CX Chromatograph, equipped with a capillary column of polyethylene glycol (DB-WAX 30 x 0.32 mm, film thickness 0.25 mm). Programmed temperature to the column to vary between 100 and 250°C to 8°C/min, final temperature being maintained for 20 min. The temperatures of the injector and detector were 250°C and 280°C, respectively, using nitrogen as carrier gas flow of 1.0 mL/min. The identification of the chromatographic peaks occurred by comparing the retention times of each fatty acid sample with standards of the mixture, and the measurement carried out by normalizing the peak areas. The results were presented as percentage of each fatty acid identified in the lipid fraction.

Cell culture

The murine melanoma cell line, B16F10, and the murine melanocytic cell line, Melan-A, were obtained from the Haemostasis and Poisons Laboratory of Medic Biochemistry of Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). B16F10 and Melan-A cell lines were maintained in DMEM medium, supplemented with sodium bicarbonate (0.2 g/L), L-glutamine (0.3 g/L), Hepes (3 g/L), 10% fetal bovine serum, 1% antibiotic and antimycotic, in cell culture flasks at 37°C.

Cells and treatments with total lipidic extract of the microalgae

B16F10 cell line was maintained in log phase by seeding twice a week and the experiments were performed 1 day after trypsinization. The cells were centrifuged, suspense in DMEM medium (5×10^5 cells/mL) and incubated with 1, 10 and 100 µg/mL of the lipidic extract of each microalga until 72 h. The control cells received only the absolute ethanol vehicle to achieve the maximum concentration of ethanol of the treated cells (0.25% - Lipidic extract of *Isochrysis galbana*; 1.47% - Lipidic extract of *Thalassiosira pseudonana*).

Cells and treatments with α -linolenic and linoleic acids

B16F10 and Melan-A cells (5×10^5 cells/mL) were incubated for 24 h to adhere in cell culture plates with DMEM medium at 37°C. α -linolenic and linoleic acids (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) were added at the start of the experiments from an ethanol stock solution and control cells were treated with the same amount of absolute ethanol vehicle to achieve the maximum concentration of ethanol of the treated cells (0.05%).

Cell lines were incubated in DMEM medium with 7.5, 15, 30 and 60 μM [7] of each acid until 72 h.

Cellular viability

The viability of B16F10 cells exposed to lipidic extract, as well, the viability of this cell line and Melan-A cells exposed to α -linolenic and linoleic acids, was measured by method of MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium) 0 h, 24 h, 48 h and 72 h after incubation at 37°C, according to [29].

Statistical analysis

Each experiment was repeated three independent times with triplicate samples. The results were expressed as the means \pm SEs. One-way analysis of variance (ANOVA) was used to determine significant differences among groups. Tukey's significant difference post hoc test was used for pairwise comparisons after analysis of variance. Statistical significance was accepted at $p < 0.05$.

Results

Lipids total content and fatty acids profile of the microalgae

The lipids total content of *Isochrysis galbana* microalga was 61%, resulting in an extract concentration of 350000 $\mu\text{g/mL}$. Whereas *Thalassiosira pseudonana* microalga exhibited 2.35% of total lipids, resulting in an extract concentration of 67700 $\mu\text{g/mL}$. The fatty acid composition of the total lipids for *Isochrysis galbana* and *Thalassiosira*

pseudonana microalgae is presented in table 1 and 2, respectively. For *Isochrysis galbana*, altogether 22 different fatty acids (FAs) have been detected, including 7 saturated (SFAs) and 15 unsaturated fatty acids (UFAs). The UFAs comprised of 8 monounsaturated (MUFAs), 1 diunsaturated and 6 PUFAs. Accordance to this result, it is possible to affirm that approximately 25.8% of these fatty acids represent ω -3 PUFAs whereas 19.5% belong to ω -6 PUFAs series. ALA was the dominant PUFA. For *Thalassiosira pseudonana*, 29 different fatty acids have been identified, including 12 SFAs and 17 UFAs. The UFAs comprised of 8 MUFAs, 1 diunsaturated and 8 PUFAs. Among the UFAs, PUFAs were higher than MUFAs. Regarding PUFAs, about 18.4% of these fatty acids represent ω -3 PUFAs whereas 10.8% belong to ω -6 PUFAs series. DHA was the dominant PUFA followed by EPA.

Table 1: Fatty acids composition of *Isochrysis galbana* microalga (%).

| Fatty acid | Common name | % of fatty acids |
|-------------------|------------------------------|------------------|
| C12 | Lauric | 0.5 |
| C14 | Myristic | 7.8 |
| C14:1 | Myristoleic | 1.9 |
| C15:1 | Cis-10-pentadecenoic | 8.5 |
| C16 | Palmitic | 8.5 |
| C16:1 | Palmitoleic | 0.6 |
| C17 | Margaric | 0.6 |
| C17:1 | Margaroleic | 3.7 |
| C18:1n9cistrans | Oleic | 17.1 |
| C18:2n6cistrans | Linoleic | 10.9 |
| C18:3n6 | γ -linolenic | 8.0 |
| C18:3n3 | α -linolenic | 13.6 |
| C20:1 | Gadoleic | 1.5 |
| C20:2 | Eicosadienoic | 0.5 |
| C20:3n6 | Dihomo- γ -linolenic | 0.6 |
| C20:5n3 | Eicosapentaenoic | 1.0 |
| C22 | Behenic | 0.5 |
| C22:1n9 | Erucic | 0.5 |
| C23 | Tricosylic | 1.2 |
| C22:6n3 and C24:1 | Docosahexaenoic and Nervonic | 11.2 |
| C24 | Lignoceric | 1.3 |

Proportion of ω -3/ ω -6 PUFAs: 25.8%/19.5%

Table 2: Fatty acids composition of *Thalassiosira pseudonana* microalga (%).

