

JÚLIA AIKAWA

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE SOBRE A CAQUEXIA,
O CRESCIMENTO TUMORAL E O SISTEMA IMUNITÁRIO EM RATOS F2

CURITIBA

2004

JÚLIA AIKAWA

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE SOBRE A CAQUEXIA,
O CRESCIMENTO TUMORAL E O SISTEMA IMUNITÁRIO EM RATOS F2

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular, na
área de Fisiologia, para obtenção do
título de Mestre, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do
Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cláudio
Fernandes.

CURITIBA

2004

À minha família, pela motivação constante
e carinho infinito,

minha eterna gratidão!

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido orientador Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes, pelo apoio, incentivo e muita paciência, que possibilitaram o desenvolvimento desta tese.

À profª. MS. Alessandra Folador e aos colegas Osvaldo Jr. Tchaikovski e Sandro Massao Hirabara, pela amizade, ajuda, ensinamentos e conselhos proporcionados no cotidiano do laboratório.

Ao Marcos de Andrade Kaehler, pelo amor, companheirismo e infinita ajuda.

Aos colegas e amigos de laboratório Ricardo Key Yamazaki, Claudia Nogata, Nathalia Pizato, Karla D. Moreto, Sandro J. R. Bonatto, Everson Araújo Nunes, Rogéria Campos Mund, Ricardo Antonio Tanhoffer, Maressa C. de A. Piconceli, Lílian Schade, Evelise M. Garcia, Gleisson A. P. Brito, Heloisa H. P. de Oliveira, Fancilene Denes, Dalva T. S. Z. Miranda, Vanessa Gomes Batista, Maurício Darlei Lissa, Heloisa Tavares, Fábio Alexandre Freitas que proporcionaram um excelente ambiente de trabalho e entusiasmos diários.

Aos meus velhos amigos Richard Leutz e Cintia Bernardo Gonçalves, pela amizade, carinho, incentivo e encorajamento nesta reta final.

A todos os meus amigos de faculdade, em especial à Claudia Giongo e Simone Camargo Umbria, que tiveram ao meu lado nessa longa caminhada, pela amizade e dedicação.

Aos funcionários do Biotério, pela boa vontade e pelo auxílio no cuidado com os ratos.

Ao departamento de Fisiologia, pelo espaço cedido ao meu trabalho.

E aos ratinhos, que literalmente deram o “sangue” em nome da Ciência.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 SISTEMA IMUNITÁRIO.....	1
1.2 ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS.....	3
1.3 ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS E SISTEMA IMUNITÁRIO	8
1.4 CÂNCER E CAQUEXIA.....	10
1.5 ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS E CÂNCER.....	13
1.5 TUMOR DE WALKER 256	16
2. JUSTIFICATIVA.....	17
3. OBJETIVOS	18
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1 ANIMAIS	19
4.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	19
4.3 PROCEDIMENTOS	20
4.3.1 Obtenção e Transplante de Células do Tumor de Walker 256.....	20
4.3.2 Obtenção das Células do Sistema Imunitário	22
4.3.2.1 Obtenção dos Linfócitos	22
4.3.2.2 Incubação das Células Linfóides.....	22
4.3.3 Quantificação Protéica.....	23
4.4 PARÂMETROS ANALISADOS	23
4.4.1 Determinação do Peso dos Tecidos.....	23
4.5 PROCEDIMENTOS BIOQUÍMICOS.....	24
4.5.1 Determinação da Glicemia.....	24
4.5.2 Determinação do Lactato Sérico	24
4.5.3 Determinação do conteúdo de glicogênio hepático	25
4.5.4 DETERMINAÇÃO DO PERFIL LIPÍDICO NO SORO.	26
4.5.4.1 Colesterol	26
4.5.4.2 Colesterol HDL	26
4.6 CULTIVO CELULAR	27
5. RESULTADOS.....	29

6. DISCUSSÃO	52
7. CONCLUSÃO	66
8. REFERÊNCIAS.....	67

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ESQUEMA 1 - METABOLISMO DOS ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS.....	6
ESQUEMA 2 – PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	21
FIGURA 1 - Peso total (g) das proles ao nascimento e no desmame geradas por mães sem suplementação (C), suplementados com gordura de coco (S) ou com óleo de peixe (P).....	30
FIGURA 2 - Variação do peso corpóreo (%) da prole dos animais controle sem suplementação (C), suplementados com gordura de coco (S) ou óleo de peixe (P), desde o desmame (21 dias) até a fase adulta (70 dias). O peso dos ratos no dia 21 foi considerado como 100%.....	31
FIGURA 3 - Peso fresco do tumor (g) dos animais portadores de tumor de Walker 256 dos grupos sem suplementação (W), suplementados com gordura de coco (SW) ou com óleo de peixe (PW).....	32
FIGURA 4 - Concentração da glicose sérica (mg/dL) dos animais sem suplementação (C), suplementados com gordura de coco (S), ou com óleo de peixe (P), dos animais portadores de tumor (W), portadores de tumor suplementados com gordura de coco (SW) ou com óleo de peixe (PW).....	33
FIGURA 5 - Concentração de lactato sérico (µmol/ml) dos animais do grupo controle (C), do grupo suplementado com gordura de coco (S) ou óleo de peixe (P), dos animais portadores de tumor (W), portadores de tumor suplementados com gordura de coco (SW) ou óleo de peixe (PW).....	35
FIGURA 6 - Produção de lactato (nmol/h/mg de proteína) pelos linfócitos do baço incubados com glicose 5,6 mM, BSA 1% em tampão KR durante 1 hora a 37 °C, dos animais do grupo controle (C), do grupo suplementado com gordura de coco (S) ou óleo de peixe (P), dos animais portadores de tumor (W), portadores de tumor suplementados com gordura de coco (SW) ou óleo de peixe (PW).....	36
FIGURA 7 - Produção de lactato (nmol/h/mg de proteína) pelos linfócitos do linfonodo mesentérico incubados com glicose 5,6 mM, BSA 1% em tampão KR durante 1 hora a 37 °C, dos animais do grupo controle (C), do grupo suplementado com gordura de coco (S), ou óleo de peixe (P), dos animais portadores de tumor (W), portadores de tumor suplementados com gordura de coco (SW) ou óleo de peixe (PW).....	37

FIGURA 8 - Conteúdo de glicogênio hepático (mg/100 mg de tecido) dos animais do grupo controle (C), suplementados com gordura de coco (S) ou óleo de peixe (P), portadores de tumor (W), portadores de tumor suplementados com gordura de coco (SW) ou óleo de peixe (PW).....**39**

