

FRANCILENE DENES

**SUPLEMENTAÇÃO CRÔNICA COM ÓLEO DE PEIXE REDUZ O METABOLISMO
DA GLICOSE EM CÉLULAS DO TUMOR DE WALKER 256, A TAXA DE
CRESCIMENTO TUMORAL E AUMENTA A SOBREVIVÊNCIA DOS ANIMAIS
PORTADORES DE TUMOR**

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

CURITIBA
2002

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes, pela orientação, apoio e paciência durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Profª. MS. Alessandra Folador, pelos ensinamentos, carinho e amizade.

Aos meus avós Maria e Enedino que sempre me deram força e rezaram por mim.

À minha mãe pela paciência, compreensão e apoio financeiro mantidos desde o início de tudo.

À minha tia Alzira e minha prima Leila pela amizade, preocupação e encorajamento nos momentos difíceis.

Ao Edney pelo carinho, companheirismo e incentivo.

Aos meus amigos do laboratório Ricardo, Júlia, Mariana, Sandro, Claudia, Irlena, Fábio, Sibelle e João pela ajuda e descontração durante os experimentos.

À Valéria pelas explicações, apoio e estímulo dados nos momentos importantes.

Aos amigos André, Patrícia, Kelly, Mitzi, Ângela, pela convivência e amizade ao longo do curso de graduação.

Aos funcionários do Biotério pelo enorme auxílio no cuidado com os ratos.

Aos lindos ratinhos que foram sacrificados em nome da Ciência e sem os quais não se poderia realizar este trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	iv
RESUMO	v
INTRODUÇÃO	1
CÂNCER	1
TUMOR DE WALKER 256	3
INTERAÇÕES METABÓLICAS ENTRE O PORTADOR E O TUMOR	4
ÁCIDOS GRAXOS ω-3	9
CAQUEXIA NO CÂNCER E PUFAs ω -3	13
OBJETIVOS	14
MATERIAL E MÉTODOS	15
Animais	15
Reagentes, Enzimas e Ácidos	15
Protocolo Experimental	15
Obtenção e Transplante das Células Tumorais	16
Determinação do Peso Corpóreo	16
Determinação da Taxa de Sobrevivência	17
Incubação das Células Tumorais	17
Determinação de Lactato	18
Quantificação Protéica	19
Análise Estatística	21
RESULTADOS	22
DISCUSSÃO	29
CONCLUSÕES	34
REFERÊNCIAS	35

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	-	Ácido Araquidônico
AG	-	Ácido Graxo
AGCL	-	Ácido Graxo de Cadeia Longa
BSA	-	Albumina Sérica Bovina
C	-	Grupo Controle não suplementado
COX	-	Enzima Cicloxigenase
DHA	-	Ácido Docosa-hexaenóico
EPA	-	Ácido Eicosa-pentaenóico
HPLC	-	High Performace Liquid Chromatography
IFN γ	-	Interferon γ
IL-1	-	Interleucina -1
IL-2	-	Interleucina -2
IL-6	-	Interleucina -6
LDH	-	Lactato Desidrogenase
LPL	-	Enzima Lipase Protéica
LT	-	Leucotrienos
MUFAs	-	Ácidos graxos monoinsaturados (Fatty Acids Monounsaturated)
NAD ⁺	-	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADH	-	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo, forma reduzida
OC	-	Grupo suplementado com Óleo de Coco
OP	-	Grupo suplementado com Óleo de Peixe
PBS	-	Tampão Fosfato Salina
PGs	-	Prostaglandinas
PGE ₂	-	Prostaglandina da série E ₂
PUFAs	-	Ácidos graxos poliinsaturados (Fatty Acids Polyunsaturated)
TNF- α	-	Fator de Necrose Tumoral - α
TX	-	Tromboxanas
W	-	Grupo portador de tumor
WOC	-	Grupo suplementado com Óleo de Coco portador de tumor
WOP	-	Grupo suplementado com Óleo de Peixe portador de tumor

RESUMO

O câncer é uma doença que acomete milhões de pessoas em todo mundo e a caquexia constitui o problema principal desta enfermidade. Ela atinge cerca de 2/3 dos pacientes que morrem de câncer, sendo o principal obstáculo na terapia do câncer. O efeito da dieta de gorduras sobre o estado caquético de pacientes com câncer, tem sido investigado. Os ácidos graxos poliinsaturados ω -3 (PUFAs ω -3), encontrados principalmente no óleo de peixe, exercem influência sobre os mediadores da caquexia, auxiliando no restabelecimento do estado metabólico geral, alterado neste caso. Este trabalho investigou se a suplementação crônica com PUFAs ω -3, ao longo da vida, promove alteração na taxa de crescimento tumoral, caquexia e sobrevida. Para isso, determinou-se o metabolismo de glicose pelas células tumorais, peso do tumor, evolução da massa corpórea e taxa de sobrevida dos animais dos grupos controle (C), suplementados com óleo de coco (OC) ou óleo de peixe (OP) com ou sem tumor. Os resultados mostram que não houve alteração da massa corpórea dos animais suplementados com diferentes ácidos graxos. Observou-se nos animais portadores de tumor, que houve redução da taxa de crescimento tumoral e do grau de caquexia no grupo suplementado com óleo de peixe (WOP), quando comparado ao grupo portador de tumor (W) e portador de tumor suplementado com óleo de coco (WOC). A produção de lactato a partir de glicose pelas células tumorais, que ocorreu no grupo WOP, foi significativamente menor quando comparada com o W e WOC. Ainda, a suplementação com óleo de peixe nos animais portadores de tumor, promoveu uma maior taxa de sobrevivência quando comparada aos grupos W e WOC. Assim, demonstrou-se que a suplementação com óleo de peixe, a longo prazo, diminuiu a taxa de crescimento tumoral, o grau de caquexia, estendeu o tempo de sobrevida e reduziu o metabolismo de glicose das células tumorais dos ratos portadores de tumor de Walker 256.

INTRODUÇÃO

CÂNCER

O organismo multicelular pode ser visto como uma sociedade ou um ecossistema cujos membros individuais são as células, que estão comprometidas com colaboração. Seguindo este raciocínio, o câncer pode ser analisado como um processo microevolucionário, onde mutação, competição e seleção natural, agem dentro da população de células somáticas, constituindo os ingredientes básicos do câncer. O comportamento "egoísta" de uma célula pode trazer danos irreparáveis ao organismo, chegando muitas vezes à falência total do mesmo (ALBERTS *et. al.*, 1997).

O câncer está relacionado com distúrbios das regras fundamentais do comportamento celular, nos organismos multicelulares, "sendo as células cancerosas definidas por duas propriedades hereditárias: (1) reproduzem-se em detrimento das normais, (2) invadem e colonizam territórios, normalmente reservados para outras células" (ALBERTS *et.al.*, 1997). Tumores podem ser divididos em benignos, quando o crescimento celular permanece contido numa massa única ou em malignos, quando conseguem invadir e se desenvolver em outros tecidos, formando metástases, sendo assim definidos como canceres. Estes últimos podem ser, ainda, classificados de acordo com o tecido e tipo celular de origem; sarcomas, originam-se de tecidos conjuntivos ou musculares, enquanto que, carcinomas, derivam de células epiteliais e leucemias de células hematopoiéticas (ALBERTS *et. al.*, 1997).

Geralmente, o câncer é resultado de várias mutações somáticas em uma mesma célula. Para compreendê-lo é necessário descobrir se a aberração é devida a uma modificação na seqüência do DNA (alteração genética), ou uma variação no padrão de expressão dos genes (alteração epigênica) onde ambas conduzem a célula ao descontrole da proliferação celular (ALBERTS *et. al.*, 1997).

Embora a etiologia do câncer ainda não esteja bem estabelecida, não se conhecem a(s) causa(s) de 85 a 90% dos cânceres humanos. Diversos fatores estão envolvidos sendo as principais o fumo, infecções e carcinógenos presentes na dieta (CURI *et. al.*,2002).

Os tumores malignos podem competir com o hospedeiro por nutrientes, induzindo a debilidade do organismo, ocasionando o que se chama de síndrome da caquexia (LAWSON *et. al.*, 1982; THEOLOGIDES, 1979).

TUMOR DE WALKER 256

O tumor de Walker 256 é um carcinosarcoma, que se desenvolveu espontaneamente na região da glândula mamária de uma rata grávida, descoberto em 1928, por George Walker no *Johns Hopkins University School of Medicine*. Foi localizado na parede abdominal esquerda com tamanho semelhante ao de uma noz. Durante a lactação o tumor regredia, mas retomava o crescimento após o desmame (EARLE, 1935). Em 1953 e 1954, esse tumor foi transplantado em ratos Sherman por inoculação subcutânea, sendo palpável em uma semana e, levando a morte dos animais após seis semanas. Após 15 dias do transplante subcutâneo, o tumor foi descrito como uma massa firme, esférica, lobulada e parcialmente encapsulada, promovendo metástases nos linfonodos pulmonares, regionais e ocasionalmente retroperitoniais (DUNN, 1945; LIKELY; SANFORD; EARLE, 1952; MIDER; TESLUK; MORTON, 1948; McCOY & NEUMAN, 1956)

Dois subtipos de carcinomas de Walker 256 têm sido investigados por apresentarem diferenças marcantes na interação com o organismo do hospedeiro. O tipo A, invasivo e metastatizante, tem um lento ritmo de crescimento, induzindo a anorexia e caquexia somente na fase terminal, garantindo uma sobrevivência média de 27 dias. Ao contrário, o tipo B, não-invasivo e de crescimento rápido, induz a anorexia e caquexia precoce com sobrevida de somente 15 dias. Logo, esse último tornou-se um importante modelo para estudos da caquexia induzida pelo câncer (GUAITANI *et. al.*, 1983).

INTERAÇÕES METABÓLICAS ENTRE O PORTADOR E O TUMOR

Mediadores da Caquexia

A caquexia é uma síndrome complexa que afeta mais de 70% dos pacientes com câncer e, de acordo com Warren (1932), é responsável por 22% das mortes destes pacientes. Assim, o grau de caquexia está inversamente relacionado ao prognóstico do paciente (HARVEY, 1979; ARGILÉS *et. al.*, 1992; NIXON *et. al.*, 1980). Ela não se manifesta somente no câncer, sendo também observada em uma variedade de condições inflamatórias tais como sepsis, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida e artrite reumatóide (GRUNFELD & FEINGOLD, 1992; ROUBENOFF *et. al.*, 1992; CANGIANO *et. al.*, 1996). Pacientes com síndrome da caquexia apresentam sintomas característicos como perda de peso, astenia, anorexia, e anemia (ARGILÉS *et. al.*, 1992).

A presença e o crescimento do tumor estão relacionados com anorexia, ou seja, diminuição no fornecimento e competição por nutrientes, que ocorre entre o tumor e o portador, promovendo severos distúrbios metabólicos. O crescimento no consumo de energia juntamente com a queda do abastecimento calórico, são a chave para o desenvolvimento da caquexia (ARGILÉS; ALVAREZ; LÓPEZ-SORIANO, 1997). Deste modo, parece que mudanças metabólicas observadas, são reflexo da atuação de mediadores gerados pelo tumor ou por anticorpos em resposta a ele. As citocinas, hormônios neuroendócrinos e subprodutos tumorais, são postulados como possíveis mediadores da caquexia (BARBER, 2001). Várias citocinas pró-inflamatórias, incluindo fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), interferon- γ e fator neutrófico ciliar, têm sido implicados no estabelecimento da caquexia (SELBY *et. al.*, 1987; MOLDAVER *et. al.*, 1988; CASTELL *et. al.*, 1990; BALLMER *et. al.*, 1991). Por exemplo, o TNF- α e IL-1 se mostram potentes inibidores do transporte de glicose para o

tecido adiposo (HAUNER *et. al.*,1995), suprimem a lipogênese, ativam enzimas proteolíticas, favorecendo o catabolismo muscular (FONG *et. al.*,1989).

Infusão de hormônios tais como cortisol, glucagon e adrenalina, em humanos, originam sintomas de caquexia, levando à depleção protéica, elevação da concentração sérica de proteína de fase aguda, elevação no gasto energético e intolerância à glicose (WATTERS, 1986). Em pacientes com câncer, têm sido encontradas concentrações elevadas de cortisol e glucagon (BURT *et.al.*,1983).