| Fatty acid | Common name | % of fatty acids |
|-----------------|-----------------------------|------------------|
| C10 | Capric | 1.4 |
| C12 | Lauric | 2.6 |
| C14 | Myristic | 3.2 |
| C14:1 | Myristoleic | 1.7 |
| C15 | Pentadecylic | 1.8 |
| C15:1 | Cis-10-pentadecenoic | 1.9 |
| C16 | Palmitic | 6.2 |
| C16:1 | Palmitoleic | 2.4 |
| C17 | Margaric | 1.9 |
| C17:1 | Margaroleic | 2.8 |
| C18 | Stearic | 4.6 |
| C18:1n9cistrans | Oleic | 9.6 |
| C18:2n6trans | Linoleic | 2.8 |
| C18:3n6 | γ -linolenic | 2.3 |
| C18:3n3 | α -linolenic | 2.3 |
| C20 | Arachidic | 5.9 |
| C20:1 | Gadoleic | 3.6 |
| C20:2 | Eicosadienoic | 3.2 |
| C20:3n6 | Dihomo- γ -linolenic | 3.4 |
| C20:3n3 | Eicosatrienoic | 2.2 |
| C21 | Heneicosylic | 2.8 |
| C20:4n6 | Arachidonic | 2.3 |
| C20:5n3 | Eicosapentaenoic | 6.9 |
| C22 | Behenic | 3.6 |
| C22:1n9 | Erucic | 2.9 |
| C23 | Tricosylic | 3.5 |
| C22:6n3 | Docosahexaenoic | 7.0 |
| C24 | Lignoceric | 1.8 |
| C24:1 | Nervonic | 3.4 |

Proportion of ω -3/ ω -6 PUFAs: 18.4%/10.8%

Effect of lipidic extracts of the microalgae on melanoma cell line

In relation to lipidic extract of *Isochrysis galbana* microalga, it is possible to observe a significant antiproliferative effect on B16F10 cell line, in 72 h, for the concentration of 100 μ g/mL in relation to untreated cells (Fig. 1). Whereas, the lipidic extract of *Thalassiosira pseudonana* microalga caused a significant growth inhibition was showed

in 24 h in the concentrations of 10 and 100 $\mu\text{g/mL}$ and this effect on cell proliferation was sustained in 72 h for all tested concentrations (1, 10 and 100 $\mu\text{g/mL}$) in relation to control cells (Fig. 2). Also, a cytotoxic effect was observed immediately in the highest concentration (100 $\mu\text{g/mL}$) of this extract (Fig. 2), which was confirmed by test of trypan blue exclusion (data not showed).

B16F10 Lipidic Extract - *Isochrysis galbana*

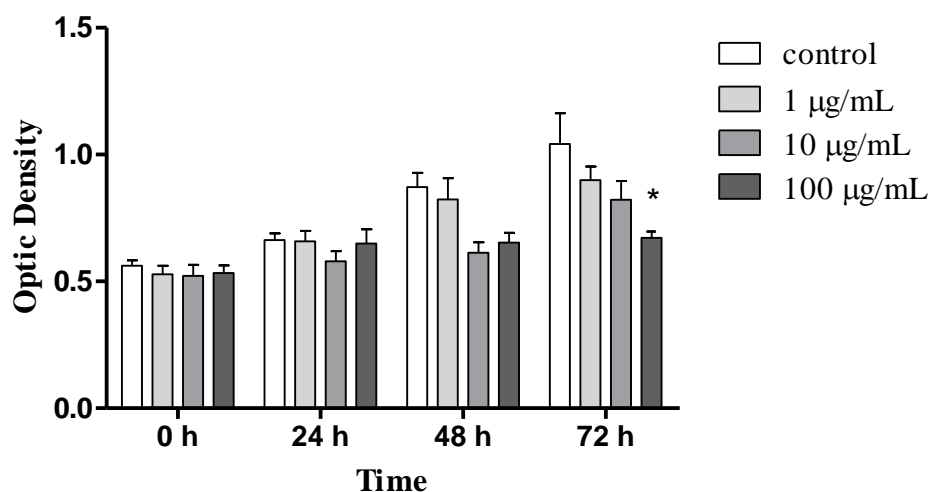


Figure 1: Optic density of B16F10 cells measured by MTT test immediately, 24 h, 48 h and 72 h, after treatment with lipidic extract of *Isochrysis galbana*. Data are expressed as mean \pm SE. * - represents significant difference in relation to control in each time of exposure ($p < 0.05$).

B16F10 Lipidic Extract - *Thalassiosira pseudonana*

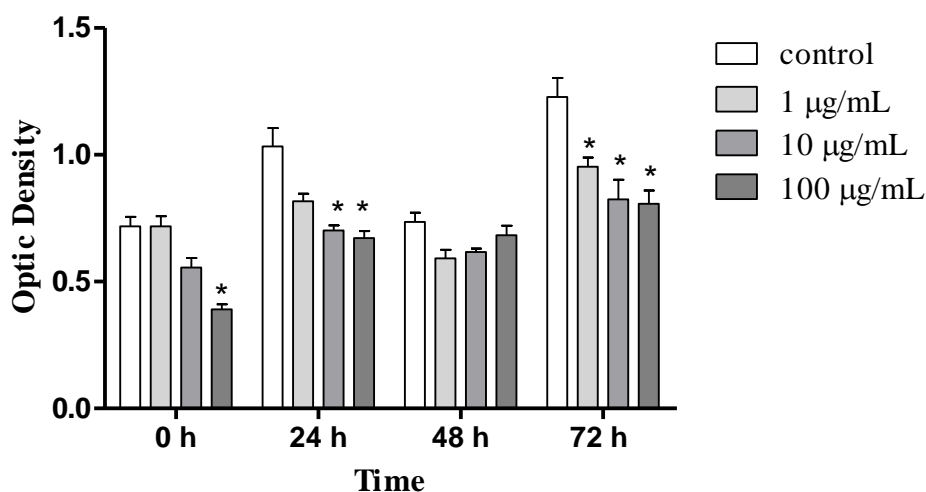


Figure 2: Optic density of B16F10 cells measured by MTT test immediately, 24 h, 48 h and 72 h, after treatment with lipidic extract of *Thalassiosira pseudonana*. Data are expressed as mean \pm SE. * - represents significant difference in relation to control in each time of exposure ($p < 0.05$).