FIGURA 9 - Concentração sérica de colesterol (mg/dL) dos animais do grupo controle (C), do grupo suplementado com gordura de coco (S) ou com óleo de peixe (P) e dos animais do grupo portadores de tumor (W), portadores de tumor suplementados com gordura de coco (SW) ou com óleo de peixe (PW).....**40**

FIGURA 10 - Concentração sérica de colesterol HDL (mg/dL) dos animais do grupo controle (C), do grupo suplementado com gordura de coco (S) ou com óleo de peixe (P) e dos animais do grupo portadores de tumor (W), portadores de tumor suplementados com gordura de coco (SW) ou com óleo de peixe (PW).....**42**

FIGURA 11 - Concentração sérica de triacilglicerol (mg/dL) dos animais do grupo controle (C), do grupo suplementado com gordura de coco (S), do grupo suplementado com óleo de peixe (P) e dos animais do grupo portadores de tumor (W), portadores de tumor suplementados com gordura de coco (SW) e portadores de tumor suplementados com óleo de peixe (PW).....**43**

FIGURA 12 - Peso do baço, expresso como porcentagem do peso corpóreo, dos animais no dia do sacrifício do grupo controle (C), do grupo suplementado com gordura de coco (S) ou óleo de peixe (P), dos animais portadores de tumor (W), portadores de tumor suplementados com gordura de coco (SW) ou com óleo de peixe (PW).....**45**

FIGURA 13 - Proliferação de linfócitos apresentada como índice de estimulação dos linfócitos do linfonodo mesentérico de ratos do grupo controle (C), grupo suplementado com gordura de coco (S) ou com óleo de peixe (P), portadores de tumor (W), portadores de tumor suplementados com gordura de coco (SW) ou com óleo de peixe (PW).....**49**

FIGURA 14 - Proliferação de linfócitos apresentada como índice de estimulação de linfócitos de baço de ratos do grupo controle (C), grupo suplementado com gordura de coco (S) ou com óleo de peixe (P), portadores de tumor (W), portadores de tumor suplementados com gordura de coco (SW) ou com óleo de peixe (PW).....**50**

FIGURA 15 - Proliferação de linfócitos apresentada como índice de estimulação de linfócitos do timo de ratos do grupo controle (C), grupo suplementado com gordura de coco (S) ou com óleo de peixe (P), portadores de tumor (W), portadores de tumor suplementados com gordura de coco (SW) ou com óleo de peixe (PW).....**51**

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	-	ácido araquidônico
AGE	-	ácido graxo essencial
AMPc	-	adenosina monofosfato cíclico
APC	-	células apresentadoras de antígeno
ATP	-	adenosina trifosfato
BSA	-	albumina sérica bovina
Con-A	-	concanavalina A
COX	-	enzima ciclooxigenase
DHA	-	ácido docosahexaenóico
EDTA	-	etileno diaminotetracético
EPA	-	ácido eicosapentaenóico
F0	-	progenitora
F1	-	primeira geração
F2	-	segunda geração
GLA	-	ácido gama-linolênico
HETE	-	ácidos hidroxi-eicosatetraenóicos
HPETE	-	ácidos hidroperoxi-eicosatetraenóicos
Igs	-	imunoglobulinas
IFN- γ	-	interferon- γ
IL	-	interleucina
KR	-	krebs-Ringer
LDh	-	dehidrogenase láctico
LMF	-	fator mobilizador de lipídios
LOX	-	enzima lipoxigenase
LPL	-	lipoproteína lipase
LPS	-	lipopolissacarídeo
LT	-	leucotrienos
LX	-	lipoxinas
NAD ⁺	-	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NK	-	célula “ <i>natural killer</i> ”
NSAID	-	drogas anti-inflamatórias não-esteroidais
PG	-	prostaglandinas
PUFA	-	ácidos graxos poliinsaturados
TCA	-	ácido tricloroacético
Tc	-	células T citotóxica
Th	-	células T “ <i>helper</i> ”
TNF- α	-	fator de necrose tumoral alfa
TX	-	tromboxanos

RESUMO

O câncer é responsável pela morte de aproximadamente 4 milhões de pessoas por ano em todo mundo. No Brasil, depois das doenças cardiovasculares, o câncer é a segunda causa mais comum de morte por doença. A caquexia está presente entre 20- 70% dos indivíduos com câncer e está associada a distúrbios metabólicos, cujos agentes causadores ainda não são conhecidos. O presente trabalho investigou se ratos suplementados com óleo de peixe, por duas gerações, e inoculados com tumor de Walker 256 têm redução da taxa de crescimento tumoral e da caquexia, similar ou diferente dos F1. Ratas Wistar foram suplementadas com óleo de peixe (ácido graxo poliinsaturado rico em n-3) ou gordura de coco (ácido graxo saturado), na dose de 1 g/Kg p.c., desde o desmame (21 dias) até a fase adulta. A prole feminina gerada (F1) foi submetida ao mesmo protocolo de suas mães e colocadas para reprodução com ratos não suplementados. A prole masculina gerada (F2) foi submetida ao mesmo protocolo de suas respectivas mães. Ao completarem 70 dias, metade destes ratos foram inoculados com suspensão de células do tumor de Walker 256 (2×10^7 céls/mL), e nos controle, salina (0,9%). Após 14 dias, os animais foram mortos e o tumor, fígado, timo, linfonodo mesentérico e baço removidos. Do fígado mensurou-se o conteúdo de glicogênio. Timo, baço e linfonodo mesentérico foram utilizados para cultivo celular e mensuração do metabolismo de glicose. O sangue foi coletado para análises bioquímicas. O peso dos animais foi monitorado desde o nascimento até a fase adulta. Não foi observado alteração significativa na evolução da massa corpórea entre os grupos estudados. O peso do tumor entre o grupo não suplementado (W) e suplementado com gordura de coco (SW) não foi diferente, entretanto no suplementado com óleo de peixe (PW) houve redução significativa. Hipoglicemia, laticidemia e reduzido conteúdo de glicogênio, estavam presentes nos animais W e nos SW. Suplementação com óleo de peixe (PW) reverteu estes parâmetros de caquexia. Não houve alteração significativa da concentração sérica de colesterol e de triacilglicerol entre os grupos de animais. Entretanto, a concentração de colesterol HDL foi menor apenas no W quando comparada à dos demais grupos. O peso do baço dos animais dos grupos com tumor foi significativamente maior que o dos animais dos grupos sem tumor, porém não foi diferente quando comparados entre si. Nos animais PW houve diminuição da produção de lactato, a partir de glicose, pelos linfócitos incubados obtidos do linfonodo mesentérico. No baço, esta também estava reduzida quando comparada à dos demais grupos com tumor. O perfil proliferativo dos linfócitos de linfonodo mesentérico e timo foi muito semelhante, diferindo apenas na magnitude da resposta. Embora o perfil proliferativo do baço tenha sido diferente daquele do timo e linfonodo mesentérico, a suplementação com óleo de peixe promoveu redução na taxa de proliferação dos linfócitos destes três tecidos analisados. Todos estes dados foram observados também na geração F1. Nossos resultados sugerem que a suplementação por mais de uma geração não tem efeito aditivo sobre os parâmetros investigados e que a alimentação com presença de ácidos graxos n-3 tem efeito quimioprotetor contra o câncer e estabelecimento da caquexia.