A síntese e liberação de prostaglandinas da série E₂ (PGE₂), é estimulada quando há lesão celular, sendo seus efeitos associados aos sintomas encontrados nos processos inflamatórios, infecciosos e/ou neoplásicos (febre, dor, perda de apetite e hipermetabolismo). As prostaglandinas são substâncias formadas a partir do metabolismo do ácido araquidônico. A associação de IL-1 e TNF- α , estimula a síntese de PGE₂ em vários tecidos periféricos (DAYER *et. al.*, 1985). Investigações sobre o envolvimento de PGE₂ na indução da caquexia no câncer, mostraram que em ratos portadores de leucemia, o hipermetabolismo observado é induzido pela produção de PGE₂ periféricas (ROE *et. al.*, 1997). Ratos portadores de carcinoma de Walker 256 apresentam elevadas concentrações de PGE₂ e vasopressina circulantes, que foram considerados como principais fatores envolvidos nas alterações metabólicas e hormonais que induzem a caquexia (SIDDIQUI & WILLIAMS, 1987). As PGE₂ estão envolvidas também no favorecimento da angiogênese, crucial para proliferação das células tumorais, agindo indiretamente como mediador do processo (FOLKMAN & KLAGSBURN, 1987; BLOOD & ZETTER, 1990).

Alterações no Metabolismo de Carboidratos, Lipídeos e Proteínas

Em geral, os tumores consomem grandes quantidades de glicose e metabolizam-na, preferencialmente, de forma anaeróbica (ARGILÉS & LÓPEZ-SORIANO, 1990), resultando em altas taxas de lactato sérico. O lactato produzido é transportado para o fígado, onde através do ciclo de Cori, o esqueleto de carbono é reutilizado na síntese de glicose. Neste mecanismo são gastas aproximadamente 300 kcal/dia, ocasionando enormes perdas energéticas em portadores de tumor maligno (EDEN *et. al.*, 1984). Lactato, glicerol (liberado em consequência da lipólise do tecido adiposo) e aminoácidos (colocados na circulação devido à proteólise do músculo esquelético), se apresentam como substratos gliconeogênicos, somando-se à constante degradação do glicogênio, contribuindo para o aumento da produção de glicose hepática, para assim, suprir a demanda energética exacerbada do tumor, bem como as necessidades metabólicas do portador (WATERHOUSE; JEANPETRE; KEILSON, 1979).

A modificação do metabolismo de carboidratos se deve a alta demanda energética do tumor, ativando o processo compensatório do fígado, o qual gera quantidades aumentadas de glicose circulante. Hormônios contra-regulatórios, como os glicocorticóides ou glucagon e o aparecimento de resistência à insulina (INCULET *et. al.*, 1987), são outros achados ocorridos neste quadro.

A gordura constitui 90% das reservas energéticas do organismo adulto. Sua dissolução é fator preponderante no desenvolvimento da caquexia, principalmente, a extensa redução do tecido adiposo, somado com a hiperlipidemia sérica, em pacientes com câncer. Estes fatores, geralmente, são ocasionados por:

1- aumento da atividade lipolítica (THOMPSON *et. al.*, 1981), que estimula a liberação de glicerol e ácido graxo. Este último parece ser um péssimo substrato para as células tumorais. Em contrapartida, os ácidos graxos poliinsaturados ω -6 (linoléico e ácido

araquidônico) promovem crescimento tumoral pela ativação da mitose (IMAGAWA *et. al.*, 1989);

2- decréscimo da ação da enzima lipase protéica (LPL), a qual cliva os triacilgliceróis, contidos nas lipoproteínas, em glicerol e ácidos graxos (NOGUCHI *et. al.*, 1996);

3- redução da lipogênese, promovendo menor esterificação e diminuição na deposição lipídica.

A astenia, debilidade muscular generalizada, se apresenta como outro fator marcante na síndrome da caquexia induzida pelo câncer. Este sintoma é provocado pelo intenso catabolismo do músculo esquelético, o qual corresponde a mais ou menos metade da massa total de proteína do organismo (MORRISON, 1989; TISDALE, MULLIGAN, BECK, 1992).

Nos períodos de jejum, os aminoácidos, produto da quebra protéica, são aproveitados na gliconeogênese, ativada pela vias catabólicas. A não ingestão alimentar prolongada, leva a uma menor degradação do músculo esquelético, impedindo o desequilíbrio na concentração de nitrogênio. Entretanto, em portadores de tumor, o organismo perde esta habilidade tão essencial (Fig.1). Em modelos experimentais, estudos comprovam "in vivo" (COSTELLI *et. al.*, 1993;1995) e "in vitro" (GARCÍA-MARTÍNEZ; LÓPEZ-SORIANO; ARGILÉZ, 1995), que há grande aumento na depleção do tecido muscular.

Assim, tem-se que com o desenvolvimento da caquexia, o organismo entra em estado de depleção de suas reservas energéticas, enquanto o tumor cresce às custas destas reservas. A Caquexia tem sido a principal barreira no tratamento do câncer. Portanto, interrompê-la ou revertê-la torna-se fundamental para se obter sucesso no seu tratamento. Dentre as várias ferramentas utilizadas no tratamento da caquexia, ácidos graxos ω -3 têm sido utilizados com algum sucesso (BARBER, 2001).

CAQUEXIA NO CÂNCER

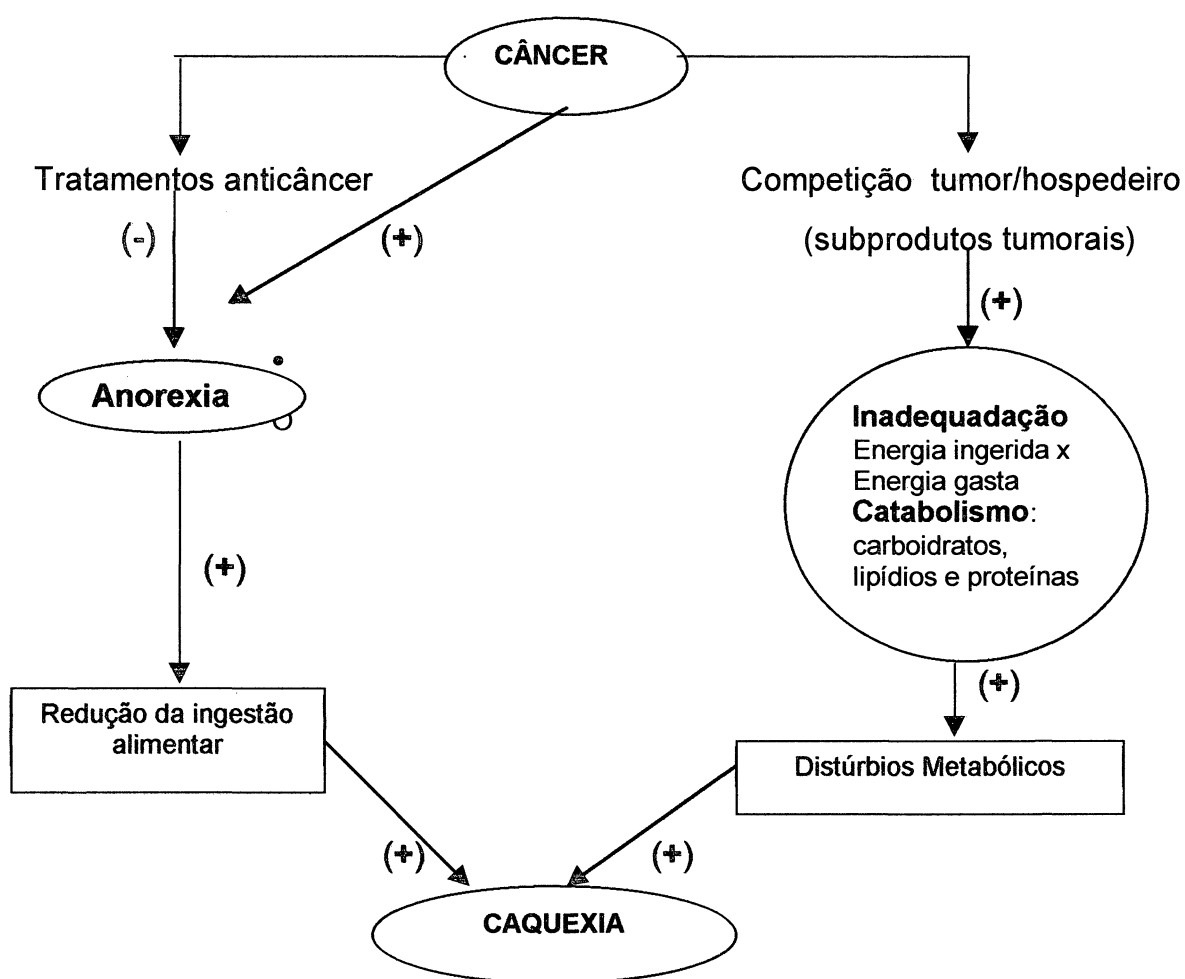


FIGURA 1 - Diagrama do estado metabólico observado no câncer.

ÁCIDOS GRAXOS ω -3

Quimicamente, ácidos graxos são cadeias retas de hidrocarbono terminando em uma das extremidades com grupo carboxila e grupo metila na outra. Há 24 ácidos graxos comuns que diferem na extensão da cadeia, grau e natureza de saturação, podendo portanto, serem encontrados na forma saturada, monoinsaturada e poliinsaturada. A maioria das cadeias destes ácidos graxos tem entre 4 e 36 carbonos e são classificados pelo número de carbonos, posição e número das duplas ligações. A localização da primeira insaturação, contada a partir da terminação metila do ácido graxo, é designada por um símbolo ou letra, seguida pelo número (Fig. 2).

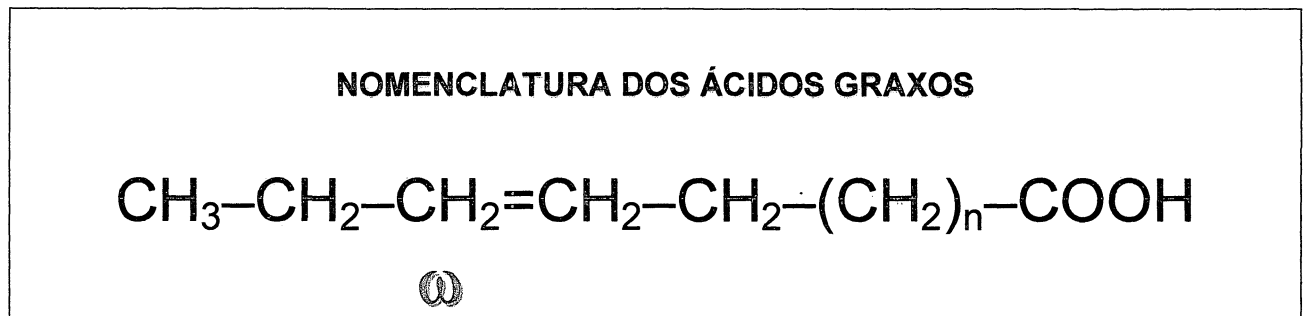


FIGURA 2 - Nomenclatura dos ácidos graxos.

As propriedades dos ácidos graxos, como solubilidade e flexibilidade, são determinadas pelo tamanho da cadeia e grau de insaturação, sendo que ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa são mais solúveis e flexíveis do que os saturados. O organismo animal pode adicionar apenas uma dupla ligação em ácidos saturados (dessaturação). Sendo assim, ácidos graxos poliinsaturados não podem ser fabricados pelos animais, apesar de suas funções metabólicas. Eles são obtidos somente através da dieta, sendo alguns considerados "ácidos graxos essenciais" como é o caso dos AGs α -linolênico e o linoléico. Durante décadas, tem sido mostrado que a quantidade e o tipo de ácido graxo de cadeia longa (AGCL) consumido na dieta, pode influenciar profundamente nas respostas biológicas (ALEXANDER,1998). Estes AGCL insaturados

são capazes de influenciar a resposta do sistema imunitário e outras respostas celulares. Eles são divididos em três famílias, dependendo da posição da insaturação (ω -3, ω -6, ω -9). O ω -3 e ω -6 são classificados como ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), enquanto que a maioria dos ω -9 são monoinsaturados (MUFAs). Os ácidos graxos ω -3 estão primariamente na forma de α -linolênico, presente nos óleos de soja, canola e peixe (HUNTER *et. al.*, 1996), sob a forma de ácido eicosa-pentaenóico (EPA) e ácido docosa-hexaenóico (DHA) (Tabela 1). O óleo de coco é um AG saturado, ou seja, não contém duplas ligações e inclui grande número de hidrogênios em sua cadeia, possui altas concentrações de AG caprílico (8:0), cáprico (10:0), láurico (12:0) e mirístico (14:0).


