

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA

ANDRESSA MADALOZO LAFFITTE

**EFEITO DO ÓLEO DE FÍGADO DE TUBARÃO E ÓLEO DE PEIXE
SOBRE VIABILIDADE DE LINFÓCITOS EXPOSTOS AO
QUIMIOTERÁPICO FLUORURACILA *IN VITRO***

CURITIBA

2017

ANDRESSA MADALOZO LAFFITTE

**EFEITO DO ÓLEO DE FÍGADO DE TUBARÃO E ÓLEO DE PEIXE
SOBRE VIABILIDADE DE LINFÓCITOS EXPOSTOS AO
QUIMIOTERÁPICO FLUORURACILA *IN VITRO***

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Fisiologia no Curso de Pós-Graduação em Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antonio Tanhoffer.

Coorientador: Prof. Dr. Sandro José Ribeiro Bonatto.

CURITIBA

2017



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia



PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **ANDRESSA MADALOZO LAFFITTE** para fins de obter o título de Mestre em Fisiologia pela Universidade Federal do Paraná, são de parecer unânime à APROVAÇÃO da acadêmica.

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, 28 de agosto de dois mil e dezessete.

Professor Doutor Thiago Demetrius Woiski
IPPP- Membro Titular

Professora Doutora Ana Lúcia Tararthuch
UFPR - Membro Titular

Professor Doutor Sandro José Ribeiro Bonatto
IPPP – Coorientador e Presidente da Banca Examinadora

AGRADECIMENTOS

“Muitas coisas bonitas não podem ser vistas ou tocadas, elas são sentidas dentro do coração. O que você fez por mim, é uma delas. E eu agradeço do fundo do meu coração.”

Deus

Meus pais Tânia e Maurício

Meu irmão Gustavo

Toda minha família e amigos

Meu noivo Eduardo

Meus orientadores prof. Ricardo, prof. Fabíola e prof. Sandro

Meus amigos e colegas que participaram da pesquisa como voluntários, me orientando, colaborando de alguma forma.... Stephanie, Thomas, Pedro, Aldre, Stefani, Débora, Carol, Malu, Camila, Ana Luisa, Juliana B., Juliana S., Bruna, Larisson, Jhonny, Igor, Carlos, Felipe, prof. Bruno, prof. Márcia, prof. Luiz, prof. Kátya, pessoal da secretaria e coordenação.

Sintam-se agradecidos aqueles que me ajudaram e eu não lembrei de citar nesse momento

Meu muito obrigada!

RESUMO

Introdução: A quimioterapia usada no tratamento de neoplasias malignas pode provocar leucopenia, que pode levar à necessidade de suspensão do tratamento até a melhora da imunidade. Mesmo havendo muitos estudos que mostram o efeito imunomodulatório de alguns lipídios, pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos. **Objetivos:** Avaliar viabilidade/capacidade proliferativa dos linfócitos após período de incubação na presença de óleo de fígado de tubarão (OFT) ou óleo de peixe (OP) e/ou quimioterápico. **Material e métodos:** Células mononucleares do plasma de homens saudáveis com idade de 20 a 30 anos, foram obtidas e separadas em 12 grupos experimentais para avaliação da capacidade proliferativa (Alamar Blue®) em presença de óleo de peixe (OP) ou óleo de fígado de tubarão (OFT) (complexados com soro fetal bovino), associados ou não ao quimioterápico (Qt), com estímulo do mitógeno concanavalina A (ConA). Apoptose e necrose celular também foram avaliadas após 72 horas de incubação por citometria de fluxo, e a presença de AGPI n-3 no sobrenadante das células foi avaliada por HPLC. Os dados foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA), seguida de pós-teste de Tukey, nível de significância $p < 0,05$. **Resultados e discussão:** Resultados obtidos com AlamarBlue® revelaram que linfócitos tratados com quimioterápico associado com OP ou OFT demonstraram maior viabilidade celular do que os submetidos apenas ao quimioterápico. As células tratadas com Qt1+OFT mantiveram-se 54%, 42% e 36% mais viáveis que as células tratadas apenas com quimioterápico, em 24, 48, e 72h, respectivamente. As tratadas com Qt1+OP apresentaram resultado ainda mais pronunciado, com aumento da viabilidade de 64%, 69% e 74% em 24, 48 e 72h, respectivamente. As células tratadas com Qt3+OFT mantiveram-se 38% e 45% mais viáveis que as células tratadas apenas com quimioterápico, em 24 e 72h, respectivamente. As tratadas com Qt3+OP apresentaram resultado ainda mais significativo, com aumento da viabilidade de 52%, 64% e 68% em 24, 48 e 72h, respectivamente. Por citometria foi possível observar que OP e OFT, após 72h de cultivo, associados ou não a Qt, foram capazes de reverter efeito pró-necrótico do quimioterápico em maior concentração. Os resultados obtidos por HPLC sugerem presença de efeito dependente e independente de incorporação dos ácidos graxos n-3 na membrana celular. **Conclusão:** OFT e OP foram capazes de se contrapor ao efeito do quimioterápico nas condições estudadas, sendo o efeito do OP mais pronunciado.

Palavras-chave: Óleo de peixe, óleo de fígado de tubarão, quimioterapia, linfócitos.

ABSTRACT

Introduction: Chemotherapy used in the treatment of malignant neoplasms promotes leukopenia, which may lead to treatment suspension until immunity improves. Although there are many studies that show the immunomodulatory role of some lipids, little is known about the mechanism. **Objectives:** To evaluate the viability / proliferative capacity of lymphocytes after the incubation period in the presence of shark liver oil (SLO) or fish oil (FO) and/ or chemotherapy. **Material and methods:** Plasma mononuclear cells from healthy men aged from 20 to 30 years were collected and separated into 12 experimental groups for the evaluation of proliferative capacity (Alamar Blue®) in the presence of fish oil (FO) or shark liver oil (SLO) (complexed with fetal bovine serum - FBS), associated or not to chemotherapy (Ct), stimulated by mitogen concanavalin A (ConA). Apoptosis and cell necrosis were also evaluated after 72 hours of incubation by flow cytometry and presence of n-3 PUFA in the cell supernatant by HPLC. For the statistical test, data were submitted to One-Way ANOVA, followed by Tukey post-test, significance level $p < 0.05$. **Results and discussion:** Results obtained with AlamarBlue® revealed that lymphocytes treated with OP or OFT chemotherapy showed greater cell viability than those submitted to chemotherapy alone. Cells treated with Ch1 + SLO remained 54%, 42% and 36% more viable than cells treated with chemotherapy alone at 24, 48, and 72h, respectively. Those treated with Ch1 + FO presented an even more significant result, with a viability increase of 64%, 69% and 74% at 24, 48 and 72h, respectively. Cells treated with Ch3 + SLO remained 38% and 45% more viable than cells treated with chemotherapy alone, at 24 and 72h, respectively. Those treated with Ch3 + FO presented an even more significant result, with a viability increase of 52%, 64% and 68% at 24, 48 and 72h, respectively. By cytometry it was possible to observe that FO and SLO, after 72h of culture, associated or not to Ch, were able to revert pro-necrotic effect of the chemotherapeutic in higher concentration. The results obtained by HPLC suggest the presence of a dependent and independent effect of n-3 fatty acids incorporation into the cell membrane. **Conclusion:** SLO and FO were able to reverse chemotherapy effect under the investigated conditions, with the effect of OP being more pronounced.

Keywords: Fish oil, Shark liver oil, chemotherapy, lymphocytes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ilustração dos leucócitos: Linhagem linfoide e mielóide.....	16
Figura 2	Mecanismo geral de desenvolvimento de tumores.....	19
Figura 3	Cálculo da dose de quimioterapia baseado na superfície corporal..	22
Figura 4	Estrutura química da fluoruracila.....	24
Figura 5	Vias de metabolização e mecanismos de ação do 5FU	25
Figura 6	Estrutura química dos principais alquilgliceróis.....	26
Figura 7	Estrutura química do triacilglicerol demonstrando as ligações éster e do alquildiacilglicerol demonstrando a ligação éter.....	27
Figura 8	Estrutura química de um fosfolipídio éter.....	28
Figura 9	Estrutura química do EPA, DHA e ALA.....	31
Figura 10	Metabolização dos Ácidos graxos n-3.....	31
Figura 11	Estrutura química de um ácido graxo n-3.....	32
Figura 12	Sangue após centrifugação demonstrando células sanguíneas separadas do plasma.....	38
Figura 13	Formação da nuvem de linfócitos após centrifugação.....	39
Figura 14	Cálculo para contagem de linfócitos.....	41
Figura 15	Placa com 24 wells pronta com os 12 grupos.....	42
Figura 16	Porcentagem de redução do Alamar Blue dos grupos controles.....	46
Figura 17	Porcentagem de redução do Alamar Blue dos grupos com quimioterápico.....	46
Figura 18	Porcentagem de redução do Alamar Blue dos grupos com óleo.....	47
Figura 19	Porcentagem de redução do Alamar Blue dos grupos com Qt1+óleos.....	48
Figura 20	Porcentagem de redução do Alamar Blue dos grupos com Qt3+óleos.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Número de casos novos de câncer e mortes por câncer no mundo.....	20
Tabela 2	Distribuição proporcional dos 10 tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma.....	20
Tabela 3	Tipos de quimioterapia, classificados conforme suas diferentes especificidades.....	22
Tabela 4	Classificação e mecanismos de ação antineoplásicos.....	23
Tabela 5	Composição de cada grupo por <i>well</i>	40
Tabela 6	Grupos controles e seus respectivos tratados.....	45
Tabela 7	Grupos avaliados por citometria de fluxo e seus respectivos percentuais de células viáveis, apoptóticas, necróticas e apoptóticas tardias.....	49
Tabela 8	Percentual de ácidos graxos do sobrenadante de cultura de células mononucleares após 72 horas.....	50

LISTA DE SIGLAS

ARA	Ácido araquidônico
AG	Ácidos graxos
AGPI	Ácidos graxos poliinsaturados
ALA	Ácido alfa linolênico
ALQ	Alquilgliceróis
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CD	Cluster of differentiation
ConA	Concanavalina A
Cox-2	Ciclooxigenases 2
DHA	Ácido docoheptaenoico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EPA	Ácido eicosapentaenoico
5FU	Fluoruracila
IFN- γ	Interferon gamma
Ig	Imunoglobulina
M	Molar
mg	Miligrama
ml	Mililitro
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
N-3	Ômega 3
NaCl	Cloreto de sódio
NK	Células " <i>Natural Killer</i> "
OFT	Óleo de Fígado de Tubarão
OP	Óleo de peixe
PBS	Solução tampão fosfato salina
PCR	Proteína C reativa
PKC	Proteína quinase C
PGE	Prostaglandinas
Qt	Quimioterapia

RNA	Ácido ribonucléico
RPMI	Meio de cultivo
SFB	Soro fetal bovino
TCLE	Termo de consentimento livre esclarecido
TGF- β 1	Transforming growth factor beta 1
Th	Células " <i>T-helper</i> "
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UFPR	Universidade Federal do Paraná

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
γ	Gamma
Ω	Ômega
n	Ômega
ω	Ômega
μL	Microlitros
μg	Micrograma

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	14
1. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
1.1 SISTEMA IMUNITÁRIO.....	15
1.2 CÂNCER E QUIMIOTERÁPICOS.....	18
1.2.1 CÂNCER.....	18
1.2.2 QUIMIOTERAPIA.....	21
1.2.3 FLUORURACILA.....	23
1.3 ÓLEO DE FÍGADO DE TUBARÃO.....	26
1.4 ÓLEO DE PEIXE.....	31
2. JUSTIFICATIVA.....	35
3. OBJETIVOS.....	36
3.1 OBJETIVO GERAL.....	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1 NUTRACÊUTICOS E REAGENTES.....	37
4.2 DESENHO EXPERIMENTAL.....	37
4.2.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	37
4.2.1.1 ISOLAMENTO DE MONÓCITOS.....	38
4.2.1.2 COMPLEXAÇÃO DOS ÓLEOS.....	39
4.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	40
4.4 ALAMAR BLUE.....	41
4.5 PROPORÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS, APOPTÓTICAS E NECRÓTICAS AVALIADAS POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	42
4.6 PERFIL LIPÍDICO E HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY- HPLC.....	43
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
5. RESULTADOS.....	45
5.1 VIABILIDADE CELULAR – ALAMAR BLUE.....	45

5.2 PROPORÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS, APOPTÓTICAS E NECRÓTICAS POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	49
5.3 PERFIL LIPÍDICO OBTIDO POR HPLC.....	50
6. DISCUSSÃO.....	52
CONCLUSÃO.....	64
REFERÊNCIAS.....	65

INTRODUÇÃO

O sistema imunitário possui mecanismos de defesa contra micro-organismos ou contra a transformação maligna de células, como o câncer (MARTÍNEZ & ALVAREZ-MON, 1999). De fato, células cancerosas se dividem mais rapidamente, e geralmente de forma desorganizada, do que as células saudáveis (BRASIL, 2006), exigindo então alta efetividade na ação leucocitária.

Dentre os tratamentos disponíveis para o combate ao câncer, a quimioterapia é muito difundida e pode eliminar mesmo células em locais distantes do sítio de origem, como em metástases, sendo considerada uma forma eficaz e segura de tratamento dessa patologia (BENEFÍCIOS, 2017).

Por outro lado, tratamentos com quimioterápicos também podem causar certos efeitos colaterais, como náuseas, vômitos, “rash” cutâneo e danos aos leucócitos (leucopenia) do sistema imunitário (CARNEIRO, 2011).

Em contrapartida, o sistema imunitário pode ser modulado por alguns ácidos graxos (AG), principalmente do tipo poli-insaturado, por meio da incorporação desses compostos na membrana das células de defesa (CALDERA *et al.*, 2009). Dois importantes óleos que vem sendo estudados quanto a sua atuação no sistema imunitário são o óleo de fígado de tubarão (OFT) e o óleo de peixe (OP), ambos fontes de AG ômega-3 (ou n-3). No entanto, OFT também possui em sua composição lipídios denominados alquilgliceróis (ALQ), e é considerado a principal fonte natural destes lipídios. Estudos prévios com ALQ já demonstraram ação preventiva à leucopenia em pacientes portadoras de câncer de mama submetidas a tratamento contra o câncer (BROHULT, 1957). Em relação aos AG n-3, há evidências de que seu consumo promove elevação do número de leucócitos circulantes (HARDMAN *et al.*, 2002).

Pelo fato de quimioterápicos estarem relacionados com leucopenia, e tanto OP como OFT serem nutracêuticos imunomoduladores com potencial para reduzir leucopenia, este trabalho visa simular *in vitro* uma condição de disponibilidade de AG n-3 e ALQ para linfócitos na presença de quimioterápico, e avaliar a viabilidade/capacidade proliferativa destas células.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Sistema imunitário

O sistema de defesa é essencial contra o desenvolvimento de infecções e tumores. Isso é possível pela característica biológica do nosso organismo de reconhecer determinadas estruturas moleculares ou antígenos e desenvolver uma resposta efetora diante destes estímulos, provocando sua destruição ou inativação. Sendo o sistema imunitário, o qual é constituído por uma complexa rede de células e moléculas distribuídos por todo o corpo, o responsável por essa função (MARTÍNEZ & ALVAREZ-MON, 1999).

Essas células que constituem o sistema imunitário se originam da medula óssea vermelha e são encontradas circulando no plasma, organizadas em órgãos linfóides como timo, baço e linfonodos ou dispersas em outros locais. As células tronco hematopoiéticas - originadas na medula óssea - têm habilidade de se multiplicar e se diferenciar em qualquer célula do sangue, como plaquetas, eritrócitos (glóbulos vermelhos) e leucócitos (glóbulos brancos), que migram em função do patrulhamento dos tecidos (BERRIDGE, 1997; CALDER, 2001; CALDER, 2007).

Os leucócitos, especificamente, são as células mais importantes no sistema imunitário e se diferenciam em duas linhagens: (i) linhagem mielóide, precursora dos macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos e monócitos, e, (ii) a linhagem linfóide que é precursora dos linfócitos T, células natural killer (NK) e linfócitos B (Figura 1) (CRUVINEL, *et. al.*, 2010).

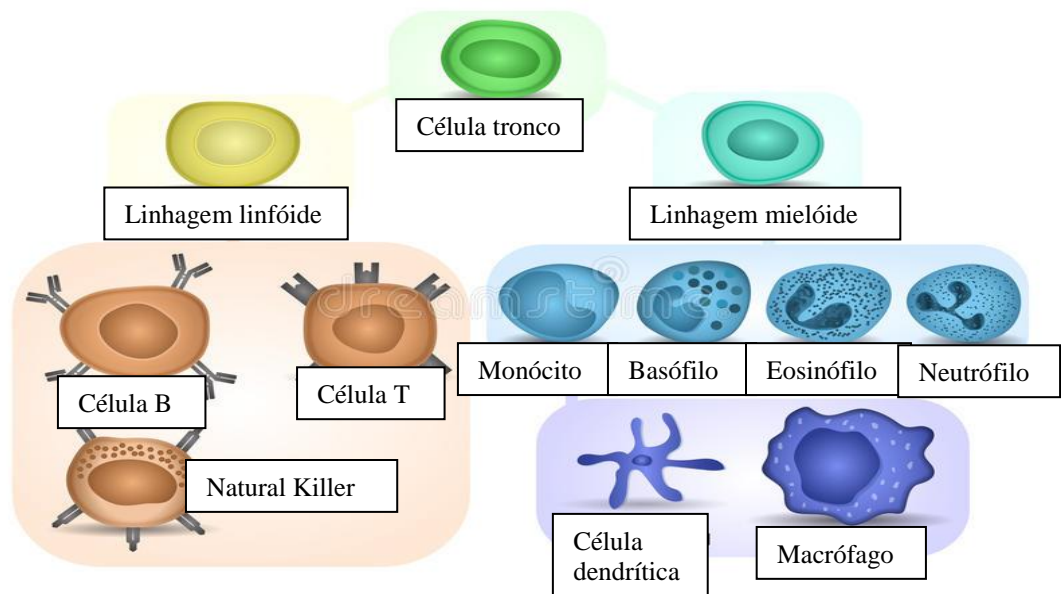


FIGURA 1- Ilustração dos leucócitos: Linhagem linfóide e mielóide. FONTE: Dreamstime, 2017.

De fato, essas linhagens, em conjunto, contribuem para a formação da função imunológica, por meio das respostas imunitárias inata e adaptativa (MEDZHITOV & JANEWAY, 2000).

Denomina-se inata por referir-se a *natural*, ou seja, o indivíduo já nasce com ela. Para o antígeno conseguir entrar no organismo, ele se depara com barreiras mecânicas, químicas e biológicas que se opõem a sua entrada. Caso o mesmo ultrapasse essas barreiras, a imunidade inata possui rápidas respostas à determinados estímulos, independente de contato prévio com os agentes agressores (MEDZHITOV & JANEWAY, 2000).

Essa resposta tem como principais células os granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), macrófagos, células dendríticas e as células NK (CRUVINEL *et. al.*, 2010). Sendo que as células fagocíticas (células dendríticas, macrófagos e neutrófilos) expressam receptores de membrana específicos para moléculas comuns em grupos de microorganismos. Já os macrófagos se originam de um precursor celular na medula óssea, sendo posteriormente transferidos para a circulação sanguínea como monócitos, onde ali permanecem por diversas horas para então migrarem para os tecidos já diferenciados em macrófagos, sendo capazes de reconhecer e destruir invasores (NATHAN, 1983).

Em contrapartida à resposta inata, a resposta imunitária adaptativa produz anticorpos contra um determinado agente infeccioso, ou seja, a imunidade desenvolve-se em resposta a uma infecção e adapta-se a ela. Essa resposta imunitária depende de células especializadas, os linfócitos T e B que proporcionam a especificidade e diversidade de reconhecimento, especialização de resposta e memória imunológica duradoura que pode ocorrer após exposição à doença ou vacinação (CALDER, 2007; DELVES & ROITT, 2000). Essas chamadas células linfocitárias correspondem a cerca de 30% do tecido celular circulante do sangue e são responsáveis por um grande número de mitoses (LORENZI, 2006), sendo classificadas como linfócitos B (células derivadas da medula óssea que produzem imunoglobulinas, combatem patógenos e constituem a imunidade humoral) e em linfócitos T (células derivadas da medula óssea e maturadas no timo, que agem contra patógenos, constituindo a imunidade mediada por células).

Diferentemente, os linfócitos T apresentam receptores de membrana específicos para antígenos, enquanto que os linfócitos B precisam ser apresentados a eles por outras células, as células apresentadoras de antígeno (CALDER, 2007). Os linfócitos T *helper*, são distinguidos pela presença da proteína CD4 (CD, do inglês *cluster of differentiation*) em sua superfície, enquanto linfócitos T citotóxicos apresentam proteína CD8. Os linfócitos T citotóxicos são capazes de matar células infectadas, e os linfócitos T *helper* auxiliam células B, macrófagos, células *NK* e até mesmo outros linfócitos T, a combater infecções por produzir citocinas específicas (CALDER *et. al.*, 2002; CALDER, 2007).

As citocinas produzidas atuam como mensageiros químicos que permitem a comunicação entre essas duas respostas, inata e adaptativa, por meio do contato direto entre essas citocinas e as células (CALDER, 2001). Contudo, a possível ultrapassagem de ambas as respostas por células tumorais, leva a progressão tumoral (ZITVOGEL, *et. al.*, 2008).

