

DALTON LUIZ SCHIESSEL

Ácido graxo α -linolênico causa o mesmo efeito que seus derivados de cadeia longa em ratos portadores de tumor de Walker 256? Investigação antitumoral e imunitária.

CURITIBA

2011

DALTON LUIZ SCHIESSEL

Ácido graxo α -linolênico causa o mesmo efeito que seus derivados de cadeia longa em ratos portadores de tumor de Walker 256? Investigação antitumoral e imunitária.

Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná como requisito para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular na área de concentração: Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes.

CURITIBA

2011

**Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas**

Schiessel, Dalton Luiz

Ácido graxo α - linolênico causa o mesmo efeito que seus derivados de cadeia longa em ratos portadores de tumor de Wlaker 256? Investigação antitumorial e imunitária. / Dalton Luiz Schiessel. – Curitiba, 2011.

106 f.: il. color. ; 30cm.

Orientador: Luiz Cláudio Fernandes

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Câncer – aspectos imunológicos 2. Biologia celular 3. Óleo de peixe 4. Ácidos graxos I. Título II. Fernandes, Luiz Cláudio III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

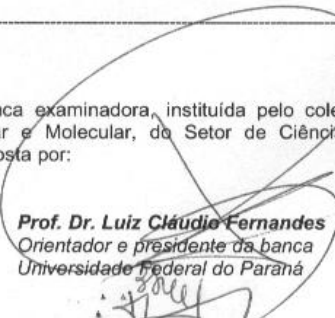
CDD 616.992

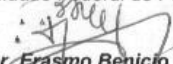
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

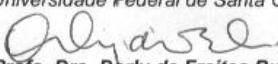
Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

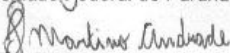
PARECER


A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:


Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes
Orientador e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná


Prof. Dr. Erasmo Benício Santos de Moraes Trindade
Universidade Federal de Santa Catarina


Profa. Dra. Darly de Freitas Buchi
Universidade Federal do Paraná

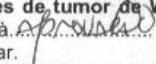

Prof. Dr. Anderson Joel Martino Andrade
Universidade Federal do Paraná


Prof. Dr. Sandro José Ribeiro Bonatto
Hospital Pequeno Príncipe

E tendo como suplentes,

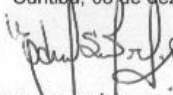
Profa. Dra. Carolina Camargo de Oliveira
Universidade Federal do Paraná

Profa. Dra. Andrea Senff Ribeiro
Universidade Federal do Paraná

Após argüir o doutorando **Dalton Luiz Schiessel**, em relação ao seu trabalho intitulado: "**Ácido graxo α -linolênico causa o mesmo efeito que seus derivados de cadeia longa em ratos portadores de tumor de Walker 256? Investigação antitumoral e imunitária**" são de parecer favorável à  do acadêmico, habilitando-o ao título de DOUTOR em Biologia Celular e Molecular.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 08 de dezembro de 2011


Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular - UFPR
Matr. 185795

CENTRO POLITÉCNICO – CEP 81.531-990-JARDIM DAS AMÉRICAS-Caixa Postal 19031-
FONE: (41) 3361-1676 FAX 3266-2042 – E-Mail- pgbiocel@ufpr.br – www.pgbiocel.ufpr.br CURITIBA -PR

Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu.

Há tempo de nascer, e tempo de morrer;

Tempo de plantar, e tempo de arrancar o que se plantou;

Tempo de matar, e tempo de curar;

Tempo de derrubar, e tempo de edificar;

Tempo de chorar, e tempo de rir;

Tempo de prantear, e tempo de dançar;

Tempo de espalhar pedras, e tempo de ajuntar pedras;

Tempo de abraçar, e tempo de afastar-se de abraçar;

Tempo de buscar, e tempo de perder;

Tempo de guardar, e tempo de lançar fora;

Tempo de rasgar, e tempo de coser;

Tempo de estar calado, e tempo de falar;

Tempo de amar, e tempo de odiar;

Tempo de guerra, e tempo de paz.

(Eclesiastes, 3:1-8)

Earth's Cry, Heaven's Smile

(Carlos Santana)

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho aos meus pais Renato e Raquel (*in memoriam*) sempre com palavras sábias.

Dedico em especial a minha mulher Scheila pelo amor, carinho, companheirismo e compreensão ao longo destes anos e pelos próximos e ao meu filho Leonardo.

Ao Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes, agradeço a amizade e a oportunidade de poder aprender neste laboratório que você coordena, é um excelente local de pesquisa, de trabalho e amizades.

Aos colegas e amigos do LabMetab; pela amizade e por sempre ajudarem nos experimentos em especial ao Ricardo Yamazaki, Danielle Pequito, Isabela Coelho, Adriana Yamaguchi, Marcelo Kryczyk, Gleisson Brito, Gina Borghetti, Júlia Aikawa, Cíntia Rodacki, Sandro Bonatto e Kátya Naliwaiko também agradeço pelos ensinamentos a Fabíola Iager, Everson Nunes. Pela amizade de Ricelli, Juliano, Thiago, Carla e Renata e as estagiárias Tatiana, Carolina, Bruna, Ana Cláudia e Fernanda, e por todos tornarem o ambiente de trabalho muito agradável.

Aos funcionários do Biotério e do Laboratório Central.

Ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, em especial a secretária Marlene.

Ao Prof. Guilherme L. Sasaki e ao Doutor Lauro Souza, pelas análises no GC-MS.

À Fundação Araucária, pelo auxílio financeiro.

À Fundação Herbarium, pela disponibilização das cápsulas de óleo de peixe.

À Bebidas Latinas SAC Lima, Peru, pela disponibilização do Óleo Oro Inka.

RESUMO

Alterações na dieta estabelecidas nos últimos 200 anos causaram redução no consumo de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) n-3, aumento do consumo de gordura total, saturada e rica em AGPI n-6. Estas mudanças foram fatores determinantes para o aumento da incidência de doenças crônicas não transmissíveis entre estas o câncer. Estima-se que um terço de todos os cânceres pode ser prevenido pelo estilo de vida saudável e dieta saudável. AGPI n-3, em especial o ácido graxo eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), ricos no óleo de peixe, tem diversos efeitos na prevenção de câncer e/ou redução do tumor, acompanhado de menor proliferação das células tumorais *ex vivo* e maior peroxidação lipídica apresentando efeito antitumoral. Também atenuam os efeitos da caquexia do câncer, proporcionam maior resposta na imunidade mediada por macrófagos e neutrófilos e em linfócitos reduzem sua proliferação. Os efeitos, no câncer, provocados por outro AGPI n-3 em especial o ácido α -linolênico (ALA) o precursor (parental) do EPA e DHA tem sido pouco estudado. O objetivo deste trabalho foi investigar o crescimento tumoral, caquexia, resposta de macrófagos, neutrófilos e de linfócitos, em ratos portadores de tumor de Walker 256 suplementados com óleo rico em ácido graxo α -linolênico. Ratos Wistar (70 dias) foram alimentados com dieta padrão, grupo controle (C) e suplementados com 1g/kg de: óleo de peixe (OP) ou Oro Inka (OI) rico em α -linolênico (50%). Após 30 dias, em metade do grupo dos animais inoculou-se células do tumor de Walker 256, formando grupos W, OPW e OIW. Após 14 dias estes foram ortotansados, o sangue coletado, tumor retirado e os macrófagos peritoneais e linfócitos mesentéricos obtidos. A suplementação com Oro Inka causou redução da massa tumoral. Neste tecido houve menor expressão da COX-2 e menor incorporação de ácido araquidônico e maior de ALA e EPA comparado ao tumor dos não suplementados. Parâmetros bioquímicos de caquexia e peso corpóreo estavam reduzidos no grupo Oro Inka (OIW). Nos macrófagos e neutrófilos houve aumento da fagocitose, retenção de vermelho neutro e da produção de ânion superóxido. Em linfócitos do mesentério menor proliferação celular e aumento da subpopulação de linfócitos CD8⁺. As citocinas TNF- α e IL-6 tiveram menor concentração plasmática pelos macrófagos e aumento da produção *in vitro* pelos linfócitos mesentéricos. Todos estes efeitos foram observados no grupo suplementado com óleo de peixe. Nossa conclusão é a de que a suplementação com Oro Inka, rico em ALA, causou efeito antitumoral, anticaquético e modulador da resposta imunitária similar a descrita em outros trabalhos pela suplementação com óleo de peixe. Se isto ocorre pela ação do próprio ácido graxo parental ou pela sua conversão em ácido graxo de cadeia longa ainda precisa ser determinada.

Palavras chave: Óleo de peixe. Oro inka. Ácido α -linolênico. Câncer. Caquexia. Resposta imunológica.

ABSTRACT

Changes in diet established in last 200 years caused reduction in consumption of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) and increase the consumption of total fat, saturated and n-6 PUFA. These changes are related with the development of chronic diseases such as cancers. It has been stated that one third of all cancers can be prevented by adopting a good lifestyle and healthy diet. N-3 PUFA in particular eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) rich in fish oil have been reported to induce cancer prevention as well as able to reduce tumor weight, tumor cells proliferation *ex vivo* and increase lipid peroxidation. Also can attenuate the effects of cancer cachexia, provide higher response in mediate immunity by macrophages, neutrophils and lymphocytes. The effect on cancer caused by other n-3 PUFA in particular the α -linolenic acid (ALA), the precursor of EPA and DHA have been poorly studied. The aim of this study was to investigate tumor growth, cachexia, macrophage, neutrophils and lymphocytes response in Walker 256 tumor-bearing rats supplemented with oil Oro Inka, rich in α -linolenic fatty acid. Wistar rats (70 days) were fed a standard diet control group (C) and supplemented with 1g/kg of fish oil (FO) or Oro Inka (OI) rich in α -linolenic acid (50%). After 30 days, half of the groups were inoculated with Walker 256 tumor cells suspension named W, OPW and OIW, respectively. After 14 days they were killed, blood harvested, tumor withdrawn, peritoneal macrophages and lymphocytes gut-associated were obtained. Supplementation with Oro Inka, rich in ALA, caused a reduction in cancer cachexia, tumor growth followed by lower expression of COX-2 as well as lower incorporation of arachidonic acid and higher of the ALA and EPA in the tumor tissue. Regarding to immune system macrophages and neutrophils had higher phagocytosis, lysosomal volume and anion superoxide production but in the gut-associated lymphocytes lower cell proliferation and we found increase in the CD8⁺ T cell population. All these findings were also found in the tumor-bearing rats supplemented with fish oil. In summary supplementation with Oro Inka did cause the same effect already seen by fish oil supplementation. Whether such effects is done by the Oro Inka itself or by its conversion to EPA this study can not answer.

Key words: Fish oil. Oro inka. α -linolenic acid. Cancer. Cachexia. Immune response.

LISTA FIGURAS

FIGURA 1: PERCENTUAL DE CALORIAS INGERIDAS A PARTIR DE GORDURAS ...	1
FIGURA 2: ESTRUTURA DE ÁCIDOS GRAXOS COMUNS NA DIETA.....	4
FIGURA 3: METABOLISMO DE ÁCIDOS GRAXOS N-6 E N-3.....	8
FIGURA 4: ESTIMATIVAS PARA O ANO 2010 DE NOVOS CASOS DE CÂNCER.	12
FIGURA 5: RECEPTOR DO TNF-A (TNFR-1) E VIA DE SINALIZAÇÃO.....	20
FIGURA 6: MASSA TUMORAL	39
FIGURA 7: EXPRESSÃO DE COX-2 NO TECIDO TUMORAL	42
FIGURA 8: PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS <i>EX VIVO</i>	42
FIGURA 9: CONCENTRAÇÃO DE LIPOPERÓXIDOS NO TECIDO TUMORAL.....	43
FIGURA 10: GLICEMIA	44
FIGURA 11: CONCENTRAÇÃO DE TRIACILGLICEROL PLASMÁTICO.	44
FIGURA 12: TNF- α PLASMÁTICO.....	45
FIGURA 13: IL-6 PLASMÁTICA	46
FIGURA 14: FAGOCITOSE DE ZIMOSAN POR MACRÓFAGOS.....	47
FIGURA 15: RETENÇÃO DE VERMELHO NEUTRO POR MACRÓFAGOS	47
FIGURA 16: PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO POR MACRÓFAGOS.....	48
FIGURA 17: PRODUÇÃO DE TNF- α POR MACRÓFAGOS.	49
FIGURA 18: PRODUÇÃO DE IL-6 POR MACRÓFAGOS.....	50
FIGURA 19: FAGOCITOSE DE ZIMOSAN POR NEUTRÓFILOS.	51
FIGURA 20: RETENÇÃO DE VERMELHO NEUTRO POR NEUTRÓFILOS.....	52
FIGURA 21: PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDOPOR NEUTRÓFILOS.	53
FIGURA 22: PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS MESENTÉRICOS.....	54
FIGURA 23: % DE LINFÓCITOS CD4 ⁺ DO LINFONODO MESENTÉRICO.....	55
FIGURA 24: % DE LINFÓCITOS CD8 ⁺ DO LINFONODO MESENTÉRICO.....	55
FIGURA 25: RAZÃO CD4 ⁺ /CD8 ⁺ DE LINFÓCITOS MESENTÉRICOS.....	56
FIGURA 26: CONCENTRAÇÃO DE TNF- α DE LINFÓCITOS MESENTÉRICOS.	57
FIGURA 27: CONCENTRAÇÃO DE IL-6 DE LINFÓCITOS MESENTÉRICOS	58
FIGURA 28: TRANSFORMAÇÕES METABÓLICAS DO ALA NO FÍGADO.....	62

LISTA TABELAS

TABELA 1: AÇÕES BIOLÓGICAS DOS EICOSANÓIDES.	10
TABELA 2: PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS: RAÇÃO, ÓLEO DE PEIXE E ORO INKA	26
TABELA 3: PERCENTUAL (%) DE MUDANÇA DE PESO.....	40
TABELA 4: PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS NO TECIDO TUMORAL.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – Ácido Araquidônico
AGE – Ácidos Graxos Essenciais
AGI – Ácidos Graxos Insaturados
AGMI – Ácido Graxo Monoinsaturado
AGPI – Ácido Graxo Poliinsaturado
AGS – Ácido Graxo Saturado
AL – Ácido Linoléico
ALA – Ácido α -Linolênico
AO – Ácido Oléico
AS – Ânion Superóxido - $O_2^{\cdot-}$
ATP – Adenosina Trifosfato
CD3 - Cluster de diferenciação 3
CD4+ – Cluster de diferenciação 4
CD8+ – Cluster de diferenciação 8
CEEA – Comitê de ética em experimentação animal
ConA – Concanavalina A
COX – Enzima Ciclooxigenase
COX-1 – Enzima Ciclooxigenase 1
COX-2 – Enzima Ciclooxigenase 2
DCNT – Doença Crônica não Transmissível
DHA – Ácido Docosahexaenóico
DNA – Ácido desoxirribonucléico
EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
EPA – Ácido Eicosapentaenóico
 H_2O_2 – Peróxido de Hidrogênio
HETE – Ácido hidroxieicosatetraenóico
HLA – Antígeno Leucocitário Humano
HPETE – Ácido hidroperoxieicosatetraenóico
HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência
IG – Imunoglobulinas
IL – Interleucina
IL-1 – Interleucina-1
IL-10 – Interleucina-10
IL-12 – Interleucina-12
IL-1 β – Interleucina-1 beta
IL-2 – Interleucina-2
IL-4 – Interleucina-4
IL-5 – Interleucina-5
IL-6 – Interleucina 6
INCA – Instituto Nacional do Câncer
INF- γ – Interferon gama
LHS – Lipase Sensível a Hormônio
LOX – Enzima Lipooxigenase
LPO – Peroxidação Lipídica

LPS – Lipopolissacarídeo
LT – Leucotrieno
LTB – Leucotrieno B
LTB₄ – Leucotrieno da série B4
LTB₅ – Leucotrieno da série B5
MHC - Complexo Principal de Histocompatibilidade
MHC I – Complexo de Histocompatibilidade principal tipo I
MHC II – Complexo de Histocompatibilidade principal tipo II
mRNA – Ácido Ribonucléico mensageiro
n-3 – Ácidos Graxos da Família Omega 3
n-6 – Ácidos Graxos da Família Omega 6
n-9 – Ácidos Graxos da Família Omega 9
NAD – nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzida
NADP – adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzida
NBT – Azul de Nitrotolueno
NFκB – Fator de Transcrição Nuclear κ B
NK – Linfócitos *natural killer*
NO – Óxido nítrico
OMS – Organização Mundial da Saúde
PBS – Solução tampão fosfato
PE – Ficoeritrina
PG – Prostaglandina
PGE₂ – Prostaglandina E2
PL – Fosfolipídios
PLC – Fosfolipase C
SCAC – Síndrome da Caquexia-Anorexia do Câncer
SDS – Dodecil sulfato de sódio
SFB – Soro fetal bovino
TAG – Triacilglicerol
TBS – Solução tampão tris
Th – Linfócitos T auxiliares ou *helper*
TLR – Receptor do tipo Toll
TNF-α – Fator de Necrose Tumoral Alfa
TPP – Trifenilfosfina
TX – Tromboxano
UCP – Proteína desacopladora da cadeia respiratória

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Ácidos Graxos	2
1.2. Metabolismo dos AGPI	5
1.3. Câncer	11
1.4. Sistema Imunitário e Câncer	15
1.5. Metabolismo do AGPI n-3 α -linolênico e câncer	21
2. OBJETIVOS	24
2.1 Geral	24
2.2 Específicos	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1. Animais	25
3.2. Protocolo Experimental	25
3.3. Obtenção e Transplante das Células do Tumor de Walker 256	27
3.4. Determinação da Massa Corpórea dos Animais e Peso dos Tecidos	27
3.5. Determinação Sanguínea	28
3.5.1. Glicemia	28
3.5.2. Triacilglicerolemia	28
3.6. Determinação do Perfil de Ácidos Graxos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (High Performance Liquid Chromatography – HPLC)	28
3.6.1. Extração lipídica	28
3.6.2. Saponificação dos extratos lipídicos	29
3.6.3. Derivatização dos ácidos graxos	29
3.6.4. Obtenção dos cromatogramas - HPLC	30
3.7. Proliferação de Células Tumorais “ex vivo”	30
3.8. Peroxidação Lipídica do Tecido Tumoral	31
3.9. Determinação da Quantificação Protéica para Peroxidação Lipídica	32
3.10. Parâmetros Imunitários de Macrófagos e Neutrófilos	32
3.10.1. Obtenção de Macrófagos	32
3.10.2. Obtenção de neutrófilos sanguíneos	33
3.10.3. Fagocitose	33
3.10.4. Retenção de vermelho neutro	34
3.10.5. Mensuração da produção de Ânion Superóxido	34
3.10.6. Adesão de macrófagos	35
3.11. Parâmetros Imunitários de Linfócitos	35
3.11.1. Obtenção dos linfócitos	35
3.11.2. Proliferação linfocitária	35
3.11.3. Marcadores de superfície	36
3.12. Determinação da Concentração de Citocinas	36
3.12.1. Plasma	36
3.12.2. Linfócitos e macrófagos	36
3.13. Determinação da Expressão Proteínas	37
3.13.1. Eletroforese em Sds – Page	37
3.13.2. “Western Blotting”	37
3.14. Análise Estatística	38

4. RESULTADOS.....	39
Parâmetros Tumorais.....	39
4.1. Massa Tumoral.....	39
4.2. Percentual (%) de Mudança de Peso.....	39
4.3. Perfil dos Ácidos Graxos do Tecido Tumoral.....	40
4.4. Expressão de COX-2.....	41
4.5. Proliferação de Células Tumorais “ <i>ex vivo</i> ”.....	42
4.6. Determinação de lipoperóxidos no tecido tumoral.....	43
Parâmetros Bioquímicos de Caquexia.....	43
4.7. Glicemia.....	43
4.8. Triacilglicerolemia.....	44
Citocinas Plasmáticas.....	45
4.9. TNF- α	45
4.10. IL-6.....	45
Parâmetros Imunitários.....	46
Macrófagos.....	46
4.11. Fagocitose.....	46
4.12. Retenção de vermelho neutro.....	47
4.13. Ânion superóxido (AS).....	48
4.14. TNF- α	48
4.15. IL-6.....	50
Neutrófilos.....	51
4.16. Fagocitose.....	51
4.17. Retenção de vermelho neutro.....	51
4.18. Ânion superóxido (AS).....	52
Linfócitos Mesentéricos.....	53
4.19. Proliferação de linfócitos.....	53
4.20. Quantificação de linfócitos CD4 ⁺ e CD8 ⁺ do linfonodo mesentérico.....	54
Concentração de citocinas por linfócitos mesentéricos cultivados.....	56
4.21. TNF- α	56
4.22. IL-6.....	58
6. DISCUSSÃO.....	59
7. CONCLUSÃO.....	80
REFERÊNCIAS.....	81
ANEXOS.....	92

1. INTRODUÇÃO

Fatores genéticos e fatores ambientais são importantes para determinar se um organismo será saudável ou doente. A alimentação é um fator ambiental e nos últimos 200 anos, alterações em nossa dieta foram estabelecidas, ocasionando significativa redução no consumo de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) n-3 e de vitaminas antioxidantes C e E, associado ao considerável aumento do consumo de gordura total, gordura saturada, gordura rica em AGPI n-6 e de ácidos graxos trans (Figura 1) (SIMOPOULOS, 1999; SIMOPOULOS, 2002). Desde então, foram relacionadas estas modificações, com o aumento da incidência de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) (FERGUSON, 2004).

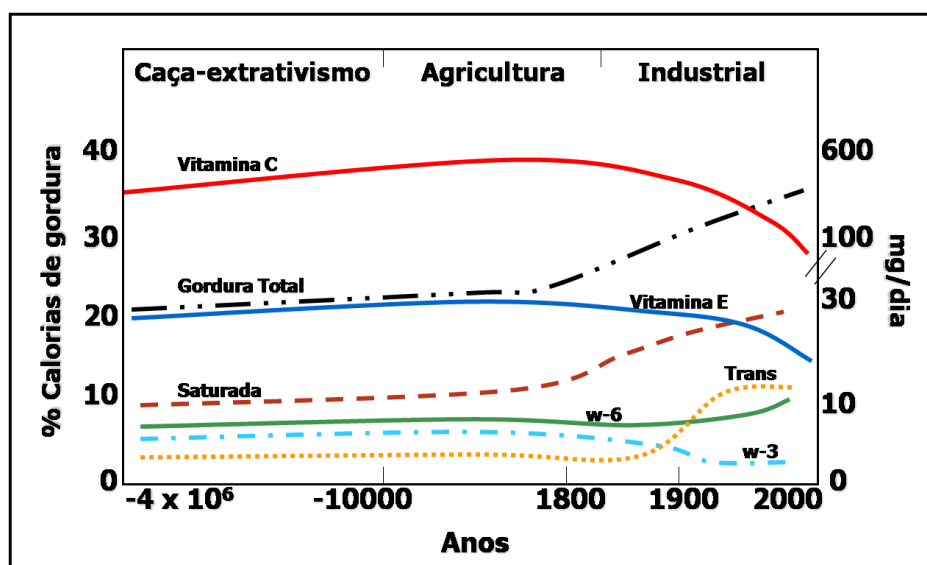


FIGURA 1: PERCENTUAL DE CALORIAS INGERIDAS A PARTIR DE GORDURAS, DESDE O HOMEM PALEOLÍTICO ATÉ O ANO 2000.

FONTE: SIMOPOULOS (1999).

O câncer é considerado uma DCNT e, estudos epidemiológicos indicam que, até um terço dos casos, podem estar relacionados com o estilo de vida e dieta inadequada (VALDÉS-RAMOS E BENÍTEZ-ARCINIEGA, 2007). Portanto a associação entre nutrição e câncer é bidirecional, uma vez que, nutrientes e componentes dos alimentos são capazes de induzir alterações mutagênicas ou, contrariamente, proteger contra fatores mutagênicos (VALDÉS-RAMOS E BENÍTEZ-ARCINIEGA, 2007),

O consumo de dieta adequada em energia; contendo menor quantidade de carnes vermelhas e alguns tipos de gordura, têm sido recomendadas como importante meio para a

redução do risco de câncer sendo que um dos nutrientes da dieta relacionados na promoção ou prevenção de câncer, é a quantidade gordura e o tipo de ácidos graxos presentes na dieta (PÉGORIER, MAY e GIRARD, 2004).

Os lipídeos da dieta contém diferentes composições de ácidos graxos, aqueles derivados de gorduras animais e certos óleos vegetais como soja, girassol e milho estão relacionados como aumenta do risco de câncer. Contrariamente, os ácidos graxos presentes no azeite de oliva, da linhaça e de óleos de peixes marinhos, estão associadas com a redução do risco de câncer (SAUER, BLASK e DAUCHY, 2007).

1.1. Ácidos Graxos

Os ácidos graxos são cadeias de hidrocarbonetos com um grupo carboxila na cabeça (δ) terminal e um grupo metila na cauda (n) final. O número de carbonos na cadeia e o tipo de ligação entre estes dará origem a diferentes tipos de ácidos graxos (HARDMAN, 2004).

A nomenclatura dos ácidos graxos refere-se ao número de átomos de carbono, quantidade e posição das duplas ligações em relação ao grupo metila. Existe uma ampla gama de comprimentos de cadeia, variando de ácidos graxos de 4 carbonos em lipídeos de produtos lácteos a ácidos graxos contendo 30 carbonos em alguns lipídios marinhos (RATNAYAKE e GALLI, 2009).

Os ácidos graxos saturados (AGS) contêm apenas simples ligação entre as ligações carbono-carbono. De acordo com o tamanho da cadeia carbônica os ácidos graxos podem ser classificados como: a) ácidos graxos de cadeia curta – contendo de 3 a 7 carbonos na cadeia, b) ácidos graxos de cadeia média – contendo de 8 a 13 carbonos na cadeia, c) ácidos graxos de cadeia longa – contendo de 14 a 20 carbonos na cadeia e d) ácidos graxos de cadeia muito longa – contendo acima de 21 carbonos na cadeia (RATNAYAKE e GALLI, 2009).

Os ácidos graxos contendo uma (1) ou mais ligações duplas na cadeia são chamados de ácidos graxos insaturados (AGI). Quando o ácido graxo que contém 1 dupla ligação é chamado de ácido graxo monoinsaturado (AGMI) e se apresentarem duas (2) ou mais duplas ligações é chamado de Ácido Graxo Poliinsaturado (AGPI) (YAQOOB, 2004; RATNAYAKE e GALLI, 2009).

Na nomenclatura, o termo “n” (em minúsculo) refere-se à posição da primeira dupla ligação do ácido graxo relativa ao grupo metila da molécula de hidrocarboneto (CHILTON,

RUDEL, *et al.*, 2008). Em quase todos os ácidos graxos insaturados que ocorrem naturalmente, as duplas ligações estão na configuração *cis* e normalmente são posicionados no n-3, n-6 ou n-9 em relação ao átomo de carbono do grupo metila (RATNAYAKE e GALLI, 2009).

Em mamíferos, incluindo seres humanos, ácidos graxos saturados e monoinsaturados podem ser obtidos pela dieta ou, podem ser sintetizados pela síntese “de novo” de ácido graxo. Pela dessaturação dos ácidos graxos saturados podem ser sintetizados à ácidos graxos monoinsaturados n-9. Essa conversão é realizada pela $\Delta 9$ desaturase, que é uma enzima muito ativa em tecidos de mamíferos, que introduz uma dupla ligação entre a posição (n) 9 – 10 cadeia de ácidos graxos (RATNAYAKE e GALLI, 2009). O ácido oléico (AO) (18: 1n-9) é o principal produto da dessaturação de AGS, e também é fornecido ao organismo pela dieta principalmente pela ingestão de azeite de oliva (RATNAYAKE e GALLI, 2009), assim, estes ácidos graxos sintetizados pelo organismo são considerados ácidos graxos não essenciais.

Os mamíferos não conseguem sintetizar ácidos graxos com a dupla ligação no carbono (n) 6 ou 3, por esta razão os ácidos graxos n-6 e n-3, são considerados ácidos graxos essenciais (AGE) e devem ser obtidos na dieta (YAQOUB, 2004; HARDMAN, 2004; SIMOPOULOS, 2006; YAQOUB e CALDER, 2007).

Os AGPI n-6, a primeira dupla ligação do ácido graxo está presente no 6° carbono a partir do carbono terminal. Este é consumido na dieta principalmente como ácido graxo linoléico (AL) (18:2 n-6), presentes em óleos vegetais (milho, soja e girassol), também alguma quantidade de outro AGPI n-6 derivado do AL, o Ácido Araquidônico (AA) (20:4 n-6) pode ser obtida a partir de carnes (HARDMAN, 2004).

Para os AGPI n-3 a primeira ligação dupla é no 3° átomo de carbono a partir do carbono (n) terminal (Hardman, 2004). O parental (precursor) dos ácidos graxos da família n-3 é o ácido graxo α -linolênico (ALA) (18:3 n-3), que está presente nos vegetais verdes folhosos e em diferentes quantidades nos óleos de soja (8%), canola (11%), linhaça (57%) (HARDMAN, 2004; McCUSKER e GRANT-KELS, 2010) e Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis L.*) (45%) (HAMAKER, VALLES, *et al.*, 1992). Ácidos graxos n-3 de cadeia maior, principalmente o ácido graxo eicosapentaenóico (EPA) (20:5 n-3) e ácido graxo docosahexaenóico (DHA) (22:6 n-3), são encontrados em peixes marinhos de águas geladas como a cavala, o salmão, sardinha, arenque, dourado; truta arco íris e os seus óleos que

contêm aproximadamente 60% de EPA e DHA (YAQOUB, 2004; HARDMAN, 2004; McCUSKER e GRANT-KELS, 2010). Desta forma, o parental (precursor) de todos os ácidos graxos n-6 é o ácido graxo linoléico (AL) e o ácido graxo α -linolênico (ALA) é o parental de todos os ácidos graxos n-3 (STOLL, 2002; BURDGE, 2006; McCUSKER e GRANT-KELS, 2010).

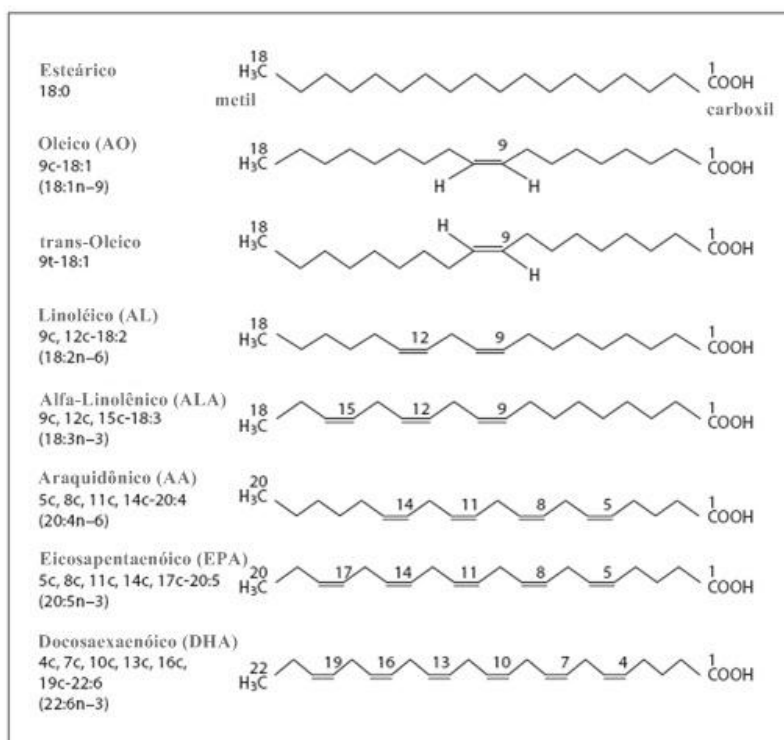


FIGURA 2: ESTRUTURA DE ÁCIDOS GRAXOS COMUNS NA DIETA.
FONTE: RATNAYAKE, GALLI (2009).

Estas diferenças entre os ácidos graxos, conferem diferentes ações no metabolismo destes lipídeos no organismo e no câncer. No desenvolvimento e crescimento de tumores, os ácidos graxos saturados (AGS) exercem fraco efeito e ácidos graxos monoinsaturados não apresentam efeito. Ácidos graxos poliinsaturados n-6 como o Ácido Linoléico (AL) estão relacionados com promoção do crescimento tumoral, já por outro lado, os ácidos graxos poliinsaturados n-3 atenuam o crescimento de tumores (SAUER, BLASK e DAUCHY, 2007).

Talvés uma explicação para este fato seja o metabolismo dos ácidos graxos e seu metabólitos (eicosanóides), são a chave de mediadores inflamatórios implicados no câncer (BARACOS, 2006), apresentam atividades biológicas que modulam a proliferação e o crescimento celular, diferenciação, inflamação, imunidade, agregação plaquetária e

angiogênese (BERQUIN, EDWARDS e CHEN, 2008), já que todos estes eventos biológicos são responsáveis pelo processo de iniciação, promoção e progressão de tumores (FORMAN, HURSTING, *et al.*, 2004).

