

WANESSA MAZANEK SOUZA

**SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE E ÓLEO DE FÍGADO
DE TUBARÃO AUMENTA A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM
TUMOR DE WALKER 256**

**CURITIBA
2008**

WANESSA MAZANEK SOUZA

**SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE E ÓLEO DE FÍGADO
DE TUBARÃO AUMENTA A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM
TUMOR DE WALKER 256**

Monografia apresentada para obtenção
do título de bacharel em
Ciências
Biológicas da Universidade
Federal
Paraná.
Orientador : Prof. Dr. Luiz
Cláudio
Fernandes

**CURITIBA
2008**

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	4
LISTA DE ABREVIATURAS.....	5
RESUMO.....	6
1. INTRODUÇÃO.....	7
1.1- CÂNCER.....	7
1.2- TUMOR DE WALKER 256.....	8
1.3- ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS.....	9
1.4- ALQUILGLICERÓIS.....	10
1.5- ÁCIDOS GRAXOS E CÂNCER.....	11
1.6- PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	12
2. OBJETIVOS.....	15
3. MATERIAL E MÉTODO.....	16
3.1- LOCAL.....	16
3.2- AMOSTRA.....	16
3.3- PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	16
3.4- OBTENÇÃO E TRANSPLANTE DAS CÉLULAS DO TUMOR DE WALKER 256.....	17
3.5- PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	18
3.6- ANÁLISE DE ÁCIDOS GRAXOS POR HPLC.....	19
3.7- ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	21
4. RESULTADOS.....	22
4.1- PESO DOS TUMORES.....	22
4.2- DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE ÁCIDOS GRAXOS PRESENTES NOS ÓLEOS DE PEIXE E DE FÍGADO DE TUBARÃO.....	23
4.3- DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE ÁCIDOS PRESENTES NA RAÇÃO.....	25
4.4- DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE ÁCIDOS GRAXOS PRESENTES NO TUMOR.....	25
4.5- PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA NO TECIDO TUMORAL.....	27
5. DISCUSSÃO.....	29
6. CONCLUSÃO.....	34
REFERÊNCIAS.....	35

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura química das moléculas de alquilglicerol.....	10
Figura 2 - Peroxidação lipídica.....	14
Figura 3 - Peso dos tumores.....	22
Figura 4 - Perfil de ácidos graxos do óleo de peixe.....	24
Figura 5 - Perfil de ácidos graxos do óleo de fígado de tubarão..	24
Figura 6 - Concentração de hidróxidos lipídicos em tecido tumoral.....	28
Tabela 1 - Perfil de ácidos graxos na ração.....	25
Tabela 2 - Perfil de ácidos graxos dos lipídeos totais do tumor...	27

LISTA DE ABREVIATURAS

- AGPI** – Ácido graxo poliinsaturado
- BHT** - Hidroxitolueno butilado
- DHA** – Ácido docosaheptaenóico
- DNA** – Ácido desoxirribonucléico
- EPA** – Ácido eicosapentaenóico
- HPLC** – Cromatografia líquida de alta densidade
- IL-1** – Interleucina-1
- IL-6** – Interleucina-6
- LPO** – Lipoperoxidação
- RNA** – Ácido ribonucléico
- TNF** – Fator de necrose tumoral
- TPP** – trifenilfosfina
- W** – Animais não suplementados
- WA** – Animais suplementados com óleo de fígado de tubarão
- WAO** – Animais suplementados com óleo de fígado de tubarão e óleo de peixe
- WO** – Animais suplementados com óleo de peixe
- ω-3** – Omega 3
- ω-6** – Ômega 6

RESUMO

Dados do Instituto Nacional de Câncer (2008), estimam para o ano de 2008 e para 2009, a incidência de 466.730 casos novos de câncer no Brasil. A estimativa é de que até o ano de 2020 serão 15 milhões de novos casos a cada ano. Diante disto, diversos estudos estão sendo realizados na tentativa de se identificar as possíveis causas desse aumento desordenado de casos, e também na tentativa de amenizar os efeitos causados por esta patologia. Pesquisas epidemiológicas sugerem que 30% dos casos de câncer estão ligados à dieta, onde o consumo excessivo de gorduras em especial as saturadas e de ácidos graxos poliinsaturados n-6 (AGPI n-6), associado à baixa ingestão de ácidos graxos poliinsaturados n-3 (AGPI n-3) facilitam o aparecimento de doenças cardiovasculares e câncer. Estudos demonstram que o óleo de peixe e o óleo de fígado de tubarão, quando administrados isoladamente, apresentam capacidade de reduzir o crescimento tumoral. No entanto, o mecanismo pelo qual estes óleos atuam ainda não é conhecido, nem mesmo o efeito da suplementação conjunta destes óleos. Neste trabalho foi proposto investigar o efeito da suplementação isolada e conjunta de óleo de peixe e óleo de fígado de tubarão sobre o crescimento e a peroxidação lipídica do tumor de Walker 256. Para isso foi determinado o peso do tumor, a composição de ácidos graxos da ração fornecida aos animais, a composição de ácidos graxos do tumor e dos óleos utilizados na suplementação e a taxa de peroxidação lipídica do tumor. Ratos Wistar machos de 21 dias foram divididos em quatro grupos: ratos controle sem suplementação (W), ratos submetidos a suplementação crônica com óleo de fígado de tubarão (WA), óleo de fígado de tubarão + óleo de peixe (WAO) e óleo de peixe (WO), por 70 dias na dose de 1g/ Kg p.c. Após este período, foi inoculada suspensão de células de tumor Walker 256 contendo 3×10^7 células/mL, 14 dias após a inoculação, os animais foram ortotanaziados e massa tumoral retirada e pesada. As suplementações com óleo de peixe (WO e WAO) e com óleo de fígado de tubarão (WA) reduziram o crescimento tumoral nos animais, bem como, a peroxidação lipídica. Esses resultados, sugerem que a suplementação com óleo de fígado de tubarão, com óleo de peixe e com óleo de fígado de tubarão + óleo de peixe promovem a redução tumoral parcialmente através da peroxidação lipídica.

1.Introdução

1.1. Câncer

Câncer é caracterizado pelo aumento desordenado e incontrolado do número de células que, ao alcançarem determinada massa, acabam por invadir e comprimir os tecidos vizinhos. Esse processo ocorre através de alterações nos genes que controlam a proliferação e o crescimento celular. As células geradas são propensas ao rápido crescimento, formando tumores. Os tumores formados podem ser benignos ou malignos. Os tumores benignos são revestidos por cápsula fibrosa que garantem sua retirada sem maiores danos ao organismo. Entretanto, os tumores malignos têm a propriedade de entrar na corrente sanguínea e vasos linfáticos, expressando formas secundárias de tumor ou metástases em outros sítios do corpo (ALBERTS *et al*, 2004). O câncer pode ser classificado de acordo com o tipo celular ou tecido de onde provém; em que os das células epiteliais são os carcinomas; das musculares e do tecido conectivo, os sarcomas; e nas células do sangue, as leucemias. Embora ainda desconhecida a etiologia do processo carcinogênico, diversos fatores podem estar envolvidos no desenvolvimento tumoral, dentre eles o fumo, infecções e carcinógenos presentes na dieta alimentar (CURI *et al*, 2002). Estes fatores acabam transformando a célula normal em célula anormal a qual prolifera-se sem controle até a total debilidade do portador (FERNANDES, 1995).