1.2 Câncer e quimioterápicos

1.2.1 Câncer

As células do corpo humano são estruturadas para formar tecidos que dão origem a órgãos. As células possuem um ciclo celular, as quais se dividem (duplicando seu material genético e o dividindo igualmente às suas células filhas), amadurecem e morrem, sendo então renovadas para começar um novo ciclo. Ao considerar a presença de alguma anormalidade nessas fases (dano no DNA) o ciclo é interrompido até que o defeito seja reparado e o ciclo celular possa continuar, caso contrário a célula entra em apoptose. No câncer, constituído por células anormais esse processo natural deixa de ser seguido, sofrendo mutação que pode provocar danos em um ou mais genes (segmentos do DNA que contém a informação genética, que controlam as funções normais das células) de uma única célula. Se não houver o reparo desse dano, a célula se divide descontroladamente e produz novas células anormais. Contudo, se os sistemas de reparo e imunológico falham na tarefa de destruir e limitar essas células anormais, esse ciclo continua repetindo-se até que em determinado momento células cancerosas são produzidas, as quais podem desenvolver mecanismos para impedir a apoptose e continuam a multiplicar-se de forma descontrolada, podendo formar um tumor maligno, invadindo e destruindo tecidos ou gerando metástases, conforme mostrado na Figura 2 (BRASIL, 2006; CARNEIRO, 2011).

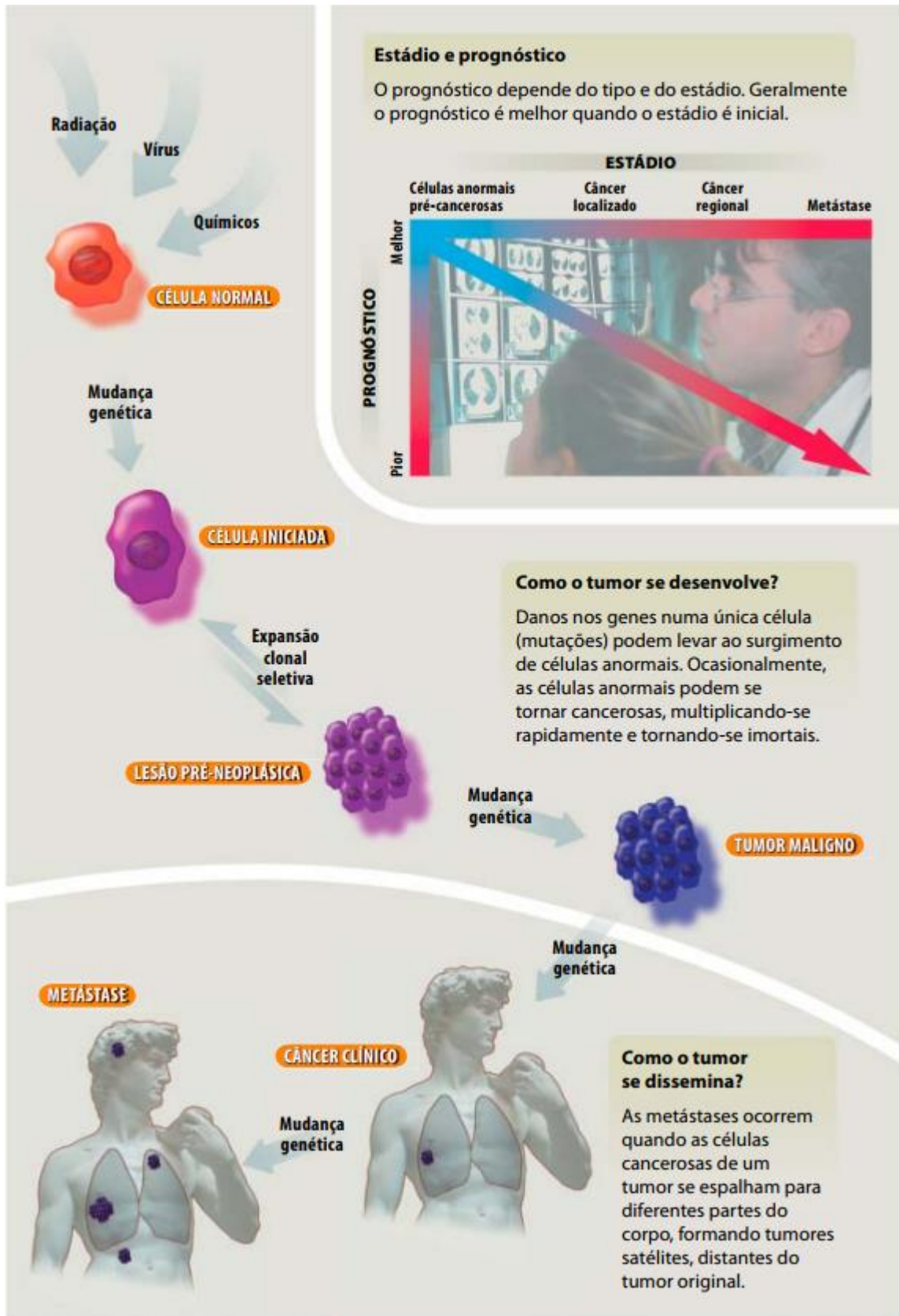


FIGURA 2 – Mecanismo geral de desenvolvimento de tumores. FONTE: Brasil, 2006.

Mundialmente, de acordo com as estatísticas de 2012, o número de novos casos de câncer é maior do que 14 milhões, sendo que o número de mortes por essa doença supera 8 milhões (Tabela 1) (GLOBOCAN, 2012).

TABELA 1 - Número de casos novos de câncer e mortes por câncer no mundo. FONTE: Globocan, 2012.

Mundo	Ambos os sexos
População (milhares)	7.054.446,00
Número de novos casos de câncer (milhares)	14.068,00
Número de mortes por câncer (milhares)	8.202,00

Segundo a Organização Mundial da Saúde o número de casos novos aumentou de 12,7 milhões (2008) para mais de 14 milhões (2013), e o número de mortes por câncer de 7,6 milhões (2008) para 8,2 milhões (2013) e para 8,8 milhões (2017), ou seja, o número de casos novos e mortes por essa doença vem crescendo constantemente (OMS-a, 2013; OMS-b, 2017).

No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer, são estimados para o ano de 2016-2017, 600 mil novos casos de câncer (INCA-d, 2017). Consta na figura abaixo a distribuição dos 10 tipos de câncer mais incidentes conforme o sexo (Tabela 2).

TABELA 2- Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma. FONTE: INCA, 2015.

Localização primária	Homens		Localização primária	Mulheres	
	Casos	%		Casos	%
Próstata	61.200	28,6	Mama feminina	57.960	28,1
Traqueia, Bronquio e Pulmão	17.330	8,1	Cólon e reto	17.620	8,6
Cólon e reto	16.660	7,8	Colo de útero	16.340	7,9
Estômago	12.920	6	Traqueia, Bronquio e Pulmão	10.890	5,3
Cavidade Oral	11.140	5,2	Estômago	7.600	3,7
Esôfago	7.950	3,7	Corpo de útero	6.950	3,4
Bexiga	7.200	3,4	Ovário	6.150	3
Laringe	6.360	3	Glândula tireóide	5.870	2,9
Leucemias	5.540	2,6	Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5	Sistema Nervoso Central	4.830	2,3

As taxas de sobrevida dos pacientes com câncer são diferentes ao comparar a doença restrita ao órgão de origem ou já estendida a outros órgãos. Portanto, existe a necessidade de se classificar os casos de câncer baseado nessas informações. Para descrever a gravidade do câncer na classificação dessa doença, a palavra estágio é utilizada. O estágio inicial significa que a pessoa tem apenas um pequeno tumor maligno. No avançado, o tumor já maior, pode ter se espalhado para as outras áreas do corpo (BRASIL, 2006, INCA-a, 2017).

O sistema de estadiamento TNM (preconizado pela União Internacional Contra o Câncer) é o mais utilizado, em que ocorre a classificação do tumor maligno, onde “T” equivale as características do tumor primário (variando de T0 a T4), “N” é designado às características dos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza (variando de N0 a N3) e “M” para a presença ou ausência de metástases (variando de M0 a M1) (INCA - a, 2017).

Ao avaliar a classificação clínica TNM para intestino delgado por exemplo, T3N1M0 significa que T3 refere a tumor que invade desde a muscular própria até a subserosa, N1 metástase em linfonodos regionais e M0 ausência de metástase à distância (BRASIL, 2004).

A causa dessa doença pode estar relacionada a fatores como a ausência de exercícios físicos, sedentarismo, alimentação inadequada, exposição à radiação ultravioleta sem proteção, uso de tabaco e de álcool em excesso, a não-vacinação contra agentes infecciosos como hepatite B e prática sexual sem proteção (BRASIL, 2006).

1.2.2 Quimioterapia

Dos diversos tratamentos para essa doença (câncer), os principais são radioterapia, cirurgia, transplante de medula óssea e quimioterapia (INCA-B, 2017). A quimioterapia especificamente, pode causar severos danos às séries de células brancas do sistema imunitário. Mesmo assim, mais de 50% dos pacientes com câncer recebem a quimioterapia como forma de tratamento, por ser capaz de eliminar as células cancerosas em locais distais às fontes de câncer originais, sendo considerada uma forma segura e eficaz no tratamento de câncer, além de diminuir a

chance de recidiva da doença e reduzir o tamanho de tumores grandes em caso de cirurgia, possibilitando uma cirurgia menos invasiva (BENEFÍCIOS, 2017).

Basicamente, o tratamento com quimioterápicos tem diferentes finalidades, que são dependentes do tipo e do estadió em que a doença se encontra (Tabela 3):

TABELA 3 – Tipos de quimioterapia, classificados conforme suas diferentes especificidades. FONTE: INCA-C, 2017.

Curativa	Usada aspirando conseguir o controle completo do tumor
Adjuvante	Após cirurgia curativa, visando esterilizar células residuais
Neoadjuvante	Indicada para se ter redução parcial do tumor, permitindo uma complementação terapêutica com cirurgia e/ou radioterapia
Paliativo	Tem o objetivo de melhorar a qualidade de sobrevivida do paciente, sem finalidade curativa

Ao contrário de outros tratamentos contra células tumorais, os quimioterápicos são tóxicos para células normais, especialmente as localizadas na medula óssea e células da mucosa. Porém, os agentes utilizados no tratamento do câncer acarretam maior dano às células malignas do que as dos tecidos normais. Os efeitos tóxicos dos quimioterápicos sobre as células sanguíneas levam a mielossupressão, granulocitopenia, plaquetopenia e anemia de forma imediata (7 a 21 dias). Sua indicação depende de uma série de fatores como a idade do paciente, seu estado nutricional, as funções renal, hepática e pulmonar, a presença de infecções, metástases e o tipo de tumor. Entretanto, apesar das reações adversas, a quimioterapia ainda é uma ferramenta eficaz no tratamento do câncer (FONSECA; *et. al.*, 2000; INCA-c, 2017).

Em relação à dose dessa quimioterapia, ela é escolhida baseada na superfície corporal. O cálculo, que segue na Figura 3, é realizado com base no peso e altura do indivíduo, visando a administração de uma dose equilibrada de quimioterapia, evitando efeitos adversos associados a super dosagens (MAIA, 2010).

$$\text{Superfície Corporal (m}^2\text{)} = \sqrt{\frac{\text{Peso (kg)} \times \text{Altura (cm)}}{3.600}}$$

FIGURA 3 - Cálculo da dose de quimioterapia baseado na superfície corporal. FONTE: Maia, 2010.

Além das diferentes finalidades da quimioterapia e do cálculo da dose, também existe a classificação conforme o mecanismo de ação da droga (Tabela 4), sendo esses:

TABELA 4- Classificação e mecanismo de ação dos antineoplásicos. FONTE: Carneiro, 2011.

Alquilantes	Podem quebrar a cadeia de DNA ou formar pontes entre as cadeias do ácido nucléico, impedindo a duplicação do DNA, levando a apoptose celular. Ex: Ciclofosfamida, bussulfano, carmustina e cisplatina
Antimetabólitos	Competem com os metabólitos necessários para as reações bioquímicas normais, inibindo a função normal da célula, incluindo a divisão celular. Ex: Fludarabina, Citarabina e Fluoruracila
Inibidores mitóticos	Paralisam a mitose devido sua ação sobre a tubulina, formadora dos microtúbulos que constituem o fuso mitótico, pelo qual migram os cromossomos, interrompendo a divisão celular. Ex: Vincristina e docetaxel
Antibióticos antitumorais	Inibem a síntese do DNA ou de proteínas essenciais ao ciclo celular. Ex: Daunorrubicina e Doxorubicina
Inibidores da Topoisomerase I e II	Interferem na transcrição e replicação do DNA Ex: Irinotecano e Etoposídeo
Hormônios	Limitam a ação de hormônios naturais Ex: Dexametasona, Tamoxifeno, Megestrol
Anticorpos monoclonais	Estimulam o sistema imune, que por meio da sinalização das células do tumor maligno podem prevenir seu crescimento ou induzir a apoptose Ex: Cetuximabe

1.2.3 Fluoruracila

O quimioterápico fluoruracila é um antineoplásico antimetabólito, caracterizado por possuir estrutura química semelhante aos compostos naturais encontrados no organismo humano, precursores do DNA e vitaminas (Figura 4). É denominado como antimetabólito por competir com os metabólitos necessários para reações bioquímicas normais, inibindo a função normal da célula, incluindo a divisão celular. É utilizado para tratamento de câncer de mama, ovário, cabeça e pescoço, pâncreas, estômago, colorretal (CARNEIRO, 2011), fígado, vesícula e vias biliares, colo de útero e bexiga (BRASIL, 2013).

Por outro lado, existem dificuldades encontradas na terapia com fluoruracil, sendo a maior delas a toxicidade (MYERS *et. al.*, 1976).

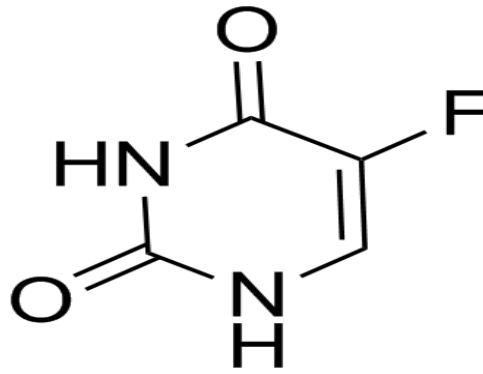


FIGURA 4 – Estrutura química da fluoruracila.

Nas células a fluoruracila é convertida intracelularmente em metabólitos ativos, após ser processado pela enzima uridina fosforilase, formando nucleotídeos citotóxicos: o nucleotídeo FUTP (5-fluoruridina-5-trifosfato), o qual substitui a UTP (Uracila trifosfato), bloqueando a síntese de RNA; o nucleotídeo FdUDP (5-fluoro-2-deoxiuridina-5-difosfato), que substitui a dTTP (timina 5-trifosfato) e incorporação ao DNA; e o nucleotídeo FdUMP (5-fluoro-2-deoxiuridina-5-monofosfato), que inibe a atividade da enzima TS (timidilato sintase), responsável por catalisar a metilação redutiva de dUMP (deoxiuridina-monofosfato) para dTMP (deoxitimidina-monofosfato) para o fornecimento de timina para a síntese de DNA. Com a enzima TS inibida, não ocorre o fornecimento de timina para síntese de DNA (Figura 5). Uma vez que DNA e RNA são essenciais para a divisão celular, a deficiência de timina criada pela fluoruracila leva à morte celular (CARRERAS & SANTI, 1995).

Boa parte da fluoruracila (5-FU) é catabolizada no fígado (AU *et. al.*, 1983). Mais de 80% é processado nas células hepáticas pela enzima DPD (dihidropirimidina-dehidrogenase), formando o DHFU (dihidro-fluorouracil) um metabólito inativo para ser eliminado (CARRERAS & SANTI, 1995).

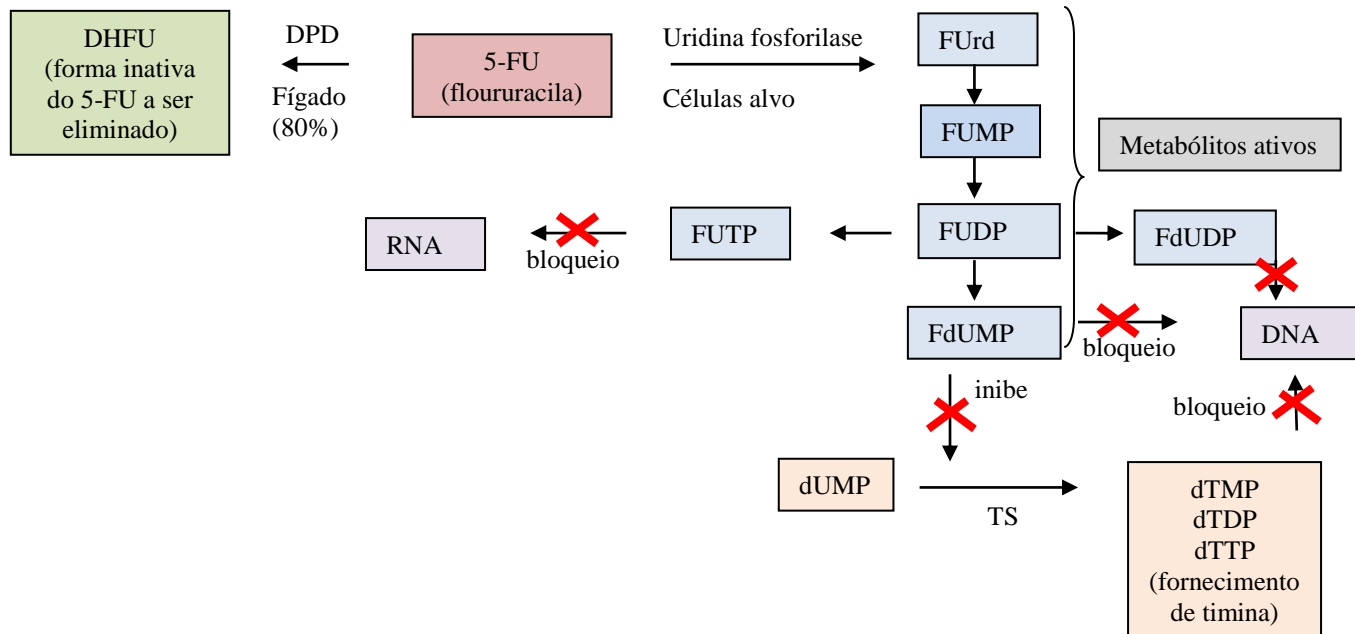


FIGURA 5- Vias de metabolização e mecanismo de ação do 5-FU. DHFU (dihidro-fluorouracol), DPD (dihidro-pirimidina-desidrogenase), FUrD (fluoxuridina), FUMP (fluoro-uridina-monofosfato), FUDP (fluoro-uridina-difosfato), FUTP (fluoro-uridina-trifosfato), FdUMP (fluoro-deoxi-uridina-monofosfato), dUMP (deoxiuridina monofosfato), dTMP (deoxitimidina-monofosfato). FONTE: Aguiar Júnior, 2004 – adaptado.

De fato, o quimioterápico não atua exclusivamente sobre as células tumorais, pois estruturas que se renovam constantemente, como a medula óssea e a mucosa do tubo digestivo também são atingidas pela ação dos quimioterápicos (INCA-C, 2017). Em contrapartida, esse quimioterápico gera algumas reações adversas dermatológicas, gastrointestinais e hematológicas, sendo essa última representada pela leucopenia e mielossupressão (CARNEIRO, 2011).

Como as células normais apresentam um tempo de recuperação previsível, é possível aplicar a quimioterapia repetidamente, desde que observado o intervalo de tempo necessário para a recuperação da medula óssea e mucosa do tubo digestivo. Por este motivo a quimioterapia é aplicada em ciclos periódicos (INCA-C, 2017). O primeiro ciclo de quimioterapia é chamado de indução e possui o objetivo de remissão completa ou parcial da doença, o restante precisa ser eliminado nos ciclos subsequentes (MAIA, 2010).

Os ciclos de quimioterapia com a fluoruracila possuem intervalos que variam de 0 - 7 - 14 - 21 e 28 dias, conforme o protocolo a ser aplicado e geralmente é associado a outros antineoplásicos como cisplatina, docetaxel, oxaliplatina,

irinotecano, mitomicina C, ciclofosfamida, metotrexate e doxorrubicina (HITT *et. al.*, 2005; VAN CUTSEM *et. al.*, 2006; ANDRE *et. al.*, 2009; FISCHER *et. al.*, 1990; PRITCHARD *et. al.*, 1997; COOPER *et. al.*, 1999; AJANI *et. al.*, 2008; MACDONALD *et. al.*, 2001; NIGRO *et. al.*, 2006; SMALLEY *et. al.*, 2006).

1.3 Óleo de fígado de tubarão

Assim como existem substâncias que desafiam o sistema imunitário, como os quimioterápicos, existem compostos que podem contribuir para a otimização desse sistema, como o óleo de fígado de tubarão.

O chamado óleo de fígado de tubarão (OFT) vem sendo estudado desde os anos 50, e é composto por AG n-3, por esqualeno, que é um precursor esteróide do colesterol, sendo a esqualamina um esteróide aminado conhecido por apresentar função como inibidor de angiogênese e pelos ALQ (MARWIC, 2001; PALMIERI *et.al.*, 2014).

Esses ALQ representam em torno de 30 a 50% do OFT e os principais ALQ encontrados nesse óleo são Chimil (hexadecilglicerol), batil (octodecilglicerol) e selaquil (octadecilglicerol) (Figura 6). São gorduras formadas por uma cadeia hidrocarbônica, saturada ou insaturada (sendo os dois primeiros saturados e o último insaturado), unida por ligação tipo éter a uma das hidroxilas do glicerol (BROHULT *et. al.*, 1970; BROHULT, 1977; PALMIERI *et. al.*, 2014).

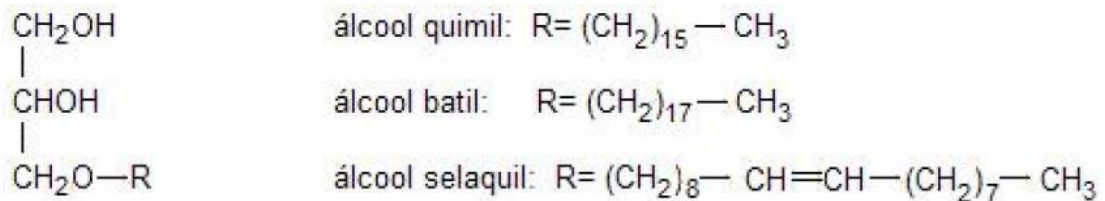


FIGURA 6 - Estrutura química dos principais ALQ.