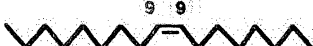



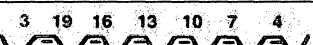
ESTRUTURA DOS ÁCIDOS GRAXOS			
característica ω	final metila	final carboxila	característica Δ
Estearico 18:2		COOH SATURADO	18:0
Oléico 18:1 ω -9		COOH MONOINSATURADO	18:1 Δ 9
Linoléico 18:2 ω -6		COOH POLIINSATURADO	18:2 Δ 9,12
α -Linolênico 18:3 ω -3		COOH POLIINSATURADO	18:3 Δ 9,12,15
EPA 20:5 ω -3 *		COOH POLIINSATURADO	20:5 Δ 5,8,11,14,17
DHA 22:6 ω -3 **		COOH POLIINSATURADO	22:6 Δ 4,7,10,13,16,19

TABELA - 1 Estrutura dos ácidos graxos

* EPA = EICOSA-PENTAENÓICO

** DHA = DOCOSA-HEXAENÓICO

 Δ = INSATURAÇÃO

As membranas celulares dos animais são formadas por fosfoglicerídeos, colesterol e proteínas. Em geral, os PUFAs estão ligados ao segundo carbono do glicerol sendo os fosfoglicerídeos capazes de aumentar a mobilidade, rotação e a troca entre as camadas da membrana. Logo, a composição lipídica exerce grande influência na fluidez da membrana, na formação e habilidade de ligação dos receptores, além da ativação de padrões de sinalização celular (GRABER; SUMIDA; NUNEZ, 1994).

Em humanos e outros mamíferos, o DHA está presente em concentrações consideráveis, compondo as membranas do córtex cerebral (O'BRIEN & SAMPSON, 1965) e retina (ANDERSON, 1970).

Os PUFAs ω -3 ingeridos por humanos e animais provocam redução na concentração de células inflamatórias, em contraste com o número aumentado destas, quando a suplementação é com PUFAs ω -6, precursor do ácido araquidônico (AA). A ativação do AA, liberado da membrana fosfolipídica, pela ação das enzimas cicloxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX), levam a formação das tromboxanas (TX), prostaglandinas (PG) e leucotrienos (LT), os últimos, atuam na regulação funcional da atividade das células envolvidas na inflamação e imunidade (CALDER, 2001).

Citocinas juntamente com as PGs formam um sistema interconectado que afeta a produção de uma série de cascatas. Por exemplo, a PGE₂ inibe a síntese das citocinas liberadas pelos linfócitos Th-1, interleucina-2 (IL-2) e interferon- γ (IFN- γ) (HILKENS *et al.*, 1995; NAITO *et al.*, 1996). Visto que a IL-2 desempenha papel crucial na proliferação dos linfócitos-T, a PGE₂ leva a supressão deste processo. Citocinas liberadas pelos linfócitos Th-1 estimulam a ação de macrófagos, células natural "killers" e linfócitos-T citotóxico, os quais são importantes na defesa do hospedeiro (MOSSMAN & SAD, 1996; CALDER, 1998).

A suplementação em humanos e animais com o óleo de peixe, resulta na incorporação do ácido eicosa-pentaenóico (EPA) e de outros PUFAs ω -3, pelos fosfolipídeos das membranas das células inflamatórias (GIBNEY & HUNTER, 1993; SPERLING *et al.*, 1993). O EPA parece inibir a liberação do AA da membrana fosfolipídica. Isto ocorre pela inibição das fosfolipases e competição pelo sítio ativo das enzimas cicloxigenase e lipoxigenase. Dessa forma, a introdução do óleo de peixe na dieta diminui a capacidade das células de defesa gerarem eicosanóides a partir do AA (CALDER, 2001). Portanto, esta suplementação leva ao decréscimo da síntese de PGE₂ (Fig.3), atuando como antagonista da mesma, elevando a taxa de citocinas produzidas e liberadas pelos linfócitos Th-1, com conseqüente proliferação de linfócitos (CONNOLLY & ROSE, 1999)

SÍNTESE DE EICOSANÓIDES

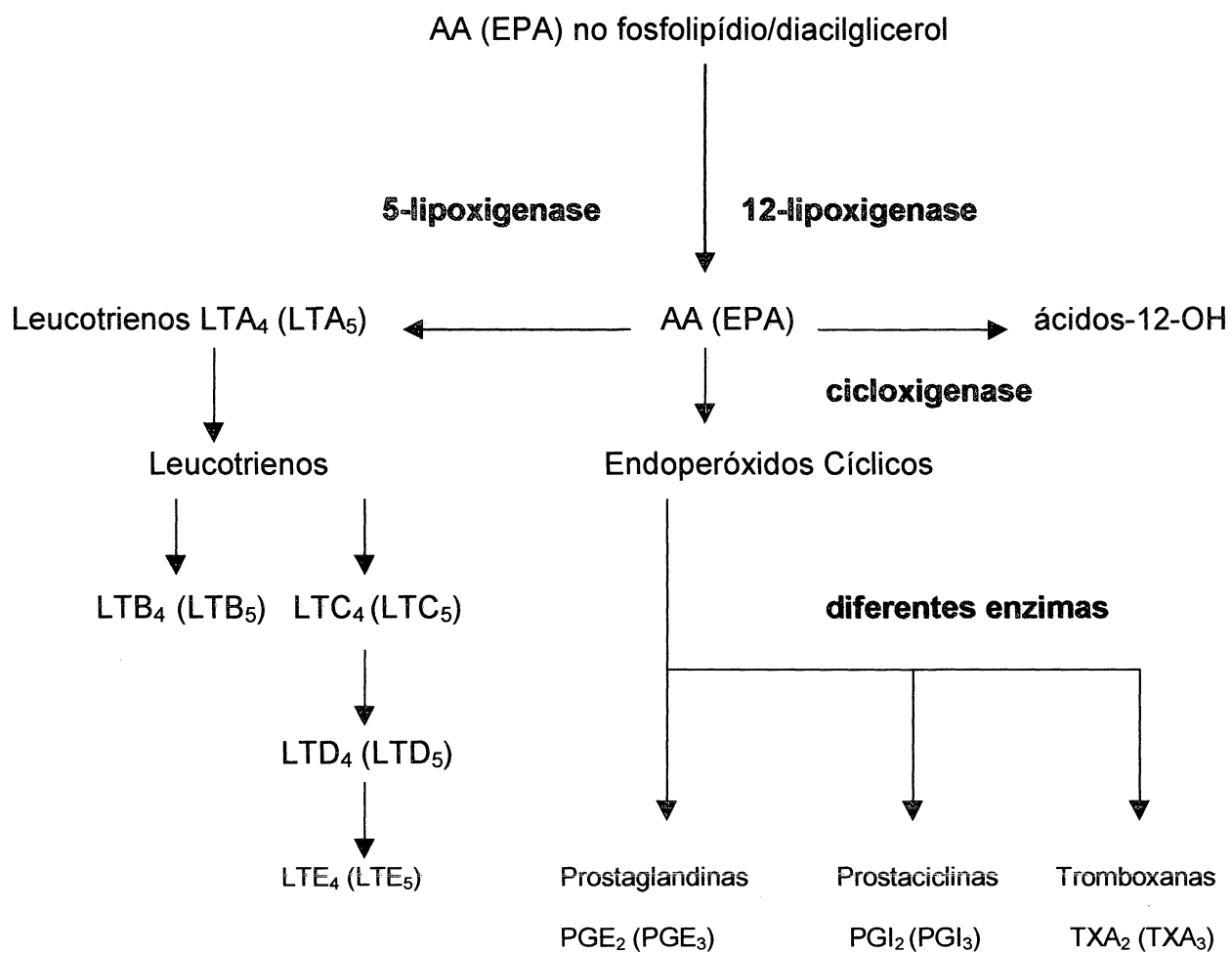


FIGURA 3 - Síntese de eicosanóides via ácido araquidônico (AA) ou eicosapentaenóico (EPA).

CAQUEXIA NO CÂNCER E PUFAs ω -3

O efeito da dieta de gordura sobre o estado caquético de pacientes com câncer tem sido investigado. O óleo de peixe e o EPA exercem influência sobre os mediadores da caquexia, normalizando o estado metabólico geral, alterado nestes casos. Obtém-se através da suplementação desses ácidos graxos, melhora efetiva na perda de peso, observando muitas vezes, ganho de massa muscular (WIGMORE, 1996). O estudo feito por TOGNI (2002), realizado no Laboratório de Metabolismo Celular, mostrou que a administração dos PUFAs ω -3 em animais portadores de tumor recupera a glicemia, diminui a degradação do glicogênio muscular e hepático e, ainda, reduz a depleção do colesterol HDL. Demonstrando assim que os PUFAs ω -3 têm capacidade de reverter parcialmente o quadro caquético apresentado por esses animais. O EPA tem mostrado inibir o crescimento tumoral. Estudos com cultivo de células de carcinoma humano (FALCONER *et. al.*, 1994) e modelos animais (TISDALE & BECK, 1987; 1991) confirmaram esta observação. A supressão desempenhada pelos PUFAs ω -3 na biossíntese de eicosanóides, tais como as PGs, provoca diminuição na angiogênese, indispensável para a multiplicação das células tumorais (CONNOLLY *et. al.*, 1997), e induzem a ocorrência do processo de apoptose nas células tumorais (ROSE *et. al.*, 1999).

O tratamento da caquexia é somente um dos aspectos acerca dos pacientes com câncer avançado. A introdução de PUFAs ω -3 na dieta não representa a cura desta doença, mas traz muitos benefícios, pois restabelece a qualidade de vida deste grupo de pessoas (BARBER, 2001). Até o momento, poucos trabalhos têm investigado o papel da suplementação crônica com PUFAs ω -3 sobre o desenvolvimento tumoral, caquexia e taxa de sobrevivência.

OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo investigar os efeitos da suplementação crônica com PUFA ω -3, a partir da gestação até a fase adulta, promove alteração na taxa de crescimento tumoral, massa corpórea, grau de caquexia, metabolismo da glicose e sobrevida dos ratos portadores de tumor de Walker 256.

MATERIAL E MÉTODOS

Local

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Metabolismo Celular do Departamento de Fisiologia do Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

Animais

Foram utilizadas ratas da linhagem Wistar obtidas do Biotério de Ciências Biológicas da UFPR a partir do 21º dia de nascimento, e ratos Wistar machos adultos reprodutores. Todos os animais foram submetidos a ciclo claro/escuro (12/12 horas) com água e alimentação à vontade em ambiente com temperatura controlada de 23°C ± 1°C.

Reagentes, Enzimas e Ácidos

Todos os componentes dos tampões foram obtidos da *Reagen Quimibrás* Indústria Brasileira S/A. Lactato desidrogenase e NAD⁺ foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis USA). O óleo de peixe foi proveniente de uma preparação de lipídios marinhos da Alimentos Naturais LTDA. E o óleo de coco da Indústria Brasileira Refino de Óleos Brasil LTDA.

Protocolo Experimental

Ratas Wistar fêmeas, com 21 dias, foram divididas em três grupos distintos, sendo que dois deles foram suplementados com ácido graxo, diariamente, desde o desmame até a idade adulta (90 dias).

1- Grupo suplementado com 1g/kg de peso corpóreo (p.c.) de óleo de peixe; (180 mg de EPA e 120 mg de DHA).

2- Grupo suplementado com óleo de coco, ácido graxo saturado (gordura de coco), na mesma dose citada anteriormente.

3- O grupo controle não recebeu suplementação.