ABSTRACT

Cancer kills approximately 4 million people every year world wide. In Brazil, regardless heart diseases, cancer is the main cause of death. Most cancer patients (20-70%) die with cachexia as primary cause depending on tumor type and is associated with metabolic disturbances, unfortunately the mediators are not totally known. This study investigated if rats supplemented with fish oil for two generations and inoculated with Walker 256 tumor cells have tumor growth and cachexia similar or different from those of F1 generation. Female Wistar rats were fed with fish oil (FO-polyunsaturated fatty acids rich in n-3) or coconut fat (CO-saturated fatty acid) 1g/kg b.w. from weaning until 90 days of age. Then they mated with no supplemented rats and F1 and F2 generation received the same diet as their mothers. Control rats were fed with regular chow. At 70 days of age half of each group was injected in the right flank with a suspension of 2×10^7 Walker 256 tumor cells and in the control saline (0.9%). After 14 days the animals were killed and tumor, blood, liver spleen, thymus gut associated lymphocytes were withdrawal for investigation. Tumor-bearing rats supplemented with FO (PW) significantly decreased tumor growth as compared to CO supplemented (SW) or fed with regular chow (W). Cachexia was confirmed by hypoglycemia, hyperlactidemia and depletion of glycogen stores (W). Supplementation of the diet with CO did not alter these parameters. FO supplementation reversal all these parameters to control levels. Lactate production from glucose, by lymphocytes obtained from PW group was significantly lowered as compared to W and SW. Proliferation rate of lymphocytes cultivated were not different between the groups except by the magnitude of the response. Our results suggest that lifelong consumption of FO for two generations were not able to cause any additive effect on tumor growth and cachexia as compared to F1 generation and also FO has a chemoprotector effect against cancer and cachexia development.

1. INTRODUÇÃO

1.1 SISTEMA IMUNITÁRIO

Os órgãos, células e moléculas responsáveis pela defesa do organismo às infecções constituem o sistema imunitário (SCROFERNEKER; POHLMANN, 1998). Este tem a responsabilidade de proteger o hospedeiro contra agentes infecciosos patogênicos (ROITT; BROSTOFF; DAVID, 1999). As células e moléculas do sistema imunitário trabalham como um sistema de defesa integrado, objetivando eliminar o agente infeccioso e proporcionar imunidade protetora persistente (JANEWAY *et al.*, 2000). De modo geral, o sistema imunitário divide-se funcionalmente em duas categorias: sistema inato (ou natural) e sistema adaptativo, também denominado adquirido ou específico (CALDER, 2001a). A interação entre essas duas categorias resulta no que chamamos de imunidade (MEDZHITOV; JANEWAY, 1997; BORGHANS; NOEST; BOER, 1999).

A resposta imunológica conta com a participação de vários tipos de células e de seus produtos, na ativação e modulação desta resposta. As principais células que compõem o sistema imunitário são os leucócitos, também chamados de células sanguíneas brancas. Pertencentes a este grupo de células estão incluídos os granulócitos e agranulócitos, classificados conforme a presença de grânulos citoplasmáticos e, os polimorfonucleares e monomorfonucleares, classificados de acordo com a forma do núcleo. Os granulócitos polimorfonucleares, predominantemente responsáveis pela fagocitose, incluem os neutrófilos, eosinófilos e os basófilos, enquanto que os agranulócitos monomorfonucleares são representados pelos monócitos e linfócitos (SCROFERNEKER; POHLMANN, 1998).

Dentre os monomorfonucleares, embora com funções muito distintas, porém interdependentes, macrófagos e linfócitos são considerados as principais células de defesa do organismo. Enquanto os macrófagos formam a primeira linha de defesa do sistema inato, os linfócitos fazem parte do sistema adaptativo. Como os macrófagos nem sempre conseguem reconhecer e eliminar os agentes invasores, os linfócitos

proporcionam meios mais versáteis de defesa e maior nível de proteção face a novas infecções pelos mesmos agentes (JANEWAY *et al.*, 2000).

Linfócitos são células de tamanho entre 6-10 μm , geralmente arredondadas, com relação núcleo/citoplasma elevada quando observadas ao microscópio comum, após coloração hematológica apropriada. São encontrados principalmente no baço, medula óssea, linfonodos, timo e placa de Peyer (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 1995). Os linfócitos podem ser categorizados de acordo com seus marcadores de membrana, reações a estímulos, padrões de migração e vida média (ARDAWI; NEWSHOLME, 1985).

Os dois principais tipos de linfócitos são os linfócitos B, que participam da resposta humoral e os linfócitos T, responsáveis pela resposta celular (BERNE *et al.*, 2000). Na resposta humoral, os linfócitos B são ativados e diferenciam-se em plasmócitos, células produtoras de imunoglobulinas (Igs). Na resposta celular, os linfócitos T são ativados e produzem citocinas que modulam, por exemplo, a ativação dos macrófagos (UNANUE; BENACERRAF, 1986).

Também fazendo parte da classe de linfócitos estão as células “*natural killer*” (NK), as quais expressam CD16 como marcadores de superfície, entre outros (CALDER, 2001b). Estas células são funcionalmente distintas das células T e B (ou linfócitos T e B), pois são capazes de lisar diretamente células tumorais ou células infectadas por vírus, e têm função importante na rejeição de transplantes. Células NK são ativadas por interleucina (IL)-2, IL-12, interferon- γ (IFN- γ) e fator de necrose tumoral (TNF)- α (CALDER, 1998a).