Essa ligação éter é a chave para o entendimento funcional dos ALQ. A ligação C-O-C é encontrada em muitos compostos biológicos importantes, como a tiroxina da glândula tireóide por exemplo. Os éteres gliceróis são muito difundidos, sendo estes isolados de muitas formas de vida e em diferentes arranjos

moleculares. A estrutura básica dos ALQ geralmente é encontrada associada a cadeias de ácido graxo unidas ao glicerol por ligação éster (Figura 7) (PUGLIESE *et. al.*, 1998). Os ALQ metóxi-substituídos, assim chamados por ter um átomo de hidrogênio substituído pelo grupamento metóxi-substituídos (-OCH₃) no início de sua cadeia alifática, são caracterizados por possuírem atividade biológica ainda mais significativa quando comparados aos ALQ em geral. (CARBALLEIRA, 2002; HALLGREN *et. al.*, 1978).

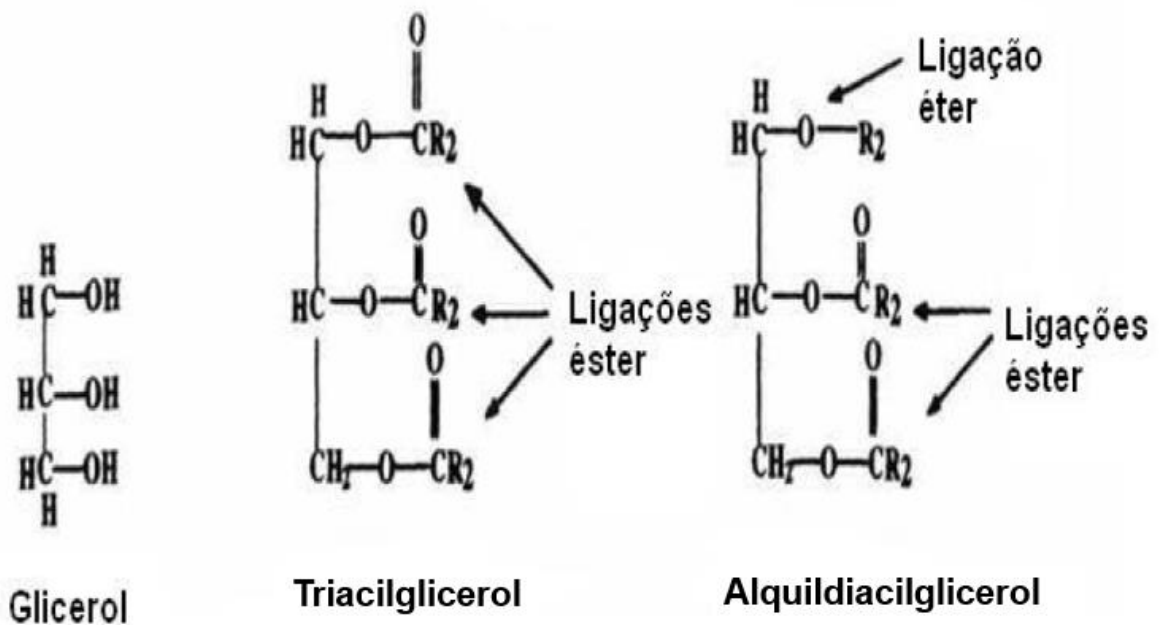


FIGURA 7 - Estrutura química do triglicerídeo demonstrando as ligações Ester e do alquildiacilglicerol demonstrando a ligação éter.

Em relação aos ALQ e suas fontes, são encontrados abundantemente no fígado de algumas espécies de peixes elasmobrânquios, como os tubarões (IANNITTI & PALMIERI, 2010) e estão presentes em pequenas quantidades no leite humano (QIAN *et. al.*, 2014). Dependendo da espécie de tubarão, o óleo extraído pode ser bastante rico em ALQ, os quais parecem exercer efeitos bacteriostáticos, fungistáticos, antiinflamatórios e hematopoiéticos (BORDIER *et. al.*, 1996). Esses éteres lipídicos também são encontrados no colostro humano e no leite de ovelha e humano, sendo que este contém aproximadamente dez vezes mais ALQ que o leite de vaca (HALLGREN *et. al.*, 1974). Uma pequena quantidade de ALQ é encontrada nas células vivas de grande parte dos tecidos animais, principalmente nos órgãos

hematopoiéticos, incluindo baço, fígado, tecidos linfáticos, sangue e majoritariamente na medula óssea (SNYDER & WOOD, 1969).

Em fontes naturais, os ALQ podem estar esterificados com ácidos graxos, principalmente poli-insaturados, formando alquildiacilgliceróis, ou ainda compondo o esqueleto carbônico de fosfolipídios, neste caso, fosfolipídios éteres (Figura 8) (BROHULT, 1962).

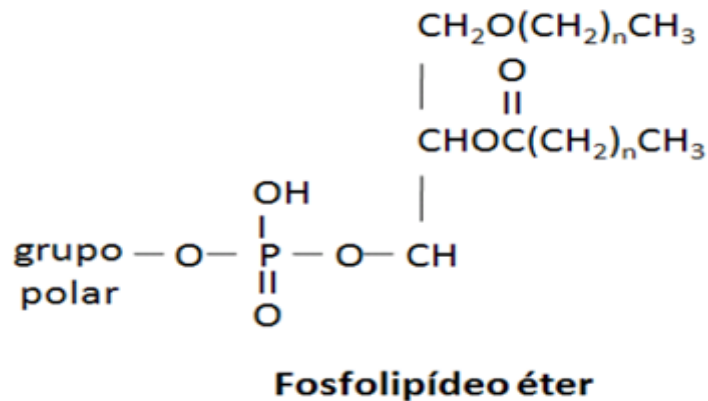


FIGURA 8 - Estrutura química de um fosfolipídeo éter.

Os ALQ provenientes da dieta são absorvidos sem ocorrer a quebra da ligação éter, sendo posteriormente incorporados aos fosfolipídios de membrana, principalmente nos fosfolipídios fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina, possibilitando assim sua (ALQ) disponibilidade para serem usados pelas células como precursores de outras moléculas, exercendo seus efeitos biológicos (BLANK *et. al.*, 1991; REICHWALD & MANGOLD, 1977). Essa absorção dos éteres lipídicos ocorre no intestino. De acordo com o estudo de Bergstrom e Blomstrand (1957), cerca de 95 por cento de álcool quimil (ALQ saturado com 16 carbonos) radiomarcado administrado foi absorvido no intestino, enquanto que o restante (5%) foi excretado nas fezes (BERGSTROM & BLOMSTRAND, 1957).

Já os ALQ dos extratos lipídicos da medula óssea, vem sendo usados na Europa desde a década de 30 para o tratamento de granulocitopenia. Sendo descoberto que a fração não saponificável dessa medula era a responsável pelo aumento da quantidade de leucócitos (PUGLIESE *et. al.*, 1998).

Algo semelhante foi visto em 1952 no tratamento de câncer, mais especificamente leucemia infantil, onde ocorreu a ingestão de ALQ por meio da gordura não saponificável da medula óssea de gado. (BROHULT, 1962).

Dentre os efeitos imunoprotetores atribuídos aos ALQ, os quais são vistos como agentes protetores da medula óssea, cita-se a ativação de macrófagos citotóxicos, por aumentar a resposta imunitária humoral (BERDEL *et. al.*, 1980; BROHULT, A. 1957), além de estimular a hematopoiese (DENIAU *et. al.*, 2010).

No estudo de Yamamoto (1987), foram testados dois ALQ sintéticos em camundongos, sendo que ambos induziram a estimulação de macrófagos, porém um de forma mais eficiente que o outro, ocorrendo a potencialização imunológica (YAMAMOTO & NGWENGA, 1987).

Em estudo realizado por Pambland *et. al.* (1990) foi verificado também que vários tipos de ALQ poderiam estimular a resposta funcional de neutrófilos em humanos, devido à ativação do metabolismo oxidativo, aumento da concentração de cálcio intracelular, ou ambos.

A suplementação de ALQ sintéticos na dieta de ratas lactantes aumentou significativamente a concentração de éteres lipídicos no leite, que por sua vez induziu ao aumento de granulócitos no sangue periférico e de imunoglobulinas (IgG e IgM) no plasma dos filhotes amamentados, sugerindo que esse composto exerce importante função no desenvolvimento da resposta imunitária (OH & JADHAV, 1994).

Além de macrófagos e neutrófilos os ALQ também atuam em linfócitos. Em um estudo *in vitro*, com células de camundongos imunizados com HBsAg (antígeno de superfície da hepatite B), as células TCD4 esplênicas foram estimuladas com anti-CD3 e anti-CD8 e os linfócitos B por anti-BCR e anti-CD8. Verificou-se que os ALQ proporcionaram um aumento na proliferação células B e T. Também houve o aumento de citocinas Th1 (TNF- α e IFN- γ) e diminuição nos níveis de citocinas Th2 (IL-4 e IL10), demonstrando assim que os ALQ podem modular as respostas imunes aumentando a proliferação de linfócitos *in vitro* (QUIAN *et.al.*, 2014).

Algo similar ocorreu com ratos suplementados com OFT, em que houve maior proliferação de linfócitos do baço dos ratos sedentários que receberam o OFT se comparados aos sedentários que não receberam, porém, a proliferação de linfócitos associados ao intestino foi similar em ambos os grupos (VITORINO *et. al.*, 2010).

Contudo, apesar das inúmeras funções biológicas terem sido constantemente confirmadas por diversos estudos, os mecanismos moleculares precisos de ação dos ALQ ainda não estão completamente elucidados (LE BLANC *et. al.*, 1995).

Na década de 60, Astrid Brohult fez experimentos pioneiros suplementando com OFT pacientes com câncer de útero submetidas a tratamento radioterápico, demonstrando que a administração de OFT durante a exposição à radioatividade reduziu significativamente a leucopenia. Entretanto, os efeitos relacionados à prevenção de leucopenia e trombocitopenia podem variar, possivelmente de acordo com o tipo de ALQ (BROHULT *et. al.*, 1977). Interessantemente, o OFT já era considerado uma medicação antiga entre os pescadores da costa oeste da Noruega e Suécia, sendo utilizado para cicatrização de feridas, tratamento de irritações do trato respiratório e alimentar e linfadenopatia (IANNITTI & PALMIERI, 2010), além de sua atuação em dermatites (NOWICKI & BARANSKA-RYBAK, 2007) e câncer (IAGHER *et. al.*, 2013) demonstrados por outros autores e de fato, estudos demonstram a ação do OFT sobre a imunidade em populações e condições distintas.

Foram verificados diversos efeitos benéficos do uso de ALQ tais como: redução dos efeitos colaterais de radioterapia (leucopenia e trombocitopenia), inibição do crescimento tumoral, além de estimular e modular a resposta imunitária (PUGLIESE *et. al.*, 1998).

Ainda, ALQ sintéticos são cogitados como adjuvantes em formulações de vacinas pela sua propriedade de estimular respostas imunitárias incluindo o aumento da produção de anticorpos (ACEVEDO *et. al.*, 2006).

Nos dados encontrados na literatura, é visível que a estimulação da resposta imunitária tem sido o alvo principal de investigação envolvendo OFT, principal fonte natural de alquilgliceróis. Porém não é conhecido o mecanismo do OFT em evitar a leucopenia. Estas investigações podem contribuir para o melhor entendimento da ação dos éteres lipídicos, gerar novas informações considerando os mecanismos de ação e permitir futuras aplicações considerando o potencial benefício propiciado por eles.

1.4 Óleo de peixe

Os AG poli-insaturados (AGPI) da família n-3 presentes no OP correspondem ao ácido alfa-linolênico (ALA), que endogenamente pode ser convertido em ácido eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) (Figura 9), pela utilização de processos enzimáticos sequenciais de alongação e dessaturação (Figura 10), sendo que a deficiência desse AG essencial pode causar disfunção imunológica (CALDER, 2003).

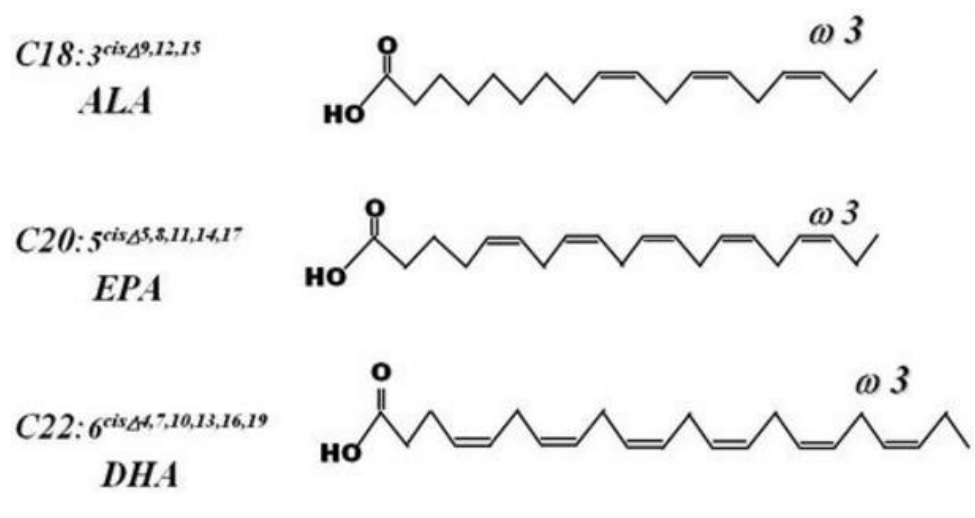


FIGURA 9 - Estrutura química do EPA, DHA e ALA.

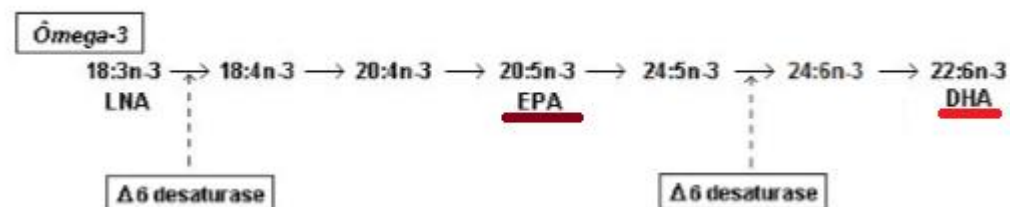


FIGURA 10- Metabolização dos ácidos graxos n-3. FONTE: Rose, 1999 (adaptado).

A essencialidade dos AG é caracterizada por ser imprescindível ao organismo e não pode ser sintetizado pelo mesmo. Os AGPI são classificados quanto ao primeiro carbono insaturado do lado metila. Para reforçar a idéia de numeração a partir do final da molécula, tal classificação foi associada à letra grega

ômega (Ω), que é a última letra do alfabeto grego, embora às vezes se utilize a letra “n”, sendo assim, classificado em ômega-3 (ou como padronizado neste manuscrito: n-3), a primeira insaturação entre os carbonos 3-4 do lado metila (Figura 11) (CURI-B, 2002).

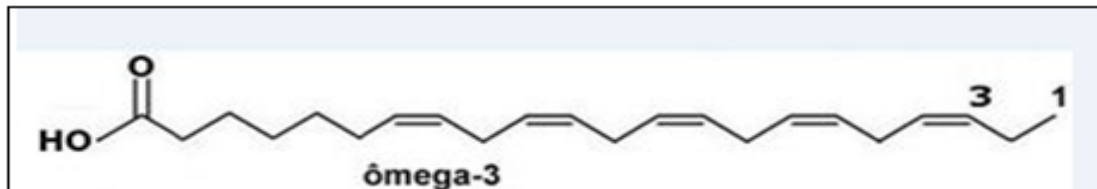


FIGURA 11 - Estrutura química de um ácido graxo n-3.

Quando indivíduos ingerem OP, EPA e DHA substituem parcialmente os AG n-6, principalmente o ARA, nas membranas de provavelmente todas as células (SIMOPOULOS, 2002; CALDER *et. al.*, 2002). Os alimentos de origem marinha apresentam grande quantidade de AG n-3, os quais são encontrados no plâncton e em algas que servem como alimento para os peixes (DOMMELS *et. al.*, 2002). Acredita-se que o grande consumo de produtos marinhos pelos esquimós, japoneses e populações do Alasca e Groelândia, proporciona um efeito protetor contra o câncer, em consequência do consumo elevado de AGPI n-3, tais como DHA e EPA (WOUTERSEN *et. al.*, 1999).

Já a alimentação de humanos de países ocidentais possui como característica sua riqueza em AG n-6 (ARA). Esses AG são incorporados em fosfolipídios de células de defesa mononucleares (linfócitos e monócitos). O mesmo ocorre com a incorporação de AG n-3 após ingestão via oral de OP (EPA e DHA), sendo possível perceber que os lipídios provenientes da alimentação têm influência na composição lipídica da membrana celular de células de defesa. Sendo assim, esses lipídios podem alterar propriedades da membrana celular, afetando vias de sinalização intracelular, alterar a produção de eicosanóides e docosanoídes pelas células, influenciando na resposta imunitária (CALDER, 2004; PRESCOTT & STENSON, 2005; SINGER *et. al.*, 2008).

Ao analisar o conteúdo desses AGPI n-3 no plasma de pacientes com diversas doenças neurológicas, relativas ao funcionamento hepático, ao sistema imunitário e a inflamação, verificou-se que há correlação entre estes estados

patológicos e o baixo conteúdo do AGPI n-3 com relação à população saudável (HOLMAN, 1998). A deficiência de AG n-3 parece estar relacionada com a etiologia de diversas enfermidades, como cardiopatias, problemas associados á pacientes submetidos a transplantes renais, hepatite e outras (HOLMAN, 1998).

Ao testar duas doses de EPA associado ao DHA, sendo a dose nutricional (0,85g/d) e a dose farmacêutica (3,4g/d) durante 8 semanas em pacientes humanos saudáveis com hipertrigliceridemia, foi mostrado que a dose mais elevada diminuiu a quantidade de triglicerídeos, porém ambas as doses não apresentaram melhora no estado inflamatório, inclusive na expressão de genes inflamatórios de citocinas em linfócitos isolados (SKULAS *et. al.*, 2011).

Estudos também vêm mostrando que dietas ricas em n-3 estão associadas a um melhor prognóstico e a uma maior sobrevida de pacientes com doenças auto-imunes (HARBIGE, 1998; WATANABE *et. al.*, 1994; HAMAZAKI, 1992). O consumo regular a longo prazo de alimentos ricos em n-3 levou a um menor número de células NK e atividade de neutrófilos, mas maior produção de linfotóxina por linfócitos, sendo consistentes com a diminuição da reação inflamatória e danos teciduais em pacientes com transtornos inflamatórios suplementados com AGPI n-3 (MUKARO *et. al.*, 2008).

Em pacientes pós cirúrgicos de câncer de cabeça e pescoço suplementados com AGPI n-3 e dietas reforçadas com arginina por 12 semanas demonstraram melhores parâmetros nos níveis de linfócitos (LUIIS *et. al.*, 2013).

Desse modo, o conteúdo de AGPI n-3 e n-6 na dieta é determinante da supressão ou indução do desenvolvimento tumoral, via alteração da síntese de eicosanóides, pois o EPA inibe competitivamente o metabolismo do ARA através das vias da ciclooxigenase e lipooxigenase. Os eicosanóides formados a partir do ARA participam de processos inflamatórios, reações alérgicas, arteriosclerose e também são moduladores do crescimento e disseminação de neoplasias (CHAPKIN *et. al.*, 1989).

Nesse caso, células tumorais morrem quando tratadas com várias drogas antineoplásicas. Os AGPI n-3 potencializam a citotoxicidade de algumas drogas como mitomicina C, vincristina e doxorubicina. O DHA pode aumentar o efeito dos agentes citotóxicos sobre o tumor. Tumores de animais alimentados com OP são mais responsivos à quimioterapia que os animais que recebem dieta contendo óleo de milho (BURNS & SPECTOR, 1994). Uma vez que o OP é altamente insaturado,

sua ingestão aumenta conseqüentemente o grau de instauração de AG nos fosfolípidios da membrana, facilitando a destruição das células neoplásicas (BURNS & SPECTOR, 1994).

Esses efeitos citotóxicos dos AG variam de acordo com o tipo de neoplasia, do mesmo modo que, nas culturas variam conforme o tipo celular. Esses estudos têm importância clínica, uma vez que a seletividade para ação citotóxica deve restringir-se apenas às células neoplásicas (CURI-B *et. al.*, 2002).

]De acordo com Fernandes (1994), dietas ricas em OP (n-3) estão relacionadas com a elevação da expressão do TGF- β 1 (*transforming growth factor beta 1*), um fator de crescimento que modula a resposta imune (FERNANDES *et. al.*, 1994), sendo mostrado por outros autores a relação no efeito inibitório sobre o desenvolvimento tumoral (ROSE, 1997; RAO *et. al.*, 1996; FRITSCHÉ & JOHNSTON, 1990). Dietas contendo o OP suprimem a carcinogênese por diminuir a atividade da ciclooxigenase (COX-2) e assim diminuir a biossíntese das prostaglandinas implicadas na transformação neoplásica (LATHAN *et. al.*, 1999).