Após 90 dias, as fêmeas foram colocadas para acasalar com machos não suplementados. No período de gestação (21 dias) e de amamentação (21 dias), essas mães continuaram recebendo a suplementação diária. A prole de machos resultante foi submetida ao mesmo tratamento descrito para as mães e, tiveram seus pesos corpóreos monitorados a cada dois dias. Os machos quando atingiram a maturidade sexual (90 dias) foram inoculados com suspensão de células (2×10^7 /ml) obtidas do tumor ascítico de Walker 256 e no controle 1ml de salina 0,9%. A suplementação e o monitoramento da massa corpórea continuaram até o término dos 14 dias após a inoculação. Depois desse período, os animais foram sacrificados, sendo o tumor retirado, pesado e o sangue coletado para a posterior análise bioquímica.

Obtenção e Transplante das Células Tumorais

Foi injetado intraperitonealmente uma suspensão de 2×10^7 células/ml do tumor de Walker 256. Após um período de cinco dias, constatada a ascite, sacrificou-se o animal portador do tumor ascítico, e injetou-se 10ml de solução salina 0,9% na cavidade abdominal. Em seguida, massageou-se o abdômen do rato e, através de laparotomia mediana, retirou-se da cavidade abdominal, com pipeta pasteur de plástico, o fluido contendo as células tumorais. Utilizando-se uma câmara de *Neubauer* foi efetuada a contagem do número de células.

Determinação do Peso do Tumor e Corpóreo

Os tumores retirados dos animais foram pesados em balança digital *Denver Instrument XL-410* previamente aferida. Os seus pesos corpóreos foram também monitorados a cada dois dias no período da tarde, utilizando-se do mesmo instrumento.

Determinação da Taxa de Sobrevivência

Um outro grupo de animais foi inoculado com tumor e preparado para determinação da taxa de sobrevivência. A cada cinco dias, efetuou-se a contagem de animais que estavam vivos na gaiola e o resultado foi usado na determinação da taxa de porcentagem de sobreviventes.

Incubação das Células Tumorais

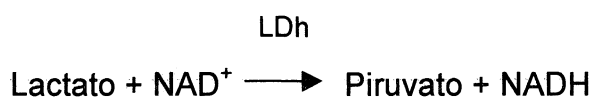
O tumor de Walker 256 foi investigado quanto ao metabolismo de glicose através de incubação conforme FERNANDES *et. al.*,(1996). O animal portador do tumor foi sacrificado e o tecido tumoral retirado. Com auxílio de uma tesoura, as porções necrosadas e de tecido não tumoral foram retirados. A seguir, o tumor foi triturado com a ajuda de um Mixer, em solução salina. Após o material todo ser fragmentado, filtrou-se este em gaze e peneira e, obteve-se o líquido em bequer. Todo o procedimento foi realizado em gelo. Transferiu-se o material do bequer para tubos de 50mL e centrifugou-se a 4°C por 10 minutos à velocidade de 1.500 rpm. Em seguida, desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimentado em solução hemolítica (NH₄Cl 15,5 mM e Trisaminometano 170 mM), em pH 7,2 na proporção de 9:1, respectivamente. As células foram mantidas nesta solução por 15 minutos em banho a 37°C. As células foram, então, centrifugadas novamente, o sobrenadante descartado e, o sedimentado ressuspense em salina gelada 0,9%. Centrifugou-se mais uma vez como acima. As células tumorais foram incubadas em solução tampão fosfato salina pH 7,4, (PBS - NaCl 0,137 M, KCl 2,65 mM, KH₂PO₄ 0,88 mM, Na₂HPO₄+ 12H₂O 6,4 mM), com BSA a 1%, fornecendo como substrato 5,6 mM de glicose. A incubação ocorreu por 60 minutos a 37°C, sob agitação contínua. Ao final de 60 minutos foi adicionado 200 µl de ácido tricloroacético (TCA 25%) para interromper a reação. Este material foi coletado e colocado em eppendorf e centrifugado por um minuto a 14.000 rpm. Logo após, coletou-se 500 µl do sobrenadante da amostra e adicionou-se 4 µl de indicador

universal para permitir a visualização da neutralização, através da adição de KOH/TRIS (5,5M/2M), sinalizada pela coloração verde, indicando pH 7,0.

Determinação do Lactato

Para a determinação do lactato produzido pelas células tumorais, foram pipetados 100 µl da amostra neutralizada em tubos contendo o tampão de ensaio e após 45 minutos efetuou-se a leitura a 340 nm. O princípio desta reação está relacionado com o lactato produzido pelas células tumorais mais o NAD^+ , resultando em piruvato e NADH, em uma reação que obedece a proporção estequiométrica. A LDh tem a função de catalisar a reação e o hidrato de hidrazina evita que o processo reativo tenha duplo sentido. O NADH é componente lido pelo espectrofotômetro, fornecendo assim as concentrações de lactato produzido.

Princípio da reação é mostrada abaixo:



➤ Tampão de ensaio para 100ml de H_2O destilada, pH 8,85.

EDTA	0,28 g
Glicina	2,8 g
Hidrato de Hidrazina	1,5 ml
LDh	0,4 ml
NAD^+	60 mg

Tendo a medida da absorbância para o lactato, foi calculada a concentração deste em $\mu\text{mol/h/mg}$ de proteína, segundo a fórmula:

$$[\text{Lactato}] = \frac{\text{D.O}}{6,22} \times \frac{V1}{V} \times \frac{V2}{V3} \times \frac{V4}{V5} \times \frac{1}{\text{mg proteína}}$$

- [Lactato] = Concentração de lactato produzido
- D.O = Densidade óptica
- 6,22 = Constante
- V1 = Volume da amostra + tampão de ensaio
- V = Volume da amostra
- V2 = Volume da amostra + TCA
- V3 = Volume da amostra
- V4 = Volume da amostra + volume de neutralização
- V5 = Volume da amostra

Quantificação Protéica

As amostras contendo as células foram lisadas por ultra-som através do sonicador. Posteriormente, homogeneizadas, centrifugadas por 5 minutos a 13.000 rpm e o sobrenadante coletado. A quantificação protéica foi feita seguindo o método de Bradford. O Método Bradford surgiu em 1976, sendo relativamente preciso para a maioria das proteínas, exceto pequenos polipeptídeos básicos, como ribonucleases e lisozimas. Utiliza-se o Azul de Coomassie G-250, o qual liga-se à cadeia protéica, aumentando a sensibilidade do método. A concentração da amostra desconhecida é calculada com base em uma curva padrão de uma proteína conhecida. A proteína padrão geralmente utilizada é a albumina bovina sérica (BSA). A curva padrão tem uma linearidade entre as concentrações de 20 a 1000 μg de proteínas por ml da amostra.

Preparo da curva padrão

- Pesou-se 10mg de albumina sérica bovina (BSA) e solubilizou-a em 10ml de H₂O destilada;
- Leu-se no espectrofômetro a 280 nm, contra referência de H₂O destilada;
- Fez-se a diluição da solução-mãe de BSA para a curva padrão, como descrita a seguir:

Diluição	Solução-mãe	H ₂ O destilada
1:1	500 µl	0 µl
1:1.125	400 µl	100 µl
1:1.666	300 µl	200 µl
1:2	250 µl	250 µl
1:2.5	200 µl	300 µl
1:4	125 µl	375 µl
1:5	100 µl	400 µl
1:10	50 µl	450µl
1:20	25 µl	475 µl
1:50	10 µl	490 µl

- Preparou-se uma bateria de 21 tubos, colocou-se 1ml da solução de Bradford mais 20 μ l de cada diluição em cada tubo (fez-se em duplicata para cada diluição); no tubo branco, colocou-se 1ml da solução de Bradford mais 20 μ l de H₂O destilada; (agitou-se bem antes de usar a solução de Bradford).
- Agitou-se os tubos e a leitura de absorbância a 595 nm, contra referência do tubo branco.
- Construiu-se o gráfico da curva padrão (concentração de BSA x densidade óptica) e achou-se a equação da reta [$y = ax + b$, sabendo que $a =$ coeficiente angular = $\text{tg } \alpha = (y_2 - y_1) : (x_2 - x_1)$ e $b =$ coeficiente linear = ponto do eixo das coordenadas por onde a reta passa].

Determinação protéica:

- Para a determinação protéica, dilui-se 10 μ l de cada amostra 1:25 com tampão utilizada na resuspensão da amostra ;
- Preparou-se uma bateria de tubos, em duplicada para cada tubo além do tubo branco;
- Colocou-se 1ml da solução de Bradford em cada tubo mais 20 μ l de cada amostra; no tubo branco colocou-se 1 ml da solução mais 20 μ l da solução salina, a mesma utilizada na resuspensão da amostra anteriormente;
- Leu-se no espectrofotômetro a 595 nm, contra referência do branco;
- Utilizou-se da equação da reta para o cálculo da concentração protéica de cada amostra [sabendo que $y =$ densidade óptica, $x =$ concentração da amostra e sendo $y = ax + b$, logo $x = (y - b) : a$] (BRADFORD, 1976).

Análise Estatística

Os dados foram apresentados como média \pm EPM e foram submetidos a ANOVA com pós-teste de Tukey com nível de significância para $p < 0,05$.

RESULTADOS

Na figura 1 estão representados os valores do peso corpóreo dos machos da prole, desde o desmame (21 dias) até a fase adulta, dos animais do grupo controle (C), suplementados com óleo de coco (OC) ou suplementados com óleo de peixe (OP). Animais do grupo C apresentaram ganho de peso de até 800% neste período. As diferentes suplementações não modificaram significativamente ($p>0,05$), a porcentagem de evolução do peso corpóreo quando comparadas entre si ou com o controle.

Na figura 2 estão representados os dados dos pesos fresco do tumor (g) dos animais portadores de tumor (W), suplementado com óleo de coco (WOC) ou suplementado com óleo de peixe (WOP). Ocorreu redução significativa ($p<0,05$) da massa tumoral no grupo suplementado com o óleo de peixe (WOP), quando comparada aos grupos controle (W) e ao suplementado com óleo de coco (WOC), porém entre estes os dois últimos não há diferença significativa.

Na tabela 1 estão representados os dados do peso corpóreo (g), antes da inoculação do tumor e após 14 dias da inoculação, peso fresco do tumor (g), peso da carcaça (peso do animal subtraído o peso do tumor) dos animais com tumor (W), dos grupos suplementados com óleo de coco (WOC) ou óleo de peixe (WOP). Ao final de 14 dias, no grupo W o tumor representou 6,8% do peso corpóreo do animal, 5,9% no grupo WOC e 3,0% no grupo WOP. A porcentagem de variação de peso corpóreo no grupo W foi de -4,5%, no grupo WOC foi de -4,1% e no grupo WOP -1,5%.