1.2. Metabolismo dos AGPI

Os ácidos graxos essenciais (AGE) n-3 e n-6 são metabolicamente e funcionalmente distintos, apresentam importantes funções fisiológicas e seus metabólitos são importantes para o ótimo desenvolvimento do cérebro, células sanguíneas e da pele. Seu metabólitos quando incorporados nos fosfolipídios das membranas plasmáticas desempenham função estrutural nas células em especial nas altamente especializadas, como terminais sinápticos, células da retina e miócitos cardíacos, contêm concentrações elevadas de ácido araquidônico (AA 20: 4n-6) e ácido docosahexaenóico (DHA 22: 6n-3) (RATNAYAKE e GALLI, 2009).

Podem ser utilizados com fonte energética para o organismo, mas em especial papel no metabolismo é a na sua conversão para eicosanóides (LARSSON, KUMLIN, *et al.*, 2004; YAQOOB e CALDER, 2007).

No metabismo, o AL e ALA não podem ser interconvertidos, mas pequena quantidade da ingestão pode ser alongado e dessaturado para formar outros ácidos graxos da mesma série, respectivamente, em AA ou EPA e DHA (CHILTON, RUDEL, *et al.*, 2008) ocorrendo isto principalmente no retículo endoplasmático das células do fígado e de leucócitos (SIMOPOULOS, 2003; SIMOPOULOS, 2006; BERQUIN, EDWARDS e CHEN, 2008).

Para esta conversão, a via precisa da $\Delta 6$ e $\Delta 5$ dessaturases do sistema microssomal e um passo envolvendo a β -oxidação dos peroxissomos para ação da enzima Alongase. O primeiro passo envolve a inserção de uma dupla ligação na posição $\Delta 6$ do AL e/ou ALA pela ação de $\Delta 6$ dessaturase, que é o passo limitante desta via. A seguir, ocorre o alongamento da cadeia por 2 unidades de carbono pela alongase e uma inserção de outra ligação dupla na posição $\Delta 5$ pela $\Delta 5$ dessaturase para formar AA (20: 4n-6) ou EPA (20: 5n- 3) (CHILTON, RUDEL, *et al.*, 2008).

AA é o produto predominante da via do ácido graxo n-6 e um dos principais constituintes dos lipídios estruturais na maioria dos tecidos (cérebro, fígado, coração). Por sua baixa quantidade fornecida na dieta e pela necessidade de altas concentrações requeridas para

os tecidos e metabolismo, a maioria do AA é produzido através da conversão do AL (RATNAYAKE e GALLI, 2009).

Ácido α -linolênico é convertido para EPA, alongado e dessaturado para DHA, sendo esta conversão não muito eficiente e, dependente da quantidade de ALA e AL na dieta (DAMSGAARD, FRØKIÆR e LAURITZEN, 2008). A quantificação da conversão de ALA para EPA não pode ser caracterizado pois depende do consumo total de gorduras ALA, EPA, DHA e AL. (LARSSON, KUMLIN, *et al.*, 2004). ALA é convertido em parte, apenas 5% a 10% para EPA e 2 a 5% para DHA (ALBERT, OH, *et al.*, 2005; ANDERSON e MA, 2009; BRENNAN, SALEM J. R., SINCLAIR, & CUNNANE, 2009; McCUSKER e GRANT-KELS, 2010).

Para a formação do DHA (22: 6n-3), o EPA passa por dois processos de alongação aumentado em 2 unidades de carbono formando 24: 5n-3, uma dessaturação pela mesma $\Delta 6$ desaturase formando 24: 6n-3 e então há um encurtamento de cadeia através da retirada de duas unidades de carbono por um ciclo da via da β -oxidação no peroxissomo (BARCELÓ-COBLIJN e MURPHY, 2009).

Na dieta ocidental a quantidade de AGPI é superior a 12% do total do consumo de energia, sendo que o AGPI n-6 em especial o ácido linoléico (AL – 18:2 n-6) constitui aproximadamente 80 a 95% destes AGPIs (DAMSGAARD, FRØKIÆR e LAURITZEN, 2008). O principal AGPI n-3 é o ALA e a média per capita de consumo é ~ 1,4g por dia, já o consumo de EPA e DHA juntos são de ~0,1-0,2 g por dia (ANDERSON e MA, 2009), assim, a ingestão de ácido linoléico é muito maior (5 a 20 vezes) do que o de ácido α -linolênico (YAQOOB e CALDER, 2007).

De acordo com a FAO/WHO a recomendação da quantidade relativa de AL e ALA na dieta devem ser entre 5:2 e 10:1 para a manutenção das concentrações corporais adequadas destes ácidos graxos e seus outros metabólitos (FAO/WHO, 1994) pois afinidade da $\Delta 6$ desaturase é maior para ALA do que para AL (SIMOPOULOS, 2003; RATNAYAKE e GALLI, 2009). ALA parece ser um supressor muito mais forte da dessaturação e alongação de ácido graxos n-6, do que AL é para a dessaturação e alongação de ácidos graxos n-3 e 10 vezes mais AL é requerido para ter um efeito igual sobre o metabolismo de n-3 como o ALA faz para o alongamento de AL (BARCELÓ-COBLIJN e MURPHY, 2009).

Na típica dieta dos países industrializados o consumo de AL é cerca de 10 vezes superior ao de ALA e, este consumo de AL pode estar muito acima do que o necessário para prevenir a deficiência de ácidos graxos essenciais. Drástica redução no consumo de AL se justifica em países ocidentais, que resultaria em maior conversão do ALA à EPA e DHA (LANDS, 2006).

Diversos estudos realizaram mudanças dietéticas para alterar as concentrações deste AGPI no organismo. O aumento na síntese de EPA foi obtido através da redução do AL na dieta de 7% para 3% de total de energia, enquanto que aumento na síntese de DHA foi conseguido pelo aumento da quantidade de ALA dietético de 0,3% para 1,1% (SINCLAIR, ATTAR-BASHI E LI 2002). Assim, redução de AL na dieta, juntamente com aumento na ingestão de ALA seria a forma mais adequada para se melhorar a síntese de EPA e DHA (GOYENS, SPILKER, *et al.*, 2006).

Relatou-se que o consumo de AL quando mantido constante em 15 g/dia, o percentual total da conversão de ALA para EPA e DHA é 11 a 18,5%, mas quando o consumo de AL é aumentado da faixa de 15 a 30 g/d, esta conversão é reduzida para 5 – 11%. Também foi verificado que a atividade da $\Delta 5$ e $\Delta 6$ -dessaturase está consideravelmente menor em ratos alimentados com dieta rica em EPA e DHA, que naqueles alimentados com dieta com óleo de linhaça (rico em ALA) (LARSSON, KUMLIN, *et al.*, 2004).

Dietas com baixa quantidade de gordura resultam no aumento da atividade da $\Delta 5$ - e $\Delta 6$ -dessaturase, o qual pode aumentar a conversão do ALA para EPA, assim com uma baixa ingestão AL e uma alta ingestão de ácidos graxos n-3 parece ser necessária para suprimir a produção de eicosanóides derivados do AA (LARSSON, KUMLIN, *et al.*, 2004).

Os eicosanóides são hormônios lipídicos de vida curta e biologicamente potentes os quais modulam a resposta inflamatória e imunológica, crescimento celular e diferenciação celular, a sua produção de começa com a liberação destes AGPIs dos fosfolipídios da membrana plasmática pela ação de várias fosfolipases que servem de substrato para as enzimas ciclooxigenase (COX) (-1, -2), lipooxigenase (LOX) (5-, 12- e 15-) ou citocromo P450 mono oxigenase. (LARSSON, KUMLIN, *et al.*, 2004; GALLI e CALDER, 2009).

Existem duas importantes isoformas da COX (COX-1 e COX-2) para a conversão dos AGPI em eicosanóides. Ambas estão presentes em muitos tecidos humanos normais e são alteradas em várias condições patológicas. A COX-1 é constitutiva e está envolvida na

produção basal de eicosanóides em condições fisiológicas, ao passo que a COX-2 é induzida e super-expressa na inflamação. COX-2 é responsável pela produção significativamente maior de PGs (ZIDAR, ODAR, *et al.*, 2009).

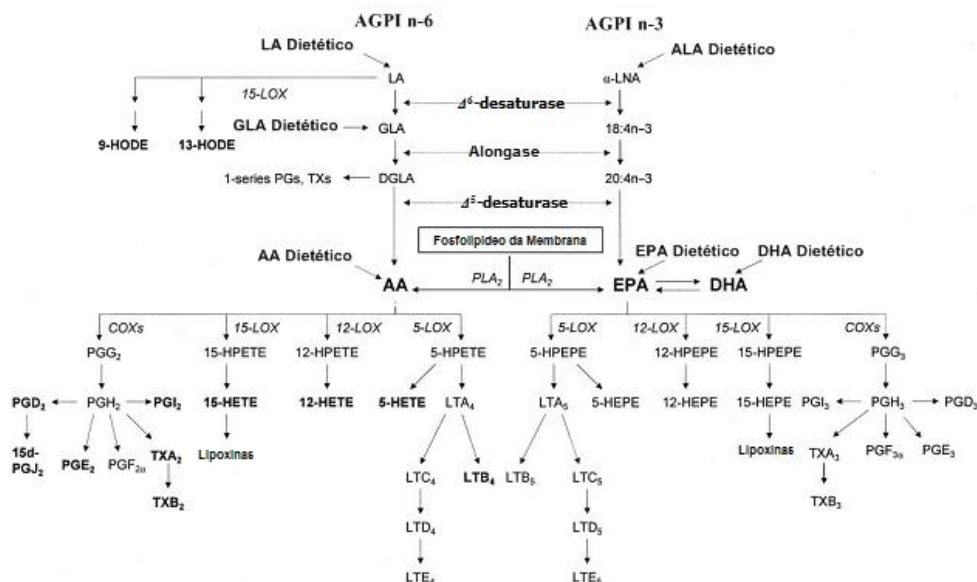


FIGURA 3: RESUMO DO METABOLISMO DE ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS (AGPI) N-6 E N-3 EM EICOSANÓIDES ENVOLVIDOS NA INFLAMAÇÃO E CARCINOGENESE. LA - ÁCIDO LINOLÉICO (18:2 N-6); ALA - ÁCIDO α -LINOLÊNICO (18:3 N-3); GLA - ÁCIDO γ -LINOLÊNICO (18:3 N-6); DGLA - ÁCIDO DIHOMO- γ -LINOLÊNICO (20:03 N-6); AA - ÁCIDO ARAQUIDÔNICO (20:4 N-6); EPA - ÁCIDO EICOSAPENTAENÓICO (20:5 N-3); DHA - ÁCIDO DOCOSAHEXAENÓICO (22: 6N-3); PLA2 - FOSFOLIPASE A2; LOX - LIPOXIGENASE; COX - CICLOOXIGENASE; 5, 12, 15-HETE - 5, 12, 15 ÁCIDO (S)-HIDROXIEICOSATETRAENÓICO; LT - LEUCOTRIENOS; HEPE - ÁCIDO HIDROXIEICOSAPENTAENÓICO; HPETE - ÁCIDO HIDROPEROXIEICOSAPENTAENÓICO; TX - TROMBOXANO; HPEPE - ÁCIDO HIDROPEROXIEICOSAPENTAENÓICO; PG - PROSTAGLANDINA. FONTE: LARSSON, *et al.* (2004)

A COX e a LOX têm como substratos ácidos graxos n-6 o AA e o ácido graxo n-3 o EPA e DHA que são metabolizados a eicosanóides e estão associados à resposta inflamatória induzida por vários tipos de estímulos como; citocinas, promotores tumorais e fatores de crescimento (Figura 3) e cada ácido graxo produzirá diferentes tipos de eicosanóides com diferentes respostas metabólicas (MUND, R.C. 2004).

O metabolismo do AA, pela ação da COX resulta na formação de prostaglandinas e tromboxanos da série 2 e pela ação da LOX a formação de leucotrienos da série 4. Estes apresentam funções metabólicas na regulação da inflamação, imunidade, migração celular e plaquetária, pressão arterial e na função na musculatura e vasos de tecidos liso, com ação pró-inflamatória que incluem febre e eritema, aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação, causando dor e edema, formação de trombos, ateroma e aumento da

proliferação celular (crescimento tumoral) (JHO, COLE, *et al.*, 2004; HARDMAN, 2004; PIZATO, 2005; SIMOPOULOS, 2006; GALLI e CALDER, 2009).

A principal prostaglandina (PG) sintetizada por ação da COX derivada do ácido graxo n-6 (AL) é a PGE₂, a qual é importante para um grande número de processos fisiológicos em uma ampla variedade de tecidos. Sua ação inclui modulação da resposta imunitária, promoção da proliferação celular, angiogênese, inflamação, inchaço, dor e febre. Sugere-se então uma ligação entre a enzima COX e desenvolvimento do câncer. Os efeitos pró-tumorais de COX-2 são amplamente atribuídos ao seu papel na produção de PGE₂, (GREENHOUGH, SMARTT, *et al.*, 2009).

O EPA, quando metabolizado pela COX, resulta na síntese de prostaglandinas e tromboxanos da série 3 e pela LOX produzem leucotrienos da série 5, os quais tem menores efeitos biológicos quando comparados aos derivados da família n-6. LTB₅ é dez vezes menos ativo em sua resposta comparado com o LTB₄ como agente quimiotático para neutrófilos e a PGE₃ tem atividade pró-inflamatória menor do que a PGE₂ (PIZATO, 2005; WEAVER, IVESTER, *et al.*, 2009; GALLI e CALDER, 2009).

Os docosanóides, produtos do metabolismo do DHA pela ação da COX-2 e LOX, entre eles as resolvinas e protectinas tem potente efeito anti-inflamatório e imunorregulatório (BERQUIN, EDWARDS e CHEN, 2008; SINGER, SHAPIRO, *et al.*, 2008; WEAVER, IVESTER, *et al.*, 2009), atenuam a ativação do Fator de Transcrição Nuclear κ B (NF κ B) e são sintetizados em animais com dieta suficiente em ácidos graxos α -linolênico (SINGER, SHAPIRO, *et al.*, 2008).

Desta forma os componentes da dieta que desempenham papel como potentes agentes anti-inflamatórios são os ácidos graxos n-3. A Supressão da produção de AA pelos ácidos graxos n-3 suprime a produção de eicosanóides derivados do AA (HARDMAN, 2004).

Eicosanóides derivados dos AG n-6 e n-3 apresentam efeitos opostos no crescimento de células cancerosas, invasão, angiogênese e na modulação do sistema imunitário através da inflamação (Tabela 1). Evidências crescentes sugerem que a inflamação pode desempenhar um papel crítico no desenvolvimento do câncer humano (SIMOPOULOS, 2006; BERQUIN, EDWARDS e CHEN, 2008).

TABELA 1: AÇÕES BIOLÓGICAS DOS EICOSANÓIDES DERIVADOS DO AA, DOS EICOSANÓIDES DERIVADOS DO EPA E DOCOSANÓIDES DERIVADOS DO DHA.

Ações biológicas dos eicosanóides derivados do AA	
Eicosanóides	Ação fisiológica
PGE ₂	pró-inflamatória e pró-agregante, supressor da resposta imune, promove o crescimento celular, proliferação celular, vasodilatação, bronco-constricção, leve anti-inflamatórios (inibe a 5-LOX e assim diminui LTs inflamatórios da série 4, induz LOX-15 que promove a formação de anti-lipoxinas inflamatórias)
PGI ₂	Anti-inflamatório, inibe agregação plaquetária e potente vasodilatador
TXA ₂	Potente agregador plaquetário e potente vasoconstritor
PGD ₂	inibe a agregação plaquetária, vasodilatação, promoção do sono
PGF _{2α}	induz a contração do músculo liso, contração uterina
LTB ₄	pró-inflamatória, a causa da agregação de neutrófilos, e quimiotaxia de neutrófilos e eosinófilos
LTC ₄	pró-inflamatória, promover a permeabilidade das células endoteliais, contração de células musculares lisas, constricção das vias aéreas periféricas
LTD ₄	contração de células musculares lisas, constricção das vias aéreas periféricas
12-HETE	quimiotaxia de neutrófilos, estimula a secreção de insulina glicose-induzida
15-HETE	inibe a 5- e 12-LOX
Lipoxina A	geração de ânion superóxido, quimiotaxia
Lipoxina B	inibe a atividade das células NK
Ações fisiológicas dos eicosanóides derivados do EPA e docosanóides derivados do DHA	
PGE ₃	Leve anti-agregatório e vasodilatação
PGI ₃	Leve anti-agregatório
TXA ₃	Leve pró-agregatório
EPA resolvina E1	Potente anti-inflamatório
DHA resolvina D	Potente anti-inflamatório
DHA protectina D1	Potente anti-inflamatório

FONTE: RATNAYAKE, GALLI (2009).

A via da lipoxigenase 5 está envolvida na carcinogênese e na progressão de diversos tipos de tumores como os de pulmão, cólon, próstata, rim e bexiga. A COX-2 é enzima chave no metabolismo dos ácidos graxos e inflamação e o aumento da inflamação crônica é um dos fatores que levam a esses tipos de câncer (SIMOPOULOS, 2010). Os eicosanóides derivados do AA e EPA e os Docosanóides derivados do DHA estão envolvidos em uma variedade de ações fisiológicas, incluindo a modulação da inflamação, agregação plaquetária, resposta imunológica, crescimento celular e proliferação, contração das células musculares lisas.

Eicosanóides são produzidos quando as células são estimuladas e estes são rapidamente metabolizados, portanto, não são acumulados nas células. O desequilíbrio na síntese de eicosanóides nos tecidos pode levar ao desenvolvimento de certas condições patológicas como o câncer (BERQUIN, EDWARDS E CHEN, 2008; SIMOPOULOS, 2010).

1.3. Câncer

O termo *câncer* é utilizado genericamente para representar um conjunto de mais de 100 doenças, incluindo tumores malignos de diferentes localizações. As mutações e as conseqüentes mudanças na morfologia das células ocorrem durante toda a vida de um indivíduo. O câncer se desenvolve quando uma célula acumula mutações em genes relacionados com a multiplicação celular e sobrevivência (BRASIL, 2009).

Célula cancerosa é aquela que mudou sua morfologia, bem como sua função, e em particular perdeu sua capacidade em controlar seu próprio crescimento, seja por apoptose ou diminuindo a sua taxa de proliferação. Células cancerosas se multiplicam a uma velocidade acima do normal do que as células “normais”, aumentando assim a probabilidade de novas mutações, e algumas destas células alteradas podem migrar para outros tecidos, causando metástases e o crescimento do tumor em um tecido diferente de sua origem (VALDÉS-RAMOS e BENÍTEZ-ARCINIEGA, 2007).

A variação geográfica na incidência do câncer e as taxas de mortalidade são decorrentes do estilo de vida e fatores ambientais, incluindo a dieta. Dieta e outros fatores de estilo de vida substancialmente influenciam o risco de câncer e sugere-se que fatores dietéticos podem contribuir para estimativa de um terço de todas as mortes por câncer. Assim, estudos têm sido feitos para investigar os benefícios dos nutrientes e outros fatores dietéticos na prevenção do câncer (MARTÍNEZ, MARSHALL e GIOVANNUCCI, 2008).

O câncer é também uma doença relacionada à idade e há uma relação entre o aumento da expectativa de vida na maioria dos países, o contínuo crescimento populacional e o seu envelhecimento, o qual afetará de forma significativa o impacto do câncer no mundo (BRASIL, 2009).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) prevê que em 2030, 12 milhões de todas as mortes no mundo serão devido ao câncer e que pelo menos 30-40% destas mortes são

preveníveis (BODE e DONG, 2009).. O impacto global do câncer mais que dobrou em 30 anos. Em 2008, a IARC/OMS relatou que ocorreram 12,4 milhões de casos novos e 7,6 milhões de óbitos por câncer no mundo. Em 2010 no Brasil, foram estimados 236.240 casos novos para o sexo masculino e 253.030 para sexo feminino. O câncer de pele do tipo não melanoma (114 mil casos novos) foi o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (52 mil), mama feminina (49 mil), cólon e reto (28 mil), pulmão (28 mil), estômago (21 mil) e colo do útero (18 mil) (Figura 4) (BRASIL, 2009).

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa de Casos Novos		
	Masculino	Feminino	Total
Próstata	52.350	-	52.350
Mama Feminina	-	49.240	49.240
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.800	9.830	27.630
Cólon e Reto	13.310	14.800	28.110
Estômago	13.820	7.680	21.500
Colo do Útero	-	18.430	18.430
Cavidade Oral	10.330	3.790	14.120
Esôfago	7.890	2.740	10.630
Leucemias	5.240	4.340	9.580
Pele Melanoma	2.960	2.970	5.930
Outras Localizações	59.130	78.770	137.900
Subtotal	182.830	192.590	375.420
Pele não Melanoma	53.410	60.440	113.850
Todas as Neoplasias	236.240	253.030	489.270

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10
Fonte: Instituto Nacional de Câncer - INCA/MS

FIGURA 4: ESTIMATIVAS PARA O ANO 2010 DE NÚMERO DE CASOS NOVOS POR CÂNCER, EM HOMENS E MULHERES, SEGUNDO LOCALIZAÇÃO PRIMÁRIA. FONTE: INCA (2009).

O câncer é a segunda principal causa de morte no Brasil (BRASIL, 2009) e nos Estados Unidos e está aumentando em prevalência devido ao envelhecimento e ao número limitado de estratégias de prevenção bem sucedida. Os tratamentos clássicos do câncer apresentam altos custos para os governos visto que a incidência desta aumentou de forma impactante e, desta forma despesas com saúde aumentaram inexoravelmente. No atual ritmo de crescimento, prevê-se que 20% do produto nacional bruto será gasto com despesas relacionadas com a saúde na próxima década. Embora o câncer seja responsável por apenas 5% do orçamento da saúde, o seu custo é crescente e pode ser visto como paradigmático quando se encara o problema da equidade nos cuidados de saúde (SCHNIPPER, MEROPOL e BROCK, 2010).

A importância da prevenção do câncer já era postulada pelo médico romano Galeno em 168 AC que observou a associação de dieta pouco saudável com câncer (BODE e DONG,

2009). Associações positivas entre fatores ambientais e comportamentais têm sido relatadas para o aumento do risco de câncer pelo menos nos últimos 200 anos. Desta forma a prevenção através das mudanças das atitudes relacionadas aos fatores ambientais são formas de evitar o aumento da incidência e de gastos com o tratamento.

Diversos estudos epidemiológicos revelaram que 30-40% da incidência de neoplasias no mundo podem ser atribuídas à dieta (POPKIN, 2007) conjuntamente às busca de hábitos de vida saudável como redução do consumo do álcool e do tabaco, da manutenção de peso corpóreo para nível desejável e do aumento da prática de esporte regularmente (KONTOU, PSALTOPOULOU, *et al.*, 2011).

O comprometimento na vida do portador de câncer é fator importante a se observado porque, aproximadamente 50% dos pacientes que apresentam o diagnóstico de câncer, sofreram de progressiva perda de tecido muscular esquelético e adiposo, resultando em perda de peso. Esta complicação presente nos portadores de tumor, aliada a anorexia, é responsável por um quadro presente no câncer conhecido como Síndrome da Caquexia-Anorexia do Câncer (SCAC), a qual contribui de forma efetiva na qualidade de vida e tempo de sobrevivência do indivíduo (JHO, COLE, *et al.*, 2004; BARACOS, 2006; TISDALE, 2009). Esta síndrome é complexa envolvendo múltiplas interações com os componentes do tumor e as defesas de hospedeiro contra a doença metastática (MAZZOTTA e JENEY, 2008).

Na SCAC, o quadro da caquexia (Grego - *Kakos* – mau, ruim e *hexis* – condição do corpo) é responsável relponsável pela perda de peso corpóreo (MORLEY, THOMAS e WILSON, 2006) e caracterizada por progressiva depleção das reservas de tecido adiposo e muscular (JHO, COLE, *et al.*, 2004; BONGAERTS, HALTEREN e VERHAGEN, 2006). A anorexia é a redução da ingestão de alimentos (MAZZOTTA e JENEY, 2008). É o sintoma mais frequentemente reportado e relacionado ao câncer. A regulação da saciedade é resultado da síntese de fatores orexígenos e anorexígenos, compreendendo sinais metabólicos periféricos para o cérebro (leptina, insulina, peptídeo YY, grelina citocinas e mediadores lipídicos) e sinalização de sensores metabólicos no tronco cerebral e hipotálamo (neuropeptídeo Y, serotonina e peptídeo melanocortina) a influência de fatores anorexígenos tais como serotonina e hormônio estimulante α -melanócito são dominantes, enquanto a ação contrária, orexígena do neuropeptídeo Y é reduzida (BARACOS, 2006; STEPHENS e FEARON, 2007).

Mudanças na composição corporal diferem em indivíduos com caquexia ou anorexia. Na caquexia o gasto energético de repouso é normal ou aumentado sendo que gordura e músculo são perdidos em paralelo e na anorexia o gasto energético de repouso é baixo, a massa de gordura é preferencialmente perdida primeiramente e, enquanto, a perda de músculo é apenas observada nos estágios terminais da perda de peso (RYDÉN e ARNER, 2007).

No caso da desnutrição, a caquexia ocorre por privação alimentar e causa inicialmente a redução do tecido adiposo. A caquexia do câncer causa tanto a perda de tecido adiposo como massa muscular (MORLEY, THOMAS e WILSON, 2006). A diferença fundamental observada na caquexia do câncer e a que está presente na desnutrição, é a irreversibilidade da perda de peso com a alimentação no câncer, pois isto parece ser devido a mudanças metabólicas da caquexia semelhantes aos observados após a cirurgia, trauma ou sepse e conduzido por mediadores similar (BARBER, 2001).

Diversos mecanismos estão envolvidos na mediação da síndrome da caquexia-anorexia no câncer; alterando e/ou reduzindo o apetite, aumentando as necessidades energéticas levando a perda de peso e alterando as resposta do sistema imunológico que em conjunto reduzem a qualidade de vida e a sobrevivência do portador de tumor.

A condição pró-catabólica do portador de tumor é aumentada pela alteração no perfil metabólico com hipóxia no tumor, aumento da captação de glicose, da glicólise e produção de lactato (FERNANDES, RAZI, *et al.*, 1999). O tumor consome grande quantidade de glicose pela glicólise anaeróbica sendo que 1 mol de glicose produz 2 moles de Adenosina Trifosfato (ATP) e 2 moles de lactato. Na resíntese do lactato em glicose pelo ciclo de Corí no fígado gasta 6 moles de ATP para produzir 1 mol de glicose (gliconeogênese), aumentando da demanda energética para esta conversão (BONGAERTS, HALTEREN e VERHAGEN, 2006).

No câncer, o sistema imunitário colabora para um estado inflamatório crônico o qual é responsável pelas mudanças no eixo hipotálamo-hipófise, disautonomia, hipermetabolismo, estresse oxidativo, diminuição da síntese protéica muscular e aumento da proteólise muscular mediada pelo sistema ubiquitina proteassomo, juntamente com outras alterações metabólicas, tais como a resistência à insulina nos tecidos periféricos(FERNANDES, RAZI, *et al.*, 1999, levando a caquexia e anorexia aumentando a morbidade e mortalidade do portador de tumor BARACOS, 2006).

1.4. Sistema Imunitário e Câncer

O sistema imunitário protege o hospedeiro de agentes infecciosos, permite a tolerância à auto-antígenos e agentes ambientais não ameaçadores (proteínas alimentares e bactérias intestinais). É dividido em; sistema imunitário inato e o sistema imunitário adaptativo (adquirido). Ambos os sistemas envolvem vários fatores do sangue e células que se originam na medula óssea encontrados circulando na corrente sanguínea, dispersos nos tecidos e organizados em órgãos linfóides como o timo, baço, linfonodos e tecido linfóide associado ao intestino (CALDER, 2007).

A imunidade inata é a primeira linha de defesa e está presente antes da exposição à patógenos. Sua função é de impedir a entrada de agentes infecciosos no organismo para eliminá-los se eles entrarem. Consiste de barreiras físicas (pele), fatores solúveis (sistema complementar). As células fagocíticas, são os principais efetores da imunidade inata que incluem granulócitos (neutrófilos, basófilos e eosinófilos), monócitos, macrófagos e células natural killer. A imunidade inata não tem memória e não é influenciada pela exposição prévia à agente infeccioso (NUNES, 2009).

A imunidade inata atua de forma central, sendo a principal característica a destruição direta do patógeno através das proteínas do sistema complemento e por produtos tóxicos liberados pelas células, através do processo de fagocitose. Este reconhecimento dos patógenos pelos fagócitos causa a geração de diversas substâncias mediadores da resposta imunológica (prostaglandinas e citocinas) que resultam na resposta inflamatória, promovendo acúmulo de fagócitos no local da infecção e objetivando conter a propagação do agente infeccioso (CALDER e KEW, 2002; PEQUITO, 2009)

Macrófagos são as primeiras células a encontrar os patógenos nos tecidos. Eles são provenientes de células tronco progenitoras localizados na medula óssea, pertencentes à linhagem mielóide e são a forma madura dos monócitos circulantes nos tecidos onde são encontrados em grande número ou em associação com o trato gastrointestinal, pulmão, fígado e baço (JANEWAY, TRAVERS, *et al.*, 2007)

Desta forma, os macrófagos por serem os primeiros a encontrar o patógeno, rapidamente recrutam outro tipo de fagócito, os neutrófilos. Estas células representam a segunda maior família de fagócitos e são também denominados leucócitos neutrofilicos polimorfonucleares. Os neutrófilos apresentam meia-vida curta, e são abundantes no sangue,

mas não estão presentes em tecidos de indivíduos saudáveis (JANEWAY *et al.*, 2007; PEQUITO, 2009).

Fagocitose é um processo complexo realizado por macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, após ligação aos receptores fagocíticos que estão na superfície dessas células com antígenos ou opsoninas, desencadeando vias de sinalização que resultam em morte do patógeno ou processamento para sua apresentação a outras células (NIEDERGANG; CHAVRIER, 2004).

Células fagocíticas expressam receptores de superfície específica para as características gerais dos antígenos bacterianos. Eles reconhecem estruturas padrões conservadas nos patógenos, e podem assim, discriminar o próprio do não-próprio. Dentre estes receptores incluem-se aqueles que reconhecem determinadas moléculas de açúcar presentes na superfície dos patógenos, como o receptor de manose, que quando ativadas estas células são capazes de promover diretamente a fagocitose (GENNERY e CANT, 2006; JANEWAY, TRAVERS, *et al.*, 2007).

A ligação do antígeno aos receptores celulares desencadeia fagocitose, liberação de proteínas citotóxicas e posterior destruição dos microorganismos patogênicos pelo sistema complemento ou por produtos químicos tóxicos, como os radicais superóxido e peróxido de hidrogênio (CALDER, 2007).

A destruição do patógeno não depende somente do seu englobamento, mas sim da formação de vesícula intracelular, denominado fagossoma e, posteriormente de sua maturação. Após a ativação dos receptores fagocíticos e desencadeamento de vias de sinalização, processos como remodelação de polímeros de actina e da membrana para formação de pseudópodos que resultam no fagossoma. A posterior fusão deste com outras vesículas intracelulares resulta na sua maturação e capacita o fagossoma a destruir as partículas englobadas através da atuação de enzimas líticas e do complexo NADPH oxidase do fagócito (PEQUITO, 2009).

Alguns receptores de sinalização como o Toll¹ (TRL) são importantes na indução da imunidade adaptativa. Eles são capazes de sinalizar, em resposta as proteoglicanas bacterianas ou lipopolissacarídeos (LPS), ativar o NF- κ B e levar a indução de diversos genes, como

¹ Receptores tipo Toll (TLR) são uma classe de proteínas que desempenham um papel fundamental no sistema imunitário inato. Eles são receptores não catalíticos, transmembrana que reconhecem moléculas estruturalmente conservadas derivados de patógenos.

aqueles para citocinas, quimiocinas e moléculas co-estimuladoras, que são importantes para o início da resposta adquirida (JANEWAY, TRAVERS, *et al.*, 2007, PEQUITO, 2009).

A imunidade adquirida envolve dois subgrupos de células que são os linfócitos B e linfócitos T. Os linfócitos B são caracterizados por sua capacidade de produzir anticorpos (imunoglobulinas - IG) (chamada imunidade humoral) específicos para um antígeno individual, e ligam-se nos patógenos extracelulares que ativam os fagócitos (macrófagos e neutrófilos) (NUNES, 2009).

Anticorpos trabalham de diversas formas no combate a patógenos invasores. A formação de complexos entre antígeno/anticorpo e antígeno/complemento/anticorpo favorece o reconhecimento por fagócitos que, então iniciam o processo de fagocitose e promovem a destruição da bactéria ou toxina pela fagocitose (PEQUITO, 2009).

A imunidade mediada por células é uma das atribuições dos linfócitos T. Estes têm como principal função a defesa contra microorganismos que sobrevivem e se replicam dentro de células fagocíticas ou não fagocíticas. Os linfócitos T possuem a capacidade de reconhecer antígenos protéicos provindos de microorganismos intracelulares que foram apresentados na superfície de células infectadas (NUNES, 2009; GALLI e CALDER, 2009).

Linfócitos T expressam receptores de antígenos específicos de células T, mas, ao contrário dos linfócitos B, só são capazes de reconhecer antígenos apresentados a eles em uma superfície celular, este é o traço distintivo entre a imunidade humoral e celular (CALDER, 2007; GALLI e CALDER, 2009).

