

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ADRIANA AYA YAMAGUCHI

ÁCIDO GRAXO α -LINOLÊNICO E SEUS METABÓLITOS, ÁCIDOS
EICOSAPENTAENÓICO (EPA) E DOCOSAHEXAENÓICO (DHA), EM CÉLULAS
DO TUMOR DE WALKER 256. HÁ EQUIVALÊNCIA NAS SUAS AÇÕES?

CURITIBA

2012

ADRIANA AYA YAMAGUCHI

ÁCIDO GRAXO α -LINOLÊNICO E SEUS METABÓLITOS, ÁCIDOS
EICOSAPENTAENÓICO (EPA) E DOCOSAHEXAENÓICO (DHA), EM CÉLULAS
DO TUMOR DE WALKER 256. HÁ EQUIVALÊNCIA NAS SUAS AÇÕES?

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Fisiologia, Departamento de Fisiologia, Setor de
Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná,
como parte das exigências para a obtenção do título de
Mestre em Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Fernandes.

CURITIBA

2012

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Yamaguchi, Adriana Aya

Ácido graxo α -linolênico e seus metabólitos, ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), em células do tumor de Walker 256. Há equivalência nas suas ações? / Adriana Aya Yamaguchi. – Curitiba, 2012.

69 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Luiz Claudio Fernandes

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

1. Cancer 2. Oleo de peixe I. Título II. Fernandes, Luiz Claudio III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

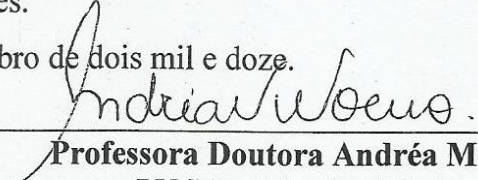
CDD (20. ed.) 616.994




Ata da defesa de dissertação de mestrado de ADRIANA AYA YAMAGUCHI

Aos vinte e oito dias do mês de setembro do ano de dois mil e doze, foi realizada no Anfiteatro 10 do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, a defesa de dissertação da mestranda **Adriana Aya Yamaguchi**, intitulada “**ÁCIDO GRAXO α -LINOLÊNICO E SEUS METABÓLICOS, ÁCIDOS EICOSAPENTAENÓICO (EPA) E DOCOSAHEXAENÓICO (DHA), EM CÉLULAS DO TUMOR DE WALKER 256. HÁ EQUIVALÊNCIA NAS SUAS AÇÕES?**”. A abertura teve início às 09h00min pelo Presidente da Banca Examinadora e Orientador da candidata, Professor Doutor Luiz Cláudio Fernandes. O Presidente apresentou ao público presente os membros da banca examinadora e logo passou a palavra à aluna, para que fizesse uma apresentação sucinta de sua dissertação. Após a explanação oral, o Professor Doutor Luiz Cláudio Fernandes passou à palavra ao primeiro examinador, Professora Doutora Andréa Moreno do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da PUC-Pr. Na sequência, passou a palavra ao segundo examinador, Professor Doutor Sandro José Ribeiro Bonatto do Departamento de Biologia Celular e Molecular do IPPP. A aluna respondeu as perguntas dos examinadores e se posicionou frente às críticas. Findas as arguições pelos demais membros da banca, o Presidente, Professor Doutor Luiz Cláudio Fernandes fez uma rápida apreciação das conclusões mais importantes dos debates realizados e comunicou que a Banca Examinadora iria reunir-se em sessão secreta para discussão e atribuição dos conceitos. Os trabalhos foram interrompidos por cinco minutos. Após haver analisado o referido trabalho e argüido a candidata, os membros da banca examinadora reunidos em sessão secreta deliberaram pela “APROVAÇÃO”, habilitando-a ao título de Mestre em Fisiologia, condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Art. 59º do Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação. Eu, Luiz Cláudio Fernandes, Presidente da Banca Examinadora lavrei a presente ata, a qual assino juntamente com os senhores examinadores.

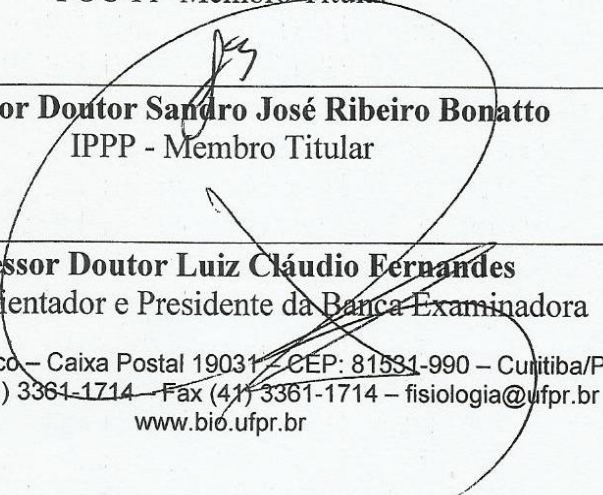
Curitiba, 28 de setembro de dois mil e doze.



Professora Doutora Andréa Moreno
PUC-Pr- Membro Titular



Professor Doutor Sandro José Ribeiro Bonatto
IPPP - Membro Titular



Professor Doutor Luiz Cláudio Fernandes
UFPR - Orientador e Presidente da Banca Examinadora

AGRADECIMENTOS

A toda a minha família, principalmente mamãe, papai e Juju. Sem o apoio de vocês não teria chegado até aqui. Amor incondicional!

Ao “chefe” Prof. Luiz pela dedicação e paciência. Agradeço a confiança por me abrir as portas do Laboratório e dar a oportunidade de fazer parte desta “família”. Gratidão de quem lhe admira.

Ao Prof. Silvio Zanata e ao pessoal do seu laboratório pela gentileza em permitir a utilização de seus equipamentos.

Ao Everson por me apresentar ao LabMetab. Se não fosse teu incentivo não saberia como é bom fazer parte desse grupo.

Ao Sandro, pela enorme paciência, cumplicidade e apoio.

Às sempre presentes: Gina, Júlia, Dani e Isa e aos meninos: Gleisson e Rica. Esse trabalho também é de vocês!

Minha amizade e gratidão aos amigos: Dalton, Juliano, Ricelli, Raci, Katya, Marcelo, Cintia, Thiago, Rica Chairs, Aldre, Ana Lúcia e Dalva. Obrigada por toda a ajuda em experimentos e, principalmente, pelo ótimo ambiente de convívio.

Aos amigos que indiretamente participaram deste trabalho: Taísa, Val, Fer Nunes, Fer Monego, Glau, Pri, Dre, Ju, Fabi, Clau e Lari. O apoio de vocês foi fundamental!

Aos meus amigos, pelo apoio e compreensão em todos os momentos ausentes.

Aos estagiários Benito e Anna Júlia pela disposição e auxílio.

À Loli pela sempre gentileza em ajudar.

Ao Prof. Ricardo Fernandez Perez.

Aos funcionários do biotério pelo auxílio com os animais.

Ao Miguel Baltazar pela gentil doação do *oro inka* e à Fundação Herbarium pela doação das cápsulas de peixe.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

*Na verdade, sabe-se somente quando se sabe pouco;
com o saber cresce a dúvida.*

Goethe

RESUMO

Alterações no padrão da alimentação caracterizadas pelo aumento do consumo de gorduras saturadas e *trans* e ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) n-6 em detrimento à redução do consumo de AGPI n-3 estão relacionadas ao aumento na incidência de doenças crônicas degenerativas, como o câncer. O consumo de AGPI n-3 é associado a benefícios contra esta doença por promover efeitos antitumorais, antiproliferativos e imunomoduladores. Estudos *in vivo* demonstraram que tanto o parental ácido α -linolênico (ALA) quanto seus metabólitos ácidos eicosapentaenóico e docosahexaenóico (EPA e DHA), são capazes de promover os benefícios relatados contra esta doença. Neste caso, o ALA sofre metabolização e é convertido em EPA e DHA não sendo possível distinguir se os efeitos são decorrentes do ácido graxo precursor ou de seus metabólitos. Assim, para elucidar essa questão, a realização de experimentos *in vitro* é ideal na abordagem deste tema. Este estudo investigou a proliferação e morte celular *in vitro* de células ascíticas obtidas do tumor de Walker 256 na presença do complexado de óleo de peixe à BSA, rico em EPA e DHA, e do complexado *oro inka* à BSA, rico em ALA, e do soro de animais. As células tumorais foram cultivadas em meio de cultura RPMI-1640 (Meio), na presença do veículo, albumina sérica bovina 2% (BSA), do óleo de peixe complexado à BSA (OP-BSA), do *oro inka* complexado à BSA (OI-BSA) ou do soro de animais controle (Soro C), portadores de tumor (Soro Ctw) e suplementados com óleo de peixe (Soro OP) e *oro inka* (Soro OI). A proliferação celular foi analisada pela incorporação de [2-¹⁴C]-timidina em DNA; apoptose por citometria de fluxo; expressão de proteína Bcl-2, envolvida na sinalização de morte, por western blotting. A presença do OI-BSA não reduziu a proliferação das células tumorais, com exceção para diluição 1:5, com singela redução; enquanto nos grupos OP-BSA vs. Meio, BSA e OI-BSA houve significativa redução da proliferação. As células cultivadas na presença de soro de animais suplementados com óleo de peixe e *oro inka* não sofreram alteração na proliferação celular quando comparadas à Meio, BSA e Soro C, e somente a presença do Soro Ctw foi capaz de aumentar a proliferação destas células, comparada à dos demais grupos. As células cultivadas na presença de OI-BSA vs. Meio e BSA não apresentaram modificações na apoptose, e esta sofreu incremento significativo nos grupos OP-BSA vs. Meio, BSA e OI-BSA. A expressão de Bcl-2 foi reduzida para OP-BSA vs. Meio, BSA e OI-BSA, mas a presença de OI-BSA não foi capaz de modificar a expressão desta proteína. O complexado *oro inka* não foi capaz de produzir os efeitos anti-proliferativo e pró-apoptótico *in vitro* em células, do tumor de Walker 256, e estes efeitos foram observados no complexado OP-BSA.

Palavras-chave: câncer, AGPI n-3, óleo de peixe, *oro inka*, ácido α -linolênico.

ABSTRACT

Changes in the diet such as increased consumption of saturated and trans fatty acid and n-6 polyunsaturated fatty acid (PUFA) along with reduction of n-3 PUFA have been associated with high incidence of chronic disease, such as cancer. Consumption of n-3 PUFA have been associated with benefits against such disease due to antitumoral, antiproliferative and immunomodulation effects. Studies, *in vivo*, showed that both n-3 PUFA, the precursor, α -linolenic fatty acid (ALA), and their metabolites, eicosapentaenoic and docosahexaenoic fatty acids (EPA and DHA), are capable of to provoke these effects. In this case, ALA is metabolized and converted into EPA and DHA. Thus it is hard to distinguish whether the effects are due to the fatty acid precursor or its metabolites. *In vitro* experiments are a good approach to answer this issue. This study aimed to investigate *in vitro* cell proliferation and cell death in Walker 256 tumor ascitic cells in the presence of fish oil-BSA complex, rich in EPA and DHA, or *oro inka*-BSA complex, rich in ALA, and animal's serum. Tumor cells were seeded in RPMI-1640 culture medium (Medium), in the presence of bovine seric albumin 2% (BSA), fish oil-BSA complex (FO-BSA), *oro inka*-BSA complex (OI-BSA) or serum from control animals (Serum C), tumor-bearing animals (Serum Ct), animals supplemented with fish oil (Serum FO) or *oro inka* oil (Serum OI). The following assays were performed: cell proliferation by [2-¹⁴C]-thymidine incorporation into DNA, apoptosis by flow cytometry and expression of cell death-associated Bcl-2 protein by western blotting. The presence of OI-BSA did not reduce cell proliferation, with exception of 1:5 dilution, which lead to a small reduction in the proliferation. In OP-BSA group vs. Medium, BSA and OI-BSA there was a significant reduction in cell proliferation. Furthermore cell proliferation from tumor cells in the presence of serum obtained from rats supplemented with fish oil or *oro inka* did not change when compared to Medium, BSA and Serum C. On the other hand Serum from Ct was able to increase cell proliferation when compared to the other groups. Apoptosis did not change by presence of OI-BSA vs. Medium and BSA but was markedly increased by the OP-BSA group ($p < 0.0r$ vs. Medium, BSA and OI-BSA). In the OP-BSA group there was a reduction of Bcl-2 expression ($p < 0.05$ vs. Medium, BSA and OI-BSA), but in the presence of OI-BSA there was no change in the Bcl-2 expression. The *oro inka*-BSA complex was not able to promote antiproliferative and proapoptotic effects. The findings here demonstrate that they indeed occur in the presence of OP-BSA.

Key words: cancer, n-3 PUFA, fish oil, *oro inka*, α -linolenic fatty acid.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA1 – METABOLIZAÇÃO DOS AGPI n-6 e n-3.....	18
FIGURA 2 - PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS TUMORAIS (CPM), CULTIVADAS DURANTE 24 HORAS NA AUSÊNCIA (MEIO OU BSA) OU PRESENÇA DOS COMPLEXOS OP-BSA OU OI-BSA.....	41
FIGURA 3 - PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS TUMORAIS (CPM), CULTIVADAS DURANTE 48 HORAS NA AUSÊNCIA (MEIO OU BSA) OU PRESENÇA DOS SOROS DOS ANIMAIS	42
FIGURA 4 - GRÁFICO DE <i>DENSITY PLOT</i> MOSTRANDO A INCORPORAÇÃO DE ANEXINA V E/OU 7AAD PELAS CÉLULAS TUMORAIS CULTIVADAS NA PRESENÇA DE MEIO DE CULTURA (MEIO).	48
FIGURA 5 - GRÁFICO DE <i>DENSITY PLOT</i> MOSTRANDO A INCORPORAÇÃO DE ANEXINA V E/OU 7AAD PELAS CÉLULAS TUMORAIS CULTIVADAS NA PRESENÇA DE ALBUMINA BOVINA SÉRICA (BSA).	48
FIGURA 6 - GRÁFICO DE <i>DENSITY PLOT</i> MOSTRANDO A INCORPORAÇÃO DE ANEXINA V E/OU 7AAD PELAS CÉLULAS TUMORAIS CULTIVADAS NA PRESENÇA DE OP-BSA NA PROPORÇÃO DE 1:8 (OP 1:8).....	49
FIGURA 7 - GRÁFICO DE <i>DENSITY PLOT</i> MOSTRANDO A INCORPORAÇÃO DE ANEXINA V E/OU 7AAD PELAS CÉLULAS TUMORAIS CULTIVADAS NA PRESENÇA DE OI-BSA NA PROPORÇÃO DE 1:8 (OI 1:8).	49
FIGURA 8 - PORCENTAGEM DE CÉLULAS TUMORAIS MARCADAS COM ANEXINA V E 7-AAD, CULTIVADAS DURANTE 24 HORAS NA AUSÊNCIA (MEIO E BSA) OU PRESENÇA DOS COMPLEXOS OP E OI-BSA.....	50
FIGURA 9 - EXPRESSÃO DA PROTEÍNA BCL-2 EM CÉLULAS TUMORAIS CULTIVADAS DURANTE 24 HORAS NA AUSÊNCIA (MEIO E BSA) OU PRESENÇA DOS COMPLEXOS OP E OI-BSA NA PROPORÇÃO DE 1:8.....	51

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS (g/100g DE ÁCIDOS GRAXOS TOTAIS), OBTIDO POR HPLC (HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY) DAS CÁPSULAS DE ÓLEO DE PEIXE, ORO INKA E DA RAÇÃO ADMINISTRADA AOS ANIMAIS.	29
TABELA 2 - PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS (g/100g DE ÁCIDOS GRAXOS TOTAIS), OBTIDO POR HPLC (<i>HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY</i>) DAS CÁPSULAS DE ÓLEO DE PEIXE.	30
TABELA 3 - PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS (g/100g DE ÁCIDOS GRAXOS TOTAIS), OBTIDO POR HPLC (<i>HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY</i>) DO MEIO, BSA, COMPLEXOS OP E OI-BSA..	43
TABELA 4 – PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS INSATURADOS (g/100g DE ÁCIDOS GRAXOS TOTAIS), OBTIDO POR HPLC (<i>HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY</i>) DO SORO DOS ANIMAIS.	46

LISTA DE SIGLAS

AA	Ácido araquidônico
AGPI	Ácido graxo poliinsaturado
ALA	Ácido α -linolênico
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma</i>
BSA	Albumina bovina sérica
C	Controle
Ctw	Controle portador de tumor
COX	Ciclooxigenase
DHA	Ácido docosahexaenóico
EPA	Ácido eicosapentaenóico
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorter</i>
FITC	Fluorocromo fluoresceína isotiocianato
HETE	Ácidos hidroxeicosatetraenóicos
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
I κ B	<i>Inhibitor of kappa B</i>
IL-1	Interleucina-1
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-6	Interleucina-6
LA	Ácido linoléico
LOX	Lipooxigenase
LT	Leucotrieno
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
NF- κ B	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
n-3	Ômega-3
n-6	Ômega-6
n-7	Ômega-7
n-9	Ômega-9
OI	<i>Oro inka</i>

OI-BSA	<i>Oro inka</i> complexado à BSA
OP	Óleo de peixe
OP-BSA	Óleo de peixe complexado à BSA
PBS	Tampão fosfato salina
PG	Prostaglandina
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PPAR- γ	<i>Peroxisome proliferator activated receptor</i>
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
TBST	Tampão TRIS-salina contendo 0,05% de tween-20
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral α
TX	Tromboxano
TXA ₂	Tromboxano A ₂
7-AAD	<i>7-amino-actinomycin D</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 CÂNCER	15
1.2 ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS	17
1.3 ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS E CÂNCER	20
2 JUSTIFICATIVA	25
3 OBJETIVOS	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 ANIMAIS	28
4.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL	28
4.3 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DA RAÇÃO, ÓLEO DE PEIXE E <i>ORO INKA</i>	29
4.4 COMPLEXO ÓLEOS-ALBUMINA	31
4.5 TUMOR DE WALKER 256	31
4.6 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS DO TUMOR DE WALKER 256	32
4.7 COLETA E SEPARAÇÃO DAS CÉLULAS	32
4.8 PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS	33
4.9 APOPTOSE DE CÉLULAS TUMORAIS POR CITOMETRIA DE FLUXO	33
4.10 IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOTTING	34
4.11 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)	37
4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
5 RESULTADOS	40
5.1 CAPACIDADE PROLIFERATIVA DAS CÉLULAS TUMORAIS	40
5.2 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS NOS COMPLEXOS ÓLEOS-BSA E SORO DOS ANIMAIS	42
5.3 APOPTOSE DAS CÉLULAS TUMORAIS	47
5.4 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA Bcl-2	50
6 DISCUSSÃO	52
7 CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS	61
ANEXOS	67

1 INTRODUÇÃO

A interação entre fatores genéticos e ambientais são a base para a manutenção de bom estado de saúde ou para o desenvolvimento de doenças no indivíduo. Nos últimos anos, técnicas avançadas de biologia molecular permitiram evidenciar que fatores genéticos podem determinar a susceptibilidade de indivíduos a determinadas doenças, e que, associados a fatores ambientais podem estar envolvidos no desenvolvimento de patologias. Entre os fatores ambientais, um em destaque é a nutrição. Evidências demonstram a influência do padrão de alimentação no desenvolvimento e prevenção de doenças (SIMOPOULOS, 2008).