De todos os casos, 80% a 90% dos cânceres estão associados a fatores ambientais. Alguns deles são bem conhecidos: o cigarro pode causar câncer de pulmão, a exposição excessiva ao sol pode causar câncer de pele, e alguns vírus podem causar leucemia (BRASIL, Ministério da Saúde, 2008). O envelhecimento traz mudanças nas células que aumentam a sua suscetibilidade à transformação maligna. Isso, somado ao fato de as células das pessoas idosas terem sido

expostas por mais tempo aos diferentes fatores de risco para câncer, explica em parte o porquê de o câncer ser mais freqüente nesses indivíduos (BRASIL, Ministério da Saúde, 2008).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2008 e válidas também para o ano 2009, apontam que ocorrerão 466.730 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes serão os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e colo do útero no sexo feminino (INCA,2008).

1.2. Tumor de Walker 256

O tumor de Walker 256 é um carcinosarcoma que se desenvolveu espontaneamente na região da glândula mamária de uma rata grávida, e foi descrito em 1928 por George Walker no John`s Hopkins University School of Medicine. Estava localizado na parede abdominal esquerda com tamanho semelhante ao de uma noz. Esse tumor foi transplantado em ratos Sherman por inoculação subcutânea, sendo palpável em uma semana e, levando a morte dos animais após seis semanas. Após 15 dias do transplante subcutâneo, o tumor foi descrito como uma massa firme, esférica, lobulada e parcialmente encapsulada, promovendo metástases nos linfonodos pulmonares, regionais e ocasionalmente retroperitoniais (DUNN, 1945; LIKELY; SANFORD; EARLE, 1952; MIDER; TESLUK; MORTON, 1948; McCOY & NEUMAN, 1956).

Dois subtipos de carcinomas de Walker 256 têm sido investigados por apresentar diferenças marcantes na interação com o organismo do hospedeiro. O tipo A, invasivo e metastatizante, tem um lento ritmo de crescimento induzindo a anorexia e caquexia somente na fase terminal, garantindo uma sobrevivência média de 27 dias. Ao contrário, o tipo B, não invasivo e de crescimento rápido, induz a anorexia e a caquexia precoce com sobrevida de mais ou menos 15

dias. Logo, esse último tornou-se um importante modelo para estudos da caquexia induzida pelo câncer (GUAITANI *et. al.*, 1983).

1.3. Ácidos Graxos Poliinsaturados

Ácidos graxos são ácidos carboxílicos presentes nas gorduras naturais e geralmente se apresentam como cadeias lineares com número par de átomos de carbono (ABAYASEKARA;WATHES,1999). Ácidos graxos podem ser saturados, sem a presença de duplas ligações; monoinsaturados, presença de uma dupla ligação, e poliinsaturados, presença de duas duplas ligações (BRITISH NUTRITION FOUNDATION, 1999).

O ácido linoléico (18:2n-6) é o precursor dos ácidos graxos ômega-6 (ω -6), enquanto o ácido α -linolênico (18:3n-3) é o precursor dos ácidos graxos ômega-3 (ω -3). Esses ácidos graxos são denominados essenciais pois tecidos de animais não podem sintetizá-los. Assim portanto esses ácidos graxos devem ser fornecidos na dieta (ABAYASEKARA;WATHES,1999).

Particularmente, em relação ao ω -3, somente a partir de 1980 descobriu-se sua necessidade na dieta, considerando-se suas propriedades profiláticas no que diz respeito ao aparecimento de distúrbios neurológicos e visuais (CURI; MIYASAKA;PROCÓPIO,2002). Além disso, o consumo de peixes, grandes fontes de ω -3 de cadeia longa, reduz de maneira significativa o risco de doenças cardiovasculares (HERIMM; MERCHANT; ROSNER; STMPFER; WILLETT; ASCHERIO, 2002).

Entre outros efeitos, os ácidos graxos poliinsaturados da família ω -3 quando em grandes quantidades apresentam efeito supressor, inibindo proliferação de linfócitos, a produção de anticorpos e citocinas, a expressão de moléculas de adesão e a atividade de células citotóxicas (CURI; MIYASAKA; PROCÓPIO, 2002). Sua ingestão sob a forma de óleo de peixe, reduz a produção

de citocinas, interleucina 1 (IL-1) interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral (TNF) por células mononucleares. Em adição, esse efeito se mantém por várias semanas após a interrupção de sua ingestão (COOPER; GIBBONS; HORAN; LITTLE; ROTHWELL, 1993).

1.4. Alquilgliceróis

Éteres lipídicos são substâncias químicas com pronunciada atividade biológica. Os alquilgliceróis, um dos representantes desse grupo, encontram-se presentes na medula óssea humana, no leite materno, no leite de vaca e no óleo de fígado de tubarão (BROHULT, BROHULT, BROHULT, JOELSSON, 1986).

O conteúdo lipídico das células de fígado de tubarão de diversas espécies tem sido estudado e relatado na literatura desde os meados de 1950. Deste conteúdo lipídico, cerca de 30% a 50% correspondem a moléculas de alquilgliceróis, gorduras constituídas por uma cadeia hidrocarbônica, saturada ou insaturada, unida por ligação do tipo éter a uma das hidroxilas do glicerol (BROHULT *et al.*, 1977). Os alquilgliceróis mais comuns são denominados de álcoois quimil, batil e selaquil, devido ao número de átomos de carbono na cadeia alifática, que varia de 16 a 18, e o número de átomos de hidrogênio, de 33 a 35 (Figura 1).

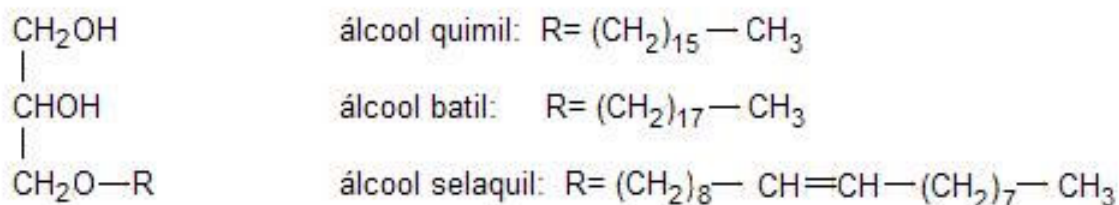


Figura 1: Estrutura química das moléculas de alquilglicerol mais comuns.

A presença de grupo metóxi (-OCH₃) no início da cadeia alifática em substituição ao hidrogênio, confere estimulação da resposta imunológica e imunomodulação, atividade antifúngica, e em culturas de células demonstraram efeitos citotóxicos sobre células tumorais e redução de metástases (BROHULT et al., 1986). Alguns estudos que investigaram os efeitos do alquilglicerol sobre a proliferação celular em diferentes linhas de cânceres humanos, mostraram ocorrer redução significativa na colônia de células tumorais da próstata, bem como aumento da apoptose tanto na próstata quanto ovário, e predominante necrose em carcinomas mamários (KROTKIEWSKI; PRZYBYSZEWSKA; JANIK, 2003). Seus efeitos, também estão relacionados à prevenção de leucopenia, trombocitopenia, e a sua administração a pacientes com câncer de colo uterino resultam em taxas de sobrevivência mais altas comparando-se apenas à administração da terapia radioativa (BROHULT; BROHULT; BROHULT, 1970).

1.5. Ácidos Graxos e câncer

Desde 1960, estudos epidemiológicos sugerem haver correlação entre consumo de determinados ácidos graxos e aparecimento de tumores (ROYNETTE *et al.*, 2004). Há estimativa de que 30% de todos os casos estejam ligados à dieta, demonstrando que o consumo excessivo de gorduras saturadas e ácidos graxos n-6, e a baixa ingestão de ácidos graxos n-3, facilitam o aparecimento de doenças cardiovasculares e câncer (McENTEE *et al.*, 2002).