Dentre as principais células efetoras da imunidade adquirida estão os linfócitos T auxiliares ou *helper* (Th) (CD4⁺) e os linfócitos T citotóxicos (CD8⁺). Agentes patogênicos extracelular estimulam a resposta T helper e patógenos intracelulares estimulam linfócitos T citotóxicos que destroem a célula infectada ou células tumorais (THIES, NEBE-VON-CARON, *et al.*, 2001; GALLI e CALDER, 2009).

Os linfócitos *helper* (Th) (CD4⁺) podem se diferenciar também em várias subpopulações com características funcionais muito distintas. Destas, as Th1 e a Th2 são as subpopulações de linfócitos T efetores mais bem definidos. Uma das principais funções dos linfócitos Th1 é a defesa contra infecções causadas principalmente por microorganismos intracelulares (NUNES, 2009).

Para realizar esta função, linfócitos Th1 produzem citocinas IL-2 e IFN- γ (THIES, NEBE-VON-CARON, *et al.*, 2001) que ativam macrófagos, neutrófilos, células natural killer (NK) e linfócitos T citotóxicos, além de estimular a resposta humoral (produção de anticorpos por linfócitos B) contra o agente invasor (GALLI e CALDER, 2009). Linfócitos T helper 2 (Th2) produzem IL-10 (THIES, NEBE-VON-CARON, *et al.*, 2001), IL-4, que estimula a produção de IgE, IL-5, um fator ativador de eosinófilos. Células Th2 são responsáveis pela defesa contra helmintos através da ativação mediada por IgE de mastócitos e basófilos (NUNES, 2009).

Linfócitos T citotóxicos (CD8⁺) são células efectoras com a capacidade de eliminar microorganismos intracelulares a partir da destruição da célula hospedeira (NUNES, 2009; GALLI e CALDER, 2009) e sendo o mecanismo de eliminação das células alvo por linfócitos T CD8⁺ é mediado pelo reconhecimento antigênico e posterior liberação de mediadores (granzimas e perforinas) ou expressão de moléculas (ligante de FAS) que induzirão a morte da célula alvo (NUNES, 2009).

Todas as células nucleadas são capazes de apresentar peptídeos moleculares via *Major Histocompatibility Complex-I* (MHC-I) para alavancar o sistema imunitário celular (linfócitos CD8⁺), mas não são capazes para iniciar uma resposta imunológica, a qual é iniciada pelas células apresentadoras de antígenos (ACPs). Nestas células, peptídeos são ligados nas moléculas MHC-II e apresentados na superfície celular. Junto com as moléculas co-estimulatórias nas ACPs, o peptídeo/complexo MHC-II irá estimular a resposta imunológica (linfócitos CD4⁺) (DIEDERICHSEN, HJELMBORG, *et al.*, 2003).

A maioria da resposta imunológica mediada por linfócitos citotóxicos locais (células T CD8⁺), ocorrem através do reconhecimento de antígenos tumorais associados e apresentados por moléculas MHC Classe I e uma menor expressão (Down-regulation) das moléculas MHC-I no câncer é conhecido ser um importante mecanismo para o tumor escapar da vigilância imunológica (SHARMA, SHEN, *et al.*, 2007).

Quando linfócitos são apresentados a antígenos, eles tornam-se ativados e secretam citocinas fazendo estas células entrarem em ciclo celular dividindo-se. Isto é conhecido como a proliferação de linfócitos, levando a um aumento do número de linfócitos antígenos específico e, como tal, é componente chave da regulação, amplificação e memória da resposta imunológica mediada por células. Em culturas celulares a proliferação de células

linfócitos T pode ser estimulada por mitógenos, com a Concanavalina A (ConA), que se ligam no complexo receptor CD3 da célula T (THIES, NEBE-VON-CARON, *et al.*, 2001).

Um dos fatores de diferenciação das populações de linfócitos T é feita a através das citocinas produzidas pelas respectivas células. Citocinas são um grande grupo de glicoproteínas e peptídeos de baixo peso molecular que medeiam interações diretas entre células e regulam funções celulares e teciduais (GALLI e CALDER, 2009). São mediadores produzidos na resposta inflamatória e juntamente envolvem uma série de moléculas como os eicosanóides e espécies reativas do oxigênio e nitrogênio (GALLI e CALDER, 2009). Citocinas tem como fonte as células inflamatórias e também funcionam como mediadores parácrinos e intracelulares desempenhando sua maior função na imunomodulação (GALLI e CALDER, 2009).

As citocinas têm grande participação no desenvolvimento embrionário, no crescimento e maturação celular, em processos de cura e reparo de tecidos, na formação de novos vasos sanguíneos e na modulação da resposta imunitária. Citocinas possuem 3 propriedades: a) pleiotropia: elas podem atuar de maneira diferente nos diferentes tipos celulares; b) redundância: funções similares podem ser estimuladas por diferentes citocinas; c) multifuncionalidade: refere-se ao fato de que uma mesma citocina pode regular diferentes funções imunitárias (NUNES, 2009).

Citocinas pró-inflamatórias levam à anorexia, perda de peso, uma resposta de proteína de fase aguda, quebra de proteínas e gordura, aumento das concentrações de cortisol e glucagon e queda de insulina, resistência à insulina, anemia, febre e gasto energético elevado em os animais (BARBER, 2001). Excessiva produção de citocinas proinflamatórias como interleucinas (IL) entre estas a IL-1, IL-2, IL-6, Inteferon γ (INF- γ) e Fator da Necrose Tumoral - alfa (TNF- α) são comumente observadas na caquexia em paciente com câncer (MORLEY, THOMAS e WILSON, 2006).

A interação entre as células do sistema imunitário e inflamação é mediada em grande parte pelas citocinas que são capazes de promover crescimento celular, diferenciação e ativação funcional. TNF- α , IL-1 e IL-6 são as mais importantes citocinas produzidas por monócitos e macrófagos. Produção de quantidades apropriadas de TNF- α , IL-1 e IL-6 são benéficas na resposta para a infecção, mas em quantidades inapropriadas ou superprodução, podem ser danosas. Estas citocinas, especialmente o TNF- α , está implicado na causa de

muitas das respostas patológicas que ocorrem em condições inflamatórias e induz febre e síntese de proteínas de fase aguda pelo fígado, ativando linfócitos T e B e células endoteliais (SIMOPOULOS, 2002).

Há grande evidência que a IL-6 tem função primordial na resposta inflamatória. IL-6 é uma citocina de 26 kDa, produzida por muitas células diferentes no organismo, incluindo linfócitos, monócitos, fibroblastos e células endoteliais, e é a única citocina que pode estimular a síntese de todas as proteínas da fase aguda envolvidas na resposta inflamatória como a, Proteína C Reativa, soro amilóide A, fibrinogênio, α 1-quimotripsina e haptoglobina (SIMOPOULOS, 2002).

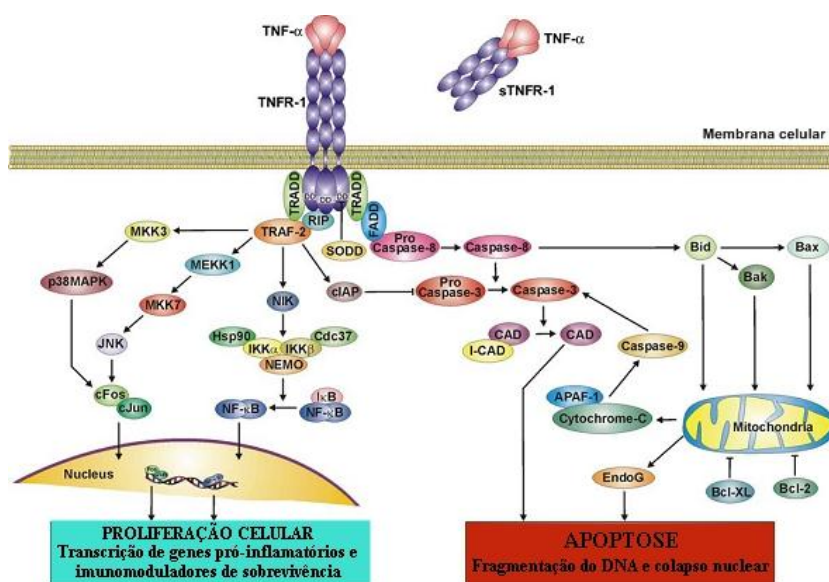


FIGURA 5: RECEPTOR DO TNF-A (TNFR-1) E VIA DE SINALIZAÇÃO. FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA (TNF-A) ATIVAM AMBOS OS CAMINHOS DE SOBREVIVÊNCIA E PROLIFERAÇÃO, JUNTAMENTE COM AS VIAS DE APOPTOSE VIA TNFR-1.
FONTE: HORSSSEN, HAGEN, EGGERMONT (2006).

Fator de necrose tumoral alfa é uma citocina multifuncional envolvida em apoptose, sobrevivência celular, inflamação e imunidade, também foi caracterizado como "caquetina" e como fator de diferenciação de linfócitos T (HORSSSEN, HAGEN e EGGERMONT, 2006) (Figura 5). O TNF- α é a primeira citocina liberada, em resposta a estímulo, pelos monócitos e macrófago, para iniciar destruição de células tumorais, estimula os linfócitos T e B a iniciarem a produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 e IL-6 (MORLEY, THOMAS e WILSON, 2006). As citocinas ativam o Fator de Transcrição Nuclear κ B (NF- κ B), o que resulta em diminuição da síntese protéica muscular e também ativam o sistema

proteolítico mediado pela ubiquitina que é o principal sistema envolvido em doenças relacionadas ao hipermetabolismo (MORLEY, THOMAS e WILSON, 2006).

O TNF- α tem papel importante na caquexia por promover a lipólise do tecido adiposo, pois ativa a enzima Lipase Sensível a Hormônio (LHS) que cliva os triacilgliceróis (TAG) em ácidos graxos livres e glicerol, liberando-os para a circulação. Ainda, pela regulação de diferentes proteínas com a redução das concentrações de Perilipina², CIDE-A³, Zinco- α glicoproteína⁴ e proteína antilipolítica G α_i ⁵, inibe a sinalização da insulina prejudicando a ação do IRS-1 induzindo resistência à insulina e estimula termogênese pelo aumento da expressão de proteínas desacopladoras (UCP-2 e UCP-3) no músculo esquelético (RYDÉN e ARNER, 2007).

1.5. Metabolismo do AGPI n-3 α -linolênico e câncer

Os ácidos graxos exercem amplas funções dentro das células. Eles atuam como combustível para geração de energia; são componentes da membrana celular fosfolipídica contribuindo para as suas propriedades físicas e funcionais; modificador da estrutura da proteína que influencia na localização celular e função de proteínas; são precursores para a síntese de mediadores lipídicos bioativos como prostaglandinas, leucotrienos, lipoxinas e resolvinas; regulam a expressão gênica através de efeitos sobre a atividade dos receptores, em processos de sinalização intracelular ou por ativação do fator de transcrição (CALDER, 2007; SINGER, SHAPIRO, *et al.*, 2008; SIMOPOULOS, 2010).

AGPI n-3 tem demonstrado uma série de benefícios relacionados à saúde incluindo a melhoria dos resultados relacionados com doença cardiovasculares. No diabetes por modificar a sensibilidade das células à insulina e no câncer por diminuir a massa tumoral e o número de metástase, atenuar a caquexia e modular o sistema imunitário. Estes efeitos têm sido demonstrados nos estudos utilizando o óleo de peixe rico em EPA e DHA (SIMOPOULOS, 2010).

² Fosfolipoproteína que recobre a gota lipídica intracelular quando fosforilada agrega-se e permite o contato da LHS na superfície lipídica para a hidrólise de TG.

³ Proteína é expressa no tecido adiposo humano e regulada pela perda de peso.

⁴ Fator de mobilização de lipídeos (LMF) é liberada por alguns tipos de tumores e pode estimular diretamente a lipólise.

⁵ Proteína de membrana que inibe e ativação da adenilato ciclase que provoca a síntese de AMP cíclico. O AMPc liga e ativa a proteína quinase A (PKA), que por sua vez fosforila e ativa LHS.

O ácido graxo α -linolênico (ALA) é o principal AGPI n-3 presente na dieta ocidental, até o conhecimento atual apresenta efeitos benéficos no câncer (próstata, mama), mas ainda não são claros e são controversos (ANDERSON e MA, 2009). Simopoulos, (1999) relatou que ALA não apresenta efeitos biológicos equivalentes aos ácidos graxos n-3 encontrados no óleo de peixe, mas pode ser o precursor de EPA e DHA.

Em parâmetros de massa tumoral, Chen, *et al.*, (2004), mostraram pela primeira vez que o ácido α -linolênico na dieta podem inibir o crescimento do câncer de mama humano, reduzir a proliferação e induziu a apoptose das células tumorais, assim o ácido α -linolênico apresentou efeitos anticancerígenos em reduziu a produção de AA e seus eicosanóides, os quais têm mostrado estimular diretamente o crescimento das células malignas.

O óleo de linhaça rico em ácido graxos α -linolênico demonstrou atenuar a tumorigênese mamária (células de tumor MCF-7) *in vitro*, apresentou menor massa tumoral reduziu a proliferação das células tumorais e aumentando a apoptose, sendo o mecanismo anticâncer do ALA relacionado com o aumento de peroxidação lipídica, propriedade anti angiogênica e a modulação das vias de transdução de sinal (TRUAN, CHEN e THOMPSON, 2010).

O efeito na modulação do sistema imunitário Thies, *et al.*, (2001) observaram que a suplementação em homens idosos de 2 g/d de ALA não foi significativamente capaz de reduzir a proliferação de linfócitos humanos comparado com óleo de peixe (OP).

Estudos em humanos (18g/dia) mostram que grandes quantidades de ALA na dieta diminuem a proliferação de linfócitos e em células mononucleares de sangue periférico o ALA inibe a síntese de IL-6, IL-1 β e TNF- α demonstrando o papel do ALA na redução da inflamação como importante em evento inflamatório comparado com uma dieta rica em LA (ZHAO, ETHERTON, *et al.*, 2007).

Carayol, Grosclaude e Delpierre (2010), em uma meta análise investigaram a relação entre o consumo na dieta de ácido α -linolênico (ALA) e o risco de câncer de próstata e descobriram que os indivíduos que consumiram mais de 1,5g/dia de ALA em comparação com indivíduos que consumiam menos de 1,5g/dia tiveram um risco significativo de câncer de próstata diminuído, mas estas descobertas suportam uma fraca associação protetora entre a ingestão de ALA na dieta com o risco de câncer de próstata, e concluíram que mais pesquisas são necessárias para concluir sobre essa questão

Assim temos que a partir da metade do século 19, com a Era de industrialização ocorreu uma alteração na dieta e redução do consumo de ácidos graxos n-3, determinando um aumento na incidência de DCNT. Estudos realizados com o óleo de peixe (rico em EPA e DHA) têm comprovado seu efeito benéfico no câncer. De forma similar, trabalhos têm demonstrado ações benéficas utilizando-se a linhaça rico em ALA no câncer, porém, segundo Thompson (2005) estes efeitos tem sido atribuídos as altas concentrações de lignanas, moléculas presentes na de linhaça com propriedades anti-tumorais.

Uma alternativa para estudos com o parental dos ácidos graxos n-3 na dieta é o óleo Oro Inka. Este é extraído da *Inka Peanut* (IP) (amendoim Inka) (*Plukenetia volubilis*), que é uma planta nativa das florestas chuvosas de alta altitude da região dos Andes na América do Sul (Peru). Esta semente é utilizada como fonte alimentar dos índios Chanca e outros grupos tribais da região andina por ser uma rica fonte nutricional com conteúdo de ~49% de óleo e um alto conteúdo de proteínas (33%) (HAMAKER, VALLES, *et al.*, 1992). O óleo extraído da *Plukenetia volubilis* apresenta em sua composição 45% de ácidos graxos α -Linolênico e uma boa razão n-6 (AL) para n-3 (ALA) de 0,82 (HAMAKER, VALLES, *et al.*, 1992).

Por conter na composição alta quantidade de ácidos graxos n-3, o óleo da *Inka Peanut* (Oro Inka[®] - Bebidas Latinas SAC. Lima, Peru) rico em ácido graxo n-3 α -linolênico pode ter efeito similar aos dos ácidos graxos de cadeia longa EPA e DHA presentes no óleo de peixe no câncer? A dieta, o tumor e o hospedeiro estão interrelacionas e, envolvidos no crescimento do cancer, no quadro de caquexia e a resposta do sistema imunitário. Assim, as mudanças na dieta ocorridas fizeram aumentar o interesse da nutrição em verificar o como o organismo pode se beneficiar com o aumento do consumo do ácido graxo parental n-3 em diversas doenças crônicas não degenerativas em especial o câncer.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Comparar o efeito da suplementação com óleo de peixe ou Oro Inka, rico em ácido graxo α -linolênico sobre a massa tumoral, caquexia, resposta imunitária de macrófagos, neutrófilos e linfócitos em ratos portadores de tumor de Walker 256.

2.2 Específicos

- a) Determinar o peso do tumor;
- b) Mensurar a proliferação das células do tumor da Walker 256 “*ex-vivo*”;
- c) Quantificar a peroxidação lipídica no tecido tumoral;
- d) Analisar o perfil de ácidos graxos dos óleos, ração e do tecido tumoral;
- e) Quantificar a expressão de COX-2 (ciclooxigenase-2) no tecido tumoral;
- f) Determinar a Glicemia e triacilglicerolemia, como indicadores sanguíneos de caquexia;
- g) Mensurar a fagocitose, volume lisossomal e produção de ânion superóxido em macrófagos peritoneais e neutrófilos;
- h) Mensurar a proliferação de linfócitos mesentéricos;
- i) Analisar a população de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ do linfonodo mesentérico; e
- j) Quantificar a produção da TNF- α e IL-6 do plasma e do sobrenadante da cultura de células de macrófagos peritoneais e linfócitos mesentéricos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, var. albinus), obtidos do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram submetidos a ciclo claro/escuro (12/12horas), em temperatura controlada a 22 ± 1 °C, com água e alimentação (Ração Nuvital® - Nuvilab AR-1) *ad libitum*. Os procedimentos envolvendo animais foram aprovados Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas (SCB) da Universidade Federal do Paraná (UFPR) (Certificado N° 311) (ANEXO 1). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Metabolismo Celular do Departamento de Fisiologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

3.2. Protocolo Experimental

Os ratos da linhagem Wistar (70 dias) foram acondicionados e separados em quatro animais por caixa de contenção formando 6 grupos de acordo com o tipo de suplementação e de acordo com a presença ou não de tumor de Walker 256. Foram divididos em:

Grupos sem tumor

- C – não suplementado
- OP – suplementado com Óleo de Peixe (rico e EPA e DHA)
- OI – suplementado com Oro Inka (rico em ALA)

Grupos com tumor

- W – não suplementado
- OPW – suplementado com Óleo de Peixe (rico e EPA e DHA)
- OIW – suplementado com Oro Inka (rico em ALA)

Os animais receberam dieta padrão por todo o período e, de acordo com os grupos, foram suplementados por 30 dias com: Óleo de Peixe® - Fundação Herbarium (0,2 mg/cap de EPA e 0,1mg/cap DHA) e Oro Inka - Bebidas Latinas SAC. Lima, Peru (46% de ácidos graxos α -linolênico) na dose de 1g/kg (MUND, *et al.*, 2007) de peso corpóreo. O perfil dos ácidos graxos da ração fornecida aos animais e dos óleos suplementados estão apresentado na tabela 3. A ração Nuvital® Nuvilab AR-1 é rica em ácido linoléico (AL 18:2n-6) na

quantidade 56%, seguido de 20% de ácido oléico (18:1n-9). No óleo de peixe há 29,8% de ácido eicosapentaenóico (EPA - 20:5n-3) e 23,8% do ácido docosahexaenóico (DHA - 22:6n-3). O Oro Inka apresenta na sua composição 54,5% do ácido graxo α -linolênico ALA (18:3n-3) e contém 31,6% de ácido linoléico (AL 18:2n-6). Resumidamente, observa-se que na dieta padrão predomina ácidos graxos n-6 (56%), a suplementação com óleo de peixe contém 54% de ácidos graxos de cadeia longa da família n-3 EPA e DHA, e o óleo Oro Inka tem 55% ácidos graxos α -linolênico precursor da família n-3.

TABELA 2: PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DA RAÇÃO, ÓLEO DE PEIXE E ORO INKA (G/100 G DE ÁCIDOS GRAXOS TOTAIS). RAÇÃO NUVITAL - NUVILAB AR-1®, ÓLEO DE PEIXE – FUNDAÇÃO HERBARIUM, ORO INKA – BEBIDAS LATINAS SAC.

Ácidos graxos (g/100 g de ácidos graxos totais)	Ração Nuvital	Óleo de Peixe	Óleo Oro Inka
Saturado			
Láurico (12:0)	1,3±0,3	3,5±0,5	
Palmítico (16:0)	13,7±0,9	14,4±2,0	3,4±0,3
Esteárico (18:0)	2,4±0,3	1,0±0	1,3±0,05
Insaturado			
Oléico (18:1n-9)	20,0±0,05	10,7±1,2	6,7±0,2
Linoléico (18:2n-6)	56,0±0,8	3,3±0,3	31,6±0,3
α -linolênico (18:3n-3)	6,0±0,6		54,5±0,8
Araquidônico (20:4n-6)	0,2±0,1	13,8±0,9	1,6±0,2
EPA (20:5n-3)	0,3±0	29,8±0,5	0,7±0,4
DHA (22:6n-3)		23,8±0,05	
Razão n-6/n-3	9,0:1	0,3:1	0,6:1

FONTE: O AUTOR (2011).

Após o período inicial, os animais dos grupos denominados com tumor foram inoculados com 1 mL subcutaneamente, no flanco direito, de uma suspensão de células de tumor de Walker 256, contendo 3×10^7 células/mL. Os grupos sem tumor foram inoculados com solução salina a 0,9%. Os animais foram ortotansados no 14º dia após a inoculação do tumor. Foram coletados o sangue, lavado peritoneal, tecido tumoral e linfocitário mesentérico para realização dos ensaios descritos abaixo.

3.3. Obtenção e Transplante das Células do Tumor de Walker 256

O tumor de Walker é um carcinossarcoma que se desenvolveu espontaneamente na glândula mamária de uma rata grávida em 1928, no laboratório de George Walker no “Jonh Hopkins University School of Medicine”. O tumor estava localizado na parte inferior da parede abdominal esquerda e apresentava tamanho médio de 5 cm de diâmetro. Durante a lactação o tumor regrediu, após o desmame ele reincidiu e cresceu rapidamente em seguida (GUAITANI, TORRE, *et al.*, 1983). Dois tipos de carcinomas de Walker 256 têm sido investigados por apresentarem diferenças na interação com o hospedeiro. O do tipo A, invasivo e metastizante, tem lento ritmo de crescimento induzindo a anorexia e a caquexia somente na fase terminal, garantindo sobrevida média de 27 dias. O tumor do tipo B, não invasivo e de crescimento rápido, induz a caquexia precocemente com sobrevida de 15 dias (GUAITANI, TORRE, *et al.*, 1983). Foram injetados intraperitonealmente em um rato adulto suspensão de 2×10^7 células/ml do tumor da Walker tipo B. Após período de cinco dias, quando constatado a ascite, o animal foi ortotansiado e injetado 10 mL de PBS em sua cavidade abdominal. Em seguida, seu abdome foi massageado, e através de laparotomia mediana, foi coletada da cavidade abdominal, com auxílio da pipeta tipo Pasteur, o fluido contendo as células tumorais. A contagem do número de células tumorais foi realizada em câmara de Neubauer. Após a contagem, inoculou-se o 3×10^7 células/ml no flanco direito, subcutaneamente, nos animais.

3.4. Determinação da Massa Corpórea dos Animais e Peso dos Tecidos

Durante o experimento os animais, a cada 2 dias, no período da manhã eram pesados para a devida suplementação (1 g/kg de peso corpóreo) com os respectivos óleos. Após o período experimental de 45 dias os animais foram ortotansiadados sendo a massa tumoral retirada e pesada em balança digital. Foi calculado o % de mudança de peso pela fórmula:

$$\%MP = \frac{PF - PT}{PI} \times 100\%$$

Onde: MP – mudança de peso

PF – peso final 14 dias após a inoculação do tumor de Walker 256

PT – peso do tumor

PI – peso inicial no dia da inoculação do tumor de Walker 256

3.5. Determinação Sanguínea

O sangue dos animais (9 ml/animal) foi coletado em tubo contendo 1 ml de solução de Heparina Sódica (5000 U.I./ml), e centrifugado a 1200 rpm (Eppendorf – Centrifuge 5810 R) por 6 minutos em temperatura de 4°C. O plasma foi coletado para os experimentos abaixo.

3.5.1. Glicemia

A determinação da concentração da glicose circulante foi realizada pelo método enzimático colorimétrico, utilizando o Kit Glicose E enzimática da Bioliquid, seguindo as instruções do fabricante. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Microplate reader Bio-rad – Benchmark) a 505 nm e os resultados expressos em mg/dL.

3.5.2. Triacilglicerolemia

A concentração plasmática de TAG foi determinada por método enzimático colorimétrico, utilizando os kits triglicérides GPO-Bioliquid conforme especificações do fabricante. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Microplate reader Bio-rad – Benchmark) a 540 nm e os resultados foram expressos em mg/dL.

3.6. Determinação do Perfil de Ácidos Graxos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (High Performance Liquid Chromatography – HPLC)

3.6.1. Extração lipídica

Foi realizada de acordo com o método descrito por Folch *et al.* (1957). Setenta miligramas de cada amostra de tecido tumoral, 10 µl dos óleos e 100 mg da ração foram utilizados para a extração. Após a pesagem, foi acrescentado ao tecido contido em tubo de vidro, 1,33 mL do solvente extrator (composto por metanol:clorofórmio, 1:2, vol:vol). O material foi homogeneizado com o auxílio de um homogeneizador (BoschR GGS 27). Em seguida, foram adicionados 240 µL de metanol ao homogeneizado, e o material foi então centrifugado a 5000 g (Eppendorf – Centrifuge 5810 R), por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de vidro e foram adicionados 480 µL de clorofórmio (para manter a proporção metanol:clorofórmio em 1:2 v:v). Na sequência, foram adicionados 410 µL de água ultrapura, e o sistema bifásico formado foi então submetido a intensa agitação, até não serem mais distinguíveis as duas fases. Cerca de 10 minutos depois, após a reconstituição espontânea do sistema bifásico, o sobrenadante (aquoso) foi removido

com o auxílio de micropipeta. Foi então adicionado 1 mL de Solução de Folch (metanol 48,98%; água 47,96%; clorofórmio 3,06%; MgCl₂ 0,017%; CaCl₂ 0,02%; NaCl 0,37%), lentamente (para evitar a formação de emulsão) de maneira que as paredes do tubo fossem lavadas com esta solução. Após a remoção do sobrenadante, este procedimento foi repetido mais duas vezes, e o infranadante submetido à secagem em nitrogênio gasoso em banho-maria a 40 °C.

3.6.2. Saponificação dos extratos lipídicos

Os extratos lipídicos obtidos dos tumores e células, bem como alíquotas de óleo de peixe e Oro Inka, foram ressuspensos em 100 µL de metanol e saponificados com 2,0 mL de uma solução alcalina em metanol (hidróxido de sódio 0,5M em metanol a 90%), a 37 °C por 2 horas, em banho-maria com agitação (BEYER E JENSEN, 1989; NISHIYAMA-NARUKE, SOUZA, *et al.*, 1998). A solução alcalina foi então acidificada até aproximadamente pH 3,0, com 1,5 mL de ácido clorídrico 1M. Os ácidos graxos em solução foram extraídos 3 vezes com 2,0 mL de hexano. O solvente foi evaporado em nitrogênio gasoso em banho a 37 °C e as amostras então guardadas protegidas da luz, a -20 °C até a derivatização.

3.6.3. Derivatização dos ácidos graxos

A reação de derivatização foi baseada no método descrito por Abushufa, Reed e Weinkove (1994). O reagente 1 foi preparado adicionando-se 10mg de 4-bromometil-7-metoxi coumarina (BMCM) em 10 mL de acetonitrila. O reagente 2 foi preparado adicionando 26,5 mg de 18-crown-6-ether e 100 mg de carbonato de potássio em 5 mL de acetonitrila e 50 µL de água ultra pura. O reagente 2 foi sonificado por 30 minutos e outros 5 mL de acetonitrila foram adicionados. O sobrenadante foi separado do precipitado e a solução foi estocada a 4-8°C. As amostras contendo ácidos graxos a serem derivatizados foram reconstituídas em 100 µL de acetonitrila e homogeneizadas em vórtex por 30 segundos. Após este período foram adicionados 100 µL do reagente 1, e 100 µL do reagente 2. Foram adicionados mais 100 µL de acetonitrila e as amostras foram novamente homogeneizadas, mantidas a 60°C por 15 minutos em placa aquecedora, e em seguida transferidos para frascos apropriados para injeção em HPLC. Para a análise dos ácidos graxos derivatizados através do detector de fluorescência, foram realizadas injeções de 50 µL dos derivados diluídos. O fluxo

foi de 1,0 mL/minuto, a temperatura controlada de 23°C. Os compostos foram detectados fluorimetricamente com excitação a 325 nm e emissão a 398 nm. Quanto à fase móvel, foi realizado gradiente binário com acetonitrila e água, iniciando com a proporção de 77:23% (acetonitrila:água) e finalizando com 90:10%, em um total de 55 minutos.

3.6.4. Obtenção dos cromatogramas - HPLC

Após extração lipídica, saponificação dos extratos e derivatização dos ácidos graxos obtidos, as amostras foram injetadas em um sistema HPLC – Varian com uma bomba (modelo ProStar 230), autoinjeter (mod ProStar 410) e detector de fluorescência (mod. ProStar 363). A coluna analítica para a separação dos ácidos graxos derivatizados utilizada foi da marca Varian, Microsorb-MV C-8 de fase reversa, com 250 mm de comprimento x 4,6 mm de diâmetro, contendo partículas de 5 µm. O software para integração e registro de dados foi o Star 6.2 Chromatography Workstation. Os seguintes ácidos graxos foram utilizados como padrões: ácido láurico (C12:0), ácido mirístico (C14:0), ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoléico (C16:1n-7), ácido esteárico (C18:0), ácido oléico (C18:1n-9), ácido linoléico (C18:2n-6), ácido α -linolênico (C18:3n-3), ácido araquidônico (C20:4n-6), ácido eicosapentaenóico (C20:5n-3) e ácido docosaexaenóico (C22:6n-3).

3.7. Proliferação de Células Tumorais “ex vivo”

Dos animais ortotansados foram retirados o tecido tumoral, dissecados e macerados o tecido. As células tumorais, assim obtidas foram filtradas e centrifugados (Eppendorf – Centrifuge 5810 R) a 1800 rpm, a 4 °C, durante seis minutos. Ressuspendidas com PBS este procedimento centrifugação e lavagem foi repetido por mais 2 vezes em seguida as células utilizados para a os procedimento de cultivo, descritos abaixo. Isoladas as células tumorais, uma solução com 180 µL contendo 1×10^5 células por poço, foram cultivados em meio de cultura RPMI-1640 com HEPES (1 litro água miliq – pH 7,4 Glutamina – 0,292 g; NaHCO₃ – 2,2 g; HEPES – 2,5 g; Meio RPMI – 10,40 g) enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos (penicilina 10.000U e estreptomicina 10 mg/L), em placas de 96 poços (volume final de 200 µL) a 37 °C em atmosfera de 95% ar / 5% CO₂. Foi adicionado 20 µL de uma solução contendo (2-¹⁴C)-timidina (0,02 µL/poço) (50 mCi/mmol) e as células foram mantidas em cultura por um período adicional de 24 horas, sob as mesmas condições descritas

acima. Após, foram coletadas automaticamente em coletor múltiplo (Skatron Combi Multiple Cell Harvester, UK) em papéis filtro n° 11731 FILTERMATS (COX Scientific Ltd. UK). Neste processo não há necessidade de processos extrativos preparatórios para obtenção de DNA celular. Os discos de papéis contendo a radioatividade incorporada no DNA foram transferidos para tubos contendo 1 mL de líquido de cintilação e levados para mensuração da radioatividade incorporada em DNA em cintilador modelo Beckman LS 6500. Os resultados foram expressos em contagens por minuto (CPM).