Ao longo dos anos, enquanto o padrão genético da população se manteve praticamente inalterado, a dieta sofreu inúmeras modificações, principalmente no consumo de ácidos graxos essenciais e antioxidantes. O ambiente nutricional em que vivemos, atualmente, é muito diferente daquele para o qual a nossa constituição genética foi selecionada. Sugere-se que estas modificações na alimentação podem estar envolvidas com o aumento da taxa de incidência de doenças crônico-degenerativas como a arteriosclerose, hipertensão arterial, obesidade, diabetes, doenças auto-imunes e muitos cânceres. Estas doenças possuem, como base fisiológica, quadro inflamatório crônico e estudos têm observado que o elevado consumo de gorduras saturadas, ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) ômega-6 (n-6) e gorduras *trans*, associado à redução do consumo de ácidos graxos da família ômega-3 (n-3) podem estar envolvidos no desenvolvimento deste quadro (SIMOPOULOS, 2008, PATTERSON *et al.*, 2011).

Entre estas doenças inflamatórias, o câncer é a segunda principal causa de morte no mundo, sendo as doenças cardiovasculares as que mais matam pessoas atualmente. Estima-se que em 2020 15 milhões de novos casos de câncer serão diagnosticados, e 12 milhões de pacientes morrerão decorrente da doença. O câncer é causado por fatores intrínsecos e extrínsecos. Dentre os fatores intrínsecos estão mutações, alterações hormonais e condições imunitárias; os fatores extrínsecos estão associados ao ambiente e incluem o fumo, exposição à radiação e infecções, e a alimentação (ANAND *et al.*, 2008).

A ocorrência de cânceres específicos em diferentes países revela que deva existir uma relação entre os hábitos alimentares e a incidência da doença. Asiáticos,

por exemplo, apresentam incidência 25 vezes menor de câncer de próstata e 10 vezes menor de câncer de mama que populações ocidentais. Além disso, os japoneses e populações de esquimós apresentam baixa incidência de doenças cardiovasculares, como infarto do miocárdio, inflamações crônicas ou doenças autoimunes, quando comparados com populações ocidentais. Estudos revelam relação da baixa incidência dessas doenças com alta ingestão de AGPI n-3. A partir destas observações, estudos surgiram demonstrando o efeito benéfico do consumo de ácidos graxos n-3 em outras doenças como artrite reumatoide, doença inflamatória intestinal (HASSAN *et al.*, 2010) e o câncer (ANAND *et al.*, 2008; SIMOPOULOS, 2008).

Estudos na área nutricional demonstram que a incidência destas doenças decorre da modificação no padrão alimentar de consumo destes ácidos graxos. A alimentação de décadas passadas envolvia o baixo consumo de ácidos graxos saturados, gorduras *trans* e pequena ou aproximada razão AGPI n-6/n-3 de 1-2/1 em relação à dieta alimentar atual da maioria da população mundial. A “dieta ocidental” consumida em grande parte do globo possui elevadas quantidades de AGPI n-6, sendo encontradas razões n-6/n-3 de até 10-50/1 (SIMOPOULOS, 2008; PATTERSON *et al.*, 2011).

1.1 CÂNCER

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo. Esta doença é a causa de aproximadamente 23% das mortes ocorridas nos Estados Unidos e é a segunda causa mais comum de morte depois das doenças cardiovasculares (ANAND *et al.*, 2008). No Brasil, para 2012 e para o próximo ano, as estimativas são de ocorrência de aproximadamente 518.510 novos casos de câncer, sendo o mais incidente na população brasileira o câncer de pele do tipo não melanoma, seguido pelos tumores de próstata, mama feminina, cólon e reto, pulmão e colo do útero (BRASIL, 2012). Somente 5-10% dos cânceres são causados por alterações gênicas, a maioria é resultado de inúmeras mutações que ocorrem com interações com o meio ambiente; demonstrando que a maioria dos casos não é de origem hereditária e que fatores relacionados ao estilo de vida, como hábitos alimentares,

fumo, consumo de álcool, e infecções possuem profunda influência no desenvolvimento da doença (COLDITZ *et al.*, 2007; ANAND *et al.*, 2008).

O processo de carcinogênese inicia-se com a susceptibilidade de células normais a alterações no DNA. A manutenção normal de qualquer organismo baseia-se em replicações celulares por divisão para substituição de células e reparo de áreas teciduais lesadas. A divisão celular inicia pela replicação do DNA, processo extremamente eficiente, mas passível de erro que levam a mutações no material genético. O acúmulo de alterações no DNA da célula pode culminar em mudanças irreversíveis na célula. Fatores externos, como exposição à radiação ou a agentes químicos e infecções (VALDÉS-RAMOS *et al.*, 2007) ou produtos internos como mediadores inflamatórios (citocinas, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, prostaglandinas (PGs) e fatores de crescimento) são capazes de iniciar essas mutações no DNA. Em condições normais, a maioria das mutações é reparada, mas quando em quantidades elevadas e incompatíveis com a sobrevivência celular, a célula é destinada a morrer por apoptose. No câncer, os danos ao DNA são persistentes e resistem aos inúmeros processos de reparo. Quando estas células de material genético mutado proliferam-se, dá-se início à formação do tumor. Nestas células, há aumento da expressão de oncogenes e/ou redução da atividade de supressores de tumor que levam a mudanças no microambiente celular, favorecendo a sobrevivência e a proliferação da célula cancerosa. A partir disso, pode ocorrer crescimento do tumor e, em alguns, casos metástase (MORRISON, 2012)

A maior parte dos cânceres desenvolve-se a partir da interação de três fatores: o microambiente do tecido, o acúmulo de mutações genéticas e a exposição a quadro inflamatório crônico (VALDÉS-RAMOS *et al.*, 2007). A inflamação é resposta rápida e normal a danos agudos ao tecido resultante de injúria física, isquêmica, por toxinas, infecções virais ou bacterianas. No processo inflamatório usual, todo o tecido lesionado e o DNA mutado são reparados. Ocorre recrutamento de células do sistema imunitário, liberação de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, e síntese de eicosanóides. O processo inflamatório cessa e a cura acontece. Quando a inflamação persiste, cria-se ambiente favorável ao desenvolvimento do câncer. Quanto mais persistente e longo o quadro inflamatório, maior a probabilidade de mutações genéticas ocorrerem, favorecendo o surgimento da doença. É importante ressaltar que nem toda inflamação crônica leva ao câncer.

Entretanto, a relação entre a inflamação e o câncer é forte (CALDER, 2006; MORRISON, 2012).

1.2 ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS

Ácidos graxos são cadeias de hidrocarbonetos com um grupo carboxila ao final da cabeça da cadeia e um grupo metila ao final da cauda da cadeia. Os carbonos podem ser ligados por uma ou duas ligações. O número de carbonos na cadeia e o tipo de ligação entre os carbonos dão origem aos diferentes tipos de ácidos graxos. Os ácidos graxos saturados são os que possuem ligações simples entre os carbonos da cadeia, enquanto os ácidos graxos insaturados (mono-, di- ou poliinsaturados) são os que possuem duplas ligações entre os carbonos (HARDMAN, 2004; PATTERSON *et al.*, 2011).

Os ácidos graxos insaturados podem ser divididos em classes: ômega-7 (16:1n-7) e ômega-9 (18:1n-9), monoinsaturados, e ômega-6 (18:1n-6) e ômega-3 (18:3n-3), poliinsaturados. Cada classe é composta por uma família de ácidos graxos que pode ser sintetizada biologicamente a partir de seus precursores parentais oferecidos na dieta. O ácido graxo parental da família ômega-7 (n-7) é o ácido palmitoléico, enquanto o ácido oléico é o precursor da família ômega-9 (n-9). Ambos podem ser sintetizados por mamíferos, inclusive humanos. O ácido graxo parental do ômega-6 (n-6) é o ácido linoléico (LA) (18:2n-6), enquanto do ômega-3 (n-3) é o ácido α -linolênico (ALA) (18:3n-3) (CURI *et al.*, 2002; SIMOPOULOS, 2008).

Enquanto os ácidos graxos das famílias n-7 e n-9 podem ser sintetizados pelo organismo humano, os ácidos graxos poliinsaturados da família n-6 e n-3 não podem, e estes por serem imprescindíveis ao organismo, são considerados essenciais. (SIMOPOULOS, 2008; HULL, 2011; PATTERSON *et al.*, 2011). Em plantas, ALA é sintetizado a partir do LA por dessaturação catalisada pela enzima delta15-dessaturase. Animais, incluindo humanos, não possuem esta enzima, sendo ela presente somente em plantas (CALDER, 2012).

Os mamíferos não são capazes de sintetizar ALA, mas os AGPI n-3 e n-6 podem ser alongados e dessaturados para formar outros ácidos graxos da mesma

série de cadeia longa com 20 e 22 carbonos. O LA é metabolizado em ácido araquidônico (AA) (20:4n-6) e o ALA em ácidos eicosapentaenóico (EPA) (20:5n-3) e docosahexaenóico (DHA) (22:6n-3) pela atuação das enzimas delta6 e delta5-dessaturases e por alongases (FIGURA 1). A maioria dos mamíferos, inclusive os humanos, é capaz de converter LA em AA e ALA em EPA e DHA, mas essa taxa de conversão é baixa (SIMOPOULOS, 2008; HULL, 2011, CALDER, 2012). A metabolização dos AGPI ocorre primeiramente no fígado, mas pode ocorrer também em outros tecidos (PATTERSON *et al.*, 2011). Entretanto, a via de dessaturação e alongação do ALA que ocorre nos hepatócitos é a mais importante para o suprimento de outros tecidos de EPA e DHA (BURDGE, 2006).

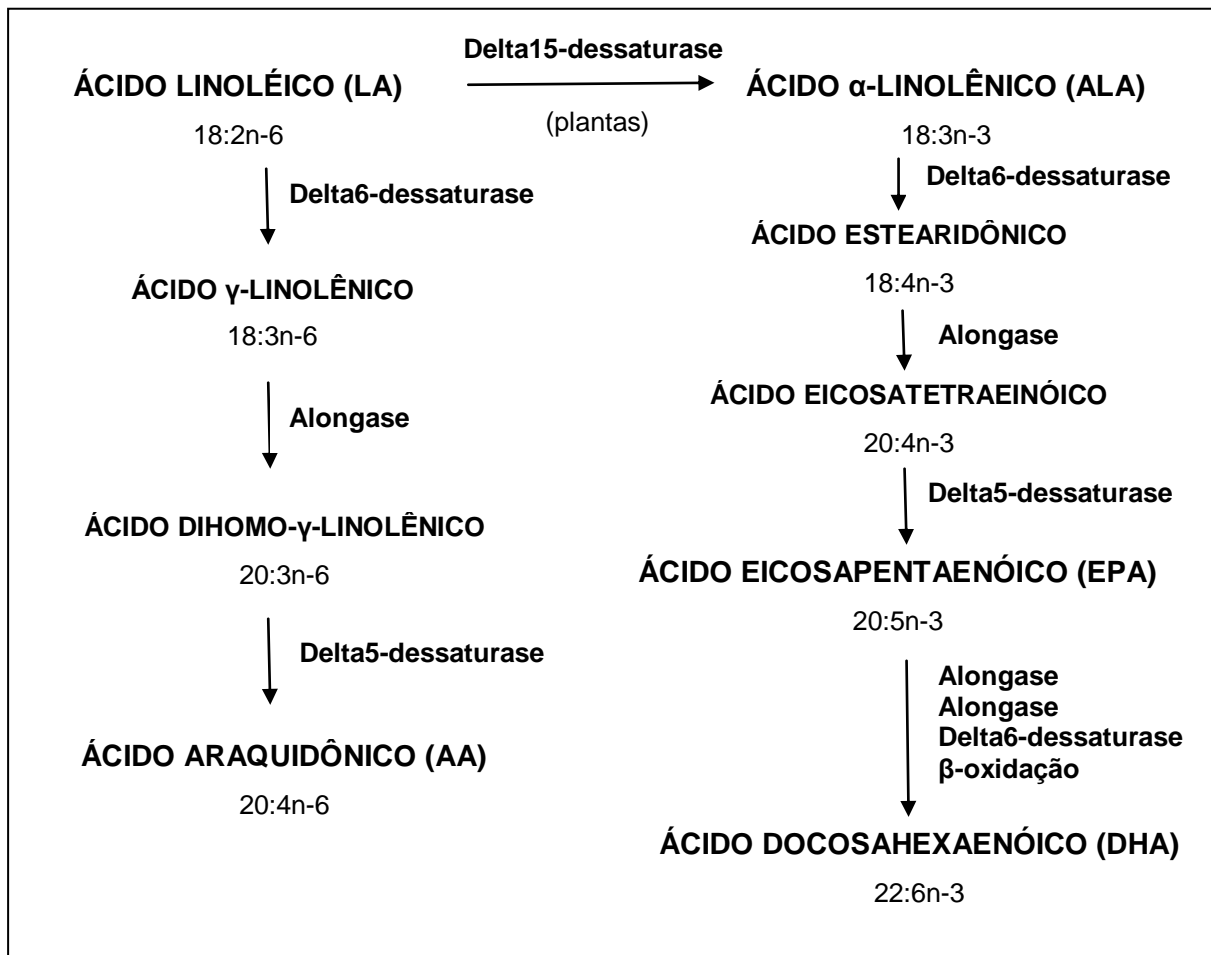


FIGURA1 – METABOLIZAÇÃO DOS AGPI n-6 e n-3 (adaptado de CALDER, 2012).

A conversão do ALA em EPA e a conversão do LA em AA ocorre pela competição pela mesma enzima, a delta6-dessaturase. Nessa etapa da via de metabolização, a ação da delta6-dessaturase é limitada e esta tem preferência pelo ALA como substrato. Quantidades elevadas de consumo de LA podem interferir na

dessaturação e alongação do ALA. Alguns estudos sugerem que a enzima delta-6-dessaturase pode estar reduzida com o passar da idade e, ainda, bebês prematuros, indivíduos hipertensos e alguns diabéticos possuem limitação na habilidade de conversão de ALA em EPA e DHA (BURDGE, 2006; SIMOPOULOS, 2008, CALDER 2012). Hormônios como o glucagon, a adrenalina, os glicocorticoides e a tiroxina podem deprimir as atividades da delta5 e delta6-dessaturases (PATTERSON *et al.*, 2011).

O LA pode ser encontrado em abundância na semente da maioria das plantas, com exceção do coco, cacau e palma, e em óleos vegetais (girassol, milho e cártamo). É o AGPI mais consumido na dieta ocidental, com ingestão elevada em 5 a 20 vezes maior quando comparada ao consumo de ALA. O AA, produzido a partir do LA é encontrado em carnes e em ovos. O ALA por ser produzido por plantas e encontrado em vegetais folhosos verde-escuros, em óleos (canola, linhaça, soja) e em sementes e é o AGPI n-3 mais consumido na dieta humana. Ácidos graxos n-3 EPA e DHA possuem como principais fontes peixes como salmão e sardinha e óleos de peixes (HARDMAN, 2004; SIMOPOULOS, 2008; HULL, 2011, PATTERSON *et al.*, 2011). Dietas com baixa ingestão de fontes de EPA e DHA apresentam consumo menor ou igual 0,2g EPA/dia. Uma refeição com porção de peixe rico nestes AGPI poderia fornecer aproximadamente 0,2 a 0,3g EPA e DHA (CALDER, 2012).

No âmbito nutricional, as últimas décadas foram marcadas por muitas mudanças no padrão alimentar da população. Observa-se exponencial aumento do consumo de ácidos graxos saturados, AGPI n-6 e ácidos graxos *trans*, enquanto o consumo de AGPI n-3 foi drasticamente reduzido. Em décadas passadas, o consumo de lipídeos correspondia a 20 a 30% do consumo total de energia por dia. Atualmente, europeus, por exemplo, possuem os lipídeos como fonte de 28 a 42% da energia total consumida no dia. O aumento progressivo de consumo de lipídeos deve-se à forte inserção dos óleos vegetais, como de milho e girassol, na alimentação como constituinte ou utilizado no preparo de alimentos. Como consequência, a ingestão de AGPI n-6 tornou-se progressivamente maior que o de AGPI n-3 (SIMOPOULOS, 2008; PATTERSON *et al.*, 2011). Para a avaliação do consumo de AGPI essenciais pode ser utilizada a razão n-6/n-3, que para ser considerada como ingestão adequada deve estar aproximadamente entre 4/1. Entretanto, com estas modificações na dieta ao longo das últimas décadas é

possível observar razões n-6/n-3 de 10-20/1 (PATTERSON *et al.*, 2011) ou até de 30-50/1 (SIMOPOULOS, 2008). Concomitante a modificações no padrão alimentar, houve incremento dos índices de doenças inflamatórias como doenças cardiovasculares, obesidade, diabetes mellitus, doença inflamatória intestinal, artrite reumatoide, doenças neurodegenerativas e câncer. A ingestão elevada de AGPI n-6 associado ao reduzido consumo de AGPI n-3 provoca modificações fisiológicas que desencadeiam estado pró-inflamatório e pró-trombótico com aumento de vasoespasmos, vasoconstrição e da viscosidade do sangue, favorecendo o surgimento dessas doenças (PATTERSON *et al.*, 2011).