2 JUSTIFICATIVA

As estimativas referentes ao ano 2016-2017 do Instituto Nacional do Câncer apontam o surgimento de 600 mil casos novos de câncer no Brasil (INCA-D, 2017). Um dos tratamentos mais utilizados é a quimioterapia, que provoca vários efeitos colaterais tais como queda de cabelo, diarreia, feridas na boca, náusea, vômito, anemia, leucopenia e trombocitopenia, afetando fortemente a qualidade de vida do paciente. Particularmente a leucopenia acarreta importantes consequências, incluindo a necessidade de suspensão do tratamento até a melhora da imunidade. O quimioterápico Fluorouracila traz a informação que o tratamento deve ser interrompido quando os glóbulos brancos estiverem inferiores a $3.500/\text{mm}^3$ e o paciente deve ficar em isolamento em casos inferiores a $2.000/\text{mm}^3$ (FAULDFLUOR, 2017). Apesar de haver muitos estudos que mostram o efeito estimulatório dos OP e OFT sobre células do sistema imunitário, pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos. Dessa forma, o contato dos linfócitos plasmáticos com óleo e quimioterápico *in vitro* como proposto neste trabalho visa simular esta condição observada na clínica a fim de ser estudada e gerar novas informações a respeito da ação desses nutracêuticos associados ao tratamento quimioterápico e à leucopenia.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o efeito do OP e OFT sobre a viabilidade de linfócitos de indivíduos saudáveis expostos ao quimioterápico fluoruracila *in vitro*.

3.2 Específicos

1. Avaliar viabilidade/capacidade proliferativa dos linfócitos após período de incubação na presença de óleo e/ou quimioterápico;
2. Avaliar a proporção de células viáveis, apoptóticas e necróticas após período de incubação na presença de óleo e/ou quimioterápico;
3. Identificar e quantificar AG n-3 presentes no sobrenadante do cultivo celular após 72h.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Nutracêuticos e reagentes

O OP utilizado como suplemento foi gentilmente doado pela Fundação Herbarium (Colombo, PR, BRA), o OFT, pela Naturalis Alimentos Naturais Ltda (São Paulo, SP, BRA). O quimioterápico Fauldfluor® (Fluoruracila) pelo Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe (Curitiba, PR, BRA).

Os sais utilizados para preparo de tampões foram obtidos da Reagen Quimibras Indústria Brasileira S/A (Rio de Janeiro, RJ, BRA), Vetec Química Fina Ltda (Rio de Janeiro, RJ, BRA) ou Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda (Diadema, SP, BRA).

Meio de cultura (RPMI 1640), antibióticos (penicilina G e estreptomicina) e soro fetal bovino (SFB) foram obtidos da Gibco (Grand Island, NY, USA). Iodeto de propídeo, concanavalina A, ácidos graxos para HPLC, azul de tripan, foram obtidos da Sigma Chemical Co (St Louis, MO, USA). A anexina V foi adquirida da BD Pharmigen (Franklin Lakes, NJ, USA) e o Alamar Blue® da Bio-Rad (Santo Amaro, SP, BRA).

4.2 Desenho experimental:

4.2.1 Obtenção das amostras

A coleta de sangue foi realizada no Laboratório de Metabolismo Celular, Departamento de Fisiologia da UFPR. Como critérios de inclusão foram selecionados humanos do gênero masculino, na faixa etária de 20 e 30 anos e saudáveis. Foram considerados saudáveis aqueles com ausência de doenças por meio de questionário aplicado. Após coleta foi realizada contagem de leucócitos para verificar se estavam dentro da normalidade, caso contrário o sangue seria descartado adequadamente. Foram excluídos aqueles de não concordarem em assinar o TCLE. Inicialmente houve a abordagem pessoal, com uma explanação sucinta sobre a pesquisa, e em caso de interesse pela participação como voluntário, uma explicação completa foi efetuada, concomitante com a leitura do “Termo de

Consentimento Livre e Esclarecido” (TCLE). Somente depois de o voluntário concordar com todos os termos, o TCLE foi assinado. Foi coletado material biológico (sangue) de diferentes indivíduos, em vários experimentos independentes para verificar a reprodutibilidade dos resultados. O material biológico (sangue) foi utilizado unicamente para essa pesquisa e foi descartado em lixo biológico ao término do estudo.

4.2.1.1 Isolamento dos monócitos:

O sangue foi coletado em tubos com EDTA e posteriormente submetido a uma primeira centrifugação (1400g, 10min) para a separação do plasma (Figura 12). O sobrenadante foi descartado. O infranadante contendo as células do sangue foi colocado em um tubo tipo falcon de 15mL, adicionado o mesmo volume de PBS em temperatura ambiente e homogeneizado.

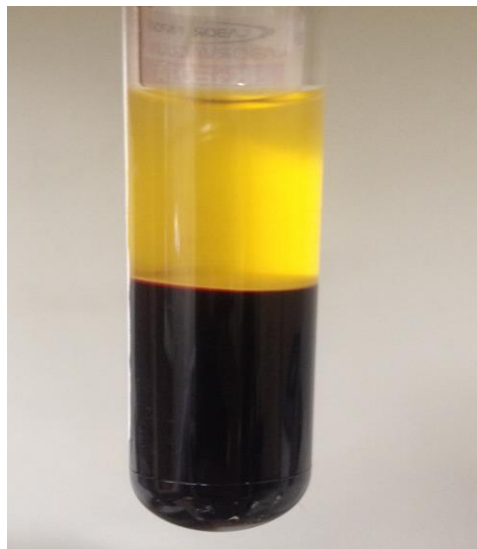


FIGURA 12 - Sangue após centrifugação demonstrando células sanguíneas separadas do plasma. FOTOGRAFIA: A autora.

Em outros dois tubos falcon de 15mL foi adicionado 3mL de Ficoll Paque Plus® em temperatura ambiente, sobre o qual foram adicionados cuidadosamente 8mL da mistura anterior (células e PBS), e esses dois tubos foram centrifugados a 400g a 18°C por 40 minutos (Figura 13).

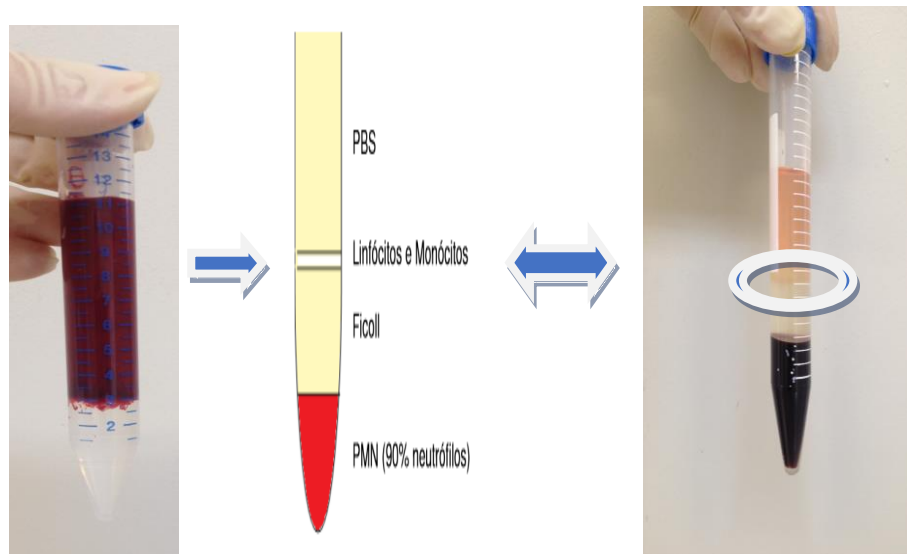


FIGURA 13 - Formação da nuvem de linfócitos após centrifugação. FOTOGRAFIAS: A autora.
 FONTE: Bonatto, 2008.

Foi retirada a nuvem formada (linfócitos e monócitos) e descartado o restante. A nuvem foi colocada em um tubo falcon de 15mL e centrifugada a 1400g, por 7 min. Foi descartado o sobrenadante (ficoll e PBS), e as células foram lavadas com PBS. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 4mL de meio RPMI (10% SFB+1% antibiótico) e homogeneizado. Uma alíquota foi destinada para contagem das células em câmara de Neubauer (tripan blue e PBS), e posteriormente adequado o número de células a fim de se obter 10^5 células por *well* da placa de cultivo de 24 *wells*.

4.2.1.2 Complexação dos óleos

O óleo de fígado de tubarão e o óleo de peixe foram solubilizados em SFB em câmara de fluxo laminar na proporção 1:10. Após preparadas as misturas, estas permaneceram em um agitador tipo gangorra a 4°C por um período de 24 horas e foram armazenadas em geladeira, envoltas em papel alumínio.

4.3 Grupos experimentais

Após isolamento, as células mononucleares do sangue foram separadas em 12 grupos experimentais de acordo com as incubações realizadas em placa de cultura (Tabela 5):

TABELA 5 – Composição de cada grupo por *well*.

Grupo	Célula	RPMI	ConA	SFB	Qt1(10 ⁻¹ M)	Qt3(10 ⁻³ M)	OFT	OP
Cel	x	x						
ConA	x	x	x					
SFB	x	x		x				
ConA+SFB	x	x	x	x				
Qt1	x	x	x	x	x			
Qt3	x	x	x	x		x		
OFT	x	x	x	x			x	
OP	x	x	x	x				X
Qt1+OFT	x	x	x	x	x		x	
Qt1+OP	x	x	x	x	x			X
Qt3+OFT	x	x	x	x		x	x	
Qt3+OP	x	x	x	x		x		X

Foram realizados cerca de 19 estudos-piloto para determinação da concentração de quimioterápico a ser utilizada no estudo, bem como para demais ajustes metodológicos. Para a obtenção dos dados de viabilidade/proliferação celular foram realizados 4 experimentos independentes (n=2 em cada grupo), para os dados de apoptose/necrose celular, 3 experimentos independentes (n=1 em cada grupo) e para a detecção de n-3 por HPLC, 3 experimentos independentes (n=1 com cada grupo).

A concentração de quimioterápico utilizada foi determinada em estudo piloto no qual o produto Fauldfluor® (fluoruracila 50 mg/ml) foi diluído para concentração próxima àquela considerada ótima no plasma de indivíduos sob tratamento quimioterápico (QT3, equivalente a 10^{-3} M) e uma dose maior (QT1, equivalente a 10^{-1} M). Foi utilizado 50 μ g/ml do mitógeno ConA, pois esse quimioterápico possui melhor desempenho em células em divisão celular. O tempo de incubação com óleo e com o quimioterápico foi de 72 horas conforme determinado por estudo piloto.

4.4 Alamar Blue

As células foram plaqueadas (Figura 14) conforme os grupos já citados. Ao final foi adicionado o reagente Alamar Blue® 10% do volume total e a placa foi levada à estufa. O Alamar Blue® é indicado para medir quantitativamente a proliferação celular, ele é um indicador de crescimento colorimétrico relacionado a atividade metabólica das células viáveis. A medida que as células crescem a atividade metabólica resulta na redução química do Alamar Blue®. Um crescimento contínuo mantém um ambiente reduzido (vermelho) enquanto uma inibição do crescimento mantém um ambiente oxidado (azul), viabilizando a leitura de absorbância e leitor de microplaca.

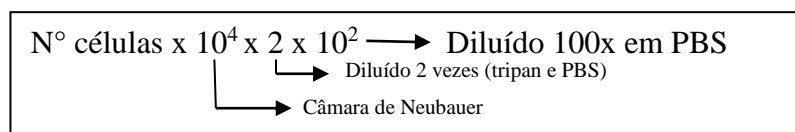


FIGURA 14 - Cálculo para contagem de linfócitos.

As células foram incubadas em placas de 24 *wells* (Figura 15), com 100 μ L de solução contendo células, sendo 2 *wells* por grupo.

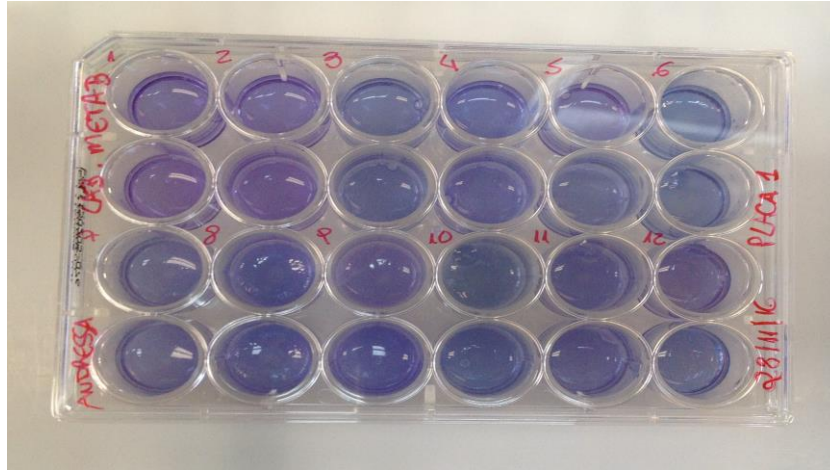


FIGURA 15 - Placa com 24 wells pronta com os 12 grupos. FOTOGRAFIA: A autora.

A placa permaneceu em estufa por 72 horas com o mesmo meio de cultivo e sem reposição do Alamar Blue, sendo aferidas as leituras de absorbância em leitor de microplaca (Synergy HT multi-detection microplate reader®) no comprimento de onda 570 e 600 em 24h, 48h e 72h. Os dados foram calculados conforme indicado no *datasheet* do Alamar Blue®.

4.5 Proporção de células viáveis, apoptóticas e necróticas avaliadas por citometria de fluxo

Após 72 horas em cultivo nas mesmas condições e grupos descritos nos itens anteriormente, as células foram lavadas com PBS, centrifugadas e colocadas em 1mL de tampão de ligação (Composição 10x concentrado: 0,1M HEPES (ph 7,4), 1,4M NaCl, 25mM CaCl diluídos em água MilliQ). Para usar, foi deixado em 1x concentrado. Após centrifugação adicionou-se 100 µL de tampão de ligação, 5µL de FITC anexina V (BD Pharmingen FITC Annexin V ®) para marcar as células em apoptose, deixado no escuro por 15 minutos, e adicionou-se mais 400µL do tampão de ligação. Em cada tubo foram adicionados 2,5 µL de iodeto de propídeo (1mg/ml) imediatamente antes da leitura em citômetro de fluxo (FACSCalibur®) para marcar as células em necrose.

4.6 Perfil lipídico e *High performance Liquid Chromatography* - HPLC

O perfil lipídico do sobrenadante do meio de cultivo dos 12 diferentes grupos após 72h foi determinado por HPLC. Extração dos lipídios dos sobrenadantes foi efetuada de acordo com o método descrito por FOLCH *et. al.*, 1957, adaptado. Brevemente, o sobrenadante foi homogeneizado em 1,33ml de clorofórmio: metanol (2:1 v/v). Ao sobrenadante resultante da homogeneização adicionou-se 0,24ml de metanol para precipitação de proteínas. As amostras depois de homogeneizadas, foram centrifugadas durante 10min a 970g. A fase superior (hidrometanólica) foi transferida para outro tubo de ensaio, adicionou-se 0,48ml de clorofórmio e 0,41ml de água, para formação de emulsão. Após a formação espontânea de sistema bifásico, a cada amostra foi adicionado 1ml da solução de Folch (clorofórmio: metanol: água, 3:48:47 v/v) para eluição da fração hidrometanólica. Os extratos lipídicos foram submetidos à secagem em fluxo de nitrogênio gasoso.

Após secagem, os extratos lipídicos foram saponificados, processo pelo qual são separados apenas os ácidos graxos dos lipídios totais. A cada amostra foram acrescentados 0,1ml de metanol e saponificadas com 2ml de solução alcalina em metanol (hidróxido de sódio 1M em metanol 90%) sendo então incubadas em banho-maria a 37°C, sob agitação por 2h (NISHIYAMA-NARUKE *et. al.*, 1998).

Após incubação as amostras foram resfriadas em banho de gelo e a solução alcalina foi acidificada até atingir pH 3.0 pela adição de ácido clorídrico 1mol/L. Os ácidos graxos contidos nesta solução foram extraídos pela adição 1ml de hexano, em três repetições. A fração obtida das extrações foi evaporada em fluxo de nitrogênio gasoso. Após secagem, amostras foram acondicionadas à -20° C, até a derivatização. Para a derivatização os ácidos graxos foram ressuspensos em acetonitrila e colocados na presença de Bromometil-Metóxi-Coumarin (BMMC) (1 mg/mL), a 60° C por 15 minutos (ABUSHUFA *et. al.*, 1994). Após a incubação, e adição de igual volume de acetonitrila em todas as amostras, as amostras foram mantidas a 10°C até o momento da injeção no HPLC.

Para a análise dos ácidos graxos derivatizados foram realizadas injeções no volume de 100 µL de cada amostra. Os ácidos graxos foram injetados em cromatógrafo líquido Varian Pró-Star 6.0® e separados em coluna de sílica C8(250mm de comprimento X4,5mm de diâmetro) de fase reversa, com partícula interna de 5 µm e poro de saída de 100 Å. A eluição aconteceu com sistema de fase

móvel, composto de acetonitrila e água, com gradiente inicial de 77:23 v:v e final 90:10 v:v. Uma vez eluídos, os ácidos graxos foram detectados através de detector de fluorescência, com excitação 325 nm e emissão 398 nm. As concentrações de ácidos graxos são apresentadas como percentual do ácidos graxos totais.

ANÁLISE ESTATÍSTICA:

Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média e foram submetidos à análise de variância de uma via (One-Way ANOVA), seguido de pós-teste de Tukey no programa Prisma 6, com nível de significância para $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Viabilidade Celular - Alamar Blue

Nos gráficos a seguir serão comparados os grupos tratados com seus respectivos controles, como mostra a Tabela 6:

TABELA 6 - Grupos controles e seus respectivos tratados.

CONTROLES	TRATADOS
Célula	ConA SFB
ConA+SFB	Qt1 Qt3 OFT OP
Qt1	Qt1+OFT Qt1+OP
Qt3	Qt3+OFT Qt3+OP

De acordo com esta tabela, entre grupo tratado e controle há apenas uma diferença. Por exemplo, entre os grupos Qt1+OFT e Qt1, a única diferença é a presença ou não de OFT na cultura.

Ao comparar alguns dos grupos considerados controles em diferentes tempos de incubação (Figura 16) é possível perceber diferença da proliferação celular do grupo ConA, que apresentou aumento de 38%, 24% e 29% comparado ao seu controle (grupo Célula), em 24 horas, 48 horas e 72 horas, respectivamente ($p < 0,05$). Após 24h de cultivo, o grupo ConA +SFB apresentou proliferação celular menor que o grupo ConA ($p < 0,05$), entretanto, em 48 horas e 72 horas não há mais diferença significativa entre ConA e ConA+SFB. É possível observar que associando a ConA (que demonstrou aumentar a proliferação celular) ao SFB (que demonstrou uma tendência a menor proliferação celular) prevalece o estímulo de aumentar a proliferação celular em relação ao grupo Célula, sendo considerado suficiente conforme o objetivo do estudo.

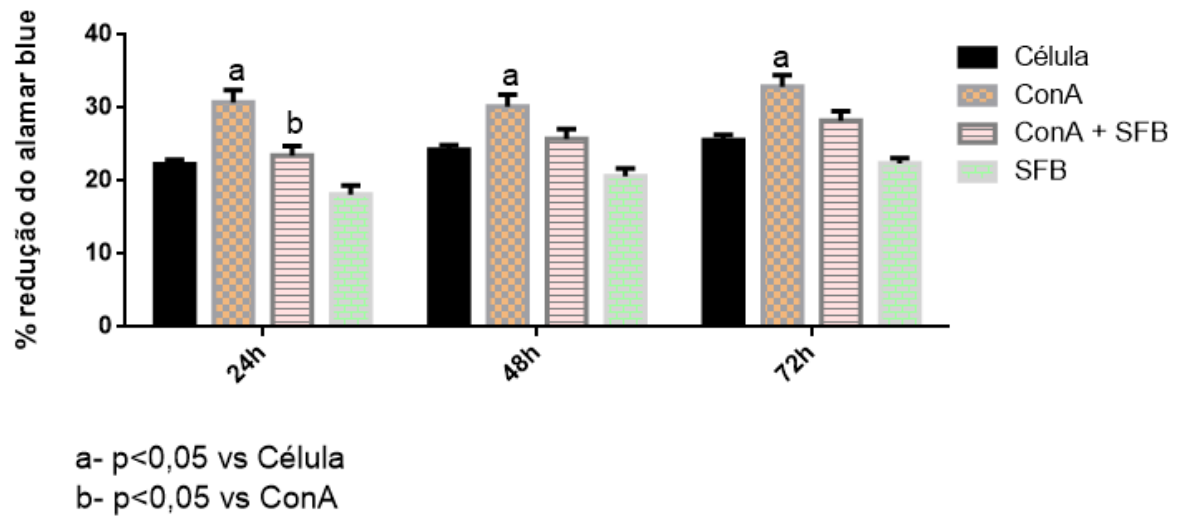


FIGURA 16: Porcentagem de redução do Alamar Blue dos grupos controle: Célula, Concanavalina A (ConA), Concanavalina A + Soro Fetal Bovino (ConA + SFB), e Soro fetal Bovino (SFB). a- $p < 0,05$ em relação ao respectivo grupo Célula; b- $p < 0,05$ em relação ao respectivo grupo ConA.

Ao comparar os grupos contendo quimioterápico (Qt1 e Qt3) com o grupo ConA + SFB (Figura 17), Qt1 e Qt3 apresentam menor viabilidade/proliferação celular em 24 horas, 48 horas e 72 horas ($p < 0,05$). Em 24 horas no grupo Qt1 havia 36% menos células vivas, enquanto no grupo Qt3 23% menos, já em 48 horas Qt1 28% menos e Qt3 22%, e após 72 horas no grupo Qt1 havia 25% menos células e no Qt3 24% menos que seu controle.

