

EVELISE MARIA GARCIA

**DETERMINAÇÃO DA TAXA DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA NO TUMOR DE
WALKER 256 DE RATOS SUPLEMENTADOS CRONICAMENTE COM ÓLEO
DE PEIXE**

**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

2004

À minha mãe Edília que sempre me incentivou a
caminhar na direção dos meus sonhos.
Ao meu pai Alfeu que foi fonte de perseverança para
finalizar esta etapa de minha vida profissional.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes, pela orientação, idéias, paciência e incentivo que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho.

À minha mãe por todo amor e compreensão, e por estar sempre comigo.

Ao Beny pelo amor e compreensão. Não tenho palavras para dizer o quanto você é importante, obrigada por tudo.

À minha irmã Ana por todo carinho e paciência.

Às minhas grandes amigas Mônica, Patricia, Roxane e Fernanda pela amizade e por estarem sempre presentes nos momentos em que precisei.

Aos colegas de laboratório Júlia, Everson, Claudinha, Nathalia, Ricardo K., Ricardo T., Loli, Maressa, Sandro, Dalva, Lú, Gleisson, Vanessa e Maurício pelo companheirismo, auxílio nos experimentos e por proporcionarem um ótimo ambiente de trabalho. À Rogéria pela paciência em responder minhas intermináveis perguntas e, principalmente, pela amizade.

À Katya pela atenção e paciência em me ensinar a metodologia utilizada neste estudo.

Aos colegas de faculdade pelos momentos divertidos.

Aos funcionários do Biotério pelo auxílio e disponibilidade no cuidado com os animais.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	v
RESUMO	vi
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 CÂNCER	1
1.2 TUMOR DE WALKER 256	2
1.3 ÁCIDOS GRAXOS	2
1.4 CÂNCER E ÁCIDOS GRAXOS	6
2 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	7
2.1 PROCESSO DE INDUÇÃO DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA ENZIMÁTICA .	8
2.2 PROCESSO DE INDUÇÃO DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA NÃO ENZIMÁTICA	10
2.3 ANTIOXIDANTES.....	11
3 OBJETIVOS	12
4 MATERIAIS E MÉTODOS	13
5 RESULTADOS	17
5.1 GERAÇÃO F0.....	17
5.2 GERAÇÃO F1.....	22
6 DISCUSSÃO	27
7 CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	- Ácido araquidônico
ALA	- Ácido α -linolênico
AGPI	- Ácido graxo poliinsaturado
COX	- Enzima ciclooxigenase
DHA	- Ácido docosahexaenóico
EPA	- Ácido eicosapentaenóico
GLA	- Ácido gama-linolênico
H ₂ O ₂	- Peróxido de hidrogênio
LOX	- Enzima lipooxigenase
LPO	- Peroxidação lipídica
LTs	- Leucotrienos
n-3	- Omega-3
n-6	- Omega-6
n-9	- Omega-9
O ₂ ^{•-}	- Radical superóxido
OH [•]	- Radical hidroxil
PBS	- Tampão fosfato salina
PW	- Grupo portador de tumor suplementado com óleo de peixe
PGs	- Prostaglandinas
RO [•]	- Radical alcóxil
ROO [•]	- Radical peróxil
SW	- Grupo portador de tumor suplementado com gordura de coco
TXs	- Tromboxanas
W	- Grupo portador de tumor não suplementado

RESUMO

Sabe-se que populações consumidoras de óleo de peixe possuem menor incidência de tumores. O mecanismo pelo qual o óleo de peixe induz a este efeito não é totalmente conhecido, entretanto a peroxidação lipídica (LPO), investigada neste trabalho, é um mecanismo postulado como causador da redução de crescimento tumoral. Este trabalho tem como objetivo mensurar a taxa de LPO no tecido tumoral, fígado, baço e pulmão de ratos Wistar portadores do tumor de Walker 256 (W), suplementados cronicamente com óleo de peixe (1g/kg p.c.). Foram utilizados dois protocolos experimentais para este estudo: animais de geração F0 e F1. Após 70 dias de suplementação, foi inoculada suspensão de células tumorais (2×10^7 células/mL) nos animais e, 14 dias depois, ortotanaziados por deslocamento cervical. O tumor foi retirado para determinação do peso bem como da taxa de LPO pelo método FOX. O peso da massa tumoral (g) dos animais de geração F0 não suplementados (W) foi $14,95 \pm 0,56$; suplementados com gordura de coco (SW) foi $20,1 \pm 1,41$ e; com óleo de peixe (PW) foi $7,6 \pm 0,44$. Nos animais de geração F1 o peso da massa tumoral (g) do grupo W foi $28,9 \pm 3,53$; SW foi $31,9 \pm 3,4$ e; PW foi $7,3 \pm 3,7$. O peso da massa tumoral dos animais (geração F0 e F1) do grupo PW apresentou-se estatisticamente menor, quando comparado aos grupos W e SW. A taxa de LPO (mmol/mg de tecido) nos animais de geração F0 grupo W foi $32,01 \pm 0,98$; do grupo SW foi $28,06 \pm 1,26$ e; do grupo PW foi $58,12 \pm 7,96$. A taxa de LPO (mmol/mg de tecido) nos animais de geração F1 do grupo W, SW e PW foi $1,19 \pm 0,11$, $1,12 \pm 0,12$ e $2,03 \pm 1,18$, respectivamente. A taxa de LPO (geração F0 e F1) no grupo PW foi estatisticamente maior quando comparado a W e SW. Nos tecidos fígado, baço e pulmão de geração F0 e F1, a taxa de peroxidação lipídica não foi diferente entre os grupos. A suplementação com óleo de peixe durante uma e duas gerações diminuiu a massa tumoral e um provável mecanismo foi a taxa de LPO elevada nos PW.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

O câncer tem importância ímpar no contexto da biologia celular, pois reflete distúrbios do comportamento das células em um organismo multicelular. É uma doença na qual células individuais mutantes iniciam sua prosperidade, às custas de seus vizinhos, mas no final destrói toda sociedade celular e morre. As células cancerosas reproduzem-se em detrimento de células normais, invadindo e colonizando territórios reservados para outras células (ALBERTS *et al*, 1997).

Em geral, os cânceres parecem originar-se por um processo no qual uma população inicial de células levemente modificadas, descendentes de um único ancestral mutante, evoluem através de sucessivos ciclos de mutação e seleção natural. Esta evolução envolve um grande elemento de chance e geralmente leva muitos anos (ALBERTS *et al*, 1997). Esse processo ocorre através de alterações nos genes que controlam a proliferação e o crescimento celular.

Denomina-se tumor ou neoplasma a proliferação, fora de controle, de uma massa de células anormais. Quando estas células neoplásicas permanecem agrupadas numa massa única o tumor é dito benigno. O tumor é considerado câncer somente se for maligno, isto é, se suas células tiverem capacidade de invadir tecidos vizinhos através da corrente sanguínea ou de vasos linfáticos, formando tumores secundários ou metástases em outros locais do corpo (ALBERTS *et al*, 1997).

O câncer é classificado de acordo com o tecido e tipo de célula que lhe deu origem. Cânceres que se originam de células epiteliais são chamados carcinomas; aqueles que se originam de tecidos conjuntivos ou musculares são denominados sarcomas. Cânceres que não se enquadram nestas duas categorias incluem as várias leucemias (ALBERTS *et al*, 1997).

O câncer tem sido considerado um problema em países desenvolvidos e nações industrializadas. No ano de 2000, tumores malignos foram responsáveis por 12% das 56

milhões de mortes que ocorreram no mundo. Estima-se que no ano de 2020, o número de casos de câncer será de 15 milhões.

1.2 TUMOR DE WALKER 256

O tumor de Walker 256 foi identificado por George Walker em 1928, no John's Hopkins University School of Medicine, após observação do desenvolvimento espontâneo de tumor em glândulas mamárias de uma rata grávida. Entre 1953 e 1954 esse tumor foi transplantado em ratos por inoculação subcutânea, sendo palpável em uma semana e levando a morte dos animais após seis semanas. O tumor de Walker 256 apresenta dois subtipos: tipo A, metastizante, que leva a caquexia terminal dos ratos portadores em aproximadamente 27 dias; e o tipo B, que não forma metástases e induz caquexia precoce do portador, levando a morte em 15 dias. Esta linhagem de células tem sido utilizada em vários estudos porque é espécie-específica para ratos e facilmente transplantada (FERNANDES et al, 1994).