1.3 ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS E CÂNCER

Os benefícios gerados pelos AGPI n-3 no câncer são conhecidos, entretanto não completamente entendidos. Acredita-se que diferentes mecanismos como transporte através de membrana, angiogênese, proliferação, apoptose, metástase e funções imunitárias, contribuem individualmente ou em conjunto para a melhora do quadro patológico (YANG *et al.*, 2012). Muitas atividades moleculares e celulares são propostas, com base em estudos *in vitro*, para explicar a atividade anti-neoplásica dos AGPI n-3 que englobam: inibição da atividade da enzima ciclooxigenase (COX); produção de mediadores lipídicos antiinflamatórios; ação direta do ácido graxo n-3 em vias de sinalização mediada por receptores acoplados à proteína G; alteração da dinâmica da membrana celular e da função de receptores da superfície de membrana e aumento do estresse oxidativo da célula (HULL, 2011).

Em pacientes com câncer, as interações entre as células do sistema imunitário e da inflamação são mediadas em grande parte por proteínas que promovem crescimento celular e diferenciação. As principais citocinas pró-inflamatórias produzidas pelas células imunitárias são o fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6). A produção apropriada de TNF- α , IL-1 e IL-6 é resposta benéfica contra a infecção, mas em quantidades inapropriadas ou superprodução pode ser maléfica e estas citocinas, especialmente o TNF, estão envolvidos na causa de respostas patológicas das condições de inflamação (GIACOSA *et al.*, 2008). Os AGPI n-3, EPA e DHA, apresentam papel

importante em ações anti-inflamatórias e podem provocar redução na produção destas citocinas (CALDER, 2012).

Os eicosanóides são uma família de mediadores lipídicos derivados da oxidação de AGPI e englobam as prostaglandinas (PGs), os tromboxanos (TXs), os leucotrienos (LTs) e os ácidos hidroieicosatetraenóicos (HETEs). Estão envolvidos em muitos processos patológicos como inflamação e câncer. Quando presentes em grandes quantidades influenciam muitas atividades metabólicas envolvidas na inflamação como agregação plaquetária, hemorragia, vasoconstrição e vasodilatação. O ácido graxo precursor dos eicosanóides é liberado da membrana de células envolvidas no processo inflamatório, sendo o AA o mais comum AGPI presente nas membranas de macrófagos, neutrófilos e linfócitos. O AA é liberado da membrana celular pela ação da enzima fosfolipase A₂, ativada por estímulo em condições de inflamação. O AA livre é utilizado como substrato pela enzima ciclooxigenase (COX) na formação de PGs e TXs da série 2, pela lipooxigenase (LOX) para a formação de LTs da série 4 ou pela citocromo P450 para a síntese de HETEs (STOFFEL *et al.*, 2006; PATTERSON *et al.*, 2011; CALDER, 2012).

A prostaglandina E₂ (PGE₂) promove supressão do sistema imunitário, permitindo que células cancerígenas se proliferem e sejam capazes de formar metástase. Têm-se observado que a alta concentração sérica PGE₂ é favorável para o crescimento de células tumorais, e há boa correlação entre as concentrações de PGE₂ e crescimento de tumores em experimentos animais (SIMOPOULOS, 2003; MUND *et al.*, 2007; HULL, 2011). Os leucotrienos B₄ (LTB₄) estimulam a produção de citocinas inflamatórias como o TNF- α , interleucina 1 β (IL-1 β) e o IL-6 por macrófagos e induzem a infiltração de leucócitos (PATTERSON *et al.*, 2011).

O EPA também pode ser oxidado pelas enzimas COX, LOX e citocromo P450 para a produção de eicosanóides. Fisiologicamente, os eicosanóides derivados do EPA são importantes por serem menos ativos biologicamente quando comparados aos eicosanóides derivados do AA (PATTERSON *et al.*, 2011; CALDER, 2012). A ingestão de EPA aumenta a quantidade desse ácido graxo na membrana das células envolvidas no processo inflamatório concomitante à redução de AA nas mesmas. Como consequência há redução da produção de eicosanóides derivados dos AGPI n-6 (eicosanóides da série par): redução na produção de prostaglandina E₂ (PGE₂), tromboxano A₂ (TXA₂) e LTB₄; envolvidos na agregação plaquetária, indução de inflamação, quimiotaxia e aderência de leucócitos e monócitos e ativação

de neutrófilos. Em contrapartida, há aumento da produção de eicosanóides derivados dos AGPI n-3 (eicosanóides da série ímpar), como PGs e TXs da série 3 e LTs da série 5, fracos agregadores plaquetários, com baixa capacidade de vasoconstrição e fracos agentes quimiotáticos e promotores de inflamação (SIMOPOULOS, 2008; ANDERSON *et al.*, 2009; CALDER, 2012).

Recentes estudos identificaram grupo novo de mediadores lipídicos que apresentam ações antiinflamatórias. Suas sínteses acontecem mediante atuação da COX-2 e da LOX-5. São formadas lipoxinas derivadas do AA, resolvinas da série E formadas a partir do EPA e resolvinas da série D, docosatrienos e neuroprotectinas derivados do DHA (ANDERSON *et al.*, 2009; CALDER, 2009).

Os AGPI são importantes constituintes funcionais e estruturais da membrana celular. O principal AGPI presente nos fosfolípidos da membrana das células envolvidas na inflamação é o AA e, em menor quantidade, EPA e DHA. Como já discutido anteriormente, a incorporação de EPA e DHA na membrana destas células é capaz de alterar o perfil de eicosanóides produzidos no processo inflamatório, estes menos ativos biologicamente. Além disso, um segundo aspecto em relação a alterações nos fosfolípidos de membrana envolvem os chamados *lipid rafts*. Estas estruturas são formadas pela movimentação de receptores, proteínas acessórias e enzimas ao longo da membrana celular formando “plataformas” de sinalização. Esta movimentação ocorre em resposta à ativação celular e é essencial para que a transdução de sinal intracelular ocorra de maneira adequada pelo citosol até alcançar o núcleo. Algumas evidências sugerem que a incorporação de AGPI n-3 nos fosfolípidos de membrana alteram a fluidez, a estrutura e a função dos *lipids rafts*. Em linfócitos T, a exposição em cultura celular ou a suplementação de animais com EPA e DHA foi capaz de melhorar os mecanismos de sinalização intracelular, reduzindo a atividade destas células. A localização de receptores de superfície de membrana em *lipids rafts* pode ser crucial no controle da sinalização de proliferação e de apoptose (HULL, 2011, CALDER 2012).

Os AGPI n-3 são capazes de modificar o ambiente pró-inflamatório via ação sobre fatores de transcrição como o O NF- κ B (*nuclear factor-kappa B*) e o PPAR- γ (*Peroxisome proliferator activated receptor*). O NF- κ B é um dos mais importante fatores de transcrição envolvidos na resposta inflamatória, envolvido na *up-regulation* de genes que codificam citocinas, moléculas de adesão e a COX-2. O NF- κ B é ativado em uma cascata de sinalização que se inicia a partir de estímulo

inflamatório extracelular e envolve a fosforilação da sua unidade inibitória (o I κ B), permitindo a translocação do restante do dímero de NF- κ B para o núcleo. A ativação de NF- κ B tem sido observado em tumores sólidos humanos e é resultado do microambiente inflamatório da patologia (CALDER, 2012; MORRISON, 2012). EPA e DHA são capazes de reduzir o estímulo extracelular para a ativação do NF- κ B associado à redução na taxa de fosforilação do I κ B, em macrófagos (CALDER, 2012)

O PPAR- γ é fator de transcrição com papel anti-inflamatório. Atua diretamente regulando a expressão de genes envolvidos na inflamação e é capaz de interferir na translocação do NF- κ B para o núcleo. Os AGPI n-3 são capazes de ativar o PPAR- γ , resultando em efeitos anti-inflamatórios. Em células envolvidas no processo de inflamação, o DHA é capaz de estimular o PPAR- γ e seus genes alvo. Estes efeitos estão relacionados à redução da produção de citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-6 (CALDER 2012).

A apoptose, via de morte celular programada, está comumente alterada em patologias como o câncer. A morte celular programada é fenômeno biológico essencial para a manutenção do desenvolvimento e a regulação da homeostase tecidual. Ocorre através da ativação de enzimas denominadas caspases que levam à degradação do DNA nuclear e das proteínas citoplasmáticas. A expansão clonal da célula cancerosa depende do estímulo da sua capacidade proliferativa e de crescente incapacidade de morrer por apoptose (KELLY *et al.*, 2011; FAVALORO *et al.*, 2012).

Mediada por caspases, a apoptose pode ocorrer por duas vias: extrínseca e intrínseca. A via extrínseca ocorre por estímulo de sinais extracelulares decorrentes da ligação de ligantes a específicos receptores transmembrana, ativando uma cascata de sinalização de caspases. A via intrínseca, também conhecida como via mitocondrial, é ativada em resposta a condições intracelulares decorrente de estresse como dano ao DNA, produtos do estresse oxidativo, entre outros. Nesta via o potencial de membrana da mitocôndria é alterado e a produção de ATP cessada levando à liberação de proteínas que contribuirão para a ativação das caspases. A via intrínseca é regulada pela família de proteínas Bcl-2 (*B-cell lymphoma*). Esse amplo conjunto de proteínas é caracterizado pela presença de, pelo menos, um domínio homólogo à Bcl-2 e, funcionalmente, podem ser classificadas em proteínas

anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1) e pró-apoptóticas (Bax, Bak, Bcl-xs, Bok, Bad, Bik, Bid e Bim) (FAVALORO *et al.*, 2012, REUBOLD *et al.*; 2012).

No câncer, ocorrem mutações em antagonistas da morte celular. Expressão elevada de Bcl-2 já foi constatada em linfomas e tumores sólidos como de mama, pulmão, rim e ovário. Normalmente associada agressividade tumoral e resistência ao tratamento anti-neoplásico. Alta expressão de Bcl-x_L já foi descrita em mielomas e linfomas, e tumores de pulmão e osteosarcomas. Ainda, ocorrem mutações que levam à inibição dos ativadores da morte celular. As caspases, efetoras em ambas as vias de apoptose, podem ter suas funções inibidas nesta doença. Estas mutações iniciam eventos pró-oncogênicos que levam ao desenvolvimento do tumor, com possível progressão para metástase (KELLY *et al.*, 2011; FAVALORO *et al.*, 2012).

Os AGPI n-3, assim como seus metabólitos formados, são capazes de modular vias de sinalização no processo apoptótico. Estudos *in vitro* com células tumorais demonstraram o efeito pró-apoptótico do EPA e DHA (SERINI *et al.*, 2009, YANG *et al.*, 2012), sendo ambas, via intrínseca e via extrínseca, moduladas por estes ácidos graxos. Em culturas celulares de linhagem de linfoma, a presença do EPA foi capaz de ativar a via intrínseca. O DHA foi capaz de modificar a expressão de proteínas da família Bcl-2 em células de linhagem de câncer de cólon, as proteínas pró-apoptóticas Bak e Bcl-x_S estavam aumentadas, enquanto as anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-x_L estavam reduzidas (SERINI *et al.*, 2009).

2 JUSTIFICATIVA

Os benefícios dos AGPI n-3 em doenças inflamatórias como câncer são conhecidos e amplamente estudados. Grande parte destes estudos avaliam a influência do EPA e o DHA nos mecanismos regulatórios da doença através de culturas de células *in vitro* ou *in vivo* através suplementação com óleo de peixe (SERINI *et al.*, 2009; PATTERSON *et al.*, 2011; CALDER, 2012, YANG *et al.*, 2012).

Fontes alimentares do EPA e DHA são peixes e óleos de peixe, sendo seu precursor, ALA, o AGPI n-3 mais abundante ofertados na dieta por ser encontrado em vegetais e óleos (canola e linhaça). Pesquisas em animais e em humanos sugerem o consumo de ALA como efeito protetor contra o câncer (OIKARINEN *et al.*, 2005). Em animais, o consumo de ALA foi capaz de reduzir a incidência e o tamanho de tumores de mama (CHEN *et al.*, 2004) e de adenomas no intestino (OIKARINEN *et al.*, 2005). Em humanos, observa-se que o consumo de ALA na dieta promoveu redução da proliferação celular e aumento das taxas de apoptose em células de tumor de mama (THOMPSON *et al.*, 2005) e em células de tumor de próstata (DEMARK-WAHNEFRIED *et al.*, 2008). Todos estes estudos utilizaram como fonte de ALA a linhaça, cuja composição é de 57% de ácido α -linolênico em relação aos ácidos graxos totais.

Sacha Inki (*Plukenetia volubilis* L.) é uma planta oleaginosa da família das *Euphorbiaceae* nativa de florestas de altas altitudes do Andes da América do Sul. Compõe a alimentação de índios do Peru e de povos nativos da Amazônia, que consomem a farinha e o óleo obtidos de suas sementes (SATHE *et al.*, 2002). Estas são ricas fontes nutricionais na alimentação por serem abundantes em óleo (35-60%) e proteínas (27-33%). O óleo *Sacha Inki* é rica fonte de ALA (45,2% dos ácidos graxos totais) e também apresenta moderada quantidade de LA (36,8% dos ácidos graxos totais) (HAMAKER *et al.*, 1992; GUILLÉN *et al.*, 2003).

Em muitos estudos (CHEN *et al.*, 2004; OIKARINEN *et al.*, 2005; THOMPSON *et al.*, 2005; DEMARK-WAHNEFRIED *et al.*, 2008) o ALA foi ingerido via suplementação ou administração na dieta, com posterior metabolização nos hepatócitos para a conversão em EPA e DHA. SIMOPOULOS (1999) e ANDERSON *et al.* (2009) sugerem que ALA quando comparado a seus derivados de cadeia longa, EPA e DHA, não possuem equivalência biológica, demonstrando que

investigações devem ser realizadas no intuito de avaliar se os efeitos antitumorais observados são decorrentes da ação do EPA e do DHA ou de seu precursor, o ALA. Assim, para elucidar esta dúvida, a realização de experimentos *in vitro* é a ferramenta ideal para abordar este tema.

3 OBJETIVOS

Este trabalho objetivou investigar a proliferação e a morte celular *in vitro* em células de tumor de Walker 256 na presença dos complexados de óleo de peixe e *oro inka*-BSA, ricos em ácidos graxos ômega-3, e do soro de animais, suplementados ou não.

Para alcançar este objetivo investigamos:

- Proliferação das células tumorais pela incorporação de (2- ¹⁴C)-timidina em DNA;
- Percentual de células tumorais em apoptose por citometria de fluxo;
- Expressão da proteína envolvida na via de sinalização de morte celular (Bcl-2) por Western Blotting;
- O perfil de ácidos graxos nos complexados óleos-BSA e no soro dos animais por HPLC.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA), do Setor de Ciências Biológicas (SCB) da Universidade Federal do Paraná – CEEA n° 481 (ANEXO 2).

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos albinos da linhagem Wistar, obtidos do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná. Esses animais foram mantidos em ciclo claro/escuro (12/12 horas), em ambiente com temperatura controlada de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ com ração composta em macronutrientes de 63,4% de carboidratos, 25,6% de proteínas e 11% de lipídeos (NUVILAB CR1[®], Nuvital Nutrientes Ltda) e água à vontade (*ad libitum*). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Metabolismo Celular do Departamento de Fisiologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

4.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os animais com 70 dias de vida foram separados aleatoriamente em quatro grupos: grupo controle (Soro C), grupo controle tumor (Soro Ctw), grupo suplementado com óleo de peixe (Soro OP) e grupo suplementado com óleo de *Sacha Inki* (*Plukenetia volubilis* L.), ou *oro inka* (Soro OI). Os grupos receberam dieta habitual e suas respectivas suplementações (1g/kg p.c.) diariamente, via oral, através de micropipeta até completarem 100 dias. Os grupos Soro C e Soro Ctw receberam a suplementação de tampão salina fosfato (PBS), enquanto o grupo Soro OP e Soro OI, suas respectivas suplementações de óleo. Após o período de suplementação, os animais do grupo Soro C, Soro OP e Soro OI foram anestesiados com uretana 20% e realizada punção cardíaca com *vacutainer* (S-Monovette[®])

estéril para a obtenção do sangue, enquanto o grupo Soro Ctw recebeu a inoculação intraperitonealmente de suspensão de células do tumor de Walker 256, contendo 1×10^5 células/mL; sendo a coleta do sangue realizada da mesma forma, após 7 dias. O sangue coletado foi centrifugado (Centrífuga *Eppendorf*[®] – 5810R) no próprio tubo de coleta a 2000g por 10 minutos a 16°C para separação do soro. Este foi armazenado em ultrafreezer -80°C. O óleo de peixe utilizado é obtido de uma preparação de lipídeos marinhos, gentilmente doado pela Fundação Herbarium[®], o qual contém em 1g/cápsula a proporção de 0,192g de EPA e 0,124g DHA. O *oro inka* foi gentilmente cedido por Bebidas Latinas[®] SAC., Lima, Peru.

4.3 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DA RAÇÃO, ÓLEO DE PEIXE E *ORO INKA*

Na TABELA 1 é apresentado o perfil de ácidos graxos do *oro inka*, empregado na suplementação dos animais e nos complexados, utilizado para os ensaios experimentais; e o perfil de ácidos graxos da ração oferecida aos animais. Na TABELA 2 é apresentado o perfil de ácidos graxos do óleo de peixe, utilizado para a suplementação dos animais e nos complexados.

TABELA 1 - PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS (g/100g DE ÁCIDOS GRAXOS TOTAIS), OBTIDO POR HPLC (*HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY*) DAS CÁPSULAS DE ÓLEO DE PEIXE, *ORO INKA* E DA RAÇÃO ADMINISTRADA AOS ANIMAIS. OS VALORES CORRESPONDEM À MÉDIA±EPM.

ÁCIDOS GRAXOS	<i>ORO INKA</i>	RAÇÃO NUVITAL [®] (AR-1)
Saturados		
Láurico (12:0)	-	1,3±0,3
Mirístico (14:0)	0,04±0,04	-
Palmítico (16:0)	4,0±0,5	13,7±0,9
Esteárico (18:0)	0,4±0,1	2,4±0,3
Insaturados		
Oléico (18:1n-9)	8,6±0,4	20,0±0,03

continua

TABELA 1 - PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS (g/100g DE ÁCIDOS GRAXOS TOTAIS), OBTIDO POR HPLC (*HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY*) DAS CÁPSULAS DE ÓLEO DE PEIXE, ORO INKA E DA RAÇÃO ADMINISTRADA AOS ANIMAIS. OS VALORES CORRESPONDEM À MÉDIA±EPM.