Effect of α -linolenic and linoleic acids on B16F10 and Melan-A cells

In response to ω -3 PUFAs precursor, ALA, B16F10 and Melan-A cell lines demonstrated different results. It is possible to observe a proliferation inhibition in the B16F10 cell line at 72 h for all tested concentrations (7.5, 15, 30 and 60 μ M) of ALA in relation to control cells, therefore, suggesting a growth inhibition of this tumoral cell independently of the concentration (Fig. 3). Whereas for Melan-A cells, we observed any significant difference in the cellular proliferation between untreated and treated cells (Fig. 4). In relation to effect of ω -6 PUFAs precursor, LA acid, B16F10 and Melan-A cells showed similar responses (Fig. 5 and 6), we observed no significant difference between untreated and treated cells. On time, B16F10 cell line demonstrated difference between the concentration of 15 μ M and control cells in 48 h (Fig. 5).

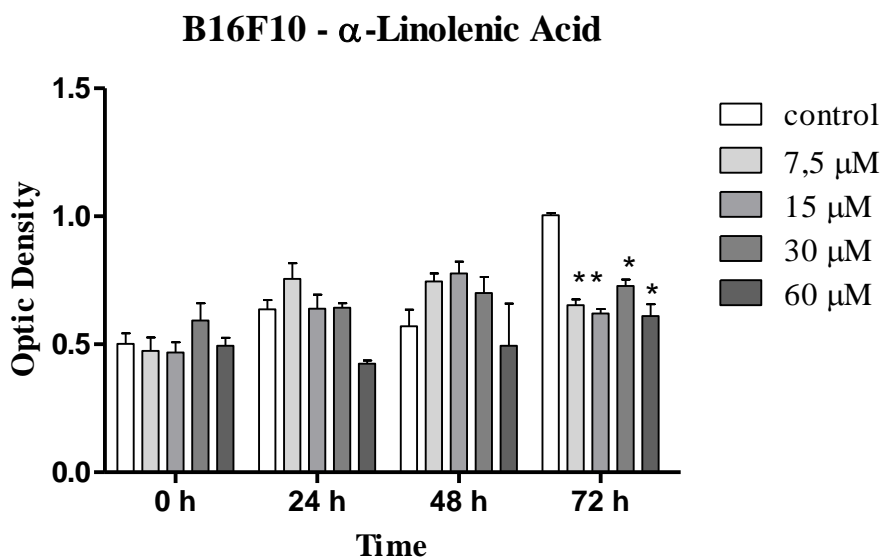


Figure 3: Optic density of B16F10 cells measured by MTT test immediately, 24 h, 48 h and 72 h, after treatment with α -linolenic acid. Data are expressed as mean \pm SE. * - represents significant difference in relation to control in each time of exposure ($p < 0.05$).

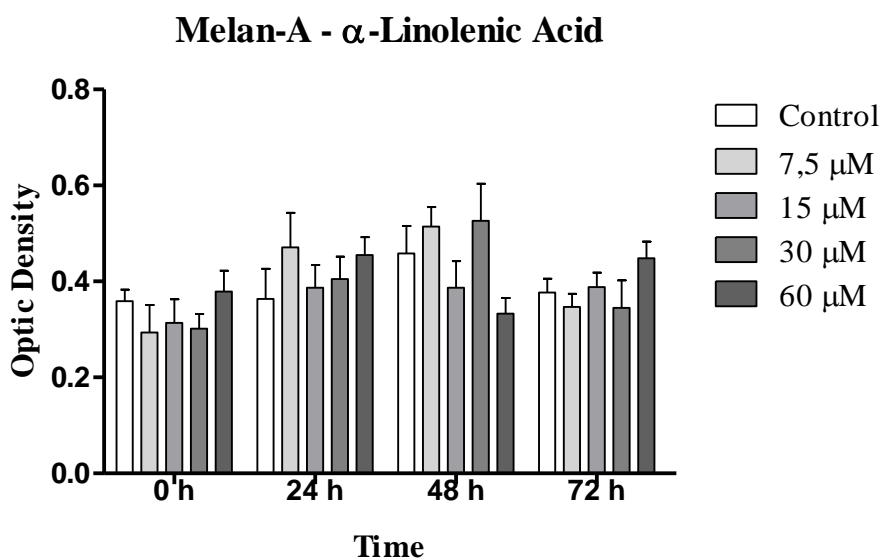


Figure 4: Optic density of Melan-A cells measured by MTT test immediately, 24 h, 48 h and 72 h, after treatment with α -linolenic acid. Data are expressed as mean \pm SE.

B16F10 - Linoleic Acid

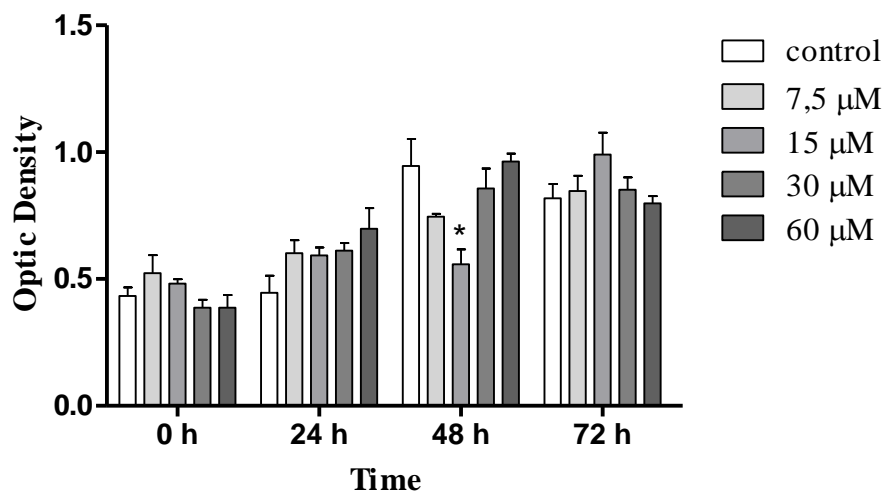


Figure 5: Optic density of B16F10 cells measured by MTT test immediately, 24 h, 48 h and 72 h, after treatment with linoleic acid. Data are expressed as mean \pm SE. * - represents significant difference in relation to control in each time of exposure ($p < 0.05$).