1.3 ÁCIDOS GRAXOS

Os ácidos graxos são elementos-chave no organismo, pois são fonte de energia para o metabolismo e precursores da síntese de fosfolípidos. Os ácidos graxos e seus metabólitos são constituintes da membrana celular e possuem papel importante na manutenção da integridade e fluidez da membrana (JIANG, 1998).

Ácidos graxos são formados por uma cadeia de átomos de carbono, aos quais estão ligados átomos de hidrogênio, formando uma cadeia hidrocarbônica. Os diferentes ácidos graxos encontrados nas células diferem em comprimento de suas cadeias de hidrocarboneto e no número de duplas ligações carbono-carbono (ALBERTS *et al*, 1997), proporcionando diferentes propriedades fisiológicas, químicas e nutricionais.

Os ácidos graxos podem ser saturados (nenhuma dupla ligação entre carbonos), monoinsaturados (uma dupla ligação) ou poliinsaturados (duas ou mais duplas ligações),

dentre eles destacam-se três importantes famílias de ácidos graxos poliinsaturados: n-9, n-6 e n-3.

Os ácidos graxos n-9, n-6 e n-3 são classificados de acordo com a posição da primeira dupla ligação a partir da extremidade metila da cadeia carbônica (ROYNETTE, 2003). Assim, a família n-9 apresenta a primeira dupla ligação entre os carbonos nove e dez da cadeia hidrocarbônica, a família n-6, entre os carbonos seis e sete e a família n-3, entre os carbonos três e quatro. A família n-3, metabolizada a partir do precursor ácido α -linolênico (ALA; 18:3n-3), tem como produtos principais os ácidos eicosapentaenóico (EPA; 20:5n-3) e docosahexaenóico (DHA; 22:6n-3) e a família n-6 derivada do ácido linoléico (LA; 18:2n-6) tem o ácido araquidônico (AA; 20:4n-6) como seu principal produto.

Ácidos graxos (AG) das famílias n-3 e n-6 não podem ser sintetizados por mamíferos, pois estes não possuem as enzimas desaturases $\Delta 12$ e $\Delta 15$, responsáveis pela síntese dos AG n-3 e n-6. Estes ácidos graxos devem ser obtidos da dieta, consequentemente são chamados ácidos graxos essenciais (ROSE, 1999). Alimentos que possuem grande concentração de n-3 são vegetais de folhas verdes escuras, óleo de canola, óleo de nozes e óleo de linhaça. Pode-se ainda encontrar n-3 no óleo de peixe, pois os peixes se alimentam de algas presentes no fitoplâncton marinho e estas algas são ricas fontes de ácidos graxos n-3 de cadeia longa. Ácidos graxos n-6 podem ser encontrados em muitas sementes e óleos de açafrão, soja, girassol e milho.

N-3 e n-6 possuem importante papel na regulação do sistema imunitário, agindo como precursores para síntese de eicosanóides. O AA ou o EPA são mobilizados da membrana celular pela ação das enzimas fosfolipases, especialmente fosfolipase A₂ e C, e subsequentemente metabolizados pelas ciclooxigenases (COX) ou lipooxigenases (LOX) em prostaglandinas (PGs), tromboxanas (TXs) e leucotrienos (LTs) (ROYNETTE, 2003) (Figura 01).

Existe grande competição entre os ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) n-6 e n-3 pelas enzimas desaturase e elongase, as quais são comuns a ambas as vias metabólicas.

Contudo, estas enzimas têm grande afinidade por AGPI n-3, pois quando o consumo de AGPI n-3 é alto, este é preferencialmente metabolizado. A suplementação com ALA, EPA e DHA leva a inibição competitiva do metabolismo do AGPI n-6, onde a desaturação de LA e as concentrações de AA são diminuídas. AA e EPA competem pelas enzimas COX e LOX (ROYNETTE, 2003).

O AA é precursor de eicosanóides, como prostaglandinas e tromboxanas de série 2 e leucotrienos de série 4. Estes eicosanóides podem atuar na formação de trombose e aterosclerose, desenvolvimento de desordens inflamatórias e alérgicas, proliferação celular (SIMOPOULOS, 1999), regulação inflamatória, imunidade, migração celular e plaquetária e pressão sanguínea (CALDER, 1997).

O EPA produz prostaglandinas e tromboxanas de série 3 e leucotrienos de série 5 (CALDER, 1997). EPA pode ser substrato para a síntese de eicosanóides, mas não o DHA. O consumo de n-3 reduz os níveis de AA na membrana celular e conseqüentemente diminui a produção de eicosanóides pelo AA e aumenta a produção pelo EPA (CALDER, 1997). Os eicosanóides produzidos pelo EPA, os quais não têm as mesmas propriedades biológicas que aquelas produzidas pelo AA, levam a diminuição da produção de metabólitos da prostaglandina E₂, tromboxana A₂ (potente agregador de plaquetas e vasoconstritor) e leucotrieno B₄ (indutor de inflamação) e aumento na concentração do leucotrieno B₅ (ação fraca como indutor de inflamação e agente quimiotático) (SIMOPOULOS, 1999; GIL, 2002).

Estudos recentes mostram que certos ácidos graxos essenciais são seletivamente tóxicos a células tumorais, efeito que deve-se a produção do ânion superóxido. Os ácidos graxos essenciais também exercem ação regulatória sobre a motilidade da célula tumoral, invasão e sobre o comportamento metastisante, via mecanismos como regulação da adesão célula-célula, moléculas supressoras de tumor e motilidade relacionada com as vias de transdução de sinais (JIANG, 1998).

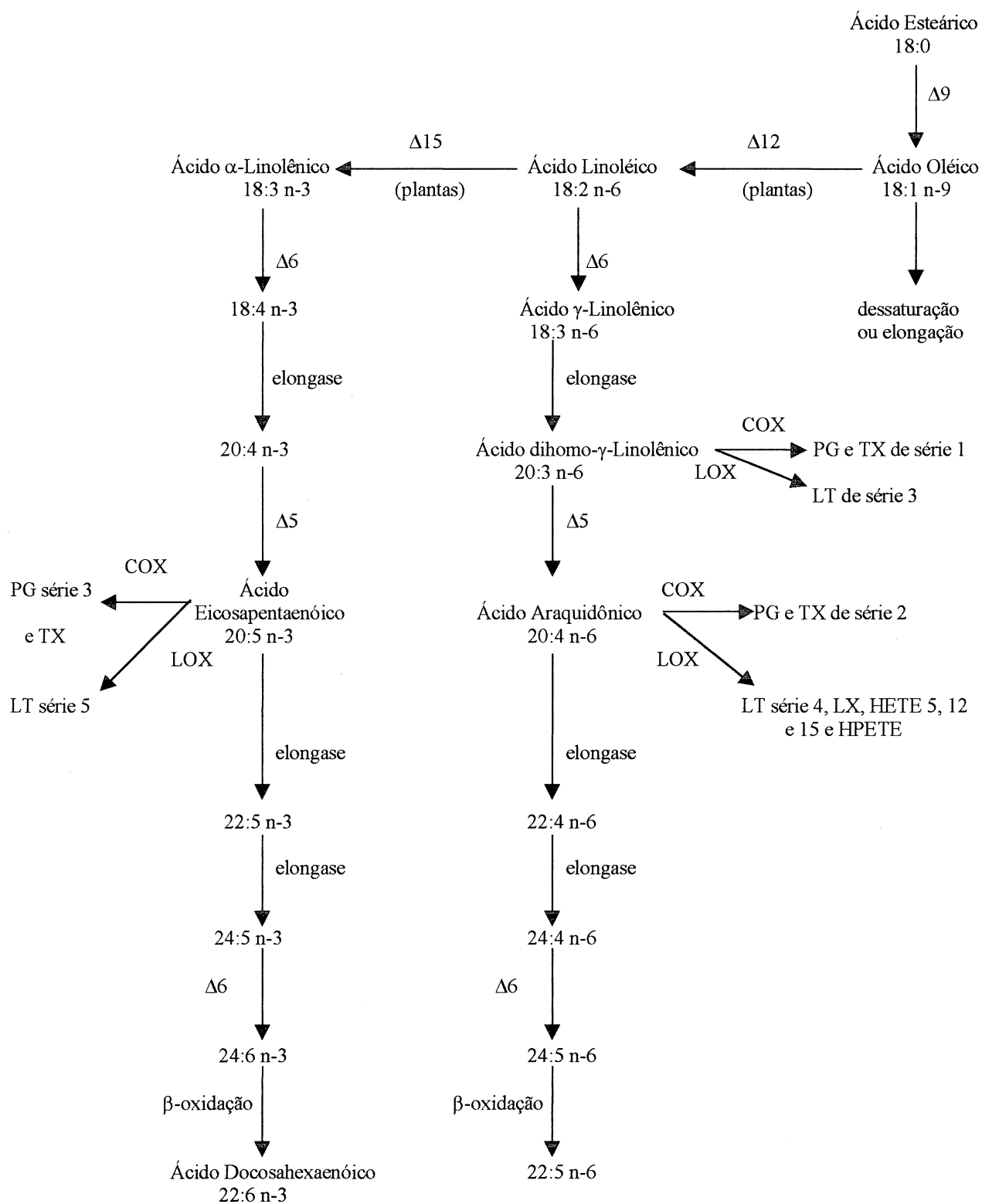


Figura 01: Metabolismo dos ácidos graxos poliinsaturados. (Adaptado de CALDER, 1998).