Em populações como às do Alasca e da Groenlândia, a incidência de câncer é relativamente baixa quando comparada com a quantidade de gordura consumida. Sugere-se que o consumo de grande quantidade de ácidos graxos n-3, presentes em animais marinhos que eles consomem, exerça efeito protetor nestas populações

(CURI,2002). Os ácidos graxos essenciais n-3 e n-6 são metabolicamente e funcionalmente distintos como citado anteriormente. Entretanto, para o bom funcionamento do organismo de mamíferos, uma razão 7:1 entre a ingestão destes dois ácidos graxos é considerada fundamental para a perfeita saúde e bom desenvolvimento do organismo.

Estes lipídios são capazes de modularem a produção de eicosanóides, modificar a expressão gênica, alterar o metabolismo energético, função imunitária, fluidez das membranas, entre outras (CURI et al, 2002). Por este motivo, seus efeitos nos diversos tipos de câncer, nos processos de metástase e angiogênese têm sido investigados.

1.6. Peroxidação lipídica

Um possível mecanismo pelo qual os AG n-3 poderiam estar atuando na inibição do desenvolvimento tumoral é através da lipoperoxidação (LPO), que pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultantes da ação de radicais livres sobre lipídios de membranas celulares (CURI et al, 2002). Os radicais livres promovem a incorporação de um oxigênio molecular a um ácido graxo poliinsaturado presente na membrana das células, formando hidroperóxidos como produto primário. Os produtos da sua oxidação (lipoperóxidos) têm propriedades citotóxicas nas células tumorais (SUARÉZ, et al, 1996). Os produtos da LPO podem causar alterações na membrana e estrutura das células, alterações do citoesqueleto, levando a célula a entrar em apoptose (ZANETTI, R. et al, 2000).

O acúmulo de ácidos graxos poliinsaturados na membrana propicia o ataque de algumas espécies reativas, que abstraem um átomo de hidrogênio do grupo metileno da cadeia e inicia o processo de peroxidação lipídica, aumentando a produção de mais radicais

livres (Figura 2). Esses radicais livres atacam DNA e RNA da célula tumoral, causando sua destruição (ALBERTS et al., 2004).

3 ácidos graxos com 3 duplas ligações

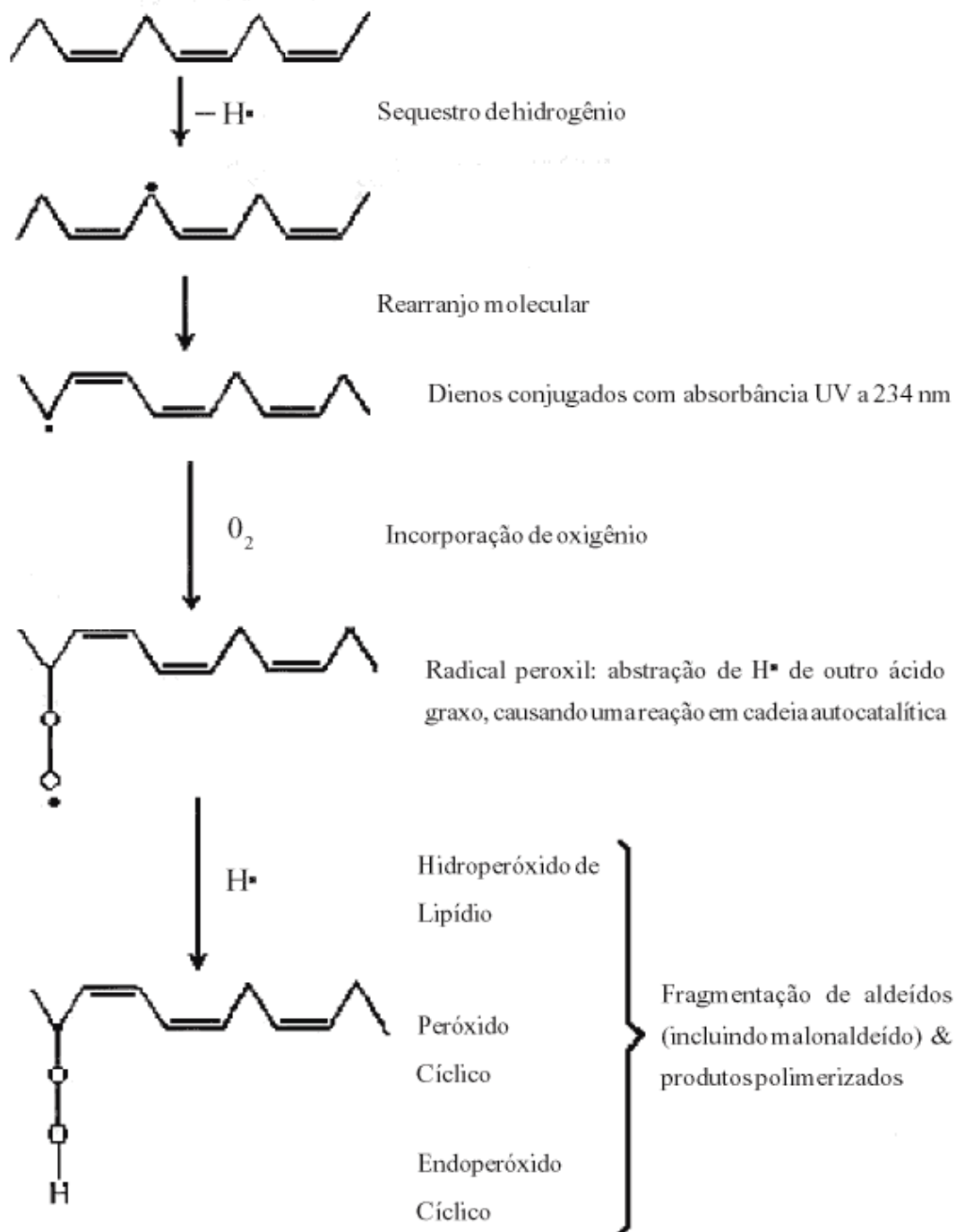


Figura 2: Peroxidação lipídica: uma reação em cadeia. Fonte: Haliwell & Gutteridge (1991)

2. Objetivos

Tem sido demonstrado que o óleo de peixe e o óleo de fígado de tubarão, quando administrados isoladamente, apresentam capacidade de reduzir o crescimento de vários tumores. No entanto, o mecanismo pelo qual estes óleos atuam ainda não é conhecido, nem mesmo o efeito da suplementação conjunta destes óleos. Este trabalho tem como objetivo investigar o efeito da suplementação isolada e conjunta de óleo de peixe e óleo de fígado de tubarão sobre o crescimento e a peroxidação lipídica do tumor de Walker 256.

3. Materiais e Métodos

3.1. Local

Este trabalho de conclusão de curso foi realizado no Laboratório de Metabolismo Celular, no Departamento de Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

3.2. Amostra

Para os experimentos foram utilizados ratos da linhagem Wistar do sexo masculino cedidos pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Todos os animais receberam água e ração à vontade, foram submetidos a ciclo claro/escuro de 12/12 horas e mantidos em ambiente com temperatura controlada ($23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$). Todos os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Setor de Ciências Biológicas.

3.3. Protocolo experimental

Os animais, após o desmame (21 dias), foram separados em quatro grupos contendo cinco animais cada, de acordo com o tipo de suplementação: grupo não suplementado (W), grupo suplementado com óleo de peixe (WO), grupo suplementado com óleo de peixe e óleo de fígado de tubarão (WAO) e grupo suplementado com óleo de fígado de tubarão (WA).