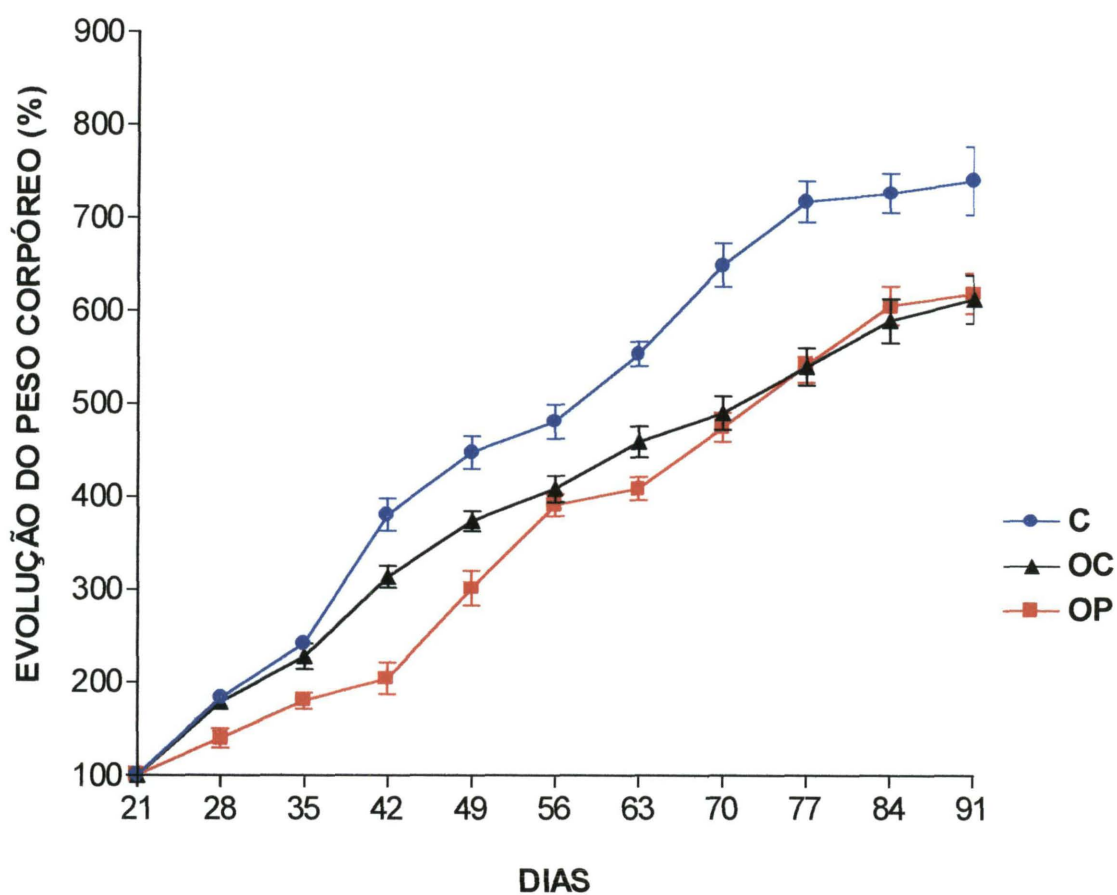


FIGURA 1: Evolução do peso corpóreo dos machos dos grupos controle (C), do grupo suplementado com óleo de coco (OC) e do grupo suplementado com óleo de peixe (OP), desde o desmame (21 dias) até a fase adulta (91 dias), em intervalos de 7 dias. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média de 10 animais do grupo C, 13 animais do grupo OC e 20 animais do grupo OP.

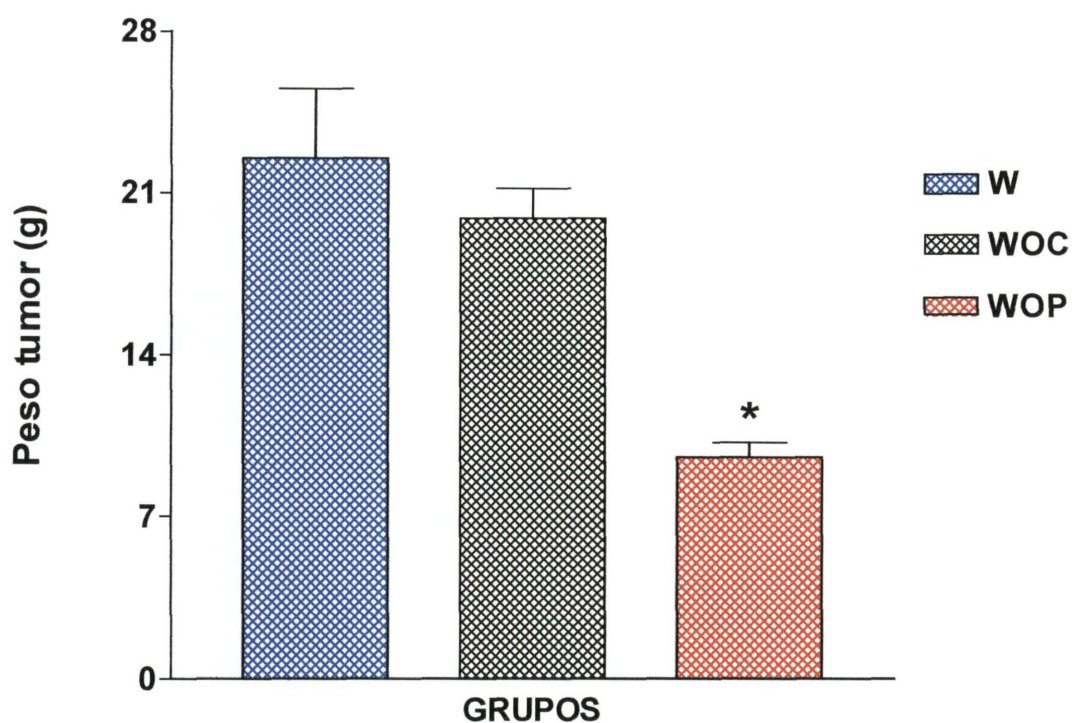


FIGURA 2: Peso do tumor (g) dos animais portadores de tumor (W), do grupo suplementado com óleo de coco (WOC) e do grupo suplementado com óleo de peixe (WOP). *Diferença significativa quando comparado ao grupo W e WOC. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média de 6 animais do grupo W, 6 animais do grupo WOC e 7 animais do grupo WOP.

TABELA 1: Peso corpóreo, do tumor e da carcaça dos animais portadores de tumor (W), portadores de tumor suplementados com óleo de coco (WOC) ou óleo de peixe (WOP) no período de 14 dias. *Diferença significativa ($p < 0,05$) quando o grupo WOP foi comparado aos grupos W e WOC. Os dados estão representados como média \pm erro padrão da média de 6 animais do grupo W, 6 do grupo WOC e de 7 animais do grupo WOP.

	GRUPOS DOS RATOS PORTADORES DE TUMOR W256		
	W	WOC	WOP
PESO CORPÓREO (g) ANTES DA INOCULAÇÃO DO TUMOR	323,0 \pm 14,0	301,7 \pm 3,2	316,0 \pm 14,2
PESO CORPÓREO (g) NO 14 ^º DIAS DE INOCULAÇÃO DO TUMOR	332,0 \pm 17,4	339,2 \pm 17,6	321,7 \pm 15,8
PESO DO TUMOR (g)	22,5 \pm 3,0	19,9 \pm 1,4	9,6 \pm 0,7*
PESO DA CARÇAÇA (g)	309,0 \pm 13,5	319,0 \pm 16,4	312,1 \pm 15,4
VARIAÇÃO DO PESO CORPÓREO (g)	- 14,0 \pm 0,6	- 12,4 \pm 1,8	- 4,2 \pm 1,5
VARIAÇÃO DO PESO CORPÓREO (%)	- 4,5 \pm 0,1	- 4,1 \pm 0,7	- 1,5 \pm 0,6

A figura 3 mostra a curva de sobrevivência (%) dos animais portadores de tumor (W) e dos portadores de tumor suplementados com óleo de coco (WOC) ou óleo de peixe (WOP). Respectivamente, 10, 15 e 12 animais dos grupos W, WOC e WOP foram inicialmente inoculados com suspensão de células tumorais, sendo estes considerados como 100%. Após 5 dias da inoculação, 93% dos animais do grupo WOC continuavam vivos, enquanto que nos grupos W e WOP 100% dos animais estavam vivos. Após 10 dias da inoculação, 80% animais continuavam vivos no grupo WOC, enquanto que nos grupos W e WOP continuou em 100%. No 15º dia, 40% dos animais no grupo WOC, 90% no W e 83% no WOP estavam vivos. No 20º dia nos grupos W e WOC restavam vivos 80% e 27%, respectivamente, enquanto que no grupo WOP não houve morte neste intervalo. No 25º dia, 13% animais no grupo WOC, 40% no W e 50% no WOP permaneciam vivos. Ao final de 30 dias da inoculação, quando os animais foram sacrificados, 30% dos animais estavam vivos no grupo W, 13% no WOC e 50% no grupo WOP, mostrando que a suplementação com óleo de peixe tende a melhorar a taxa de sobrevivência em ratos portadores de W256.

Na figura 4 estão apresentados os valores da produção de lactato pelas células tumorais ($\mu\text{mol/h/mg}$ de proteína), dos animais portadores de tumor (W), do grupo suplementado com óleo de coco (WOC) e do grupo suplementado com óleo de peixe (WOP). As células tumorais do grupo W produziram $381,8^*$ $\mu\text{mol/h/mg}$ de proteína. No grupo WOC esta produção foi de $243,1^*$ e no WOP foi de $99,6^*$. Sendo que a produção foi significativamente ($p < 0,05$) menor nos grupos WOC e WOP quando comparadas a W e também a produção no grupo WOP foi significativamente reduzida quando comparada ao WOC.

* valor médio

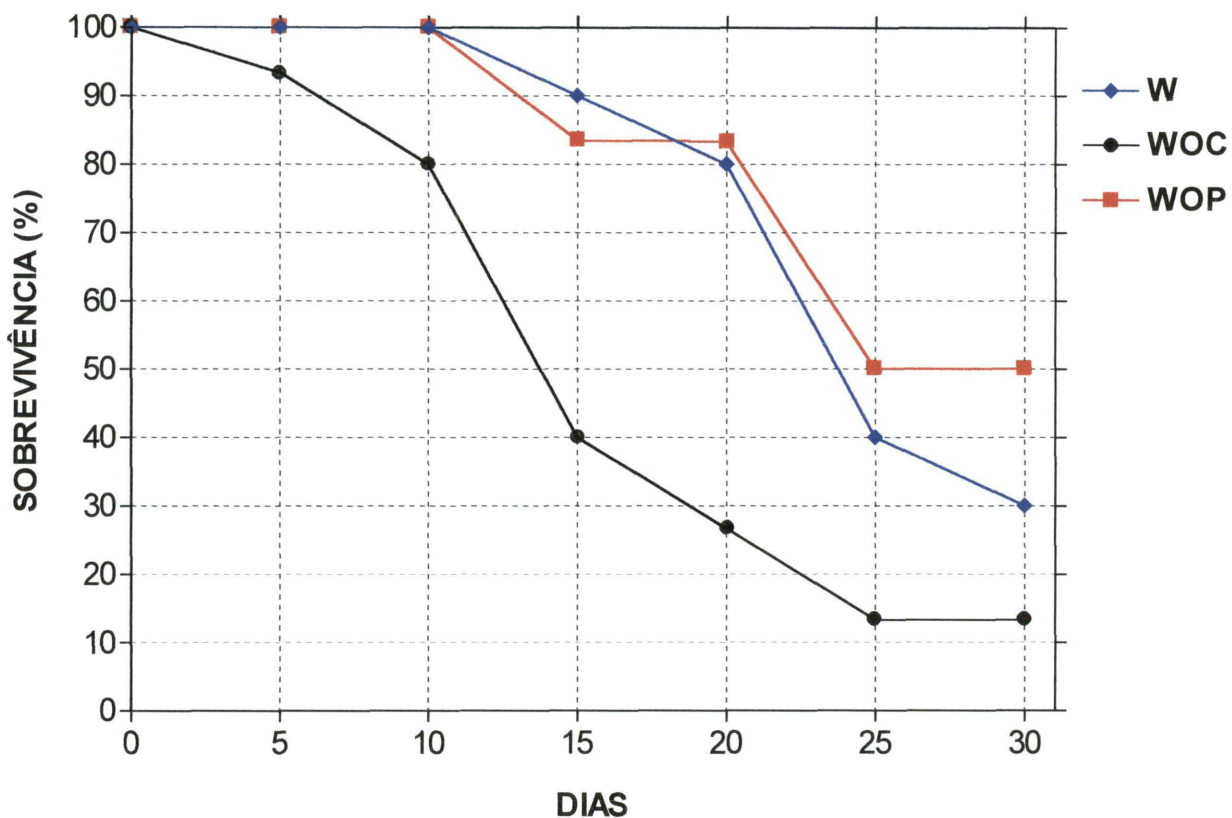


FIGURA 3: Curva de sobrevivência (%) dos animais portadores de tumor (W) e dos animais portadores de tumor suplementados com óleo de coco, (WOC) ou óleo de peixe (WOP). Os dados representam a porcentagem de animais vivos ao longo de 30 dias. O número inicial de animais no grupo W foi de 10, no grupo WOC foi de 15 e de 12 animais no grupo WOP. No 30º dia, quando todos os animais sobreviventes foram sacrificados, restavam 3 ratos no grupo W, 2 no grupo WOC e 6 animais no grupo WOP.