1.4 CÂNCER E ÁCIDOS GRAXOS

Ácidos graxos n-3 desempenham importante papel no crescimento e desenvolvimento do organismo bem como, na prevenção e tratamento de doenças coronarianas, hipertensão, diabetes, doenças auto-imunes, inflamações e câncer (SIMOPOULOS, 1999).

Nossos ancestrais tinham dieta baseada em baixa concentração de gordura saturada, baixos níveis de gordura *trans* e razão de ácidos graxos n-6 e n-3 de 1-2:1. Acredita-se que o grande consumo de produtos marinhos pelos esquimós, assim como pelos japoneses e populações do Alasca e Groelândia, proporciona efeito protetor contra o câncer, em consequência do consumo elevado de n-3, tais como EPA e DHA (CURI, 2002).

A dieta ocidental atual possui concentrações altas de ácidos graxos n-6 e baixas em n-3, pois o consumo de peixes decaiu e a produção industrial de animais alimentados com grãos ricos em n-6 aumentou (SIMOPOULOS, 1999). Vários estudos demonstram correlação do aumento do consumo de ácidos graxos n-6 e a incidência de câncer, onde estes, são substratos para peroxidação lipídica e formação de radicais livres. Em muitos estudos, células tumorais do tecido mamário responderam ao ácido linoléico de maneira agressiva, demonstrando proliferação das células tumorais e carcinogênese (JIANG, 1998). Os ácidos graxos n-3 contribuem para a diminuição do crescimento tumoral e respostas pró-inflamatórias, como já mencionado.

Muitos estudos sugerem que ácidos graxos essenciais e seus metabólitos, como ácido gama-linolênico (GLA), EPA e DHA, podem matar seletivamente células tumorais sem provocar danos a células normais (DAS, 1999). Esta ação tumoricida dos ácidos graxos parece depender de sua habilidade em aumentar a ação de radicais livres em células tumorais.

2 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

A peroxidação lipídica (LPO) pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultantes da ação de radicais livres sobre lipídios de membranas celulares (CURI *et al.*, 2002).

A maior classe de biomoléculas susceptíveis à LPO, ou seja, ao dano oxidativo por espécies reativas do oxigênio são os ácidos graxos poliinsaturados (KOLANJIAPPAN, 2003). Os radicais livres promovem a incorporação de um oxigênio molecular a um ácido graxo poliinsaturado para produzir hidroperóxidos como produto primário (CURI *et al.*, 2002). Muitos dos peróxidos de hidrogênio são instáveis e dessa forma, rapidamente decompostos a aldeídos, alcanos, isoprostanos (YIN, 2003), radical superóxido e hidroxila (SPITELLER, 2003), entre outros produtos.

Os produtos da LPO podem causar alterações na estrutura e função da membrana celular, incluindo diminuição da permeabilidade e fluidez de membrana, inativação de enzimas de ligação de membrana e perda de ácidos graxos essenciais (KOLANJIAPPAN, 2002). Estes produtos ainda podem iniciar fibrose ou inflamação, transcrição de genes ou apoptose (YIN, 2003), apresentar citotoxicidade (YOSHIDA *et al.*, 2003), e alterar o fluxo iônico e de outras substâncias, levando à perda da seletividade para a entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas à célula, provocar alteração no DNA e comprometer os componentes da matriz extracelular (CURI *et al.*, 2002).

A LPO pode ocorrer através de dano celular, o qual modifica a conformação da membrana, envelhecimento e/ou proliferação celular.

Segundo COLQUHON (2001), o EPA provoca aumento no índice de apoptose e inibição da proliferação de células tumorais e também detecta-se presença de fragmentação de DNA nestas células.

Os locais mais susceptíveis à LPO são as ligações mais fracas, como as duplas ligações encontradas nos ácidos graxos poliinsaturados (SPITELLER, 2003). Dessa

forma, o índice de LPO aumenta de acordo com o aumento do número de duplas ligações presentes na membrana celular (YOSHIDA, 2003).

Estudos recentes demonstram que dieta rica em n-3 pode levar à maior LPO no tumor porque estas células não apresentam concentração de antioxidantes normal (KOLANJIAPPAN, 2002).

Nos sistemas biológicos, a LPO pode ocorrer através de duas vias: a enzimática e a não enzimática.

2.1 PROCESSO DE INDUÇÃO DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA ENZIMÁTICA

A LPO inicia-se com a extração de um átomo de hidrogênio de um ácido graxo poliinsaturado por lipoxigenases, tal remoção requer menos energia do que a remoção de um H de uma ligação simples. A maioria das LOX não aceitam AGPI esterificados (SPITELLER, 2003). A LPO pode ser iniciada por radicais hidroxil (OH^\bullet), peróxil (ROO^\bullet), alcóxil (RO^\bullet) e superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$). A geração de radicais da LPO produz moléculas que são capazes de reagir com outros AGPI iniciando nova reação e formando peróxidos lipídicos e um novo radical de ácido graxo para posterior peroxidação (JIANG, 1998).

Após um evento que resulte na mudança conformacional da membrana celular, ocorre a ativação da fosfolipase A₂ e AMPc. A fosfolipase A₂ atua no fosfolipídio apenas na posição 2, gerando ácidos graxos livres que conseqüentemente provocam mudanças de pH nas proximidades. O AMPc induz, na presença de cálcio, a ativação de quinases e estas ativam enzimas de degradação, como por exemplo lipoxigenases (SPITELLER, 2003) (Figura 02).

No estado inativo, as lipoxigenases contém em seu centro ativo um íon ferro (Fe^{2+}). Quando a enzima é ativada o íon ferro é oxidado a Fe^{3+} . Neste estado, a enzima reage com um AGPI retirando um átomo de hidrogênio do grupo ativo CH_2 , formando um radical. O radical de hidrogênio é transformado a próton através da remoção de um

elétron enquanto o Fe^{3+} é reduzido a Fe^{2+} . O radical lipídico gerado é transformado em radical peroxil através da reação com oxigênio, este radical, então, é transformado em ânion peroxil. O ânion peroxil é finalmente combinado com o próton anteriormente gerado para formar hidroperóxido lipídico (Figura 03) (SPITELLER, 2003).

Algumas lipoxigenases, especialmente a 15-LOX, aceitam fosfolipídios como substratos. Quando a 15-LOX é ativada hidroperóxidos lipídicos são produzidos, nos quais o ácido graxo poliinsaturado ainda está conectado a cadeia de glicerol (SPITELLER, 2003).

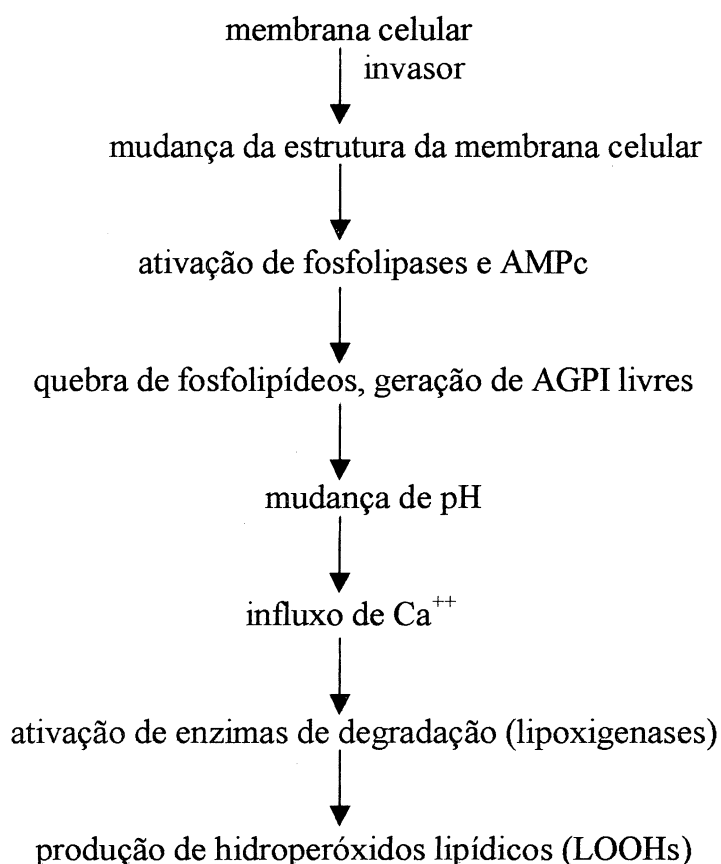


Figura 02: Seqüência de eventos que levam a geração de LOX. (Adaptado de SPITELLER, 2003).