3.8. Peroxidação Lipídica do Tecido Tumoral

Mensurou-se peroxidação lipídica pelo método xilenol laranja (FOX) conforme descreve Jiang, Woollard e Wolff, (1991) e Nourooz-Zadeh, Tajaddini-Sarmadi e Wolff, (1994). O método quantifica a formação de hidroperóxidos lipídicos/mg de proteínas durante a peroxidação lipídica. O método baseia-se no princípio de que hidroperóxidos oxidam ferro a íon férrico e por sua vez este íon se liga ao corante xilenol laranja. Para isso, amostras de tecido tumoral (200 mg) foram homogeneizadas em 5 volumes de metanol (Homogeneizador Politron - 25.000 rpm), e centrifugadas (Eppendorf – Centrifuge 5810 R) a $5.000 \times g/5'/4^\circ\text{C}$. O sobrenadante (90 μL) foi aliquoteado em tubos de reação contendo 10 μL de metanol ou 10 μL de solução metanólica de trifetilfosfina (TEPP, SigmaR) a 10mM. Todos os tubos foram agitados vigorosamente e então incubados em temperatura ambiente por 30 minutos. Após este período foram adicionados 900 μL de solução de trabalho (reativo de FOX2), contendo MeOH 90%, xilenol laranja 100 μM (SigmaR), H_2SO_4 25 mM, hidroxitolueno butilado (BHT) 4 mM, e sulfato ferroso de amônio 250 μM , em metanol 90% (v:v, em água). Após agitação, as amostras foram incubadas por 2 horas em temperatura ambiente. Nesta etapa, os cátions ferrosos (Fe^{2+}) do reativo de FOX2 são oxidados pelos hidroperóxidos presentes na amostra (tanto pelos hidroperóxidos lipídicos quanto por outros tipos de hidroperóxidos presentes na amostra). Como todos os hidroperóxidos lipídicos das amostras tratadas com TEPP foram reduzidos, a produção de Fe^{3+} será menor nestas do que nas amostras não tratadas com TEPP. O Fe^{3+} formado e então quelado pelo xilenol laranja, o que faz a cor deste indicador passar de laranja a azul-purpura (passa a absorver luz em 560 nm). Ao final do tempo da incubação, a absorbância foi mensurada no espectrofotômetro (ULTROSPEC 2000 -Parmacia) em comprimento de onda de 560 nm. Subtraiu-se então o valor da absorbância das

amostras tratadas com TPP (sem hidroperóxidos lipídicos) do valor da absorbância das amostras sem TPP. A quantidade de lipoperóxidos foi calculada utilizando-se curva padrão de peróxido de hidrogênio, obtida com soluções padrão de diferentes concentrações (100; 50; 25; 12,5; 6,2; 3,1 e 1,6 μM) submetidas aos mesmos procedimentos descritos acima para a dosagem de hidroperóxidos (com exceção ao tratamento com TPP). Os resultados foram expressos em nmol de hidroperóxidos/mg de proteína. O cálculo para a determinação qual quantidade de peroxidação lipídica no tecido tumoral foi realizado utilizando-se coeficiente de extinção molar $\Sigma = 4,3 \times 10^4 \text{M}$. A fórmula utilizada para o cálculo foi:

$$\frac{\text{ABS.} \times \text{dil. Do PBS} \times \text{dil de solução de trabalho} \times \underline{1}}{\Sigma} \quad \text{mg de tecido}$$

ABS - absorbância

3.9. Determinação da Quantificação Protéica para Peroxidação Lipídica

A concentração de proteínas das amostras foi mensurada pelo método de Bradford, (1976) que utiliza o corante Coomassie Blue G 250 que se liga às proteínas resultando em coloração azul, passível de ser detectada em comprimento de onda de 450 nm. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (ULTROSPEC - Pharmacia) a 595 nm.

3.10. Parâmetros Imunitários de Macrófagos e Neutrófilos.

3.10.1. Obtenção de Macrófagos

Para a obtenção de células peritoneais, os ratos sem e portadores do tumor de Walker 256 foram exsanguinados por decapitação. Após a remoção da pele da região abdominal 10 mL de tampão fosfato-salina (PBS), pH 7,4 foi injetado na cavidade peritoneal dos animais. Após 30 segundos da aplicação, a cavidade peritoneal foi aberta e o fluido, contendo as células, aspiradas com o auxílio de pipeta tipo Pasteur, estéril. Em seguida, estas células foram centrifugadas (Eppendorf – Centrifuge 5810 R) a 150 G, 4 °C, durante 5 minutos. Os macrófagos então, após descarte do sobrenadante, foram ressuspensos em PBS, e em seguida, procedeu-se à contagem destes em câmara de Neubauer corando-se com azul de tripan 0,2%. Para os ensaios abaixo foram plaqueados por poço 2×10^6 células/mL.

3.10.2. Obtenção de neutrófilos sanguíneos

O isolamento dos neutrófilos foi baseado no método proposto por Bøyum, (1976). O sangue coletado dos animais foi transferido para tubos Falcon® de 50 mL e diluídos (1:2) com PBS. A seguir, foi adicionado 3 mL de Ficoll-Paque Plus e em seguida 8 mL do sangue diluído. Logo após, foram centrifugados (Eppendorf – Centrifuge 5810 R) durante 40 minutos a 400 G. Após a separação das células, a camada superior constituída por células mononucleares e plaquetas foi descartada. A camada inferior composta pelos neutrófilos e eritrócitos foi incubada com solução hemolítica em banho-maria por 15 minutos. Depois, centrifugada a 150 G (Eppendorf – Centrifuge 5810 R) por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em PBS para posterior contagem em câmara de Neubauer corando-se com azul de tripan 0,2%. Para os ensaios abaixo foram plaqueados por poço 10^6 células/mL.

3.10.3. Fagocitose

Utilizou-se o método descrito por Pipe et al. (1995) modificado por Bonatto, et al., (2004). Foram depositados 100 μ L da solução de macrófagos ou neutrófilos obtidos como descrito acima, em placa de ELISA e adicionam-se 10 μ L de zimosan ($2,3 \times 10^8$ partículas/mL) corado com vermelho neutro (solução estoque vermelho neutro: Vermelho Neutro – 0,02g; Dimetilsulfóxido (DMSO) – 1 mL) (solução de fagocitose: zimosan – 0,02 g; Solução estoque de vermelho neutro – 0,3 mL e PBS – 3 mL) e incubou-se por 30 minutos. Após este procedimento, foi adicionado 100 μ L de fixador de Baker (Cloreto de sódio (NaCl) – 2 g; acetato de cálcio – 1g; formaldeído – 4mL e água milique – 93 mL) para interromper o processo de fagocitose, 30 minutos depois a placa foi lavada com PBS e, posteriormente, centrifugada (Eppendorf – Centrifuge 5810 R), por 5 minutos a 240 G, a fim de remover o zimosan e o vermelho neutro não fagocitado pela células. O vermelho neutro no interior dos macrófagos foi solubilizado utilizando-se 100 μ L de Solução de Extração (ácido acético glacial 96% - 1 mL; etanol – 50 mL e água milique – 49 mL). Em seguida incubou-se por 30 minutos a 37°C e, procedeu-se a leitura das placas, a 550 nm utilizando-se espectrofotômetro (Microplate reader Bio-rad – Benchmark). Os dados foram expressos em: % comparados com o grupo controle e também normalizados pela adesão.

3.10.4. Retenção de vermelho neutro

Para esta análise utilizou-se o método descrito por Pipe et al. (1995) modificado Bonatto, et al., (2004), onde em placas do tipo ELISA depositou-se 100 µL da solução de macrófagos ou neutrófilo e adicionou-se 20 µL de vermelho neutro a 2% (solução estoque de vermelho neutro – 0,02ml e PBS – 5mL). Após 30 minutos, a placa foi centrifugada (Eppendorf – Centrifuge 5810 R) por 5 minutos a 240 G. O sobrenadante foi descartado e os poços lavados com PBS, para eliminar o vermelho neutro que não foi internalizado pelas células. Adicionou-se 100 µL de solução de extração para solubilizar o vermelho neutro que estava dentro dos lisossomos. Esta solubilização é possível porque o vermelho neutro é corante catiônico que se difunde através da membrana celular e, uma vez presente no lisossomo, fica aprisionado devido a mudanças de cargas causada pelo pH ácido do sistema lisossomal. Finalmente, após incubação por 30 minutos a 37°C, a placa foi lida a 550 nm utilizando-se espectrofotômetro (Microplate reader Bio-rad – Benchmark). Os dados foram expressos em: % comparados com o grupo controle e também normalizados pela adesão.

3.10.5. Mensuração da produção de Ânion Superóxido

A geração de superóxido foi estimada através da redução de “nitroblue tetrazolium” (NBT), um composto amarelo lipossolúvel que se torna insolúvel e de cor azul no seu estado reduzido (MADHAVI e DAS, 1994). Depositou-se 100 µL da solução de macrófagos ou neutrófilo em placa de 96 poços e adicionou-se 100 µL de solução de NBT 0,25% (NBT – 0,25 g, Zimosan – 0,5 g e PBS – 100 mL), foram incubados por 30 minutos a 37 °C. Após centrifugou-se (Eppendorf – Centrifuge 5810 R) por 5 minutos a 240 G e descartou-se o sobrenadante. Adicionou-se 100 µL de PBS e centrifugou-se por 5 minutos a 240 G, descartou-se o sobrenadante. Adicionou-se 100 µL de Metanol 50% e incubou-se por 10 minutos a 37°C. Centrifugou-se (Eppendorf – Centrifuge 5810 R) por 5 minutos a 240G e foi descartado o sobrenadante. Secou-se a quente e solubilizou-se com 120 µL de KOH 2M e 140 µL de DMSO. A placa foi lida a 550 nm utilizando-se espectrofotômetro (Microplate reader Bio-rad – Benchmark). Os dados foram expressos em: % comparados com o grupo controle e também normalizados pela adesão.

3.10.6. Adesão de macrófagos

Foi plaqueado, em microplacas de 96 poços 100 μL de células na concentração de 2×10^5 . Incubou-se por 1 hora em estufa a 37 °C e submeteu-se a procedimentos de lavagem. Metanol 50% foi adicionado para fixação das células e incubado por 5 minutos. Giemsa 0,2% foi adicionado e a microplaca incubada por 40 minutos. Metanol foi adicionado para solubilizar o corante. Após 30 minutos de incubação, a leitura foi realizada a 550 nm (dados não mostrados) utilizando espectrofotômetro (Microplate reader Bio-rad – Benchmark).

3.11. Parâmetros Imunitários de Linfócitos

3.11.1. Obtenção dos linfócitos

Dos animais ortotansados foram retirados os linfonodos mesentéricos, dissecados e isolados por compressão destes órgãos em cilindro de malha em solução salina. Os linfócitos assim obtidos foram filtrados em papel filtro especial (Whatmen n° 105) e após centrifugados (Eppendorf – Centrifuge 5810 R) a 180 G, a 4 °C, durante seis minutos. Este procedimento de filtragem foi repetido por 3 vezes em seguida os linfócitos utilizados para a determinação dos parâmetros imunitários, descritos abaixo.

3.11.2. Proliferação linfocitária

Isolados os linfócitos, uma solução com 180 μL contendo 2×10^5 células por poço, foram cultivados em meio de cultura RPMI-1640 com Hapes (1 litro água miliq – pH 7,4 Glutamina – 0,292 g; NaHCO_3 – 2,2 g; Hapes – 2,5 g; Meio RPMI – 10,40 g) enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos (penicilina 10.000U e estreptomicina 10 mg/L), em placas de 96 poços (volume final de 200 μL) a 37 °C em atmosfera de 95% ar / 5% CO_2 por 48 horas. Metade dos poços de cada grupo de linfócitos foram estimulados com 20 μL /poço de solução hidroalcoólica do mitógeno Concanavalina A (ConA – 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), e outra metade sem estímulo sendo mantidos em cultura por 48 horas. Após este período, foram adicionados 20 μL de uma solução contendo (2- ^{14}C)-timidina (0,02 $\mu\text{L}/\text{poço}$) (50 mCi/mmol) e as células foram mantidas em cultura por um período adicional de 18 horas, sob as mesmas condições descritas acima. Após, foram coletadas automaticamente em coletor múltiplo (Skatron Combi Multiple Cell Harvester, UK) em papéis filtro n° 11731 FILTERMATS

(COX Scientific Ltd. UK). Neste processo não há necessidade de processos extrativos preparatórios para obtenção de DNA celular. Os discos de papéis contendo a radioatividade incorporada no DNA foram transferidos para tubos contendo 1 mL de líquido de cintilação e levados para mensuração da radiatividade incorporada em DNA em cintilador modelo Beckman LS 6500. Os resultados foram expressos em contagens por minuto (CPM).

3.11.3. Marcadores de superfície

A identificação dos marcadores de superfície para linfócitos T helper ($CD4^+$) e T citotóxico ($CD8^+$) foi realizada através de Citometria de Fluxo, segundo, metodologia descrita por JEFFERY *et al.*; (1996). Para isto, linfócitos coletados do linfonodo mesentéricos (2×10^5 células/tubo) foram incubados com anticorpo monoclonal contra $CD4^+$ (marcado com o fluorocromo Ficoeritrina (PerCpE) com absorvância de 488 nm e emissão maior que 640 nm – canal FL2) e $CD8^+$ (marcado com o fluorocromo Isotiocianato de fluoresceína (FITC) com absorvância de 488 nm e emissão maior que 530 nm – canal FL1) por 30 minutos. Depois foi feita a lavagem dos anticorpos com tampão PBS filtrado (0,05%). A fluorescência celular foi avaliada por citometria de fluxo (FACS – *fluorescence activated cell sorter*) em equipamento FACSCalibur Becton Dickinson –Biosciences. Os resultados foram expressos em porcentagem positiva de população dos diferentes linfócitos. O software utilizado para a aquisição dos dados foi o Cell Quest™, e para a análise de dados, o programa Weasel v2.6.1®.

3.12. Determinação da Concentração de Citocinas

3.12.1. Plasma

Após a separação do plasma de cada animal, como descrito anteriormente, estes foram congelados a -80°C para posterior mensuração das citocinas TNF- α e IL-6 seguindo as especificações do fabricante.

3.12.2. Linfócitos e macrófagos

Após a coleta dos linfócitos e macrófagos como descrito acima, o plaqueamento, em placas de 24 “wells”, contendo 200 μL de meio de cultura RPMI-1640 com Hepes com 2×10^6

células/"well". Metade dos "wells" de cada grupo, os linfócitos foram estimuladas com concanavalina-A 5 µg/ml e os macrófagos com lipopolissacarídeo 10 µg/ml (LPS) e foi adicionado 1,8 mL de meio RPMI 1600 com hepes + SFB (soro fetal bovino) e antibióticos (penicilina 10.000U e estreptomicina 10 mg/L) e nos "wells" controle adicionou-se apenas o meio de cultura. As placas foram, em seguida, colocadas na estufa com CO₂ a 5%, a 37 °C, por 24 horas. Após este período, centrifugou-se a placa por 5 minutos a 150 G e coletou-se o sobrenadante sendo congelado a -80°C. A quantificação ocorreu através de kit específico de TNF-α (Rat TNF-α ELISA – Ready-Set-Go! – Cat# 88-7340-88 – eBioscience Inc. USA) e IL-6 (Rat IL-6 ELISA Development Kit - Catalog #:900-K86 - PeproTech Inc. USA), utilizando-se o teste de ELISA.

3.13. Determinação da Expressão Proteínas

3.13.1. Eletroforese em Sds – Page

O método "SDS – PAGE" descrito por Laemmli, (1970), desenvolvido para que esta migração dependa do tamanho da proteína. O SDS (dodecil sulfato de sódio) é um poderoso detergente carregado negativamente que se liga a regiões hidrofóbicas das proteínas. O complexo formado SDS-proteína distribui carga negativa semelhante entre todas as proteínas, que migrarão para o pólo positivo do campo elétrico. Portanto, a migração das proteínas no método "SDS – PAGE" depende unicamente dos seus pesos moleculares. O gel de empilhamento foi preparado de 7% a 12% dependendo da proteína estudada, permitindo que todas as proteínas migrem com a mesma velocidade no início da corrida. Chegando ao gel de separação, as proteínas começam a migrar de acordo com seus pesos moleculares. A concentração de poliacrilamida do gel de separação foi de 10%. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida em "SDS – PAGE" por aproximadamente 2 horas (200 V, 400 mA). Esta separação das proteínas é importante para a posterior identificação das proteínas pelo uso de anticorpos (Western Blotting).

3.13.2. "Western Blotting"

O método de "Western Blotting" surgiu em 1979, descrito por Towbin, Staehelin e Gordon, (1979) e baseia-se na identificação de proteínas específicas pelo uso de anticorpos

mono ou policlonais. Após a separação das proteínas em SDS – PAGE, as proteínas presentes no gel foram eletrotransferidas (BIORAD ® Semi-dry transfer cell) para uma membrana de nitrocelulose (BIO-RAD® TRANSBLOT) durante aproximadamente 1 hora sob voltagem constante de 25 V (5,5 mA/cm²), contendo tampão de Transferência Bjerrum and Schafer-Nielsen (48 mM Tris, 39 mM glicina, 10% SDS e 20% metanol) previamente resfriado a 4 °C. A membrana foi bloqueada *over night* a 4°C com tampão de bloqueio TBST (NaCl 4M, TrisHCl 1M, 0,05% Tween 20) contendo 5% de leite desnatado (Molico, Nestlé) para evitar ligação inespecífica em regiões da membrana em que não há proteínas. Lavada com TBST (3 vezes de 10 minutos), membrana foi incubada com anticorpo primário em tampão de incubação (TBS + 3% de leite em pó) por 3 horas em temperatura ambiente contendo anticorpo primário para β -Actin (C4): sc-47778 (Santa Cruz Biotechnology) diluídos na proporção de 1:800 ou COX-2 (C-20): sc-1745 (Santa Cruz Biotechnology) diluídos na proporção de 1:400. Após a incubação, a membrana foi submetida à outra lavagem com TBST (3 vezes de 10 minutos) e nova incubação com (TBS + 3% de leite em pó) por 2 horas em TA contendo anticorpo secundário específico para o anticorpo primário ligado a enzima HRP (horseradish peroxidase) (Goat anti-mouse IgG-HRP sc-2005 e rabbit anti-goat IgG-HRP: sc-2768 diluídos na proporção de 1:4000). Após a lavagem com TBST (3 vezes de 10 minutos) pela adição de um substrato cromogênico ou quimioluminescente (Western Blotting Luminol Reagent: sc-2048 - (0,1 mL/cm²) por 5 minutos. Esta enzima permite a visualização do sinal da proteína identificada pelo anticorpo revelado em filme Kodak® para radiografia. A densidade das bandas foram avaliadas por densitometria (software Image J®), em relação à densidade da banda de um controle interno (actina).

3.14. Análise Estatística

Utilizou-se o programa GraphPad Prism®. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média se submetidos a análise de variância de duas vias tendo tumor e suplementação como fatores. Nível significância para $p < 0,05$ foi empregado para indicar diferença estatística

4. RESULTADOS

Parâmetros Tumorais

4.1. Massa Tumoral

Na figura 6 estão apresentados os dados da massa tumoral (g) dos grupos portadores de tumor sem suplementação (W), suplementados com óleo de peixe (OPW) e Oro Inka (OIW). A massa tumoral do grupo W foi de $19,1 \pm 2,0$ g. No grupo OPW a massa tumoral foi de $7,9 \pm 0,7$ g, correspondendo a 58,6 % à do grupo W ($p < 0,05$). No grupo suplementado com o Oro Inka a massa tumoral foi de $8,3 \pm 0,7$ g, apresentando uma redução em 56,5% comparada à do W ($p < 0,05$). Não houve diferença entre os grupos suplementados ($p > 0,05$)

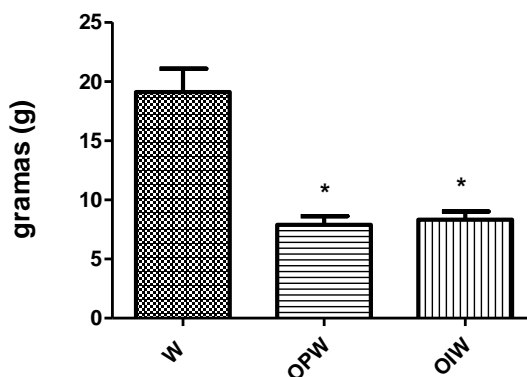


FIGURA 6: MASSA TUMORAL (G) OBTIDA DE RATOS PORTADORES DO TUMOR DE WALKER 256 ALIMENTADOS COM DIETA PADRÃO (W), SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE (OPW) OU ORO INKA (OIW). OS DADOS REPRESENTAM A MÉDIA \pm EPM DE 20 RATOS DO GRUPO W, 25 DO OWP E 29 DO OIW. * $p < 0,05$ VS. W.
FONTE: O AUTOR (2011).

4.2. Percentual (%) de Mudança de Peso

O percentual de mudança de peso (%) está representado na tabela 2. Os pesos dos animais no início e ao final de 14 dias (Tabela 2) não foram diferentes entre os grupos ($p > 0,05$) sem tumor (C) ou com tumor (W), suplementados com tumor (WOP, WOI) ou sem tumor (OP, OI). Ao promover a redução do peso do tumor do peso corpóreo final têm-se o peso da carcaça que ao se expressar os dados em percentagem de mudança de peso identifica-se uma redução do peso em $-04 \pm 0,6$ no grupo sem suplementação (W). A suplementação com óleo de peixe (WOP) ou Oro Inka (WOI) promoveu percentual de mudança de peso positiva

de $3,3\pm 0,7$ e $2,7\pm 0,6$, respectivamente, que não foram diferentes entre si ou à de seus pares sem tumor ($p>0,05$), mas foram significantes quando comparadas à do grupo W ($p<0,05$).

TABELA 3: PERCENTUAL (%) DE MUDANÇA DE PESO: PESO INICIAL, FINAL, TUMORAL E DA CARÇA DOS ANIMAIS NÃO PORTADORES DE TUMOR ALIMENTADOS COM DIETA PADRÃO (C), SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE (OP) OU ORO INKA (OI) E PORTADORES DO TUMOR ALIMENTADOS COM DIETA PADRÃO (W), SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE (OPW) OU ORO INKA (OIW). OS DADOS ESTÃO APRESENTADOS COMO MÉDIA \pm EPM DE 20 RATOS POR GRUPO TRATADO. * $p<0,05$ VS. W.

	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	Peso do Tumor (g)	Peso Carça (g)	Mudança de Peso (g)	% Mudança de Peso
C	358,4 \pm 9,5	371,7 \pm 9,2		371,7 \pm 9,2	13,2 \pm 1,7	3,8\pm0,5
OP	349,1 \pm 7,2	364,3 \pm 7,9		364,3 \pm 7,9	15,1 \pm 1,7	4,3\pm0,5
OI	358,52 \pm 7,5	374,4 \pm 7,6		374,4 \pm 7,6	15,9 \pm 1,5	4,5\pm0,4
W	360,6 \pm 9,1	376,0 \pm 9,1	19,1 \pm 2,0	358,8 \pm 8,4	15,4 \pm 3,3	-0,4\pm0,6
WOP	329,8 \pm 6,2	348,8 \pm 6,2	7,9 \pm 0,7*	340,6 \pm 6,2	19,0 \pm 2,2	3,3\pm0,7*
WOI	351,3 \pm 10,0	368,5 \pm 10,6	8,3 \pm 0,7*	360,5 \pm 10,3	17,2 \pm 2,1	2,7\pm0,6*

FONTE: O AUTOR (2011).

4.3. Perfil dos Ácidos Graxos do Tecido Tumoral

O perfil de ácidos graxos obtidos do tecido tumoral está apresentado na tabela 4. A percentagem (%) de ácidos graxos láurico, palmítico e esteárico, saturados, presentes no tumor não foi diferente entre os grupos ($p>0,05$). A suplementação com óleo peixe elevou significativamente o % do ácido graxo monoinsaturado oléico ($24,2\pm 0,7$), a qual foi 22% maior quando comparada à do grupo W ($p<0,05$; $18,8\pm 1,2$); elevou também significativamente o % dos ácidos graxos α -linolênico e EPA ($5,3\pm 1,1$; $2,4\pm 0,4$) em 10 e 4,8 vezes, respectivamente ($p<0,001$), não alterando o % de DHA quando comparadas às do grupo sem suplementação (W; $0,6\pm 0,1$ e $0,5\pm 0,05$, respectivamente). Com relação ao ácido araquidônico o % encontrado no tumor foi $5,5\pm 0,6$ a qual foi cinco vezes menor quando comparada à do grupo controle W ($p<0,001$; $24,4\pm 1,2$). A suplementação com Oro Inka também promoveu alteração no perfil de ácidos graxos no tecido tumoral onde observamos elevação de mais de duas vezes ($p<0,05$) na % de ácido graxo α -linolênico ($1,6\pm 0,3$ vs. W). O % de EPA praticamente dobrou ($0,9\pm 0,1$) em relação ao grupo W ($p<0,05$) e a % de ácido

araquidônico foi de $13,8 \pm 1,4$ contra $24,4 \pm 1,2$ no W ($P < 0,05$) redução de duas vezes e não foi diferente na % de DHA. Quando se compara as duas suplementações temos alteração apenas no perfil dos ácidos graxos α -linolênico que foi 3,5 vezes menor no grupo OIW que à do grupo OPW e na de ácido araquidônico que foi aproximadamente 2,5 vezes maior ($p < 0,05$).

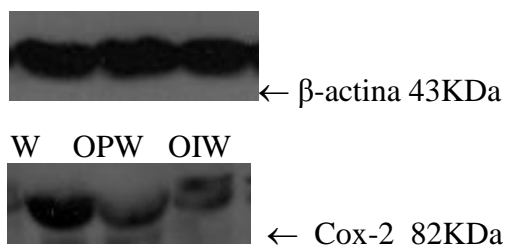
TABELA 4: PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS NO TECIDO TUMORAL (G/100 G DE ÁCIDOS GRAXOS): DE RATOS PORTADORES DO TUMOR DE WALKER 256 ALIMENTADOS COM DIETA PADRÃO (W), SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE (OPW) E ORO INKA (OIW). OS DADOS SÃO MÉDIA \pm EPM DE 20 ANIMAIS POR GRUPO. * $p < 0,05$ vs. W. # $p < 0,05$ vs. OPW.

Ácidos graxos (g/100 g de ácidos graxos totais)	Grupos		
	W	OPW	OIW
Saturado			
Láurico (12:0)	$1,5 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,1$
Palmítico (16:0)	$15,1 \pm 0,7$	$17,2 \pm 1,0$	$16,8 \pm 0,5$
Estearico (18:0)	$11,2 \pm 1,4$	$12,0 \pm 1,8$	$12,1 \pm 1,5$
Insaturado			
Oleico (18:1n-9)	$18,8 \pm 1,2$	$24,2 \pm 0,7^*$	$21,3 \pm 0,9$
Linoléico (LA 18:2n-6)	$25,1 \pm 2,4$	$27,1 \pm 2,9$	$26,0 \pm 2,6$
α -linolênico (ALA 18:3n-3)	$0,6 \pm 0,1$	$5,3 \pm 1,1^*$	$1,6 \pm 0,3^{* \#}$
Araquidônico (AA 20:4n-6)	$24,4 \pm 1,2$	$5,5 \pm 0,6^*$	$13,8 \pm 1,4^{* \#}$
EPA (20:5n-3)	$0,5 \pm 0,05$	$2,4 \pm 0,4^*$	$0,9 \pm 0,1^{* \#}$
DHA (22:6n-3)	$2,6 \pm 0,2$	$3,6 \pm 0,5$	$2,3 \pm 0,2$
Razão n-6/n-3	13,4:1	2,8:1	8:1

FONTE: O AUTOR (2011).

4.4. Expressão de COX-2

A expressão da COX-2 (unidades arbitrárias) da massa tumoral obtida dos animais dos grupos estudados está apresentada na figura 7. No grupo sem suplementação (W) a expressão foi de $219,4 \pm 3,7$. A suplementação com óleo de peixe (OPW) ou Oro Inka (OIW) causou redução na expressão em que no grupo OPW foi de $181,5 \pm 3,3$ e OIW de $182,0 \pm 4,2$, respectivamente. Ambas as suplementações causaram redução de $\sim 20\%$ na expressão da COX-2 quando comparado ao não suplementado ($p < 0,05$ vs. W).



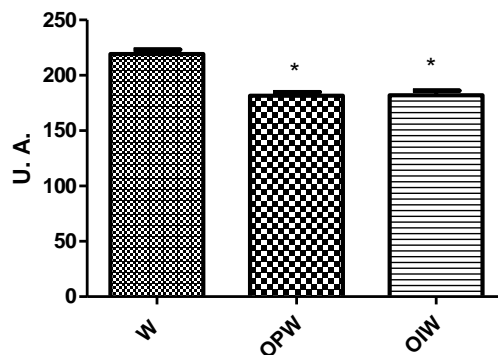


FIGURA 7: EXPRESSÃO DE COX-2 NO TECIDO TUMORAL (UNIDADES ARBITRÁRIAS) DE RATOS PORTADORES DO TUMOR DE WALKER 256 ALIMENTADOS COM DIETA PADRÃO (W), SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE (OPW) OU ORO INKA (OIW). OS DADOS ESTÃO APRESENTADOS COMO MÉDIA \pm EPM DE 20 ANIMAIS POR GRUPO. * $p < 0,05$ vs. W
 FONTE: O AUTOR (2011).

4.5. Proliferação de Células Tumorais “*ex vivo*”

Na figura 8 estão apresentados os dados sobre a proliferação das células tumorais “*ex vivo*” no período de 24 horas em contagem por minuto (cpm). No grupo sem suplementação (W) a proliferação foi de ~ 832 cpm. No grupo suplementado com óleo de peixe (OPW) ou Oro Inka (OIW) a proliferação foi de ~274 com e ~298, respectivamente, ou seja 3 vezes menor ($p < 0,05$) quando comparada à dos animais sem suplementação (W).

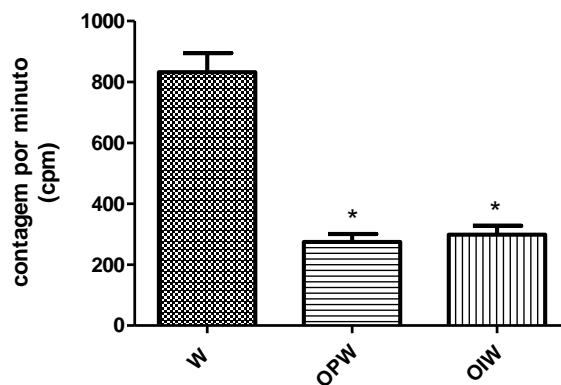


FIGURA 8: PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS *EX VIVO* (CPM) OBTIDAS DE RATOS PORTADORES DO TUMOR DE WALKER 256 ALIMENTADOS COM DIETA PADRÃO (W), SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE (OPW) OU ORO INKA (OIW). OS DADOS ESTÃO APRESENTADOS COMO MÉDIA \pm EPM DE 5 CULTIVOS EM DUPLICATA.

* $p < 0,05$ vs. W.

FONTE: O AUTOR (2011).

4.6. Determinação de lipoperóxidos no tecido tumoral

A concentração de lipoperóxidos (mmol/mg de proteína) no tecido tumoral dos animais do grupo portador de tumor sem suplementação (W) foi de $45,4 \pm 3,2$. Nos animais do grupo OPW e OIW foi de $75,1 \pm 2,8$, e $80,2 \pm 8,6$, respectivamente, ou seja, quase dobrou, o que foi significativo ($p < 0,05$). Não houve diferença na concentração de lipoperóxidos no tecido tumoral entre os grupos suplementados ($p < 0,05$).

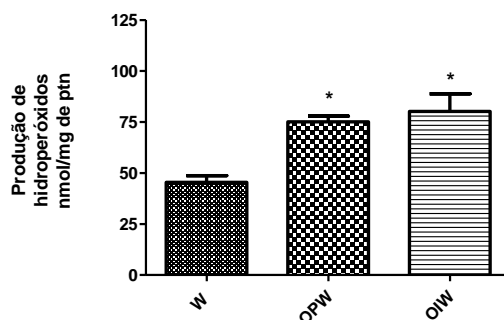


FIGURA 9: CONCENTRAÇÃO DE LIPOPERÓXIDOS NO TECIDO TUMORAL (NMOL/MG DE PTN) OBTIDO DE RATOS NÃO SUPLEMENTADOS (W), SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE (OPW) OU ORO INKA (OIW). OS DADOS REPRESENTAM A MÉDIA \pm EPM. * $p < 0,05$ VS. W. FONTE: O AUTOR (2011).

Parâmetros Bioquímicos de Caquexia

4.7. Glicemia

A glicemia (mg/dL) está representado na figura 10. A glicemia dos animais dos grupos não portadores alimentados com dieta padrão (C) foi de $89,1 \pm 1,8$; no suplementado com óleo de peixe (OP) foi de $93,3 \pm 2,5$ e com Oro Inka (OI) foi de $94,5 \pm 3,0$, não sendo diferentes entre si ($P > 0,05$). Nos grupos portadores de tumor alimentados com dieta padrão (W) a glicemia foi de $70,6 \pm 2,6$ a qual foi reduzida significativamente quando comparada à do controle ($p < 0,05$). A suplementação com óleo peixe (OPW) impediu queda da glicemia a qual foi de $87,8 \pm 3,3$, assim como à com Oro Inka (OIW) a qual foi de $87,5 \pm 2,8$ ($p < 0,05$ vs. W)

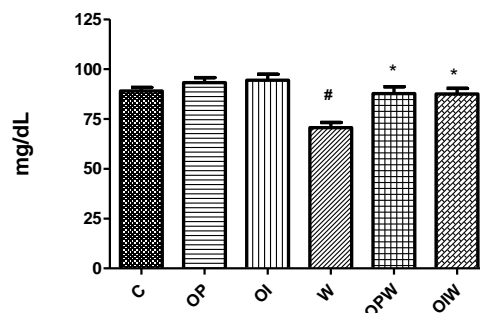


FIGURA 10: GLICEMIA (MG/DL) DOS RATOS NÃO PORTADORES DE TUMOR ALIMENTADOS COM DIETA PADRÃO (C), SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE (OP) OU ORO INKA (OI) E RATOS PORTADORES DO TUMOR DE WALKER 256 ALIMENTADOS COM DIETA PADRÃO (W), SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE (OPW) OU ORO INKA (OIW). OS DADOS REPRESENTAM A MÉDIA \pm EPM DE 20 ANIMAIS. # $p < 0,05$ VS. C; * $p < 0,05$ VS. W
 FONTE: O AUTOR (2011).