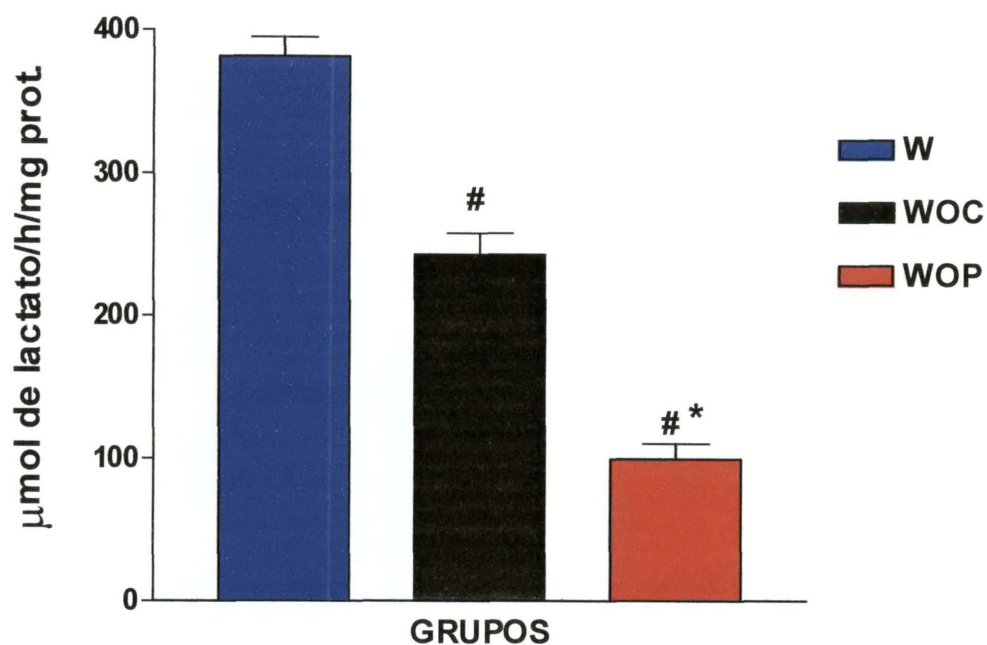


FIGURA 4: Produção total de lactato ($\mu\text{mol/h/mg}$ de proteína) pelas células do tumor de Walker 256 incubadas durante 1h com glicose 5,6 mM, BSA 1% em PBS, do grupo com tumor (W), do grupo suplementado com óleo de coco (WOC) e do grupo suplementado com óleo de peixe (WOP). [#]Diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo W. ^{*}Diferença significativa quando comparado ao grupo W e WOC. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média de 19 animais por grupo.

DISCUSSÃO

A caquexia é caracterizada por exibir progressiva perda de peso, está intimamente relacionada ao catabolismo intenso das reservas de carboidratos, gorduras e proteínas (TISDALE, 1999) e acompanha o desenvolvimento de vários tumores malignos (DE WYS *et. al.*, 1980).

O crescimento tumoral depende dos nutrientes fornecidos pelo portador. Conforme se dá o crescimento tumoral, alterações das funções fisiológicas, imunológicas e bioquímicas ocorrem no organismo do hospedeiro. A constante quebra dos depósitos energéticos como glicogênio, proteínas musculares e triacilgliceróis é resultado da necessidade energética tecidual, reduzida pela caquexia e a alta demanda nutricional do tumor. A ação de mediadores liberados pelas células do sistema imunitário, como as citocinas, leva o hospedeiro a induzir e manter o quadro caquético (MICHIE *et. al.*, 1988; STARNES *et. al.*, 1988; HELLERSTEIN *et. al.*, 1989; STRASSMANN *et. al.*, 1992; ESPAT *et. al.*, 1996).

Neste estudo, o crescimento tumoral levou a menor ganho de massa corpórea no grupo portador de tumor (Tabela 1), mostrando que este modelo induziu à caquexia. A suplementação com óleo de coco não modificou este quadro levando também à perda de peso. No grupo suplementado com óleo de peixe, por outro lado, a perda de massa corpórea foi menor, indicando ação contra o estabelecimento da caquexia. ROSE & CONOLLY (1997), discutiram os aspectos nutricionais envolvidos com a epidemiologia do câncer, mencionando o crescente aumento da ingestão de PUFAs ω -6 em relação a ω -3, o que pode gerar maiores riscos de desenvolver um câncer de mama. Vários estudos indicam que dietas com óleo de peixe, o qual tem altas concentrações de PUFAs ω -3, podem prevenir o aparecimento e a progressão do câncer de próstata. Opostamente, os PUFAs ω -6 (AG linoléico presente na maioria dos óleos vegetais) promovem o efeito estimulatório na proliferação das células cancerígenas da próstata humana (MISHINA *et. al.*, 1985; SCHUMAN *et. al.*, 1982; GODLEY *et. al.*, 1996; NORRISH *et. al.*, 1999; KOBAYASHI *et. al.*, 1999; ROSE & CONNOLLY, 1991; PANDALAI *et. al.*, 1996).

Investigações realizadas com suplementação de óleo de peixe sugerem papel quimioprotetor exercido pelos PUFAs ω -3 em vários modelos animais (BARBER, 2001; CALDER, 2001). Porém, a maior parte destes estudos, introduziu dieta modificada pouco antes da inoculação do tumor ou logo após a inoculação (fase aguda) (PETRIK *et. al.*, 2000; CALDER *et. al.*, 1998).

Este estudo objetivou investigar se a suplementação prolongada, ao longo da vida, com PUFAs ω -3 tinha algum efeito sobre crescimento tumoral e a caquexia. Foi observado que os animais suplementados com óleo de peixe perderam 1,5% da massa corpórea, enquanto nos outros grupos, houve redução de 4,5% no peso corpóreo (Tabela 1), demonstrando que a administração do óleo de peixe leva a excelente resposta metabólica do animal portador de tumor. Além disso, animais saudáveis submetidos à suplementação com os PUFAs ω -3 não apresentaram mudança significativa na evolução do peso corpóreo no decorrer dos estágios de desenvolvimento (Figura 1), o que seria um efeito não desejado.

Pesquisas feitas com PUFAs ω -3 relatam a capacidade de inibição deste ácido graxo, na atenuação da proliferação dos vasos sanguíneos (angiogênese) em tumores experimentais (MUKUTMONI-NORRIS; HUBBARD; ERICKSON, 2000). A existência de suprimento sanguíneo é fundamental para a multiplicação das células do tumor primário bem como para metástases. De fato, vários estudos têm mostrado que angiogênese, e a densidade microvascular têm estreita relação com o prognóstico de câncer de mama humano (TOI *et. al.*, 1996). Mediadores provenientes de derivados lipídicos, como as prostaglandinas, principalmente as da série E_2 (PGE_2), têm sido mostrados como importantes fatores para o processo angiogênico (CHENG, *et. al.* 1998). Neste trabalho, o crescimento tumoral foi avaliado e, observou-se nos animais suplementados com o óleo de peixe, redução da taxa de crescimento em 60% (Figura 2) quando comparada aos animais dos outros grupos, corroborando os dados encontrados na literatura (SAUER, DAUCHY, BLASK, 1994). A explicação do mecanismo pelo qual os PUFAs ω -3 exercem este efeito não é atualmente sabida.

As prostaglandinas da série E₂, produto do AA têm sua concentração diminuída pela suplementação com ácido graxo ω-3 (ARONSON *et. al.*, 2001; GOGOS *et. al.*, 1998), o que dificultaria o processo de angiogênese. Esta hipótese tem sido considerada por vários pesquisadores, mas ela por si só não explica o fenômeno. De fato, SIDDIQUI e WILLIAMS (1987) relataram que ratos com tumor de Walker 256 têm elevadas concentrações de PGE₂. PIFFAR (1999), mostrou que a administração de Naprosyn, um antiinflamatório não esteroidal, bloqueador da COX, levou a redução do crescimento tumoral. Em adição, outra hipótese é que a redução de PGE₂ permite a ocorrência do mecanismo de apoptose nas células tumorais (ROSE *et. al.*, 1999). Em resumo, a capacidade benéfica exercida por este ácido graxo em restringir a incidência de tumores, limitar o crescimento e propagação de metástases têm sido mostrado por vários outros estudos (SIMOPOULOS *et. al.*, 1991; LING *et. al.*, 1991; KARMALI, 1987), mas o mecanismo de ação ainda permanece por ser estabelecido. A inclusão de PUFAs ω-3 na dieta atenua drasticamente os sintomas da caquexia induzida pelo câncer, e por conseguinte, os distúrbios metabólicos. Dentre essas modificações, as quais contribuem para o gasto nutricional, está a elevada atividade glicolítica do tumor, característica também apresentada pelo tumor de Walker 256. A glicólise, principal processo utilizado para a metabolização de glicose pelas células tumorais de crescimento rápido, representa baixo rendimento energético (2 ATPs por molécula de glicose) e grande produção de lactato, em condições anaeróbicas (TAYEK & KATZ, 1997). A quantidade aumentada de lactato plasmático em ratos com tumor (TOGNI, 2000), pode ser explicada pela enorme utilização de glicose pelo tecido tumoral, diminuindo o fornecimento desta para os tecidos periféricos. Então, a alta concentração de lactato circulante é captada pelo fígado, onde ocorre a reciclagem da glicose (gliconeogênese), processo que consome 6 moléculas de ATP para formar uma de glicose, através do reaproveitamento do esqueleto de carbono, via ciclo de Cori. A glicose sintetizada a partir da gliconeogênese é usada como substrato energético do tumor, que parece aumentar ao longo do curso da doença. Este não é o mecanismo usual que o organismo se utiliza para a regulação homeostática (ARGILÉS, ALVAREZ, LÓPEZ-SORIANO, 1997). Na figura 4, tem-se o resultado do metabolismo da glicose

pelas células do tumor de Walker 256, mostrando que no grupo WOP a taxa de produção de lactato foi significativamente menor, significando grande redução do metabolismo das células tumorais e por consequência sua proliferação. Este dado encontrado, contribui significativamente para as pesquisas em andamento e as já realizadas no laboratório, dando maior sustentação à hipótese de que os PUFAs ω -3 exercem efeitos anti-tumoral e anti-caquético em indivíduos portadores de tumor. Ainda não sabemos, se a redução deste metabolismo ocorre por ação dos PUFAs ω -3 sobre as enzimas da via glicolítica ou sobre a captação de glicose dificultando seu transporte. Dados obtidos por HPLC (TOGNI, 2002), mostram que há grande concentração de EPA e DHA nos tumores retirados de ratos suplementados com óleo de peixe, o que dá suporte a esta hipótese.

Dentre os PUFAs ω -3, o EPA (20:5) e o DHA (20:6) são considerados os mais importantes. SAUER, DAUCHY, BLASK, (1994), introduziram na dieta de roedores EPA e DHA, e conseguiram inibir o crescimento do tumor de mama e carcinoma de cólon em ratos. HUDSON & TISDALE (1994), demonstraram que a administração oral de EPA, resulta em supressão da proliferação das células tumorais e prevenção na perda de peso corpóreo, efeitos estes, que foram relacionados a elevações dos níveis de EPA no plasma e no tecido tumoral.

A aplicação destes achados da área básica na área clínica, foram realizados por WIGMORE *et. al.* (1996). Eles pesquisaram 18 pacientes com câncer de pâncreas e os suplementaram com uma mistura que continha 2,2 g de EPA e 1,4 g de DHA diariamente. Antes do tratamento, todos os pacientes tinham perda de peso cuja média era de 3 kg/mês. Ao final de 3 meses de suplementação com PUFAs ω -3, os indivíduos tiveram estabilidade de seus pesos corpóreos e a taxa de sobrevida também aumentou quando comparado ao grupo placebo. Eles se certificaram não ter havido retenção hídrica, o que significou aumento de massa magra. Os mesmos autores propõem que os PUFAs ω -3 possam ter efeito na melhora dos mecanismos de defesa do hospedeiro, associado às alterações na composição da membrana plasmática das células tumorais, tornando-as mais susceptíveis aos mecanismos de defesa, ou ainda, devido à mudança no metabolismo de PGE₂ nas células tumorais.