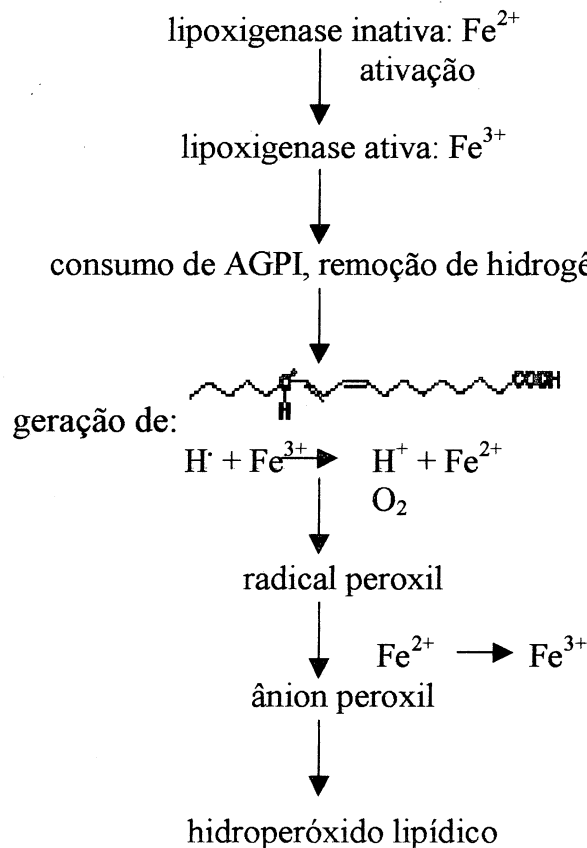


Figura 03: Geração enzimática de hidroperóxidos lipídicos (Adaptado de SPITELLER, 2003).

2.2 PROCESSO DE INDUÇÃO DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA NÃO ENZIMÁTICA

Os peróxidos lipídicos podem também ser obtidos por processo não enzimático. Este processo ocorre na presença de estoques de lipídeos, especialmente de óleos que contêm grandes concentrações de ácidos graxos poliinsaturados na forma esterificada (SPITELLER, 2003).

A geração de produtos da LPO em doenças é geralmente causada por processo não enzimático, o que é explicado através de disfunção mitocondrial. Na mitocôndria o oxigênio é transformado em água, numa reação de transferência de elétrons. No primeiro passo dessa reação um elétron é transferido para o oxigênio, gerando um ânion superóxido. Este reage com água através de transferência de próton e forma-se o radical

HO^{\cdot} . Dois destes radicais se combinam através da ação da enzima superóxido dismutase gerando H_2O_2 e O_2 . O H_2O_2 reage com o íon Fe^{2+} formando o radical OH^{\cdot} (Figura 03). O radical OH^{\cdot} , por sua vez, é altamente reativo sendo capaz de abstrair um hidrogênio da dupla ligação do grupo CH_2 do AGPI (SPITELLER, 2003).

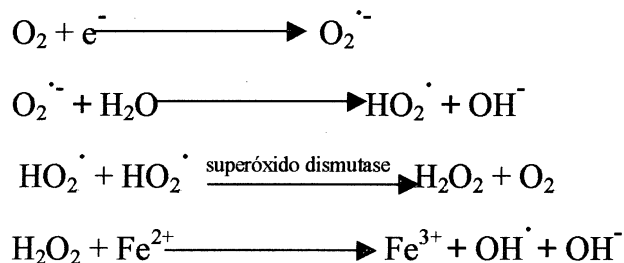


Figura 03: Geração de radicais OH^{\cdot} (Adaptado de SPITELLER, 2003).

2.3 ANTIOXIDANTES

As células do corpo humano estão protegidas dos efeitos negativos da LPO pela presença de antioxidantes endógenos, os quais atuam como potentes "varredores" de radicais lipídicos e inibidores do processo neoplásico (KOLANJIAPPAN, 2002). Os antioxidantes encontrados são: a enzima catalase que protege a célula contra oxidação, a vitamina E e a glutathione redutase - redutor intracelular - que agem na defesa contra radicais livres.

As células tumorais possuem baixa concentração de antioxidantes. Espécies reativas do oxigênio podem iniciar LPO e dano ao DNA, levando a mutagênese, carcinogênese e morte celular, se o potencial antioxidante da célula for insuficiente (KOLANJIAPPAN, 2002).

Trabalhos prévios (TOGNI et al, 2003) tem demonstrado que a suplementação crônica com óleo de peixe foi capaz de induzir redução do crescimento tumoral, o qual foi acompanhado de aumento de incorporação do AGPI n-3 no tecido tumoral. O mecanismo pelo qual o óleo de peixe reduz a taxa de crescimento tumoral ainda não é sabido, contudo uma das possíveis hipóteses é através da via de peroxidação lipídica.

3 OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivo mensurar a taxa de peroxidação lipídica no tecido tumoral, fígado, baço e pulmão de ratos portadores do tumor de Walker 256 de primeira e segunda geração suplementados cronicamente com óleo de peixe.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

- Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar, provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram submetidos a ciclo claro/escuro (12h/12h) com água e comida *ad libitum*, em ambiente com temperatura controlada de $23 \pm 1^\circ\text{C}$. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Metabolismo Celular, no Departamento de Fisiologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

- Protocolo experimental

Para a realização dos experimentos foram utilizados dois protocolos experimentais.

I Geração F0:

Ratos machos recém-desmamados (21 dias) foram divididos em 3 grupos distintos:

- 1) Grupo com tumor sem suplementação (W);
- 2) Grupo com tumor saturado (SW), que recebeu suplementação, via oral, com gordura de coco (ácido graxo saturado), na dose de 1g/kg p.c.;
- 3) Grupo com tumor poliinsaturado (PW), que recebeu suplementação, via oral, com óleo de peixe, rico em ácido graxo poliinsaturado n-3, na dose de 1g/kg p.c..

A evolução da massa corpórea de todos os grupos foi monitorada a cada dois dias, durante todo o período experimental.

Estes grupos receberam suplementação até completarem 70 dias, quando então foi inoculado, subcutaneamente, no flanco direito, suspensão de células do tumor de Walker 256, contendo 2×10^7 células/mL. No 14º dia após a inoculação do tumor, os

animais foram ortotanaziados por deslocamento cervical e o tumor, fígado, baço e pulmão retirados para mensuração da taxa de peroxidação lipídica.

II Geração F1

Ratas fêmeas recém-desmamadas (21 dias) foram divididas em 3 grupos distintos:

- 1) Grupo sem suplementação (C);
- 2) Grupo saturado (S), que recebeu suplementação, via oral, com gordura de coco (ácido graxo saturado), na dose de 1g/kg p.c.;
- 3) Grupo poliinsaturado (P), que recebeu suplementação, via oral, de 1g/kg p.c. de óleo de peixe, rico em ácido graxo poliinsaturado n-3.

A evolução da massa corpórea de todos os grupos foi monitorada a cada dois dias, durante todo o período experimental.

Após 90 dias, as fêmeas foram colocadas para acasalar com machos, não submetidos a suplementação. A prole de machos resultante (F1) foi igualmente dividida em 3 grupos suplementados como mencionado acima. Ao completarem 70 dias, foi inoculado, subcutâneamente, suspensão de células do tumor de Walker 256 (2×10^7 células/mL). No 14º dia após a inoculação do tumor, os animais foram ortotanaziados por deslocamento cervical e os tecidos tumor, fígado, baço e pulmão retirados para mensuração da taxa de peroxidação lipídica.