As células T são divididas em duas classes bem distintas: células T “*helper*” ou auxiliaadoras (Th) e células T citotóxicas (Tc). Essas classes são definidas pela presença de proteínas na superfície celular, onde as células Th expressam a proteína transmembrana denominada CD4, enquanto as células Tc expressam o marcador denominado CD8. Células Th aumentam a resposta de outras células brancas do sangue e algumas dessas células Th auxiliam as células B a produzirem anticorpos. Células Tc são responsáveis pela destruição das células do hospedeiro que se tornaram

infectadas por vírus ou outros parasitas intracelulares (ROITT; BROSTOFF; DAVID, 1998).

Estas duas classes de células reconhecem o peptídeo antigênico através das células apresentadoras de antígeno (APC) (ALBERTS *et al.*, 1997; ROITT; BROSTOFF; DAVID, 1998; CALDER, 2001a). Além das funções descritas, os linfócitos Th e Tc também podem suprimir a resposta imunológica. Existe outra classe de linfócitos, ainda não bem definida, com considerável controvérsia sobre sua natureza e fisiologia, conhecidas como células T supressoras. De fato, não está claro se a supressão da resposta imunológica é mediada por um tipo distinto de célula T ou por células que, dependendo da situação, podem agir como auxiliares ou citotóxicas (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 1995).

As populações de linfócitos T “*helper*” são subdivididas funcionalmente de acordo com o padrão de citocinas que elas produzem. Linfócitos T “*helper*” tipo 1 (células Th1) produzem IL-2 e IFN- γ , que ativam macrófagos, células NK e Tc. A atividade das células Th1 pode ser induzida por interações com agentes patogênicos como bactérias, vírus e fungos. Linfócitos T “*helper*” tipo 2 (células Th2) produzem IL-4, que estimula a produção de IgE pelos linfócitos, IL-5, um fator de ativação de eosinófilos, e IL-10, que juntamente com IL-4 suprimem a imunidade mediada por células. Células Th2 são responsáveis pela defesa contra helmintos, pois ao produzirem IgE, ativam mastócitos e basófilos que colaboram na eliminação desses parasitas. Um desequilíbrio ou desregulação entre as respostas de Th1 e Th2 é uma característica de muitas doenças humanas, como reações alérgicas e doenças inflamatórias (MOSSMANN; SAD, 1996).

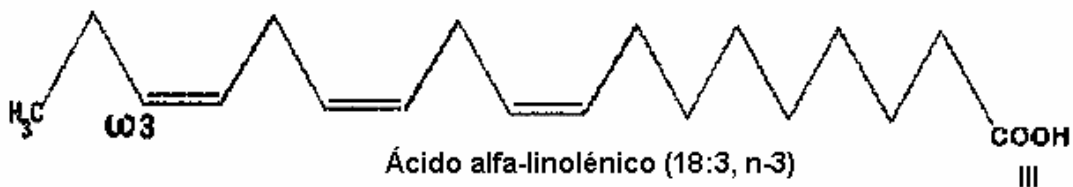
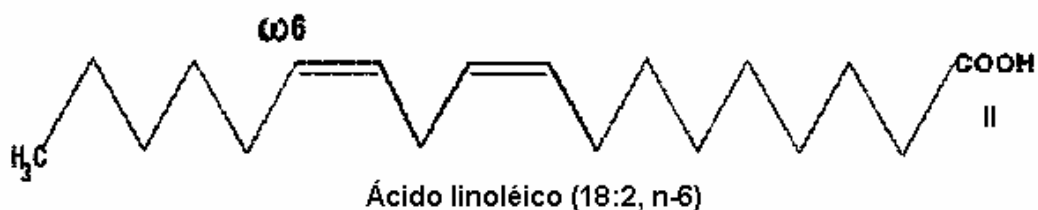
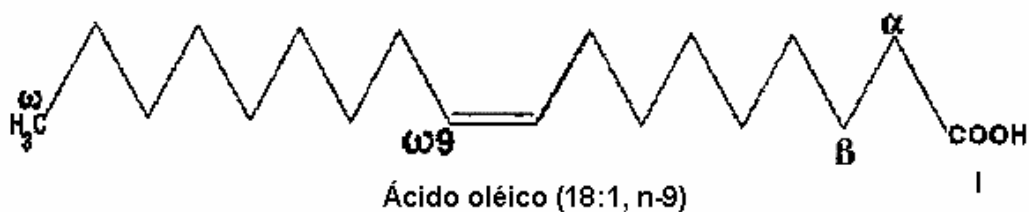
1.2 ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS

Os ácidos graxos estão presentes em nossa alimentação e são ingeridos principalmente como triacilgliceróis. Dieta de lipídeos é fundamental para realização de muitas funções importantes no organismo, como, por exemplo, manutenção da

integridade de membranas celulares. Além de serem fonte energética, são também precursores para numerosos compostos biologicamente ativos.

Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos com longas cadeias de hidrocarbonetos e classificados de acordo com a presença de duplas ligações: Saturados ou sem dupla ligação, Monoinsaturados, com apenas uma dupla ligação (I) e Poliinsaturados, com duas ou mais duplas ligações (II e III) (VOET; VOET; PRATT, 2000).

Existem três importantes famílias de ácidos graxos insaturados, cuja nomenclatura se refere à posição da primeira dupla ligação, a partir do terminal metila da cadeia de hidrocarboneto. São as famílias ômega 3 (n-3), ômega 6 (n-6) e ômega 9 (n-9) (ROSE; CONNOLLY, 1999). A letra grega “ ω ” também é usada, no lugar da letra “n”, para descrever a terminação metila (POMPÉIA, 2002).