Melan-A - Linoleic Acid

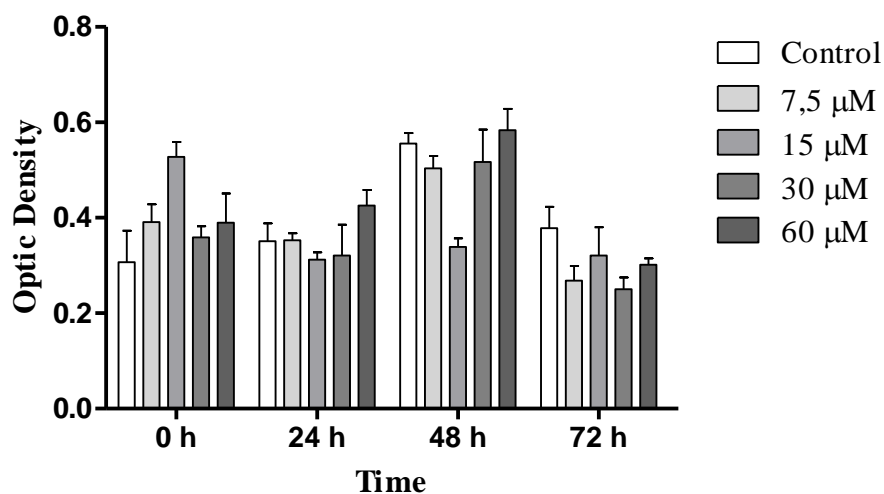


Figure 6: Optic density of Melan-A cells measured by MTT test immediately, 24 h, 48 h and 72 h, after treatment with linoleic acid. Data are expressed as mean \pm SE.

Discussion

In recent years, identification and validation of the potential benefits of phytocompounds has become an important area of pharmaceutical science [17]. Microalgal biomass has already been found as a natural source of a number of biologically active compounds, including PUFAs, mainly ω -3 PUFAs [2, 30]. It is known that the biochemical composition of microalgal cells, particularly their lipid composition, depends on the growth phase. In the present study, it was noted an abundance of ω -3 PUFAs in the total lipids of *Thalassiosira pseudonana* microalga in the stationary phase, in accordance with Zhukova, 2004. Moreover, the fatty acids profile obtained for *Isochrysis galbana* corroborate with the findings of Zhu *et al.*, 1997 and Huerlimann *et al.*, 2010, which also observed a high concentration of ω -3 PUFAs. Seaweed lipid extracts containing ω -3 PUFAs have been shown to be a very effective antiproliferative agent to cancer cells [34]. In this study, we demonstrated that lipidic extracts of *Isochrysis galbana* (ILE) and *Thalassiosira pseudonana* (TLE) marine microalgae are able to induce an inhibition of proliferation in B16F10 cell line. *Thalassiosira pseudonana* showed only 2.35% lipids in their dry weight, although the effect of this extract was more pronounced than that of *Isochrysis galbana*. As can be observed in Table 2, *Thalassiosira pseudonana* showed a more expressive proportion of ω -3/ ω -6 PUFAs (18.4%/10.8%) when compared with *Isochrysis galbana* microalga (25.8%/19.5%). This result could be related with high ω -3 PUFAs concentrations in TLE in relation to ω -6 PUFAs, since we also found that ALA exerts an antiproliferative effect in this cell line.

Cancer is a disease characterized by an imbalance between cell division and cell death. Although the molecular mechanisms which account for the biological effects of the ω -3

PUFAs are not completely understood, there is considerable evidence from animal tumours and human cell lines that providing DHA and/or EPA will both increase apoptotic and other death pathways and decrease cell growth. It has been hypothesized in several recent reviews that the effects of EPA and/or DHA on tumour cell apoptosis is likely due to their ability to alter the lipid environment and modulate receptors, proteins and lipid-derived signals originating from cell membranes [3, 5, 7, 9]. The available data seem to indicate that apoptosis induced by EPA or DHA may follow both the extrinsic and intrinsic pathways [7]. Our data show that the inhibitory effect of ALA on melanoma cells did not correlate with exposed concentrations, but with time exposition, differently of other studies [12, 35].

ω -3 PUFAs have been demonstrated to promote anti-tumour immunity and inhibit cancer initiation, tumour angiogenesis, and metastasis [5, 9, 36-38]. Numerous laboratory studies have found an inhibition of melanoma cell lines with the addition of the ω -3 PUFAs ALA, EPA, and DHA [11, 39-42]. Besides, there is a suggestion that DHA may have the greatest impact on melanoma cell lines [11, 42]. Albino *et al.*, 2000 related inhibitory activity of DHA on cell cycle progression and Liu *et al.*, 2001 hypothesized that inhibitory effects of DHA on cancer development are due, at least in part, to the suppression of the transcription factor activator protein 1 (AP-1) activity. Furthermore, this compound is highly peroxidable, so it is hypothesized that their incorporation into plasma and mitochondrial membrane phospholipids may sensitize cells to reactive oxygen species (ROS), inducing an oxidative stress [3, 43]. Lipid peroxidation products can inhibit DNA synthesis and cell division. Moreover, ω -3 PUFAs are mainly known for their anti-inflammatory effects that are partially due to their positive competition with ω -6 PUFAs as substrates for cyclooxygenase (COX) and

lipooxygenase (LOX) enzymes, resulting in the formation of less active prostaglandins and leukotrienes [3]. Since, the constitutive expression of COX-2 has been associated with the development and progression of many kinds of cancers [44], including melanoma [45, 46] and has been related to apoptosis resistance [47], a primary cause of treatment failure in this cancer.

Whereas, ω -6 PUFAs, as a whole, have been widely recognized as factors worsening the development of diseases. However, a potential beneficial action on health has been reported for some of them, GLA and AA [7]. For example, Andrade *et al.*, 2005 also reported a toxic effect for LA in a melanoma cell line that depended of the time of exposure. Although, in our study, we didn't observe any effect in the growth of both cell lines for this ω -6 PUFA.

Additionally, in this study, we observed that melanocytic normal cells were not sensible to tested ALA concentrations, that allow suggest a possible antitumoral effect for this ω -3 PUFA.