ÁCIDOS GRAXOS	ORO INKA	RAÇÃO NUVITAL® (AR-1)	conclusão
Insaturados			
Linoléico (18:2n-6)	32,1±1,6	56,0±0,8	
Linolênico (18:3n-3)	50,8±0,1	6,0±0,6	
Araquidônico (20:4n-6)	0,05±0,05	0,3±0,2	
EPA (20:5n-3)	0,2±0,08	0,2±0,005	
DHA (22:6n-3)	-	-	
Razão n-6/n-3	0,6	9,0	

FONTE: modificado de SCHIESSEL, 2011, p.26.

TABELA 2 - PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS (g/100g DE ÁCIDOS GRAXOS TOTAIS), OBTIDO POR HPLC (*HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY*) DAS CÁPSULAS DE ÓLEO DE PEIXE. OS VALORES CORRESPONDEM À MÉDIA±EPM.

ÁCIDOS GRAXOS	ÓLEO DE PEIXE
Saturados	
Láurico (12:0)	4,8±0,005
Mirístico (14:0)	9,9±0,1
Palmítico (16:0)	15,0±0,2
Margárico (17:0)	0,2±0,2
Esteárico (18:0)	1,9±0,005
Insaturados	
Palmitoléico (16:1n-7)	1,6±1,6
Oléico (18:1n-9)	10,6±0,1
Linoléico (18:2n-6)	11,6±0,1
Linolênico (18:3n-3)	-
Araquidônico (20:4n-6)	0,7±0,01
EPA (20:5n-3)	23,8±0,6
DHA (22:6n-3)	19,8±0,8
Razão n-6/n-3	0,3

FONTE: O autor.

4.4 COMPLEXO ÓLEOS-ALBUMINA

O óleo de peixe e o *oro inka*, utilizados para a elaboração dos complexados foram os mesmos empregados na suplementação dos animais. Os óleos foram solubilizados em solução de albumina bovina sérica (BSA) (Sigma-Aldrich®) a 2% em meio RPMI-1640 (ICN Biomedicals®) filtrado (0,2µm) sob agitação por 24 horas a 4°C, ambos na proporção de 1:10. Após este período, as gotículas de gordura não complexadas foram retiradas com auxílio de micropipeta e a solução armazenada em ultrafreezer -80°C.

4.5 TUMOR DE WALKER 256

A indução de câncer em animais e o cultivo de células neoplásicas são abordagens importantes para se investigar a dinâmica tumoral, bem como as alterações causadas no organismo portador de tumor. Um dos modelos experimentais mais utilizados em ratos Wistar é o Tumor de Walker 256. Este tumor foi identificado por George Walker em 1928, no *John's Hopkins University School of Medicine*, em glândulas mamárias de uma rata preta. O tumor de Walker 256 é caracterizado como carcinossarcoma apresentando dois subtipos: tipo A, metastisante que leva a caquexia terminal dos ratos portadores em aproximadamente 27 dias; e o tipo B, que não forma metástases e induz a caquexia precoce do portador, levando a morte em 15 dias. Desde sua descoberta em 1928, essa linhagem tumoral tem sido amplamente utilizada em estudos antineoplásicos e de caquexia induzida pelo tumor, por ser espécie-específica para ratos e facilmente transplantada (FERNANDES, 1995). Neste experimento foram utilizados matrizes com o tumor de Walker 256, tipo B, cedidos pela Professora Flávia A. Guarnier, UEL, em 2011 e, desde então mantidos pelo Laboratório de Metabolismo Celular da UFPR.

4.6 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS DO TUMOR DE WALKER 256

Ratos machos adultos receberam injeção intraperitoneal de 1mL de suspensão de células, contendo 1×10^5 células/mL, do tumor de Walker 256. Após aproximadamente 7 dias, quando constatada a ascite, os animais foram ortotansados e receberam injeção de 3 mL de PBS com heparina (1:120) em suas cavidades abdominais, com posterior massagem desta região. A cavidade abdominal foi aberta e o fluido ascítico contendo as células tumorais coletado.

4.7 COLETA E SEPARAÇÃO DAS CÉLULAS

As células tumorais foram coletadas e mantidas sob refrigeração, sendo centrifugadas (Centrífuga *Eppendorf*[®] – 5810R) no próprio tubo de coleta a 153g por 7 minutos a 4°C. Em seguida, em condições estéreis, foram colocadas em solução hemolítica, contendo antibiótico e mantidas em banho-maria a 37°C por 15 minutos. Foram submetidas, na seqüência, à centrifugação a 153g por 7 minutos a 4°C. As células foram lavadas com meio de cultura RPMI-1640 enriquecido com soro fetal bovino (SFB) (*Cultilab*[®] Ltda.) a 10% e contendo antibióticos (penicilina 10.000 e estreptomicina 10mg/L) (*Invitrogen Corporation, Gibco*[®]) a 0,1%. O sedimento foi ressuspenso em meio de cultura RPMI-1640 enriquecido com SFB e antibióticos e armazenado em garrafa de cultura em estufa a 37°C por 1 hora, com o objetivo de descarte dos macrófagos presentes no líquido ascítico. Os macrófagos são capazes de aderir à superfície da garrafa de cultura e, assim, isolados do restante da solução de células. Após este período, a solução de células foi centrifugada a 153g por 7 minutos a 4°C e ressuspenso em meio de cultura RPMI-1640 enriquecido com SFB e antibióticos. Alíquota foi separada para contagem das células tumorais em microscópio em câmara de Neubauer.

4.8 PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS

Células tumorais, 1×10^4 células/poço, foram cultivadas em meio de cultura RPMI-1640 enriquecido com soro fetal bovino 10%, contendo antibióticos (penicilina 10.000 e estreptomicina 10mg/L) a 0,1% e 20 μ L de solução contendo (2-¹⁴C)-timidina (0,02 μ L/poço) (61mCi/mmol) (*Amersham, GE Healthcare*[®]) em placas de 96 poços (volume final de 220 μ L), em incubadora a 37°C / atmosfera de 95% ar / 5% de CO₂. As células foram cultivadas por 24 horas na ausência (BSA 2% ou meio RPMI-1640) ou presença de óleo de peixe-BSA complexado (OP-BSA) ou *oro inka*-BSA complexado (OI-BSA), ambos nas proporções de 1:5 (OP/OI 1:5), 1:8 (OP/OI 1:8), 1:10 (OP/OI 1:10) e 1:20 (OP/OI 1:20). As células tumorais também foram cultivadas por 48 horas na ausência (BSA 2% ou meio RPMI-1640) ou presença de soro de animais dos grupos C (Soro), Ctw (Soro Ctw), OP (Soro OP) e OI (Soro OI) nas proporções 1:5 (Soro C 1:5, Soro Ctw 1:5, Soro OP 1:5 e Soro OI 1:5) e 1:10 (Soro C 1:10, Soro Ctw 1:10, Soro OP 1:10 e Soro OI 1:10). Os soros dos animais empregados nos ensaios foram diluídos em meio RPMI-1640.

Após os respectivos períodos, as células tumorais foram coletadas automaticamente em coletor múltiplo (*Skatron*[®] *Titertek*[™] *Cell Harvester*) em papéis filtro n° 11731 (*Cox Scientific*[®] *Ltd.*). Neste processo não há a necessidade de processos extrativos preparatórios para a obtenção de DNA celular. Os discos de papéis contendo a radioatividade incorporada no DNA foram transferidos para tubos contendo 1mL de líquido de cintilação (*PerkinElmer*[®]) e mensurados em contador (*Beckman*[®] *LS – 6500*). Os resultados foram analisados no programa *GraphPad Prism* e expressos em contagens por minuto (cpm).

4.9 APOPTOSE DE CÉLULAS TUMORAIS POR CITOMETRIA DE FLUXO

Células tumorais, 2×10^5 células/mL, foram cultivadas em meio de cultura RPMI-1640 enriquecido com soro fetal bovino 10% e antibióticos (penicilina 10.000 e estreptomicina 10mg/L) em placas de 24 poços (volume final de 2mL), em incubadora a 37°C / atmosfera de 95% ar / 5% de CO₂. As células foram cultivadas por 24 horas na ausência (BSA 2% ou meio RPMI-1640) ou presença de OP-BSA ou

OI-BSA, ambos nas proporções de 1:5 (OP/OI 1:5), 1:8 (OP/OI 1:8); 1:10 (OP/OI 1:10) e 1:20 (OP/OI 1:20). Após este período, as células foram coletadas e transferidas para tubos de ensaio. Depois de isoladas, as células tumorais foram lavadas com PBS e ressuspensas em tampão de ligação (Hepes 10mM pH 7,4, NaCl 150mM, KCl 5mM, MgCl₂ 1mM e CaCl₂ 1,8mM) contendo anexina V (Proteimax[®]), na proporção de 1:500, marcada com o fluorocromo fluoresceína isotiocianato (FITC) (Proteimax[®]), e com *7-amino-actinomycin D* (7-AAD) (eBioscience[®]). A anexina V é capaz de se ligar especificamente na fosfatidilserina, fosfolípido da monocamada interna da membrana plasmática celular que no processo de apoptose é translocado para a monocamada externa.

A fluorescência celular foi avaliada por citometria de fluxo (FACS – *fluorescence activated cell sorter*) em equipamento FACSCalibur Becton Dickinson[®], sendo que a marcação com FITC foi visualizada no canal FL1 do citômetro, e a marcação com 7-AAD, no canal FL3. Os dados foram expressos em porcentagem de eventos. O *software* utilizado para a aquisição dos dados foi o *Cell Quest*[™], e para a análise de dados, o programa *WeaseI*[®].

4.10 IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOTTING

4.10.1 Extração proteica

Células tumorais, 2×10^5 células/mL, foram cultivadas em meio de cultura RPMI-1640 enriquecido com soro fetal bovino 10% e antibióticos (penicilina 10.000 e estreptomicina 10mg/L) a 0,1% placas de 24 poços (volume final de 2mL), em incubadora a 37°C / atmosfera de 95% ar / 5% de CO₂. As células foram cultivadas por 24 horas na ausência (BSA 2% ou meio RPMI-1640) ou presença de OP-BSA e OI-BSA, ambos na proporção de 1:8 (OP/OI 1:8). Após as 24 horas, as amostras foram coletadas e centrifugadas (Centrífuga *Eppendorf*[®] – 5810R) a 1785g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células lavadas com PBS gelado. O sedimento formado foi ressuspensado em tampão de lise (TRIS 50mM, NaCl 150mM, Triton X-100 1%, SDS (dodecil sulfato de sódio) 0,1%, fluoreto de

sódio 100mM e inibidores de proteases e fosfatases (pirofosfato de sódio 10mM, ortovanadato de sódio 10mM, aprotina 0,01mg/mL, *cocktail* 100x 1:100) na proporção de 1:6 e mantidos em gelo, com posterior agitação mecânica por 3 vezes com 5 minutos de intervalo. Transcorrido o tempo de lise celular, a solução de células foi centrifugada a 1785g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante armazenado, em refrigeração, a -20°C.

4.10.2 Quantificação proteica

A quantificação protéica foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). A concentração de proteínas das amostras foi calculada com base em curva padrão de proteína conhecida (albumina sérica bovina). Após a dosagem proteica, as amostras foram diluídas em tampão Laemmli 5x (TRIS HCl 1M, azul de bromofenol 0,5%, glicerol, SDS 10%, água ultrapura q.s.p.) acrescido de β -mercaptoetanol 1:20 (v/v), e ficaram na concentração de 45 μ g. Após, foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE seguido por Imunoblotting.

4.10.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e *Imunoblotting*

Após a diluição no tampão Laemmli 5x, as amostras foram submetidas à eletroforese pelo método SDS-PAGE. Este método foi descrito por LAEMMLI (1970). O SDS (dodecil sulfato de sódio) é poderoso detergente carregado negativamente que se liga às regiões hidrofóbicas das proteínas, formando o complexo SDS-proteína. As proteínas, então, são capazes de migrar em direção ao polo positivo do campo elétrico (MOORE, 2009), sendo separadas, por peso molecular em gel de poliacrilamida a 12%. A presença de agentes como o glicerol, que confere densidade maior à amostra em relação ao tampão de corrida, e o β -mercaptoetanol, agente redutor capaz de desfazer as pontes dissulfeto da estrutura proteína, possibilitam a separação da amostra em subunidades.

As amostras foram submetidas à eletroforese por aproximadamente 90 minutos (160V) (*Biorad Mini-PROTEAN[®] Tetra Cell*). Em seguida, foram

eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose, em aparato de transferência semi-dry (20V) por 1 hora (*Biorad Trans-blot[®] SD Cell*). Terminado o processo de transferência, as membranas foram coradas com vermelho Ponceau para visualizar a eficiência do processo. A seguir, as membranas foram bloqueadas com solução TBST (tampão TRIS-salina contendo 0,05% de tween-20) acrescido de leite desnatado a 5%, por 1 hora, com o objetivo de evitar ligações inespecíficas aos anticorpos.

O método de *Imunoblotting* (ou *Western Blotting*) foi descrito por TOWBIN *et al.* (1979) e baseia-se na identificação de proteínas através interação com anticorpos específicos, incluindo a detecção, quantidade relativa e o peso molecular das proteínas-alvo. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário diluído em TBST acrescido de leite desnatado a 3%, por 3 horas em temperatura ambiente com suave agitação. Foi utilizado anticorpo monoclonal comercial para o reconhecimento da proteína Bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology[®]), na proporção de 1:500.

Seguida da incubação com o anticorpo primário, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado à HRP (*horseradish peroxidase*) na proporção de 1:5000, específico para o anticorpo primário. O anticorpo secundário foi diluído em TBST acrescido de leite desnatado a 3% e esta segunda incubação ocorreu em temperatura ambiente, por 1 hora e com suave agitação. A reação foi visualizada através de substrato quimioluminescente (luminol) e registrada em filme para raio-X (Kodak[®]).

As imagens das bandas correspondentes à reação positiva foram avaliadas através de densitometria com auxílio de *software Image J*.

Como controle interno (*housekeeping*) foi utilizado anticorpo contra a proteína β -actina (Santa Cruz Biotechnology[®]), na proporção de 1:800.

4.11 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (*High Performance Liquid Chromatography* – HPLC)

4.11.1 Extração lipídica

A extração lipídica das amostras foi realizada conforme FOLCH et al. (1956). Foram utilizadas, de cada amostra, alíquotas de 200µL para o soro, meio RPMI-1640 e BSA 2%, e 30µL para os óleos; aos quais, em tubos de vidro, foram adicionados 1,33mL de solvente extrator (composto de metanol:clorofórmio, proporção de 1:2). A esta mistura foi adicionado 240µL de metanol e o material foi então centrifugado (Centrífuga *Eppendorf*® – 5810R) a 5000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de vidro e foram adicionados 480µL de clorofórmio e 410µL de água ultrapura e o sistema bifásico formado foi submetido à intensa agitação. Após 10 minutos para a reconstituição espontânea do sistema bifásico, o sobrenadante (aquoso) foi removido com o auxílio de micropipeta. Adicionou-se 1mL de solução de Folch (metanol 48,98%; água ultrapura 47,96%; clorofórmio 3,06%; MgCl₂ 0,01%; CaCl₂ 0,02%; NaCl 0,37%) por três vezes e após a última retirada do sobrenadante, as amostras foram submetidas à secagem em nitrogênio gasoso em banho-maria à 37°C.

4.11.2 Saponificação dos extratos lipídicos

Os extratos lipídicos obtidos foram ressuspensos em 100µL de metanol e saponificados com 2mL de solução alcalina em metanol (hidróxido de sódio 0,5M em metanol a 90%) por 2 horas em banho-maria à 37°C, sob agitação (BEYER E JENSEN, 1989; NISHIYAMA-NARUKE, *et al.*, 1998). Após este período, as amostras foram acidificadas pela adição de 1,5mL de ácido clorídrico 1M. Os ácidos graxos livres em solução foram extraídos três vezes com 1mL de hexano. O solvente foi evaporado em nitrogênio gasoso em banho-maria à 37°C.

4.11.3 Derivatização dos ácidos graxos

A reação de derivatização dos ácidos graxos foi baseada no método descrito por ABUSHUFA et al. (1994). Nesta etapa são empregados dois reagentes que permitem que as amostras sejam detectadas através de detector de fluorescência. O reagente A consiste em 4-bromometil-7-metoxi coumarina (BMMC) (*Sigma-Aldrich*®), fluoróforo, solubilizado em acetonitrila. O reagente B consiste na mistura de 18-crown-6-ether (*Fluka*®), catalisador da reação da amostra com o fluoróforo, carbonato de potássio, água ultrapura e acetonitrila. As amostras contendo os ácidos graxos a serem derivatizados foram reconstituídas em 200µL de acetonitrila (*Tedia*®) e agitadas mecanicamente. Às amostras, foram adicionados 200µL do reagente A e 200µL do reagente B e estas foram agitadas novamente. As amostras foram mantidas em estufa a 60°C por 15 minutos e em seguida transferidas para tubos apropriados para injeção em HPLC.

Para a determinação dos ácidos graxos no HPLC (*Varian*®), através do detector de fluorescência, foram realizadas injeções de 50µL dos derivados diluídos. Os compostos foram separados detectados fluorimetricamente com excitação a 325nm e emissão a 398nm. Quanto à fase móvel, foi realizado gradiente binário com acetonitrila e água iniciando com a proporção de 77:23% (acetonitrila:água) e finalizando com 90:10%, em um total de 55 minutos.

A análise dos dados foi realizada com o auxílio do programa *GraphPad Prism*®. Os ácidos graxos que foram utilizados como padrões foram: ácido láurico (12:0), ácido mirístico (14:0), ácido palmítico (16:0), ácido esteárico (18:0), ácido oléico (18:1n-9), ácido linoléico (18:2n-6), ácido α -linolênico (18:3n-3), ácido araquidônico (20:4n-6), ácido eicosapentaenoico (20:5n-3) e ácido docosaenoico (22:6n-3).

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) dos grupos experimentais e submetidos à análise de variância de uma via com o pós-teste de Bonferroni para populações com distribuição gaussiana. Para populações que não seguiram distribuições gaussianas, foi utilizada análise de variância não-

paramétrica (teste de Kruskal-Wallis), seguido de pós-teste de Dunn. Teste “t” de Student foi utilizado quando indicado. $p < 0,05$ foi usado para indicar significância estatística. As análises e os gráficos foram realizados com o auxílio do software *GraphPad Prism*® (*GraphPad Prism* versão 5.00 para *Windows*, *GraphPad Software*, San Diego California EUA).