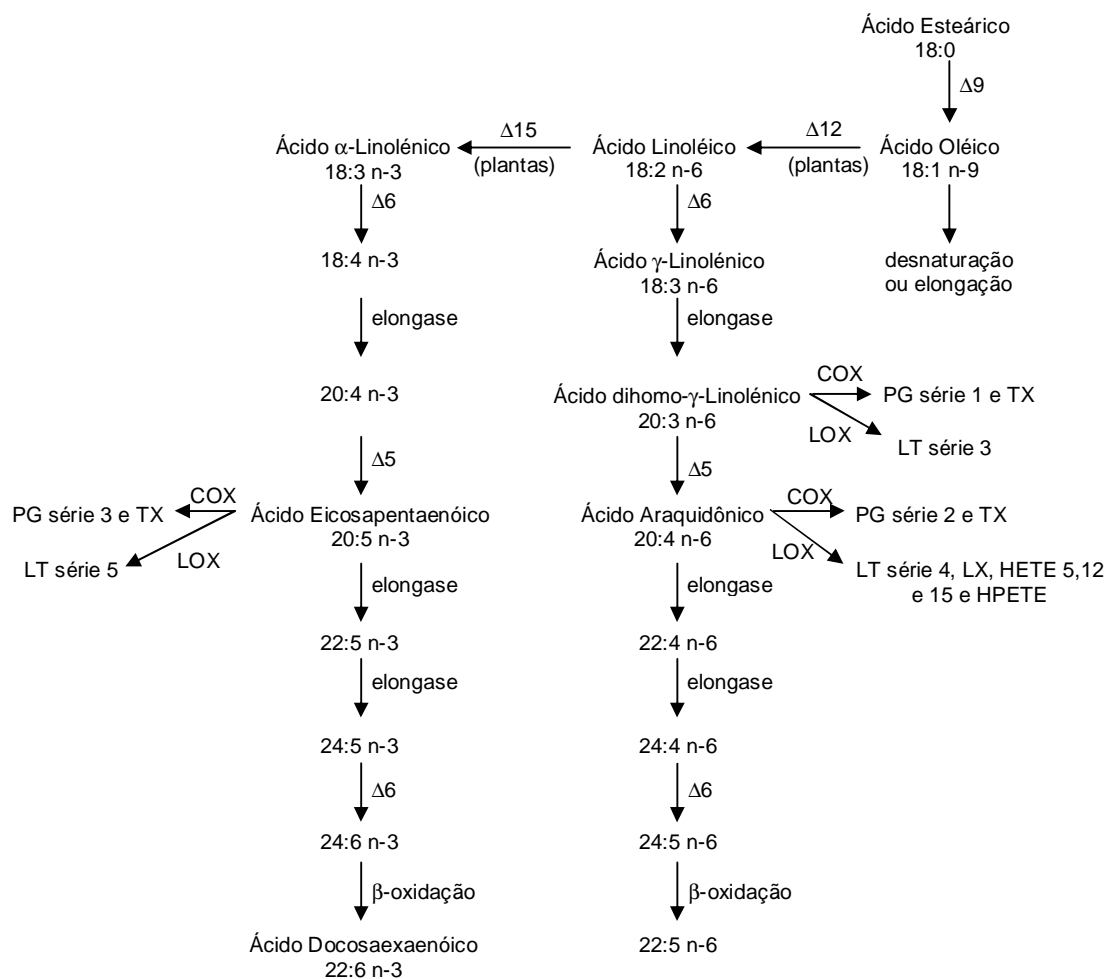
Ômega 6 e ômega 3 são as duas principais famílias de ácidos graxos poliinsaturados (“*Polyunsaturated fatty acids*” ou PUFA), as quais não são interconversíveis em mamíferos, pois a enzima que converte o ácido linoléico em α -linolénico está presente apenas em plantas (CALDER, 2001a, 1998b, 1997; SIMOPOULOS, 2002). A família ω -6 é derivada do ácido graxo linoléico e a família ω -3 é derivada do ácido graxo α -linolénico. Esses dois ácidos são denominados “essenciais” porque não podem ser sintetizados no organismo, devendo ser, portanto, providos pela dieta (THE BRITISH NUTRITION FOUNDATION, 1999).

Óleos vegetais como o de milho, girassol, açafrão e soja têm o ácido graxo linoléico como componente principal, enquanto que canola, linhaça, noz e plantas com folhas de coloração verde escuro, em geral, são fontes de α -linolénico (BARTSCH; NAIR; OWEN, 1999; THE BRITISH NUTRITION FOUNDATION, 1999).

Uma vez ingeridos, os ácidos graxos essenciais podem sofrer uma série de reações para síntese de ácidos graxos de cadeia longa (com mais de 18 átomos de carbono). Neste processo, estão envolvidas enzimas de desaturação e de alongação. A desaturação é caracterizada pela introdução de uma dupla ligação na cadeia de carbono e a alongação, pela introdução de dois novos átomos de carbono (CALDER, 1998c; 1997) (Esquema 1).

O ácido linoléico (18:2n-6) é o principal precursor do ácido araquidônico (AA 20:4n-6), enquanto o ácido α -linolénico é o precursor do ácido eicosapentaenóico (EPA 20:5n-3). AA e EPA são ácidos graxos poliinsaturados com 20 átomos de carbono que formam fosfolipídeos das membranas biológicas. O ácido α -linolénico também é precursor do ácido docosahexaenóico (DHA 22:6n-3) (ROSE; CONNOLLY, 1999; TAPIERO *et al.*, 2002).

Os ácidos linoléico e α -linolénico são substratos das mesmas desaturases, de forma que as famílias n-3 e n-6 competem entre si pelas mesmas enzimas na via metabólica, sendo que os n-3 apresentam maior afinidade pelas enzimas (KELLEY, 2001). Assim, uma dieta rica em n-3 é capaz de diminuir a conversão do ácido linoléico em ácido araquidônico, elevando a quantidade de EPA e DHA (HAUGE; CHRISTOFFERSEN, 1984) (Esquema 1).



ESQUEMA 1: METABOLISMO DOS ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS.

Enzimas desaturases $\Delta 5$, $\Delta 6$, $\Delta 9$, $\Delta 12$ e $\Delta 15$; COX: enzima ciclooxigenase; LOX: enzima lipoxigenase; PG: prostaglandinas; LT: leucotrienos; TX: tromboxanas; LX: lipoxinas; HETE: ácidos hidroxieicosatetraenóicos; HPETE: ácidos hidroxiperoxieicosatetraenóicos.

Adaptado de CALDER (1998c).

Vários trabalhos publicados nas duas últimas décadas demonstraram que várias doenças estão associadas à deficiência dos ácidos graxos essenciais (AGE), como a dermatite, a deficiência do crescimento, insuficiência reprodutiva, dificuldades de aprendizado e acuidade visual prejudicada (ANDERSON; CONNOR, 1994; DREVON, 1992; BJERVE, 1989). Em particular, o DHA tem se mostrado como o principal constituinte dos fosfolípidos de membrana do cérebro humano e retina (ANDERSON, 1970). O reconhecimento da essencialidade desses ácidos graxos resultou em grande número de publicações na última década, em especial quanto à necessidade em recém-natos. Isto porque a taxa de síntese de PUFA n-3, a partir do ácido α -linolénico em recém-nascidos, é inadequada para o ótimo desenvolvimento do sistema nervoso (VAN HOUWELINGEN *et al.*, 1992) e, por esta razão, tem-se sugerido enriquecer o leite com n-3. É importante salientar que os AGE e seus derivados de cadeia longa são elementos estruturais vitalmente importantes e, portanto, essenciais para a formação de novos tecidos. Durante o desenvolvimento fetal, PUFA n-3 são transferidos da mãe para o feto via placenta e, após o nascimento, os recém-nascidos adquirem esses AGE pelo leite materno (HARRIS *et al.*, 1984; ASHES *et al.*, 1992; RUAN *et al.*, 1995), sendo que a transferência de PUFA n-3 (EPA e DHA) da dieta para o leite materno, é dose-dependente (MAKRIDES; NEUMANN; GIBSON, 1996).