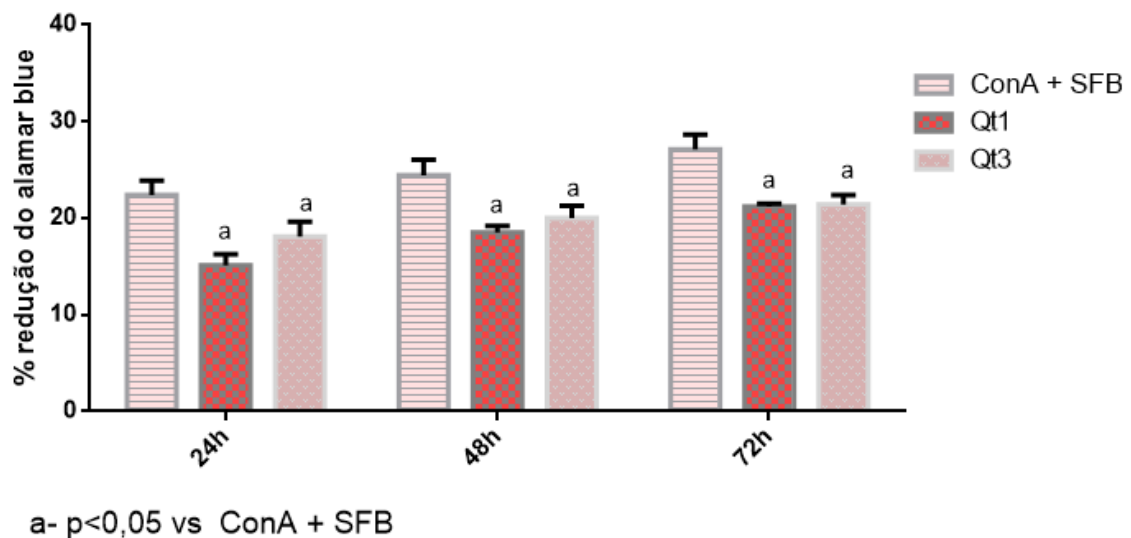


FIGURA 17 - Porcentagem de redução do Alamar Blue dos grupos com quimioterápico: Concanavalina A + Soro Fetal Bovino (ConA + SFB), Quimioterapia na concentração 10^{-1} (Qt1), Quimioterapia na concentração 10^{-3} (Qt3). ^a $p < 0,05$ em relação ao respectivo grupo ConA+SFB.

O gráfico dos grupos contendo células + ConA+SFB + OFT ou OP (Figura 18), demonstra que OP promoveu aumento da proliferação celular em relação ao grupo ConA+SFB após 48 e 72h de cultivo (27% e 32%, respectivamente) ($p < 0,05$). OFT foi capaz de elevar a proliferação celular após 48 e 72h de cultivo em relação ao grupo ConA+SFB (13 e 11%, respectivamente), porém não de forma estatisticamente significativa.

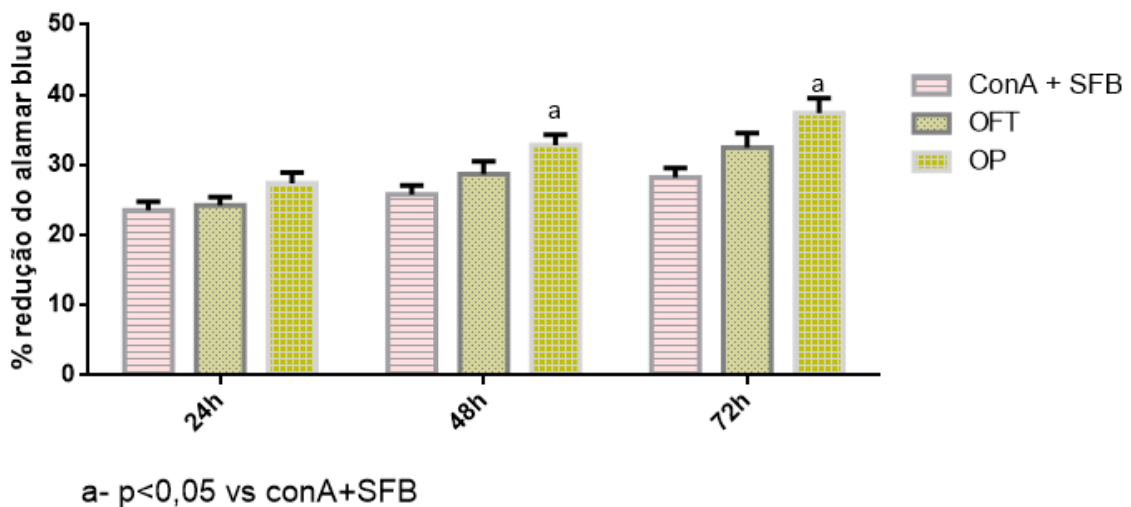


FIGURA 18 – Porcentagem de redução do Alamar Blue dos grupos com óleo: Concanavalina A + Soro Fetal Bovino (ConA+SFB), Óleo de fígado de tubarão (OFT), ou Óleo de peixe (OP). ^a $p < 0,05$ em relação em relação ao respectivo grupo ConA+SFB.

Quando OFT e OP são adicionados ao meio contendo quimioterápico na concentração de 10^{-1} M (Figura 19) é possível observar que o grupo Qt1 + OFT em relação ao grupo Qt1 (controle), apresentou 54%, 42% e 35% a mais de viabilidade/proliferação celular em 24 horas, 48 horas e 72 horas respectivamente ($p < 0,05$). O grupo Qt1 + OP apresentou incremento da viabilidade/proliferação ainda maior de 64%, 69% e 74% em 24 horas, 48 horas e 72 horas, respectivamente em relação ao grupo Qt1 ($p < 0,05$). Além disso, após 72h de cultivo o grupo Qt1 + OP apresentou maior viabilidade/proliferação celular do que o grupo Qt1+ OFT (28%, $p < 0,05$).

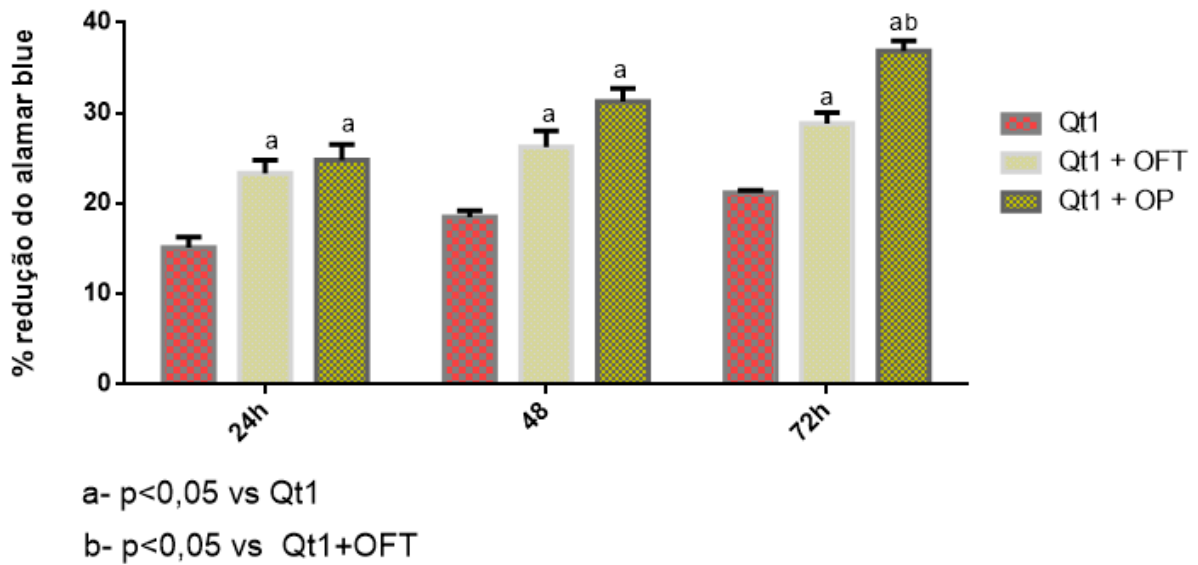


FIGURA 19 – Porcentagem de redução do Alamar Blue dos grupos com Qt1+óleos: Quimioterapia 10^{-1} (Qt1), Quimioterapia 10^{-1} + Óleo de fígado de tubarão (Qt1 + OFT), e Quimioterapia 10^{-1} + Óleo de peixe (Qt1+OP). ^a $p < 0,05$ em relação em relação ao respectivo grupo Qt1; ^b $p < 0,05$ em relação ao respectivo grupo Qt1 + OFT.

O Grupo Qt3+OFT (Figura 20), apresentou 38% e 45% maior viabilidade/proliferação celular em relação ao grupo Qt3 (controle), em 24 e 72 horas, respectivamente. Valores maiores de viabilidade/proliferação celular foram obtidos na presença de OP no meio de cultura (grupo Qt3+OP) em relação ao controle (52%, 64% e 68% após 24, 48 e 72 horas) ($p < 0,05$).

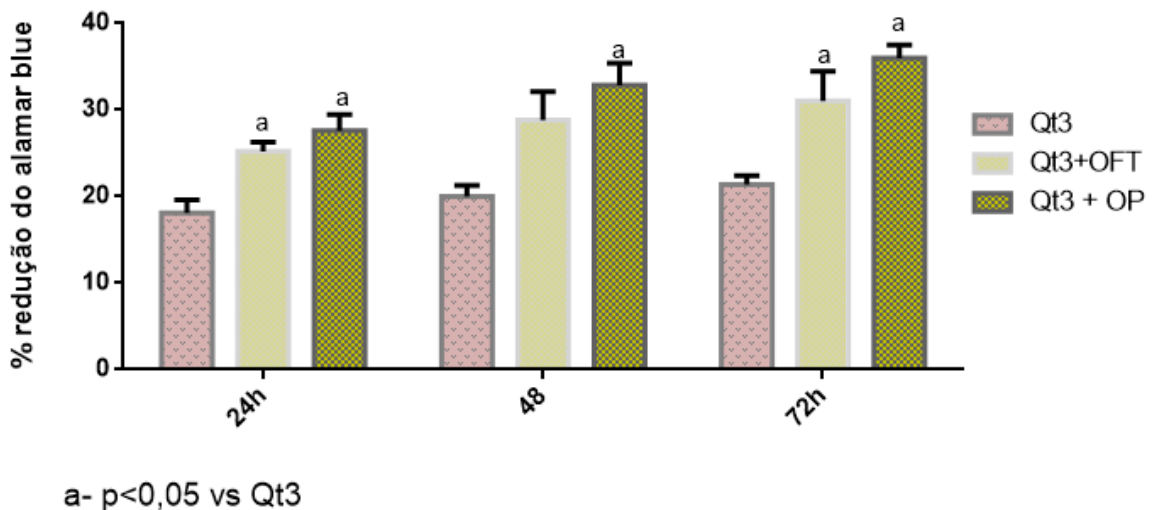


FIGURA 20 – Porcentagem de redução do Alamar Blue dos grupos com Qt3+óleos: Quimioterapia 10^{-1} (Qt1), Quimioterapia 10^{-3} + Óleo de fígado de tubarão (Qt3 + OFT), e Quimioterapia 10^{-3} + Óleo de peixe (Qt3+OP). ^a $p < 0,05$ em relação em relação ao respectivo grupo Qt3;

5.2 Proporção células viáveis, apoptóticas, necróticas por citometria de fluxo

Na tabela a seguir estão os dados percentuais referentes a células viáveis, apoptose, necrose, apoptose tardia dos linfócitos avaliados por citometria de fluxo (Tabela 7).

TABELA 7 – Grupos avaliados por citometria de fluxo e seus respectivos percentuais de células viáveis, apoptóticas, necróticas e apoptóticas tardias.

ConA+SFB, grupo em que as células receberam ConA e SFB in vitro; QT1, grupo em que as células receberam Qt1 in vitro; QT3, grupo em que as células receberam Qt3 in vitro; OFT, grupo em que as células receberam OFT in vitro; OP, grupo em que as células receberam OP in vitro; Qt1+OFT, grupo em que as células receberam Qt1 e OFT in vitro; Qt1 + OP, grupo em que as células receberam Qt1 e OP in vitro; Qt3+OFT, grupo em que as células receberam Qt3 e OFT in vitro; Qt3+OP, grupo em que as células receberam Qt3 e OP in vitro. a $p < 0,05$ vs conA+SFB, b $p < 0,05$ vs QT1, c $p < 0,05$ vs QT3.

	GRUPOS								
	ConA+SFB	QT1	QT3	OFT	OP	QT1+OFT	QT1+OP	QT3+OFT	QT3+OP
Viáveis	12,9±2,7	4,9±2,3	5,8±0,6	7,6±2,0	9,8±0,1	3,9±1,3	4,8±0,03	9,0±1,3	12,4±0,8 ^c
Apoptose	40,8±2,5	19,4±3,7 ^a	33,7±2,3	39,6±2,2 ^b	37,4±3,0 ^b	39,2±8,8	37,0±9,5	40,5±6,1	34,0±6,4
Necrose	2,6±0,9	6,5±2,4	1,5±0,3 ^b	0,5±0,03 ^b	1,5±0,2 ^b	0,9±0,2 ^b	0,3±0,1 ^b	1,2±0,3	1,9±0,4
Apoptose tardia	43,7±6,2	69,2±4,7	58,9±1,9	52,2±3,3	51,3±7,3	52,4±6,8	57,0±6,4	48,9±11,6	51,2±7,6

A análise por citometria de fluxo da porcentagem de células viáveis, apoptóticas e necróticas é apresentada na Tabela 7. O grupo QT1 apresentou redução da quantidade de células viáveis de cerca de 2,6 vezes em relação ao grupo controle (conA+SFB), enquanto o grupo QT3 apresentou redução de 2,2 vezes. A associação dos óleos (grupos QT1+OFT e QT1+OP) não foi capaz de reverter a redução de células viáveis promovida pelo quimioterápico na maior concentração (QT1). Quando a menor concentração de quimioterápico foi utilizada na presença de OP (grupo QT3+OP), foi possível observar aumento da porcentagem de células viáveis em relação ao grupo QT3 ($p < 0,05$), e quando foi utilizada na presença de OFT (grupo QT3+OFT), foi possível observar aumento da porcentagem

de células viáveis em relação ao grupo QT3, porém sem diferença estatística. Células tratadas com OFT ou OP (grupos OFT e OP) apresentaram porcentagem de células viáveis que não foi maior que o grupo controle (conA+SFB).

Em relação à porcentagem de células apoptóticas é possível notar que o quimioterápico na maior concentração (grupo QT1) promoveu menos apoptose do que nos grupos conA+SFB (redução de ~2 vezes), QT3 (1,7 vezes), OFT (2 vezes), OP (1,9 vezes), QT1+OFT (2 vezes) e QT1+OP (1,9 vezes) ($p < 0,05$), sendo que quando o OFT e OP foram adicionados a Qt1 o percentual de apoptose manteve-se similar ao grupo ConA+SFB. No entanto, QT1 apresentou a maior porcentagem de necrose (4 vezes maior que a observada para o grupo QT3; 13 vezes maior que OFT; 4 vezes maior que OP; 7 vezes maior que QT1+OFT; e 22 vezes maior que QT1+OP; $p < 0,05$).

A apoptose tardia, detectada através da marcação simultânea com anexina e iodeto de propídeo, foi maior no grupo QT1 em relação a todos os demais grupos, apesar da ausência de significância estatística nas comparações.

5.3 Perfil lipídico obtido por HPLC

TABELA 8 – Percentual de ácidos graxos obtidos do sobrenadante da cultura de células mononucleares após 72h.

OFT, grupo em que as células receberam OFT in vitro; OP, grupo em que as células receberam OP in vitro; Qt1+OFT, grupo em que as células receberam Qt1 e OFT in vitro; Qt1 + OP, grupo em que as células receberam Qt1 e OP in vitro; Qt3+OFT, grupo em que as células receberam Qt3 e OFT in vitro; Qt3+OP, grupo em que as células receberam Qt3 e OP in vitro; SFB, grupo em que as células receberam SFB in vitro; OFT complexado, grupo sem células, apenas o OFT complexado in vitro; OP comple, grupo sem células, apenas o OP complexado in vitro. a $p < 0,05$ vs OFT

GRUPOS

ÁCIDOS GRAXOS %	OFT	OP	QT1+OFT	QT1+OP	QT3+OFT	QT3+OP	SFB	OFT COMPL.	OP COMPL.
EPA (20:5 n-3)	N.D.	22,2±0,3	N.D.	7,4±0,0	N.D.	9,7±0,5	N.D.	N.D.	20,0±6,5
DHA (22:6 n-3)	2,2±0,7	13,9±1,5 ^a	5,2±1,2	5,5±0,0	2,9±0,7	5,7±0,1	N.D.	4,1±0,1	13,4±3,1

O sobrenadante da cultura dos grupos OP e OP complexado com SFB apresentaram porcentagem de EPA e DHA similares, que reduziram quando quimioterápico estava presente (grupos QT1+OP e QT3+OP; redução de aproximadamente 2,5 vezes).

Os grupos OFT complexado com SFB, OFT, QT1+OFT e QT3+OFT não tiveram EPA detectado. No grupo OFT complexado com SFB e no grupo OFT a porcentagem de DHA foi de 4 a 6 vezes menor que a encontrada nos grupos OP e OP complexado com SFB.

A identificação e quantificação dos ácidos graxos EPA e DHA do sobrenadante do grupo SFB foi importante para mostrar a ausência destes compostos no grupo controle, sendo assim, esses AGPI foram provenientes dos óleos.

6 DISCUSSÃO

Alquilgliceróis e ácidos graxos n-3 são capazes de alterar a sinalização intracelular e, além disso, atuam como moléculas imunomoduladoras. Alguns estudos mostram que a suplementação com óleo de fígado de tubarão, principal fonte natural de alquilgliceróis, ou com óleo de peixe, rico em ácidos graxos n-3, é capaz de modular a funcionalidade de células do sistema imune, melhorando sua resposta. Este efeito é de suma importância em indivíduos submetidos a tratamento quimioterápico, e conhecer os mecanismos pelos quais estes lipídios atuam sobre células mononucleares, mais especificamente sobre linfócitos, foi o intuito deste trabalho.

O mitógeno utilizado foi a concanavalina A (ConA), lecitina que em cultura celular tem capacidade de induzir atividade mitogênica dos linfócitos T (SIGMA, 2012). Essa atividade mitogênica foi verificada por Jeurink *et. al.* (2008), os quais realizaram estudo com objetivo de estabelecer o estímulo policlonal mais adequado em experiências com células mononucleares de sangue periférico humano, avaliando a viabilidade e proliferação celular. Concluiu-se que a proliferação de células T em culturas de sangue periférico humano a longo prazo deveria incluir anti-CD3, anti-CD8 ou ConA como controle positivo. ConA ativa linfócitos B em repouso, mas apenas estimula as células a entrar no ciclo celular, não ocorrendo divisão (HAWRYLOWICZ & KLAUS, 1984). Já em linfócitos T, ConA atua diretamente nos receptores onde ocorre reconhecimento de antígeno (PALACIOS, 1982; BRETSCHER, 1999).

No presente estudo foi utilizado mitógeno pois os efeitos do quimioterápico são mais marcantes em células em divisão celular (FAUDFLUOR, 2017). Em nosso estudo foram utilizadas as células mononucleares de sangue periférico de humanos saudáveis estimuladas por ConA. O mesmo protocolo foi empregado por Pinzón (2015), que utilizou linfócitos de pessoas saudáveis e ConA, bem como Alamar Blue (PINZÓN *et. al.*, 2015), indicador metabólico também utilizado no presente trabalho.

O SFB foi utilizado para complexação tanto do OFT como do OP. Para não receberem o SFB apenas os grupos em que um dos óleos foi adicionado, os demais grupos receberam o SFB na mesma proporção.

SFB é um suplemento amplamente utilizado para meios de cultura de células por causa do alto teor de fatores de promoção de crescimento. Quando é

utilizado em quantidades adequadas fornece componentes que satisfazem requisitos metabólicos específicos para cultura de células (SIGMA, 2017).

No presente estudo as células do grupo SFB apresentaram a mesma viabilidade que o grupo Célula. Por outro lado, o mitógeno ConA utilizado cumpriu sua função, estimulando eficazmente a proliferação linfocitária do grupo ConA em relação ao grupo Célula ($p < 0,05$). Quando se associou ConA e SFB (grupo ConA+SFB) foi possível perceber que a proliferação celular foi menor que a encontrada para o grupo ConA em 24h, no entanto após 48h e 72h de cultivo, a proliferação do grupo ConA+SFB tornou-se progressivamente maior em relação ao grupo Célula (6% e 10%, respectivamente) (Figura 16), de modo que foi considerado estímulo suficiente para o estudo. É possível que a proliferação menor observada no grupo ConA+SFB em relação ao grupo ConA seja pelo fato de que as proteínas presentes no SFB (3,5 a 5,5g/100mL conforme assessoria científica da empresa Thermo Fisher) possam ter sequestrado moléculas de ConA, disponibilizando menos mitógeno para as células.

Outro composto utilizado associado aos linfócitos foi a fluoruracila, quimioterápico que provoca diminuição da quantidade de células brancas no sangue de indivíduos em tratamento contra o câncer. Essa diminuição de células brancas provocada por fluoruracil foi mostrada, dentre outros autores, por Garg *et. al.*, (2012), que avaliou 73 pacientes com câncer colorretal tratados com fluoruracila associado ao leucovorin, e verificou leucopenia em 46% deles. De fato, fluoruracila é um quimioterápico utilizado em associação com muitos outros para o tratamento de diversos tipos de neoplasias malignas, e este fato estimulou a utilização de fluoruracil neste trabalho.

Partindo dessa queda na quantidade de leucócitos, fluoruracila foi utilizado *in vitro* como ferramenta para se criar ambiente desafiador para as células mononucleares e, conseqüentemente, ser possível a avaliação dos efeitos do OFT e OP.

A dose de fluoruracila inicialmente escolhida para os testes *in vitro* foi de 10^{-3} M, que corresponde aproximadamente à concentração do composto no plasma de um indivíduo em tratamento quimioterápico. Também foi selecionada uma dose mais concentrada (10^{-1} M), com o objetivo de aumentar o desafio sobre as células em cultura, e comparar resultados obtidos com os 2 óleos sob investigação.