5 RESULTADOS

5.1 CAPACIDADE PROLIFERATIVA DAS CÉLULAS TUMORAIS

5.1.1 Proliferação das células do tumor de Walker 256 na presença dos complexos óleos-BSA

A proliferação das células tumorais, em contagem por minuto (cpm), na ausência, grupos Meio e BSA, ou na presença dos complexos OP-BSA ou OI-BSA, está apresentada na FIGURA 2. Após 24 horas de cultivo, a proliferação celular do grupo Meio não apresentou diferença estatística em relação ao grupo BSA, sendo ambas de ~3000cpm. As células tumorais cultivadas na presença de OP-BSA apresentaram proliferação celular de ~1500cpm para todas as diluições (1:5, 1:8, 1:10 e 1:20); caracterizando proliferação celular 50% menor quando comparada a do Meio ($p < 0,05$) e BSA ($p < 0,05$). A mesma proporção de redução na proliferação é constatada quando os grupos experimentais OP-BSA são comparados aos seus respectivos grupos, em relação à diluição, do complexado *oro inka* (OI-BSA). Estes últimos apresentaram proliferação celular de ~2500cpm para todas as proporções: 1:5, 1:8, 1:10 e 1:20 ($p < 0,05$).

O grupo experimental OI-BSA na proporção de 1:5 (~2389cpm) apresentou proliferação celular 18% menor em relação à dos grupos Meio ($p < 0,05$) e BSA ($p < 0,05$).

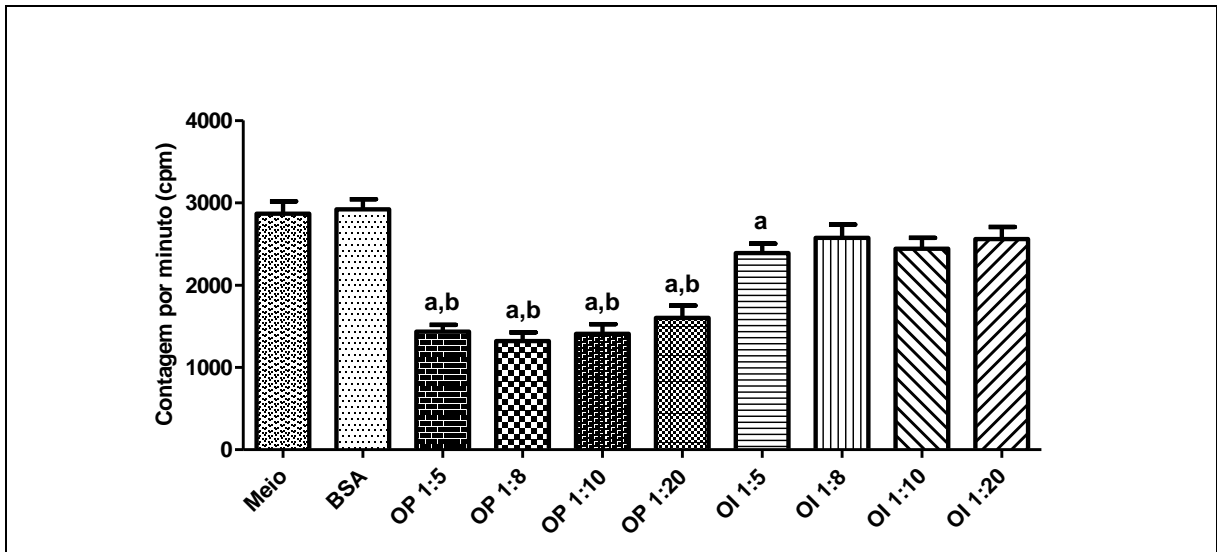


FIGURA 2 - PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS TUMORAIS (CPM), CULTIVADAS DURANTE 24 HORAS NA AUSÊNCIA (MEIO OU BSA) OU PRESENÇA DOS COMPLEXOS OP-BSA OU OI-BSA. OS DADOS ESTÃO APRESENTADOS COMO MÉDIA±EPM DE 8 EXPERIMENTOS EM SEXTUPLICATAS. a $p < 0,05$ vs MEIO e BSA, b $p < 0,05$ vs GRUPO CORRESPONDENTE OI.

5.1.2 Proliferação das células do tumor de Walker 256 na presença do soro de animais

As células tumorais foram cultivadas, por 48 horas, na ausência (Meio e BSA) ou na presença do soro de animais. A capacidade proliferativa destas células foi expressa por contagem por minuto (cpm) e pode ser visualizada na FIGURA 3.

Além dos grupos experimentais Meio (~1300cpm) e BSA (~1400cpm), adotou-se um controle (Soro C, Soro OP, Soro OI e Soro Ctw) para cada grupo experimental, que diluído ao meio apresentava proporção de 1:4 por poço. O grupos experimentais Soro Ctw e Soro Ctw 1:5 e 1:10 apresentaram proliferação celular de ~3000cpm. Estes dados demonstram aumento em 50% da proliferação celular em relação ao Meio ($p < 0,05$) e ao BSA ($p < 0,05$).

As células tumorais quando cultivadas na presença do soro de animal com tumor de Walker 256 apresentaram capacidade proliferativa maior quando comparada à dos demais grupos experimentais. O controle (Soro Ctw) apresentou aumento em 50% da proliferação celular quando comparada à do Soro C ($p < 0,05$), Soro OP ($p < 0,05$) e Soro OI ($p < 0,05$) que apresentaram proliferação de ~1600cpm. A diluição Soro Ctw 1:5 com proliferação celular de ~3000cpm apresentou aumento

de 62% na proliferação das células tumorais em relação à dos demais grupos experimentais de mesma diluição: Soro C 1:5 ($p < 0,05$), Soro OP 1:5 ($p < 0,05$) e Soro OI ($p < 0,05$). Ainda, quando comparado à dos demais grupos experimentais, o Soro Ctw 1:10 com proliferação de ~3200cpm apresentou 69% de aumento na proliferação celular em relação ao Soro C 1:10 (~1900cpm) ($p < 0,05$).

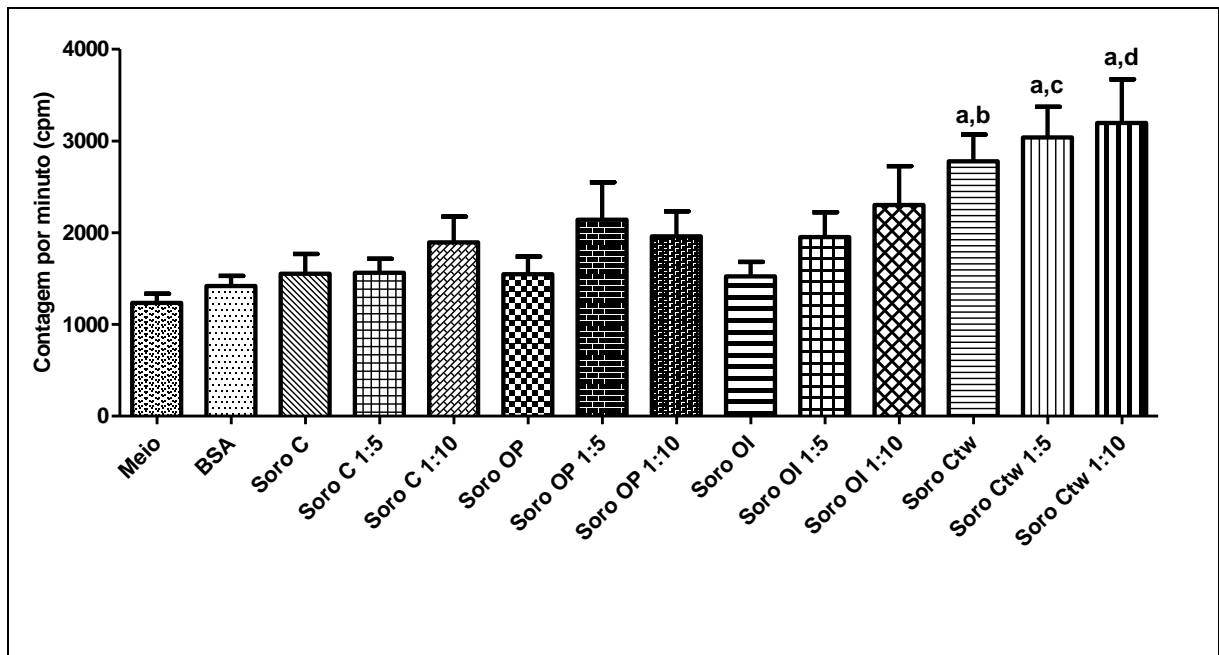


FIGURA 3 - PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS TUMORAIS (CPM), CULTIVADAS DURANTE 48 HORAS NA AUSÊNCIA (MEIO OU BSA) OU PRESENÇA DOS SOROS DOS ANIMAIS. OS DADOS SÃO APRESENTADOS COMO MÉDIA±EPM DE 4 EXPERIMENTOS EM SEXTUPLICATAS. a $p < 0,05$ vs MEIO e BSA; b $p < 0,05$ vs SORO C, OP e OI; c $p < 0,05$ vs SORO C 1:5, OP 1:5 e OI 1:5; d $p < 0,05$ vs SORO C 1:10.

5.2 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS NOS COMPLEXOS ÓLEOS-BSA E SORO DOS ANIMAIS

A TABELA 3 apresenta o perfil de ácidos graxos apresentados pelo meio de cultura RPMI-1640, BSA 2% diluído em meio de cultura e pelos complexos OP- e OI-BSA empregados na cultura de células tumorais.

Os complexos OI-BSA apresentaram quantidade 20 vezes maior do ácido graxo α -linolênico, quando comparada à do meio de cultura ($p < 0,05$), BSA ($p < 0,05$) e ao de seus respectivos grupos, em relação às diluições, OP-BSA ($p < 0,05$).

Em contrapartida, os metabólitos do ácido α -linolênico, EPA e DHA, estão presentes em maior quantidade nos complexos OP-BSA quando comparados ao do Meio ($p < 0,05$), BSA ($p < 0,05$) e ao de seus respectivos grupos, em relação às proporções, OI-BSA ($p < 0,05$). Em relação ao EPA, quando comparados ao meio, BSA e ao dos complexos OI-BSA, o complexo OP-BSA Puro ($p < 0,05$) apresentou quantidade 16 vezes maior deste ácido graxo, a proporção de OP-BSA 1:5 ($p < 0,05$) possuía quantidade 12 vezes maior, enquanto as diluições OP-BSA 1:8 ($p < 0,05$) e OP-BSA 1:10 ($p < 0,05$), quantidades 5 vezes maiores e a diluição OP-BSA 1:20 ($p < 0,05$), 2,4 vezes mais de EPA. O DHA não está presente no meio de cultura, no BSA e nos complexos OI-BSA, e somente presente nos complexos OP-BSA.

As razões n-6/n-3 apresentadas pelos complexos OP- e OI-BSA estão muito próximas das apresentadas pelos seus respectivos óleos de origem, razões características de óleos com quantidades maiores de ácidos graxos da família ômega-3 que da família ômega-6 na sua constituição. Os complexos OP-BSA apresentam razão n-6/n-3 igual a 0,1 (OP-BSA Puro), 0,2 (OP-BSA 1:5 e 1:10) e 0,3 (OP-BSA 1:8 e 1:20), enquanto o óleo de peixe apresentou razão n-6/n-3 de 0,3. Os complexos OI-BSA também mantiveram a razão n-6/n-3 muito próxima do *oro inka* (0,6). O complexo OI-BSA Puro apresentou razão n-6/n-3 igual a 0,7, as diluições OI-BSA 1:5 e 1:8 apresentaram razão de 0,8, enquanto as proporções OI-BSA 1:10 e 1:20, razão igual a 0,9.

TABELA 3 - PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS (g/100g DE ÁCIDOS GRAXOS TOTAIS), OBTIDO POR HPLC (*HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY*) DO MEIO, BSA, COMPLEXOS OP E OI-BSA. OS VALORES CORRESPONDEM À MÉDIA \pm EPM. a $p < 0,05$ vs MEIO, b $p < 0,05$ vs BSA, c $p < 0,05$ vs GRUPO CORRESPONDENTE OI-BSA.

ÁCIDOS GRAXOS	GRUPOS					
	MEIO	OP-BSA PURO	OP-BSA 1:5	OP-BSA 1:8	OP-BSA 1:10	OP-BSA 1:20
Láurico (12:0)	69,3 \pm 3,6	12,5 \pm 5,6	24,2 \pm 7,4	48,2 \pm 0,6	51,9 \pm 0,05	55,3 \pm 0,04
Mirístico (14:0)	0,09 \pm 0,09	9,8 \pm 0,2	8,7 \pm 1,8	3,5 \pm 0,04	3,5 \pm 0,2	2,3 \pm 0,02
Palmítico (16:0)	24,9 \pm 0,2	18,4 \pm 0,6	15,6 \pm 3,8	19,2 \pm 5,7	20,7 \pm 1,7	25,9 \pm 0,8
Estearíco (18:0)	2,9 \pm 1,4	4,4 \pm 0,4	4,5 \pm 0,3	6,5 \pm 0,04	5,6 \pm 0,04	4,3 \pm 2,2

continua

TABELA 3 - PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS (g/100g DE ÁCIDOS GRAXOS TOTAIS), OBTIDO POR HPLC (HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY) DO MEIO, BSA, COMPLEXOS OP E OI-BSA. OS VALORES CORRESPONDEM À MÉDIA±EPM. a p<0,05 vs MEIO, b p<0,05 vs BSA, c p<0,05 vs GRUPO CORRESPONDENTE OI-BSA.

continuação

ÁCIDOS GRAXOS	GRUPOS					
	MEIO	OP-BSA PURO	OP-BSA 1:5	OP-BSA 1:8	OP-BSA 1:10	OP-BSA 1:20
Oléico (18:1n-9)	0,8±0,6	9,6±1,2	5,9±2,2	3,0 ±0,4	2,9±0,005	1,7±0,9
Linoléico (18:2n-6)	0,08±0,08	3,0±0,2	3,8±0,8	2,1±0,6	1,6±0,3	1,0±0,3
Linolênico (18:3n-3)	0,5±0,3 ^b	0,4±0,2 ^{b,c}	0,1±0,03 ^{b,c}	0,1±0,01 ^{b,c}	0,2±0,005 ^{b,c}	0,1±0,03 ^{b,c}
Araquidônico (20:4n-6)	0,6±0,6	0,9±0,8	0,6±0,5	0,5±0,07	0,4±0,3	0,3±0,2
EPA (20:5n-3)	0,7±0,3	18,4±1,2 ^{a,b,c}	13,8±2,5 ^{a,b,c}	6,0±0,4 ^{a,b,c}	5,3±0,07 ^{a,b,c}	2,8±0,2 ^{a,c}
DHA (22:6n-3)	-	13,6±2,6 ^{a,b,c}	9,2±2,2 ^{a,b,c}	2,7±0,07 ^{a,b,c}	2,9±0,02 ^{a,b,c}	1,7±0,06 ^{a,b,c}
Razão n-6/n-3	0,5	0,1	0,2	0,3	0,2	0,3
ÁCIDOS GRAXOS	GRUPOS					
	BSA	OI-BSA PURO	OI-BSA 1:5	OI-BSA 1:8	OI-BSA 1:10	OI-BSA 1:20
Láurico (12:0)	55,9±3,0	35,9±0,7	17,8±3,5	20,9±0,4	21,1±0,1	24,8±0,3
Mirístico (14:0)	1,6±1,2	0,4±0,02	2,6±0,7	3,1±0,06	3,1±0,03	3,8±0,05
Palmítico (16:0)	21,3±2,5	14,6±0,1	15,8±2,0	18,1±0,01	17,2±0,3	20,7±0,09
Esteárico (18:0)	6,5±0,06	3,5±0,1	4,7±0,3	6,5±0,06	5,1±0,07	7,6±0,02
Oléico (18:1n-9)	6,6±0,005	5,3±0,4	9,4±0,03	9,7±0,03	8,8±0,08	9,2±0,03
Linoléico (18:2n-6)	3,6±0,05	16,5±0,5	16,5±1,3	16,7±0,08	17,5±0,3	13,5±0,1
Linolênico (18:3n-3)	2,6±0,2 ^a	23,1±0,9 ^{a,b}	22,7±1,6 ^{a,b}	22,1±0,2 ^{a,b}	20,7±0,3 ^{a,b}	16,5±0,4 ^{a,b}

continua

TABELA 3 - PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS (g/100g DE ÁCIDOS GRAXOS TOTAIS), OBTIDO POR HPLC (*HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY*) DO MEIO, BSA, COMPLEXOS OP E OI-BSA. OS VALORES CORRESPONDEM À MÉDIA±EPM. a $p<0,05$ vs MEIO, b $p<0,05$ vs BSA, c $p<0,05$ vs GRUPO CORRESPONDENTE OI-BSA. conclusão

ÁCIDOS GRAXOS	GRUPOS					
	BSA	OI-BSA PURO	OI-BSA 1:5	OI-BSA 1:8	OI-BSA 1:10	OI-BSA 1:20
Araquidônico (20:4n-6)	1,0±0,1	1,2±0,1	1,1±0,02	1,6±0,2	1,2±0,005	1,4±0,5
EPA (20:5n-3)	1,6±0,6	0,6±0,05	0,3±0,01	0,2±0,001	0,2±0,02	0,2±0,01
DHA (22:6n-3)	-	-	-	-	-	-
Razão n-6/n-3	0,7	0,7	0,8	0,8	0,9	0,9

A TABELA 4 apresenta os perfis de ácido graxos insaturados apresentados pelos soros dos animais, empregados no cultivo das células tumorais. A suplementação com óleo de peixe foi capaz de aumentar o percentual do ácido graxo α -linolênico, família ômega-3, no soro dos animais em aproximadamente 6 vezes quando comparado quando à do soro de animais controle (Soro C Puro, 1:5 e 1:10) ($p<0,05$), 5 vezes quando comparado aos suplementados com *oro inka* (Soro OI Puro, 1:4 e 1:10) ($p<0,05$) e controle com tumor (Soro Ctw 1:5 e 1:10) ($p<0,05$). A suplementação com óleo de peixe foi capaz de aumentar o percentual de EPA e DHA em 1 a 2 vezes, enquanto a suplementação com *oro inka* provocou incremento de 1 a 2 vezes do percentual de EPA.