Os dados apresentados na figura 3 mostram que a suplementação com óleo de peixe aumentou em 67% a taxa de sobrevivência dos animais, quando comparada a dos portadores não suplementados e em 74% quando comparada a dos portadores suplementados com óleo de coco, o que corrobora os dados de WIGMORE *et. al.* (1996). Portanto, a suplementação com óleo de peixe melhora o quadro caquético amplia a sobrevida, reduz a taxa de crescimento tumoral e metabolismo de glicose nos indivíduos portadores de tumor de Walker 256. Assim, uma pequena intervenção nutricional nas porcentagens de PUFA ω -3 pode exercer efeito quimioprotetor quanto ao desenvolvimento tumoral.

CONCLUSÕES

Nossos resultados mostraram que a suplementação com o óleo de peixe a partir da gestação até a fase adulta, reduziu a taxa de crescimento tumoral, o grau de caquexia, aumentou o tempo de sobrevida e diminuiu o metabolismo de glicose dos animais portadores de tumor de Walker 256.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Biologia Molecular da Célula**, 3 ed. Porto Alegre, Artes Médicas, p.1256-1259, 1997.

ALEXANDER, J. W. Immunonutrition: The role of ω - 3 fatty acids. **Nutrition**, v. 14, p.627-633, 1998.

ANDERSON, R.E. Lipids of ocular tissue- IV Comparision of phospholipids from retinas of six mammalian species. **Exp Eyes Res.**, v. 10, p.339, 1970.

ARGILÉS, J.M. & LÓPEZ-SORIANO, F.J. Oxidation of branched-chain amino acids in tumour-bearing rats. **Biochem. J.**, v.268, p.241, 1990.

ARGILÉS, J.M.; GARCÍA-MARTÍNEZ, C.; LLOVERA, M.;LÓPEZ-SORIANO, F.J. The role of cytokines in muscle wasting its relation with cancer cachexia. **Med. Res. Rev.**, v.12, n. 6, p.637-652, 1992.

ARGILÉS, J.M. ; ALVAREZ, B.; LÓPEZ-SORIANO, F.J. The metabolism basis of cancer cachexia. **Med. Res. Ver**, v.17,n. 5,p. 477-498, 1997.

ARONSON, W. J.; GLASPY, J.A.; REDDY, S.T.; REESE, D.;HEBER, D.; BAGGA, D. Modulation of omega-3/omega-6 polyunsaturated ratios with dietary fish oils in men with prostate cancer. **Elsevier Science Inc.**, v. 58, n.2, p.283-288, 2001.

BALLMER, P.E.; McNURLAN M. A.; SOUTHORN, B.G.; GRANT, I.; GARLICK, P.J. Effects of human recombinant interleukin-1 β on protein syntesis in rat tissues compared with a classical acute-phase reaction induced by turpentine. **Biochem J.**, v. 279, p.683, 1999.

BARBER, M. D. Cancer cachexia and its Treatment with Fish-oil-Enriched Nutritional supplementation. **Nutrition**, v.17, p. 751-755, 2001.

BLOOD, C.H.& ZETTER, B.R. Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis. **Biochem Biophys.**, v. 89, p. 118, 1990.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities utilizing the principle of protein dye binding. **Anal. Biochem.**, v.142, p. 79-83, 1976.

BURT, M.E.; AOKI, T.T.; GORSCHBOTH, C.M.; BRENNAN M.F. Peripheral tissue metabolism in cancer-bearing man. **Ann. Surg.**, v.198, p. 685-691, 1983.

CALDER, P.C.; DAVIS, J. YAQOUB, H; PALA, H.; THIES, F.; and NEWSHOLME. Dietary fish oil suppresses human colon tumor growth in athymic mice. **Clin. Scie.**, v.94, p. 303-331, 1998.

CALDER, P.C. Dietary fatty acids and the immune system. **Nutr. Rev.** V.56, p.70-83, 1998.

CALDER, P.C. More good news about fish oil. **Nutrition, (Editorial) 17**; n.2, p.158-159, 2001.

CANGIANO, C.; LAVIANO, A.; MUSCARITOLI, M.; MEGUID, M.M.; CASCINO, A.; FANELLI, F.R. Cancer anorexia: New pathogenic and therapeutic insights. **Nutrition**, v.12, n.1, p.48-51, 1996.

CASTELL, J.V.; GÓMEZ-LECHÓN M.J.; DAVID, M.; FABRA, R.; TRULLENQUE, R.; HEINRINCH, P.C. Acute-phase response of human hepatocytes: regulation of acute-phase protein synthesis by interleukin-6. **Hepatology**, v.12, p. 1179-1190, 1990.

CHENG, T.; CAO, W.; WEN, R.H.; STEINBERG, M.M. Prostaglandin E₂ induces vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor mRNA expression in cultured rat Muller cells. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 39, p. 581-591, 1998.

CONNOLY, J.M.; LUI, X.H.; ROSE, D.P. Effects of dietary menhaden oil, soy, and a cyclooxygenase inhibitor on human breast cancer cell growth and metastasis in nude mice. **Nutr. Cancer**, v.29, p.48-54, 1997.

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

COSTELLI, P.; CARBO, N.; TESSIDORE, L.; BAGBY C.J.; LÓPEZ-SORIANO, F.J.; ARGILÉS, J.M.; BACCINO, F.M. Tumor necrosis factor- α mediates changes in tissue protein turnover in rat cachexia model. **J. Clin. Invest.**, v. 92, p. 2783-2789, 1993.

COSTELLI, P.; GARCÍA-MARTÍNEZ, C.; LLOVERA, M.; CARBÓ, N.; LÓPEZ-SORIANO, F.J.; AGELL, N.; TESSITORE, L.; BACCINO, F.M.; ARGILÉS, J.M. Lack of effect of eicosapentaenoic acid in preventing cancer cachexia and inhibiting tumor growth. **Cancer Lett.**, v.20, n. 1, p. 25-32, 1995.

CURI, R; POMPÉIA, C.; MIYASAKA, C. K.; PROCOPIO, J. **Entendendo a gordura**. 1ed. São Paulo: Editora Manole, 2002.

DAYER, J.M.; BEUTLER, B.; CERAMI, A. Cachectin Tumor Necrosis Factor stimulates collagenase and prostaglandin E₂ production by human synovial cells and dermal fibroblasts. **J. Exp. Med.**, v.162, p. 2163-2168, 1985.

De WYS, W.D., BEGG, C., LAVIN, P.T., BAND. P.R., BENNET, J.M., BERTINO, J.R., COHEN, M.H., DOUGLASS, H.O., ENGSTRON, P.F., EZDINLI, E.Z., HORTON, J., JOHNSON, G.J., MOERTEL, C.G., OKEN, M.M., PERLIA, C., ROSENBAUN C., SILVERSTEIN, M.N., SKELL, R.T., SPONZO, R.W. & TORMEY, D.C. Prognostic effect of weight loss prior to chemotherapy in cancer patients. **Am. J. Med.**, v.69, p.491-497, 1980.

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

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

EDEN, E.; EDSTROM, S; BENNEGARD, K.; SCHERSTEN, T.; LUNDHOLM. Glucose flux in relation to energy expenditure in malnourished in patients with and without cancer during periods of fasting and feeding. **Cancer Res.**, v.44, p.1718, 1984.

ESPAT, N.J.; AUFFENBERG, T.; ROSENBERG, J.J.; ROGY, M.; MARTIN, D.; FANG, C.H.; HASSELGREN, P.O.; COPELAND, E.M. ; MOLDAWER, L.L. Ciliary neurotrophic factor is catabolic and shares with IL-6 the capacity to induce an acute phase response. **Am J. Phys.**, v.271, p.185-190, 1996.

FALCONER, J.S.; FEARON, K.C.H.; PLESTER, C.E.; ROSS, J.A.; CARTER, D.C. Cytokines, the acute-phase response, and resting energy expenditure in cachectic patients with pancreatic cancer. **Ann. Surg.**, v. 219, p. 325-331, 1994.

FERNANDES, L.C., COSTA ROSA, L.F.B.P., MACHADO, U.F. and CURI, R. Insulin treatment inhibits glucose and glutamine metabolism in tumor cells from Walker 256 tumor-bearing rats. **Cancer Ther. Control**, v. 5, p.35-40, 1996.

FOLKMAN, J.& KLAGSBURN, M. Angiogenic factors. **Science**, v. 235, p. 442-447, 1987.

FONG, Y.; MOLDAWER, L.; MORANO, M.; WEI, H.; BARBER, A.; MANOGUE, K.; TRACEY, K.J.; KUO, G.; FISCHMAN, D.A.; CERAMI, A.; LOWRY, S.F. Anticachectin/tumor necrosis factor-alpha antibodies attenuate development of cachexia in tumor models. **Faseb. J.**, v. 3, n. 8, p. 1956-1962, 1989.

GARCÍA-MARTÍNEZ, C.; LÓPEZ-SORIANO, F.J.; ARGILÉS, J.M. Amino acid uptake in skeletal muscle of rats bearing the Yoshida AH-130 ascites hepatoma. **Mol. Cell. Biochem.**, v.148, n. 1, p. 17-23, 1995.

GIBNEY, M.J.& HUNTER, B. The effects of short-and long-term supplementation with fish oil on the incorporation of n-3 polyunsaturated fatty acids into cells of the immune system in healthy volunteers. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v. 47, p. 255, 1993.

GODLEY, P.A.; CAMPBELL, M.K.; MILLER, C.; GALLAGHER, P.; MARTINSON, F.E.; MOHLER, J.L.; SANDLER, R.S. Correlation between biomarkers of omega-3 fatty acid consumption and questionnaire data in African, American and Caucasian United States males with and without prostatic carcinoma. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, v. 5, p. 115-119, 1996.

GOGOS, C.A.; GINOPOULOS, P.; SALSA, B.; APOSTOLIDOU, E.; ZOUMBOS, N.C.; KALFARENTZOS, F. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids plus vitamin E restore immunodeficiency and prolong survival for severely ill patients with generalized malignancy. **Am. Cancer Soc.**, v. 82, n. 2, p. 395-402, 1998.

GRABER, R.; SUMIDA, C.; NUNEZ, E.A. Fatty acids and cell signal transduction. **J. Lipid Mediators Cell Signaling**, v. 9, p. 91, 1994.

GRUNFELD, C. & FEINGOLD, L.H. Metabolic disturbances and wasting in the acquired immunodeficiency syndrome. **N. E. J. Med.**, V.327, p.329-337, 1992.

GUAITANI, A.; DELLA TORRE, P.; MORASCA, L.; PINTUS, C.; BARTOSEK, I. Two lines of Walker carcinoma 256: their peculiarities and different interactions with the host. **Tumori**, v.69, p.1-9, 1983.

HARVEY, K.B. ; BOTHE, A. ; BLACKBURN. Nutritional assessment and patient outcome during oncological therapy. **Cancer**, 43(5supp):2065-9, 1979.

HAUNER, H.; PETRUSCHKE, T.; RUSS, M.; RÖHRIG, K.; ECKEL, J. Effects of tumour necrosis factor alpha (TNF- α) on glucose transport and lipid metabolism of newly-differentiated human fat cells in culture. **Diabetologica**, v. 38, p.764-771, 1995.

HELLERSTEIN, M.K., MEYDANI, S.N., MEYDANI, M., WU K. & DINARELLO, C.A. Interleukin-1-induced anorexia in the rat. Influence of prostaglandins. **J. Clin. Invest.**, 84:228-35, 1989.

HILKENS, C.M.U.; VERMEULEN, H.; VAN NEERVEN, R.J.J.; SNIJDEWINT, F.G.; WIERENGA, E.A.; KAPSENBERG, M.L. Differential modulation of T helper 1 (Th1) and T helper 2 (Th2) cytokine secretion by prostaglandin E₂ critically depends on interleukin-2. **Eur. J. Immunol**, v. 25, p. 59-62, 1995.

HUDSON, D. & TISDALE, M.J. Comparison of the effectiveness of eicosapentaenoic acid administered as either the free acid or ethyl ester as an anticachectic and antitumour agent. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 51, p. 141-145, 1994.