Estes grupos receberam suas respectivas suplementações (1g/Kg p.c.) com auxílio de micropipeta até completarem 70 dias. Após este período, todos os animais dos diferentes grupos sofreram inoculação subcutânea no flanco direito de 1 mL de suspensão de células do tumor de Walker 256, contendo 3×10^7 células/mL, e continuaram

recebendo suplementação por mais 2 semanas. Os animais foram ortotansados no 14º dia após a inoculação do tumor. O tumor foi então retirado, pesado, e fragmentos foram separados e congelados para determinação de hidroperóxidos e para análise da composição de ácidos graxos por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Durante todo experimento, os animais foram pesados a cada dois dias no período da manhã.

3.4. Obtenção e transplante das células do tumor de Walker 256

Em um rato macho adulto foi injetado intraperitonealmente 1 mL de suspensão de 2×10^7 células do tumor de Walker 256 tipo B. Após um período de cinco dias, quando constatada a ascite, o animal foi ortotansado e injetado 10 mL de solução salina 0,9% em sua cavidade abdominal. Em seguida, seu abdômen foi massageado e através de laparotomia mediana, foi retirado da cavidade abdominal, com pipeta de plástico tipo Pasteur, o fluido contendo as células tumorais. A contagem do número de células tumorais foi realizada através do uso de câmara de Neubauer. Da ascite obtida, o mesmo número de células foi inoculado subcutaneamente no flanco direito, nos animais em experimentação. As células tumorais, foram cedidas gentilmente pelo Dr. Rui Curi da USP em 1992, e a partir de então, são mantidas no laboratório de metabolismo celular da Universidade Federal do Paraná para a indução em ratos experimentais, mimetizando assim o comportamento oncológico em relação aos cânceres encontrados em seres humanos.

3.5. Peroxidação lipídica

Foi utilizada a metodologia descrita por Nourooz-Zadeh *et al* (1994), aplicada ao extrato metanólico das amostras. O extrato metanólico foi obtido pela homogeneização de 300 mg de tecido em 1mL de metanol, utilizando-se um homogeneizador (Bosch® GGS 27). O homogenato foi então centrifugado a 5000 g, por 5 minutos, a 4°C. Para cada amostra, alíquotas de 90µL do sobrenadante foram colocadas em tubos de ensaio (1,5 mL de capacidade). Em três destes tubos foram adicionados 10µL de solução metanólica de trifenilfosfina (TPP, Sigma®) a 10 mM, para ocorrer a redução seletiva de hidroperóxidos (os grupamentos hidroperóxidos, especificamente os presentes em lipídios, são convertidos a grupamentos hidroxila pela trifenilfosfina). As amostras contidas em outros três tubos restantes receberam apenas 10µL de metanol. Todos os tubos foram agitados vigorosamente e então incubados em temperatura ambiente por 30 minutos.

Ao final deste período de incubação foi adicionado a cada tudo 900µL do reagente FOX2. Este reagente foi reparado no momento do uso, consistindo de xilenol laranja 100µM, hidroxitolueno butilado (BHT) 4mM, ácido sulfúrico 25mM e sulfato ferroso de amônio 250µM, em metanol 90% (v:v, em água). Após agitação, as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por mais 30 minutos. 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 TPP foram reduzidos, a produção de Fe^{3+} será menor nestas do que nas amostras não tratadas com TPP. O Fe^{3+} formado é então quelado pelo xilenol laranja, o que faz a cor deste indicador passar de laranja a azul-púrpura (passa a absorver luz em 560nm). Ao final do tempo da incubação, a absorbância foi mensurada

a 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. O valor obtido por essa subtração, referente apenas a quantidade de ferro oxidado por hidroperóxidos lipídicos, foi utilizado na fórmula da curva padrão de peróxido de hidrogênio, obtida com soluções padrão de diferentes concentrações (100.0, 50.0, 25.0, 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). O resultado obtido foi referente à concentração do hidroperóxidos lipídicos. Dividiu-se o valor da concentração de hidroperóxidos lipídicos pela concentração de proteínas totais do extrato metanólico. Os resultados foram expressos em nmol de hidroperóxidos/mg de proteína.

3.6. Análise de ácidos graxos por HPLC

3.6.1. Extração Lipídica

A extração lipídica foi realizada segundo o método de FOLCH et al. (1957). As amostras foram adicionadas a 400 μL de PBS, 500 μL de metanol e 1mL de clorofórmio. Após agitação e centrifugação por 1 min a 4°C e 453 g, a fase inferior foi transferida para outro tubo. Esse procedimento foi repetido pela adição de 500 μL de metanol e 500 μL de clorofórmio nas amostras. Aos extratos lipídicos foi adicionado 1 mL de solução de Folch (clorofórmio/ metanol/ água, 3:48:47) seguida de agitação e centrifugação nas mesmas condições. O sobrenadante foi descartado e a fase orgânica evaporada em fluxo de nitrogênio gasoso.

3.6.2. Saponificação

Após a extração lipídica, foi realizada a saponificação pelo método de HAMILTON; HAMILTON (1992), modificado por NISHIYAMA-NAKURE et al. (1998). Os extratos lipídicos foram ressuspensos em 100µL de metanol e a eles foram adicionados 2 mL de NaOH 0,5 M em metanol 90%. As amostras foram homogeneizadas e incubadas sob agitação por 2h a 37°C, para hidrólise alcalina. Em seguida foram resfriadas e misturadas com 1,5 mL de ácido clorídrico 1M para acidificação. Os ácidos graxos foram então extraídos três vezes com 1 mL de hexano. As amostras foram secas em fluxo de nitrogênio gasoso.

3.6.3. Derivatização

A derivatização foi realizada de acordo com o método descrito por ABUSHUFA et al. (1994). As amostras foram ressuspensas em 100µL de acetonitrila (Merck) e agitadas. Após 30 segundos, 100µL do reagente A (bromometil-metóxi-cumarina 1mg/mL em acetonitrila) e 100µL do reagente B (18-Crown-6 e carbonato de potássio em acetonitrila e água) foram adicionados, seguida de agitação e incubação por 15 min a 60°C em banho seco. A mistura foi filtrada e armazenada a 8°C até o momento da análise da composição dos ácidos graxos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

3.6.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Os ácidos graxos foram separados em uma coluna C-8 de fase reversa (250 mm comprimento x 4,6 mm diâmetro interno x 5µm diâmetro das partículas) e um detector de fluorescência. O comprimento de onda de excitação foi de 325 nm e de emissão de 398

nm. O volume injetado foi de 50 μ L em fluxo de 1,0 mL/min. A fase móvel era composta por acetonitrila e água, cujo gradiente inicial era de 77% e 23% e final de 90% e 10% respectivamente. O tempo de corrida foi de 55 min. Foram utilizados os seguintes padrões de ácido graxos: ácido láurico (C12:0), ácido mirístico (C14:0), ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoléico (C16:1), ácido esteárico (C18:0), ácido oléico (C18:1), ácido linoléico (C18:2), ácido linolênico (C18:3), ácido araquidônico (C20:4), ácido eicosapentaenóico (C20:5) e ácido docosaheptaenóico (C22:6).

3.7. Análise estatística

Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média. Os resultados foram submetidos à análise de variância de uma via seguido de pós-teste de Tukey. Valor para $p < 0,05$ foi utilizado para avaliar significância estatística. Teste t de Student foi utilizado em algumas situações.

4. Resultados

4.1. Peso dos tumores

O peso tumoral dos animais não suplementados foi de $17,1 \pm 2,1$. As suplementações com óleo de peixe (WO), óleo de fígado de tubarão (WA) e óleo de peixe+óleo de fígado de tubarão (WAO) promoveram redução de cerca de 50% no peso dos tumores em relação ao grupo W ($p < 0,001$). Não houve diferença significativa entre os grupos WA e WAO, e entre WA e WO ($p > 0,05$ teste t). O grupo WO foi significativamente menor que WAO ($p < 0,05$ teste t) (Figura 3).