TABELA 4 – PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS INSATURADOS (g/100g DE ÁCIDOS GRAXOS TOTAIS), OBTIDO POR HPLC (HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY) DO SORO DOS ANIMAIS. OS VALORES CORRESPONDEM À MÉDIA±EPM. a p<0,05 vs GRUPO CORRESPONDENTE SORO C, b p<0,05 vs GRUPO CORRESPONDENTE SORO OP, c p<0,05 vs GRUPO CORRESPONDENTE SORO OI, d p<0,05 vs GRUPO CORRESPONDENTE SORO Ctw.

ÁCIDOS GRAXOS	GRUPOS			
	SORO C PURO	SORO C 1:4	SORO C 1:5	SORO C 1:10
Oléico (18:1n-9)	9,1±1,1	5,3±0,03	5,1±0,02	4,5±0,2
Linoléico (18:2n-6)	22,7±1,6	8,4±0,0	8,2±0,5	5,4±0,03
Linolênico (18:3n-3)	2,2±0,5 ^b	0,8±0,03 ^{c,d}	0,9±0,01 ^{b,d}	0,8±0,01 ^{b,c,d}
Araquidônico (20:4n-6)	17,8±1,6	6,0±0,02	6,4±0,3	3,9±0,1
EPA (20:5n-3)	0,9±0,3	0,1±0,1 ^c	-	-
DHA (22:6n-3)	2,9±0,4	0,7±0,07 ^{b,d}	0,7±0,03 ^{b,d}	0,3±0,01 ^{b,d}
Razão n-6/n-3	7	9	9	8
ÁCIDOS GRAXOS	GRUPOS			
	SORO OP PURO	SORO OP 1:4	SORO OP 1:5	SORO OP 1:10
Oléico (18:1n-9)	10,4±0,04	9,9±0,2	9,9±0,4	9,9±0,3
Linoléico (18:2n-6)	24,2±0,8	16,5±0,2	16,1±0,2	11,8±0,5
Linolênico (18:3n-3)	5,7±0,5 ^c	6,5±1,9 ^c	7,0±0,05 ^{c,d}	5,9±1,2 ^d
Araquidônico (20:4n-6)	12,8±0,4	9,1±0,2	7,8±0,4	5,7±0,1
EPA (20:5n-3)	2,1±0,2 ^c	2,0±0,6	2,0±0,3 ^a	1,6±0,3 ^{a,d}
DHA (22:6n-3)	4,1±0,2 ^c	2,4±0,01	2,1±0,2	1,2±0,4 ^d
Razão n-6/n-3	3	2	2	2
ÁCIDOS GRAXOS	GRUPOS			
	SORO OI PURO	SORO OI 1:4	SORO OI 1:5	SORO OI 1:10
Oléico (18:1n-9)	10,1±0,4	13,6±2,2	12,6±1,7	12,8±3,0
Linoléico (18:2n-6)	23,4±0,6	16,9±0,6	13,0±1,0	7,6±1,9
Linolênico (18:3n-3)	1,7±0,1	1,9±0,06 ^d	1,6±0,2	1,9±0,1 ^d
Araquidônico (20:4n-6)	20,3±1,7	15,1±1,4	11,4±1,7	5,6±0,7
EPA (20:5n-3)	1,1±0,1	1,4±0,1	1,2±0,2 ^a	1,3±0,01
DHA (22:6n-3)	2,7±0,3	1,9±0,5	1,5±0,6	1,1±0,9
Razão n-6/n-3	8	6	6	3

continua

TABELA 4 – PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS INSATURADOS (g/100g DE ÁCIDOS GRAXOS TOTAIS), OBTIDO POR HPLC (*HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY*) DO SORO DOS ANIMAIS. OS VALORES CORRESPONDEM À MÉDIA±EPM. a $p<0,05$ vs GRUPO CORRESPONDENTE SORO C, b $p<0,05$ vs GRUPO CORRESPONDENTE SORO OP, c $p<0,05$ vs GRUPO CORRESPONDENTE SORO OI, d $p<0,05$ vs GRUPO CORRESPONDENTE SORO Ctw.

ÁCIDOS GRAXOS	GRUPOS				conclusão
	SORO Ctw PURO	SORO Ctw 1:4	SORO Ctw 1:5	SORO Ctw 1:10	
Oléico (18:1n-9)	6,1±0,03	14,9±0,3	14,6±0,5	2,7±0,2	
Linoléico (18:2n-6)	21,3±2,5	17,3±0,4	15,0±1,1	4,8±0,3	
Linolênico (18:3n-3)	4,0±1,3	1,4±0,03	1,6±0,06	0,9±0,01	
Araquidônico (20:4n-6)	17,9±1,9	13,7±0,1	11,9±0,2	3,7±0,3	
EPA (20:5n-3)	0,6±0,3	0,4±0,05	0,3±0,02	-	
DHA (22:6n-3)	3,8±0,7	2,6±0,2	1,9±0,005	0,7±0,06	
Razão n-6/n-3	4	6	6	5	

A razão n-6/n-3 foi calculada para cada amostra (TABELA 4), sendo que o grupo Soro C apresentou razão n-6/n-3 de 7 (Soro C Puro), 9 (Soro C 1:3 e 1:5) e 8 (Soro C 1:10). A suplementação com óleo de peixe rico em ômega-3 foi capaz de modificar esta razão. O grupo Soro OP Puro apresentou razão n-6/n-3 igual a 3 e as demais diluições, 2, devido ao incremento do percentual de ácidos graxos ômega-3 no soro destes animais. O mesmo efeito é notado, mas em menor impacto, 1,5 a 2 vezes, para o soro dos animais suplementados com oro inka, sendo a razão apresentada pelo grupo Soro OI Puro de 8 e nas diluições 1:3 e 1:5, razão n-6/n-3 igual a 6. Os animais controles com tumor (Ctw) apresentaram razão de 4 (Soro Ctw Puro), 6 (Soro Ctw 1:3 e 1:5) e 5 (Soro Ctw 1:10).

5.3 APOPTOSE DAS CÉLULAS TUMORAIS

A apoptose foi determinada por citometria de fluxo pela marcação com anexina V e 7AAD e, os dados, apresentados em *density plot*. Abaixo, estão as representações gráficas ilustrativas dos grupos experimentais, sendo o Meio apresentado na FIGURA 4, BSA na FIGURA 5, OP na proporção de 1:8 na FIGURA

6 e OI na proporção de 1:8 na FIGURA 7. No quadrante inferior esquerdo, está representada a porcentagem de células viáveis (VIÁVEIS) e no quadrante superior esquerdo, as células marcadas com 7AAD, representando células em necrose (NECROSE). No quadrante direito, há a representação das células em apoptose, marcadas somente com anexina V e com anexina + 7AAD (APOPTOSE).

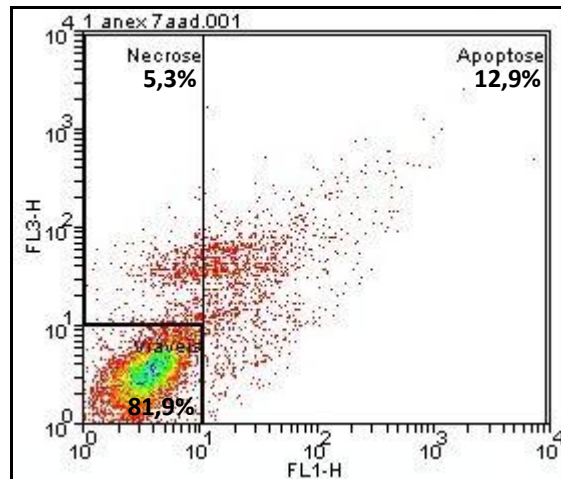


FIGURA 4 - GRÁFICO DE *DENSITY PLOT* MOSTRANDO A INCORPORAÇÃO DE ANEXINA V E/OU 7AAD PELAS CÉLULAS TUMORAIS CULTIVADAS NA PRESENÇA DE MEIO DE CULTURA (MEIO).

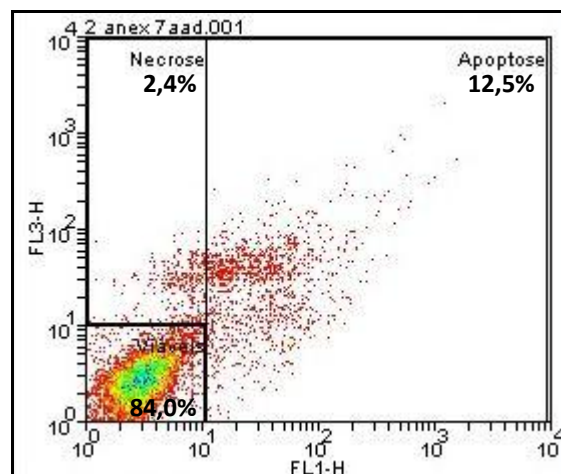


FIGURA 5 - GRÁFICO DE *DENSITY PLOT* MOSTRANDO A INCORPORAÇÃO DE ANEXINA V E/OU 7AAD PELAS CÉLULAS TUMORAIS CULTIVADAS NA PRESENÇA DE ALBUMINA BOVINA SÉRICA (BSA).

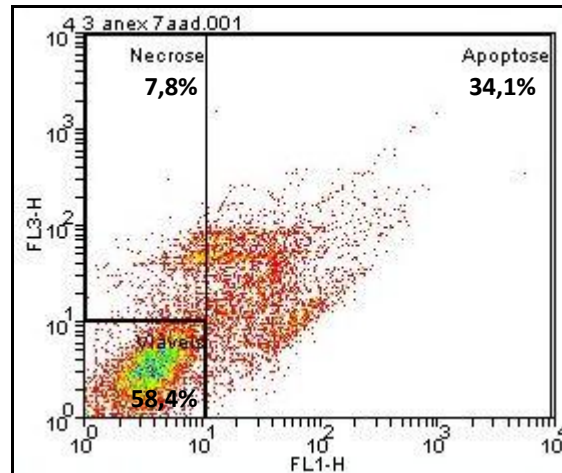


FIGURA 6 - GRÁFICO DE *DENSITY PLOT* MOSTRANDO A INCORPORAÇÃO DE ANEXINA V E/OU 7AAD PELAS CÉLULAS TUMORAIS CULTIVADAS NA PRESENÇA DE OP-BSA NA PROPORÇÃO DE 1:8 (OP 1:8).

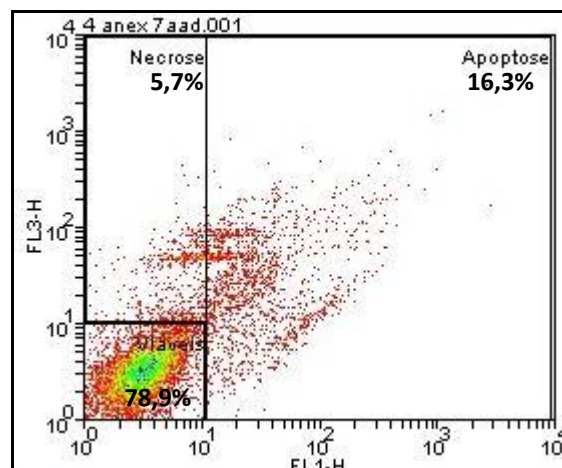


FIGURA 7 - GRÁFICO DE *DENSITY PLOT* MOSTRANDO A INCORPORAÇÃO DE ANEXINA V E/OU 7AAD PELAS CÉLULAS TUMORAIS CULTIVADAS NA PRESENÇA DE OI-BSA NA PROPORÇÃO DE 1:8 (OI 1:8).

O cultivo com a presença de OP-BSA foi capaz de aumentar a porcentagem de células tumorais em apoptose, em todas as proporções, quando comparadas à dos grupos Meio e BSA. O grupo OP 1:5 apresentou aumento de 2,8 vezes ($p < 0,05$); o grupo OP 1:8 incremento de 2,4 vezes ($p < 0,05$); enquanto os grupos OP 1:10 e OP 1:20, aumento de 2,8 vezes ($p < 0,05$) e 3,5 vezes ($p < 0,05$), respectivamente. As células tumorais cultivadas na presença de OP-BSA também apresentaram maior apoptose quando comparadas à dos seus respectivos grupos OI-BSA, em relação às diluições. O grupo OP 1:5 foi o que apresentou maior elevação da porcentagem de células em apoptose, 2 vezes ($p < 0,05$), quando comparada à de seu respectivo grupo OI 1:5. Para os demais grupos OP, o aumento da porcentagem de células em

apoptose foi de 1,5 vezes ($p < 0,05$) para o grupo OP 1:8, 1,6 vezes ($p < 0,05$) no grupo OP 1:10 e aumento de 1,9 vezes ($p < 0,05$) para o grupo OP 1:20, quando comparados ao de seu respectivo grupo OI (FIGURA 8).

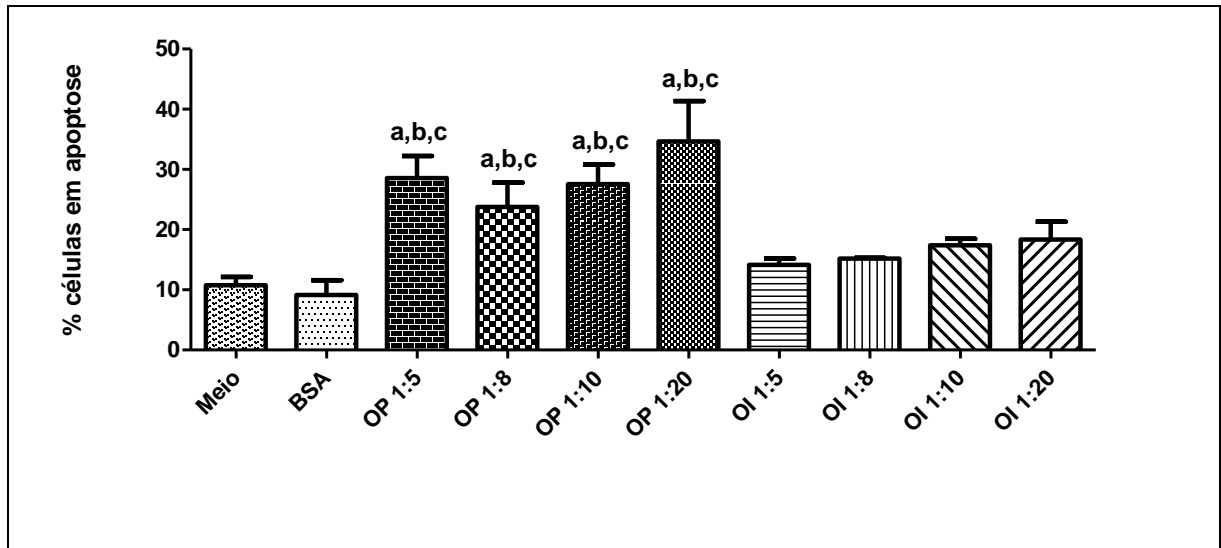


FIGURA 8 - PORCENTAGEM DE CÉLULAS TUMORAIS MARCADAS COM ANEXINA V E 7-AAD, CULTIVADAS DURANTE 24 HORAS NA AUSÊNCIA (MEIO E BSA) OU PRESENÇA DOS COMPLEXOS OP E OI-BSA. OS DADOS SÃO EXPRESSOS EM MÉDIA±EPM DE 3 EXPERIMENTOS EM OCTUPLICATAS. a $p < 0,05$ vs MEIO, b $p < 0,05$ vs BSA, c $p < 0,05$ vs GRUPO CORRESPONDENTE OI.

5.4 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA Bcl-2

A expressão da proteína Bcl-2, envolvida no processo de apoptose, nas células tumorais cultivadas por 24 horas na ausência (Meio e BSA) ou na presença dos complexos OP-BSA e OI-BSA, ambos na proporção de 1:8, está representada na FIGURA 9. A presença de OP-BSA na cultura de células tumorais promoveu redução na expressão desta proteína. A expressão proteica no grupo OP 1:8 foi 14% ($p < 0,05$) menor quando comparada à do Meio, 22% ($p < 0,05$) menor em relação à do grupo BSA e em 15% menor ($p < 0,05$) quando comparada à do OI 1:8.

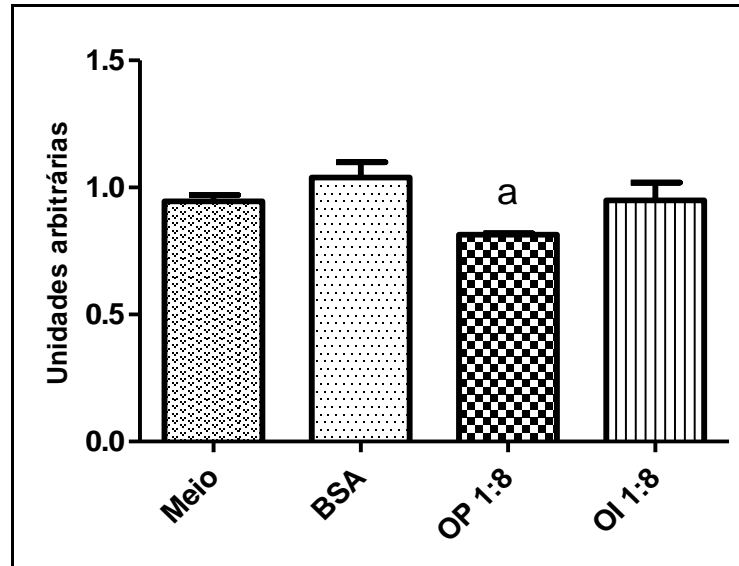
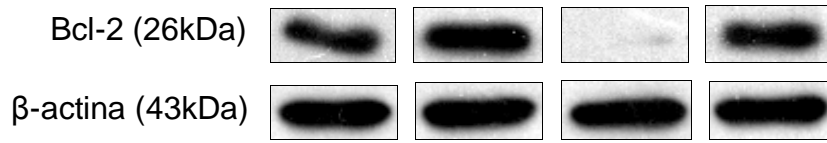


FIGURA 9 - EXPRESSÃO DA PROTEÍNA BCL-2 EM CÉLULAS TUMORAIS CULTIVADAS DURANTE 24 HORAS NA AUSÊNCIA (MEIO E BSA) OU PRESENÇA DOS COMPLEXOS OP E OI-BSA NA PROPORÇÃO DE 1:8. OS DADOS SÃO EXPRESSOS EM MÉDIA±EPM DE 3 EXPERIMENTOS EM OCTUPLICATAS. a $p < 0,05$ vs MEIO, BSA e OI 1:8.