• Obtenção e transplante de células tumorais

O Animal portador do tumor ascítico de Walker 256 foi ortotanaziado por deslocamento cervical e em seguida foi injetado 10 mL de solução salina 0,9%. A cavidade abdominal foi aberta e todo conteúdo ascítico coletado. Uma alíquota desta suspensão foi diluída 1:100 e feita contagem de células em câmara de Neubauer, com corante “Trypan Blue”. Um mL desta suspensão (contendo 2×10^7 células) foi injetado subcutâneamente nos animais (FERNANDES et al, 1991). A quantidade inoculada

assegura que a massa tumoral represente de 7 a 10% do peso da carcaça do animal quando da finalização do período experimental.

Nos experimentos realizados neste estudo utilizamos matrizes com tumor de Walker 256 tipo B, cedido gentilmente pelo Professor Rui Curi, ICB-USP, em 1989 e, desde então mantidos pelo Laboratório de Metabolismo Celular.

- Reagentes

O óleo de peixe foi doado gentilmente pela Fundação Herbarium e a gordura de coco da Indústria Brasileira Refino de Óleos do Brasil Ltda. Corante xilenol laranja e hidroxitolueno butilado (BHT) provenientes da Sigma Chemical Co., metanol e ácido sulfúrico da Biotec e sulfato ferroso amoniacal da Vetec Química Fina Ltda.

- Determinação do peso dos tecidos

A massa tumoral, do fígado, do baço e do pulmão foi determinada em balança digital Denver Instrument XL-410.

- Determinação da taxa de peroxidação lipídica

A taxa de peroxidação lipídica foi mensurada pelo método FOX ou xilenol laranja conforme Jiang e colaboradores (1991). Este método quantifica a formação de hidroperóxidos durante a peroxidação lipídica. Baseia-se no fato que hidroperóxidos oxidam ferro a íon férrico e por sua vez este íon se liga ao corante xilenol laranja.

Amostras de aproximadamente 300 mg de tecido foram homogeneizadas (homogeneizador Politron – 25000 rpm) em 5 volumes de tampão fosfato (PBS) 0,1M, pH 7,4. O homogeneizado foi, novamente, diluído em PBS (1:10) e 100 µL deste homogeneizado foram adicionados a 900µL da solução de reação, com incubação a temperatura ambiente por 2 horas, para posterior leitura em espectrofotômetro ULTROSPEC 2000 (Pharmacia) a 560 nm. A solução de reação foi composta por 100µM

xilenol laranja, 25mM H₂SO₄, 4mM hidroxitolueno butilado (BHT), 250μM sulfato ferroso amoniacal, dissolvidos em 90% (v/v) de metanol. Para cada experimento foram feitas triplicatas. A determinação das concentrações de hidroperóxidos foi feita utilizando coeficiente de extinção molar $E=4,3 \times 10^{-4}$ M.

- Determinação da quantificação protéica

A quantidade de proteína foi mensurada pelo método de Bradford. A concentração de proteína do homogeneizado foi calculada com base em curva padrão de proteína conhecida (o correto é utilizar uma proteína padrão mais próxima da amostra em questão). Foram diluídos 10μL da amostra na proporção 1:10 em PBS. Uma bateria de tubos foi preparada em duplicata para cada amostra mais o tubo branco. Foi colocado em cada tubo 1mL da solução de Bradford e 20μL de amostra; no tubo branco foi colocado 1mL da solução de Bradford mais 20μL de PBS. A leitura foi feita em espectrofotômetro ULTROSPEC 2000 (Pharmacia) a 595 nm.

- Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média e submetidos a análise de variância de uma via (ANOVA) seguido de pós-teste de Tukey, com nível de significância para $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 GERAÇÃO F0

Na figura 1 está representado o peso do tumor (g) dos animais portadores de tumor de Walker 256, da geração F0. Nos animais suplementados com óleo de peixe o peso do tumor foi de 8g, o qual foi significativamente menor, quando comparado ao dos grupos sem suplementação (15g) e suplementados com gordura de coco (20g). Nos animais portadores de tumor suplementados com gordura de coco (SW) o peso da massa tumoral foi estatisticamente mais elevado quando comparado aos animais portadores de tumor (W).

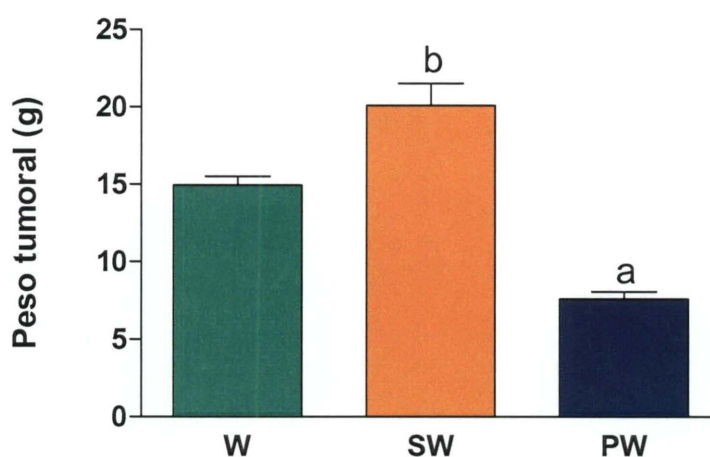


Figura 1: Peso fresco do tumor (g) dos animais de geração F0 portadores de tumor de Walker 256 sem suplementação (W), com tumor suplementados com gordura de coco (SW) ou com óleo de peixe (PW). Os dados representam a média \pm EPM de 30 animais por grupo. **a** $p < 0,001$ quando comparado aos grupos W e SW e **b** $p < 0,001$ quando comparado aos grupos W e PW.

A taxa de peroxidação lipídica (Figura 2) no tecido tumoral (mmol/mg de proteína) dos ratos F0 do grupo sem suplementação (W) foi de 32 mmol/mg de proteína e no suplementado com gordura de coco (SW) foi de 29 mmol/mg de proteína, não sendo diferente ($p>0,05$) quando comparados entre si. No grupo suplementado com óleo de peixe (PW) a taxa foi de 58 mmol/mg de proteína, a qual foi significativamente maior quando comparado a W e SW.

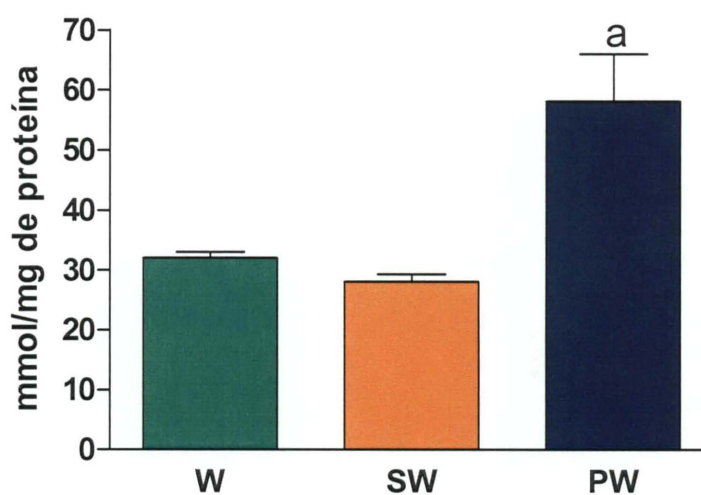


Figura 2: Taxa de peroxidação lipídica (mmol/mg de proteína) do tecido tumoral de ratos F0 do grupo sem suplementação (W), com tumor suplementados com gordura de coco (SW) ou óleo de peixe (PW). Os dados representam a média \pm EPM de 24 animais por grupo. **a** $p<0,01$ quando comparado com o grupo W e $p<0,001$ quando comparado com o grupo SW.

A taxa de peroxidação lipídica (LPO) no fígado de ratos F0 portadores de tumor de Walker 256 não suplementados (W), suplementados com gordura de coco (SW) ou óleo de peixe (PW) não foi diferente ($p>0,05$) entre os grupos (Figura 3).