4.8. Triacilglicerolemia

A triacilglicerolemia (mg/dL) está apresentada na figura 11. A suplementação com óleo de peixe (OP $35,8 \pm 4,3$) ou Oro Inka (OI $36,3 \pm 3,6$) não alterou a triacilglicerolemia dos animais não portadores de tumor quando comparada à do grupo controle (C $42,0 \pm 5,8$). Entretanto a presença do tumor elevou a triacilglicerolemia significativamente (1,6 vezes) no grupo não suplementado para $69,0 \pm 5,8$ ($p < 0,05$ vs. C). A suplementação com óleo de peixe (OPW $46,2 \pm 4,3$) ou Oro Inka (OIW $45,9 \pm 4,0$) impediram elevação da triacilglicerolemia sendo similar estatisticamente à de seus pares sem tumor ($p > 0,05$), mas foi significativamente menor que à do grupo W ($p < 0,05$).

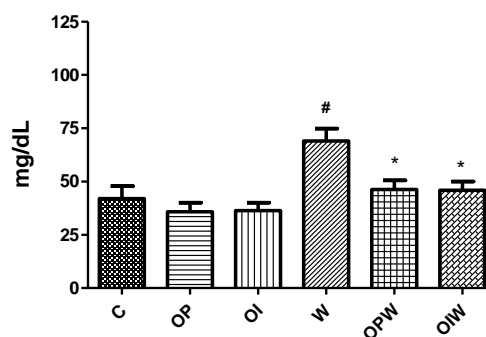


FIGURA 11: CONCENTRAÇÃO DE TRIACILGLICEROL PLASMÁTICO (MG/DL) DO GRUPO CONTROLE DE RATOS NÃO PORTADORES DE TUMOR ALIMENTADOS COM DIETA PADRÃO (C), SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE (OP) OU ORO INKA (OI) E RATOS PORTADORES DO TUMOR DE WALKER 256 ALIMENTADOS COM DIETA PADRÃO (W) SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE (OPW) E ORO INKA (OIW). OS DADOS SÃO MÉDIA \pm EPM DE 20 ANIMAIS POR GRUPO. # $p < 0,05$ VS. C; * $p < 0,05$ VS. W.
 FONTE: O AUTOR (2011).

Citocinas Plasmáticas

4.9. TNF- α

A concentração de TNF- α do plasma (pg/mL) está apresentada na Figura 12. Nos animais não portadores de tumor alimentados com dieta padrão foi de $30,1 \pm 3,0$, óleo de peixe foi de $27,12 \pm 2,9$ e Oro Inka foi de $24,6 \pm 1,9$, não havendo diferença entre eles ($P > 0,05$). A presença do tumor elevou a concentração de TNF- α circulante no grupo sem suplementação (W) para $49,5 \pm 3,1$ elevação esta maior que 50% ($p < 0,05$). Por outro lado, mesmo com a presença do tumor a suplementação com óleo de peixe ou Oro Inka induziram na circulação dos animais do grupo OPW concentração de $29,1 \pm 2,3$ e no OIW de $30,0 \pm 2,3$, as quais não foram diferentes das de seus pares sem tumor ($p > 0,05$).

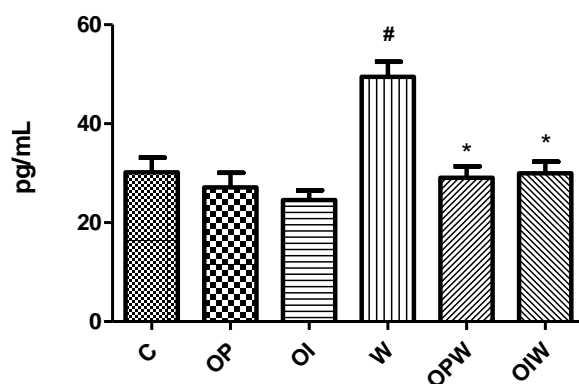


FIGURA 12: TNF- α PLASMÁTICO (PG/ML) DOS ANIMAIS DOS GRUPOS NÃO PORTADORES DE TUMOR ALIMENTADOS COM DIETA PADRÃO (C), SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE (OP) OU ORO INKA (OI) E PORTADORES DO TUMOR ALIMENTADOS COM DIETA PADRÃO (W), SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE (OPW) OU ORO INKA (OIW). OS DADOS REPRESENTAM A MÉDIA \pm EPM DE 20 ANIMAIS POR GRUPO. # $p < 0,05$ vs. C; * $p < 0,05$ vs. W. FONTE: O AUTOR (2011).

4.10. IL-6

A concentração de IL-6 plasmática (ng/mL) está apresentada na figura 13. Nos animais não portadores de tumor alimentados com dieta padrão foi de $18,8 \pm 1,2$, óleo de peixe foi de $15,7 \pm 1,6$ e Oro Inka foi de $15,32 \pm 0,9$, não havendo diferença estatística entre eles ($P > 0,05$). A presença do tumor elevou a concentração de TNF- α circulante no grupo sem suplementação (W) para $26,0 \pm 2,7$ elevação esta de 1,4 vezes ($p < 0,05$). Contudo, mesmo com a presença do tumor, a suplementação com óleo de peixe ou Oro Inka induziram na circulação

dos animais do grupo OPW concentração de $16,3 \pm 1,2$ e no OIW de $16,0 \pm 0,9$, as quais não foram diferentes das de seus pares sem tumor ($p > 0,05$).

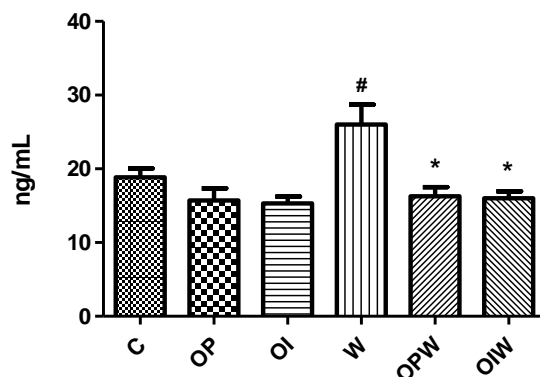


FIGURA 13: IL-6 PLASMÁTICA (NG/ML) DOS ANIMAIS DOS GRUPOS NÃO PORTADORES DE TUMOR ALIMENTADOS COM DIETA PADRÃO (C), SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE (OP) OU ORO INKA (OI) E RATOS COM TUMOR ALIMENTADOS COM DIETA PADRÃO (W), SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE (OPW) OU ORO INKA (OIW). OS DADOS REPRESENTAM A MÉDIA \pm EPM DE 20 ANIMAIS POR GRUPO. # $p < 0,05$ vs. C; * $p < 0,05$ vs. W. FONTE: O AUTOR (2011).

Parâmetros Imunitários

Macrófagos

4.11. Fagocitose

Na figura 14 estão apresentados os resultados da fagocitose (%) de zimosan pelos macrófagos peritoneais obtidos dos animais tendo como referencia o grupo controle C expresso em $100,0 \pm 2,3$. A suplementação com óleo de peixe ou Oro Inka elevou em aproximadamente 20% a capacidade fagocítica dos macrófagos peritoneais sendo no OP de $120,5 \pm 17,6$ e no OI de $122,1 \pm 9,1$, significativamente maiores que o grupo sem suplementação ($p < 0,05$ vs. C). A presença do tumor no grupo sem suplementação (W) fez com que a fagocitose fosse de $88,7 \pm 1,2$, significativamente menor (11%) que a do grupo sem tumor ($p < 0,05$ vs. C). A suplementação com óleo de peixe no grupo com tumor (OPW) ou Oro Inka fez com que a fagocitose também se elevasse em aproximadamente 20% ou seja, no OPW de $119,1 \pm 12,2$ e no OIW de $119,0 \pm 7,3$ ($p < 0,05$ vs. C e W).

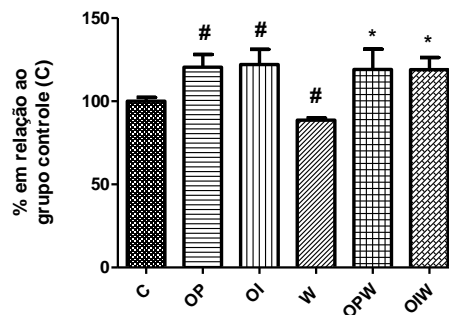


FIGURA 14: FAGOCITOSE (%) DE ZIMOSAN PELOS MACRÓFAGOS PERITONEAIS. OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM COMPARAÇÃO AO GRUPO ALIMENTADO COM DIETA PADRÃO SEM TUMOR (C). OP E OI SÃO DOS GRUPOS SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE OU ORO INKA, RESPECTIVAMENTE. RETENÇÃO PELOS MACRÓFAGOS DOS RATOS PORTADORES DO TUMOR DE WALKER 256 ALIMENTADOS COM DIETA PADRÃO (W), SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE (OPW) OU ORO INKA (OIW). OS DADOS REPRESENTAM A MÉDIA \pm EPM DE 5 EXPERIMENTOS. # $p < 0,05$ vs. C; * $p < 0,05$ vs. W. FONTE: O AUTOR (2011).

4.12. Retenção de vermelho neutro.

A retenção de vermelho neutro (%) pelos macrófagos peritoneais de todos os grupos em relação ao grupo controle ($100,0 \pm 3,2$) está apresentada na figura 15. A suplementação com óleo de peixe ($108,6 \pm 5,1$) e Oro Inka ($108,3 \pm 2,4$) elevou em 8% a retenção, a qual não foi significativa quando comparada à do C ($p > 0,05$). A presença do tumor no grupo sem suplementação (W $91,2 \pm 2,5$) reduziu a retenção em 9%. Nos grupos portadores de tumor suplementados com óleo de peixe (OPW) a retenção foi de $123,8 \pm 7,5$ e com Oro Inka (OIW) foi de $122,3 \pm 5,5$, incremento de 22% em relação ao C ($p < 0,05$) e de 30% ao W ($p < 0,001$).

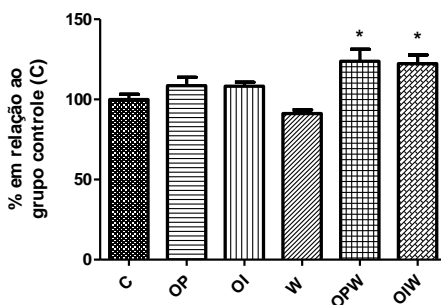


FIGURA 15: RETENÇÃO DE VERMELHO NEUTRO PELOS MACRÓFAGOS PERITONEAIS. OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM COMPARAÇÃO AO GRUPO ALIMENTADO COM DIETA PADRÃO SEM TUMOR (C). OP E OI SÃO DOS GRUPOS SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE OU ORO INKA, RESPECTIVAMENTE. RETENÇÃO PELOS MACRÓFAGOS DOS RATOS PORTADORES DO TUMOR DE WALKER 256 ALIMENTADOS COM DIETA PADRÃO (W), SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE (OPW) OU ORO INKA (OIW). OS DADOS REPRESENTAM A MÉDIA \pm EPM DE 5 EXPERIMENTOS. * $p < 0,05$ vs. W. FONTE: O AUTOR (2011).

4.13. Ânion superóxido (AS).

Produção de Ânion Superóxido (%) pelos macrófagos peritoneais de todos os grupos em relação ao grupo controle (100,0±8,2) está apresentada na figura 16. A suplementação com óleo de peixe (OP) duplicou a produção de AS sendo de 204,1±19,4 o mesmo sendo observado para Oro Inka (OI) sendo de 207,1±20,1. No grupo portador de tumor sem suplementação (W) houve elevação de 58% sendo 157,9±6,9. Já a suplementação com óleo de peixe (OPW) ou Oro Inka duplicou a produção, tal qual observado nos seus pares sem tumor sendo de 207,0±15,6 e 202,0±16,6, respectivamente ($p < 0,001$ vs. C; $p < 0,05$ vs. W).

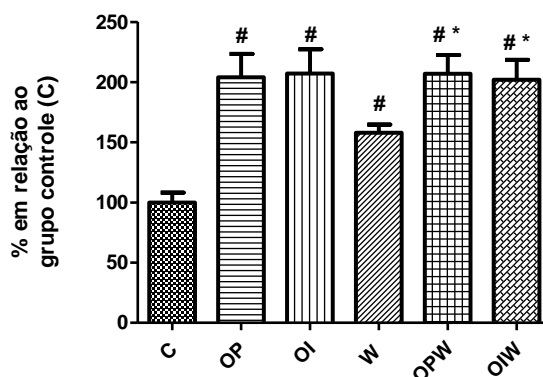


FIGURA 16: PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO (%) PELOS MACRÓFAGOS PERITONEAIS. OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM COMPARAÇÃO AO GRUPO ALIMENTADO COM DIETA PADRÃO SEM TUMOR (C). OP E OI SÃO DOS GRUPOS SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE OU ORO INKA, RESPECTIVAMENTE. PRODUÇÃO DE ANION SUPERÓXIDO PELOS MACRÓFAGOS DOS RATOS PORTADORES DO TUMOR DE WALKER 256 ALIMENTADOS COM DIETA PADRÃO (W), SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE (OPW) OU ORO INKA (OIW). OS DADOS REPRESENTAM A MÉDIA ± EPM DE 5 EXPERIMENTOS. # $p < 0,05$ vs. C; * $p < 0,05$ vs. W. FONTE: O AUTOR (2011).

Produção de Citocinas por Macrófagos Peritoneais.

4.14. TNF- α

A produção de TNF- α (pg/mL) dos macrófagos peritoneais está apresentada na figura 17. No grupo sem tumor sem suplementação (C) a produção de TNF- α na ausência e presença de LPS foi de 204,6±30,6 e 447,6±46,9, respectivamente. Introduzindo a suplementação com óleo de peixe (OP) foi de 186,9±36,1 e 392,7±31,8, ou com Oro Inka (OI) foi de 184,4±26,9 e 381,1±38,6, respectivamente. Não houve diferença entre estes grupos na ausência de LPS ou na presença deste ($p > 0,05$), contudo foi diferente significativamente, mais que o dobro quando se compara o mesmo grupo na presença de LPS ($p < 0,001$; LPS vs. ausência). A presença do tumor elevou a produção de TNF- α no grupo sem suplementação (W) na

ausência de LPS para $328,1 \pm 40,4$ ($p < 0,05$ vs. C) e a adição de LPS dobrou a produção sendo de $664,0 \pm 33,1$ ($p < 0,001$ vs. C/LPS). A suplementação com óleo de peixe no grupo portador de tumor (OPW) na ausência de estímulo elevou a produção para $262,3 \pm 33,2$, mas esta não foi diferente da observada no seu par sem tumor ($p > 0,05$ vs. OP). Na presença de LPS a produção atingiu $429,9 \pm 42,0$, a qual foi significativamente maior quando comparada a ausência de estímulo ($p < 0,001$ vs. OPW), mas não foi diferente da de seu par sem tumor ($p > 0,05$ vs. OP c/LPS). A suplementação com Oro Inka na ausência de estímulo (OIW) elevou a produção de TNF- α para $275,7 \pm 40,0$, a qual foi similar a de seu par sem tumor ($p > 0,05$ vs. OI). Na presença de LPS (OIW/LPS) a produção foi de $434,7 \pm 55,7$, sendo significativamente maior quando comparada a ausência de LPS ($p < 0,001$ vs. OIW) mas não foi estatisticamente diferente da de seu par com LPS sem tumor ($p > 0,05$ vs. OI c/LPS). Tanto no grupo OPW quanto no OIW, na presença de LPS, os macrófagos peritoneais produziram similar concentração de TNF- α quando comparada à do grupo sem suplementação ($p < 0,05$ vs. W c/LPS).

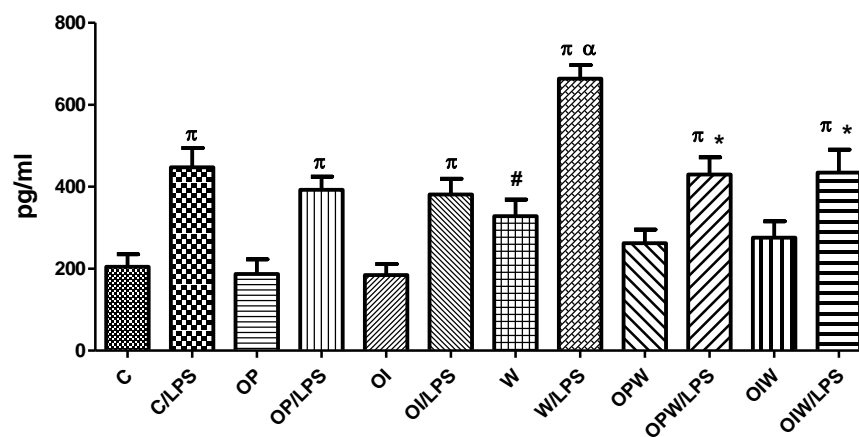


FIGURA 17: PRODUÇÃO DE TNF- α (PG/ML) NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS), PELOS MACRÓFAGOS PERITONEAIS OBTIDOS DOS RATOS SEM TUMOR ALIMENTADOS COM DIETA PADRÃO (C), SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE (OP) OU ORO INKA (OI), RATOS COM TUMOR ALIMENTADOS COM DIETA PADRÃO (W), SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE (OPW) OU ORO INKA (OIW). OS DADOS REPRESENTAM A MÉDIA \pm EPM DE 5 CULTIVOS EM DUPLICATA GRUPO. π $p < 0,05$ vs. ausência de LPS; # $p < 0,05$ vs. C; α $p < 0,05$ vs. C/LPS; * $p < 0,05$ vs. W/LPS.

FONTE: O AUTOR (2011).

4.15. IL-6

A produção de IL-6 (pg/mL) dos macrófagos peritoneais está apresentada na figura 18. No grupo sem tumor, sem suplementação e sem LPS, a produção foi de $36,5 \pm 2,8$. Na presença de LPS (C/LPS) foi de $53,2 \pm 2,7$, elevação significativa ($p < 0,05$). A suplementação com óleo de peixe no grupo sem estímulo (OP) e com LPS (OP/LPS) a produção foi de $32,9 \pm 2,3$ e $51,8 \pm 2,8$, respectivamente, incremento este significativo quanto comparado a ausência de estímulo ($p < 0,05$ vs. OP). O mesmo foi observado com a suplementação com Oro Inka (OI) na ausência de estímulo, com produção de $36,1 \pm 0,9$ e com LPS (OI/LPS) de $50,8 \pm 2,1$ ($p < 0,01$ vs. OI). A presença de tumor no grupo sem suplementação sem LPS, a produção de IL-6 foi de $46,7 \pm 1,9$, a qual foi significativamente maior quando comparada à do grupo C ($p < 0,001$). A adição de LPS (W/LPS) incrementou ainda mais a produção para $63,6 \pm 1,3$ ($p < 0,05$ vs. W). No grupo portador de tumor suplementado com óleo de peixe (OPW), a produção de IL-6 pelos macrófagos peritoneais na ausência de estímulo foi de $36,1 \pm 2,6$ ($p > 0,05$ vs. OP). Na presença do estímulo LPS (OPW/LPS) a produção elevou-se significativamente para $48,6 \pm 2,0$ ($p < 0,05$ vs. OP). Já no grupo com tumor suplementado com Oro Inka (OIW) na ausência de estímulo a produção foi de $34,3 \pm 2,6$ e OIW/LPS $49,0 \pm 2,0$. Tanto na situação sem estímulo bem como com LPS, a concentração de IL-6 nos grupos portadores de tumor suplementados com os diferentes óleos (OPW e OIW) foi significativamente menor que à do grupo sem suplementação ($p < 0,05$ vs. W)

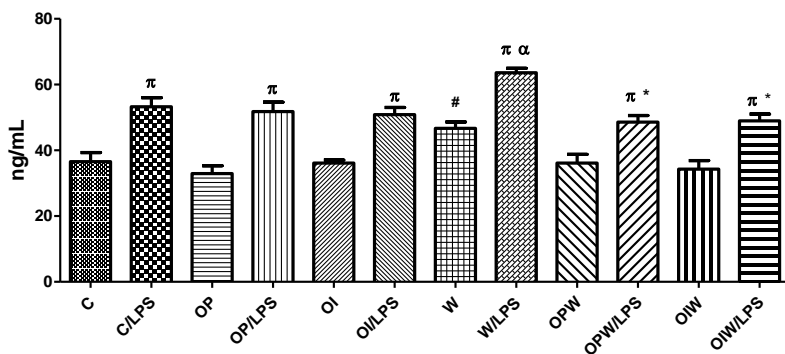


FIGURA 18: PRODUÇÃO DE IL-6 (NG/ML) NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS), PELOS MACRÓFAGOS PERITONEAIS OBTIDOS DOS RATOS SEM TUMOR ALIMENTADOS COM DIETA PADRÃO (C), SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE (OP) OU ORO INKA (OI), RATOS COM TUMOR ALIMENTADOS COM DIETA PADRÃO (W), SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE (OPW) OU ORO INKA (OIW). OS DADOS REPRESENTAM A MÉDIA ± EPM DE 5 CULTIVOS EM DUPLICATA GRUPO. π $p < 0,05$ vs. ausência de LPS; # $p < 0,05$ vs. C; α $p < 0,05$ vs. C/LPS; * $p < 0,05$ vs. W/LPS.

FONTE: O AUTOR (2011).

Neutrófilos

4.16. Fagocitose

Na figura 19 apresenta os resultados referentes à fagocitose (%) de zimosan pelos neutrófilos sanguíneos obtidos dos animais, tendo como referencia o grupo controle C expresso em $100,0 \pm 6,5$. No grupo sem tumor suplementado com óleo de peixe (OP) ou Oro Inka (OI) a fagocitose foi de $202,3 \pm 12,7$ e $191,7 \pm 10,0$, respectivamente, praticando dobrando-a ($p < 0,001$ vs. C). A presença do tumor no grupo sem suplementação (W) fez com que a fagocitose dos neutrófilos fosse de $125,7 \pm 5,9$, elevação de 25% ($p < 0,05$ vs. W). A suplementação com óleo de peixe (OPW) ou Oro Inka quase dobrou a fagocitose sendo de $196,9 \pm 18,7$ e $OIW 185,8 \pm 13,0$, respectivamente, significativa quando comparada ao W ($p < 0,05$) Não houve diferença estatística entre os grupos suplementados sem e com tumor ($p > 0,05$).

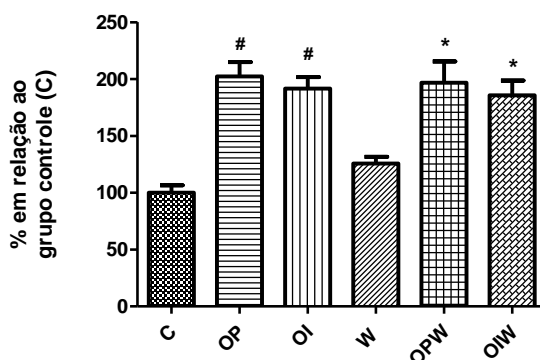


FIGURA 19: FAGOCITOSE (%) DE ZIMOSAN PELOS NEUTRÓFILOS. OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM COMPARAÇÃO AO GRUPO ALIMENTADO COM DIETA PADRÃO SEM TUMOR (C). OP E OI SÃO DOS GRUPOS SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE OU ORO INKA, RESPECTIVAMENTE. RETENÇÃO PELOS MACRÓFAGOS DOS RATOS PORTADORES DO TUMOR DE WALKER 256 ALIMENTADOS COM DIETA PADRÃO (W), SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE (OPW) OU ORO INKA (OIW). OS DADOS REPRESENTAM A MÉDIA \pm EPM DE 5 EXPERIMENTOS.

$p < 0,05$ vs. C; * $p < 0,05$ vs. W.

FONTE: O AUTOR (2011).

4.17. Retenção de vermelho neutro.

A retenção de vermelho neutro (%) pelos neutrófilos de todos os grupos em relação ao grupo controle ($100,0 \pm 4,3$) está apresentada na figura 20. A suplementação com óleo de peixe no grupo sem tumor (OP) elevou a retenção em 21% sendo de $121,0 \pm 4,8$ e com Oro Inka (OI) em 7% sendo de $107,9 \pm 5,6$. Não houve diferença estatística quando comparadas ao grupo

controle ($P>0,05$). A presença do tumor (W) elevou a retenção para 34% sendo de $134,6\pm 6,8$, significativamente diferente quando comparada ao controle ($p<0,05$). Nos grupos com tumor suplementados com óleo de peixe (OPW) a retenção foi de $(181,8\pm 11,5)$ e com Oro Inka (OIW) de $177,6\pm 12,9$, ambas significativas quando comparadas ao grupo W ($p<0,01$).

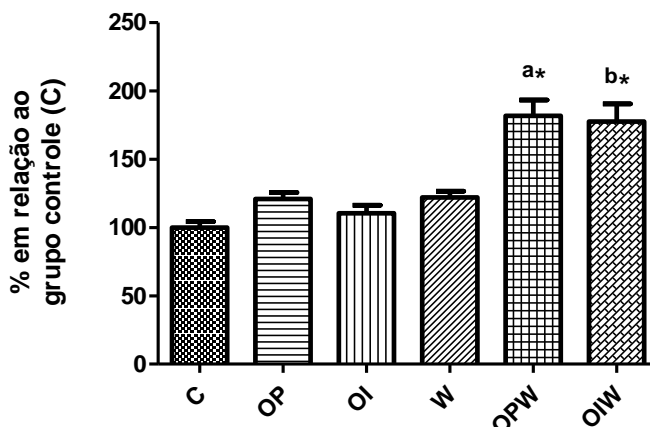


FIGURA 20: RETENÇÃO DE VERMELHO NEUTRO PELOS NEUTRÓFILOS. OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM COMPARAÇÃO AO GRUPO ALIMENTADO COM DIETA PADRÃO SEM TUMOR (C). OP E OI SÃO DOS GRUPOS SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE OU ORO INKA, RESPECTIVAMENTE. RETENÇÃO PELOS MACRÓFAGOS DOS RATOS PORTADORES DO TUMOR DE WALKER 256 ALIMENTADOS COM DIETA PADRÃO (W), SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE (OPW) OU ORO INKA (OIW). OS DADOS REPRESENTAM A MÉDIA \pm EPM DE 5 EXPERIMENTOS. ^a $p<0,05$ vs. OP; ^b $p<0,05$ vs. OI; * $p<0,05$ vs. W. FONTE: O AUTOR (2011).

4.18. Ânion superóxido (AS).

Produção de Ânion Superóxido (%) pelos neutrófilos de todos os grupos em relação ao grupo controle ($100,0\pm 10,7$) está apresentada na figura 21. Tanto a suplementação quanto a presença do tumor elevaram significativamente a produção de anion superóxido pelos neutrófilos quando comparados ao controle ($p<0,001$) sendo no grupo OP de $190,7\pm 9,7$, no (OI) de $185,3\pm 10,7$, no com tumor sem suplementação (W) de $209,8\pm 14,1$; com óleo de peixe (OPW) de $210,7\pm 8,2$ e Oro Inka (OIW) de $214,8\pm 12,1$. Não houve diferença entre estes grupos ($p>0,05$).

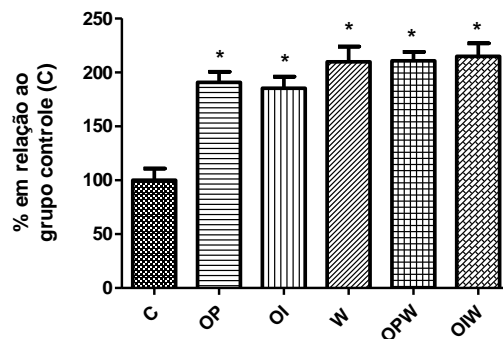


FIGURA 21: PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO (%) PELOS NEUTRÓFILOS. OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM COMPARAÇÃO AO GRUPO ALIMENTADO COM DIETA PADRÃO SEM TUMOR (C). OP E OI SÃO DOS GRUPOS SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE OU ORO INKA, RESPECTIVAMENTE. PRODUÇÃO DE ANION SUPERÓXIDO PELOS MACRÓFAGOS DOS RATOS PORTADORES DO TUMOR DE WALKER 256 ALIMENTADOS COM DIETA PADRÃO (W), SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE (OPW) OU ORO INKA (OIW). OS DADOS REPRESENTAM A MÉDIA \pm EPM DE 5 EXPERIMENTOS. # $p < 0,05$ vs. C. FONTE: O AUTOR (2011).

Linfócitos Mesentéricos

4.19. Proliferação de linfócitos.

A proliferação dos linfócitos mesentéricos (cpm) obtidos dos animais dos diferentes grupos está representada na figura 22. Na ausência do mitógeno a proliferação dos linfócitos mesentéricos do grupo controle (C) foi de $284,3 \pm 18,3$. A adição de concanavalina A (ConA) quadruplicou a proliferação significativamente ($p < 0,05$ vs. C) sendo de $1006,0 \pm 76,4$. No grupo sem tumor e suplementado com óleo de peixe (OP) a proliferação na ausência de ConA foi de $156,7 \pm 11,7$, a qual foi estatisticamente menor quando comparada ao C ($p < 0,05$). A adição do mitógeno (OP/ConA) incrementou a proliferação para $1105,0 \pm 31,0$ elevação na proliferação de quase sete vezes, a qual foi significativa quando comparada a ausência do mitógeno ($p < 0,001$ vs. OP) mas não foi diferente quando comparada à do grupo controle com mitógeno ($p > 0,05$ vs. C/ConA). A suplementação com Oro Inka causou efeito similar ao observado anteriormente onde na ausência do mitógeno (OI) a proliferação foi de $136,9 \pm 12,5$ significativamente menor quando comparada à proliferação do controle ($p < 0,05$ vs. C) e na presença do mitógeno (OI/ConA) a proliferação elevou-se para $1097,0 \pm 37,7$, sendo sete vezes maior que a proliferação basal ($p < 0,001$ vs. OI), mas não foi diferente da do controle ($p > 0,05$ vs. C/ConA). No grupo portador de tumor sem suplementação (W) a proliferação basal foi de $374,5 \pm 30,3$ significativamente maior que à do C ($p < 0,05$). A adição de concanavalina A

(W/ConA) estimulou ainda mais a proliferação sendo de $1808,0 \pm 120,4$, em aproximadamente cinco vezes ($p < 0,001$ vs. W) e quando comparada ao controle na presença de ConA o incremento foi significativo ($p < 0,05$ vs. C/ConA). Nos grupos com tumor suplementado com óleo de peixe na ausência de estímulo (OPW) a proliferação foi de $243,0 \pm 12,3$ e com estímulo (OPW/ConA) foi de $1050,0 \pm 78,1$, resultados similares aos seus pares sem tumor ($p > 0,05$), mas significativamente menor quando comparado ao grupo sem suplementação, com ou sem ConA ($p < 0,05$ vs. W). O mesmo resultado foi observado pela suplementação com Oro Inka onde na ausência de ConA (OIW) foi de $217,0 \pm 19,1$ e com o mitógeno (OIW/ConA) de $1136,0 \pm 49,02$ em que não foram diferentes de seus pares sem tumor (OI), mas significativamente diferente do grupo com tumor sem suplementação com ou sem mitógeno ($p < 0,05$ vs. W).

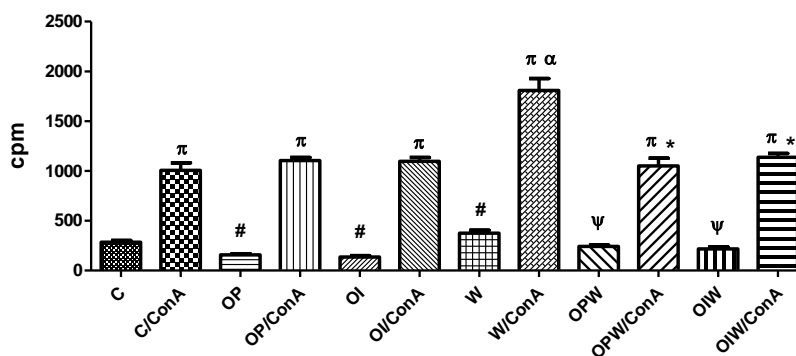


FIGURA 22: PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS MESENTÉRICOS (CPM), NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE CONCANAVALINA A (CONA), OBTIDOS DOS ANIMAIS DO GRUPO SEM TUMOR ALIMENTADO COM DIETA PADRÃO (C), SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE (OP) OU ORO INKA (OI), RATOS PORTADORES DO TUMOR ALIMENTADOS COM DIETA PADRÃO (W), SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE (OPW) OU ORO INKA (OIW). OS DADOS REPRESENTAM A MÉDIA \pm EPM DE 5 CULTIVOS EM DUPLICATA POR GRUPO. π $p < 0,05$ vs. ausência de ConA; # $p < 0,05$ vs. C; α $p < 0,05$ vs. C/ConA; ψ $p < 0,05$ vs. W; * $p < 0,05$ vs. W/ConA.

FONTE: O AUTOR (2011).