Foi observado que o quimioterápico na maior dose ($10^{-1}M$, grupo QT1) foi capaz de reduzir de forma mais eficiente a viabilidade dos linfócitos que o quimioterápico em menor dose ($10^{-3}M$, grupo QT3), especialmente nas primeiras 24h de cultivo (Figura 17). São poucos os estudos na literatura que avaliam efeito da fluoruracila em linfócitos saudáveis. Eisenthal *et. al.*, (2008) avaliou efeito de fluorouracil em células mononucleares de sangue periférico humano (voluntários saudáveis) ativadas por mitógeno *in vitro*, e observou que o quimioterápico na dose de $2,5 \times 10^{-6}M$ provocou aumento no percentual de células na fase S do ciclo celular, condizente com a replicação do DNA. Em outro estudo (TOHYAMA *et. al.*, 2013), dose mais elevada provocou aumento significativo no percentual de células mortas e suprimiu a proliferação de células mononucleares de sangue periférico humano ativadas por mitógeno. Fica claro que o efeito de levar à redução do número de células vivas do quimioterápico fluoruracila é dependente da concentração utilizada, e que as concentrações eleitas para este estudo ($10^{-1}M$ e $10^{-3}M$) estavam adequadas para que o quimioterápico pudesse atuar como ferramenta de indução de “leucopenia *in vitro*”.

Quando OFT ou OP foram adicionados ao cultivo de células, na ausência de quimioterápico (Figura 18), foi possível notar o efeito estimulador da proliferação linfocitária do OP em comparação com o grupo controle, especialmente após 48 e 72h ($p < 0,05$). Apesar de não ter havido diferença estatística entre o grupo ConA+SFB e o grupo OFT, é possível observar tendência à maior proliferação celular no grupo OFT em 48 e 72h. Entretanto, nas Figuras 19 e 20, que mostram efeito dos óleos na presença do fluoruracil, OFT foi hábil em se contrapor à ação do quimioterápico sobre os linfócitos, na menor e maior concentração, sendo possível observar maior viabilidade celular em todos os tempos avaliados ($p < 0,05$). O efeito protetor promovido pelo OP foi ainda mais evidente.

OFT é um nutracêutico conhecido por seus benefícios no sistema imunitário. Estes benefícios foram recentemente demonstrados por Palmieri *et. al.* (2014), que avaliaram 40 pacientes idosos tratados em pré-operatório com 500mg de ALQ, 2 vezes ao dia, durante 4 semanas. Os pacientes suplementados obtiveram aumento na quantidade de leucócitos, linfócitos, IgG, IgA e IgM, além de aumentada proteção contra agentes infecciosos e capacidade de reparação de feridas. Houve também diminuição da PCR (proteína C reativa), evidenciando efeito anti-inflamatório, além de menor taxa de complicações pós-operatórias em comparação aos pacientes sem

suplementação. Benefícios em camundongos portadores de tumor suplementados com OFT intraperitoneal com doses de 50 a 0,5mg/kg/dia, foram mudanças no padrão de citocinas de células mononucleares esplênicas para Th1, ocorrendo aumento de IFN- γ e linfócitos TCD8+, resultando em imunidade celular aumentada (HAJIMORADI *et. al.*, 2009). O aumento na produção de citocinas do tipo Th1 como IFN- γ , TNF- α e IL-2 por células mononucleares de sangue periférico foram encontrados em humanos submetidos à ingestão de altas doses de OFT diariamente durante 4 semanas, concluindo que altas doses de OFT podem ser benéficas em infecções (LEWKOWICZ *et. al.*, 2005). Essa ação nas células pode ocorrer pela natureza predominantemente hidrofóbica dos éteres lipídicos presentes no OFT possibilitando que estes sejam incorporadas nas membranas plasmáticas das células, nos *lipid rafts* (HECZKOVÁ & SLOTTE, 2006). Essas jangadas lipídicas são identificadas por seus constituintes exclusivos como colesterol, esfingolipídios e fosfolipídios e têm papel importante na modulação e integração da sinalização celular (MA *et. al.*, 2004), podendo assim, alterar as propriedades celulares por propiciar a formação de moléculas bioativas (HECZKOVÁ & SLOTTE, 2006).

Éteres lipídicos incorporados na membrana plasmática da célula na forma de fosfolipídios éteres atuam como substratos e levam à formação de segundos mensageiros com ligação éter, interferindo na atividade enzimática, como é o caso da PKC, a qual está relacionada à proliferação e diferenciação celular, podendo interferir positivamente nas proteínas de membrana importantes para ativação de linfócitos (HEYMANS *et. al.*, 1987; MARIGNY *et. al.*, 2002; PUGLIESE *et. al.*, 1998). A ativação dos linfócitos T ocorre por meio dos imunoreceptores de tirosina chamados de ITAMs, localizados no complexo protéico de membrana CD3 e em cadeias de proteínas do receptor de célula T. Para a ativação são necessárias proteínas como a tirosina quinase, que fica retida nas jangadas lipídicas, enquanto outras como a fosfolipase C são translocadas para as jangadas após estimulação do receptor de linfócito T (CALDER, 2007; WEISS & CAMBIER, 2004).

Supõe-se ainda que os éteres lipídicos induzam um influxo de Ca^{++} pela abertura de canais de Ca^{++} aumentando sua concentração intracelular, induzindo a despolarização da membrana plasmática (PEDRONO *et. al.*, 2004). Esse aumento de Ca^{++} intracelular foi demonstrado em ratos Wistar, em que os éteres lipídicos inibiram a atividade da enzima Ca^{++} ATPase em leucócitos (sendo 80% linfócitos) (GROSSMAN, 2001).

Fica claro que o OFT, rico em ALQ, apresenta efeito imunoestimulador. Apesar de não haver na literatura estudos sobre o efeito do OFT em células submetidas a contato com quimioterápico *in vitro*, os resultados observados no presente estudo pelo método do Alamar Blue® (Figuras 19 e 20) sugerem que o efeito imunoestimulador do OFT permanece neste cenário. Este efeito do OFT observado *in vitro* sobre linfócitos na presença de quimioterápico vem de encontro com resultados obtidos por *Brohult et. al.* (BROHULT et al, 1970; BROHULT et. al., 1979, BROHULT et. al., 1986), que mostraram *in vivo* a capacidade da suplementação com OFT de reduzir leucopenia em pacientes portadoras de tumor de colo de útero em tratamento contra o câncer.

Em relação ao OP, sabe-se que em geral EPA e DHA juntos representam cerca de 30% dos ácidos graxos presentes no óleo (CALDER, 2013). Há vários estudos que mostram, ao contrário do que foi demonstrado neste trabalho por meio do método utilizando AlamarBlue®, efeito de redução do número de células de defesa após suplementação com OP. Thies *et. al.*, (2001) verificaram que, ao suplementar indivíduos saudáveis com idade entre 55 e 75 anos com 1 g/dia de OP (720mg EPA + 280mg DHA), por 12 semanas, e estimular *in vitro* as células mononucleares do sangue periférico com mitógeno, houve redução da proliferação de linfócitos T em cerca de 65% em relação ao controle. Outros estudos mostram que os AG n-3 podem interferir na produção de citocinas por linfócitos, como por exemplo, diminuindo a produção de IL-2. Tal efeito está associado com inibição da proliferação linfocitária (CALDER & NEWSHOLME, 1992; FERNANDES *et. al.*, 1996; PURASIRI *et. al.*, 1997). O efeito supressor pode ocorrer devido ao deslocamento do receptor de IL-2 causado por EPA e DHA nas jangadas lipídicas, sendo que essa citocina é extremamente importante para a proliferação de linfócitos T (MARTINS *et. al.*, 2007).

Em linfócitos T CD4+ de camundongos, os AG n-3 suprimiram a diferenciação celular de Th17, reduzindo a capacidade de resposta das membranas para IL-6, uma citocina polarizante essencial (ALLEN *et. al.*, 2014).

Outro estudo relacionado a IL-6 e Th17 foi realizado por Monk *et. al.*, (2013), que avaliaram células T CD4+ de camundongos alimentados com dieta adequada em todos os nutrientes, contendo 2% de óleo de milho e 1% de óleo de peixe (0,5% EPA e 0,5% DHA), e observaram diminuição no percentual de células T CD4+ e IL-17.

A ação dos componentes desse óleo, assim como os éteres lipídicos, ocorre, pelo menos em parte, pela capacidade de se inserirem na membrana plasmática da célula. Elevando a concentração de n-3 nos fosfolipídios, há redução proporcional da concentração de ácido araquidônico, mais especificamente nas jangadas lipídicas de células de defesa, desordenando as jangadas com suas caudas longas e flexíveis, alterando assim a composição das membranas plasmáticas e propriedades físicas como sua fluidez. A função das proteínas presentes também é modificada, a transdução de sinal através de segundos mensageiros, o tipo de eicosanóide produzido, a expressão gênica, e conseqüentemente as respostas celulares, interferindo na interação de fatores de crescimento, citocinas e hormônios com seus receptores, influenciando na função imunitária (BERQUIM *et. al.*, 2008; CALDER, 2007; CALDER, 2013; MA *et. al.*, 2004). Essas jangadas lipídicas são enriquecidas na sinapse imunológica, região do contato entre as células T e células apresentadoras de antígenos (FRIELD *et. al.*, 2005). Em células T reguladoras e efetoras CD4+, AG n-3 exerceram efeitos imunossupressores, por meio da alteração biofísica e bioquímica nas jangadas lipídicas da membrana plasmática e na biossíntese de novo fosfolipídio (SHAIKH *et. al.*, 2012). Nessas mesmas células, as jangadas estão presentes em grandes quantidades, além de muitas proteínas envolvidas na sinalização destas células como proteínas tirosina-quinases.

Porém, estudos com a suplementação de óleo de peixe mostram efeitos variáveis sobre células do sistema imunitário, possivelmente devido à aplicação de doses/concentrações heterogêneas (TIERNEY *et. al.*, 2011; XIN *et. al.*, 2012; RANGEL *et. al.*, 2012). Amarasekera *et. al.* (2014), ao analisar o epigenoma dos locais de metilação do DNA de células TCD4 de neonatos afetados pela suplementação materna com OP, os testes de metilação e as quantidades de EPA e DHA nas células, observaram grande influência da dose/concentração utilizada.

Dietas ricas em ômega 3 em geral estão associadas à diminuição no percentual de linfócitos T e B, em contrapartida alguns autores verificam o oposto, que tais dietas aumentam a resposta proliferativa de linfócitos T após a exposição de mitógenos. Apesar desse efeito inibidor da proliferação, pequenas quantidades dos AG são essenciais para a proliferação, sendo a síntese de DNA estimulada por baixas concentrações de AG e inibida por altas concentrações dos mesmos (CURI-A *et. al.*, 2002; ROBINSON & FIELD, 1998; FERNANDES *et. al.*, 1994; SPIEKER & POLET, 1981; KELLY & PARKER, 1979; KARSTEN *et. al.*, 1994).

Estudos envolvendo quimioterápico e OP frequentemente avaliam o comportamento das células tumorais, e não de células do sistema imunitário. No estudo de Xue *et. al.*, (2009), foram avaliados linfócitos do sangue periférico, assim como no presente estudo, porém de ratos portadores de tumor que receberam o quimioterápico fluoruracila e Iritotecano. Foi realizada contagem de leucócitos antes e após o 13º dia da última quimioterapia, sendo observado que no grupo controle houve aumento na concentração de neutrófilos e uma diminuição dos linfócitos, e que no grupo que recebeu o AGPI n-3 (0,88% da dieta), essas alterações foram parcialmente ou totalmente corrigidas, normalizando a contagem leucocitária. Dados similares foram observados por Fukatsu *et. al.* (2008), porém, em camundongos saudáveis. O grupo controle recebeu infusão contínua de 10mg/kg de fluorouracil por 5 dias e o grupo tratado, além dessa mesma infusão também recebeu 10mg/kg de emulsão com 10% de OP. Os linfócitos GALT foram isolados, os quais demonstraram que o grupo controle apresentou uma menor quantidade de linfócitos, sendo que no grupo tratado essa quantidade de linfócitos foi restaurada, ou seja, a infusão de OP juntamente com a fluoruracila preservou o número de linfócitos. Em pacientes com câncer recebendo quimioterapia (fluoruracila associado a outra droga) não suplementados e suplementados com 2g/dia de OP por 8 semanas, a avaliação do número de neutrófilos no final dessas 8 semanas mostrou que o grupo não suplementado obteve queda na quantidade de neutrófilos, e que contrariamente, o grupo suplementado com OP obteve aumento na quantidade dessas células (BONATTO, 2008). Apesar deste estudo de Bonatto (2008) ter sido realizado com neutrófilos, e não com linfócitos, o resultado evidencia capacidade de estimulação do sistema imune pelo OP.

No presente estudo, o grupo OP apresentou proliferação linfocitária significativamente maior em 48 e 72 horas em comparação com o seu controle (ConA+SFB) (Figura 19), e também foi capaz de promover aumento da viabilidade mesmo na presença de quimioterápico (Figuras 19 e 20). É provável que este resultado seja devido à concentração do óleo utilizado e até mesmo ao tempo de exposição. Calder (2009) afirma que a incorporação de EPA e DHA em células imunes humanas *in vivo* atinge seu pico dentro de 4 semanas após o início da ingestão dietética de uma maneira dose dependente (CALDER-B, 2009). Apesar de nosso estudo ter sido *in vitro*, é possível que o tempo de contato de no máximo 72h das células com OP tenha sido curto demais para que a incorporação dos AG n-3

fosse possível, predominando efeito independente da incorporação em membrana. AGPI n-3 podem atuar em receptores de membrana, como na redução do processo inflamatório, por inibir a fosforilação do complexo fator nuclear NFkB. Essa inibição ocorre devido à interação com receptores acoplados a proteína G-GPR120 e aumento da expressão de PPAR- γ e PPAR- α (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ e α*) (CALDER, 2012).

De fato, ao se analisar a porcentagem de EPA e DHA obtida por HPLC no sobrenadante do cultivo celular após 72h (Tabela 8), é possível observar que a porcentagem de EPA e DHA do complexo OP-SFB e do sobrenadante da cultura após 72h do grupo OP é bastante similar, sugerindo que o efeito proliferativo encontrado para o grupo (Figura 18) possa ser independente da incorporação em membrana celular. Por outro lado, os grupos QT1+OP e QT3+OP apresentaram redução da porcentagem de EPA e DHA no sobrenadante da cultura após 72h em relação à porcentagem encontrada no complexo OP-SFB, sugerindo possível incorporação destes ácidos graxos na membrana das células cultivadas. É possível que a diminuição da porcentagem de EPA e DHA no sobrenadante da cultura dos grupos QT1+OP e QT3+OP esteja relacionada com o efeito quimioprotetor do OP sobre as células após 72h na presença do quimioterápico, o que foi evidenciado pelo aumento de viabilidade das células nas Figuras 19 e 20. A identificação e quantificação de EPA e DHA das células após 72h de cultivo, além do sobrenadante, forneceriam mais informações a esse respeito, e podem ser realizadas em ensaios futuros.

É preciso ressaltar que o OFT, além de possuir alquilgliceróis em sua composição, também apresenta ácidos graxos n-3, porém em menor concentração que o OP. Segundo *lagher et al* (2013), OP apresenta aproximadamente o dobro de EPA+DHA que OFT. Na Tabela 8, OFT complexado com SFB apresentou em análise por HPLC cerca de 4% de DHA e EPA não foi detectado, o que representa bem menos da metade de EPA+DHA encontrado no OP complexado com SFB. É preciso levar em conta que as cápsulas de OFT utilizadas no presente estudo, apesar de serem da mesma marca que os utilizados no estudo anterior desenvolvido por *lagher et al*, pertencem a lotes diferentes. Sabe-se que a composição dos óleos obtidos de peixes sofre alterações em sua composição dependendo de fatores tais como a alimentação do animal, clima, local de obtenção dos animais, dentre outros (ROSE & CONNOLLY, 1999).

Apesar da pequena concentração de DHA encontrada tanto no OFT complexado com SFB quanto no sobrenadante da cultura dos grupos OFT, QT1+OFT e QT3+OFT (Tabela 8), não pode ser descartado que o efeito de estimulação da proliferação linfocitária promovido pelo OFT e observado pelo método utilizando Alamar Blue® (Figuras 18, 19 e 20) seja também devido à presença de ácido graxo n-3. A identificação e quantificação de alquilgliceróis por cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa do sobrenadante da cultura dos diferentes grupos, bem como das células após 72h de cultivo, certamente seriam úteis na interpretação dos resultados e na avaliação do papel dos AKG nos efeitos observados nos grupos contendo OFT.

Considerando que os dados obtidos com AlamarBlue® mostram a capacidade proliferativa/viabilidade celular e são incapazes de revelar a proporção de apoptose e necrose das células cultivadas, foram realizados ensaios de citometria de fluxo.

Na Tabela 7 é possível observar que o quimioterápico fluoruracila (grupos QT1 e QT3) reduziu o número de células viáveis em relação ao grupo controle (ConA+SFB). Estes dados vão de encontro com o que foi demonstrado na Figura 17. Particularmente no grupo QT1, em que maior concentração de quimioterápico foi utilizada, a morte celular por necrose e a quantidade de células em apoptose tardia (marcadas tanto por Anexina V quanto por iodeto de propídeo) foi elevada.

A apoptose é considerada um processo controlado de desmontagem celular autônoma que evita provocar inflamações devido ao seu desfecho anti-inflamatório mediado por caspases. Nesse processo ocorre a exposição de moléculas de fosfatidilserina na monocamada externa da membrana plasmática de células em apoptose, atuando como um marcador molecular para identificação dessas células (FINK & COOKSON, 2005; MOREIRA & BARCINSKI, 2004). Em nosso estudo fosfatidilserina foi marcada pela Anexina V. Já a necrose, a qual foi marcada por iodeto de propídeo, é considerada uma morte celular acidental, resultante de perturbações ambientais com liberação descontrolada de conteúdo inflamatório celular (FINK & COOKSON, 2005). A maior porcentagem de necrose, bem como a menor porcentagem de apoptose observada em QT1 (quimioterápico mais concentrado) em relação a QT3 (menos concentrado) eram resultados esperados, e confirmam a agressividade da fluoruracila sobre células de defesa.

OP e OFT quando associados ao quimioterápico mais concentrado (grupos QT1+OFT e QT1+OP) foram capazes de reduzir a porcentagem de necrose das células em relação ao grupo QT1, e manter a porcentagem de apoptose semelhante à encontrada nos grupos que receberam apenas óleo (grupos OFT e OP). No entanto, os grupos QT1+OFT e QT1+OP não apresentaram diferença na porcentagem de células viáveis em relação ao grupo QT1. Este resultado contrasta com o que foi obtido pelo método do Alamar Blue® em que a viabilidade das células dos grupos QT1+OFT e QT1+OP foi maior que a obtida no grupo QT1. É preciso considerar que a viabilidade celular registrada por citometria de fluxo revela um estado estático (uma “fotografia”) da porcentagem de células viáveis, apoptóticas e necróticas após 72h de cultivo, enquanto que a porcentagem de redução do Alamar Blue® reflete atividade celular acumulada durante 72h. Esta explicação poderia também justificar as diferenças nas porcentagens de viabilidade celular obtidas por citometria e por Alamar Blue® para os grupos OFT e OP em relação ao grupo conA+SFB. Outro fator a ser observado e que pode explicar parcialmente os resultados aparentemente discrepantes de viabilidade celular mostrados pelos ensaios com Alamar Blue® e por citometria, é a possível falta de nutrientes para permitir a viabilidade das células após 72 horas de cultivo.

Quando a menor concentração de quimioterápico foi utilizada na presença de OFT ou OP (grupos QT3+OFT e QT3+OP) observa-se maior viabilidade celular após 72h de cultivo em relação ao grupo QT3 (1,6 e 2,1 vezes, respectivamente). Considerando que esta concentração de quimioterápico corresponde à encontrada no plasma de indivíduos em tratamento quimioterápico com fluoruracil, a capacidade do OFT e OP de manter a viabilidade celular por mais tempo, mesmo que *in vitro*, sugere importante papel quimioprotetor que poderia ser oferecido com a suplementação destes óleos em indivíduos sob tratamento contra o câncer. Como citado anteriormente, esta informação está de acordo com os primeiros estudos desenvolvidos por Brohult et al (BROHULT *et. al.*, 1970; BROHULT *et. al.*, 1979, BROHULT *et. al.*, 1986), que observou o mesmo efeito *in vivo* do OFT. Em relação ao OP, este efeito quimioprotetor foi demonstrado *in vivo* por BONATTO, 2008, no entanto com neutrófilos plasmáticos. Certamente mais estudos *in vitro* e *in vivo* poderão contribuir para o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos, a compreensão do papel dos AG n-3 e de ALQ neste processo, bem como para a

avaliação de que concentração destes compostos seria necessária para obtenção da quimioproteção.

Após esses dados relatados poderia ser indagado se o aumento de viabilidade de linfócitos de indivíduos saudáveis promovido pelos óleos aqui estudados também ocorreria em células tumorais. A literatura é vasta em mostrar que em células tumorais, principalmente AGPI n-3 são hábeis em promover morte celular.

Scheinichen *et. al.* (2003) relataram aumento de espécies reativas de oxigênio em células leucêmicas cultivadas por 48 e 72h na presença de AGPI n-3, o que não foi observado em linfócitos de humanos saudáveis cultivados nas mesmas condições. Chen & Istfan (2000), apresentaram resultados semelhantes ao verificar *in vitro* aumento de reticulação do DNA e apoptose em linfócitos leucêmicos promovidos por ácido graxo n-3 e preservação da viabilidade de linfócitos obtidos de humanos saudáveis. Chiu & Wan (1999), trabalhando com células leucêmicas humanas (HL-60 e K-562) *in vitro*, verificaram que EPA inibiu a proliferação dessas células, prendendo a progressão do ciclo celular em G0 e G1, em que a célula estaria “pausada”, preparando-se para divisão celular, induzindo a apoptose nas células HL-60. Essa apoptose foi demonstrada pela redução na expressão da proteína anti-apoptótica BCL2 e aumento da expressão da pró-apoptótica BAX. Abdi *et. al.* (2014) demonstraram *in vitro* que EPA e DHA ($\geq 50\mu\text{M}$) induziram a apoptose e aumentaram a sensibilidade ao quimioterápico em linhagens celulares humanas de mieloma, por meio da inibição da atividade de NFkB e indução a apoptose através de perturbações mitocondriais e ativação da caspase 3. Porém não afetaram a viabilidade de células mononucleares saudáveis do sangue periférico humano.