Conclusions:

Thus, the present study demonstrated that ILE and TLE are able to induce an inhibition of proliferation in the B16F10 cell line, with results more expressive for TLE, which also caused a cytotoxic effect in the highest tested concentration. This effect could possibly be linked to high ω -3 PUFAs concentrations in relation to ω -6 PUFAs in these extracts, with a greater proportion of ω -3/ ω -6 PUFAs for TLE. It is interesting to note that we found an antiproliferative activity for ALA in this cell line also. Moreover, the fact that normal melanocyte cells have not exhibited sensitivity to ALA in the tested concentrations, suggests an antitumoral effect for this ω -3 PUFA. So,

Isochrysis galbana and *Thalassiosira pseudonana* microalgae are suitable for further research to explore the mechanism of the compound that is responsible for this growth inhibitory activity against tumoral cell lines.

References

- [1] El Gamal AA. Biological importance of marine algae. *Saudi Pharm J* 2010; 18:1–25.
- [2] Plaza M, Santoyo S, Jaime L, Reina GGB, Herrero M, Señoráns FJ *et al.* Screening for bioactive compounds from algae. *J Pharm Biom Analysis* 2010; 51:450–455.
- [3] Calviello G, Serini S. Dietary Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Cancer. *Springer* 2010; 1:3-38.
- [4] Calder PC. N-3 polyunsaturated fatty acids and cytokine production in health and disease. *Ann Nutr Metab* 1997; 41:203–234.
- [5] Calviello G, Resci F, Serini S, Piccioni E, Toesca A, Boninsegna A *et al.* Docosahexaenoic acid induces proteasome-dependent degradation of beta-catenin, down-regulation of survivin and apoptosis in human colorectal cancer cells not expressing COX-2. *Carcinogenesis* 2007; 28:1202-1209.
- [6] Simopoulos AP. Essential fatty acids in health and chronic diseases. *Forum Nutr* 2003; 56:67–70.
- [7] Serini S, Piccioni E, Merendino N, Calviello G. Dietary polyunsaturated fatty acids as inducers of apoptosis: implications for cancer. *Apoptosis* 2009; 14:135–152.
- [8] Roynette CE, Calder PC, Dupertuis YM, Pichard C. N-3 Polyunsaturated fatty acids and colon cancer prevention. *Clin Nutr* 2004; 23:139–151.

- [9] Chapkin RS, Seo J, McMurray DN, Lupton JR. Mechanisms by which docosahexaenoic acid and related fatty acids reduce colon cancer risk and inflammatory disorders of the intestine. *Chem Phys Lipids* 2008; 153:14-23.
- [10] Colquhoun A, Miyake JA, Benadiba M. Fatty acids, eicosanoids and cancer. *Nutr Ther & Metab* 2009; 27:105-112.
- [11] Albino AP, Juan G, Traganos F, Reinhart L, Connolly J, Rose DP *et al.* Cell cycle arrest and apoptosis of melanoma cells by docosahexaenoic acid: association with decreased pRb phosphorylation. *Cancer Res* 2000; 60:4139-4145.
- [12] Andrade LNS, Lima TM, Curi R, Castrucci AML. Toxicity of fatty acids on murine and human melanoma cell lines. *Toxicol in Vitro* 2005; 19:553–560.
- [13] Jensen DJ, Wing GJ, Dellavalle RP. Nutrition and melanoma prevention. *Clin Dermatol* 2010; 28:644–649.
- [14] Serini S, Fasano E, Piccioni E, Monego G, Cittadini ARM, Celleno L *et al.* DHA induces apoptosis and differentiation in human melanoma cells in vitro: involvement of HuR-mediated COX-2-mRNA stabilization and β -catenin nuclear translocation. *Carcinogenesis* 2011; 33:164-173.
- [15] Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2009; 59:225-249.
- [16] Kvaskoff M, Weinstein P. Are some melanomas caused by artificial light? *Med Hypotheses* 2010; 75:305-311.
- [17] Hsan KM, Chen C-C, Shyur L-F. Current Research and Development of Chemotherapeutic Agents for Melanoma. *Cancers* 2010; 2:397-419.
- [18] Pulz O, Gross W. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004; 65:635-648.

- [19] Sijtsma L, de Swaaf ME. Biotechnological production and applications of the omega-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004; 64:146-53.
- [20] Yongmanitchai W, Ward OP. Screening of algae for potential alternative sources of eicosapentaenoic acid. *Phytochemistry* 1991; 9:2963-2967.
- [21] Saoudi-Helis L, Dubacq JP, Marty Y, Samain JF, Gudin C. Influence of growth rate on pigment and lipid composition of the microalga *Isochrysis* aff. *galbana* clone T.iso. *J Appl Phycol* 1994; 6:315–322.
- [22] Sánchez S, Martínez ME, Espinola F. Biomass production and biochemical variability of the marine microalga *Isochrysis galbana* in relation to culture medium. *Biochem Eng J* 2000; 6:13–18.
- [23] Lin Y-H, Chang F-L, Tsao C-Y, Leu J-Y. Influence of growth phase and nutrient source on fatty acid composition of *Isochrysis galbana* CCMP 1324 in a batch photoreactor. *Biochem Eng J* 2007; 37:166–176.
- [24] Mata TM, Martins AA, Caetano NS. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew Sustain Energ Rev* 2010; 14:217–232.
- [25] Guillard RRL. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith WL, Chanley MH. Culture of Marine Invertebrate Animals. *Plenum Press*, N.Y. 1975; pp.26-60.
- [26] Borges L, Faria BM, Odebrecht C, Abreu PC. Potencial de absorção de carbono por espécies de microalgas usadas na aquicultura: Primeiros passos para o desenvolvimento de um “mecanismo de desenvolvimento limpo”. *Atlântica* 2007; 1:35-46.