4.20. Quantificação de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ do linfonodo mesentérico

O % de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ dos linfonodos mesentéricos foi efetuada por citometria de fluxo e está apresentada na Figura 23 e 24. A % de linfócitos T auxiliares ou *helper* (Th) (CD4⁺) nos grupos C foi de $55,3 \pm 1,3$; no OP foi de $57,4 \pm 1,8$ e no OI foi de $57,4 \pm 1,2$, não havendo diferença estatística entre eles ($p > 0,05$). Com a presença do tumor no grupo W foi de $57,7 \pm 3,5$; no OPW foi de $61,6 \pm 1,2$ e foi de OIW $57,8 \pm 0,6$, também não havendo significância entre os grupos ($p > 0,05$) e também quando comparados aos sem tumor ($p > 0,05$).

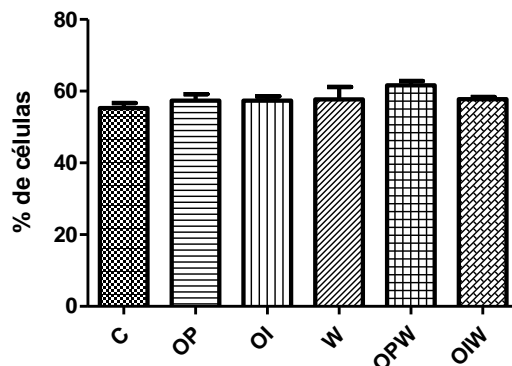


FIGURA 23: % DE LINFÓCITOS CD4⁺ DO LINFONODO MESENTÉRICO OBTIDOS DO GRUPO CONTROLE DE RATOS NÃO PORTADORES DE TUMOR ALIMENTADOS COM DIETA PADRÃO (C), SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE (OP) OU ORO INKA (OI) E RATOS PORTADORES DO TUMOR DE WALKER 256 ALIMENTADOS COM DIETA PADRÃO (W), SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE (OPW) E ORO INKA (OIW). OS DADOS REPRESENTAM A MÉDIA ± EPM DE 5 EXPERIMENTOS POR GRUPO.
FONTE: O AUTOR (2011).

Já para a população CD8⁺ o % no grupo C foi de 18,5±0,6; no OP foi de 19,9±1,1 e no OI foi de 20,4±0,8, não havendo diferença entre estes grupos ($p>0,05$). Na presença do tumor, no grupo W foi de 17,3±0,8, não sendo diferente da do grupo controle ($p>0,05$ vs. C). A suplementação com óleo de (peixe) OPW ou Oro Inka (OIW) elevou a % para 26,4±1,6 e 26,1±1,7, respectivamente, elevação esta significativa quando comparada ao grupo suplementado sem tumor ($p<0,001$ vs. W) e aos seus pares sem tumor ($p<0,001$ vs. OP e OI).

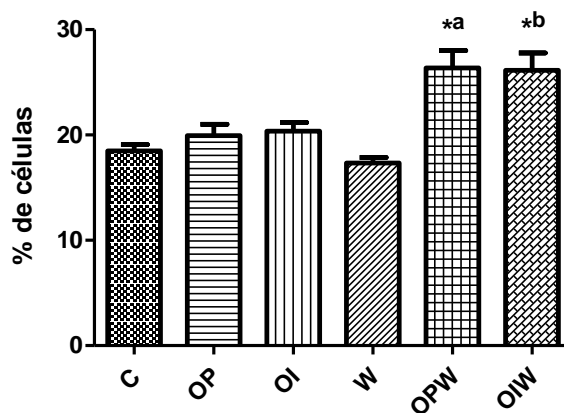


FIGURA 24: % DE LINFÓCITOS CD8⁺ OBTIDOS DO LINFONODO MESENTÉRICO DO GRUPO CONTROLE DE RATOS NÃO PORTADORES DE TUMOR ALIMENTADOS COM DIETA PADRÃO (C), SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE (OP) OU ORO INKA (OI) E RATOS PORTADORES DO TUMOR DE WALKER 256 ALIMENTADOS COM DIETA PADRÃO (W), SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE (OPW) E ORO INKA (OIW). OS DADOS REPRESENTAM A MÉDIA ± EPM DE 5 EXPERIMENTOS POR GRUPO. * $p<0,05$ vs. W; ^a $p<0,05$ vs. OP; ^b $p<0,05$ vs. OI.
FONTE: O AUTOR (2011).

A razão entre linfócitos CD4⁺/CD8⁺ está apresentada da figura 25. Nos grupos C foi de 2,99±0,04; no OP foi de 2,92±0,16 e no OI foi de 2,90±0,14, não havendo significância estatística entre eles (p>0,05). A presença do tumor no grupo sem suplementação provocou uma pequena elevação (W 3,52±0,17), mas não foi significativa em comparação ao grupo controle (p>0,05). Contudo, na presença do tumor e das diferentes suplementações com óleo de peixe (OPW 2,43±0,16) ou Oro Inka (OIW 2,23±0,08), houve redução 31 e 37%, respectivamente, o que foi significativo quando comparado ao grupo W (p<0,05) de para os grupos portadores de tumor, mas não em relação aos seus pares sem tumor.

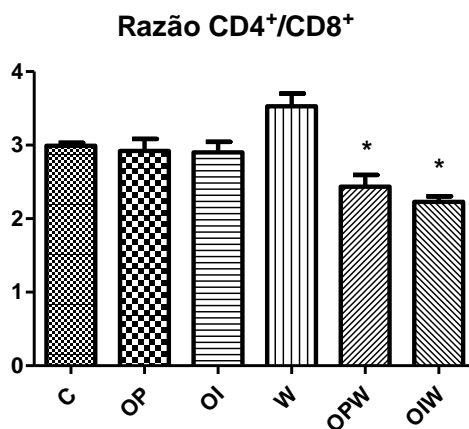


FIGURA 25: RAZÃO CD4⁺/CD8⁺ DE LINFÓCITOS DO LINFONODO MESENTÉRICO DO GRUPO CONTROLE DE RATOS NÃO PORTADORES DE TUMOR ALIMENTADOS COM DIETA PADRÃO (C), SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE (OP) OU ORO INKA (OI) E RATOS PORTADORES DO TUMOR DE WALKER 256 ALIMENTADOS COM DIETA PADRÃO (W), SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE (OPW) E ORO INKA (OIW). OS DADOS SÃO A MÉDIA ± EPM DE 5 EXPERIMENTOS POR GRUPO. * p< 0,05 VS. W.
FONTE: O AUTOR (2011).

Concentração de citocinas por linfócitos mesentéricos cultivados

4.21. TNF- α

A determinação da concentração de TNF- α (pg/mL), no meio de cultura, pelos linfócitos obtidos do linfonodo mesentérico está apresentada na figura 26. Na situação de ausência de estímulo (ConA) no grupo sem tumor e sem suplementação (C) a concentração desta citocina no meio de cultura foi de 25,8±2,7 e na adição do mitógeno (C/ConA) elevou-se para 97,0±13,3, praticamente quadruplicou, o que foi significativo (p<0,001). A suplementação com óleo peixe na ausência de tumor (OP) induziu a uma concentração de

31,7±4,8 ($p > 0,05$ vs. C) e a adição de mitógeno (OP/ConA) elevou também em quatro vezes (103,5±10,9) o que foi significativo ($p < 0,001$ vs. C/ConA); com suplementação com Oro Inka (OI) na ausência de estímulo foi de 44,1±7,8 ($p < 0,05$ vs. C) e a adição de concanavalina A (OI/ConA) também quadruplicou a concentração (114,0±9,8), que foi significativo quando comparado ao seu controle ($p < 0,001$ vs. C/ConA). Todos os grupos sem tumor na situação estimulada com ConA não apresentaram diferença estatística quando comparados entre si ($p > 0,05$). No grupo com tumor sem suplementação (W) a concentração no meio de cultura de TNF- α foi de 38,8±3,0. A adição do mitógeno (W/ConA) elevou a concentração para 75,6±5,0, duplicando-a significativamente ($p < 0,05$ vs. W), contudo não foi diferente estatisticamente quando comparado ao seu par estimulado sem tumor ($p > 0,05$ vs. C/ConA). Interessantemente no grupo portador de tumor suplementado com óleo de peixe na ausência de estímulo (OPW) a concentração da citocina era o dobro, ou seja, 70,0±7,1, da de seu par sem tumor ($p < 0,05$ vs. OP). A adição do mitógeno (OPW/ConA) elevou em duas vezes a concentração no meio (148,6±13,1), sendo esta significativa quando comparada a situação sem estímulo ($p < 0,05$ vs. OPW) e significativa quando comparada ao seu par sem tumor estimulado ($p < 0,001$ vs. OP/ConA). O mesmo foi observado com a suplementação com Oro Inka na ausência de ConA (OIW) em que a produção basal foi de 81,0±8,9 ($p < 0,05$ vs. OI) e a presença do agente estimulatório (OIW/ConA) elevou a concentração para 181,9±19,3, o que foi significativo ($p < 0,001$ vs. OIW) e também diferente do seu par sem tumor ($p < 0,0001$ vs. OI/ConA).

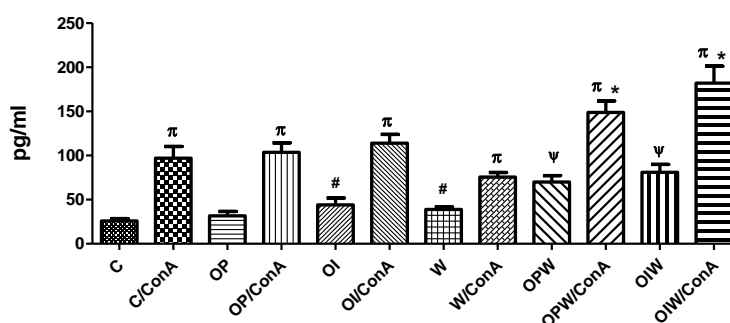


FIGURA 26: CONCENTRAÇÃO DE TNF- α (PG/ML) DE LINFÓCITOS MESENTÉRICOS, NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE CONCANAVALINA-A, OBTIDOS DE ANIMAIS SEM TUMOR ALIMENTADOS COM DIETA PADRÃO (C), SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE (OP) OU ORO INKA (OI) E PORTADORES DE TUMOR ALIMENTADOS COM DIETA PADRÃO (W), SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE (OPW) OU ORO INKA (OIW). OS DADOS REPRESENTAM A MÉDIA \pm EPM DE 5 EXPERIMENTOS POR GRUPO. π $p < 0,05$ vs. ausência de ConA; # $p < 0,05$ vs. C; ψ $p < 0,05$ vs. W; * $p < 0,05$ vs. W/ConA.

FONTE: O AUTOR (2011).

4.22. IL-6

A determinação da concentração de IL-6 (pg/mL), no meio de cultura, pelos linfócitos obtidos do linfonodo mesentérico está apresentada na figura 27. Na ausência de estímulo, a concentração de IL-6 no grupo sem tumor alimentado com ração normal (C), suplementado com óleo de peixe (OP) ou Oro Inka (OI) foi $38,0 \pm 3,1$, $30,3 \pm 2,4$ e $39,5 \pm 3,5$, respectivamente ($p > 0,05$). A adição do mitógeno elevou no C/ConA para $53,6 \pm 2,3$ no OP/ConA para $55,3 \pm 3,6$ e no OI/ConA para $54,2 \pm 2,2$, aumento este significativo quando comparado a ausência de estímulo ($p < 0,05$). Nos grupos com tumor sem suplementação (W), suplementado com óleo de peixe (OPW) ou Oro Inka (OIW) na ausência do mitógeno (W) a concentração de IL-6 foi de $44,8 \pm 2,7$, $40,4 \pm 3$ e $41,1 \pm 2,7$, respectivamente, não sendo a concentração diferente da de seus pares sem tumor ($p > 0,05$). A introdução do mitógeno ao meio de cultura provocou leve mas significativa elevação ($p < 0,05$ vs. ausência de mitógeno) onde no grupo sem suplementação (W/ConA) foi de $59,1 \pm 2,2$; com óleo de peixe (OPW/ConA) foi de $55,7 \pm 3,0$ e com Oro Inka (OIW/ConA) foi de $56,2 \pm 2,4$. A produção de IL-6 no estado estimulado com concanavalina não foi diferente entre os grupos sem ou com tumor ($p > 0,05$).

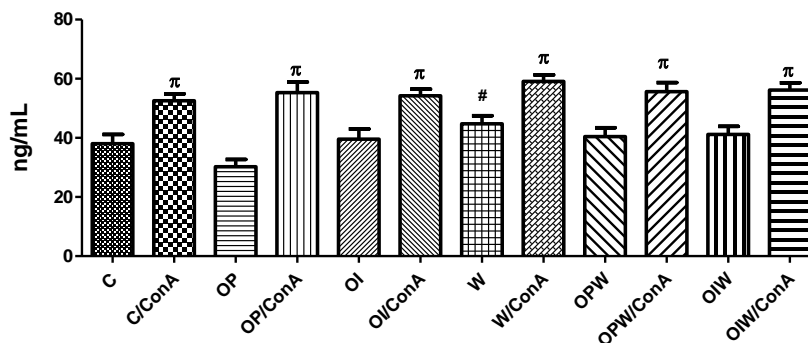


FIGURA 27: CONCENTRAÇÃO DE IL-6 (NG/ML), NO MEIO DE CULTURA, DE LINFÓCITOS MESENTÉRICOS, NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE CONCANAVALINA-A, OBTIDOS DE ANIMAIS SEM TUMOR ALIMENTADOS COM DIETA PADRÃO (C), SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE (OP) OU ORO INKA (OI) E PORTADORES DE TUMOR ALIMENTADOS COM DIETA PADRÃO (W), SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE (OPW) OU ORO INKA (OIW). OS DADOS REPRESENTAM A MÉDIA ± EPM DE 5 EXPERIMENTOS POR GRUPO. π $p < 0,05$ vs. ausência de ConA; # $p < 0,05$ vs. C. FONTE: O AUTOR (2011).

6. DISCUSSÃO

Pesquisando no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> e cruzando as palavras “câncer” e “Óleo de peixe” (*cancer and fish oil*) verificamos que nos últimos 30 anos, 1700 artigos foram publicados com este tema, e destes, vários têm demonstrado o efeito dos ácidos graxos n-3 em especial o óleo de peixe rico em EPA e DHA no câncer.

Estes estudos, experimentais e epidemiológicos confirmaram que, os AGPI n-3, principalmente o ácido eicosapentaenóico (EPA) e docosaexaenóico (DHA), promovem a ação de agentes anticarcinogênicos e atuam como agente anticancerígeno (STOLL, 2002; SIMOPOULOS, 2003; MAZZOTTA e JENEY, 2008; RIEDIGER, OTHMAN *et al.*, 2009; SIMOPOULOS, 2010), mas o papel do seu parental de origem vegetal o ácido graxo α -linolênico, o parental de todos os ácidos graxos n-3, na literatura, ainda apresenta poucos estudos sobre seus efeitos no câncer (ANDERSON e MA, 2009).

Alguns destes trabalhos têm verificado os efeitos da suplementação na dose de 1g por kg de peso corpóreo com óleo de peixe em animais portadores de tumor de Walker 256. Os efeitos nestes animais portadores de câncer foram; aumento do tempo de sobrevida, menor depleção de massa corpórea, redução do tamanho do tumor. O tecido tumoral destes animais, apresentou; maior taxa de lipoperoxidação, menor proliferação das células tumorais, menor expressão de Cox-2 e maior taxa de apoptose por apresentar maior incorporação de EPA. Também, ocorreu melhora dos parâmetros relacionados com a caquexia, como a manutenção da glicemia, redução da triacilglicerolemia e lactatemia e assim, os animais não apresentaram a instalação da caquexia. Na atividade do sistema imunológico ocorreu um aumento da atividade imunológica das células fagocíticas e redução na produção de citocinas inflamatórias por macrófagos e causou uma imunomodulação com redução da proliferação de linfócitos.

Neste estudo foi demonstrado que a suplementação na dose de 1 g/kg de peso corpóreo com o óleo Oro Inka, rico em ácidos graxos α -linolênico provocou nos animais portadores de tumor menor massa tumoral (Figura 6 – p. 39) e o efeito foi semelhante ao causado pelo óleo de peixe. Confirmou-se este resultado como os trabalhos de Togni *et al.*, (2003); Pinto Jr *et al.* (2004); Pizato, *et al.* (2005), Folador, *et al.* (2006); Mund, *et al.* (2007); Aikawa, *et al.*, (2008) e Belo, *et al.*, (2010), demonstraram que a suplementação com óleo de peixe apresentaram

menor a massa tumoral em ~50% no modelo experimental do tumor de Walker 256, comparado com seu controle.

Oikarinen, *et al.*, (2005), também demonstraram que a dieta contendo AGPI n-3 presentes no óleo de linhaça e de canola (ricos em ácidos graxos α -linolênico) diminuíram significativamente o número e o tamanho dos adenomas intestinais em camundongos e Truan, Chen e Thompson, (2010), demonstraram em camundongos portadores de tumor (MCF-7) alimentados com a dieta controle e suplementados com óleo de linhaça (40 g/kg) por 8 semanas apresentaram redução no tamanho do tumor (33%, $p < 0.05$) quando comparados aos animais controle.

O tamanho da massa tumoral está relacionado com o grau de caquexia presente no câncer e, esta causa; redução do consumo alimentar, intenso catabolismo das reservas energéticas com depleção de carboidratos, lipídeos e proteínas, resultando em acentuada perda de massa corpórea (FERNANDES, RAZI, *et al.*, 1999). Durante o período experimental o consumo de ração manteve-se inalterado (dados não mostrados) e os animais ganharam peso, mas uma maior massa tumoral presente no grupo W, resultou em um valor negativo do % de mudança de peso (Tabela 3 – p. 40), demonstrando uma redução significativa da massa corpórea. Já nos animais do grupo OIW, este parâmetro foi praticamente inalterado em relação aos seus controles sem tumor e para o grupo OPW. Desta forma, isto demonstra que a suplementação com o óleo Oro Inka pode contribuir como fator anti caquético, pois reverteu a perda de peso que é associada a caquexia do câncer.

Os ácidos graxos de cadeia longa de AA, EPA e DHA incorporados nos fosfolipídios de membrana celulares, além do seu papel na manutenção da estrutura, têm um papel funcional em servir como precursores de eicosanóides e docosanóides. AA e EPA são convertidos a eicosanóides que incluem prostaglandinas (PG), tromboxanos (TX), leucotrienos (LT), ácidos hidroxieicosatetraenóico (HETE) e ácidos hidroxiperoxieicosatetraenoico (HPETEs) e o DHA é convertido para docosanóides (RATNAYAKE e GALLI, 2009).

A incorporação de ácidos graxos dietéticos nas membranas plasmáticas podem modificar a funcionalidade das células. Assim os ácidos graxos n-3 presentes na dieta podem ser incorporados e substituir parcialmente os ácidos graxos n-6, principalmente o AA, nas membranas de provavelmente todas estas células, especialmente em plaquetas, hemácias,

neutrófilos, monócitos e células do fígado (SIMOPOULOS, 2002; SIMOPOULOS, 2006). sendo assim foi importante verificar a composição dos ácidos graxos no tecido tumoral.

A ração fornecida aos animais apresenta alta concentração de na sua composição lipídica de ácido linoléico (AL 18:2n-6), os óleos contém alta quantidade de ácidos graxos n-3, o óleo de peixe contém grande quantidade de ácido eicosapentaenóico (EPA - 20:5n-3) e ácido docosahexaenóico (DHA - 22:6n-3) e no óleo Oro Inka foi predominante em sua composição o ácido graxo α -linolênico (ALA - 18:3n-3) (Tabela 2 – p. 26).

No tecido tumoral a incorporação dos ácidos graxos (Tabela 4 – 41), para os AG saturados foi igual para todos os grupos. O ácido graxo oléico, a concentração no tecido tumoral do grupo OPW apresentou uma maior quantidade incorporada e diferença apenas para o grupo W. Para o AL (ácido graxo linoléico - 18:2n-6) este foi incorporado no tecido tumoral em quantidades semelhantes. O ácido graxo α -linolênico (ALA) que foi incorporado no tecido tumoral do grupo W foi 10 vezes menor comparado com o grupo OPW e 2,7 vezes menor que o grupo OIW. O grupo OPW apresentou 3,9 vezes maior quantidade ALA comparado com o grupo OIW.

A literatura relata que os tecidos preferencialmente metabolizam AGPI nesta ordem: n-3 > n-6 > n-9 e, isto é uma das principais razões da quantidade de ALA ser relativamente baixa nos tecidos. Devido ao alto percentual de conversão pelo organismo pela síntese “de novo” de ácido graxo pela via da para β -oxidação no fígado em ácidos graxos saturados e monoinsaturados (ácido graxo Palmítico (16:0), Palmitoléico (16:1n-7), Esteárico (18:0) e Oléico (18:1n-9)) (BARCELÓ-COBLIJN e MURPHY, 2009; RATNAYAKE e GALLI, 2009; McCUSKER e GRANT-KELS, 2010) (Fig. 28).

A concentração de ALA em fosfolipídios (PL) de plasma e tecidos é geralmente < 0,5% do total de ácidos graxos (BURDGE e CALDER, 2005) e o ALA é responsável por cerca de 0,7% do total de ácidos graxos em lipídeos neutros no tecido adiposo de homens e mulheres (BURDGE, 2006), assim a quantidade de ALA encontrada no organismo é baixa. Embora a conversão do ALA para seus derivados de longa cadeia seja importante, estudos em humanos e animais revelam que aproximadamente 60 - 85% do ALA siga o caminho da β -oxidação e seja convertido para CO₂ (BURDGE e WOOTTON, 2003). Anderson e Ma (2009) observaram que ao longo de um período de 24 horas, 20% dos ácidos palmítico, esteárico e araquidônico administrados por via oral a ratos foram expirado como CO₂, em comparação

com 60% para ALA fornecido e em humanos, os valores são pouco menores, 16-20% do ALA é expirado como CO₂ em 12 horas.

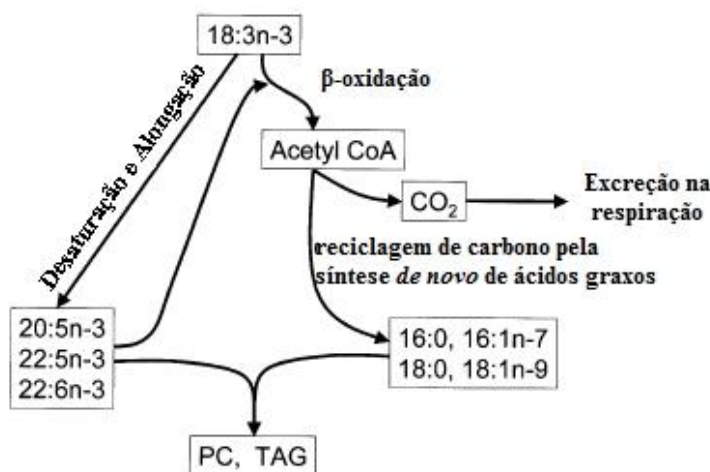


FIGURA 28: TRANSFORMAÇÕES METABÓLICAS DO ALA (18:3 N-3) NO FÍGADO HUMANO. DESSATURACÃO E ALONGAÇÃO PARA A CONVERSÃO DE AGPI DE CADEIA MAIS LONGA: EPA (20:5 N-5), ÁCIDO DOCOSAPENTAENÓICO - DPA (22:5 N-3) E DHA (22:6 N- 3), A B-OXIDAÇÃO PARA A “SÍNTESE DE NOVO” DE AGS E AGMI OU PARA A CONVERSÃO DE CO₂ COMO FONTE ENERGÉTICA.

FONTE: BURDGE, WOOTTON (2003).

Para o AA, no tecido tumoral do grupo W apresentou uma alta concentração comparado com o grupo OPW e OIW, e isto pode ser interpretado porque, a conversão de AL para AA e de ALA para EPA e DHA, utilizam a mesma via das enzimas $\Delta 6$ e $\Delta 5$ dessaturases do sistema microssomal e um passo envolvendo a β -oxidação dos peroxissomos para ação da enzima alongase (CHILTON, RUDEL, *et al.*, 2008). A afinidade da $\Delta 6$ desaturase é maior para ALA do que para AL (SIMOPOULOS, 2003; RATNAYAKE e GALLI, 2009), e para a conversão de ALA para EPA, é dependente do consumo total de gorduras ALA, EPA, DHA e AL. (LARSSON, KUMLIN, *et al.*, 2004; GIBSON, 2004; GOYENS, SPILKER, *et al.*, 2006), portanto a suplementação nos animais portadores de tumor com ALA, pode ter causado uma menor conversão do AL para o AA.

A quantidade de EPA no tecido tumoral do grupo W foi menor comparado com o grupo OPW e OIW e a quantidade que DHA presente no tecido tumoral não foi diferente entre os grupos. No metabolismo de maníferos, há uma resposta dose-dependente na dieta enriquecida com ALA, ocorre aumento de ALA, EPA e DPA no plasma, em hemácias e em células mononucleares, não sendo observadas alterações no conteúdo de DHA. (BARCELÓ-

COBLIJN e MURPHY, 2009). Estima-se que a eficiência global de conversão de ALA pode ser tão baixa quanto 0,2% de EPA e 0,05% de DHA (BERQUIN, EDWARDS e CHEN, 2008). Em primatas a conversão de ALA para DHA é relatada em 0,23% a 0,57% da dose ALA, e o fígado é o principal local para a conversão (BARCELÓ-COBLIJN e MURPHY, 2009).

Observa-se que o aumento do consumo de ALA resulta em um aumento dos níveis de ALA, EPA e DPA, mas pouca ou nenhuma mudança no plasma ou tecidos de DHA, pois como falado acima, o destino predominante do ALA é o catabolismo e reciclagem do carbono em acetato. Nos roedores, apenas 16% da dieta ALA é encontrado nos tecidos e 6% foram convertidos para ácidos graxos de poliinsaturados (AGPI). A eficiência de conversão do ALA à EPA é de 0,2%, de EPA para n-3 DPA é de 65% e de n-3 DPA para DHA é de 37%. (RATNAYAKE e GALLI, 2009). Diversos autores estimam que apenas 5-10% e 2-5% de ALA seja convertido em EPA e DHA, respectivamente, enquanto outros sugerem que os seres humanos convertem menos de 5% de ALA a EPA ou DHA (ANDERSON e MA, 2009).

Pawlosky *et al.* (2001) em um estudo *in vivo* usando metodologia de isótopos de traço para determinar no plasma o *steady state* de ácidos graxos em humanos saudáveis, descreveram o metabolismo dos ácidos graxos n-3 ser limitado para a conversão de ALA em EPA em apenas ~0,2% e da quantidade de ALA plasmático convertido para EPA houve alta eficiência metabólica para a biossíntese de DHA.

A composição de ácidos graxos da mucosa do cólon de vários ratos com neoplasia intestinal foi alterada quando receberam dieta rica em óleos de linhaça e de canola e as proporções de ALA (18: 3n-3), EPA (20: 5n-3), e ácido docosapentaenóico (22: 5n-3) foi aumentada após a dieta experimental ($P < 0,001$), enquanto o nível de DHA (22: 6n-3) manteve-se inalterada em comparação com a dieta controle (OIKARINEN, PAJARI, *et al.*, 2005).

Wiesenfeld, *et al.*, (2003) demonstraram que uma dieta contendo 40% de linhaça (58% de ácidos graxos α -linolênico), os ácidos graxos foram metabolizados, ocorrendo um aumento no conteúdo hepático de ALA e EPA, redução no conteúdo de AL e AA com manutenção do DHA em ratas grávidas e sua geração F1. Ezaki, *et al.* (1999) e Ghafoorunissa, *et al.*, (2002) demonstraram significantes aumentos das concentrações plasmáticas de DHA em altos consumos de ALA por longos períodos ou com dose muito elevadas e Blank, *et al.*, (2002)

encontraram que a máxima conversão em DHA ocorreu quando a razão AL:ALA foi de 2:1 a 4:1.

Assim, neste estudo a quantidade de ALA suplementada dieta aumentou em 2 vezes a quantidade de EPA incorporada no tecido tumoral do grupo OIW comparado com o grupo W e comparado com o grupo OPW foi 3 vezes menor. Contudo a incorporação no tumor de DHA não apresentou diferenças entre os grupos. Os grupos W e OIW em suas dietas e/ou suplementação receberam baixas quantidades de EPA e nenhuma quantidade DHA. Nestes animais o crescimento do tumor foi diferente e o conteúdo de EPA foi maior para o grupo OIW vs. W. Acredita-se que o ALA suplementado foi convertido para EPA e, utilizado na síntese de eicosanóides derivados deste ácido graxo n-3 que apresentam efeitos opostos daqueles derivados do AA, assim provocaram uma menor massa tumoral. Também uma quantidade de EPA foi metabolizado para DHA e desta forma, o efeito na menor desenvolvimento do tumor do grupo OIW pode ter sido causado pelo ALA modulando o metabolismo destes ácidos graxos.

A resposta inflamatória pode ser mediada pelos ácidos graxos, o EPA e AA quando incorporados nos fosfolípidios das membranas celulares. Estes AGs são precursores dos eicosanóides pela ação das enzimas COX e LOX. A COX apresenta duas isoformas: COX-1 é constitutiva e presente em vários tipos de células e COX-2 que é induzida em resposta à inflamação e sua expressão está aumentada em uma variedade de cânceres. Os ácidos graxos n-3 ALA, EPA e DHA podem inibir a expressão e ou, preferencialmente ligar-se à COX-2, e desta forma competir a ligação com o AA alterando assim a produção de eicosanóides e atenuando a resposta inflamatória ou para o crescimento do tumor (HARDMAN, 2002, OIKARINEN, PAJARI, *et al.*, 2005, MUND, PIZATO, *et al.*, 2007; SERINI, PICCIONI, *et al.*, 2009).

Nos resultados verifica-se que os animais do grupo W apresentam maior quantidade de ácido araquidônico no tecido tumoral que pela ação da enzima Cox-2 pode ser convertido em prostaglandina E₂. A PGE₂ é potente promotor do crescimento e proliferação celular e outros eicosanóides derivados do AA são envolvidos na resposta pró-tumoral. O EPA e DHA competem com o AA pela atividade da COX e assim resultando na produção de diferentes eicosanóides com menor atividade inflamatória e tumoral (HARDMAN, 2004). EPA substitui AA em membranas fosfolípídicas e, sua estrutura vincula uma íntima ligação com a COX-1 e

COX-2 e sendo substrato para a formação de leucotrienos biologicamente menos ativos que aqueles derivados do AA. Desta forma o EPA se comportar-se com um seletivo inibidor da COX-2 (JHO, COLE, *et al.*, 2004; CALDER, 2010).

Mecanismos envolvendo os eicosanóides e ácidos graxos na tumorigênese e no crescimento do tumor pode ser o fato de que altos níveis de PGE₂, derivados dos AGPI n-6 promoverem o crescimento do tumor. Dietas enriquecidas com óleo de peixe reduzem a expressão da Cox-2 em 50% e diminuem a formação de prostaglandina E2 no tecido tumoral (MUND, PIZATO, *et al.*, 2007), que coincide com menor proliferação células tumorais (NORMAN, BUTRUM, *et al.*, 2003). Além disso, AGPI n-3 inibem a atividade da fosfolipase A2 em macrófagos e inibem competitivamente a ação da COX sobre o AA e então o óleo de peixe na dieta resulta em uma capacidade reduzida de monócitos e macrófagos para sintetizar eicosanóides derivados do AA (YAQOOB, 2004).

Oikarinen, *et al.* (2005) demonstraram que ratos com dieta rica em óleo de linhaça e de canola não houve efeito sobre a expressão da Cox-2 em adenoma. Ren e Chung, (2007), Wang, Lim, *et al.*, (2008), Hassan, Ibrahim, *et al.*, (2010) utilizando ALA em diferentes tipos celulares verificaram uma redução na expressão de Cox-2.

Neste estudo, a suplementação com Oro Inka provocou uma redução na expressão da Cox-2 (Figura 7 – p. 42) no tecido tumoral comparado com o grupo W. O óleo parental causou o efeito idêntico efeito comparado com a suplementação de óleo de peixe que também reduziu a expressão de Cox-2 e não houve diferenças na expressão de Cox-2 entre os grupos OPW para o OIW. O resultado para o grupo OPW foi similar ao de Mund *et al.*, (2007).

Além das diversas vias como a da expressão da Cox-2 e produção de eicosanóides têm sido implicadas na supressão do crescimento tumoral pela ação dos AGPI n-3, outro fator que está relacionado com a menor massa tumoral é a redução da proliferação das células tumorais *ex vivo*, que foi verificado por Mund *et al.*, (2007), quando suplementaram animais portadores de tumor de Walker 256 com óleo de peixe.

A linhaça possui uma concentração excepcionalmente elevada de ácido α -linolênico, e tem sido demonstrado em estudos experimentais e epidemiológicos ser protetora contra o câncer, por reduzir a proliferação de células tumorais (OIKARINEN, PAJARI, *et al.*, 2005). Thompson, *et al.*, (2005) demonstraram que a ingestão diária de 25 g de linhaça reduziu significativamente a proliferação celular, aumentou apoptose em células humanas de câncer

de mama e Bommareddy, *et al.* (2009) em células de tumor intestinal com dieta rica em linhaça observaram também uma redução na proliferação de células em pacientes com este tipo de tumor. Porém isto foi em grande parte atribuída à alta concentração de lignanas com seus efeitos sobre o metabolismo estrógeno.