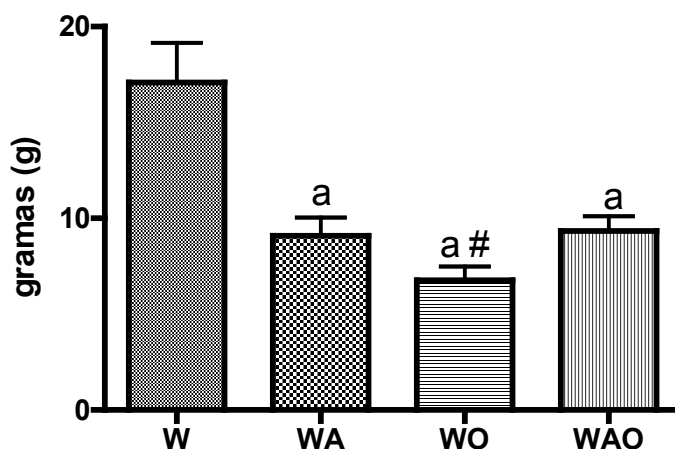


Figura 3. Peso dos tumores (g). W, sem suplementação; WA, suplementado com óleo de fígado de tubarão; WO, suplementado com óleo de peixe; WAO, suplementado com óleo de fígado de tubarão e óleo de peixe. Resultados obtidos de 3 experimentos independentes.

^a $p < 0,001$ em relação a W – ANOVA de uma via e pós-teste de Tukey

[#] $p < 0,05$ em relação a WAO – teste t

4.2. Determinação do perfil de ácidos graxos presentes nos óleos de peixe e de fígado de tubarão

Na amostra de óleo de peixe analisada por HPLC (Figura 4) foi encontrado 26,1% de ácido eicosapentaenóico (EPA) e 18,9% de ácido docosaheptaenóico (DHA). Também estava presente ácido palmítico (13,5%), ácido mirístico (11,4%), ácido palmitoléico (10,1%), ácido oléico (8,7%) e ácido láurico (7,1%). Os ácidos linolênico, araquidônico, linoléico e esteárico apresentaram-se em concentrações inferiores a 2%. Os ácidos graxos insaturados corresponderam a 66,6% dos ácidos graxos totais do óleo de peixe, enquanto os saturados a 33,4%.

No óleo de fígado de tubarão foi detectado 5,4% de EPA e 12% de DHA, o que representou uma menor concentração de ácidos graxos poliinsaturados n-3 que a encontrada no óleo de peixe. Neste óleo também foi detectado ácido láurico (28,3%), ácido oléico (24,3%), ácido palmítico (13,2%), e o ácido mirístico (4,8%). Os ácidos linolênico, araquidônico, linoléico e esteárico apresentaram-se em concentrações inferiores a 2%. Os ácidos graxos insaturados corresponderam a 47,1% dos ácidos graxos totais do óleo de fígado de tubarão, enquanto os saturados corresponderam a 52,9% (Figura 5).

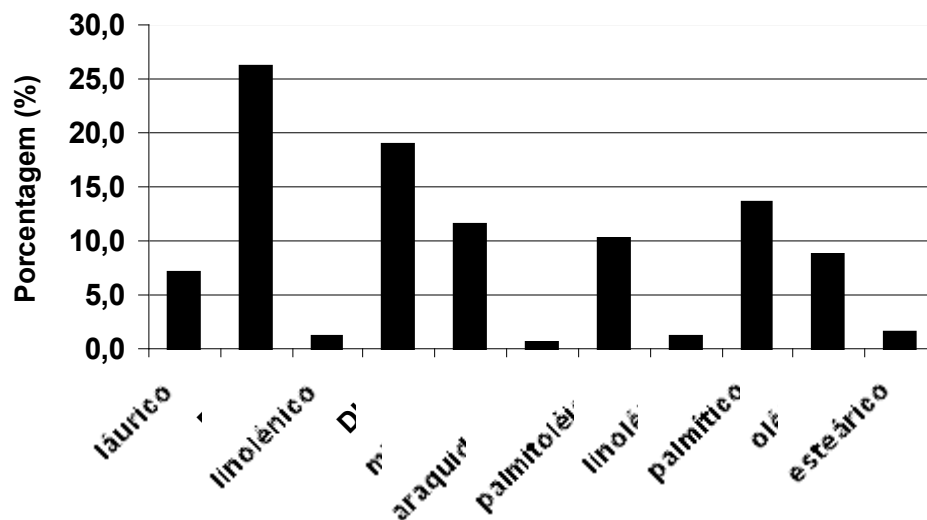


Figura 4. Perfil de ácidos graxos contidos no óleo de peixe. O conteúdo de ácidos graxos foi determinado por HPLC e os resultados foram expressos como % em relação aos lipídeos totais. EPA – ácido eicosapentaenóico, DHA – ácido docosahexaenóico.

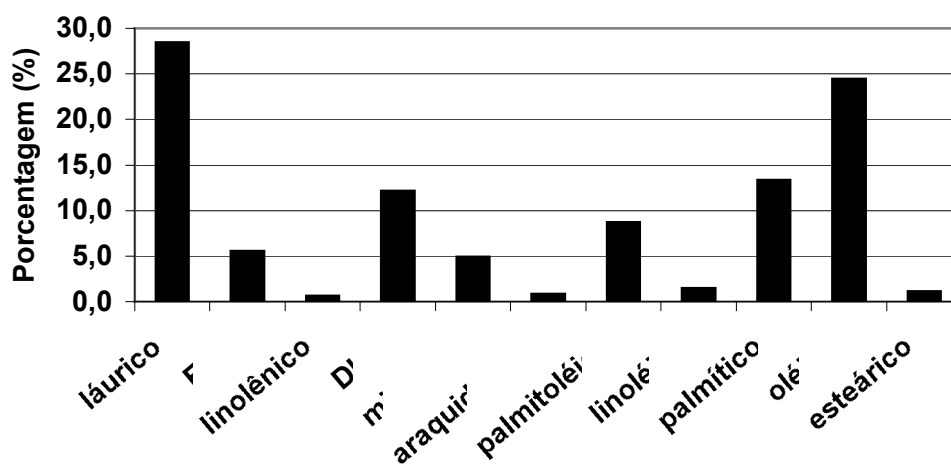


Figura 5. Perfil de ácidos graxos contidos no óleo de fígado de tubarão. O conteúdo de ácidos graxos foi determinado por HPLC e os resultados foram expressos como % em relação aos lipídeos totais. EPA – ácido eicosapentaenóico, DHA – ácido docosahexaenóico.

4.3. Determinação do perfil de ácidos graxos presentes na ração

A fração lipídica da ração foi constituída por 37,0% de ácido palmítico, 34,9% de ácido linoléico e 22,8% de ácido oléico. Os ácidos graxos insaturados somaram 60,1%, enquanto que os saturados somaram 39,9%. EPA e DHA não foram detectados

Tabela 1. Perfil de ácidos graxos contidos na ração utilizada na alimentação dos animais. O perfil de ácidos graxos foi determinado por HPLC e os resultados foram expressos como % em relação aos lipídeos totais.

Ácido graxo	Porcentagem (%)
Linolênico	2,3
Mirístico	0,2
Palmitoléico	0,2
Linoléico	34,9
Palmítico	37,0
Oléico	22,8
Esteárico	2,7

4.4. Determinação do perfil de ácidos graxos presentes no tumor

Os principais ácidos graxos encontrados no tumor do grupo controle (W) foram o palmítico, oléico e linoléico, os quais corresponderam a $24,4 \pm 1,1\%$, $23,5 \pm 0,4\%$ e $22,8 \pm 4,5\%$, respectivamente. Tumores obtidos de animais submetidos à suplementação isolada, e àqueles com óleo de peixe e óleo de fígado de tubarão apresentaram o mesmo perfil destes ácidos graxos quando comparados com o grupo controle (Tabela 2).