- [27] Folch J, Lees M, Sloane SGH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 1957; 226:497-509.
- [28] Metcalfe LD, Schmiyz AA, Belka JR. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Analys Chem* 1966; 38:514-515.
- [29] Trindade GS, Capella MAM, Capella LS, Affonso-Mitidier OR, Rumjanek VM. Differences in sensitivity to UVC, UVB and UVA radiation of a multidrug-resistant cell line overexpressing P-glycoprotein. *Photochem Photobiol* 1999; 69:694-699.
- [30] Cardozo KHM, Guaratini T, Barros MP, Falcão VR, Tonon AP, Lopes NP *et al.* Metabolites from algae with economical impact. *Comp Biochem Physiol C* 2007; 146:60-78.
- [31] Zhukova NV. Changes in the Lipid Composition of *Thalassiosira pseudonana* during Its Life Cycle. *Russ J Plant Physl*, 2004; 51:702–707.
- [32] Zhu CJ, Lee YK, Chao TM. Effects of temperature and growth phase on lipid and biochemical composition of *Isochrysis galbana* TK1. *J Appl Phycol* 1997; 9:451–457.
- [33] Huerlimann R, Nys R, Heimann K. Growth, Lipid Content, Productivity, and Fatty Acid Composition of Tropical Microalgae for Scale-Up Production. *Biotechnol Bioeng* 2010; 107:245- 257.
- [34] Bhaskar N, Hosakawa M, Miyashita K. Growth inhibition of human promyelocytic leukemia (HL-60) cells by lipid extracts of marine alga *Sargassum marginatum* (Fucales, Phaeophyta) harvested off Goa (west coast of India) with special reference to fatty acid composition. *Indian J Mar Sci* 2004; 33:355-360.
- [35] Stöckli, M. Influence of the polyunsaturated fatty acids linoleic acid, arachidonic acid, α -linolenic acid and γ -linolenic acid on melanogenesis of B16 mouse

- melanoma cells and normal human melanocytes. PhD Thesis, *University of Basel, Faculty of Science* 2002.
- [36] Larsson SC, Kumlin M, Ingelman-Sundberg M, Wolk A. Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. *Am J Clin Nutr* 2004; 79:935-945.
- [37] Berquin IM, Edwards IJ, Chen YQ. Multi-targeted therapy of cancer by omega-3 fatty acids. *Cancer Lett* 2008; 269:363-377.
- [38] Spencer L, Mann C, Metcalfe M, Webb MB, Pollard C, Spencer D *et al.* The effect of omega-3 FAs on tumour angiogenesis and their therapeutic potential. *Eur J Cancer* 2009; 45:2077-2086.
- [39] Reich R, Royce L, Martin GR. Eicosapentaenoic acid reduces the invasive and metastatic activities of malignant tumor cells. *Biochem Bioph Res Co* 1989; 160:559-64.
- [40] Abbott WG, Tezabwala B, Bennett M, Grundy SM. Melanoma lung metastases and cytolytic effector cells in mice fed antioxidant-balanced corn oil or fish oil diets. *Nat Immun* 1994; 13:15-28.
- [41] Yan L, Yee JA, Li D, McGuire MH, Thompson LU. Dietary flaxseed supplementation and experimental metastasis of melanoma cells in mice. *Cancer Lett* 1998; 124:181-6.
- [42] Liu G, Bibus DM, Bode AM, Ma W-Y, Holman RT., Dong Z. Omega-3 but not omega 6 fatty acids inhibit AP-1 activity and cell transformation in JB6 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:7510-15.

- [43] Hawkins RA, Sangster K, Arends MJ. Apoptotic death of pancreatic cancer cells induced by polyunsaturated fatty acids varies with double bond number and involves an oxidative mechanism. *J Pathol* 1998; 185:61-70.
- [44] Trifan OC, Hla T. Cyclooxygenase-2 modulates cellular growth and promotes tumorigenesis. *J Cell Mol Med* 2003; 7:207-222.
- [45] Denkert C, Kobel M, Berger S, Siegert A, Leclere A, Trefzer U *et al.* Expression of cyclooxygenase-2 in human malignant melanoma, *Cancer Res* 2001; 61: 303-308.
- [46] Goulet AC, Einsphar JG, Alberts DS, Beas A, Burk C, Bhattacharyya A *et al.* Analysis of cyclooxygenase 2 (COX-2) expression during malignant melanoma progression. *Cancer Biol Ther* 2003; 2:713-718.
- [47] Liao Z, Mason KA, Milas L. Cyclo-oxygenase-2 and its inhibition in cancer: is there a role? *Drugs* 2007; 67:821-845.

Conclusões Gerais

- Ambos os extratos lipídicos testados inibiram proliferação celular na linhagem B16F10;

- O extrato lipídico da microalga *Thalassiosira pseudonana* ainda induziu um efeito citotóxico na linhagem B16F10;

O efeito antiproliferativo mais expressivo foi do extrato da microalga *Thalassiosira pseudonana*, o que poderia estar relacionado a maior proporção de PUFAs ω -3 em relação a PUFAs ω -6;

- O ALA também foi capaz de inibir proliferação celular na linhagem B16F10, e não teve atividade na linhagem Melan-A, o que permite sugerir um efeito antitumoral para este composto;

- O LA não apresentou qualquer efeito no crescimento destas linhagens celulares.

Perspectivas

- Avaliar a proporção de morte celular através do método de exclusão por azul de trypan;

- Purificar os PUFA ω -3 e ω -6 dos extratos lipídicos das microalgas marinhas estudadas;

- Verificar a atividade de enzimas antioxidantes nas linhagens celulares B16F10 e Melan-A expostas ao PUFA ω -3 α -linolênico;

- Quantificar possíveis danos de peroxidação lipídica e produção efetiva de espécies reativas de oxigênio (ERO) nas linhagens expostas ao PUFA ω -3 α -linolênico;

- Avaliar a expressão de genes como, NF-kappaB, COX 2, Epha2, Bcl-2, BRAF, PTEN, Apaf-1, caspases e p53 nas linhagens celulares expostas ao PUFA ω -3 α -linolênico.

Referências Bibliográficas

- Albino AP, Juan G, Traganos F, Reinhart L, Connolly J, Rose DP, Darzynkiewicz Z, 2000. Cell cycle arrest and apoptosis of melanoma cells by docosahexaenoic acid: association with decreased pRb phosphorylation. *Cancer Res* 60: 4139-4145.
- Becker EW, 1994. Microalgae: biotechnology and microbiology. Cambridge : *Cambridge University Press* 12: 177-195.
- Becker EW, 2004. "Microalgae in human and animal nutrition: Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology". London: *Blackwell Science* pp.312-351.
- Berquin IM, Edwards IJ, Chen YQ, 2008. Multi-targeted therapy of cancer by omega-3 fatty acids. *Cancer Lett* 269: 363-377.
- Calder PC, 2006. N-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr* 83: 1505–1519.
- Calviello G, Palozza P, Piccioni E, Maggiano N, Frattucci A, Franceschelli P, Bartoli GM, 1998. Dietary supplementation with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid inhibits growth of Morris hepatocarcinoma 3924A in rats: effects on proliferation and apoptosis. *Int J Cancer* 75: 699-705.