Neste estudo encontra-se a ocorrência de redução na proliferação *ex vivo* das células do tumor de Walker 256 (Figura 8 – p. 42), nos animais suplementados com Oro Inka comparado com o grupo W. Nos animais suplementados com óleo de peixe ocorreu semelhante redução, sendo assim, a suplementação com óleo Oro Inka proporcionou o mesmo efeito redutor na proliferação das células tumorais que o grupo OPW. A suplementação com Oro Inka promoveu efeito na redução da expressão de Cox-2 e desta forma pode provocar redução na produção de PGE₂ e, conseqüentemente reduzir a proliferação *ex vivo* das células tumorais.

Dentre os lipídios, os ácidos graxos poliinsaturados (AGPIs) presentes nos fosfolipídios de membrana são mais suscetíveis ao ataque oxidativo mediado por radicais livres. As conseqüências da formação de lipoperóxidos é a sua propriedade citotóxica nas células tumorais e, vão além de provocar simples modificação estrutural celular, mas induzir a morte da célula (MUEHLMANN, 2008).

O estresse oxidativo ocorre, devido à deficiência no sistema antioxidante, frente à maior produção de Espécies Reativas do Oxigênio (EROS) e Espécie Reativa do Nitrogênio (ERN), pelas células tumorais. Como há menor proteção antioxidante no tecido tumoral, os radicais livres gerados danificam diretamente as moléculas de DNA e os lipídios de membrana e desta maneira alvos primários, induzem a geração de novos radicais criando outras espécies quimicamente bastante reativas (por exemplo, peróxido de hidrogênio, ânion superóxido (AS), aldeídos, etc.), de maneira descontrolada. Essa oxidação de biomoléculas é um dos fatores determinantes das conseqüências do estresse oxidativo. Dentre as espécies reativas capazes de promover este tipo de reação, o radical hidroxil (OH•) está entre as que possuem maior capacidade oxidante. Este radical é capaz de abstrair praticamente qualquer hidrogênio ligado a carbono, reagindo com várias moléculas biológicas. A formação de um radical lipídico é o fator chave para o início da peroxidação lipídica, assim o radical lipídico pode ser formado a partir do peróxido de hidrogênio, do ânion superóxido (MUEHLMANN, 2008).

Assim, a peroxidação lipídica (LPO), que pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultantes da ação de radicais livres sobre lipídios de membranas celulares (CURI, POMPÉIA, *et al.*, 2002). A relação entre a peroxidação lipídica e os AGPI está na indução da citotoxicidade, pela indução da apoptose das células. Isto pode ocorrer porque sabe-se que os produtos de peroxidação podem alterar a estrutura da membrana celular levando à morte celular (PIZATO, BONATTO, *et al.*, 2005).

Diversos autores demonstraram que o óleo de peixe suplementado na dose de 1 g/kg de peso em ratos portadores de tumor aumentou a peroxidação lipídica no tecido tumoral, reduziu a proliferação de células do tumor de Walker 256, *ex vivo*, e também verificaram um aumento na apoptose destas células, isto pode explicar um dos efeitos dos ácidos graxos EPA e DHA atuam na inibição do crescimento do tumor (PIZATO, BONATTO, *et al.*, 2005; MUND, PIZATO, *et al.*, 2007; IAGHER, 2008).

O crescimento do tumor ocorre porque o acúmulo de células através da proliferação excede a morte de células por apoptose. Assim, a desregulação da apoptose pode levar ao desenvolvimento de câncer (HARDMAN, 2002). Apoptose é a morte programada da célula e acontece quando as vias apoptóticas são funcionais, as células com danos genéticos irreparáveis devem morrer. Um dos primeiros eventos da apoptose é a redistribuição da fosfatidilserina do interior da membrana celular para o lado externo (MUND, PIZATO, *et al.*, 2007). O aumento da expressão de COX-2 e a ativação do NF- κ B mostrou reduzir a apoptose, desta forma o menor ativação do NF- κ B e expressão COX-2 modulado por ácidos graxos n-3, contribui para a restauração da apoptose (MUND, PIZATO, *et al.*, 2007).

EPA e DHA tem sido relatados para inativar a família de genes Bcl-2 e aumentar a transcrição de genes e fatores de transcrição que induzem a apoptose (HARDMAN, 2002; JHO, COLE, *et al.*, 2004). Assim, os genes da família Bcl-2 (anti-apoptótica) podem bloquear a apoptose bem como o aumento da expressão do gene Bax (pró-apoptótica), cujo produto induz a morte celular programada (IAGHER, 2008). Iagher, (2008) demonstrou que a expressão da proteína pró-apoptótica Bax está aumentada no tecido tumoral de ratos suplementados com óleo de peixe comparado com o grupo sem suplementação, já a expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 não foi diferente entre os grupos estudados sendo que a razão entre a expressão da proteína Bax/Bcl-2, a qual indica a resultante entre duas “forças intracelulares”, pró e anti-apoptótica. Assim os animais portadores de tumor suplementados

com óleo de peixe apresentaram maior relação Bax/Bcl-2 que a observada para o grupo não-suplementado portador de tumor (cerca de 3,8 vezes).

Esta via acima está relacionada com a redução da proliferação do tumor e ativação da via da apoptose na célula tumoral tendo isto uma função no decréscimo do crescimento do tumor (STOLL, 2002). Neste estudo, a lipoperoxidação lipídica (Figura 9 – p. 43) está significativamente aumentada para os animais portadores de tumor e suplementados com óleo de peixe comparado com o grupo W. Quando os animais foram suplementados com os ácidos graxos parentais do Oro Inka, a quantidade da lipoperoxidação também aumentou comparado com o grupo W.

Portanto o AGPI n-3 do óleo de peixe e do Oro Inka foram incorporados na membrana das células tumorais e foram oxidados para aumentado a peroxidação e é reconhecido que os peróxidos lipídicos inibem o crescimento de células tumorais.

A mudança no perfil plasmático de carboidratos, lipídeos e metabólitos esta presente em portadores de tumor (TISDALE, 2009). Caracterizando a síndrome da caquexia anorexia no câncer ocorre uma série de alterações como; hipoglicemia, hipertriacilglicerolemia e hiperlactatemia e quando os portadores de tumor são suplementados com óleo de peixe, estas alteração no metabolismo não estão presentes, pois a suplementação é capaz de reverter estes parâmetros comparados com os não portadores de tumor (FERNANDES, RAZI, *et al.*, 1999; TOGNI, OTA, *et al.*, 2003; PINTO Jr, FOLADOR, *et al.*, 2004; PIZATO, BONATTO, *et al.*, 2005; FOLADOR, HIRABARA, *et al.*, 2006; AIKAWA, MORETTO, *et al.*, 2008) desta forma os parâmetros da caquexia não estavam presentes.

Animais portadores de tumor suplementados com óleo de peixe apresentam; menor peso do tumor, menor depleção da massa corpórea, maior glicemia, menor lactatemia, menor triacilglicerolemia, maior produção e menor resistência à insulina; e maior reserva de glicogênio hepático e muscular (TOGNI, OTA, *et al.*, 2003; PINTO JR, FOLADOR, *et al.*, 2004; PIZATO, BONATTO, *et al.*, 2005; FOLADOR, HIRABARA, *et al.*, 2006; IAGHER, 2008; BORGHETTI, 2010), assim estes estudos sugerem que óleo de peixe (rico em EPA e DHA) é efetivo na redução de parâmetros plasmáticos da caquexia.

Neste estudo os resultados não foram diferentes daquelas encontrados na literatura. O consumo de ração não variou entre todos os grupos, assim, os animais eram normofágicos (dados não mostrados). Entre os animais dos grupos não portadores de tumor não foram

verificadas alteração nos parâmetros de caquexia sendo que a glicemia (Figura 10 – p. 44) e a triacilglicerolemia (Figura 11 – p. 44) plasmáticos não foram alteradas nem pela suplementação. Entretanto, os animais portadores de tumor sem suplementação (W), apresentaram hipoglicemia e hipertriacilglicerolemia comparados com os animais do grupo C e para os grupos OPW e OIW ($p < 0,05$). Nos animais portadores de tumor e suplementados com óleo de peixe e Oro Inka não houve a redução nestes parâmetros da caquexia comparados com os respectivos grupos não portadores de tumor. Deste forma os animais portadores de tumor e suplementados com o óleo rico Oro Inka, a suplementação foi capaz de causar uma reversão nos parâmetros de caquexia.

Citocinas pro-inflamatórias TNF- α e IL-6 também têm sido relacionadas no estabelecimento da síndrome da caquexia-anorexia. A quantidade destas citocinas no plasma representa uma condição inflamatória. Estas levam ao desenvolvimento da síndrome da caquexia-anorexia no câncer e são responsáveis pela perda de peso, aumento da resposta de proteína de fase aguda, quebra de proteínas e gordura, aumento das concentrações de cortisol e glucagon e quedas na concentração de insulina, resistência à insulina, anemia, febre e gasto energético elevado em animais (FERNANDES, RAZI, *et al.*, 1999; BARBER, 2001,; TOGNI, OTA, *et al.*, 2003,). Excessiva produção de citocinas proinflamatórias IL-1, IL-2, Inteferon γ (INF- γ), TNF- α e IL-6 são as comumente observadas na caquexia em paciente com câncer (MORLEY, THOMAS e WILSON, 2006).

Os ácidos graxos n-3 afetam um número de mediadores da caquexia com a estabilização do peso e uma sobrevivência prolongada e isto está envolvido nas alterações metabólicas, produção de eicosanóides e citocinas pró-inflamatórias (BARBER, 2001). O EPA é eficaz na redução das concentrações de citocinas pró-inflamatórias em condições inflamatórias crônicas e melhorando caquexia associada ao câncer (JHO, COLE, *et al.*, 2004).

Ácidos graxos poliinsaturados n-3 do óleo de peixe têm demonstrado efeito em reduzir a produção de citocina entre elas o TNF- α e IL-6 em camundongos (SADEGHI, WALLACE e CALDER, 1999), em ratos (PIZATO, BONATTO, *et al.*, 2005) e indivíduos saudáveis (RIEDIGER, OTHMAN, *et al.*, 2009). O ALA presente na dieta aumenta os níveis plasmáticos de EPA e DHA e ambos estão envolvidos na função imune. O preciso efeito do ALA é depende do nível de AL e do conteúdo total de AGPI na dieta. Altas doses de ALA

(acima 15g/dia) causam a supressão da produção de TNF- α em humanos e a suplementação de óleos vegetais ricos em AL aumentam estas citocinas (SIMOPOULOS, 2002).

Neste estudo a concentração de TNF- α (Figura 12 – p 45) e IL-6 (Figura 13 – p 46) no plasma dos grupos não portadores de tumor não foram diferentes. Porém a quantidade de citocinas TNF- α e IL-6 estavam elevadas nos animais portadores de tumor sem suplementação (W) comparado com o grupo C. Quanto aos animais dos grupos portadores de tumor suplementados com, o óleo de peixe houve redução na produção de TNF- α e IL-6 comparados com o grupo W. Da mesma forma para os grupos portadores de tumor suplementados com o Óleo Oro Inka rico em ácido graxo α -linolênico causou a redução plasmática das citocinas TNF- α e IL-6.

Ferrucci, *et al.*, (2006) examinaram a relação entre a concentração relativa de ácidos graxos e de marcadores inflamatórios no plasma de 1123 pacientes (20 a 98 anos) e observaram que os AGPI, em especial, o total de ácidos graxos n-3, foram independentemente associados com menores concentrações de marcadores inflamatórios (TNF- α , IL-6, IL-1ra e proteína C-reativa) independente de fatores de confusão.

Liang, *et al.*, (2008) estudaram o efeitos imunomodulatórios de uma dieta administrada na forma de nutrição parenteral total contendo ácidos graxos n-3 (solução contendo óleo de soja, óleo de peixe (5:1) em um total de 1,2g de lipídeos por kg) em pacientes no pós-operatório de câncer coloretal e verificaram que houve redução nas concentrações plasmáticas de TNF- α e IL-6 após o oitavo dia de administração da dieta comparado com o grupo controle (solução sem óleo de peixe). Cawood, *et al.*, (2010), estudaram em pacientes a resposta inflamatória das placas ateroscleróticas suplementados com AGPI n-3 consumindo 0,81g de EPA e DHA de 0.675g/dia a partir das cápsulas e observaram expressão significantes menores de mRNA para IL-6 mas não para o TNF- α .

Células tumorais podem iniciar a resposta inflamatória de forma tão eficaz como patógenos invasores e estimular a resposta inflamatória mediada pela atividade das células do sistema imunitário, por citocinas, por hormônios e pelos produtos específicos do tumor podem aumentar o nível de estresse inflamatório no paciente. Uma vez que o câncer seja estabelecido o processo inflamatório torna-se uma causa de morte do paciente, ao invés do meio destruir o tumor (GRIMBLE, 2003).

A dieta resulta na alteração da composição lipídica das membranas celulares e estas mudanças resultam em modificações na funcionalidade da resposta do sistema imunitário mediado por células macrófagos, neutrófilos e linfócitos (BONATTO, FOLADOR, *et al.*, 2004; CALDER, 2008).

Monócitos (macrófagos e neutrófilos) responsáveis pela resposta imunológica inata, são importantes na defesa do hospedeiro contra tumores ao produzirem vários agentes antitumorais. Fagocitam microorganismos patogênicos, células tumorais e destroem pela produção de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio (WALLACE, MILES e CALDER, 2003; GALLI e CALDER, 2009) incluindo ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico (BELO, IAGHER, *et al.*, 2010).

Ácidos graxos n-3 têm demonstrado propriedades antiinflamatórias e aumentam a resposta imunológica, através dos seus efeitos sobre os macrófagos e neutrófilos (NOVAK, BABCOCK, *et al.*, 2003; WEAVER, IVESTER, *et al.*, 2009). Tanto os macrófagos como neutrófilos são importantes na defesa do hospedeiro contra células tumorais, ao produzirem diversos agentes citotóxicos antitumorais resultando diretamente na eliminação do tumor. A produção de mediadores citotóxicos, a atividade dos macrófagos é alterada quando ratos são suplementados com óleo de peixe (CALDER e KEW, 2002).

Em macrófagos peritoneais e neutrófilos sanguíneos de animais não portadores de tumor suplementados com óleos de peixe observou-se um aumento na capacidade de fagocitose, aumento na produção de espécies reativas do oxigênio como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), então a suplementação por si só modifica a atividade destas células. De igual maneira, contudo nos animais portadores de tumor de Walker 256 suplementados com óleo de peixe, os macrófagos e neutrófilos, também foram hábeis em aumentar a capacidade fagocítica, volume lisossomal e a produção de espécies reativas do oxigênio (peróxido de hidrogênio e ânion superóxido). (BONATTO, FOLADOR, *et al.*, 2004; FOLADOR, HIRABARA, *et al.*, 2006; PIZATO, BONATTO, *et al.*, 2006; IAGHER, 2008; PEQUITO, 2009, BELO, IAGHER, *et al.*, 2010).

No presente estudo em macrófagos peritoneais a fagocitose de zimosan (Figura 14 – p. 47) e captação de vermelho neutro (Figura 15 – p. 47) dos animais do grupo W foram reduzidas comparados com o grupo C. Os animais do grupo suplementado com óleo de peixe e Oro Inka portadores de tumor (OPW e OIW) tiveram um aumento comparado com o grupo

W e para os seus grupos controles (OP e OI) não apresentaram diferenças. Para os animais do grupo OP, OI, W, OPW e OIW tiveram aumento significativo na produção de ânion superóxido (Figura 16 – p. 48), porém para todos os grupos suplementados ocorreu um aumento comparado com o do grupo W, assim a suplementação foi capaz de aumentar e manter a produção de ânion superóxido mesmo quando portadores de tumor. Estes resultados indicam que o aumento destas funções que são importantes na defesa do hospedeiro contra o tumor, parecendo isto, ser o resultado de alterações na fluidez das membranas (CALDER, BOND, *et al.*, 1990) em aumentar a fagocitose, e maior absorção de vermelho neutro que se acumula nos lisossomos celulares, apontando uma expansão do seu conteúdo lisossomal (FOLADOR, HIRABARA, *et al.*, 2006) e aumento da produção de espécies reativas do oxigênio que são agentes citotóxicos produzidos pelos macrófagos agem em patógenos e células tumorais.

O aumento da citotoxicidade de macrófagos foi observado em dietas contendo ácidos graxos n-3 do óleo do peixe (EPA e DHA), da mesma forma a suplementação com Oro Inka rico em ácidos graxos α -linolênico foi capaz de aumentar a fagocitose de zimozan, o volume lisossomal e a produção de ânion superóxido de forma igual ao óleo de peixe suplementado. Este aumento na capacidade de fagocítica de macrófagos pode ajudar a explicar o efeito dos AGPI n-3 em atenuar o crescimento tumoral.

Macrófagos são grandes produtores de citocinas pró-inflamatórias principalmente TNF- α e IL-6 que estão entre os mediadores da imunidade natural e adquirida. Essas citocinas podem mediar os efeitos sistêmicos da inflamação tais com anorexia, perda de peso, uma resposta de proteína de fase aguda, quebra de proteínas e gordura, aumento dos níveis de cortisol e glucagon e quedas nos níveis de insulina (FERNANDES, RAZI, *et al.*, 1999), resistência à insulina, anemia, febre e gasto energético elevado em os animais (BARBER, 2001; CALDER, 2001). Excessiva produção de citocinas proinflamatórias TNF- α e a IL-6 são observadas na caquexia em paciente com câncer (MORLEY, THOMAS e WILSON, 2006).

Nos macrófagos peritoneais de ratos portadores de tumor, a suplementação com óleo de peixe provoca redução na produção da citocina pró-inflamatória TNF- α (BONATTO, FOLADOR, *et al.*, 2004; FOLADOR, HIRABARA, *et al.*, 2006; PIZATO, BONATTO, *et al.*, 2006). Curtis, *et al.* (2000) mostraram que o ácido α -linolênico (ALA), EPA ou DHA reduzem a expressão de genes para TNF- α e IL-1 β em condrócitos bovinos. Quando ratos

foram alimentados com óleo de peixe houve diminuição dos níveis de mRNA para várias citocinas inflamatórias, incluindo IL-1 β , IL-6 e TNF- α em rins, baço e macrófagos peritoneais (CALDER, 2001; CALDER e KEW, 2002; GALLI e CALDER, 2009).

A suplementação com óleo de peixe diminuiu a produção "*ex vivo*" das citocinas inflamatórias, TNF- α , IL-1 e IL-6 em macrófagos. PGE₂ também inibe a produção de TNF- α , IL-1 e IL-6 e esta inibição da síntese das citocinas pró-inflamatórias por PGE₂ forma um importante ciclo de regulação de outros eventos inflamatórios (WALLACE, MILES e CALDER, 2000; YAQOOB, 2004). Bonatto *et al.*, (2004) demonstraram que macrófagos de ratos portadores de tumor suplementados com óleo de peixe e estimulados com LPS tiveram uma redução na produção de TNF- α em aproximadamente 3,5 vezes comparado com os macrófagos estimulados com LPS de ratos portadores de tumor com dieta padrão. Em roedores a suplementação com óleo de linhaça rico em ácido graxo parental α -linolênico causou um aumento da produção de TNF- α em macrófagos residentes, mas não apresentou efeito sobre a produção de TNF- α por macrófagos inflamatórios (HUBBARD, CHAPKIN e ERICKSON, 1994)

Neste estudo, a produção de TNF- α (Figura 17 – p. 49) e IL-6 (Figura 18 – p. 50) na situação basal, o tumor por si só, grupo W, provocou um aumento das quantidade das citocinas comparado com o grupo C e nos macrófagos dos portadores de tumor suplementados com o Óleo de Peixe (OPW) e Oro Inka (OIW). Quando estimulados com LPS, em todos os grupos a resposta dos macrófagos foi o aumento na produção das citocinas, porém esta produção foi exacerbada nos macrófagos do grupo W/LPS. Quando estimulados com o mitógeno LPS os grupos OPW/LPS e OIW/LPS apresentaram uma redução estatisticamente significativa comparados com o grupo W/LPS. O resultado provocado pelas suplementações na presença de tumor com óleo de peixe foi em reduzir a produção de TNF- α e IL-6 e com o óleo parental Oro Inka causou o mesmo resultado que o óleo de peixe.

Os neutrófilos sanguíneos são células do sistema imunitário inato que defendem o organismo de patógenos. Isto se dá pela sua atividade fagocítica e mudanças do perfil de ácidos graxos nos fosfolipídios das membranas podem influenciar nas funções destas células imunes de várias maneiras incluindo; alterações nas propriedades físicas das membranas como a fluidez mudando sua capacidade de fagocitose. (CALDER, 2008). Pequito, (2009) demonstrou que a suplementação com óleo de peixe provocou aumento na fagocitose de

zimosan e da captação de vermelho neutro de neutrófilos comparados aos animais do grupo controle (somente dieta padrão). Neste estudo, a capacidade fagocítica dos neutrófilos (Figura 19 – p. 51) foi aumentada nos animais não portadores de tumor suplementados com o óleo de peixe e Oro Inka. Desta forma o óleo de peixe apresentou resultado idêntico ao estudo de Pequito, (2009) e o Oro Inka suplementado aos animais causou o mesmo efeito em aumentar a fagocitose. Para os neutrófilos de animais portadores de tumor sem suplementação (W) não houve aumento de sua capacidade de fagocitose. Contudo nos animais portadores do tumor de Walker 256 suplementados com o óleo de peixe e Oro Inka, a capacidade de fagocitose foi aumentada comparada com o grupo W ($p < 0,05$).

A captação de vermelho neutro (Figura 20 – p. 52) (volume lisossomal) dos neutrófilos sanguíneos dos animais não portadores de tumor não suplementados (C) ou suplementados (OP e OI) e dos animais do grupo W não foi alterada. Para os animais portadores de tumor suplementados com o óleo de peixe (OPW) e óleo parental Oro Inka (OIW) o volume lisossomal aumentou significativamente comparado respectivamente com o seu grupo sem tumor e com o grupo W.

A produção de ânion superóxido (Figura 21 – p. 53) de neutrófilos está aumentada comparando o grupo C com todas as situações; não portador de tumor suplementado, portador de tumor não suplementado e portador de tumor suplementado. A suplementação com os óleos sem e na presença de tumor e o tumor por si só aumentam a produção de ânion superóxido. No resultado de Pequito, (2009) o grupo de animais não portadores de tumor suplementados com óleo de peixe fez com que os neutrófilos produzissem quantidades similares de ânion superóxido comparados com o grupo controle (não portadores de tumor não suplementados). Para os resultados aqui avaliados os três parâmetros da atividade de neutrófilos a variável suplementação e tumor interferem de forma a afetar os resultados e a interação ocorreu de maneira extremamente significativa.

O sistema imunológico adquirido, envolve linfócitos altamente específicos que quando apresentados a antígenos tornam-se ativados e proliferam, amplificando a resposta imunológica (THIES, NEBE-VON-CARON, *et al.*, 2001, GALLI e CALDER, 2009). Ácidos graxos n-3 alteram a resposta celular inflamatória adaptativa sendo que o óleo de peixe modifica a resposta para a proliferação de linfócitos e a produção de citocinas mediada por eles. Estas observações estão em concordância com trabalhos que mostram que o óleo de

peixe resulta em redução da proliferação dos linfócitos comparadas com dietas com óleo de coco e ácido graxo linoléico (AL) (CALDER, 2001), com um significativo efeito tempo e dose dependentes (THIES, NEBE-VON-CARON, *et al.*, 2001; YAQOOB, 2004).

Pizato, *et al.* (2006); Iagher, (2008) e Folador, *et al.* (2009) demonstraram que ratos portadores de tumor suplementados com óleo de peixe, os linfócitos tiveram redução significativa na proliferação, comparado com o grupo sem suplementação (controle). Vineyard, *et al.* (2010) utilizaram cavalos suplementados com óleo de peixe ou de linhaça em quantidades para fornecer 6g kg de ácidos graxos n-3/100g do total de peso corporal basal, observaram que não houve efeito do tratamento dietético na resposta proliferativa de linfócitos estimulados com ConA. Altas quantidades de óleos de linhaça rico em ALA inibem a proliferação de linfócitos em roedores (JEFFERY, SANDERSON, *et al.*, 1996) e em humanos *in vitro*, causando imuno supressão (CALDER, 2001).

Neste estudo a proliferação dos linfócitos (Figura 22 – p. 54) dos grupos suplementados com óleo de peixe e Oro Inka na situação basal tiveram uma menor proliferação comparada como grupo C e quando foram estimulado com ConA não apresentaram diferenças para o grupo C/ConA. O grupo portador de tumor (W) por si só aumentou a proliferação dos linfócitos comparados com o grupo C e comparado com os grupos suplementados portadores de tumor OPW e OIW. De forma similar quando os linfócitos dos animais do grupo portador de tumor foi estimulado com ConA (W/ConA) a proliferação deste grupo foi maior para os grupos OPW/ConA e OIW/ConA. Assim o óleo de peixe e Oro Inka imputaram uma menor capacidade proliferativa nos animais portadores de tumor em ambas as situações não estimulado/estimulado.

O consumo de AGPI n-3 provenientes de óleo rico em ALA ou óleo de peixe apresentam leve redução no estímulo de produção de TNF- α , como a supressão da proliferação de linfócitos e o AL aumentou a secreção de citocinas pró-inflamatórias, enquanto que ácidos graxos n-3 reduzem a secreção. (SIMOPOULOS, 2002). Zhao, *et al.*, (2004) relataram que o ALA pode reduzir o processo inflamatório quando consumido em doses elevadas, contudo estes efeitos são mais modestos em comparação com EPA e DHA, um a vez que esta resultado do ALA pode estar relacionada com a sua conversão para EPA. Protanto, quando alterada na dieta as quantidades de ácidos graxos n-3, há uma modulação na produção de eicosanóides derivados do ácido araquidônico e aumentada produção dos

eicosanóides derivados do ácido eicosapentaenóico, reduzem a proliferação de linfócitos, principalmente uma menor quantidade da PGE₂ (MUND, PIZATO, *et al.*, 2007) que inibe a proliferação de linfócitos T (MILES, BANERJEE, *et al.*, 2006).

Os linfócitos T são células efetoras da imunidade adquirida e são subdivididos em duas populações que diferem conforme sua função: linfócitos auxiliares ou *helper* (Th) (CD4⁺); que são estimulados por agentes patogênicos extracelular e respondem aos estímulos aumentando a resposta humoral produzindo citocinas modulando desta forma o processo inflamatório. Já os linfócitos T citotóxicos (CD8⁺) são estimulados por patógenos intracelulares e destroem células infectadas ou células tumorais, produzindo uma resposta mais celular e com menor produção de citocinas (THIES, NEBE-VON-CARON, *et al.*, 2001). Os linfócitos do linfonodo mesentérico são caracterizados por uma alta proporção de linfócitos CD4⁺ e uma baixa proporção de linfócitos CD8⁺ (JAMES, GRAEFF, ZEITZ, 1987). Estas sub-populações de linfócitos, em humanos adultos saudáveis, quando suplementados com diferentes óleos, não diferenciaram (THIES, NEBE-VON-CARON, *et al.*, 2001).

Miles, *et al.*, (2006) verificaram que não houve efeito da suplementação com dieta contendo placebo ou com uma dose dependente de óleo de peixe sobre as proporções de linfócitos T, células T helper, células T citotóxicas, células natural killer e ou linfócitos B no sangue de homens jovens e saudáveis. Dieta com óleo de peixe em ratos sem tumor provocou redução na subpopulação de linfócitos mesentéricos CD4⁺ e não alterou a sub-população CD8⁺ (FOLADOR, *et al.*, 2009).

Neste estudo a quantificação de linfócitos mesentéricos CD4⁺ (Figura 23 – p. 55) para o todos os grupos não apresentou diferenças estatísticas, portanto o tumor e/ou suplementação não alteraram esta variável. Diferentemente, PIZATO (2005) verificou que quando portadores de tumor a suplementação com óleo de peixe aumentou significativamente a população de linfócitos CD4⁺ comparado com o grupo controle (W). Oposto a este trabalho, Iagher, (2008) observou para esta sub-população de linfócitos infiltrados no tumor e Folador, *et al.* (2009) em linfócitos obtidos do sangue de animais não portadores de tumor e portadores de tumor, não suplementados e suplementados com óleo de peixe, que ambos os trabalhos não apresentaram diferenças significantes entre o grupo controle e suplementado com óleo de peixe.

Os resultados deste estudo demonstraram que tanto o óleo de peixe como o Oro Inka aumentaram significativamente a subpopulação de linfócitos CD8⁺ (Figura 24 – p. 55). Quando portadores de tumor a quantidade de linfócitos mesentéricos citotóxicos foi maior para os grupos suplementados com óleo de peixe e Oro Inka comparados com o grupo W. Pizato, (2005), não encontrou diferenças para todos os momentos, portadores de tumor e não portadores de tumor, suplementados e não suplementados e Iagher, (2008) não verificou diferenças significativas para linfócitos CD8⁺ no infiltrado tumoral entre animais portadores de tumor e suplementados com óleo de peixe comparado para o grupo controle. Folador, *et al.*, (2009), observaram um aumento significativo nesta sub-população de linfócitos CD8⁺ obtidos no sangue em animais portadores de tumor não suplementados comparados com os animais suplementados com Óleo de Peixe. A presença de linfócitos CD8⁺ infiltrados no tecido tumoral é considerada bom prognóstico devido a sua capacidade de reconhecer antígenos tumorais apresentados pelas moléculas MHC classe I e promover a morte de células tumorais (BLANKENSTEIN, 2005).

Uma maior quantidade da sub-população de linfócitos CD8⁺ apresenta uma imuno modulação que pode ser causada pela presença de tumor em animais suplementados com os óleos n-3, pois estes reduzem as concentrações de PGE₂, e esta em altas concentrações podem inibir a taxa de proliferação de células T CD8⁺ (PIZATO *ET AL.*, 2006).

Pizato *et al.*, (2006) verificaram que animais não portadores de tumor e portadores de tumor; não suplementados ou suplementados com óleo de peixe, a razão CD4⁺/CD8⁺ não foi alterada, desta forma o tumor e a suplementação não modificou a razão. Iagher, (2008) no infiltrado tumoral, determinou a razão entre linfócitos helper e citotóxico nos animais portadores de tumor, e esta não foi modificada com a suplementação de óleo de peixe.

Diederichsen *et al.*, (2003) revela em seus dados que baixa razão CD4⁺/CD8⁺ está associada com um melhor prognóstico dos pacientes. Hernberg *et al.*, (2004) encontraram o aumento na razão de células CD4⁺/CD8⁺ no sangue periférico de humanos é relacionando com aumento da sobrevida dos pacientes submetidos à radioterapia. Sugerindo que linfócitos CD8⁺ atuam como importantes agentes imunossuppressores e promotores de crescimento tumoral. Sharma, *et al.*, (2007) relatam que linfócitos T citotóxicos (CD8⁺) infiltrados no tecido tumoral têm sido associados com uma boa evolução clínica em vários tipos de tumores e podem erradicar células do tumor através do reconhecimento de antígenos tumorais

associados. Liang, *et al.*, (2008) observaram que houve elevação do percentual de linfócitos CD4⁺ e aumento na razão CD4⁺/CD8⁺ em pacientes pós operatório de câncer colorretal com nutrição enteral total suplementada com óleo de peixe. Folador, *et al.* (2009), verificaram um aumento na razão CD4⁺/CD8⁺ em linfócitos sanguíneos de ratos portadores de tumor de Walker 256 suplementados com Óleo de peixe comparado com o grupo controle.

A literatura ainda é controversa, neste estudo a razão CD4⁺/CD8⁺ dos linfócitos mesentérico (FIGURA 25 – p. 56) dos animais não portadores de tumor não foi alterada, mas a razão foi reduzida para os animais portadores de tumor suplementados com o óleo de peixe e com o Oro Inka comparado com o grupo W. O óleo parental rico em ácidos graxos α -linolênico apresentou o mesmo efeito que o óleo de peixe e nos animais portadores de tumor.

Células tumorais desenvolvem diversos mecanismos para contornar a imunidade anti-tumoral através do desenvolvimento de um microambiente imunossupressor, assim a produção de adequada quantidade de citocinas é benéfico para a resposta imune (CALDER, 2001). Macrófagos ativados são as células mais importantes na produção citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6. Também os linfócitos T produzem estas citocinas, que regulam a atividade das células envolvidas na resposta inata (monócitos, macrófagos, células NK), promovem a proliferação de linfócitos B e T, e promover a produção de anticorpos pelos linfócitos B. Estas citocinas são mediadores dos efeitos sistêmicos da inflamação, tais como febre, perda de apetite, a mobilização de proteína e gordura, e síntese de proteínas de fase aguda (HORSSSEN, HAGEN e EGGERMONT, 2006).

Um dos fatores de diferenciação e ativação das populações de linfócitos T é exercida através de citocinas. O TNF- α ativa os linfócitos T e B, iniciando e estimulando a produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 e IL-6, que também células *natural killer* (NK) e macrófagos para iniciar destruição de células tumorais (PIZATO, 2005; NUNES, 2009).