EPA e DHA foram encontrados nos tumores dos diferentes grupos na mesma porcentagem. Os grupos suplementados não apresentaram diferença significativa no conteúdo de EPA e DHA em relação ao grupo controle. Os grupos submetidos à suplementação com óleo de peixe (WO) e óleo de peixe + óleo de fígado de tubarão (WAO) apresentaram um aumento significativo de ácido linolênico, em relação ao grupo W e WA, e uma redução na quantidade de ácido araquidônico, em relação ao grupo controle (W). Os ácidos láurico, mirístico, palmitoléico, linoléico, palmítico e oléico não apresentaram diferença significativa entre os grupos.

Tabela 2. Perfil de ácidos graxos no tumor, mensurado por HPLC. Os resultados foram expressos como média percentual \pm erro padrão da média. Resultados obtidos de 3 experimentos independentes. W – controle, WA – suplementado com óleo de fígado de tubarão, WAO – suplementado com óleo de fígado de tubarão e óleo de peixe, WO – suplementado com óleo de peixe.

Ac. Graxos	W	WA	WAO	WO
Láurico	0,5 \pm 0,3	0,2 \pm 0	0,4 \pm 0,1	0,5 \pm 0,2
EPA	0,5 \pm 0,2	0,7 \pm 0,3	0,7 \pm 0,2	0,6 \pm 0,1
Linolênico	0,2 \pm 0,1	0,2 \pm 0,2	0,8 \pm 0,2 ^{ab}	0,7 \pm 0,2 ^{ab}
DHA	1,2 \pm 0,1	2,9 \pm 0,2	3,0 \pm 0,7	3,1 \pm 1
Mirístico	3,4 \pm 1,1	2,4 \pm 1,1	2,4 \pm 0,8	1,8 \pm 0,6
Araquidônico	14,5 \pm 1,9	10,9 \pm 2,2	7,1 \pm 2,1 ^c	5,7 \pm 2,7 ^c
Palmitoléico	1,2 \pm 0,3	0,7 \pm 0,3	1,6 \pm 0,3	1,0 \pm 0,4
Linoléico	22,8 \pm 4,5	23,1 \pm 1,2	25,5 \pm 4	22,6 \pm 2,8
Palmítico	24,4 \pm 1,1	24,6 \pm 2,2	24,7 \pm 1,4	22,2 \pm 1,4
Oléico	23,5 \pm 0,4	22,6 \pm 0,8	25,5 \pm 1,2	22,3 \pm 1,6
Esteárico	15,1 \pm 1,5	15,0 \pm 1,5	10,1 \pm 1,3	7,5 \pm 1 ^{de}

^a p<0,01 em relação a W

^b p<0,001 em relação a WA

^c p<0,05 em relação a W

^d p<0,01 em relação a W

^e p<0,05 em relação a WA

4.5. Peroxidação lipídica no tecido tumoral

Na figura 6 estão apresentados os dados de lipoperoxidação no tecido tumoral obtido dos diferentes grupos. A suplementação com óleo de fígado de tubarão (WA) incrementou a lipoperoxidação em 1,6 vezes, e foi significativamente maior em relação ao controle (W) ($p < 0,05$). A suplementação com óleo de peixe (WO) elevou a peroxidação em 3,3 vezes quando comparado ao controle (W) ($p < 0,001$) e em 2 vezes em relação ao WA ($p < 0,01$). A associação de ambas as suplementações (WAO) não promoveu efeito diferente daquele já observado pela suplementação com óleo de peixe ($p > 0,05$ WAO vs. WO).

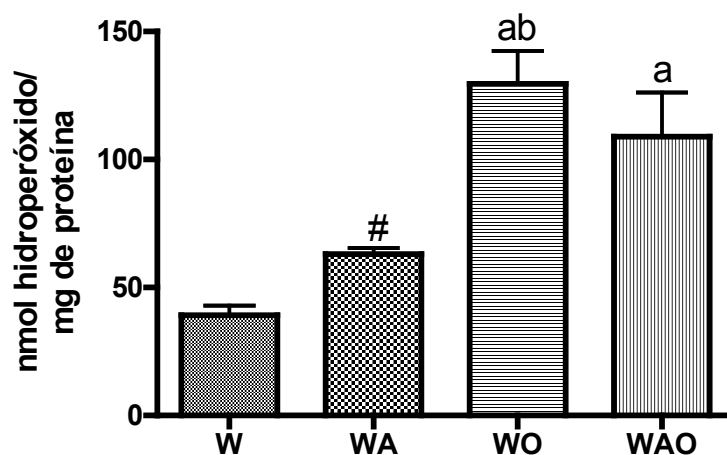


Figura 6. Concentração de hidroperóxidos lipídicos em tecido tumoral. W, sem suplementação; WA, suplementado com óleo de fígado de tubarão; WO, suplementado com óleo de peixe; WAO, suplementado com óleo de fígado de tubarão e óleo de peixe. Os resultados foram expressos como média percentual \pm erro padrão da média. Resultados obtidos de 3 experimentos independentes.

^a $p < 0,001$ em relação a W – ANOVA com pós-teste de Tukey

^b $p < 0,01$ em relação a WA – ANOVA com pós-teste de Tukey

$p < 0,05$ em relação a W – teste t

5. Discussão

Nos últimos anos, foi relatado aumento no índice de doenças auto-imunes, cardiovasculares, câncer e diabetes. Em adição, tem sido estudado mais profundamente o papel da dieta no organismo humano, e de que forma ela poderia ou não favorecer o aparecimento destas doenças. Há estimativa de que 30% de todos os casos de câncer estejam ligados a dieta, onde o consumo excessivo de gorduras saturadas (KUSHI e GIOVANUCCI, 2002) e ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) n-6, e a baixa ingestão de ácidos graxos poliinsaturados n-3, favorecem o aparecimento de doenças cardiovasculares e câncer (McENTEE et al, 2002; ROSE e CONNOLY, 1991; CAYGILL et al, 1994).

Estudos prévios têm mostrado que a dieta rica em AGPIs n-3, pode reduzir o crescimento tumoral em humanos (TISDALE,1997) bem como em vários modelos de animais (BORDREAU, *et al.*,1991; CALDER, et al., 1998b; MUKUTMONI-NORRIS, *et al.*, 2000).