O ácido araquidônico (AA) e o ácido eicosapentaenóico (EPA), derivados das famílias n-6 e n-3, respectivamente, são precursores de eicosanóides, os quais atuam como moduladores químicos em diversos processos biológicos, como na resposta inflamatória, agregação plaquetária, permeabilidade vascular e na formação de interleucinas (MIYASAKA *et al.*, 1996; CALDER, 2001a). Os eicosanóides compreendem as prostaglandinas (PG), tromboxanas (TX), leucotrienos (LT), lipoxinas (LX), ácidos hidroperoxieicosatetraenóicos (HPETE) e ácidos hidroxieicosatetraenóicos (HETE). Cada família dá origem a uma série diferente de eicosanóides. Do metabolismo do AA, a ciclooxigenase (COX) leva à formação de prostaglandinas e tromboxanas da série 2. Do metabolismo do EPA, a mesma enzima é capaz de induzir a formação dos mesmos eicosanóides, porém da série 3

(ALEXANDER, 1998; CALDER, 2001a). Existem duas isoformas de COX: a COX-1 enzima constitutiva e COX-2 induzível. Outra enzima relacionada com a formação de eicosanóides é a 5-lipoxigenase (5-LOX). Quando atua sobre o AA, induz a formação de leucotrienos da série 4 (LTA4, B4, C4, D4 e E4), HPETE e HETE da série 5; já atuando sobre EPA, desencadeia a produção de leucotrienos da série 5 (ALEXANDER, 1998; CALDER, 2001a).

Os eicosanóides derivados da família n-6 apresentam maior efeito inflamatório do que os da família n-3, pois possuem maior capacidade de agregação plaquetária, maior atividade vasoconstritora e por serem potentes agentes quimiotáticos (ALEXANDER, 1998; CALDER, 2001a; MIYASAKA *et al.*, 1996; POMPÉIA; PROCÓPIO; CURI, 1999). A variedade de efeitos dos eicosanóides (n-3 ou n-6) tem levado ao interesse em se investigar os efeitos benéficos de alimentos ricos em ácidos graxos poliinsaturados no tratamento de condições inflamatórias como artrite reumatóide (ROUBENOFF *et al.*, 1992) e nos efeitos catabólicos das citocinas em vários tipos de câncer (TISDALE, 1996).

1.3 ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS E SISTEMA IMUNITÁRIO

Vários trabalhos têm mostrado que um grande número de fatores nutricionais modulam as funções imunológicas, em especial os PUFA, que são componentes comuns da dieta (CALDER, 1998a). A incorporação de PUFA da dieta pode influenciar, por exemplo, a funcionalidade dos linfócitos, por uma variedade de razões. Linfócitos cultivados *in vitro* na presença de PUFA apresentam alterações na composição de ácidos graxos e na fluidez de membrana (CALDER *et al.*, 1994). Em adição, a presença de PUFA afeta a funcionalidade de algumas proteínas de membrana (receptores, canais iônicos e enzimas), altera a capacidade de resposta celular frente a estímulos, modifica a concentração e potência biológica de mensageiros secundários e modula a atividade de eicosanóides (CALDER; DECKELBAUM, 2001).

Estudos epidemiológicos revelaram que determinadas populações, como a de esquimós da Groelândia, que consomem grande quantidade de óleo de peixe, rico em PUFA n-3 (EPA e DHA), apresentam baixa incidência de doenças inflamatórias e auto-imunes (KROMANN; GREEN, 1980).

Estudos clínicos relatam que, em alguns casos, dieta suplementada com óleo de peixe apresenta efeito benéfico para pacientes com patologias tais como artrite reumatóide (CLELAND *et al.*, 1988; KREMMER *et al.*, 1990), esclerose múltipla (BATES *et al.*, 1989; GALLAI *et al.*, 1993), psoríase (ZIBOH *et al.*, 1986; BITTNER *et al.*, 1988) e lupus (DAS, 1994, HARBIGE, 1998). Em geral, essas doenças auto-imunes são caracterizadas pela atividade exacerbada do sistema imunitário, com ativação inapropriada das células T, resultando na destruição de tecidos do hospedeiro. Tipicamente, os sítios de destruição (por exemplo, articulações na artrite reumatóide, tecido neural na esclerose múltipla) contêm linfócitos T ativados e mediadores químicos produzidos por essas células.

Vários trabalhos têm mostrado em experimentos *ex vivo*, que o óleo de peixe, fonte de ácidos graxos n-3, apresenta pronunciado efeito sobre o sistema imunitário sendo capaz de aumentar a proporção T-supressores: T "*helper*", diminuir a resposta proliferativa das células T a mitógenos, diminuir a atividade de linfócitos T citotóxicos e de células NK e diminuir a resposta da pele à hipersensibilidade-tardia (LEE *et al.*, 1985; ENDRES *et al.*, 1989; MEYDANI *et al.*, 1993; CALDER, 1996). Além de afetar as populações de linfócitos, os ácidos graxos n-3 são capazes de interferir na habilidade de outras células, tais como as apresentadoras de antígenos, que apresentam redução em sua função (SANDERSON; YAQOOP; CALDER, 1997), os neutrófilos com sua quimiotaxia reduzida (ENDRES *et al.*, 1989), os macrófagos que diminuíram sua adesão celular, atividade fagocitária e produção de citocinas (CALDER, 1996; POMPÉIA *et al.*, 2000). Em conjunto, estes experimentos indicam que o consumo de óleo de peixe, particularmente rico em PUFA n-3, pode levar como consequência a um estado de imunossupressão *in vivo*.