Além de estudos com células tumorais de origem sanguínea, há vários outros relatos envolvendo AGPI n-3 e sua capacidade de reduzir o crescimento neoplásico *in vitro*. Destaca-se a capacidade dos AGPI n-3, EPA e DHA, induzirem a apoptose de células tumorais por diferentes vias de atuação nos vários tipos de tumores analisados.

Em células de câncer de mama humano cultivadas *in vitro*, AGPI n-3 induziram a morte celular apoptótica por redução na transdução de sinal através da AKT e NFkB (SCHLEY *et. al.*, 2005). EPA também inibiu *in vitro* o crescimento de células de câncer de pâncreas humano de uma forma dose dependente, induzindo a morte celular apoptótica associada à ativação da caspase 3 (responsável pela

execução da apoptose) e supressão de ciclooxygenase 2 (expressa por células envolvidas na inflamação) (SHIROTA *et. al.*, 2005). Algo novo foi visto em linhagens celulares de câncer de pâncreas humano tratadas *in vitro* com EPA e DHA, em que além de EPA promover acúmulo de ROS e morte celular por apoptose via ativação de caspase 8 também promoveu autofagia, sugerindo que essa indução de autofagia por EPA pode interferir na indução de apoptose celular (FUKUI *et. al.*, 2013). Já em linhagens celulares humanas de neuroblastoma EPA e DHA de forma dose-dependente tiveram efeito antiproliferativo nessas células e mínimo efeito de citotoxicidade em células não tumorais. Sugerindo que o efeito antiproliferativo pode ter sido desencadeado por “prender” o ciclo celular entre a fase G0 e G1 e elevar a apoptose, além de diminuir do percentual de células na fase S e poder induzir a fragmentação do DNA (SO *et. al.*, 2015). Ao associar DHA à cultura de células tumorais humanas incubadas com fluoruracila, Calviello *et. al.*, (2005) verificaram aumento o efeito inibitório do quimioterápico na expressão de proteínas antiapoptóticas como BCL-2 e BCL-XL e indução da expressão da C-MYC, que gera apoptose e sensibiliza as células cancerosas à ação dos agentes pró-apoptóticos como a fluoruracila.

Em relação à utilização de OFT ou alquilgliceróis *in vitro*, há escassez de informação na literatura. Krotkiewski *et al* (2003) incubaram *in vitro* linhagens de células humanas tumorais de ovário, próstata e mama humanas com OFT e observaram maior percentual de células apoptóticas em células tumorais de ovário e próstata, e maior percentual de células necróticas em células tumorais de mama quando comparadas com seu controle. Os resultados obtidos no presente trabalho apontam para uma capacidade de proteção de células mononucleares, exercida tanto pelo OFT quanto pelo OP, quando em contato *in vitro* com o quimioterápico fluoruracil. Como já mencionado, este desenho experimental foi adotado com vistas a simular uma condição real de pacientes submetidos a tratamento quimioterápico, com risco de leucopenia e necessidade de suspensão de tratamento. A possibilidade de que o uso de nutracêuticos como OFT e OP possam ser úteis na proteção de leucócitos em contato com quimioterápicos traz a necessidade de novos estudos que sejam capazes de elucidar mecanismos moleculares envolvidos, doses adequadas, e respostas de outros tipos celulares, tais como neutrófilos.

CONCLUSÃO

- OFT e OP foram capazes de aumentar a viabilidade/proliferação de linfócitos durante 72 horas de incubação;

- OFT e OP foram capazes de se contrapor aos efeitos do quimioterápico fluoruracil, aumentando a viabilidade/proliferação de linfócitos e reduzindo a porcentagem de células necróticas durante 72 horas de cultivo, sugerindo que ambos os óleos apresentam efeito quimioprotetor para as células estudadas;

- OP apresentou efeito mais pronunciado que OFT nos parâmetros estudados.

Portanto, de acordo com os achados deste estudo, OFT e OP demonstram capacidade de minimizar o efeito de imunossupressão do quimioterápico nas condições aplicadas.

REFERÊNCIAS

ABDI, J; GARSSSEN, J; FABER, J; REDEGELD, F.A. Omega-3 fatty acids, EPA and DHA induce apoptosis and enhance drug sensitivity in multiple myeloma cells but not in normal peripheral mononuclear cells. **Journal of Nutrition Biochemistry**, Amsterdam, n.25, p.1254-1262, 2014.

ABUSHUFA, R.; REED, P.; WEINKOVE, C. Fatty acids in erythrocytes measured by isocratic HPLC. **Clinical Chemistry**., Washington, v.40, n. 9, p. 1707-1712, 1994.

ACEVEDO, R.; GIL, D.; CAMPO, J.; BRACHO, G.; VALDES, Y.; PEREZ, O. The adjuvant potential of synthetic alkylglycerols. **Vaccine**, Amsterdã, v. 24, n.2, p. 32-33, 2006.

AGUIAR JÚNIOR, S. **Valor prognóstico e preditivo da expressão imunistoquímica de timidilato sintase em pacientes portadores de adenocarcinoma colorretal**. Dissertação (Mestrado em ciências na área de Oncologia) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

AJANI, J.A; WINTER, K.A; GUNDERSON, L.L; PEDERSEN, J; BENSON, A.B; THOMAS JR, C.R. et. al. Fluorouracil, Mitomycin, and Radiotherapy vs Fluorouracil, Cisplatin, and Radiotherapy for Carcinoma of the Anal Canal. **JAMA**, Chicago, v. 299, n. 16, p. 1914-1921, 2008.

ALLEN, M.J; FAN, Y.Y; MONK, J.M; HOU, T.Y; BARHOUMI, R; MCMURRAY, D.N; CHAPKIN, R.S. n-3 PUFAs reduce T-helper 17 cell differentiation by decreasing responsiveness to interleukin-6 in isolated mouse splenic CD4⁺ T cells. **J Nutr**. Rockville, v.144, n.8, p. 1306-1313, 2014.

AMARASEKERA, M; NOAKES, P; STRICKLAND, D; SAFFERY, R; MARTINO, D.J; PRESCOTT, S.L. Epigenome-wide analysis of neonatal CD4(+) T-cell DNA methylation sites potentially affected by maternal fish oil supplementation. **Epigenetics**., v.9, n.12, p.1570-1576, 2014.

ANDRE´, T; BONI, C; NAVARRO, M; TABERNERO, J; HICKISH, T; TOPHAM, C. et. al. Improved Overall Survival With Oxaliplatin, Fluorouracil, and Leucovorin As Adjuvant Treatment in Stage II or III Colon Cancer in the MOSAIC Trial. **Journal of clinical oncology**, Alexandria v.27, n.19, p. 3109-3116, 2009.

AU, J.L.S; RUSTUM, Y.M; MINOWADA, J; SRIVASTAVA, B.I.S. Differential Selectivity of 5-Fluoruracil and 5-Deony-5-fluoroudine in cultured human B lymphocytes and mouse L1210 leukemia. **Biochemical Pharmacology**, Amsterdam, v.32, n.3, p.541-546, 1983.

BENEFÍCIOS DA QUIMIOTERAPIA. Informação em Saúde. Encontrado em:<<http://www.365saude.com.br/pt-surgeries-perations/pturgeries/1009063807.html>>. Acesso em: 08/03/2017.

BERDEL, W.E; BAUSERT, W.R; WELTZIEN, H.U; MODOLELL, M.L; WIDMANN, K.H; MUNDER, PG. The influence of alkyl-lysophospholipids and lysophospholipid-activated macrophages on the development of metastasis of 3-Lewis lung carcinoma. **European Journal of Cancer**, Amsterdam, v. 16, n. 9, p. 1199-1204, 1980.

BERGSTROM, S.; BLOMSTRAND, R. The intestinal absorption and metabolism of chymyl alcohol in the rat. **Acta Physiologica Scandinavica**, Uppsala, v. 38, n.2, p. 166 - 172, 1957.

BERRIDGE, M.J. Lymphocyte activation in health and disease. **Critical Reviews in Immunology**, New York, v. 17, n.2, p. 155-178, 1997

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

BLANK, M.L.; CRESS, E.A.; SMITH, Z.L.; SNYDER, F. Dietary supplementation with ether-linked lipids and tissue lipid composition. **Lipids**, Urbana, v. 26, n.2, p.166-169, 1991.

BONATTO, S.J.R. efeito da suplementação com óleo de peixe, durante oito semanas, sobre o sistema imunitário inato de pacientes, pós-remoção tumoral e efeito in vitro do óleo de peixe sobre as células tumorais. 115f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

BORDIER, C. G.; SELLIER, N.; FOUCAULT, A. P. ; LE GOFFIC, F. Purification and characterization of deep sea shark *Centrophorus squamosus* liver oil 1-Oalkylglycerol ether lipids. **Lipids**, Urbana, v. 31, n.5, p. 521-528, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. TNM: classificação de tumores malignos / traduzido por Ana Lúcia Amaral Eisenberg. 6. ed. - Rio de Janeiro: INCA, 2004. Disponível em<<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/tnm2.pdf>>. Acesso em: 13/05/2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. A situação do câncer no Brasil/Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Instituto Nacional de Câncer, Coordenação de Prevenção e Vigilância. -Rio de Janeiro: INCA, 2006. Disponível em:<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/situacao_cancer_brasil.pdf>. Acesso em: 08/03/2017.

BRASIL. ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) [online]. **Bulário Eletrônico** 2013. Disponível em:<http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmResultado.asp>. Acesso em: 16/11/2015.

BRETSCHER P. A. A two-step, two-signal model for the primary activation of precursor helper T cells. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v. 96, p.185–190; 1999.

BROHULT, A. Proc. Fifth Intern. **Conf. Radiobiology**, p.241, 1957.

BROHULT, A. Alkoxyglycerol-esters in irradiation treatment. **Nature**, London, p. 193, 1962.

BROHULT, A.; BROHULT, J.; BROHULT, S. Biochemical effects of alkoxyglycerols and their use in cancer therapy. **Acta Chemica Scandinavia**, Uppsala, v.24, n.2, p.730 - 732, 1970.

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

BURNS, C.F. SPECTOR, A.A. Biochemical effects of lipids on cancer therapy. **J. Nutr. Biochem**, Amsterdam, v.5, n.3, p, 114-123, 1994.

CALDER, P.C. NEWSHOLME, E.A. Polyunsaturated fatty acids suppress human peripheral blood lymphocyte proliferation and interleukin-2 production. **Clin. Sci**, London, v.82, n.6, p. 695-700, 1992.

CALDER, P.C. N-3 fatty acids, inflammation and immunity: pouring oil on troubled waters or another fishy tale? **Nutrition Research**, Amsterdam v. 21, n.1-2, p. 309-341, 2001.

CALDER, P.C.; YAQOUB, P.; THIES, F.; WALLACE, F.A.; MILES, E.A. Fatty acids and lymphocyte functions. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 87, n.1, p. 31-48, 2002.

CALDER, P.C. Long-chain n-3 fatty acids and inflammation: potential application in surgical and trauma patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v.36, n.4, p.433-446, 2003.

CALDER, P.C. N-3 fatty acids, inflammation, and immunity – relevance to postsurgical and critically ill patients. **Lipids**, Urbana, v. 39, n. 12, p. 1147-1161, 2004.

CALDER, P.C. Immunomodulation by omega-3 fatty acids. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, Amsterdam, v. 77, n. 5-6, p. 327-335, 2007.

CALDER-A, P.C; ALBERS, R; ANTOINE, J.M; BLUM, S; BOURDET-SICARD, R; FERNS, G.A; *et al.* Inflammatory Disease Processes and Interactions with Nutrition. **Br J Nutr**, Cambridge, v.101, n.s1, p. 1-45, 2009.

CALDER-B, P.C. Fatty acids and immune function: relevance to inflammatory bowel diseases. **Int Rev Immunol.**, Amsterdam, v.28, n.6, p.506-234, 2009.

CALDER, P.C. Mechanisms of action of (n-3) Fatty Acids. **Journal of nutrition**, Rockville, v. 142, n. 3, p. 592-599, 2012.

CALDER, P.C. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology? **Br J Clin Pharmacol.**, Nova Jersey, v.75, n.3, p.645-662, 2013.

CALVIELLO, G., DI, N.F., SERINI, S., PICCIONI, E., BONINSEGNA, A., MAGGIANO, N. et. al. Docosahexaenoic acid enhances the susceptibility of human colorectal cancer cells to 5-fluorouracil. **Cancer Chemother Pharmacol**, London, v.55, p.12-20, 2005.

CARBALLEIRA, N.M. New advances in the chemistry of methoxylated lipids. **Progressin Lipid Research**, Amsterdam, v. 41, n.6, p. 437-456, 2002.

CARNEIRO, M. B. **Guia Farmacêutico: Hospital Erasto Gaertner**. Liga Paranaense de Combate ao Câncer. Curitiba, 2011.

CARRERAS, C.W; SANTI, D.V. The catalytic mechanism and structure of thymidylate synthase. **Annu Rev Biochem.**, Palo Alto, V.64, P.721-762, 1995.

CHAPKIN, R.S; HUBBARD, N.E; BUCKMAN, D.K; ERIKSON, K.L. Linoleic acid metabolism in metastatic and nonmetastatic murine mamary tumorcells. **Cancer Res**, Philadelphia, v.49, n.17, p.4724-4728, 1989.

CHEN, Z.Y.; ISTFAN, N.W. Docosahexaenoic acid is a potent inducer of apoptosis in HT-29 colon cancer cells. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, Amsterdam, v. 63, n. 5, p. 301-308, 2000.

CHIU, L.C.M; WAN, J.M.F. Induction of apoptosis in HL-60 cells by eicosapentaenoic acid (EPA) is associated with downregulation of bcl-2 expression. **Cancer Letters**, Amsterdam, v.145, n. 1–2,p. 17-27, 1999.

COOPER, J.S;GUO, M.D; HERSKOVIC, A; MACDONALD, J.S; MARTENSON, J.A; AL-SARRAF, M. et. al. Chemoradiotherapy of Locally Advanced Esophageal CancerLong-term Follow-up of a Prospective Randomized Trial. **JAMA**, Chicago, v.281, n.17, p. 1623-1627,1999.

CRUVINEL, W.M; MESQUITA, J.D; ARAÚJO, J.A; CATELAN, T.T.T; SOUZA, A.W.S.S; ANDRADE, L.E.C. Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares ecelulares da resposta inflamatória. **Rev Bras Reumatol**, São Paulo, v.50, n.4, p. 434-461, 2010.

CURI-A, R.; POMPÉIA, C.; MIYASAKA, C.K.; PROCOPIO, J. Entendendo a gordura: Os ácidos graxos. In: POMPÉIA, C; CURIA, R. **Ácidos Graxos e Função dos leucócitos**. São Paulo: Manoele Ltda, 2002. p.299 - 312.

CURI-B, R.; POMPÉIA, C.; MIYASAKA, C.K.; PROCOPIO, J. Entendendo a gordura: Os ácidos graxos. In: HIRATA, M.H.; DOMINGUES, R.; HIRATA, C. **Transporte de ácidos graxos no plasma**. São Paulo: Manoele Ltda, 2002. p.61 - 70.

DELVES, P.J; ROITT, D. The Immune System - First of two parts. **N. Engl. J. Med**, Waltham, v.343, p.37-50, 2000.

DENIAU, A.L; MOSSET, P; PÉDRONO, F; MITRE R; BOT, D.L; LEGRAND; A.B. Multiple Beneficial Health Effects of Natural Alkylglycerols from Shark Liver Oil. **Mar. Drugs**, Basel, v.8, n.7, p. 2175-2184, 2010.

DOMMELS, Y.E.M.; ALINK, G.M.; BLADEREN, P.J.; OMMEN, B. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids and colorectal carcinogenesis: results from cultured colon cells, animal models and human studies. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 11, n.3-4, p. 297-308, 2002.

Dreamstime. Disponível em:< <https://www.dreamstime.com/stock-illustration-white-blood-cell-formation-differentiation-hematopoietic-stem-image44476897>>. Acesso em: 30/08/2017.

EISENTHAL, A; EYTON, K; BRAZOWSKI, E; KATZ, B.Z; SHIRAZI, I; SKORNICK, Y. Effects of 5-Fluorouracil on Human Mitogen activated peripheral Blood lymphocytes from healthy individuals. **Anticancer Research**, Sithonia, v. 28, n.6, p. 3785-3791, 2008.

FAULDFLUOR: Fluoruracila 50mg/ml - Solução injetável. Disponível em:<<http://docplayer.com.br/9757499-Fauldfloor-fluoruracila-50-mg-ml-solucao-injetavel.html>>. Acesso em: 20/01/2017.

FERNANDES, G.; BYSANI, C.; VENKATRAMAN, J.Y.; TOMAR, V.; ZHAO, W. Increased TGF-beta and decreased oncogene expression by omega-3 fatty acids in the spleen delays onset of autoimmune disease in B/W mice. **J. Immunol.**, Washington, v.152, n.12, p. 5979-5987, 1994.

FERNANDES, G; CHANDRASEKAR, B; LUAN, X. TROYER, D.A. Modulation of antioxidant enzymes and programmed cell death by n-3 fatty acids. **Lipids**, Urbana, v.31, p.91-96, 1996.

FINK S.L.; COOKSON, B.T. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic Description of dead and dying eukaryotic cells. **Infection and Immunity**, Washington, v. 73, n. 4, p.1907-1916, 2005.

FISHER, B; BROWN, A.M; DIMITROV, N.V; POISSON, R; REDMOND, C; MARGOLESE, R.G. et.al. Two months of doxorubicin-cyclophosphamide with and without interval reinduction therapy compared with 6 months of cyclophosphamide,

methotrexate, and fluorouracil in positive-node breast cancer patients with tamoxifen-nonresponsive tumors: results from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-15. **Journal of Clinical Oncology**, Alexandria, v. 8, n. 9, p. 1483-1496, 1990.

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**, Rockville, v. 226, p. 497-509, 1957.

FONSECA, S.M.; MACHADO, R.C.L.; PAIVA, D.R.S.; ALMEIDA E.P.M.; MASSUNAGA, V.M.; JUNIOR, W.R.; KOIKE, C.T.; TADOKORO, H. **Manual de quimioterapia Antineoplásica**. São Paulo: Editora Reichmann & Affonso, 2000.

FRIEDL, P; DEN BOER, A.T; GUNZER, M. Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse. **Nat Rev Immunol**, London, v.5, n.7, p, 532-545, 2005.

FRITSCHKE, K.L; JOHNSTON, P.V. Effect os dietary α -linolenic acid on growth metastasis fatty acid profile and prostaglandin production of two murine mammary adenocarcinomas. **J. Nutr**, Rockville, v.120, n. 12, p. 1601-1609, 1990.

FUKATSU, K; NAGAYOSHI, H; MAESHIMA, Y; UENO, C; SAITOH, D; MOCHIZUKI, H. Fish oil infusion reverses 5-fluorouracil-induced impairments in mucosal immunity in mice. **Clin Nutr**, Amsterdam, v.27, n.2, p.269-275, 2008.

FUKUI, M; KANG, K.S; OKADA, K; ZHU, B.T. EPA, an Omega-3 Fatty Acid, Induces Apoptosis in Human Pancreatic Cancer Cells: Role of ROS Accumulation, Caspase-8 Activation, and Autophagy Induction. **Journal of Cellular Biochemistry**, New Jersey, n.114, p.192–203, 2013.

GARG, M.B; LINCZ, L.F; ALDER, L.F; SCORGIE, F.E; ACKLAND, S.P; SAKHFF, J.A. Predicting 5-fluorouracil toxicity in colorectal cancer patients from peripheral blood cell telomere length: a multivariate analysis. **Br J Cancer**, London, v. 107, n.9, p.1525-1533, 2012.

GLOBOCAN: Estimated cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. International Agency for Research on Cancer: World Health Organization, 2012. Encontrado em:< http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx>. Acesso em: 08/03/2017.

GROSMAN, N. Similar effects of ether phospholipids, PAF and lyso-PAF on the Ca^{+2} -ATPase activity of rat brain synaptosomes and leucocyte membranes. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 1, p. 1321-1329, 2001.

HAJIMORADI, M; HASSAN, Z.M; POURFATHOLLAH, A.A; DANESHMANDI, S; PAKRAVAN, N. The effect of shark liver oil on the tumor infiltrating lymphocytes

and cytokine pattern in mice. **J Ethnopharmacol.**, Amsterdam, v.126, n.3, p.565-570, 2009.

HALLGREN, B.; NIKLASSON, A.; STALLBERG, G.; THORIN, H. On the occurrence of 1-O-alkylglycerols and 1-O-(2-methoxyalkyl) glycerols in human colostrum, Human milk, cow's milk, sheep's milk, human red bone marrow, red cells, blood plasma and a uterine carcinoma. **Acta Chemica Scandinavica**, Stockholm, v. 28, n.9, p. 1029-1034, 1974.

HALLGREN, B.; STALLBERG, G.; BOERYD, B. Occurrence synthesis and biological effects of substituted glycerol ethers. **Prog Chem Fats Other Lipids**, Amsterdam, v. 16, p. 45-58, 1978.

HAMAZAKI, T. Intravenous infusion of n-3 polyunsaturated fatty acids. **Proc Soc Exp Biol Med**, New York, v.200, n.2, p. 171-173, 1992.

HARBIGE, L.S. Dietary n-6 and n-3 fatty acids in immunity and autoimmune disease. **Proc Nutr Soc**, Cambridge, v.57, n.4, p. 555-562, 1998.

HARDMAN, W.E; MOYER, M.P; CAMERON,I,L. Consumption of an omega-3 fatty acids product, INCELL AAFA™, reduced side-effects of CPT-11 (irinotecan) in mice. **British Journal of Cancer** , London, v.86, p. 983–988, 2002.