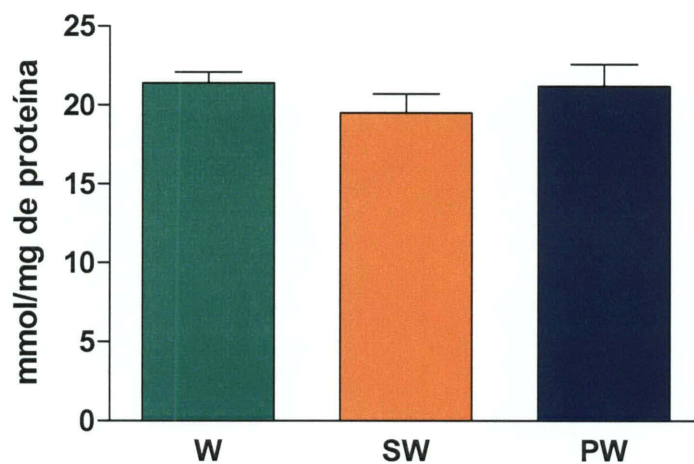


Figura 3: Taxa de peroxidação lipídica (mmol/mg de proteína) no fígado de ratos F0 portadores de tumor (W), com tumor suplementados com gordura de coco (SW) ou óleo de peixe (PW). Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média de 10 animais por grupo.

A suplementação com os diferentes ácidos graxos dos animais F0 com tumor não promoveu alteração na taxa de LPO no baço quando comparado com o grupo com tumor sem suplementação.

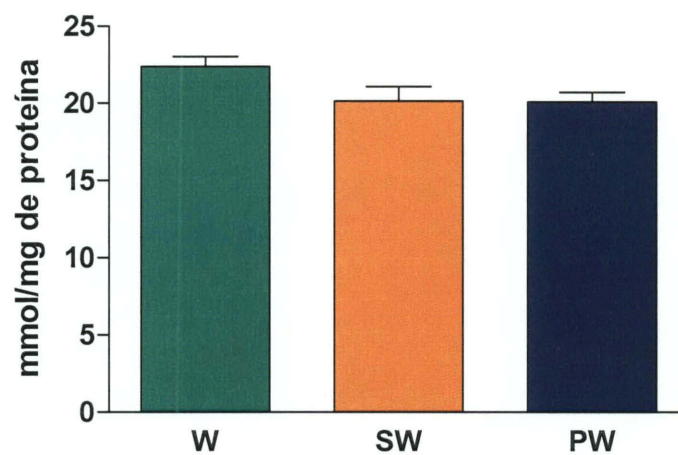


Figura 4: Taxa de peroxidação lipídica (mmol/mg de proteína) no baço dos animais F0 portadores de tumor não suplementados (W), com tumor suplementados com gordura de coco (SW) ou óleo de peixe (PW). Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média de 10 animais por grupo.

A taxa de peroxidação lipídica (mmol/mg de proteína) no pulmão de ratos F0 portadores de tumor de Walker 256 não foi diferente ($p>005$) entre os grupos sem ou com suplementação.

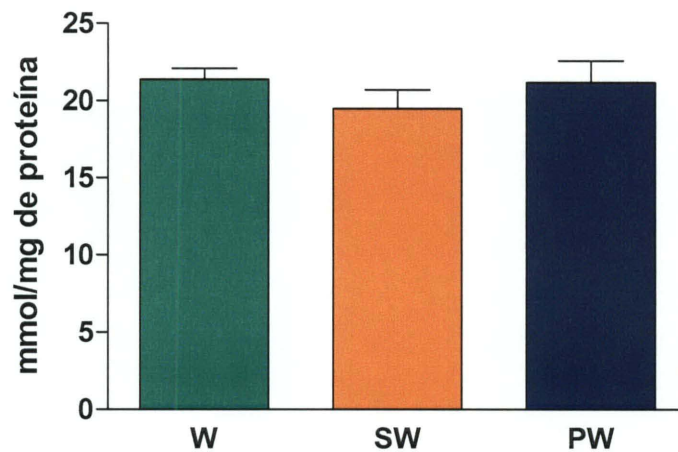


Figura 5: Taxa de peroxidação lipídica (mmol/mg de proteína) no pulmão dos animais F0 portadores de tumor não suplementados (W), com tumor suplementados com gordura de coco (SW) ou óleo de peixe (PW). Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média de 10 animais por grupo.

5.2 GERAÇÃO F1

Na figura 6 está representado o peso do tumor (g) dos animais portadores de tumor de Walker 256, da geração F1. Os animais suplementados com óleo de peixe apresentaram peso do tumor significativamente menor (7g), quando comparado ao dos grupos sem suplementação e suplementados com gordura de coco, que em média foi de 30g. Não houve diferença estatística entre a massa tumoral dos animais portadores de tumor (W) e dos portadores de tumor suplementados com gordura de coco (SW).

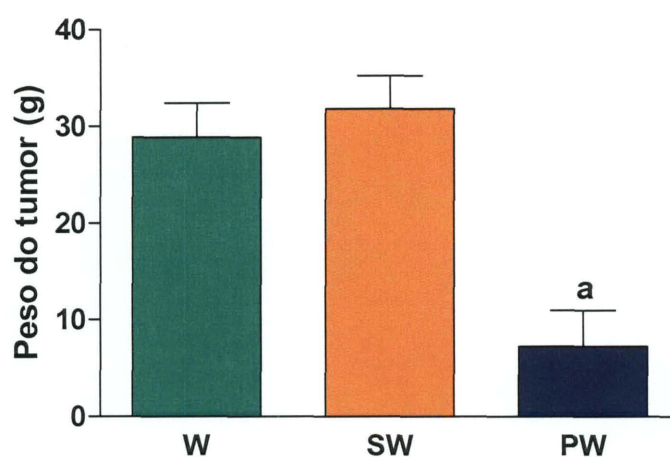


Figura 6: Peso fresco do tumor (g) dos animais F1 portadores de tumor de Walker 256 sem suplementação (W), com tumor suplementados com gordura de coco (SW) ou óleo de peixe (PW). Os dados representam a média \pm EPM de 10 animais por grupo. **a** $p < 0,05$ quando comparado aos grupos W e SW.

A taxa de peroxidação lipídica no tumor de Walker 256 de animais da geração F1 suplementados com óleo de peixe foi duas vezes maior ($p < 0,01$) quando comparada a dos grupos W e SW (Figura 7). Entre W e SW a taxa de peroxidação lipídica foi similar ($p > 0,05$).

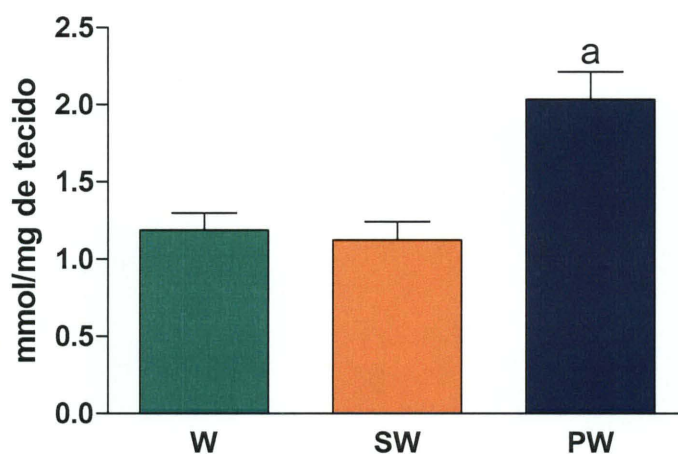


Figura 7: Taxa de peroxidação lipídica (mmol/mg de tecido) do tecido tumoral de animais F1 do grupo em suplementação (W), com tumor suplementados com gordura de coco (SW) ou óleo de peixe (PW). Os dados representam a média \pm EPM de 10 animais por grupo. **a** $p < 0,01$ quando comparado com os grupos W e SW.

A taxa de peroxidação lipídica no fígado de ratos F1, portadores de tumor de Walker 256 sem suplementação (W), com tumor suplementados com gordura de coco (SW) ou óleo de peixe (PW) não foi estatisticamente diferente entre os grupos (Figura 8).

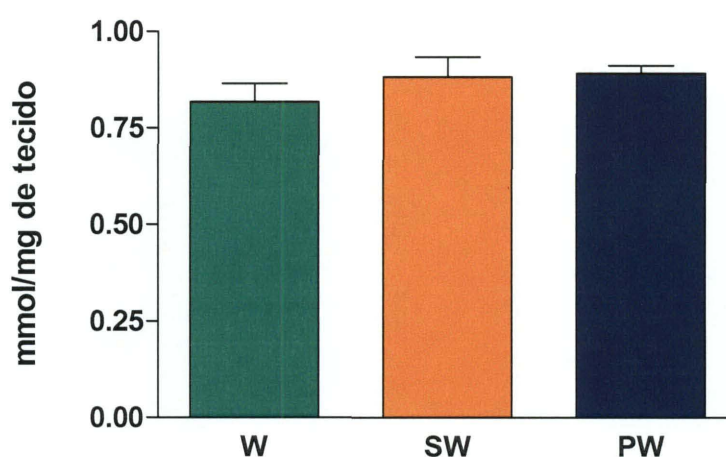


Figura 8: Taxa de peroxidação lipídica (mmol/mg de tecido) no fígado de animais F1 portadores de tumor sem suplementação (W), com tumor suplementados com gordura de coco (SW) ou óleo de peixe (PW). Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média de 6 animais por grupo.