O efeito supressor dos ácidos graxos poliinsaturados em culturas de linfócitos como mencionado acima, não é dependente somente do tipo de ácido graxo, mas

também do tempo de exposição e concentração utilizados durante o procedimento experimental. Baixas concentrações de ácidos graxos (menor que 5 μM) estimulam a proliferação, enquanto que concentrações maiores (10-15 μM) inibem (KELLY; PARKER, 1979). A maioria dos estudos concorda que a extensão da inibição da proliferação de linfócitos depende do grau de insaturação e do comprimento da cadeia dos ácidos graxos. A ordem aproximada, de acordo com a potência de inibição, é láurico = mirístico < palmítico < esteárico = oléico < linoléico < linolénico = docosahexaenóico < araquidônico < eicosapentaenóico (CALDER, 1998a). Além destes ácidos graxos inibirem a proliferação de linfócitos, eles também são capazes de inibir a produção de IL-2 (CALDER; NEWSHOLME, 1992). PURASIRI *et al.*, 1997, confirmaram que o EPA e o DHA são inibidores da produção de IL-2 em culturas de linfócitos humanos. Ao contrário, baixas concentrações de ácido α -linolénico aumentam a produção de IL-2. Além disso, baixas concentrações de ácido docosahexaenóico inibem a produção de IFN γ enquanto que os ácidos γ -linolénico e eicosapentaenóico não apresentaram efeito.

Muitas vezes, os estudos experimentais mostram-se bastante contrastantes e apresentam uma variedade de efeitos dos PUFA sobre a funcionalidade do sistema imunitário. Isso leva a dificuldade em se comparar os resultados obtidos e este fato, geralmente, pode ser atribuído às diferentes populações estudadas (raça, sexo e idade), preparações diferentes de PUFA n-3, tempo de duração da suplementação, entre outros.

1.4 CÂNCER E CAQUEXIA

O câncer é responsável pela morte de aproximadamente 4 milhões de pessoas por ano em todo mundo. Atualmente, no Brasil, o câncer constitui a segunda causa mais comum de morte por doença, sendo a primeira as doenças cardiovasculares (BRASIL. Ministério da Saúde, 1997).

A maioria dos pacientes com câncer exibe perda progressiva de peso, astenia, perda de apetite e saciedade prematura (anorexia), anemia, intenso catabolismo dos depósitos de carboidratos, gorduras e proteínas, e tudo isto está associado a uma pobre qualidade de vida e sobrevida diminuída (DE WYS, 1985; BARBER, ROSS; FEARON, 1999). Todos estes sinais e sintomas caracterizam a síndrome da caquexia (FEARON; MOSES, 2002; ARGILÉS *et al.*, 2003a, 2003b). A caquexia, palavra derivada do grego *Kakos*, que significa “mal, ruim” e *hexis* que significa “condição do corpo” está presente em até 70% dos indivíduos que morrem com câncer (THEOLOGIDES, 1979; ARGILÉS, 1999). A caquexia não se manifesta somente no câncer, mas também em uma variedade de condições inflamatórias tais como sepsis, na AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) e na artrite reumatóide, entre outras (ROUBENOFF *et al.*, 1992; CANGIANO *et al.*, 1996).

A perda de peso nos pacientes com câncer é um dos sintomas mais comuns dentre os efeitos adversos da caquexia. Normalmente ocorre no início do curso da doença (DE WYS, 1985), sendo que ela própria é capaz de levar o paciente a óbito. O grau de severidade da perda de peso varia notavelmente com o tipo de tumor. Por exemplo, alguns pacientes com câncer de mama avançado têm ganho de peso, ao passo que quase todos os pacientes com câncer de pâncreas tornam-se severamente depletados, ou seja, desenvolvem a síndrome da caquexia (FERNANDES *et al.*, 1991). Nos pacientes com câncer de pâncreas, WIGMORE *et al.* (1997) relataram que 85% manifestaram a síndrome da caquexia. Esta está associada com curto tempo de sobrevida e baixa qualidade de vida e possivelmente é a causa *mortis* de talvez 20% dos pacientes com câncer.

O padrão de perda de peso observado na caquexia é especialmente diferenciado daquele, por exemplo, observado no jejum. Quase frequentemente, a perda de peso na caquexia está associada à anorexia e os pacientes portadores da doença podem perder aproximadamente 75% de proteína muscular e 80% de gordura com preservação relativa de proteína visceral (FEARON, 1992). Por outro lado, o jejum primariamente acarreta perda de peso a partir de gordura e apenas uma pequena quantidade a partir das massas muscular e visceral. Contudo, a diferença crucial entre os dois parâmetros

analisados é a deficiência da reversibilidade pela alimentação em pacientes caquéticos (NIXON *et al.*, 1981).

Invariavelmente, pacientes com câncer têm ingestão nutricional inadequada, o que contribui substancialmente para a perda de peso (WIGMORE *et al.*, 1997). Assim, alguns experimentos foram realizados na tentativa de aumentar a ingestão nutricional por meio enteral e parenteral em pacientes com câncer avançado (EVANS *et al.*, 1987; OVESEN *et al.*, 1993). Estes estudos obtiveram aumento significativo na ingestão nutricional pelos pacientes em tratamento. Contudo, não houve melhora do peso, das mensurações antropométricas, da sobrevida ou qualidade de vida.

Os mecanismos envolvidos na indução da caquexia no câncer não são totalmente conhecidos, mas a diminuição da ingestão protéico-calórica, impossibilitando a manutenção das reservas energéticas (anorexia), é um dos achados mais freqüentes nos portadores de câncer (GIACOSA, 1996). No entanto, o fracasso na resposta dos indivíduos caquéticos ao apoio nutricional demonstrou que o definhamento do portador não deve estar relacionado apenas ao seu comportamento alimentar deficiente, mas também às mudanças no metabolismo intermediário causadas pelo tumor (ARGILÉS *et al.*, 1997; SAKURAI; KLEIN, 1998).

Na tentativa de explicar as diversas alterações metabólicas observadas na síndrome da caquexia, vários mediadores foram sugeridos, incluindo as citocinas, os hormônios, os peptídeos e/ou neurotransmissores (OTTERY; WALSH; STRAWFORD, 1998).

As citocinas, caracterizadas como mediadores químicos, são substâncias que podem ser secretadas provavelmente por todas as células humanas (DUNLOP; CAMPBELL, 2000). Quando secretadas por células cancerígenas, são capazes de induzir o suporte tecidual (fibroblastos e vasos sanguíneos) para o crescimento tumoral, assim como, permitir metástases. Dentre as citocinas, TNF, IL-1, IL-6, fator neurotrófico ciliar e IFN- γ têm sido mostradas produzir alguns dos sintomas da caquexia, após suas administrações em animais e humanos (STARNES *et al.*, 1988; STRASSMANN *et al.*, 1992). Outras evidências relacionando estes mediadores com o câncer são a utilização de anticorpos contra TNF e IL-6. Os efeitos foram limitados em

reverter a caquexia em diferentes modelos experimentais (BARBER, 2001). Vários estudos têm mostrado que IL-1, IL-6 e TNF estão associados à elevação da resposta de proteína de fase aguda, a qual aumenta o gasto energético e diminui a sobrevivência de indivíduos com câncer (WIGMORE *et al.*, 1996).