HAWRYLOWICZ, C.M; KLAUS, G.G. Activation and proliferation signals in mouse B cells. IV. Concanavalin A stimulates B cells to leave G₀, but not to proliferate. **Immunology**, New Jersey, v.53, n.4, p. 703-711, 1984.

HECZKOVA, B.; SLOTTTE, J.P. Effect of anti-tumor ether lipids on ordered domains in model membranes. **FEBS Letters**, New Jersey, v. 580, p. 2471-2476, 2006.

HEYMANS, F.; DA SILVA, C.; MARREC, N.; GODFROID, J.J.; CASTAGNA, M. Alkyl analogs of diacylglycerol as activators of protein kinase C. **FEBS Letters**, New Jersey, v. 218, n. 1, p. 35-40, 1987.

HITT, R; LOPEZ-POUSA, A; MARTÍNEZ-TRUFERO, J; ESCRIG, V; CARLES, J; RIZO, A. et. al. Phase III Study Comparing Cisplatin Plus Fluorouracil to Paclitaxel, Cisplatin, and Fluorouracil Induction Chemotherapy Followed by Chemoradiotherapy in Locally Advanced Head and Neck Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, Alexandria, v.23, n.34, p. 8636-8645, 2005.

HOLMAN, R.T. The slow discovery os the importance of W3 essencial fatty acids in human health. **Journal of Nutrition**, Rockville, v.128, n.2, p. 427-433, 1998.

IAGHER, F; BELO, S.R.B; SOUZA, W.M; NUNES, J.R; NALIWAIKO, K; SASSAKI,G. et al. Antitumor and anti-cachectic effects of shark liver oil and fish oil: comparison between independent or associative chronic supplementation in Walker 256 tumor-bearing rats. **Lipids in Health and Disease**, London, v. 12, p. 146, 2013.

IANNITTI, T.; PALMIERI, B. An Update on the Therapeutic Role of Alkylglycerols. **Mar. Drugs**, Basel, v. 8, n.8, p. 2267-2300, 2010.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Estimativas 2016: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, INCA, 2015. Encontrado em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>>. Acesso em: 08/03/2017.

INCA-A. Instituto Nacional do Câncer. Estadiamento. Rio de Janeiro, INCA 2017. Encontrado em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=54>. Acesso em 19/01/2017.

INCA-B. Instituto Nacional do Câncer. Tratamentos do câncer. Rio de Janeiro, INCA 2017. Encontrado em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/tratamento>>. Acesso em: 08/03/2017.

INCA-C. Instituto Nacional do Câncer. Quimioterapia. Rio de Janeiro, INCA 2017. Encontrado em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=101>. Acesso em: 19/01/2017

INCA-D. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa. Rio de Janeiro, INCA, 2017. Encontrado em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/index.asp?ID=2>>. Acesso em: 01/06/2017.

JEURINK, P.V; VISSERS, Y.M; RAPPARD, B; SAVELKOUL, H.F. T cell responses in fresh and cryopreserved peripheral blood mononuclear cells: kinetics of cell viability, cellular subsets, proliferation, and cytokine production. **Cryobiology**., Amsterdam, v.57, n.2, p.91-103, 2008.

KARSTEN, S.; SCHAFFER, G.; SCHAUDER, P. Cytokine production and DNA synthesis by human peripheral lymphocytes in response to palmitic, stearic, oleic, and linoleic acid. **J. Cell. Physiol**, Hoboken, v. 161, n.1, p. 15-22, 1994.

KELLY, J.P.; PARKER, C.W. Effects of arachidonic acid and other unsaturated fatty acids on mitogenesis in human lymphocytes. **J. Immunol**, Washington, v.122, n.4, p. 1556-1562, 1979.

KROTKIEWSKI, M.; PRZYBYSZEWSKA, M. JANIK, P. Cytostatic and cytotoxic effects of alkylglycerols (Ecomer). **Med Sci Monit**, New York, v. 9, n. 11, p. 131-135, 2003.

LATHAM, P. LUND, E.K; JOHNSON, I.T. Dietary n-3 PUFA increases the apoptotic response to 12-di-methylhydrazine reduces mitosis and suppresses the induction of carcinogenesis in the rat colon. **Carcinogenesis**, Oxford, v.20, n.4, p.645-650, 1999.

LE BLANC K. ; SAMULSSON, J.; BROHULT, J. BERG, A. ; PALMBLAD, J. 1-OHexadecyl-2-methoxy-glycer-3-phosphatidylcholine – A methoxy ether lipid inhibiting platelet activating factor-induced platelet aggregation and neutrophil oxidative

metabolism. **Biochemichal Pharmacology**, Amsterdam, v. 49, n.11, p. 1577-1582, 1995.

LEWKOWICZ, P.; BANASIK, M.; GLOWACKA, E.; LEWKOWICZ, N.; TCHORZEWSKI, H. Effect of high doses of shark liver oil supplementation on T cell polarization and peripheral blood polymorphonuclear cell function. **Pol Merkuriusz Lek**, Warszawa, v. 18, n. 108, p. 686-692, 2005.

LORENZI, T.F. **Manual de hematologia: propedêutica e clínica**. 4° ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

LUIS, D.A; IZAOLA, O; CUELLAR, L; TERROBA, MC; DE LA FUENTE, B; CABEZAS, G. Um ensaio clínico randomizado com duas doses de uma fórmula melhorada de ácidos graxos ômega 3 e arginina em parâmetros clínicos e bioquímicos de pacientes ambulatoriais de câncer de cabeça e pescoço. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, Roma , v.17, n.8, p. 1090-1094, 2013.

MA, D.W.L.; SEO, J.; SWITZER, K.C.; FAN, Y.; McMURRAY, D.; LUPTON, J.;CHAPKIN, R.S. N-3 PUFA and membrane microdomains: a new frontier in bioactive lipid research. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Amsterdam, v. 15, p. 700-706, 2004.

MACDONALD, J.S; SMALLEY, S.R; BENEDETTI, J; HUNDAHL, S.A; ESTES, N.C; STEMMERMANN, G.N; et.al. Chemoradiotherapy after surgery compared with surgery alone for adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction. **N Engl J Med**, Waltham, v. 345, n. 10, p. 725-730, 2001.

MAIA, V.R. Assistência de quimioterapia antineoplásica no tratamento de hemopatias malignas. 2010. Encontrado em:<<http://www.hemorio.rj.gov.br/html/pdf/ccih.pdf>>. Acesso em: 19/01/2017.

MARIGNY, K.; PEDRONO, F.; MARTIN-CHOULY, C.A.E.; YOUMINE, H.; SAIAG, B.;LEGRAND, A.B. Modulation of endothelial permeability by 1-O-alkylglycerols. **ActaPhsiologica Scandinavica**, New Jersey, v. 176, n. 4, p. 263, 2002.

MARTINS DE LIMA, T.; GORJAO, R.; HATANAKA, E.; CURY-BOAVENTURA, M.F.; PORTIOLI SILVA, E.P.; PROCOPIO, J.; CURI, R. Mechanisms by which fatty acids regulate leucocyte function. **Clinical Science**, v. 133, p. 65-77, 2007.

MARTÍNEZ, A. C.; ALVAREZ-MON, M. O sistema imunológico (I): Conceitos gerais, adaptação ao exercício físico e implicações clínicas. **Rev Bras Med Esporte**, São Paulo, v. 5, n. 3, p. 120 - 125, 1999.

MARWICK, C. Natural compounds show antiangiogenic activity. **Journal of the National Cancer Institute**, Oxford, v. 93, n. 22, p. 1685, 2001.

MEDZHITOV, R. JANEWAY, C.JR. Innate Immunity. **N. Engl. J. Med**, Waltham, v.343, p.338-344, 2000.

MONK, J.M; HOU, T.Y; TURK, H.F; MCMURRAY, D.N; CHAPKIN, R.S. n3 PUFAs reduce mouse CD4+ T-cell ex vivo polarization into Th17 cells. **J Nutr.** Rockville, v.143, n.9, p.1501-1508, 2013.

MOREIRA, M.E.C; BARCINSKI, M.A. Apoptotic cell and phagocyte interplay: recognition and consequences in different cell systems. **An. Acad. Bras. Ciênc**, Rio de Janeiro, v.76, n.1, p. 93-115, 2004.

MUKARO, V.R; COSTABILE, M; MURPHY, K.J; HII, C.S; HOWE; P.R; FERRANTE, U. Números leucocitários e função em indivíduos que comem alimentos n-3 enriquecidos: depressão seletiva dos níveis naturais de células assassinas. **Artrite Res Ther**, London , v.10, n.3, p.1-11, 2008.

MYERS, CE; DIASIO, RB; ELIOTT, HM; CHABNER, BA. Pharmacokinetics of the fluoropyridines: Implications for their clinical use. **Cancer Treatment Reviews**, Amsterdam, v.3, n.3, p. 175–183, 1976.

NATHAN, C. F. Mechanisms of macrophage antimicrobial activity. **Trans Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 77, n.5, p. 620-630, 1983.

NIGRO, N.D; SEYDEL, H.G; CONSIDINE, B; VAITKEVICIUS, V.K; LEICHMAN, L; KINZIE, J.J. Combined preoperative radiation and chemotherapy for squamous cell carcinoma of the anal canal. **Cancer**, Hoboken, v. 51, n. 10, p.1826-1829, 2006.

NISHIYAMA – NARUKE, A.; SOUZA, J. A.; CARNELLÓS, M.; CURI, R. HPLC Determination of underivatized fatty acids saponified at 37° C analysis of fatty acids in oils and tissues. **Analytical Letters**, San Francisco, v. 31, n. 14, p. 2565-2576, 1998.

NOWICKI, R.; BARANSKA-RYBAK, W. Shark liver oil as a supporting therapy in atopic dermatitis. **Pol Merkur Lekarski**, Rockville, v. 22, n. 130, p. 312-313, 2007.

OH, SY; JADHAV, LS. Effects of dietary alkylglycerols in lactating rats on immune responses in pups. **Pediatr Res**, London, v.36, n.3, p. 300-305, 1994.

OMS-a: 14 milhões de pessoas têm câncer no mundo. 2013. Disponível em:< http://www.bbc.com/portuguese/noticias/2013/12/131212_cancer_oms_levantamento_lgb>. Acesso em: 31;08;2017

OMS-b: Câncer mata 8,8 milhões de pessoas anualmente no mundo; Disponível em:< <https://nacoesunidas.org/oms-cancer-mata-88-milhoes-de-pessoas-anualmente-no-mundo/>>. Acesso em: 31;08;2017.

PALACIOS, R. Concanavalin A triggers T lymphocytes by directly interacting with their receptors for activation. **J Immunol.**, Rockville, v.128, n.1, p.337-342, 1982.

PALMBLAD, J.; SAMUELSSON, J.; BROHULT, J. Interactions between alkylglycerols and human neutrophil granulocytes. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, London, v. 50, n.4, p. 363-370, 1990.

PALMIERI, B.; PENNELLI, A.; CERBO, A. D. Jurassic surgery and immunity enhancement by alkylglycerols of shark liver oil. **Lipids in Health and Disease**, London, v. 13, p. 178, 2014.

PEDRONO, F.; KHAN, N.A.; LEGRAND, A.B. Regulation of calcium signalling by 1-Oalkylglycerols in human Jurkat T lymphocytes. **Life Sciences**, Amsterdam, v. 74, p. 2793-2801, 2004.

PINZÓN, O.A; SÁNCHEZ, J.C; SEPÚLVEDA-ARIAS, J.C; LÓPEZ-ZAPATA, D.F. Assessment of human lymphocyte proliferation associated with metabolic syndrome. **J Endocrinol Invest.**, Amsterdam, v.38, n.12, p. 1277-1282, 2015.

PRESCOTT, S.M.; STENSON, W.F. Fish oil fix. **Nature Medicine**, London, v. 11, n. 6, p. 596- 598, 2005.

PRITCHARD, K.I; PATERSON, A.H; FINE, S; PAUL, N.A; ZEE, B; SHEPHERD, L.E. et. al. Randomized trial of cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil chemotherapy added to tamoxifen as adjuvant therapy in postmenopausal women with node-positive estrogen and/or progesterone receptor-positive breast cancer: a report of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Breast Cancer Site Group. **Journal of Clinical Oncology**, Alexandria, v. 15, n. 6, p. 2302-2311, 1997.

PUGLIESE, P. T.; JORDAN, K.; CEDERBERG, H.; BROHULT, J. Some biological actions of alkylglycerols from shark liver oil. **Journal Alternative Complement Medicine**, New Rochelle, v.4, n.1, p.87-99, 1998.

PURASIRI, P; MCKECHNIE, A; HEYS, S.D; EREMIN, O. Modulation in vitro of human natural cytotoxicity, lymphocyte proliferative response to mitogens and cytokine production by essential fatty acids. **Immunology**, Washington, v.92, n.2, p.166-172, 1997.

QIAN, L, ZHANG, M; WU, S; ZHONG, Y; VAN TOL, E; CAI, W. et al. Alkylglycerols Modulate the Proliferation and Differentiation of Non-Specific Agonist and Specific Antigen-Stimulated Splenic Lymphocytes. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 4, p.1-9 2014.

RANGEL-HUERTA, O.D; AGUILERA, C.M; MESA, M.D; GIL, A. Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids supplementation on inflammatory biomarkers: a systematic review of randomised clinical trials. **Br J Nutr.**, Cambridge, v.107, n.2, p.157-170,. 2012.

RAO, C.V; SIMI, B; WYNN, T.T; GARR, K; REDDY, B. Modulating effect of amount and types of dietary fat on colonic mucosal phospholipase A2 phosphatidylinositol-

specific phospholipase C activities and cyclooxygenase metabolite formation during different stages of colon promotion in male F344 rats, **Cancer Res**, Philadelphia, v.56, n.3, p.532-537, 1996.

REICHWALD, I; MANGOLD, H.K. Assessment of the specificity of enzymatic Reactions using mixed substrates: incorporation of alkylglycerols in the ionic alkoxylipids of rat intestinal mucosa. **Nutrition and Metabolism**, London, v. 21, n.1, p. 198-201, 1977.

ROBINSON, L.E.; FIELD, C.J. Dietary long chain (N-3) fatty acids facilitate immune cell activation in sedentary, but not exercise trained rats. **J. Nutri**, Rockville, v.128, n.3, p.498-504, 1998.

ROSE, D.P. Effects of dietary fatty acids on breast and prostate cancer: evidence from in vitro experiments and animal studies. **Am. J. Clin. Nutr**, Rockville, v.66, n.6, p.1513-1522, 1997.

ROSE, D.P.; CONNOLLY, J.M. Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 83, p. 217-244, 1999.

SCHEINICHEN, D. JANKOWSKI, M.; RUSCHULTE, H.; JÜTTNER, B.; KLEINE, H.D.; MEYER ZU VILSENDORF, A. PIEPENBROCK, S.; HEINE, J. Lack of influence of ω -3 fatty acid-enriched lipids on apoptosis and secondary necrosis of cultured human lymphocytes. **Nutrition**, London, v. 19, n.5, p. 441-445, 2003.

SCHLEY, P.D; JIJON, H.B; ROBINSON, L.E; FIELD, C.J. Mechanisms of omega-3 fatty acid-induced growth inhibition in MDA-MB-231 human breast cancer cells. **Breast Cancer Res Treat.**, London, v.92, n.2, p.187-195, 2005.

SHAIKH, S.R; JOLLY, C.A; CHAPKIN, R.S. n-3 Polyunsaturated fatty acids exert immunomodulatory effects on lymphocytes by targeting plasma membrane molecular organization. **Mol Aspects Med**, Amsterdam, v. 33, n.1, p. 46-54, 2012.

SHIROTA, T; HAJI, S; YAMASAKI, M; IWASAKI, T; HIDAKA, T; TAKEYAMA, Y. et al. Apoptosis in human pancreatic cancer cells induced by eicosapentaenoic acid. **Nutrition**, Amsterdam, v.21, n.10, p.1010-1017, 2005.

SIGMA-ALDRICH. Product information concanavalin A from canavalia ensiformis (Jack Bean) cell culture tested, 2012. Disponível em:<<https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Datasheet/3/c5275dat.pdf>>. Acesso em: 12/06/2017.

SIGMA-ALDRICH-MERCK. Fetal Bovine Serum. Disponível em:<<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-culture/cell-culture-products.html?TablePage=9628642>>. Acesso em: 14/06/2017.

SINGER, P.; SHAPIRO, H.; THEILLA, M. ANBAR, R.; SINGER, J.; COHEN, J. Antiinflammatory properties of omega-3 fatty acids in critical illness: novel

mechanisms and an integrative perspective. **Intensive Care Med.**, London, v. 34, n. 9, p. 1580-1592, 2008.

SIMOPOULOS, A.P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. **Biomed Pharmacother**, Amsterdam, v. 56, n.8, p. 365-379, 2002.

SKULAS-RAY, A.C; KRIS-ETHERTON, P.M.; HARRIS, W.S; VANDEN HEUVEL, J.P; WAGNER, P.R; WEST, S.G. Dose-response effects of omega-3 fatty acids on triglycerides, inflammation, and endothelial function in healthy persons with moderate hypertriglyceridemia. **Am J Clin Nutr.**, Rockville, v.93, n.2, p, 243-252, 2011.

SMALLEY, R.V; CARPENTER, J; BARTOLUCCI, A; VOGEL, C; KRAUSS, S. A comparison of cyclophosphamide, adriamycin, 5-fluorouracil (caf) and cyclophosphamide, methotrexate, 5- fluorouracil, vincristine, prednisone (cmfvp) in patients with metastatic breast cancer. **Cancer**, Hoboken,v. 40, n. 2, p.625-632, 2006.

SNYDER, F.; WOOD, R. Alkyl and alk-1-enyl ethers of glycerol in lipids from normal and neoplastic human tissues. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 29, n.1, p. 251-257, 1969.

SO, W.W; LIU, W.N; LEUNG, K.N. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Trigger Cell Cycle Arrest and Induce Apoptosis in Human Neuroblastoma LA-N-1 Cells. **Nutrients**, Basel, n.7, p. 6956-6973, 2015.

SPIEKER-POLET, H.; POLET, H. Requirement of a combination of a saturated and an unsaturated free fatty acid and a fatty acid carrier protein for in vitro growth of lymphocytes. **The Journal of Immunology**, Washington, v.126, n.3, p. 494-954, 1981.

THIES, F; NEBE-VON-CARON, G; POWELL,J.R; YAQOOB, P; NEWSHOLME, E.A; CALDER, P.C. Dietary supplementation with gamma-linolenic acid or fish oil decreases T lymphocyte proliferation in healthy older humans. **J Nutr.**, Rockville, v.131, n.7, P.1918-1927, 2001.

TIERNEY, A.C; MCMONAGLE, J; SHAW DI; GULSETH HL, et al. Effects of dietary fat modification on insulin sensitivity and on other risk factors of the metabolic syndrome--LIPGENE: a European randomized dietary intervention study. **Int J Obes**, London, v.85, p.800-809, 2011.

TOHYAMA, N; TANAKA, S; ONDA, K; SUGIYAMA, K; HIRANO, T. Influence of anticancer agents on cell survival, proliferation, and CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cell-frequency in human peripheral-blood mononuclear cells activated by T cell-mitogen. **Int Immunopharmacol**, Amsterdam, v. 15, n.1, p.160-166, 2013.

VAN CUTSEM, E; MOISEYENKO, V.M; TJULANDIN, S; MAJLIS, A; CONSTENLA, M; BONI, C; et. al. Phase III study of docetaxel and cisplatin plus fluorouracil compared with cisplatin and fluorouracil as first-line therapy for advanced

gastric cancer: a report of the V325 Study Group. **J Clin Oncol.**, Alexandria, v. 24. n. 31, p. 4991-4997, 2006.

VITORINO, D.C; BUZZACHERA, C.F; CURI, R; FERNANDES, L.C. Effect of chronic supplementation with shark liver oil on immune responses of exercise-trained rats. **Eur J Appl Physiol.**, v.108, n.6, p.1225-1232, 2010.

WATANABE, S; SAKAI, N; YASUI, Y; KIMURA, Y; KOBAYASHI, T; MIZUTANI, T; OKUYAMA, H. A high alpha linolenate diet supresses antigen-induced immunoglobulin E response and anaphylactic shock in mice. **J. nutr**, Rockville, v.124, n.9, p.1566-1573, 1994.

WEISS, A.; CAMBIER, J.C. Lymphocyte activation. **Current Opinion in Immunology**, Amsterdam, v. 16, p. 285-287, 2004.

WOUTERSEN, R.A; APPLE, M.J; GARDEREN-HOETMER, A;WIJNANDS, M.V.W. Dietary fat and carcinogenesis. **Mutat. Res**, Amsterdam, v.443, n.1-2, p.111,127, 1999.

XIN, W; WEI, W; LI, X. Efeitos da suplementação de óleo de peixe em marcadores inflamatórios na insuficiência cardíaca crônica: uma meta-análise de ensaios clínicos randomizados. **BMC Cardiovasc Disord**, London, v.12, p. 77, 2012.

XUE, H; LE ROY, S; SAWYER, M.B; FIELD, C.J; DIELEMAN, L.A; BARACOS, V.E. Single and combined supplementation of glutamine and *n*-3 polyunsaturated fatty acids on host tolerance and tumour response to 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]carbonyloxy-camptothecin (CPT-11)/5-fluorouracil chemotherapy in rats bearing Ward colon tumour. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.102, n.3, p. 434-442, 2009.

YAMAMOTO, N; NGWENGA, B.Z. Activation of Mouse Peritoneal Macrophages by Lysophospholipids and Ether Derivatives of Neutral Lipids and Phospholipids. **Cancer research**, Philadelphia, v. 47, n.8, p. 2008-2013, 1987.

ZITVOGEL, L.; APETOH, L.; GHIRINGHELLI, F.; KROEMER, G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 8, p. 59-73, 2008.