A taxa de peroxidação lipídica no baço de ratos F1, portadores de tumor de Walker 256 sem suplementação (W), com tumor suplementados com gordura de coco (SW) ou óleo de peixe (PW) foi diferente estatisticamente (Figura 9) .

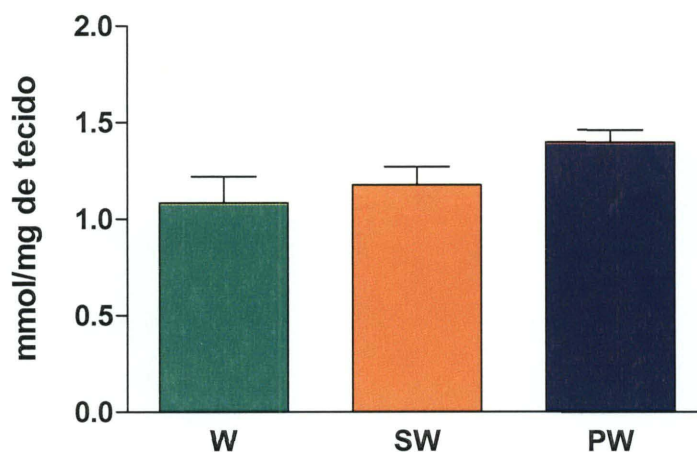


Figura 9: Peroxidação lipídica (mmol/mg de tecido) do baço de animais controle (W), com tumor suplementados com gordura de coco (SW) ou óleo de peixe (PW). Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média de 6 animais por grupo.

Na figura 10 está representada a taxa de peroxidação lipídica no pulmão dos animais com tumor. A suplementação com os diferentes ácidos graxos não promoveu alteração da taxa de peroxidação lipídica entre os animais portadores de tumor.

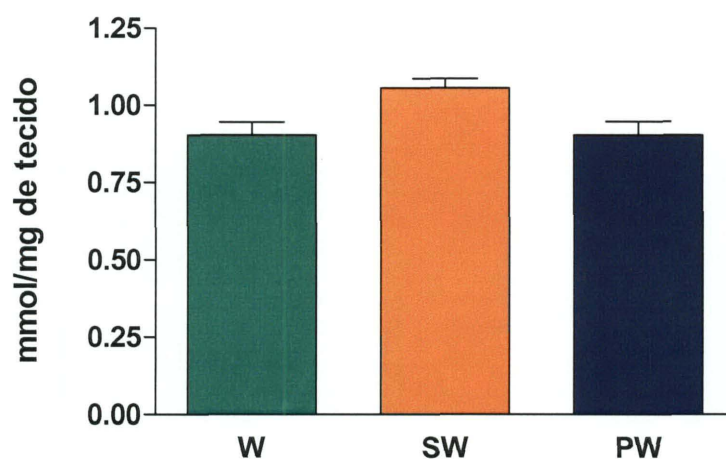


Figura 10: Taxa de peroxidação lipídica (mmol/mg de tecido) no pulmão de animais com tumor sem suplementação (W), suplementados com gordura de coco (SW) ou óleo de peixe (PW). Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média de 6 animais por grupo.

6 DISCUSSÃO

O efeito dos ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) presentes na dieta e os produtos da peroxidação lipídica têm sido amplamente estudados devido a sua importância em diversas doenças, inclusive o câncer (KOLANJIAPPAN, 2002). Estudos epidemiológicos revelaram incidência significativamente menor de câncer de colon em populações de esquimós da Groelândia, os quais consomem grandes quantidades de AGPI n-3 quando comparados a populações ocidentais (ROYNETTE *et al*, 2004). Foi relatado que tumores de colon em roedores apresentam-se estatisticamente menores nos animais suplementados com óleo de peixe, quando comparado com àqueles suplementados com gordura saturada (ROYNETTE *et al*, 2004).

A suplementação com óleo de peixe, nos animais PW foi capaz de diminuir a taxa de crescimento tumoral (figura 1 e 6), quando comparada com a dos grupos não suplementado (W) ou suplementado com gordura saturada (SW). Com relação a geração F0, houve redução de 53% e 61% no crescimento tumoral do grupo portador de tumor suplementado com óleo de peixe (PW) quando comparado aos grupos W e SW, respectivamente. Na geração F1, houve redução de 77% no crescimento tumoral quando comparado aos W e SW. Os animais do grupo PW da geração F0 e F1 apresentaram, aproximadamente, o mesmo peso de massa tumoral. Contudo, os animais dos grupos W e SW da geração F1 tiveram índices maiores de peso tumoral, quando comparados a geração F0. Conseqüentemente constata-se que os animais suplementados com ácido graxo n-3, por toda uma geração ou por duas gerações, apresentam diminuição do crescimento tumoral.

A inibição do crescimento tumoral tem sido relacionada a dieta alimentar rica em n-3, no entanto os mecanismos pelos quais esta redução ocorre não é sabido. A redução do crescimento tumoral pode ser modulada pela enzima ciclooxigenase-2 (COX-2), a qual é expressa em altos níveis em tecidos tumorais, quando comparado com a dos tecidos

adjacentes saudáveis (ROYNETTE *et al*, 2004). A enzima COX-2 produz PGE₂, a qual tem efeito promotor de crescimento tumoral. Um dos efeitos antitumorais do óleo de peixe parece ser resultado da diminuição da proliferação de células tumorais através da redução dos níveis teciduais de PGE₂ e seus metabólitos (GOGOS *et al.*, 1998). Dados ainda não publicados de nosso laboratório indicam que a expressão da enzima COX-2 está diminuída em animais suplementados com óleo de peixe.

Outro possível mecanismo para a redução do crescimento tumoral é através do processo de LPO, o qual foi investigado neste estudo. A LPO age sobre membranas celulares, especialmente entre as duplas ligações existentes nos ácidos graxos, formando hidroperóxidos lipídicos como produto final. Ácidos graxos poliinsaturados n-3 mostram-se mais susceptíveis à peroxidação lipídica do que qualquer outro AGPI, podendo este mecanismo levar ao processo de apoptose e diminuição do crescimento tumoral. TOGNI *et al* (2003) mostraram que o índice de insaturação no tumor de Walker 256, de ratos suplementados com óleo de peixe, foi significativamente maior quando comparado a dos ratos sem suplementação ou suplementados com gordura saturada. De fato, a taxa de LPO no tumor dos animais do grupo PW foi significativamente maior quando comparado aos demais grupos (Figura 2 e 7).

A relação de baixo crescimento tumoral e alta taxa de LPO encontrada nos grupos PW pode ser observada tanto em animais de geração FO, quanto naqueles de geração F1.

AGPI e seus metabólitos possuem uma variedade de papéis fisiológicos, tais como fonte de energia, estruturação da membrana celular, sinalização celular e regulação da expressão gênica (DIGGLE, 2002). Ao lado destas funções essenciais, ácidos graxos n-3 têm sido identificados como tendo efeito protetor contra o desenvolvimento tumoral (DIGGLE, 2002).

A oxidação de lipídeos e de membranas celulares geram componentes citotóxicos que implicam na etiologia do câncer. Dessa forma, o estresse oxidativo tem sido

relacionado com a carcinogênese em humanos e modelos animais. As espécies reativas do oxigênio podem iniciar LPO e dano ao DNA levando à mutagênese, carcinogênese e morte celular, caso o potencial antioxidante seja insuficiente (KOLANJIAPPAN, 2002).

A LPO tem importante papel no controle da divisão celular. Baixa concentração de radicais livres tem sido relatada como fator estimulante da proliferação celular, enquanto altos níveis induzem a citotoxicidade e morte celular (MANJU, 2002). A suplementação com EPA pode induzir à ação excessiva de radicais livres e conseqüente morte de células tumorais (JIANG, 1998).

Acredita-se que a citotoxicidade dos AGPI n-3 deve-se principalmente aos produtos de sua oxidação, os peróxidos lipídicos, os quais têm propriedades citotóxicas quando os sistemas antioxidantes são deficientes (CURI, 2002). Os sistemas antioxidantes, como catalase, glutathione redutase e vitamina E devem funcionar otimamente, sob condições de estresse para controlar a LPO (REDDY, 1994). Geralmente, em células tumorais a concentração de antioxidantes encontra-se diminuída tornando propícia a LPO.