Calviello G, Di Nicuolo F, Serini S, Piccioni E, Boninsegna A, Maggiano N, 2005.

Docosahexaenoic acid enhances the susceptibility of human colorectal cancer cells to 5-fluorouracil. *Cancer Chemother Pharmacol* 55: 12–20.

Calviello G, Serini S, Piccioni E, 2007. N-3 polyunsaturated fatty acids and the

prevention of colorectal cancer: molecular mechanisms involved. *Curr Med Chem* 14: 3059-3069.

Calviello G, Serini S, 2010. Dietary Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Cancer.

Springer 1: 3-38.

Cardozo KHM, Guaratini T, Barros MP, Falcão VR, Tonon AP, Lopes NP, Campos S,

Torres MA, Souza AO, Colepicolo P, Pinto E, 2007. Metabolites from algae with economical impact. *Comp Biochem Physiol C* 146: 60-78.

Chapkin RS, Hong MY, Fan YY, Davidson LA, Sanders LM, Henderson CE, Barhoumi

R, Burghardt RC, Turner ND, Lupton JR, 2002. Dietary n-3 PUFA alter colonocyte mitochondrial membrane composition and function. *Lipids* 37: 193-199.

Chapkin RS, Seo J, McMurray DN, Lupton JR, 2008. Mechanisms by which

docosahexaenoic acid and related fatty acids reduce colon cancer risk and inflammatory disorders of the intestine. *Chem Phys Lipids* 153: 14-23.

- Chen ZY, Istfan NW, 2000. Docosahexaenoic acid is a potent inducer of apoptosis in HT-29 colon cancer cells. *Prost Leuk Ess Fatty Acids* 63: 301-308.
- Chisti Y, 2004. Microalgae: our marine forests. Book reviews. Richmond, A. (Ed). Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Oxford: *Blackwell Science* 566p.
- Chiu LC, Wan JM, 1999. Induction of apoptosis in HL-60 cells by eicosapentaenoic acid (EPA) is associated with downregulation of bcl-2 expression. *Cancer Lett* 145: 17-27.
- Chiu LC, Wan JM, Ooi VE, 2000. Induction of apoptosis by dietary polyunsaturated fatty acids in human leukemic cells is not associated with DNA fragmentation. *Int J Oncol* 17: 789-796.
- Colquhoun A, 1998. Induction of apoptosis by polyunsaturated fatty acids and its relationship to fatty acid inhibition of carnitine palmitoyltransferase I activity in Hep2 cells. *Biochem Mol Biol Int* 45: 331-336.
- Derner RB, Ohse S, Villela M, Carvalho SM, Fett R, 2006. Microalgas, produtos e aplicações. *Ciência Rural* 36: 1959-1967.
- Dommels YE, Haring MM, Kestra NG, Alink GM, van Bladeren PJ, van OB, 2003. The role of cyclooxygenase in n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acid mediated

effects on cell proliferation, PGE (2) synthesis and cytotoxicity in human colorectal carcinoma cell lines. *Carcinogenesis* 24: 385-392.

Dupertuis YM, Meguid MM, Pichard C., 2007. Colon cancer therapy: new perspectives of nutritional manipulations using polyunsaturated fatty acids. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 10: 427-432.

Ehringer W, Belcher D, Wassall SR, Stillwell W, 1990. A comparison of the effects of linolenic (18:3 omega 3) and docosahexaenoic (22:6 omega 3) acids on phospholipid bilayers. *Chem Phys Lipids* 54: 79-88.

Hanahan D, Weinberg RA., 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100: 57-70.

Hawkins RA, Sangster K, Arends MJ, 1998. Apoptotic death of pancreatic cancer cells induced by polyunsaturated fatty acids varies with double bond number and involves an oxidative mechanism. *J Pathol* 185: 61-70.

Hawkins RA, Sangster K, Arends MJ, 1999. The apoptosis-inducing effects of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) on benign and malignant breast cells in vitro. *The Breast* 8: 16-20.

Heimli H, Finstad HS, Drevon CA, 2001. Necrosis and apoptosis in lymphoma cell lines exposed to eicosapentaenoic acid and antioxidants. *Lipids* 36: 613-621.

- Hoek C Van Den, Mann DG, Jahns HM, 1995. *Algae: An introduction to phycology*. Cambridge : *Cambridge University Press* 623p.
- Hsan KM, Chen C-C, Shyur L-F, 2010. Current Research and Development of Chemotherapeutic Agents for Melanoma. *Cancers* 2: 397-419.
- Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, Ghirardi M, Posewitz M, Seibert M, Darzins AI, 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances *Plant J* 54: 621-39.
- Instituto Nacional do Câncer (INCA), site <http://www.inca.gov.br>, acessado em 16 de janeiro de 2012.
- Jha RK, Zi-rong X, 2004. Biomedical Compounds from Marine organisms. *Mar. Drugs* 2: 123-146.
- Lai PBS, Ross JA, Fearon KCH, Anderson JD, Carter DC, 1996. Cell cycle arrest and induction of apoptosis in pancreatic cancer cells exposed to eicosapentaenoic acid in vitro. *Br J Cancer* 74: 1375-1383.
- Larsson SC, Kumlin M, Ingelman-Sundberg M, Wolk A, 2004. Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. *Am J Clin Nutr* 79: 935-945.