6 DISCUSSÃO

O papel da nutrição como fator ambiental no desenvolvimento de doenças tem sido amplamente estudado. O aumento da incidência de muitas doenças está correlacionado a modificações no padrão da dieta. Nas últimas décadas, houve aumento da prevalência de doenças crônicas como câncer, diabetes, arteriosclerose, obesidade, doenças cardiovasculares, entre outras. Concomitantemente, observou-se aumento progressivo do consumo de alimentos ricos em açúcares e gorduras saturadas, ácidos graxos da família n-6 e ácidos graxos *trans*, e redução na ingestão de ácidos graxos da família n-3 e antioxidantes (SIMOPOULOS, 2008, PATTERSON *et al.*, 2011).

O câncer é umas das doenças com maior incidência no mundo e no Brasil, sendo que muitas pesquisas são realizadas na busca de melhores métodos de prevenção e tratamento. No âmbito nutricional, os AGPI n-3 foram elucidados como boas fontes alimentares na melhora desta patologia. O início da pesquisa foi na área cardiovascular e observou-se que esquimós da Groelândia e, posteriormente, populações asiáticas apresentavam menores índices de doenças crônicas, enquanto nas populações ocidentais, a ocorrência destas doenças era maior. A diferença encontrada foi na alimentação. Esquimós e asiáticos tinham como hábito o consumo de peixes, fontes alimentares ricas em AGPI n-3 EPA e DHA e menor consumo de AGPI n-6. Desde então, muitos estudos correlacionam o consumo destes ácidos graxos (EPA e DHA) e do seu parental, ALA, a efeitos benéficos nestas doenças (ANAND *et al.*, 2008; SIMOPOULOS, 2008; HASSAN *et al.*, 2010). A maior parte das pesquisas relacionadas nesta área postulam os efeitos anti-carcinogênicos do EPA e DHA, enquanto estudos que avaliam os efeitos do ALA são em menor número (ANDERSON *et al.*, 2009).

Os AGPI n-3, EPA e DHA, apresentam significativos efeitos sobre o crescimento e a proliferação de células tumorais. Estes ácidos graxos, ricamente presentes no óleo de peixe, apresentaram efeitos anti-proliferativo em células do tumor de Walker, *in vivo* (TOGNI *et al.*, 2003; PINTO JR *et al.*, 2004; PIZATO *et al.*, 2005; MUND *et al.*, 2007, SCHIESSEL, 2011) e *in vitro* (OLIVEIRA, 2006). Os efeitos na redução da proliferação celular também podem ser observados em culturas de

linhagens de células cancerosas *in vitro* (LLOR *et al.*, 2003; ANDERSON *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2012).

Células ascíticas obtidas do tumor de Walker 256 foram cultivadas na presença de OP-BSA em diferentes diluições (FIGURA 2). Quando comparado aos seus controle (Meio) e veículo (BSA), as células cultivadas na presença do óleo de peixe apresentaram proliferação celular 50% menor, corroborando os resultados encontrados por outros autores (TOGNI *et al.*, 2003; PINTO JR *et al.*, 2004; PIZATO *et al.*, 2005; MUND *et al.*, 2007; OLIVEIRA, 2006). A ação anti-proliferativa apresentada pelo óleo de peixe é devida a ação destes ácidos graxos, EPA e DHA, sobre as vias de proliferação. A inserção destes ácidos graxos nas membranas das células tumorais modifica vias de sinalização cuja resposta poderá ser a redução da taxa de proliferação (LARSSON *et al.*, 2004). Neste trabalho não foram avaliadas a expressão de proteínas envolvidas nesta via, entretanto, OLIVEIRA (2006) demonstrou que o óleo de peixe-BSA complexado, *in vitro*, foi capaz de reduzir a expressão das proteínas AKT e ERK 1/2, envolvidas em vias de proliferação e crescimento de tumores, nas células do tumor de Walker 256.

Estudos demonstraram que o consumo de ALA através da dieta ou por suplementação com óleo é eficaz em reduzir o crescimento tumoral e a proliferação de células neoplásicas, *in vivo* (CHEN *et al.*, 2004). Os resultados se mostram frágeis quando se verifica que a fonte de ALA utilizada foi a linhaça, ótima fonte de ALA e também de lignanas, fitoesteróides que também apresentam efeitos protetores no câncer (OIKARINEN *et al.*, 2005; BOMMAREDDY *et al.*, 2010). Além disso, quando administrado em óleo, o ALA é misturado a outros ácidos graxos e antioxidantes, interferindo na avaliação de seus os efeitos no câncer (ANDERSON, *et al.*, 2009). Suplementação com *oro inka*, rico em ALA, foi capaz reduzir a proliferação de células do tumor de Walker, *in vivo* (SCHIESSEL, 2011). As pesquisas *in vivo* não conseguiram esclarecer se os efeitos antitumorigênicos apontados são decorrentes do efeito do ALA ou de seus metabólitos.

Os estudos *in vitro* que avaliaram a proliferação de células neoplásicas na presença do ALA são em menor número e antagônicos em seus resultados. A presença deste ácido graxo foi eficaz na redução da proliferação celular em linhagem de câncer de próstata (TOIT *et al.*, 1996) e em linhagem HT-29 de adenocarcinoma de cólon, mas não alterou no tipo CaCo-2 de mesma linhagem (LLOR *et al.*, 2003).

Quando cultivadas na presença de OI-BSA em diferentes proporções (FIGURA 2), as células tumorais ascíticas de Walker 256 não apresentaram alteração na proliferação celular. Com exceção da diluição 1:5, cuja proliferação foi 18% menor (vs Meio e BSA). BOMMERADDY *et al.* (2003) encontraram resultados positivos para redução da taxa de proliferação em estudos *in vitro* com linhagem celular CoCa-2 de adenocarcinoma de cólon, mas somente na maior concentração de ALA em seu estudo, de 700µM.

As divergências dos resultados encontrados na literatura com nossos dados podem ser elucidadas por diferenças no tempo de cultura celular e nas doses utilizadas. As células do tumor de Walker 256 foram aqui cultivadas por 24 horas assim tal como no estudo de LLOR *et al.* (2003). Entretanto, no trabalho de TOIT *et al.* (1996), os resultados de redução da proliferação celular só foram encontrados em períodos maiores de cultivo de 48, 96 e 144 horas de incubação. As doses de ALA utilizadas nos estudos foram diferentes e podem influenciar os resultados obtidos. No estudo de LLOR *et al.* (2003), a dose utilizada de ALA correspondeu a 0,2mM e este foi diluído em etanol. No trabalho de TOIT *et al.* (1996) a concentração final deste ácido graxo foi de 200µmol/l e foi diluído em etanol e complexado à BSA, mimetizando os ácidos graxos ligados à albumina *in vivo*.

Mamíferos, inclusive humanos, quando consomem os ácidos graxos linoléico e α-linolênico na dieta são capazes de convertê-los em seus metabólitos (AA, EPA e DHA). O processo de dessaturação e alongação dos AGPI LA e ALA acontece primordialmente no fígado (SIMOPOULOS, 2008; HULL, 2011; PATTERSON *et al.*, 2011) e os ácidos graxos de cadeia longa, produtos da conversão, são exportados para a circulação e podem ser incorporados em outros tecidos. O tumor quando instalado no indivíduo portador de tumor fica exposto a substâncias que circulam no organismo. Para tentar mimetizar a ação que os metabólitos do LA e ALA circulantes têm sobre as células cancerosas, foi realizado ensaio de cultura de células ascíticas do tumor de Walker 256 na presença de soro de animais controle, portadores de tumor e suplementados com óleo de peixe e *oro inka*.

Para os ensaios de proliferação, os óleos utilizados no cultivo das células ascíticas do tumor de Walker 256 foram complexados à albumina para mimetizar as condições fisiológicas do organismo. Os ácidos graxos, pela sua insolubilidade em meio aquoso, são carregados associados a proteínas. Para a constatação da presença de AGPI n-3 nos complexados óleos-BSA e nos soros dos animais foi

realizado o perfil de ácidos graxos presentes nesses compostos. Conforme a TABELA 3, o perfil de ácidos graxos insaturados presentes no complexo OP-BSA determina o predomínio dos AGPI n-3 EPA e DHA (vs Meio, BSA e seus respectivos OI-BSA). O complexo OI-BSA apresentou predomínio do AGPI n-3 α -linolênico (vs Meio, BSA e seus respectivos OP-BSA).

No perfil de ácidos graxos no soro dos animais (TABELA 4 e ANEXO 1), observa-se que o soro dos animais suplementados com óleo de peixe possui percentual de ALA, em relação a outros ácidos graxos, aproximadamente 6 vezes maior (vs Soro C Puro, 1:5 e 1:10) e o soro de animais suplementados com *oro inka*, percentual 2 vezes maior (vs Soro C 1:3 e 1:10). O EPA foi encontrado em baixíssimas quantidades ou ausente no soro de animais controle. A suplementação com óleo de peixe (vs Soro C 1:5 e 1:10) e *oro inka* (vs Soro C 1:3 e 1:5) foi capaz de provocar aumento, de aproximadamente 1 a 2 vezes, desse ácido graxo no soro dos animais, e em 1 a 2 vezes as quantidades de DHA no grupo OP (vs Soro C 1:3, 1:5 e 1:10). Esses resultados demonstram que, quando se fornece EPA e DHA a partir do óleo de peixe, realmente há incremento desses metabólitos no soro dos animais e, ainda, que a suplementação de *oro inka*, rico em ALA promove aumento de seus metabólitos no soro, pela conversão desse ácido graxo que ocorre primordialmente no fígado. O soro dos animais, em todas as diluições, possui elevada quantidade de ácido linoléico. Este ácido graxo pertencente à família n-6 é uma das principais fontes de ácido graxo da ração (TABELA 1) oferecida para os animais durante o período de experimentação. Assim, a quantidade elevada encontrada no soro pode ser reflexo da alimentação oferecida aos animais.

Os nossos resultados corroboram os de outros autores. MIYASAKA *et al.* (2001) observaram aumento de EPA e DHA no plasma de animais pós-desmame com suplementação de óleo de peixe por 4 semanas. BURDGE *et al.*, (2003) demonstraram, em humanos, que o consumo de ALA, EPA e DHA associados à dieta por 8 semanas proporcionaram aumento de α -linolênico e EPA em fosfolípídeos de membrana de triglicerídeos no plasma de indivíduos saudáveis. PRAT *et al.* (2002), observaram que a suplementação por 2 semanas com óleo de peixe foi capaz de aumentar as quantidades de EPA e DHA em fosfolípídeos da membrana de neutrófilos do sangue periférico de indivíduos neoplásicos. Entretanto, como a conversão de ALA em EPA e DHA em humanos é limitada e reduzida

(BURDGE, 2004), os resultados apresentados pelos estudos em humanos somente são possíveis com ingestão elevada desses ácidos graxos.

As quantidades de AGPI n-6 no soro dos animais não foram diferentes entre os grupos. Importante destacar que o incremento de α -linolênico, EPA e DHA nos grupos suplementados foi capaz de provocar alterações importantes na razão n-6/n-3 apresentada pelo grupo OP e OI. O cálculo desta razão nos permite avaliar o predomínio de AGPI n-6 *versus* n-3. Razões com valores baixos indicam maiores quantidades de ácidos graxos n-3, enquanto valores altos correspondem a maiores quantidades de n-6. O soro de animais controle, para todas as diluições, apresentou razão n-6/n-3 entre mínimo de 7 e máximo de 9. Os animais quando suplementados com óleo de peixe apresentaram redução deste valor em 3 vezes. Nos animais suplementados com *oro inka* esta redução foi de menor impacto, e a razões n-6/n-3, para todas as proporções, foi de mínimo de 3 e máximo de 8. A modificação da razão n-6/n-3 demonstra que a suplementação de óleo de peixe e de *oro inka* aumentaram as quantidades de AGPI n-3 circulantes nos animais e, apesar de não ter sido investigado, aventamos que a incorporação desses ácidos graxos também esteja aumentada em outros tecidos.

O soro dos animais foi utilizado no cultivo de células ascíticas obtidas do tumor de Walker 256 (FIGURA 3). O perfil dos ácidos graxos EPA, DHA e ALA apresentado pelo soro dos animais suplementados com óleo de peixe e *oro inka* não foi suficiente para alterar a proliferação celular quando comparado à Meio, BSA e Soro C. O grupo Soro Ctw, em todas as diluições, apresentou estímulo na proliferação tumoral, sendo maior significativamente (vs. Soro C, OP e OI). O ambiente carcinogênico é repleto de mediadores inflamatórios e fatores de crescimento que estimulam a proliferação celular e o crescimento tumoral (CALDER 2012). Animais portadores do tumor de Walker 256 possuem quantidades maiores de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e a IL-6 circulantes (SCHIESSEL, 2011) e produção de PGE₂ no tecido tumoral (MUND *et al.*, 2007). A PGE₂ estimula a progressão tumoral por inibir a apoptose e estimular a proliferação das células neoplásicas, sendo, geralmente, encontrada em altas concentrações nestas células (LARSSON *et al.*, 2004). Aventamos a hipótese de que a presença em maior quantidade desses mediadores inflamatórios no soro dos animais portadores de tumor estimulou a proliferação celular neste grupo.

Os nossos resultados *in vitro* demonstram que a presença de OP-BSA foi capaz de reduzir a proliferação celular, situação não observada para os grupos OI-BSA. Estes resultados *in vitro* corroboram com estudos *in vivo* que demonstraram que a suplementação com óleo de peixe possui efeito anti-proliferativo e anti-tumoral e a suplementação com *oro inka* também é capaz de produzir os mesmos efeitos, que deve acontecer pela conversão do ALA em seus metabólitos EPA e DHA (TOGNI *et al.*, 2003; PINTO JR *et al.*, 2004; PIZATO *et al.*, 2005; MUND *et al.*, 2007; SCHIESSEL, 2011). Entretanto, a presença do soro de animais suplementados com óleo de peixe e *oro inka* não foi capaz de alterar a proliferação nas células tumorais. A utilização do soro é importante e ocorreu com o objetivo de mimetizar fisiologicamente a exposição de células tumorais aos AGPI n-3 circulantes. Entretanto, o maior percentual de ácidos graxos EPA, DHA e ALA presentes no soro dos animais suplementados com óleo de peixe e *oro inka* não foi capaz de alterar a proliferação celular. Aventamos a idéia de que no soro dos animais podem ser encontrados fatores de crescimento que são capazes de estimular a proliferação celular, impedindo que os efeitos dos AGPI n-3 pudessem ser observados.

O processo de carcinogênese é dependente de elevada capacidade proliferativa e resistência à morte. A apoptose, ou morte celular, é processo ativo e necessário para a manutenção da homeostase tecidual, eliminando células modificadas geneticamente e que potencialmente podem dar início à carcinogênese. As células que passam por apoptose sofrem mudanças conformacionais morfológicas e internas que culminam na fragmentação do DNA e morte celular. São duas as vias envolvidas no processo apoptótico: extrínseca ativada pela ligação de ligantes específicos a receptores da membrana celular e; intrínseca que responde a estímulos intracelulares e é regulada por proteínas. Ambas as vias culminam na ativação de enzimas caspases que promoverão os eventos de morte. No ambiente carcinogênico, há predomínio de ações antagonistas à morte celular: proteínas anti-apoptóticas estão mutadas e com elevada expressão, proteínas agonistas da morte celular sofrem mutação e possuem expressão reduzida, além de possível inibição das caspases efetoras (KELLY *et al.*, 2011; FAVALORO *et al.*, 2012).

Os AGPI EPA e DHA possuem ação pró-apoptótica em células cancerosas demonstrada em estudos *in vitro* em linhagens de células neoplásicas (LLOR *et al.*, 2003; YANG *et al.*, 2012) e em células de tumor de Walker 256 (OLIVEIRA, 2006) e *in vivo* nestas mesmas células (IAGHER, 2008). Os resultados encontrados em

estudos sobre os efeitos do ácido α -linolênico na apoptose de células neoplásicas são antagônicos. Em estudos *in vitro*, o ALA apresenta efeito pró-apoptótico (KIM *et al.*, 2009; BOMMAREDDY *et al.*, 2010), em que não foi possível observar efeito do ácido α -linolênico na apoptose de linhagem de células tumorais (LLOR *et al.*, 2003).

As células ascíticas do tumor de Walker 256, foram cultivadas na ausência e presença de OP e OI-BSA, foram avaliadas em relação à apoptose (FIGURA 8). Nenhuma das diluições do complexo *oro inka*-BSA apresentou significativa diferença na porcentagem de células em apoptose (vs Meio e BSA), corroborando os de LLOR *et al.*, (2003). Na presença do óleo de peixe houve incremento expressivo, em mais de 2 vezes, das células em apoptose quando comparado ao controle (Meio) e veículo (BSA). As células cultivadas na presença de óleo de peixe apresentaram aumento significativo de células em apoptose quando comparadas ao seu respectivo grupo OI. A diluição 1:5 foi a que apresentou incremento mais expressivo, o dobro de células em apoptose (vs OI 1:5). Os resultados encontrados para o grupo OP corroboram com dados prévios do nosso grupo de pesquisa em células do tumor de Walker 256 *in vitro* (OLIVEIRA, 2006) e *in vivo* (MUND *et al.*, 2007) e com outros autores (LLOR *et al.*, 2003; YANG *et al.*, 2012).