A suplementação com óleo de peixe leva a incorporação de AGPI n-3 na massa tumoral (TOGNI et al, 2003) e outros tecidos linfóides (OTA, 2002). Apesar da taxa de LPO ter sido significativamente elevada no tecido tumoral, como discutido anteriormente, no órgão linfóide secundário baço (Figuras 4 e 9), fígado (Figuras 3 e 8) e pulmão (Figuras 5 e 10), da geração F0 e F1, não foi encontrada alteração significativa de LPO nos animais suplementados com óleo de peixe. Isto provavelmente deve-se ao papel das enzimas antioxidantes nestes tecidos e a pobreza destas na massa tumoral.

7 CONCLUSÃO

A suplementação com óleo de peixe a partir do desmame até a fase adulta (FO) e ao longo de uma geração (F1) diminuiu a massa tumoral dos animais portadores do tumor de Walker 256. Um provável mecanismo para esta redução foi a taxa de peroxidação lipídica elevada no tumor dos grupos suplementados com óleo de peixe. Nossos resultados também mostraram que no fígado, baço e pulmão dos animais portadores de tumor suplementados não houve aumento da taxa de peroxidação lipídica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 3ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.

ANDO, K.; NAGATA, K.; YOSHIDA, R.; KIKUGAWA, K.; SUZUKI, M. Effect of n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on lipid peroxidation of rat organs. **Lipids**, v. 35, n. 4, p. 401-407, 2000.

BRITISH NUTRITION FOUNDATION. Briefing paper on n-3 fatty acids and health. **British Nutrition Foundation**, 44p. 1999.

CALDER, P.C. n-3 polyunsaturated fatty acids as pharmacologic agents: a fishy tale? **Nutrition**, EUA, v. 11, n. 11/12, p. 1002-1004, 1997.

CHEESEMAN, K.H. Mechanisms and effects of lipid peroxidation. **Molec. Aspects Med.**, v.14, p. 191-197, 1993.

COLQUHOUN, A.; SCHUMACHER, R.I. γ - Linolenic acid and eicosapentaenoic acid induce modifications in mitochondrial metabolism, reactive oxygen especies generation, lipid peroxidation and apoptosis in Walker 256 rat carcinosarcoma cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1533, p. 207-219, 2001.

COLQUHOUN, A. Gama-linolenic acid alters the composition of mitochondrial membrane subfraction, decreases outer mitochondrial membrane binding of hexokinase and alters carnitine palmitoyltransferase I properties in the Walker 256 rat tumour. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1583, p. 74-84, 2002.

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

DAS, U.N. Essential fatty acids, lipid peroxidation and apoptosis. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 61, n. 3, p. 157-163, 1999.

DIGGLE, C.P. In vitro studies on the relationship between polyunsaturated fatty acids and cancer: tumour or tissue specific effects? **Progress in Lipid Research**, v.41, p. 240-253, 2002.

FERNANDES, L.C; CARPINELLI, A.R.; HELL, N.S.; CURI, R. Improvement of cancer cachexia and decrease of Walker 256 tumor growth by insulin administration in rats. **Cancer Therapy and Control**. p.259-268, 1991.

FERNANDES, L.C.; MARQUES DA COSTA, M.M.; CURI, R. Metabolism of glucose, glutamine and pyruvate in lymphocytes from Walker 256 tumor-bearing rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 27, p. 2539-2543, 1994.

GIL, A. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory diseases. **Biomed Pharmacother**, v.56, p. 388-396, 2002.

GOGOS, C.; GINOPOULOS, P.; SALSA, B.; APOSTOLIDOU, E.; ZOUMBOS, N.; KALFARENTZOS, F. Dietary Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids plus Vitamin E Restore Immunodeficiency and Prolong Survival for Severely III Patients with Generalized Malignancy. **Cancer**, 82 (2): 395-402, 1998.

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

JIANG, Z.; WOOLLARD, A.C.S.; WOLFF, S.P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe^{2+} in the presence of xylenol orange, comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids**, v. 26, n. 10, p. 853-856, 1991.

JIANG, Z.; WOOLLARD, A.C.S.; WOLFF, S.P. Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation. **Elsevier Science**, v. 268, n. 1, p. 69-71, jul/1990.

KOK, T.M.C.M.; ZWINGMAN, I.; MOONEN, E.J.; SCHILDERMAN, P.A.E.L.; RHIJNSBURGER, E.; HAENEN, G.R.M.M.; KLEINJANS, J.C.S. Analysis of oxidative DNA damage after human dietary supplementation with linoleic acid. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, p. 351-358, 2003.

KOLANJIAPPAN, K.; MANOHARAN, S.; KAYALVIZHI, M. Measurement of erythrocyte lipids, lipid peroxidation, antioxidants and osmotic fragility in cervical cancer patients. **Clinica Chimica Acta**, v. 326, p. 143-149, 2002.

KOLANJIAPPAN, K.; RAMACHANDRAN, C.R.; MANOHARAN, S. Biochemical changes in tumor tissues of oral cancer patients. **Clinical Biochemistry**, v. 36, p. 61-65, 2003.

KUMARAGURUPARAN, R.; SUBARPRIYA, R.; VISWANATHAN, P.; NAGINI, S. Tissue lipid peroxidation and antioxidant status in patients with adenocarcinoma of the breast. **Clinica Chimica Acta**, v. 325, p. 165-170, 2002.

MANJU, V.; SAILAJA, J.K.; NALINI, N. Circulating lipid peroxidation and antioxidant status in cervical cancer patients: a case-control study. **Clinical Biochemistry**, v. 35, p. 621-625, 2002.

MASOTTI, L.; CASALI, E.; GALEOTTI, T. Lipid peroxidation in tumour cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 4, p. 377-386, 1988.

MILES, E.A.; ALLEN, E.; CALDER, P.C. In vitro effects of eicosanoids derived from different 20-carbon fatty acids on production of monocyte-derived cytokines in human whole blood cultures. **Cytokine**, v. 20, n. 5, p. 215-223, 2002.

PACIFICI, E.H.K.; McLEOD, L.L.; PETERSON, H.; SEVANIAN, A. Linoleic acid hydroperoxide-induced peroxidation of endothelial cell phospholipids and cytotoxicity. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 17, n. 4, p. 285-295, 1994.

OTA, C.C.C. **Taxa de proliferação celular e produção de citocinas pelos linfócitos obtidos de ratos portadores de tumor de Walker 256, suplementados cronicamente com óleo de peixe.** Curitiba, 2002. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular, área de concentração Fisiologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

REDDY, A.C.P.; LOKESH, B.R. Alterations in lipid peroxides in rat liver by dietary n-3 fatty acids: modulation of antioxidant enzymes by curcumin, eugenol and vitamin E. **Journal Nutrition Biochemistry**, v. 5, p. 181-188, 1994.

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

ROYNETTE, C.E.; CALDER, P.C.; DUPERTUIS, Y.M.; PICHARD, C. n-3 Polyunsaturated fatty acids and colon cancer prevention. **Clinical Nutrition**, p. 1-13, 2003.

SIMOPOULOS, A. P. Essential fatty acids in health and chronic disease. **American Journal of Clinic Nutrition**, EUA, v. 70, p. 560S-569S, 1999.

SPITELLER, G. Are lipid peroxidation processes induced by changes in the cell wall structure and how are these processes connected with diseases? **Medical Hypotheses**, v. 60, p. 69-83, 2003.

TAPIERO, H.; NGUYEN, G.B.; COUVREUR, P.; TEW, K.D. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies. **Biomed Pharmacother**, v. 56, p. 215-222, 2002.

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

TOGNI, V.; OTA, C.C.C.; FOLADOR, A.; TCHAIKOVSKI, O.; AIKAWA, J.; YAMASAKI, R.K.; FREITAS, F.A.; LONGO, R.; MARTINS, E.F.; CALDER, P.C.; CURI, R.; FERNANDES, L.C. 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, p. 52-58, 2003.

YIN, H.; PORTER, N. A. Specificity of the ferrous oxidation of xylenol orange assay: analysis of autoxidation products of cholesteryl arachidonate. **Analytical Biochemistry**, EUA, v. 313, p. 319-326, 2003.

YOSHIDA, Y.; ITO, N.; SHIMAKAWA, S.; NIKI, E. Susceptibility of plasma lipids to peroxidation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 305, p. 747-753, 2003.