Os animais suplementados com óleo de peixe (WO) e óleo de fígado de tubarão (WA), desde a infância até a idade adulta, foram protegidos da velocidade de crescimento de tumor de Walker 256 (Figura 3) a qual foi reduzida em 50% quando comparada com a do controle (W). Ao associarmos ambas as suplementações, este cenário não foi alterado, sendo similar ao já induzido pelas duas suplementações isoladamente. A possível explicação para estes achados é que no óleo de peixe tem sido relatado haver grande concentração de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 de cadeia longa como EPA e DHA. De fato, na análise do perfil lipídico contido na cápsula de óleo de peixe oferecidos aos animais, detectamos maior concentração destes ácidos graxos (Figura 4). Quanto ao óleo de fígado de tubarão, tem sido atribuído o efeito aos alquilgliceróis (que compõem cerca de 20% do conteúdo lipídico da cápsula, de acordo

com análise por GC-MS), outros não descartam o papel dos AGPI n-3. Estudos anteriores mostram que os alquilgliceróis apresentam um efeito inibidor no crescimento das células de tumores *in vitro* e são capazes de limitar ou até mesmo impedir o crescimento e propagação de tumores em ratos de laboratório (HALLGREN *et al.*, 1978). O fato de o óleo de fígado de tubarão exercer estes efeitos biológicos pressupõe que seus componentes lipídicos se incorporam nas células. Em mamíferos os alquilgliceróis vindos da dieta são absorvidos sem a quebra de sua ligação éter, e são usados como precursores de fosfolipídeos de membrana em diferentes tecidos (OSWALD *et al.*, 2006). Por HPLC pudemos demonstrar que realmente há presença de EPA e DHA no óleo de fígado de tubarão, mas em quantidades bem menores (5,4% e 12%, respectivamente) que as encontradas nas cápsulas de óleo de peixe. Contudo não podemos descartar a possibilidade de que mesmo nestas concentrações estes ácidos graxos tenham sido responsáveis, total ou parcialmente, pela menor velocidade de crescimento tumoral. Este resultado vai de encontro com trabalhos já realizados que mostram uma maior quantidade destes dois ácidos graxos no perfil lipídico do óleo de peixe (TOGNI, *et al.*, 2003). Em modelos de tumores animais, como o Walker 256, o ácido graxo EPA é particularmente hábil na inibição do crescimento tumoral, enquanto que o DHA é potente indutor de apoptose em células tumorais (DAS, 1999).

A composição lipídica da ração demonstrou a ausência de EPA e DHA, e presença de ácidos oléico, palmítico e linoléico como principais constituintes (Tabela 1). Estes três últimos ácidos graxos foram encontrados em proporções semelhantes nos tumores de animais de todos os grupos, e é possível afirmar que os ácidos graxos n-3 (EPA e DHA) foram fornecidos exclusivamente através da suplementação.

Vários mecanismos têm sido postulados como indutores da morte das células tumorais, como a elevação da apoptose, redução da expressão da COX-2, redução da síntese de prostaglandina E2, alteração da resposta imunitária, alteração na atividade de fatores de transcrição e de genes, aumento ou diminuição de radicais livres e espécies reativas de oxigênio, entre outros. Neste trabalho procuramos demonstrar a participação do mecanismo de lipoperoxidação nos tumores dos diferentes grupos.

Está bem estabelecido e bem aceito que peróxidos e superóxidos gerados a partir de peroxidação lipídica promovem dano ao DNA e a outras funções celulares em condições patológicas (DORMANDY, 1983; CHEESEMAN *et. al.*, 1984). Estudos anteriores mostraram que a peroxidação lipídica reduz o crescimento tumoral em animais suplementados com óleo de peixe (MUND, 2004), mas a taxa de peroxidação lipídica induzida pela suplementação com óleo de fígado de tubarão ainda não foi estudada.

A peroxidação lipídica começa pela extração de um átomo de hidrogênio dos ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) para formar um radical de ácido graxo. Isto pode ser iniciado pelos radicais hidroxil (OH^{\cdot}), peroxil (ROO^{\cdot}), alcóxil (RO^{\cdot}), superóxido (O_2^{\cdot}) e o perihidroxil (HO_2^{\cdot}). A geração de radicais de lipoperóxidos produz moléculas que são capazes de reagir com outros AGPI e deste modo, iniciar nova reação e formando hidroperóxidos lipídicos e um novo radical de ácido graxo para posterior peroxidação (Figura 2). Os produtos de peroxidação gerados dessa maneira danificam a membrana celular e o DNA resultando em efeitos citotóxicos nas células cancerosas.

Os resultados apresentados na figura 6 mostram que a taxa de peroxidação lipídica foi significativamente maior nos tumores de ratos suplementados com óleo de peixe (WO) quando comparada à dos animais sem suplementação (W) ($p < 0,05$ WO VS. W). De fato, os

tumores de animais suplementados com óleo de peixe (WO) apresentaram mais AGPI n-3 do que aqueles do grupo W e WA. Portanto, haveria mais substrato disponível para peroxidação no grupo WO. Mund et al (2004), também avaliaram peroxidação em tumor de Walker 256 e encontraram os mesmos resultados para tumores de ratos suplementados cronicamente com óleo de peixe. Os ácidos graxos n-3 são mais suscetíveis à peroxidação lipídica devido ao número de duplas ligações existentes em sua cadeia carbônica (CURI et al, 2002). A suplementação com AGPI n-3 pode induzir a ação de radicais livres e conseqüente morte das células tumorais, e diminuição do crescimento tumoral (JIANG, 1998; DOMMELS et al, 2003).

A peroxidação lipídica nos tumores do grupo suplementado com óleo de fígado de tubarão (WA) foi significativamente maior que a encontrada nos tumores do grupo W ($p < 0,05$), possivelmente pela maior concentração de ácidos graxos n-3 nos tumores do grupo WA que nos do grupo W. Este resultado indica que a lipoperoxidação contribui para a redução do crescimento tumoral induzida pelo óleo de fígado de tubarão (Figura 3). No entanto, este óleo apresenta em seu perfil lipídico concentrações de AGPI n-3 menores que as encontradas no óleo de peixe, o que poderia explicar a menor lipoperoxidação encontrada no grupo WA em relação ao grupo WO ($p < 0,01$). Quando foi associado óleo de peixe + óleo de fígado de tubarão na suplementação (WAO), a peroxidação lipídica não foi diferente da encontrada para o grupo WO, sugerindo que nestes dois grupos (WO e WAO) a quantidade de AGPI n-3 utilizada como substrato para peroxidação foi semelhante. O aumento da peroxidação lipídica nos grupos que receberam óleo de peixe (WAO e WO) possivelmente contribuiu para a redução do crescimento tumoral nestes grupos, mas no grupo WAO não houve redução do crescimento tumoral superior ao observado nos grupos WA e WO. É possível que

haja mecanismo de ação dos dois óleos que envolva as mesmas vias de sinalização.

Os resultados apresentados mostram o já conhecido efeito do óleo de peixe sobre peroxidação lipídica em tumores e sua capacidade de redução significativa do crescimento tumoral. Óleo de fígado de tubarão, até então pouco estudado em animais com tumor de Walker 256, apresentou efeito positivo na redução do crescimento tumoral, capacidade de elevar a peroxidação lipídica em relação a animais não suplementados. Novos estudos deverão ser realizados a fim de elucidar os mecanismos de ação promovidos pelos dois óleos em células tumorais.

Conclusão

O óleo de fígado de tubarão e o óleo de peixe suplementados isoladamente, bem como suplementados conjuntamente, levaram à significativa redução do crescimento tumoral neste estudo. A peroxidação lipídica contribuiu para a redução do crescimento tumoral em todos os animais suplementados (WA, WO, WAO).

Referências Bibliográficas

ABAYASEKARA, D.R.E.; WATHES, D.C. Effects of altering dietary fatty acid composition on prostaglandin synthesis and fertility. **Prostaglandins, leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.61,p.275-287,1999.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia molecular da célula**.4º ed. Ed. Artmed, 2004.

BOUDREAU, M.D.; CHANMUGAN P.S. and HART, S.B. Lack of dose response by dietary n-3 fatty acids at a constant ratio of n-3 to n-6 fatty acids in suppressing eicosanoids synthesis from arachidonic acid. **American Journal of Clinic Nutrition**, v.54(1), p. 110-117, 1991.

Brasil. Ministério da Saúde. **Instituto Nacional do Câncer – INCA**. Estimativas da incidência por câncer. Rio de Janeiro: INCA.2008.

BRITISH NUTRITION FOUNDATION. **N-3 fatty acids and health**. London. Jun 1999. 44p.