Os efeitos dos AGPI n-3 em células neoplásicas podem ser através da ação sobre a expressão e/ou ativação de enzimas caspases e proteínas envolvidas. Muitas proteínas que orquestram o processo de apoptose estão constitutivamente expressas em células viáveis. Em microambiente favorável as atividades pró-apoptóticas e anti-apoptóticas destas proteínas estão reguladas para que a apoptose celular não ocorra. A família das proteínas Bcl-2 está envolvida nesta regulação (DELFT *et al.*, 2006). Esta família é constituída por proteínas pró-apoptóticas, a Bax e a Bak, e por proteínas antagonistas da morte celular, Bcl-2, Bcl-x, entre outras. Pesquisas demonstram que em muitos tipos de câncer, a expressão de Bcl-2 está elevada, favorecendo a proliferação celular e o crescimento tumoral (KELLY *et al.*, 2011; FAVALORO *et al.*, 2012). No presente estudo, a presença do óleo de peixe foi capaz de reduzir a expressão desta proteína (FIGURA 9). A presença do *oro inka* não foi capaz de modificar significativamente a sua expressão, quando comparada à do controle (Meio) e veículo (BSA). A capacidade da presença do óleo de peixe em reduzir significativamente a expressão de Bcl-2 (vs Meio, BSA e OI 1:8), corrobora com dados prévio do nosso grupo de pesquisa (OLIVEIRA, 2006) e com LLOR *et al.* (2003) em culturas *in vitro* de linhagens celulares neoplásicas

A atividade anti-apoptótica da Bcl-2 é antagonizada pela Bax, pró-apoptótica. A razão Bax/Bcl-2 na célula é fator determinante para a sua propensão em entrar em apoptose. Em nosso trabalho, não realizamos a análise da proteína Bax, sendo necessária a investigação desta proteína futuramente. Entretanto, os resultados obtidos da expressão da proteína Bcl-2, nos sugerem o ácido α -linolênico ao ser inserido na membrana de células ascíticas tumorais de Walker 256 não é capaz de produzir os mesmos efeitos que seus metabólitos, na apoptose. Os ácidos graxos EPA e DHA são capazes de modificar a expressão de proteínas envolvidas neste processo, através da ação sobre supressores de tumor como ou fatores de transcrição (HEMMAN *et al*, 2006) e obter como resposta a expressão reduzida de proteínas anti-apoptóticas e ativação as enzimas caspases. O ALA parece não ser capaz de alterar vias de sinalização que têm como resposta final a morte celular.

Nos nossos resultados sugerem que o ácido α -linolênico não apresenta o efeito antitumoral, antiproliferativo e pró-apoptótico tal qual seus metabólitos. Os ácidos linoléico e α -linolênico quando ingeridos a partir da dieta podem ser dessaturados e alongados em seus metabólitos AA, EPA e DHA, respectivamente. Na via de dessaturação e alongação ambos os ácidos graxos competem pela enzima delta6-dessaturase (SIMOPOULOS, 2008, CALDER 2012). Segundo PARK *et al.* (2011), em muitas células neoplásicas este processo não acontece. Sugere-se a via de dessaturação esteja inativa devido a intensas deleções que ocorrem no cromossomo destas células, inativando funcionalmente o gene codificador das enzimas dessaturases. As células neoplásicas não seriam capazes de realizar a conversão dos ácidos graxos parentais, LA e ALA, e somente sofreriam ação de seus metabólitos. Essa pode ser uma das possíveis explicações pela qual a presença do *oro inka* não foi capaz de reduzir a taxa de proliferação celular, aumentar a apoptose e alterar a expressão da proteína Bcl-2 nas células ascíticas do tumor de Walker 256.

7 CONCLUSÃO

No presente estudo foram avaliadas a proliferação e morte celular *in vitro* em células do tumor de Walker 256 na presença de complexado óleo de peixe e *oro inka*-BSA e de soro obtido de animais. Concluímos que em relação à:

Proliferação celular:

- Inalterada: na presença do complexado OI-BSA, com exceção da diluição 1:5, e na presença do soro de animais controle e suplementados com OP e OI.
- Reduzida: na presença do complexado OP-BSA.
- Estimulada: na presença do soro de animais portadores de tumor.

Apoptose celular:

- Inalterada: na presença do complexado OI-BSA.
- Aumentada: na presença do complexado OP-BSA.

Expressão de Bcl-2:

- Inalterada: na presença do complexado OI-BSA.
- Reduzida: na presença do complexado OP-BSA.

Estes resultados sugerem que o ácido α -linolênico não causa o mesmo efeito que seus metabólitos EPA e DHA na proliferação e morte *in vitro* de células ascíticas do tumor de Walker 256.

REFERÊNCIAS

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

ANAND, P. *et al.* Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. **Pharmaceutical Research**, v.25, n.9, 2008.

ANDERSON, B. M.; MA, D. W. L. Are all n-3 polyunsaturated fatty acids created equal? **Lipids in Health and Disease**, v.8, n.33, p.1-20, 2009.

BEYER, R.S.; JENSEN, L.S. Overestimation of the cholesterol content of eggs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.39, p.917-920, 1989.

BOMMAREDDY, A. *et al.* Effects of components present in flaxseed on human colon adenocarcinoma Caco-2 cells: Possible mechanisms of flaxseed on colon cancer development in animals. **Drug Discoveries & Therapeutics**, v.4, n.3, p.184-189, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Estimativas 2012: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, p.26, 2012.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Annal Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BURDGE, G. C. *et al.* Effects of altered dietary n-3 fatty acid intake upon plasma lipid fatty acid composition, conversion of [¹³C]α-linolenic acid to longer-chain fatty acids and partitioning towards β-oxidation in older men. **British Journal of Nutrition**, v.90, n.2, p.311-321, 2003.

BURDGE, G. α-Linolenic acid metabolism in men and women: nutritional and biological implications. **Lipid metabolism and therapy**, v.7, n.2, p.137-144, 2004.

BURDGE, G. C. Metabolism of α-linolenic acid in humans. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.75, p.161-168, 2006.

CALDER, P. C. n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.83, p.1505-1519, 2006.

CALDER, P.C. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: new twists in an old tale. **Biochimie**, v.91, p.791-795, 2009.

CALDER, P.C. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology? **British Journal of Clinical Pharmacology**, v.74, n.4, p.1-43, 2012.

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

COLDITZ, G. A.; SELLERS, T. A.; TRAPIDO, E. Epidemiology – identifying the causes and preventability of cancer? **Nature Review Cancer**, v.6, p.75-83 , 2006

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

DELFT, M. F. van; HUANG, D. C. S. How the Bcl-2 family of proteins interact to regulate apoptosis. **Cell Research**, v.16, p.203-213, 2006.

DEMARK-WAHNEFRIED, W. *et al.* Flaxseed supplementation (not dietary fat restriction) reduces prostate cancer proliferation rates in men presurgery. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.17, p.3577-3587, 2008.

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

FAVALORO, B. *et al.* Role of apoptosis in disease. **Aging**, v.4, n.5, p.330-349, 2012.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for isolation and purification of total lipid from animal tissue. **Journal of Biological Chemistry**, v.226, p.497-509, 1956.

GIACOSA, A.; RONDANELLI, M. Fish oil and treatment of cancer cachexia. **Genes & Nutrition**, v.3, p.25-28, 2008.

GUILLÉN, M. D. *et al.* Characterization of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil by FTIR Spectroscopy and ^1H NMR. Comparison with linseed oil. **JAOCS**, v.80, n.8, p.755-762, 2003.

HAMAKER, B. R. *et al.* Amino acid and fatty acid profiles of the inca peanut (*Plukenetia volubilis*). **Cereal Chemical**, v.69, n.4, p.461-463, 1992.

HASSAN, A. *et al.* An α -linolenic acid-rich formula reduces oxidative stress and inflammation by regulating NF- κ B in rats with TNBS-induced colitis. **The Journal of Nutrition**, n.140, p.1714-1721, 2010.

HARDMAN, W. E. (n-3) fatty acids and cancer therapy. **The Journal of Nutrition**, v.134, n.12, p.3427-3430, 2004.

HEMANN, M. T.; LOWE, S. W. The p53-Bcl-2 connection. **Cell Death and Differentiation**, v.13, p.1256-1259, 2006.

HULL, M. A. Omega-3 polyunsaturated fatty acids. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v.25, p.547-554, 2011.

IAGHER, F. **Efeito da suplementação conjunta crônica com óleo de fígado de tubarão e óleo de peixe sobre o crescimento tumoral, caquexia e atividade linfocitária de ratos Wistar portadores de tumor de Walker 256.** Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

KELLY, P. N.; STRASSER, A. The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumourigeneses and cancer therapy. **Cell Death and Differentiation**, v.18, p.1414-1424, 2011.

KIM, J. *et al.* Growth-inhibitory and proapoptotic effects of alpha-linolenic acid on estrogen-positive breast cancer cells. **Natural Compounds and Their Role in Apoptotic Cell Signaling Pathways**, v.1171, p.190-195, 2009.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.277, p.680-685, 1970.

LARSSON, S. C.; KUMLIN, M.; INGELMAN-SUNDBERG M.; WOLK, A. Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.79, n.6, p.935-945, 2004.

LLOR, X. *et al.* The effects of fish oil, olive oil, oleic acid and linoleic acid on colorectal neoplastic processes. **Clinical Nutrition**, v.22, n.1; p.71-79, 2003.

MIYASAKA, C. K. *et al.* Comparative effects of fish oil given by gavage and fish oil-enriched diet on leukocytes. **Life Science**, v.69, p.1739-1751, 2001.

MOORE, C. **Introduction to Western Blotting**. ABD-Serotec, p. 16, 2009.
Disponível em: <http://www.abdserotec.com/westernblot>, acesso em 03/05/2011.

MORRISON, W. B. Inflammation and cancer: a comparative view. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.16, n.1, p.18-31, 2012.

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

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

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

OLIVEIRA, H. H. P. de. **Cultivo de células ascíticas do tumor de Walker 256 na presença de óleo de peixe-BSA complexado: efeitos sobre a proliferação e morte celular e seus mecanismos de ação**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

PARK, W. J. *et al.* FADS2 function loss at the cancer hotspot 11q13 locus diverts lipid signaling precursor synthesis to unusual eicosanoid fatty acids. **PLoS ONE**, v.6, n.11, p.1-4, 2011.

PATTERSON, E. *et al.* Health implications of high dietary omega-6 polyunsaturated fatty acids. **Journal of Nutrition and Metabolism**, p.1-16, 2011.

PINTO JR, J.A. *et al.* Fish oil supplementation in F1 generation associated with naproxen, clenbuterol, and insulin administration reduce tumor growth and cachexia in Walker 256 tumorbearing rats. **Journal of nutritional biochemistry**, v.15, n.6, p.358-65, 2004.

PIZATO, N. *et al.* Ratio of n6 to n-3 fatty acids in the diet affects tumor growth and cachexia in Walker 256 tumor-bearing rats. **Nutrition and Cancer**, v.53, n.2, p.194-201, 2005.

PRATT, V. C. *et al.* Plasma and neutrophil fatty acid composition in advanced cancer patients and response to fish oil supplementation. **British Journal of Cancer**, v.87, p.1370-1378, 2002.

REUBOLD, T. F.; ESCHENBURG, S. A molecular view on signal transduction by the apoptosome. **Cellular Signalling**, v.24, p.1420-1425, 2012.

SATHE, A. K. *et al.* Isolation, purification, and biochemical characterization of a novel water soluble protein from Inca Peanut (*Plukenetia volubilis* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.4906-4908, 2002.

SCHIESSEL, D. L. **Ácido graxo α -linolênico causa o mesmo efeito que seus derivados de cadeia longa em ratos portadores de tumor de Walker 256? Investigação antitumoral e imunitária.** Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

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

SIMOPOULOS, A. P. Essential fatty acids in health and chronic disease. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, n.3, p.560-569, 1999.

SIMOPOULOS, A. P. Omega-3 fatty acids and cancer. **Indoor and built environment**, v.12, n.6, p.405-412, 2003.

SIMOPOULOS, A. P. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. **Experimental Biology and Medicine**, v.233, n.6, p.674-688, 2008.

STOFFEL, W. *et al.* Δ 6-Desaturase (FADS2) deficiency unveils the role of ω 3- and ω 6-polyunsaturated fatty acids. **The EMBO Journal**, v.27, p.2281-2292, 2008.

THOMPSON, L. U. *et al.* Dietary flaxseed alters tumor biological markers in postmenopausal breast cancer. **Clinical Cancer Research**, v.11, n.10, p.3827-3835, 2005.

TOGNI, V. *et al.* Cancer cachexia and tumor growth reduction in Walker 256 tumor-bearing rats supplemented with N-3 polyunsaturated fatty acids for one generation. **Nutrition and Cancer**, v.46, n.1, p.52-58, 2003.

TOIT, P. J. du; ASWEGEN C. H. van, PLESSIS, D. J. du. The effect of essential fatty acids on growth and urokinase-type plasminogen activator production in human prostate DU-145 cells. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.55, n.3, p.173-177, 1996.

TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.76, n.9, p.4350-4354, 1979.

VALDÉS-RAMOS, R.; BENÍTEZ-ARCINIEGA, A. D. Nutrition and immunity in câncer. **British Journal of Nutrition**, v.98, suppl.1, p.127-132, 2007.

YANG, T. *et al.* N-3 PUFAs have antiproliferative and apoptotic effects on human colorectal cancer stem-like cells in vitro. **Journal Nutrition Biochemistry**, p.1-10, 2012.

ANEXOS

ANEXO 1

PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS (g/100g DE ÁCIDOS GRAXOS TOTAIS), OBTIDO POR HPLC (*HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY*) DO SORO DOS ANIMAIS. OS VALORES CORRESPONDEM À MÉDIA±EPM.

ÁCIDOS GRAXOS	GRUPOS			
	SORO C PURO	SORO C 1:3	SORO C 1:5	SORO C 1:10
Láurico (12:0)	20,1±5,7	46,0±0,09	48,7±1,5	52,1±0,6
Mirístico (14:0)	1,8±0,3	1,8±0,07	2,0±0,03	2,2±0,05
Palmítico (16:0)	19,8±0,6	25,3±0,3	22,9±0,5	25,3±0,2
Esteárico (18:0)	5,4±1,5	5,6±0,2	5,0±0,1	5,4±0,1
Oléico (18:1n-9)	9,1±1,1	5,3±0,03	5,1±0,02	4,5±0,2
Linoléico (18:2n-6)	22,7±1,6	8,4±0,0	8,2±0,5	5,4±0,03
Linolênico (18:3n-3)	2,2±0,5	0,8±0,03	0,9±0,01	0,8±0,01
Araquidônico (20:4n-6)	17,8±1,6	6,0±0,02	6,4±0,3	3,9±0,1
EPA (20:5n-3)	0,9±0,3	0,1±0,1	-	-
DHA (22:6n-3)	2,9±0,4	0,7±0,07	0,7±0,03	0,3±0,01

ÁCIDOS GRAXOS	GRUPOS			
	SORO OP PURO	SORO OP 1:3	SORO OP 1:5	SORO OP 1:10
Láurico (12:0)	12,1±0,8	21,2±0,8	21,4±0,3	27,1±1,1
Mirístico (14:0)	1,7±0,1	3,1±0,2	3,8±0,2	4,1±0,2
Palmítico (16:0)	19,4±0,6	21,3±0,5	22,2±0,4	24,6±0,6
Esteárico (18:0)	7,3±0,3	8,0±0,5	8,2±0,3	7,9±0,4
Oléico (18:1n-9)	10,4±0,04	9,9±0,2	9,9±0,4	9,9±0,3
Linoléico (18:2n-6)	24,2±0,8	16,5±0,2	16,1±0,2	11,8±0,5
Linolênico (18:3n-3)	5,7±0,5	6,5±1,9	7,0±0,05	5,9±1,2
Araquidônico (20:4n-6)	12,8±0,4	9,1±0,2	7,8±0,4	5,7±0,1
EPA (20:5n-3)	2,1±0,2	2,0±0,6	2,0±0,3	1,6±0,3
DHA (22:6n-3)	4,1±0,2	2,4±0,01	2,1±0,2	1,2±0,4

continua

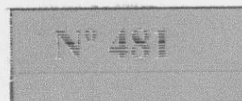
PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS (g/100g DE ÁCIDOS GRAXOS TOTAIS), OBTIDO POR HPLC (*HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY*) DO SORO DOS ANIMAIS. OS VALORES CORRESPONDEM À MÉDIA±EPM.

conclusão				
	GRUPOS			
ÁCIDOS GRAXOS	SORO OI PURO	SORO OI 1:3	SORO OI 1:5	SORO OI 1:10
Láurico (12:0)	11,3±3,7	20,6±6,1	24,1±5,8	33,3±5,0
Mirístico (14:0)	3,2±1,0	5,1±1,3	7,7±2,2	7,7±1,7
Palmítico (16:0)	18,8±1,8	17,6±5,1	21,0±5,2	16,8±4,4
Esteárico (18:0)	7,4±1,3	6,1±2,1	6,2±2,4	4,4±2,7
Oléico (18:1n-9)	10,1±0,4	13,6±2,2	12,6±1,7	12,8±3,0
Linoléico (18:2n-6)	23,4±0,6	16,9±0,6	13,0±1,0	7,6±1,9
Linolênico (18:3n-3)	1,7±0,1	1,9±0,06	1,6±0,2	1,9±0,1
Araquidônico (20:4n-6)	20,3±1,7	15,1±1,4	11,4±1,7	5,6±0,7
EPA (20:5n-3)	1,1±0,1	1,4±0,1	1,2±0,2	1,3±0,01
DHA (22:6n-3)	2,7±0,3	1,9±0,5	1,5±0,6	1,1±0,9
	GRUPOS			
ÁCIDOS GRAXOS	SORO Ctw PURO	SORO Ctw 1:3	SORO Ctw 1:5	SORO Ctw 1:10
Láurico (12:0)	24,5±10,0	25,0±0,1	28,1±3,8	55,1±2,0
Mirístico (14:0)	1,0±0,5	7,6±0,08	8,2±0,6	0,4±0,4
Palmítico (16:0)	15,3±2,6	14,9±1,3	13,6±1,7	26,2±1,3
Esteárico (18:0)	5,1±2,0	1,9±1,8	4,1±1,0	5,5±0,6
Oléico (18:1n-9)	6,1±0,03	14,9±0,3	14,6±0,5	2,7±0,2
Linoléico (18:2n-6)	21,3±2,5	17,3±0,4	15,0±1,1	4,8±0,3
Linolênico (18:3n-3)	4,0±1,3	1,4±0,03	1,6±0,06	0,9±0,01
Araquidônico (20:4n-6)	17,9±1,9	13,7±0,1	11,9±0,2	3,7±0,3
EPA (20:5n-3)	2,6±1,9	0,9±0,05	1,0±0,2	-
DHA (22:6n-3)	3,8±0,7	2,6±0,2	1,9±0,005	0,7±0,06

ANEXO 2



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



CERTIFICADO

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

CERTIFICATION

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


PROCESSO: 23075.036461/2010-22

APROVADO: 21/09/2010 – R.O. 08/2010

TÍTULO: Efeito da suplementação com óleo de peixe sobre o perfil gênico do tecido tumoral de ratos portadores de tumor Walker 256

AUTORES: Luiz Claudio Fernandes, Adriana Aya Yamaguchi, Marcelo Kryczyc, Gina Borghetti, Isabela Coelho

DEPARTAMENTO: Fisiologia


Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio
Coordenador do CEEA