HUNTER, D.J.; SPIEGELMAN, D.; ADAMI, H.O.; BEESON, L.; VAN DER BRANDT, P.A.; FOLSOM, A.R.; FRASER, G.E.; GOLDBOHN, R.A.; GRAHAM, S.; HOWE, G.R.; KUSHI, L.H.; MARSHALL, J.R.; McDERMOTT, A.; MILLER, A.B.; SPEIZER, F.E.; WOLK, A.; YAUN, S.S.; WILLETT, W. Cohort studies of fat intake and the risk of breast cancer - a pooled analysis. **N. E. J. Med.**, v.334, p. 356-361, 1996.

IMAGAWA, W.; BANDYOPADHYAY, G.; WALLACE, D.; NADI, S. Phospholipids containing polyunsaturated fatty acidyl groups are mitogenic normal mouse mammary epithelial cells in serum-free primary cell culture. **Acad. Sci. USA**, v. 86, p. 4122, 1989.

INCULET, R.I.; PEACOCK, J.L.; GORSCHBOTH, C.M.; NORTON, J.A. Gluconeogenesis in the tumor-influenced rat hepatocyte: importance of tumor burden, lactate, insulin, and glucagon. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 79, n. 5, p. 1039- 1046, 1987.

KARMALI, R.A. Omega-3 fatty acids and cancer: a review. **Champaign, AOCS**, p. 222-233, 1987.

KOBAYASHI, M.; SASAKI, S.; HAMADA, G.S.; TSUGANE, S. Serum n-3 fatty acids, fish consumption and cancer mortality in six Japanese populations in Japan and Brazil. **Jpn. J. Cancer Res.**, v. 90, p. 914-921, 1999.

LAWSON, D. H.; RICHMOND, A.; NIXON, D. H.; RUBMAN, D. Metabolic approaches to cancer cachexia. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 2, p. 227, 1982.

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

LING, P.R.; ISTFAN, N.W.; LOPES, S.M.; BABAYAN, V.K.; BLACKBURN, G.L.; BISTRIAN, B.R. Structure lipid made from fish oil and medium chain triglycerides alters tumor and host metabolism in Yoshida sarcoma-bearing rats. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 53, p. 1177-1184, 1991.

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

MICCHIE, H.R., SPRIGGS, D.R., MANOGUE, K.R., SHERMAN, M.L., REVHAUG, A., O'DWYER, S.T., ARTHUR, K., DINARELLO, C.A. CERAMI, A., WOLFF, S.M., KUFEL, D.W. & WILMORE, D.W. Tumor necrosis factor and endotoxin induce similar metabolic responses in human beings. **Surgery**, v.104, p. 280-286, 1988.

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

MISHINA, T.; WATANABE, H.; ARAKI, H.; NAKAO, M. Epidemiological study of prostatic cancer by matched pair analysis. **Prostate**, v. 6, p. 423-436, 1985.

MOLDAWER, L.L.; ANDERSON, C.; GELIN, J.; LUNDHOLM, K.G. Regulation of food intake and hepatic protein synthesis by recombinant-derived cytokines. **Am. J. Physiol.**, v. 254, p. 450, 1988.

MORRISON, S.D. In: **Influence of development on the host**. A. L. Liotta, Ed. Kluwer Acad. Publ., The Netherlands, p. 176-213, 1989.

MOSSMAN, T.R.; SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th 1, Th 2 and more. **Immunol Today**, v. 17, p. 138-143, 1996.

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

NAITO, Y.; ENDO, H.; ARAI, K.I.; COFFMAN, R.L.; ARAI, N. Signal transduction in Th clones: target of differential modulation by PGE₂ may reside downstream of the PKC-dependent pathway. **Cytokine**, v. 8, p. 346, 1996.

NIXON, D.W.; HEYMSFIELD, S.B.; COHEN, A.E.; KUTNER, M.H.; ANSLEY, J.; LAWSON, D.H.; RUDMAN, D. Protein-calorie undernutrition in hospitalised cancer patients. **Am. J. Med.**, v. 63, p. 683-690, 1980.

NOGUCHI, Y.; MAKINO, T.; YOSHIKAWA, T.; NOMURA, K.; FUKUZAWA, K.; MATSUMOTO, A.; YAMADA, T. The possible role of TNF-alpha and IL-2 in inducing tumor-associated metabolic alterations. **Surg. Today**, v.26, n.1, p. 36-41, 1996.

NORRISH, A.E.; SKEAFF, C.M.; ARRIBAS, G.L., *et.al.* Prostate cancer risk and consumption of fish oils: a dietary biomarker-based case-control study. **Br. J. Cancer**, v. 81, p. 1238-1242, 1999.

O' BRIEN, J.S. & SAMPSON, E.L. Fatty acid and aldehyde composition of the major brain lipids in normal gray matter, white matter and myelin. **J. Lipid Res.**, v. 6, p. 545-551, 1965.

PANDALAI, P.K.; PILAT, M.J.; YAMAZAKI, K., *et.al.* The effects of omega-3 and omega-6 fatty acids on in vitro prostate cancer growth. **Anticancer Res.**, v.16, p. 815-820, 1996.

PETRIK, M.B.H.; McENTEE, M.F.; CHIU, C-H and WHELAN, J. Antagonism of Arachidonic Acid Is Linked to the Antitumorogenic Effect of Dietary Eicosapentaenoic Acid in *Apc*^{Min/+} Mice. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 1156-1158, 2000.

PIFFAR, P. M. **Redução da velocidade de crescimento tumoral pela administração de naproxeno, clenbuterol e insulina em ratos portadores de tumor de Walker 256.** Monografia apresentada para obtenção do título de especialista. UFPR, Curitiba, 1999.

ROE, S.Y., COOPER, A; MORRIS, I.D.; ROTHWELL, N.J. Involvement of prostaglandins in cachexia induced by T-cell leukemia in the rat. **Metabolism**, v. 46, n. 4, p. 359-365, 1997.

ROSE, D. P.; CONNOLLY, J. M. Omega-3 fatty acids on human breast cancer growth and metastasis in nude mice. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 85, p. 1745-1747, 1991.

ROSE, D.P.; CONNOLLY, J.M.; LUI, X.H. E. Effects of dietary menhaden oil, soy, and a cyclooxygenase inhibitor on human breast cancer cell growth and metastasis in nude mice. **Nutr. Cancer**, v.29, p.48-54, 1997.

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

ROUBENOFF, R., ROUBENOFF, R.A., WARD, L.M., HOLLAND, S.M. & HELLMAN, D.B. Rheumatoid cachexia: Depletion of lean body mass in rheumatoid arthritis. Possible association with tumor necrosis factor. **J. Rheum**, v. 19, p. 1505-1510, 1992.

SAUER, L.A.; DAUCHY, R.T.; BLASK, D.E. Mechanism for the antitumor and anticachectic effects of n-3 fatty acids. **Cancer Res.**, v. 60, p. 5289-5295, 1994.

SCHUMAN, L.M.; MANDEL, J.S.; RADKE, A.; BAUER, H.; SCARLETT, J.; BLACKARD, C.; McHUGH, R. Some selected features of the epidemiology of prostatic cancer: Minneapolis-St. Paul, Minnesota case-control study, 1976-1979. **Trends in Cancer Incidence**, in Magnus K (Ed), p. 345-354, 1982.

SELBY, P.; HOOBS, S.; VINER, C.; JACKSON, E.; SMITH, I.E.; McELWAIN, T.J. Tumour necrosis factor in man: clinical and biological observations. **Br. J. Cancer**, v. 56, p. 803-808, 1987.

SIDDIQUI, R.A. ; WILLIAMS, J.F. Interactions of vasopressin and prostaglandin e E₂ in the development of cancer cachexia. **Med. Sci.**, v. 15, p. 45-46, 1987.

SIMOPOULOS, A. Omega-3 fatty acids in healthy and disease and in growth and development. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 54, p. 438-463, 1991.

SPERLING, R.I.; BENINEASO, A.I.; KNOELL, C.T.; LARKIN, J.R.; AUSTEN, K.I.; ROBINSON, D.R. Dietary ω -3 polyunsaturated fatty acids inhibit phosphoinositide formation and chemotaxis in neutrophils. **J. Clin. Invest.**, v. 91, p. 651-658, 1993.

STARNES, H.F., WARREN, R.S., JEEVANANDAM, M., GABRILOVE, J.L., LARCHIAN, W., OETTGEN, H.F. & BRENNAN, M.F. Tumor necrosis factor and the acute metabolic response to tissue injury in man. **J. Clin. Invest.**, v. 82, p. 1321-1325, 1988.

STRASSMANN, G., FONG, M., KENNEY, J.S. & JACOB, C.O. Evidence for the involvement of interleukin 6 in experimental cancer cachexia. **J. Clin. Invest.**, v. 89, p. 1681-1684, 1992.

TAYEK, S.A. & KATZ, J. Glucose production, recycling, Cori cycle, and gluconeogenesis in humans relationship to serum cortisol. **Am. J. Physiol.**, v. 272, n. 1, p. 476-484, 1997.

THEOLOGIDES, A. Cancer cachexia. **Cancer**, v.43, p. 2004-2012, 1979.

THOMPSON, M.P.; KOONS, J. E.; TAN, E. T. H.; GRIGOR, M. R. Modified Lipoprotein Lipase Activities Rates of Lipogenesis and Lipolysis as Factor Leading to Lipid Depletion in C57BL mice-bearing the preputial Glan Tumor ESR-586. **Cancer Res.**, v. 41, p. 3228-3232, 1981.

TISDALE, M.J.; BECK, S.A. Production of lipolytic and proteolytic fators by a murine tumor producing cachexia in the host. **Cancer Res.**, v. 47, p. 5919, 1987.

TISDALE, M.J.; BECK, S.A. Inhibition of tumour-induced lipolysis in vitro and cachexia and tumour growth in vivo by eicosapentaenoic acid. **Biochem. Pharmacol.**, v. 41, p. 103-107, 1991.

TISDALE, M.J.; MULLIGAN, H. D.; BECK, S.A. Lipid metabolism in cancer cachexia. **Br. J. Cancer**, v. 66, n. 1, p. 57-61, 1992.

TISDALE, M.J. Wasting in cancer. **The Journal of Nutrition**, v. 129, n. 1, p. 243-246, 1999.

TOGNI, V.G. **Tratamento com naproxeno, clenbuterol, insulina e suplementação oral com glutamina diminui a velocidade de crescimento tumoral e reverte parcialmente a caquexia em ratos portadores de tumor de Walker 256.** Monografia apresentada para obtenção do título de especialista. UFPR, Curitiba, 2000.

TOGNI, V.G. **Suplementação com óleo de peixe da gestação à fase adulta, reduz a taxa de crescimento tumoral e a caquexia em ratos portadores de tumor de Walker 256.** Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre em Biologia Celular. UFPR, Curitiba, 2002.

TOI, M.; KONDO, S.; SUZUKI, H.; YAMAMOTO, Y.; INADA, K.; IMAZAWA, T.; TANIGUCHI, T.; TOMINAGA, T. Quantitative analysis of vascular endothelial growth factor in primary breast cancer. **Cancer**, v. 77, p. 1101-1106, 1996.

WARREN, S. The immediate cause of death in cancer. **Am. J. Med. Science**, v. 185, p. 610-615, 1932.

WATERHOUSE, C.; JEANPETRE, N.; KEILSON, J. Gluconeogenesis from alanine in patients with progressive malignant disease. **Cancer Res.**, v. 39, n. 6, p. 1968-1972, 1979.

WATTERS, J.M.; BESSEY, P.Q.; DINARELLO, C.A.; WOLFF, S.M. & WILMORE, D.W. Both inflammatory and endocrine mediators stimulate host responses to sepsis. **Arch. Surg.** v. 121, p. 179-190, 1986.

WIGMORE, S. J. Inhibition of lipolysis and muscle protein degradation by EPA in cancer cachexia. **Nutrition**, v. 12 (supp), n. 1, p. 31-33, 1996.

WIGMORE, S. J.; ROSS, J.A.; FALCONER, J.S.; PLESTER, C.E.; TISDALE, M.J., CARTER, D.C.; FEARON, K.C. The effect of polyunsaturated fatty acids on the progress of cachexia in patients with pancreatic cancer. **Nutrition**, v. 12 (supp), n. 1, p. 27-30, 1996.