A produção de citocinas pró-inflamatórias por linfócitos mesentéricos nos grupos de animais não portadores de tumor a quantidade de TNF- α (Figura 26 – p. 57) e IL-6 (Figura 27 – p. 58) não foram modificadas com a suplementação tanto para os grupos sem estímulo (C, OP, OI) bem como para os grupos estimulados com ConA. Diferente dos resultados descritos em macrófagos, os linfócitos dos grupos portadores de tumor e suplementados com Óleo de Peixe (OPW) e Oro Inka (OIW) tiveram uma produção estatisticamente maior de TNF- α tanto para os grupos sem estímulo como para o grupo estimulado com ConA comparado com

os seus respectivos grupos controle W/M e W/ConA. No resultado para a citocina IL-6 a quantidade produzida somente foi alterada dentro dos grupos quando os linfócitos foram estimulados com ConA, portanto o tumor ou a suplementação não alteraram os resultados.

Folador, *et al*, (2009), incubaram linfócitos do baço com LPS e verificaram que os animais portadores de tumor tiveram significativamente aumento na produção de citocinas TNF- α e IL-6 comparado com o grupo portador de tumor suplementado com óleo de peixe

A produção de citocinas por linfócitos Th (CD4⁺) aumenta a funções microbicidas de macrófagos e a atividade de linfócitos citotóxicos (CD8⁺), também a ativação destas subpopulação de linfócitos promove sinalização estimulatória extra tipicamente requerida para ativar a produção de anticorpos por linfócitos B e, a produção de TNF- α induz e morte de células tumorais (BLANKENSTEIN, 2005; GALLI e CALDER, 2009). Neste estudo a subpopulação de linfócitos CD8⁺ e a produção de citocinas TNF- α e IL-6 pelos linfócitos mesentéricos nos animais portadores de tumor suplementados com óleo de peixe e Oro Inka está aumentada.

Esta alta concentração de citocinas em especial o TNF- α produzidas por linfócitos T, podem influenciar o tráfego deste através do endotélio por aumentar a expressão de várias moleculas de adesão envolvidas neste processo (CHABOT, WILLIAMS, & YONG, 1997) e assim, os linfócitos que migram e acumulam no sítio tumoral, auxiliam na rejeição do tumor. É necessário que células T efectoras CD8⁺ produzam INF- γ e TNF- α , tendo efeito crucial na a rejeição do tumor seja uma alteração no estroma tumoral. Foi sugerido que a quantidade elevada de TNF- α leva a uma ausência de fatores pró-angiogênicos, assim, reduzindo a angiogênese induzida pelo tumor ou o TNF- α induz a necrose tumoral, agindo diretamente nas células endoteliais estromais (BLANKENSTEIN, 2005; HORSSSEN, HAGEN e EGGERMONT, 2006).

O aumento da produção de TNF- α e a manutenção na produção de IL-6 por linfócitos mesentéricos em animais portadores de tumor e suplementados com óleos de peixe e Oro Inka pode estar implicado no estímulo da resposta fisiológica que ocorrem em condições inflamatórias, desta forma ativando macrófagos e neutrófilos com o objetivo de eliminar patógenos e/ou células de tumor, reduzindo assim, a massa tumoral, provocando a não instalação da caquexia e modulando a atividade do sistema imunológico.

7. CONCLUSÃO

Este estudo objetivou comparar o efeito da suplementação com óleo de peixe ou Oro Inka, rico em ácido graxo α -linolênico sobre a massa tumoral, caquexia, resposta fagocítica e linfócitos em ratos portadores de tumor de Walker 256.

A suplementação com o óleo rico em ácido graxo α -linolênico nos animais portadores do tumor provocou:

Nos parâmetros tumorais, induziu uma redução na proliferação das células tumorais. No tecido tumoral, causou aumento da lipoperoxidação o qual é um dos eventos iniciais da apoptose e, também provocou menor expressão da COX-2 responsável pela síntese de PGE₂, derivada do ácido araquidônico, assim isto, pode ter sido a via na qual causou uma menor massa tumoral. O perfil lipídico do tecido tumoral demonstrou uma menor incorporação do ácido araquidônico (AA) e maior incorporação de ALA e EPA comparado ao tecido tumoral dos animais não suplementados.

Os parâmetros de caquexia, a suplementação com o ácido graxo α -linolênico naqueles portadores de tumor, provocou a manutenção na massa corpórea, os animais tiveram maior glicemia e menor triacilglicerolemia, desta forma a caquexia não foi instalada.

Para os parâmetros imunitários, nas células fagocíticas, macrófagos peritoneais e neutrófilos sanguíneos foi verificado aumento da fagocitose, retenção de vermelho neutro e da produção de ânion superóxido, confirmando aumento na resposta imunológica e característica imuno protetora do óleo Oro Inka. Nos linfócitos mesentéricos foi observada menor proliferação celular e aumento da subpopulação de linfócitos CD8⁺, demonstrando o efeito imuno modulador do óleo. As citocinas TNF- α e IL-6, apresentaram uma menor concentração no plasma e no meio de cultura de macrófagos cultivados *ex vivo*. Para linfócitos, em cultura *ex vivo* causou um aumento na concentração de TNF- α .

A suplementação com óleo Oro Inka rico em ácido graxo α -linolênico demonstrou resultado antitumoral, anticaquético e imuno modulador, causando o mesmo efeito que seus derivados de cadeia longa presentes no óleo de peixe em ratos portadores de tumor de Walker 256. Baseado nos resultados da cromatografia no tecido tumoral, isto ocorreu porque o ALA presente no óleo Oro Inka foi convertido para EPA e DHA.

REFERÊNCIAS

ABUSHUFA, R.; REED, P.; WEINKOVE, C. Fatty acids in erythrocytes measured by isocratic HPLC. **Clinical Chemistry**, v. 40, p. 1707-1712, 1994.

AIKAWA, J. *et al.* Glucose metabolism by lymphocytes, macrophages, and tumor cells from Walker 256 tumor-bearing rats supplemented with fish oil for one generation. **Cell. Biochem. Funct.**, v. 26, n. 8, p. 874-80, 2008.

ALBERT, C. M. *et al.* Dietary alpha-Linolenic Acid Intake and risk of sudden cardiac death and coronary heart disease. **Circulation**, v. 112, p. 3232-3238, 2005.

ANDERSON, B. M.; MA, D. W. L. Are all n-3 polyunsaturated fatty acids created equal? **Lipids in Health and Dis.** Published online, doi: [10.1186/1476-511X-8-33](https://doi.org/10.1186/1476-511X-8-33), Aug 10;8:33, p 1 – 20, 2009.

BARACOS, V. E. Cancer-associated cachexia and underlying biological mechanisms. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 26, p. 435–61, 2006.

BARBER, M. D. Cancer Cachexia and its treatment with fish-oil-enriched nutritional supplementation. **Nutrition**, v. 17, p. 751–755, 2001.

BARCELÓ-COBLIJN, G.; MURPHY, E. J. Alpha-linolenic acid and its conversion to longer chain n-3 fatty acids: benefits for human health and a role in maintaining tissue n-3 fatty acid levels. **Progress in Lipid Research**, v. 48, p. 355–374, 2009.

BELO, S. R. B. *et al.* Walker-256 tumor growth is inhibited by the independent or associative chronic ingestion of shark liver and fish oil: a response linked by the increment of peritoneal macrophages nitrite production in Wistar rats. **Nutrition Research**, v. 30, p. 770–776, 2010.

BERQUIN, I. M.; EDWARDS, I. J.; CHEN, Y. Q. multi-targeted therapy of cancer by omega-3 fatty acids. **Cancer Lett.**, v. 269, n. 2, p. 363–377, 2008.

BEYER, R. S.; JENSEN, L. S. Cholesterol content of commercially produced eggs in Georgia. **Poultry Sci.**, v. 68, p. 1703–1706, 1989.

BLANK, C. *et al.* Optimizing DHA levels in piglets by lowering the linoleic acid to alpha-linolenic acid ratio. **J. Lipid. Res.**, v. 43, p. 1537–1543, 2002.

BLANKENSTEIN, T. The role of tumor stroma in the interaction between tumor and immune system. **Current Opinion in Immunology**, v. 17, p. 180–186, 2005.

BODE, A. M.; DONG, Z. Cancer prevention research - then and now. **Nature Reviews. Cancer**, v. 9, p. 508 – 516, jul. 2009.

- BOMMAREDDY, A. *et al.* Effects of dietary flaxseed on intestinal tumorigenesis in Apc(Min) mouse. **Nutr. Cancer**, v. 61, n. 2, p. 276-83, 2009.
- BONATTO, S. J. R. *et al.* Lifelong exposure to dietary fish oil alters macrophage responses in Walker 256 tumor-bearing rats. **Cellular Immunology**, v. 23, p. 56–62, 2004.
- BONGAERTS, G. P. A.; HALTEREN, H. K. V.; VERHAGEN, C. A. M. Cancer cachexia demonstrates the energetic impact of gluconeogenesis in human metabolism. **Medical Hypotheses**, v. 67, p. 1213–1222, 2006.
- BORGHETTI, G. **Efeito da suplementação com óleo de peixe sobre a expressão gênica de cox-2 em ratos portadores de tumor de walker 256**. 59 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Setor Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.
- BØYUM, A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 5, suppl., p. 09-15, 1976.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 142, p. 79-83, 1976.
- BRASIL. Ministério do Desenvolvimento Social. **Estimativas 2010: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer, 2009. p. 98.
- BRENNA, J. T. *et al.* Alfa-Linolenic acid supplementation and conversion to n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in humans. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 80, p. 85–91, 2009.
- BURDGE, G. C. Metabolism of a-linolenic acid in humans. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 75, p. 161–168, 2006.
- BURDGE, G. C.; CALDER, P. C. Conversion of alpha-linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults. **Reprod. Nutr. Dev.**, v. 45, n. 5, p. 581-97, sep./out. 2005.
- BURDGE, G. C.; WOOTTON, S. A. Conversion of a-linolenic acid to palmitic, palmitoleic, stearic and oleic acids in men and women. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 69, p. 283–290, 2003.
- CALDER, P. C. Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. **Lipids**, v. 36, p. 1007–24, sep. 2001.
- CALDER, P. C. Immunomodulation by omega-3 fatty acids. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 77, p. 327–335, 2007.

CALDER, P. C. The relationship between the fatty acid composition of immune cells and their function. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 79, p. 101–108, 2008.

CALDER, P. C. The 2008 ESPEN Sir David Cuthbertson lecture: Fatty acids and inflammation – From the membrane to the nucleus and from the laboratory bench to the clinic. **Clinical Nutrition**, v. 29, p. 05-12, 2010.

CALDER, P. C. *et al.* Uptake and incorporation of saturated and unsaturated fatty acids into macrophage lipids and their effect upon macrophage adhesion and phagocytosis. **Biochem. J.**, v. 269, p. 807–814, 1990.

CALDER, P. C.; KEW, S. The immune system: a target for functional foods. **British Journal of Nutrition**, v. 88, p. 165-176, 2002.

CARAYOL, M.; GROSCLAUDE, P.; DELPIERRE, C. Prospective studies of dietary alpha-linolenic acid intake and prostate cancer risk: a meta-analysis. **Cancer Causes Control.**, v. 21, n. 3, p. 347-55, mar. 2010.

CAWOOD, A. L. *et al.* Eicosapentaenoic acid (EPA) from highly concentrated n–3 fatty acid ethyl esters is incorporated into advanced atherosclerotic plaques and higher plaque EPA is associated with decreased plaque inflammation and increased stability. **Atherosclerosis**, v. 212, p. 252–259, 2010.

CHABOT, S., WILLIAMS, G., & YONG, V. W. Microglial Production of TNF- α is induced by activated T lymphocytes involvement of VLA-4 and inhibition by interferon b-1b. **J. Clin. Invest.**, v. 100, n. 3, p. 604–612, aug.1997.

CHEN, J. *et al.* Dietary flaxseed enhances the inhibitory effect of tamoxifen on the growth of estrogen-dependent human breast cancer (MCF-7) in nude mice. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 15, p. 7703–7711, nov. 2004.

CHILTON, F. H. *et al.* Mechanisms by which botanical lipids affect inflammatory disorders. **Am. J. Clin. Nutr.**, suppl. v. 87, p. 498S–503S, 2008.

CURI, R. *et al.* **Entendendo a gordura: os ácidos graxos.** São Paulo: Editora Manole, 2002.

CURTIS, C. L. *et al.* n-3 fatty acids specifically modulate catabolic factors involved in articular cartilage degradation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 2, p. 721–724, jan. 2000.

DAMSGAARD, C. T.; FRØKIÆR, H.; LAURITZEN, L. The effects of fish oil and high or low linoleic acid intake on fatty acid composition of human peripheral blood mononuclear cells. **British Journal of Nutrition**, v. 99, p. 147–154, 2008.

- DIEDERICHSEN, A. C. P. *et al.* Prognostic value of the CD4⁺/CD8⁺ ratio of tumour infiltrating lymphocytes in colorectal cancer and HLA-DR expression on tumour cells. **Cancer Immunol. Immunother**, Jul; v. 52, n.7, 423-8, 2003.
- ENGEL; JONES, J. B. Causes and elimination of erratic blanks in enzymatic metabolite assays involving the use of NAD in alkaline Hidrazina buffers, improved conditions of L-Glutamato, L-Lactate, and other metabolites. **Annals of Biochemistry**, v. 88, p. 475-484, 1978.
- EZAKI, O. *et al.* Long term effects of dietary alpha-linolenic acid from perilla oil on serum fatty acid composition and on the risk factors of coronary heart disease in Japanese elderly subjects. **J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)**, v. 45, n. 6, p. 759-72, dec. 1999.
- FAO/WHO. **Fats and oils in human nutrition: report of a joint expert consultation**, 57., 1994. Rome: FAO Food and Nutrition, 1994.
- FERGUSON, L. R.; PHILPOTT, M.; KARUNASINGHE, N. Dietary cancer and prevention using antimutagens. **Toxicology**, v.198, p.147-159, 2004.
- FERNANDES, L. C. *et al.* The central role of insulin for the establishment of cachexia in Walker 256 tumor-bearing rats. **Cancer Research Therapy & Control**, v. 10, p. 109-118, 1999.
- FERRUCCI, L. *et al.* Relationship of plasma polyunsaturated fatty acids to circulating inflammatory markers. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 91, n. 2, p. 439-446, 2006.
- FOLADOR, A. *et al.* Effect of fish oil supplementation for 2 generations on changes in macrophage function induced by Walker 256 cancer cachexia in rats. **Int. J. Cancer**, v. 120, p. 344-350, 2006.
- FOLADOR, A. *et al.* Effect of fish oil supplementation for two generations on changes of lymphocyte function induced by Walker 256 cancer cachexia in rats. **Nutr. Cancer**, v. 61, n. 5, p. 670-679, 2009.
- FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for isolation and purification of total lipid from animal tissue. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, p. 497-509, 1957.
- FORMAN, M. R. *et al.* Nutrition and cancer prevention: a multidisciplinary perspective on human trials. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 24, p. 223-54, 2004.
- GALLI, C.; CALDER, P. C. Effects of fat and fatty acid intake on inflammatory and immune responses: a critical review. **Ann. Nutr. Metab.**, v. 55, p. 123-139, 2009.
- GENNERY, A. R.; CANT, A. J. Applied physiology: immune competence. **Current Paediatrics**, v.16, p. 447-452, 2006.

GHAFOORUNISSA, A. *et al.* Effects of dietary alpha-linolenic acid from blended oils on biochemical indices of coronary heart disease in Indians. **Lipids**, v. 37, p. 1007–1086, 2002.

GIBSON, R. A. Docosa-hexaenoic acid (DHA) accumulation is regulated by the polyunsaturated fat content of the diet: Is it synthesis or is it incorporation? **Asia Pac. J. Clin. Nutr.**, v. 13, p. S78, 2004. Abstract.

GOYENS, P. L. *et al.* Conversion of -linolenic acid in humans is influenced by the absolute amounts of -linolenic acid and linoleic acid in the diet and not by their ratio. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 84, p. 44-53, 2006.

GREENHOUGH, A. *et al.* The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. **Carcinogenesis**, v.30, n. 3, p. 377–386, 2009.

GRIMBLE, R. F. Nutritional therapy for cancer cachexia. **Gut**, v. 52, p. 1391-1392, 2003.

GUAITANI, A. *et al.* Two lines of Walker carcinoma 256: their peculiarities and different interactions with the host. **Tumori.**, v. 69, n. 1, p. 01-09, 1983.

HAMAKER, B. R. *et al.* Amino Acid and fatty Acid profiles of the Inca Peanut (*Plukenetia volubilis*). **Cereal. Chem.**, v. 69, n.4, p. 461-463, 1992.

HARDMAN, W. E. Omega-3 fatty acids to augment cancer therapy. **J. Nutr.**, v. 132, p. 3508S–3512S, 2002.

HARDMAN, W. E. (n-3) Fatty acids and cancer therapy. **J. Nutr.**, v. 134, p. 3427S-3430S, 2004.

HASSAN, A. *et al.* An α -linolenic acid-rich formula reduces oxidative stress and inflammation by regulating NF- κ B in rats with TNBS-induced colitis. **J. Nutr.**, v. 140, n. 10, p. 1714-21, 2010.

HERNBERG, M. M.; HAHKA-KEMPPINEN, M. H.; PYRHÖNEN, S. O. The prognostic role of CD4 + and CD8 + lymphocytes during chemoimmunotherapy in metastatic melanoma. **Melanoma Research**, v. 14, p. 493–500, 2004.

HORSSSEN, R. V.; HAGEN, T. L. M. T.; EGGERMONT, A. M. M. TNF- α in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. **The Oncologist**, vol. 11 no. 4, p. 397–408, 2006.

HUBBARD, N. E.; CHAPKIN, R. S.; ERICKSON, K. L. Effect of dietary linseed oil on tumoricidal activity and eicosanoid production in murine macrophages. **Lipids**, v. 29, n. 9, p. 651-655, 1994.

IAGHER, F. **Efeito da suplementação conjunta crônica com óleo de fígado de tubarão e óleo de peixe sobre crescimento tumoral, caquexia e atividade linfocitária de ratos wistar portadores de tumor de walker 256**. 139 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Setor Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

JAMES, S. P., GRAEFF, A. S., & ZEITZ, M. Predominance of helper-inducer T cells in mesenteric lymph nodes and intestinal lamina propria of normal nonhuman primates. **Cellular Immunology**, v. 107, n. 2, p. 372-383, jul. 1987.

JANEWAY, C. A. *et al.* **Imunobiologia: o sistema imunológico na saúde e na doença**. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2007.

JEFFERY, N. M. *et al.* The ratio of n-6 to n-3 polyunsaturated fatty acids in the rat diet alters serum lipid levels and lymphocyte functions. **Lipids**, v. 31, n. 7, p. 737-745, 1996.

JHO, D. H. *et al.* Role of Omega-3 Fatty acid supplementation in inflammation and malignancy. **Integr. Cancer Ther.**, v. 3, n.2, p. 98-111, 2004.

JIANG, Z. Y.; WOOLLARD, A. C.; WOLFF, S. P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids.**, v. 26, n. 10, p. 853-856, 1991.

KONTOU, N. *et al.* The Mediterranean diet in cancer prevention: a review. **Journal of Medicinal Food**, p. 01–14, 2011. In press.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, (London), v. 227, p. 680-685, 1970.

LANDS, B. A critique of paradoxes in current advice on dietary lipids. **Progress in Lipid Res**, v. 47, p. 77–106, 2006.

LARSSON, S. C. *et al.* Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 79, p. 935– 945, 2004.

LIANG, B. *et al.* Impact of postoperative omega-3 fatty acid-supplemented parenteral nutrition on clinical outcomes and immunomodulations in colorectal cancer patients. **World J. Gastroenterol.**, v. 14, n. 15, p. 2434-2439, 2008.

MADHAVI, N.; DAS, V. N. Effects of n-3 and n-6 fatty acids on the survival of vinorelbine sensitive and resistant human cervical carcinoma cells, in vitro. **Cancer Letters**, v.84, p. 31-41, 1994.

MARTÍNEZ, M. E.; MARSHALL, J. R.; GIOVANNUCCI, E. Diet and cancer prevention: the roles of observation and experimentation. **Nature Reviews - Cancer**, v. 8, p. 694 – 703, sep. 2008.

MAZZOTTA, P.; JENEY, C. M. Anorexia-Cachexia syndrome: a systematic review of the role of dietary polyunsaturated fatty acids in the management of symptoms, survival, and quality of life. **J. Pain Symptom. Manage.**, v. 37, n. 6, p. 1069-1077, 2008.

McCUSKER, M. M.; GRANT-KELS, J. M. Healing fats of the skin: the structural and immunologic roles of the ω -6 and ω -3 fatty acids. **Clinics in Dermatology**, v. 28, p. 440–451, 2010.

MILES, E. A. *et al.* Limited effect of eicosapentaenoic acid on T-lymphocyte and natural killer cell numbers and functions in healthy young males. **Nutrition**, v. 22, p. 512–519, 2006.

MORLEY, J. E.; THOMAS, D. R.; WILSON, M.-M. G. Cachexia: pathophysiology and clinical relevance. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 83, n. 4, 735-743, April 2006.

MUEHLMANN, L. A. **Suplementação da dieta com lecitina de soja aumenta a produção de lipídios com atividade de paf (paf-like) nos pulmões de ratos Wistar asmáticos.** 93 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

MUND, R. C. *et al.* Decreased tumor growth in Walker 256 tumor-bearing rats chronically supplemented with fish oil involves COX-2 and PGE2 reduction associated with apoptosis and increased peroxidation. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 76, p. 113–120, 2007.

NISHIYAMA-NARUKE, A. *et al.* HPLC determination of underivatized fatty acids saponified at 37°C analysis of fatty acids in oils and tissues. **Analytical Letters**, v. 31, n. 14, p. 2565–2576, 1998.

NORMAN, H. A. *et al.* The role of dietary supplements during cancer therapy. **J. Nutr.**, v. 133, p. 3794S–3799S, 2003.

NOUROOZ-ZADEH, J.; TAJADDINI-SARMADI, J.; WOLFF, S. P. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine. **Anal. Biochem.**, v.220, p. 403–09, 1994.

NOVAK, T. E. *et al.* NF- β B inhibition by n-3 fatty acids modulates LPS-stimulated macrophage TNF- α transcription. **Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.**, v. 284, p. L84–L89, 2003.

NUNES, E. A. **Efeitos do β -hidroxi- β -metilbutirato (hmb) sobre produção de citocinas e vias de sinalização de células imunitárias.** 80 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

OIKARINEN, S. I. *et al.* Effects of a flaxseed mixture and plant oils rich in α -linolenic acid on the adenoma formation in multiple intestinal neoplasia (Min) mice. **British Journal of Nutrition**, v.94, p. 510–518, 2005.

PAWLOSKEY, R. J. *et al.* Physiological compartmental analysis of alfa-linolenic acid metabolism in adult humans. **J. Lipid Res.**, v. 42, p. 1257–1265, 2001.

PÉGORIER, J.-P.; MAY, C. L.; GIRARD, J. control of gene expression by fatty acids. **J. Nutr.**, v. 134, p. 2444S–2449S, 2004.

PEQUITO, D. C. T. **Suplementação com óleo de peixe em ratos diabéticos. avaliação de parâmetros bioquímicos sanguíneos e da resposta imunológica.** 106 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

PINTO JR, J. A. *et al.* Fish oil supplementation in F1 generation associated with naproxen, clenbuterol, and insulin administration reduce tumor growth and cachexia in Walker 256 tumor-bearing Rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.15, p. 358–365, 2004.

PIPE, R. K.; COLES, J. A.; FARLEY, S. R. Assays for measuring immune response in the mussel *Mytilus edulis*. **Technology Fish Immunology**, v. 4, p. 93-100, 1995.

PIZATO, N. *et al.* Ratio of n-6 to n-3 fatty acids in the diet affects tumor growth and cachexia in walker 256 tumor-bearing rats. **Nutrition and Cancer**, v. 53, n. 2, p. 194–201, 2005.

PIZATO, N. *et al.* Fish oil alters T-lymphocyte proliferation and macrophage responses in Walker 256 tumor-bearing rats. **Nutrition**, v. 22, p. 425–432, 2006.

PIZATO, N. M. P. **Efeito da dieta com diferentes proporções de ácidos graxos n-6:n-3 sobre o crescimento tumoral, caquexia e sistema imunitário em ratos portadores do tumor de walker 256.** 81 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

POPKIN, B. M. Understanding global nutrition dynamics as a step towards controlling cancer incidence. **Nature Reviews. Cancer**, v. 7, p. 61 – 67, jan. 2007.

RATNAYAKE, W. M. N.; GALLI, C. Fat and fatty acid terminology, methods of analysis and fat digestion and metabolism: a background review paper. **Ann. Nutr. Metab.**, v. 55, p. 08–43, 2009.

REN, J.; CHUNG, S. H. Anti-inflammatory effect of alpha-linolenic acid and its mode of action through the inhibition of nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase gene expression via NF-kappaB and mitogen-activated protein kinase pathways. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 55, n. 13, p. 5073-5080, jun. 2007.

RIEDIGER, N. D. *et al.* A systemic review of the roles of n-3 fatty acids in health and disease. **J. Am. Diet. Assoc.**, v. 109, p. 668-679, 2009.

RYDÉN, M.; ARNER, P. Fat loss in cachexia - is there a role for adipocyte lipolysis? **Clinical Nutrition**, v. 26, p. 01–06, 2007.

SADEGHI, S.; WALLACE, F. A.; CALDER, P. C. Dietary lipids modify the cytokine response to bacterial lipopolysaccharide in mice. **Immunology**, v. 96, n. 3, p. 404–410, 1999.
SAUER, L. A.; BLASK, D. E.; DAUCHY, R. T. Dietary factors and growth and metabolism in experimental tumors. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, n. 10, p. 637–49, out. 2007.

SCHNIPPER, L. E.; MEROPOL, N. J.; BROCK, D. W. Value and cancer care: toward an equitable future. **Clin. Cancer Res.**, v. 16, n. 24, p. 6004–6008, 2010.

SERINI, S. *et al.* Dietary polyunsaturated fatty acids as inducers of apoptosis: implications for cancer. **Apoptosis.**, v. 14, p. 135–152, 2009.

SHARMA, P. *et al.* CD8 tumor-infiltrating lymphocytes are predictive of survival in muscle-invasive urothelial carcinoma. **PNAS**, v. 104, n. 10, p. 3967–3972, 2007.

SIMOPOULOS, A. P. Essential fatty acids in health and chronic disease. **Am. J. Clin. Nutr.**, suppl., v.70, p. 560S–569S, 1999.

SIMOPOULOS, A. P. Evolutionary aspects of omega-3 fatty acids in the food supply. **Pmstaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 60, n. 5/6, p. 421–429, 1999.

SIMOPOULOS, A. P. Evolutionary aspects of diet, essential fatty acids and cardiovascular disease. **European Heart Journal Supplements**, v. 3, suppl. D, p. D8–D21, 2001.

SIMOPOULOS, A. P. The mediterranean diets: what is so special about the diet of greece? the mediterranean diets: what is so special about the diet of Greece? **J. Nutr.**, v. 131, p. 3065S–3073S, 2001.

SIMOPOULOS, A. P. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 21, n. 6, p. 495–505, 2002.

SIMOPOULOS, A. P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. **Biomed. Pharmacother.**, v. 56, p. 365–379, 2002.

SIMOPOULOS, A. P. Omega-3 Fatty Acids and Cancer. **Indoor Built Environ**, v. 2, p. 405–412, sep. 2003.

SIMOPOULOS, A. P. Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 60, p. 502–507, 2006.

- SIMOPOULOS, A. P. Genetic variants in the metabolism of omega-6 and omega-3 fatty acids: their role in the determination of nutritional requirements and chronic disease risk. **Experimental Biology and Medicine**, v. 235, p. 785–795, 2010.
- SIMOPOULOS, A. P. Nutrigenetics/Nutrigenomics. **Annu. Rev. Public Health**, v. 31, p. 22.1–22.16, 2010.
- SINCLAIR, A. J.; ATTAR-BASHI, N. M.; LI, D. What is the role of alpha-linolenic acid for mammals? **Lipids**, v. 37, n. 12, p. 1113-1123, 2002.
- SINGER, P. *et al.* Anti-inflammatory properties of omega-3 fatty acids in critical illness: novel mechanisms and an integrative perspective. **Intensive Care Med.**, v. 34, p. 1580–1592, 2008.
- STEPHENS, N. A.; FEARON, K. C. H. Anorexia, cachexia and nutrition. **Medicine Physical problems**, v. 36, n. 2, p. 78–81, 2007.
- STOLL, B. A. n-3 Fatty acids and lipid peroxidation in breast cancer inhibition. **British Journal of Nutrition**, v. 87, p. 193–198, 2002.
- THIES, F. *et al.* Dietary supplementation with eicosapentaenoic acid, but not with other long-chain n-3 or n-6 polyunsaturated fatty acids, decreases natural killer cell activity in healthy subjects aged >55 y. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 73, n. 3, 539-548, March 2001.
- THIES, F. *et al.* Dietary supplementation with g-linolenic acid or fish oil decreases T lymphocyte proliferation in healthy older humans. **J. Nutr.**, v. 131, p. 1918–1927, 2001.
- THOMPSON, L. U. *et al.* Dietary flaxseed alters tumor biological markers in postmenopausal breast cancer. **Clin. Cancer. Res.**, v. 11, n. 10, p. 3828-3835, may. 2005.
- TISDALE, M. J. Mechanisms of cancer cachexia. **Physiol. Rev.**, v. 89, p.381–410, 2009.
- TOGNI, V. *et al.* cancer cachexia and tumor growth reduction in walker 256 tumor-bearing rats supplemented with n-3 polyunsaturated fatty acids for one generation. **Nutrition and Cancer**, v. 46, n. 1, p. 52–58, 2003.
- TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, sep. 1979.
- TRUAN, J. S.; CHEN, J. M.; THOMPSON, L. U. Flaxseed oil reduces the growth of human breast tumors (MCF-7) at high levels of circulating estrogen. **Mol. Nutr. Food Res.**, v. 54, n. 10, p.1414-1421, 2010.
- VALDÉS-RAMOS, R.; BENÍTEZ-ARCINIEGA, A. D. Nutrition and immunity in cancer. **British Journal of Nutrition**, v. 98, suppl. 1, p. S127–S132, 2007.

VINEYARD, K. R.; WARREN, L. K.; KIVIPELTO, J. Effect of dietary omega-3 fatty acid source on plasma and red blood cell membrane composition and immune function in yearling horses. **J. Anim. Sci.**, v. 88, p. 248–257, 2010.

WALLACE, F. A.; MILES, E. A.; CALDER, P. C. Activation state alters the effect of dietary fatty acids on pro-inflammatory mediator production by murine macrophages. **Cytokine**, v. 12, n. 9, p.1374–1379, sep. 2000.

WALLACE, F. A.; MILES, E. A.; CALDER, P. C. Comparison of the effects of linseed oil and different doses of fish oil on mononuclear cell function in healthy human subjects. **British Journal of Nutrition**, v. 89, p. 679–689, 2003.

WANG, L. *et al.* The role of fatty acids and caveolin-1 in tumor necrosis factor alpha-induced endothelial cell activation. **Metabolism.**, v. 57, n. 10, p. 1328-39, 2008.

WEAVER, K. L. *et al.* Effect of dietary fatty acids on inflammatory gene expression in healthy humans. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 23, p. 15400–15407, jun. 2009.

WIESENFELD, P. W. *et al.* Flaxseed increased a-linolenic and eicosapentaenoic acid and decreased arachidonic acid in serum and tissues of rat dams and offspring. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, p.841–855, 2003.

YAMAZAKI, R. K. *et al.* Low fish oil intake improves insulin sensitivity, lipid profile and muscle metabolism on insulin resistant MSG-obese rats. **Lipids in Health and Disease**, <http://www.lipidworld.com/content/10/1/6>, v. 10, n. 66, p 1-7, 2011.

YAQOOB, P. Fatty acids and the immune system: from basic science to clinical applications. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 63, p. 89–104, 2004.

YAQOOB, P.; CALDER, P. C. Fatty acids and immune function: new insights into mechanisms. **British Journal of Nutrition**, v. 98, suppl. 1, p. S41–S45, 2007.

ZHAO, G. *et al.* Dietary a-linolenic acid reduces inflammatory and lipid cardiovascular risk factors in hypercholesterolemic men and women. **J. Nutr.**, v. 134, p. 2991–2997, 2004.

ZHAO, G. *et al.* Dietary a-linolenic acid inhibits proinflammatory cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in hypercholesterolemic subjects. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 85, p. 385–391, 2007.

ZIDAR, N. *et al.* Cyclooxygenase in normal human tissues - is COX-1 really a constitutive isoform, and COX-2 an inducible isoform? **J. Cell. Mol. Med.**, v. 13, n. 9B, p. 3753-3763, 2009.

ANEXOS



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comitê de Ética em Experimentação Animal
(CEEA)



Nº 311b

CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEEA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEEA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

PROCESSO. 23075.010702/2008-99

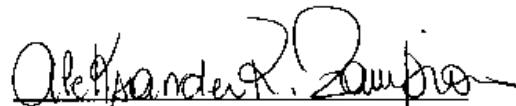
APROVADO. RO 03/2008 15/04/2008

Aprovado mudança de nome do projeto
em RO 10/2010 09/11/2010

TÍTULO: Crescimento tumoral, caquexia, resposta macrofágica e de linfócitos, em ratos portadores de tumor Walker 256 suplementados com óleo rico em ácido graxo α -linolênico

AUTORES: Luiz Claudio Fernandes, Dalton Luiz Schiessel

DEPARTAMENTO. Fisiologia


Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio
Coordenador do CEEA