- Latham P, Lund EK, Brown JC, Johnson IT, 2001. Effects of cellular redox balance on induction of apoptosis by eicosapentaenoic acid in HT29 colorectal adenocarcinoma cells and rat colon in vivo. *Gut* 49: 97-105.
- Lin, Y-H, Chang, F-L, Tsao, C-Y, Leu, J-Y, 2007. Influence of growth phase and nutrient source on fatty acid composition of *Isochrysis galbana* CCMP 1324 in a batch photoreactor. *Biochem Eng J* 37: 166–176.
- Liu CP, Lin LP, 2001. Ultrastructural study and lipid formation of *Isochrysis* sp. CCMP 1324. *Bot Bull Acad Sin* 42: 207–214.
- Ma DW, Seo J, Switzer KC, Fan YY, McMurray DN, Lupton JR, Chapkin RS, 2004. N-3 PUFA and membrane microdomains: a new frontier in bioactive lipid research. *J Nutr Biochem* 15: 700-706.
- Mannini A, Kerstin N, Calorini L, Mugnai G, Ruggieri S, 2009. An enhanced apoptosis and a reduced angiogenesis are associated with the inhibition of lung colonisation in animals fed an n-3 polyunsaturated fatty acid-rich diet injected with a highly metastatic murine melanoma line. *Br J Nutr* 101: 688-693.
- Mata, TM, Martins, AA, Caetano, NS, 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew Sust Energ Rev* 14: 217–232.

- Maziere C, Conte MA, Degonville J, Ali D, Maziere JC, 1999. Cellular enrichment with polyunsaturated fatty acids induces an oxidative stress and activates the transcription factors AP1 and NFkappaB. *Biochem Bioph Res Co* 265: 116-122.
- Narayanan BA, Narayanan NK, Reddy BS, 2001. Docosahexaenoic acid regulated genes and transcription factors inducing apoptosis in human colon cancer cells. *Int J Oncol* 19: 1255-1262.
- Narayanan NK, Narayanan BA, Reddy BS, 2005. A combination of docosahexaenoic acid and celecoxib prevents prostate cancer cell growth in vitro and is associated with modulation of nuclear factor-kappaB, and steroid hormone receptors. *Int J Oncol* 26: 785-792.
- Plaza M, Cifuentes A, Ibáñez E, 2008. In the search of new functional food ingredients from algae. *Trends Food Sci Tech* 19: 31-39.
- Plaza M, Santoyo S, Jaime L, Reina GGB, Herrero M, Señoráns FJ, Ibáñez E, 2010. Screening for bioactive compounds from algae. *J Pharmaceut Biomed* 51: 450-455.
- Pulz O, Gross W, 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl Microbiol Biot* 65: 635-648.
- Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE, 2001. *Biologia vegetal*. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 906p.

- Sánchez, S, Martínez, ME, Espinola, F, 2000. Biomass production and biochemical variability of the marine microalga *Isochrysis galbana* in relation to culture medium. *Biochem Eng J* 6: 13–18.
- Saoudi-Helis L, Dubacq JP, Marty Y, Samain JF, Gudin C, 1994. Influence of growth rate on pigment and lipid composition of the microalga *Isochrysis* aff. *galbana* clone T.iso. *J Appl Phycol* 6: 315–322.
- Schley PD, Jijon HB, Robinson LE, Field CJ, 2005. Mechanisms of omega-3 fatty acid-induced growth inhibition in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Tr* 92: 187-195.
- Schley PD, Brindley DN, Field CJ, 2007. (n-3) PUFA alter raft lipid composition and decrease epidermal growth factor receptor levels in lipid rafts of human breast cancer cells. *J Nutr* 137: 548-553.
- Schumacher MC, Laven B, Petersson F, Cederholm T, Onelöv E, Ekman P, Brendler C, 2011. A comparative study of tissue ω -6 and ω -3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) in benign and malignant pathologic stage pT2a radical prostatectomy specimens. *Urol Oncol* 10: 1572-7.
- Serini S, Piccioni E, Merendino N, Calviello G., 2009. Dietary polyunsaturated fatty acids as inducers of apoptosis: implications for cancer. *Apoptosis* 14: 135–152.

- Shaikh SR, Dumaul AC, Jensi LJ, Stillwell W, 2001. Lipid phase separation in phospholipid bilayers and monolayers modeling the plasma membrane. *Biochim Biophys Acta* 1512: 317-328.
- Shu YZ, 1998. Recent Natural Products Based Drug Development: A Pharmaceutical Industry Perspective. *J Nat Prod* 61: 1053-1071.
- Sijben, JW, Calder, PC, 2007. Differential immunomodulation with long-chain n-3 PUFA in health and chronic disease. *Proc Nutr Soc* 66: 237–259.
- Smit AJ, 2004. Medicinal and Pharmaceutical uses of seaweed natural products: a review. *J Appl Phycol* 16: 245-262.
- Spencer L, Mann C, Metcalfe M, Webb MB, Pollard C, Spencer D, Berry D, Steward W, Dennison A, 2009. The effect of omega-3 FAs on tumour angiogenesis and their therapeutic potential. *Eur J Cancer* 45: 2077-2086.
- Stillwell W, Jensi LJ, Crump FT, Ehringer W, 1997. Effect of docosahexaenoic acid on mouse mitochondrial membrane properties. *Lipids* 32: 497-506.
- Volkman JK, Jeffrey SW, Nichols PD, Rogers GI, Garland CD, 1989. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *J Exp Mar Biol Ecol* 128: 219-240.

- Zhang W, Long Y, Zhang J, Wang C, 2007. Modulatory effects of EPA and DHA on proliferation and apoptosis of pancreatic cancer cells. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 27: 547-550.
- Zhukova NV, Aizdaicher NA, 1995. Fatty acid composition of 15 species of marine microalgae. *Phytochemistry* 39: 351-356.
- Yamamoto D, Kiyozuka Y, Adachi Y, Takada H, Hioki K, Tsubura A, 1999. Synergistic action of apoptosis induced by eicosapentaenoic acid and TNP-470 on human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Tr* 55: 149-160.
- Yongmanitchai W, Ward OP, 1991. Screening of algae for potential alternative sources of eicosapentaenoic acid. *Phytochemistry* 9: 2963-2967.
- Williams CD, Whitley BM, Hoyo C, Grant DJ, Iraggi JD, Newman KA, Gerber L, Taylor LT, McKeever MG, Freedland SJ, 2011. A high ratio of dietary n-6/n-3 polyunsaturated fatty acids is associated with increased risk of prostate cancer. *Nutr Res* 31: 1-8.