BROHULT, A.; BROHULT, J.; BROHULT, S. Bioquematical effects of alkoxyglycerols and their use in cancer therapy. **Acta Chem Scand** 1970:24, 730.

BROHULT, A.; BROHULT, J.; BROHULT, S.; JOELSSIN, I. Effect of alkoxyglycerols on the frequency of injuries following radiation therapy for carcinoma of the uterine cervix. **Acta Obstet gynecol Scand**, v. 56,p. 441-448, 1977.

BROHULT, A.; BROHULT, J.; BROHULT, S.; JOELSSON, I. Reduced mortality in cancer patients after administration of alkoxyglycerols. **Acta Obstet Gynecol Scand** 65: 779-785, 1986.

CALDER, P.C.; DAVIS, J.; YAQOUB, P.; NEWSHOLME, E.A. Dietary fish oil suppress human colon tumor growth in athymic mice. **Clinical Science**, v. 94, p. 303-310, 1998b.

CHEESEMAN, K.H.; BURTON, G.W.; INGOLD, K.V. et al. Lipid peroxidation and lipid antioxidant in normal and tumor cells. **Toxicology Pathology**, v. 12, p. 235-9, 1984.

COOPER, A.L.; GIBBONS, L.; HORAN, M.A.; LITTLE, R.A.; ROTHWELL, N.J. Effect of dietary fish oil supplementation on fever and cytokine production in human volunteers. **Clin Nutrition**, 12: 321-328, 1993.

CURI, R.; POMPÉIA, C.; MIYASAKA, C.K.; PROCÓPIO, J. **Etendendo a gordura**. Editora Manole, São Paulo, 2002.

DAS UM, HUANG YS, BEGIN ME, *et al.*, Uptake and distribution of cis-unsaturated fatty acids and their effect on free radical generation in normal and tumor cells in vitro. **Free Radiological and Biological Med.**, v. 3, p. 9-14, 1987.

DOMMELS, Y.E.M.; HEEMSKERK, S.; VAN DER BERG, H.; ALINK, G.M.; BLADEREN, P.J.; OMMEN, B.V.. Effects of high fat fish oil and high fat corn oil diets on initiation of AOM-induced colonic aberrant crypt foci in male F344 rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, p. 1739-47, 2003.

DORMANDY, T.L.. An approach to free radicals. **Lancet**, ii p. 1010-4, 1983.

DUNN, T.B. Morphology and histogenesis of mammary tumors. **A. A.S. Publication**, v. 22, p. 13-38, 1945.

EARLE, W.R. A study of the Walker rat mammary carcinoma 2567 in vivo and in vitro. **Am. J. Cancer**, v.24,p. 566-612,1935.

FERNANDES, L.C. Alterações Metabólicas causadas pelo tumor de Walker 256 no músculo esquelético, linfócitos e macrófagos de ratos. Tese de Doutorado, USP, São Paulo,1995.

GUAITANI, A., et al. Two lines of Walker carcinoma 256: their peculiarities and different interactions with the host. **Tumori**, v. 69, p.1-9, 1983.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Fisiologia humana e mecanismos das doenças**. 6ª ed, Editora Guanabara koogan, Rio de Janeiro, 1998.

HALLGREN, B.; STALLBERG, G. Occurrence, synthesis and biological effects of substituted glycerol ethers. **Lipids**,v. 16, p. 45-48, 1978.

HALLIWELL, B.; GUITTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 2.ed. New Yoark. Clarendon Press, 1991. p. 198.

HAMILTON, S.; HAMILTON, R.J.; SEWLL, P.A. Extraction of lipids derivate formation in: HAMILTON, R.J. & HAMILTON, S. **Lipid analysis – a practical approach**. Chapter 2.IRL Press at Oxford University press, p. 54, 1992.

HE, K.; RIMM, E.B.; MERCHANT, A.; ROSNER, B.A.; STAMPFER, M.J.; WILLETT, W.C.; ASCHERIO, A. Fish consumption and risk of stroke in men. **Jama**, 288: 3130-3136, 2002.

JING, W.G.; BRYCE, R.P.; HORROBIN, D.F. Essential fatty acids: molecular and cellular basis of their anti-cancer action and clinical implications. **Oncology/ Hematology**, v. 27, p. 179-209, 1998.

KROTKIEWSKI, M.; PRZYBYSZEWSKA, M.; JANIK, P. **Cytostatic and cytotoxic effects of alkylglycerols (Ecomer)**.v. 9, p. 131-135, 2003

KUSHI, L. and GIOVANNUCCI, E. Dietary fat and cancer. **The American Journal of Medicine**, v. 113, p. 63-70, 2002.

LIKELY, G.D.; SANFORD, K.K.; EARLE, W.R. Further studies on de proliferation in vitro of single isolated tissue cells. **J. Nat. Cancer Inst.** , v. 13, p. 177-184, 1952.

McENTEE, M. F.; WHELAN, J. Dietary polyunsaturated fatty acids and colorectal neoplasia. **Biomed Pharmacother**, v.56, p. 380-387, 2002.

McCOY, T. A. & NEUMAN, R.E. The cultivation of Walker carcinoma 256 in vitro from cell suspensions. **J. Nat. Cancer Inst.**, v. 16, p. 1221-1229, 1956.

MIDER, G.B.; TESLUK, H.; MORTON, J.J. Effects of Walker carcinoma 256 on food intake, body weight and nitrogen metabolism of growing rats. **Acta Unio Internat. Cancr. Louvain**, v. 6,p. 409-420, 1948.

MUND, R.C.; Suplementação crônica com óleo de peixe reduz a taxa de crescimento do tumor de Walker 256. Identificação dos mediadores participantes neste processo. **Nutrition and câncer**, 2004.

MUKUTMONI-NORRIS, M.; HUBBARD, N.E.; ERICKSON, K.L. Modulation of murine mammary tumour vasculature by dietary n-3 fatty acids in fish oil. **Cancer Letters**, v. 150, p.101-109, 2000.

NISHIYAMA-NAKURE, et al. HPLC determination of underivatized fatty acid saponified at low temperature analyses of fatty acids oils and tissues. **Analytical Letters**, v. 31, p.2565-76, 1998.

NOUROOZ-ZADEH, J.; TAJADI-SARMADI, J.; WOLF, S.P. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylene orange assay in conjunction with triphenylphosphine. **Anal Biochem**. n.220, p.430-409, 1994.

OSWALD, O.E.; ANDERSON, E.C.; PIANTADOSI, C.; LIM, J. Metabolism of glyceryl ethers in the rat. **Lipids**, v.3. p.51-58, 2006.

ROSE, D.P.; CONOLLY, J.M. Dietary fat and breast cancer metastasis by human tumor xenografts. **Breast Cancer Research** , v. 46, p. 225-237, 1997.

ROYNETTE, C.E.; CALDER, P.C.; DUPERTUIS, Y.M.; PICHARD, C. N-3 polyunsaturated fatty acids and colon cancer prevention. **Clinical Nutritional**, v.23, p. 139- 151, 2004.

TISDALE. M.J.; Cancer cachexia: metabolic alterations and clinical manifestation. **Nutrition**, v.13, p.1-7, 1997.

TOGNI, V.; OTA, C.C.C.; FOLADOR, JUNIOR, O. T., AIKAWA, J.; YAMAZAKI, R.K.; FREITAS, F.A.; LONGO, R.; MARTINS, E.F.; CALDER, P. Câncer 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 (1), p. 52-58 2003.

ZANETTI, R. and CATALÁ, A. Changes in n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids during lipid-peroxidation of mitochondria obtained from rat liver and several brain regions: effect of α -tocopherol. **Prostaglandins, Leukotrienes and Fatty Acids**, v. 62(6), p.379-385, 2000.