Tomando o quadro caótico que a caquexia provoca nos pacientes portadores de câncer, uma variedade de estratégias na tentativa de melhorar a qualidade de vida e aumentar a sobrevida destes indivíduos tem sido realizada, destacando-se a quimioterapia, a radioterapia, a terapia com combinações de citocinas, dentre outras (DUNLOP; CAMPBELL, 2000). Contudo, tais tratamentos não têm sido eficientes e muitos pesquisadores acreditam que o quadro caquético pode ser amenizado ao controlar-se a anorexia. Para tanto, agentes químicos têm sido indicados, como os anti-serotoninérgicos, corticosteróides progestacionais e os ácidos graxos poliinsaturados, por serem capazes de aumentar os níveis de energia e peso corpóreo, apresentarem atividade anticitocinas, aumentarem a sobrevivência de pacientes com câncer, entre outros (CALDER, 2001a).

1.5 ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS E CÂNCER

Nas duas últimas décadas tem-se estudado extensivamente os efeitos dos diferentes tipos de ácidos graxos da dieta sobre o câncer, em especial os ácidos graxos poliinsaturados. Resultados experimentais demonstram que certos PUFA são seletivamente tóxicos para células tumorais, efeito que é particularmente devido à produção de superóxidos. Os PUFA também exercem ação reguladora na motilidade de células tumorais, na invasão e no comportamento metastisante (JIANG; BRYCE; HORROBIN, 1998).

A relação entre o consumo de gorduras na dieta e o câncer tem sido talvez melhor demonstrada nas populações de esquimós, que consomem dietas ricas em PUFA n-3 e apresentam baixa incidência de câncer além de outras doenças, como as inflamatórias (KROMANN; GREEN, 1980). Similarmente, outras populações que

também consomem elevada quantia de ácidos graxos poliinsaturados, como os japoneses, apresentam baixa incidência de câncer de mama nas mulheres.

Nos últimos anos, vários estudos clínicos têm relatado o uso de ácidos graxos no tratamento de pacientes com câncer (BARBER *et al.*, 1999; CAYGILL *et al.*, 1996; TISDALE, 1996). Alguns estudos têm mostrado que há evidências crescentes de que a dieta pode influenciar o risco de desenvolver melanoma. Acredita-se, atualmente, que o consumo alto de ácidos graxos n-6 estimula o crescimento de melanoma, assim como outros tipos de câncer, enquanto que ácidos graxos ômega-3 suprimem o crescimento de células com câncer (ALBINO *et al.*, 2000). Os autores deste trabalho mostram claramente que o ácido docosahexaenóico, um componente de óleo de peixe, é altamente efetivo em inibir o crescimento de células de melanoma em humanos.

Em pacientes com câncer pancreático, tem sido demonstrado que a suplementação com óleo de peixe tem o potencial de ser um meio seguro e efetivo em prevenir a perda de peso (BARBER *et al.*, 1999), até mesmo nos pacientes que já apresentam caquexia, problema comum neste tipo de câncer (WIGMORE *et al.*, 1996). Segundo estes autores, o quadro caquético pode ser interrompido por essa suplementação. Outro estudo clínico também tem relatado que pacientes com câncer pancreático têm melhora na perda de peso e na caquexia, sugerindo o efeito anti-caquético ao EPA, pois este pode regular as proteínas de fase aguda e citocinas inflamatórias tais como IL-6 e TNF (WIGMORE *et al.*, 1996).

O câncer de coloretal é uma das causas de mortes mais comuns nos países industrializados ocidentais. Entre as mulheres, o câncer de coloretal é o segundo, depois do de mama, que leva a óbito (WOUTERSEN *et al.*, 1999). Muitos fatores podem ser responsáveis pelo desenvolvimento de câncer de coloretal, entretanto, DOLL e PETO (1981) estimaram que 90% do risco de câncer de coloretal poderia ser atribuído a fatores ambientais, principalmente os da dieta. Além disso, estudos epidemiológicos e experimentais têm fornecido mais evidências de que, não apenas a quantidade de gordura consumida, mas também o tipo de gordura é importante (CAPONE; BAGGA; GLASPY, 1997; JIANG; BRYCE; HORROBIN, 1998; SIMOPOULOS, 1999).

Estudos *in vitro* têm sido realizados para investigar os efeitos dos PUFA n-3 e n-6 sobre linhagens de células do carcinoma coloretal. DOMMELS *et al.* (2002), relataram não haver efeito diferente entre PUFA n-3 e n-6 sobre estas linhagens de células. Em contraste, resultados a partir de modelos de animais indicam que PUFA n-6 têm um efeito promotor de tumor, predominantemente durante a fase pós-inicial da doença, enquanto que PUFA n-3, podem proteger contra carcinogênese coloretal, tanto na fase inicial como pós-inicial da doença. Contudo, isso não foi ainda confirmado em estudo com humanos.

A suplementação com GLA (ácido gama-linolénico 18:3n-6), EPA e DHA em pacientes com câncer de coloretal tem modificado o perfil das citocinas incluindo redução de IL-1, IL-6 e TNF (PURASIRI *et al.*, 1994).

O câncer de mama, neste aspecto, tem sido de grande interesse e, ao mesmo, tempo foco de discussão. Dieta contendo PUFA parece exercer diversos efeitos sobre estas células em animais e humanos portadores dessa doença. *In vitro*, o ácido linoléico (18:2n-6) estimula o crescimento e invasão de células com câncer de mama, enquanto que GLA e EPA inibem estes parâmetros. Contudo, quando estudos com animais foram realizados, os efeitos foram diversos, com alguns estimulando e outros inibindo o crescimento tumoral e a formação de metástase (JIANG; BRYCE; HORROBIN, 1998). Em relação aos estudos epidemiológicos, tem-se relatado controvérsias significantes, na qual alguns sugerem correlação positiva entre o consumo de ácidos graxos n-6 e o câncer de mama (PRENTICE; SHEPPARD, 1990; SASAKI; HORACSEK; KESTELOOT, 1993) enquanto outros negam tal relação (BAKKER; VAN'T VEER; ZOCK. *et al.*, 1997; PETREK *et al.*, 1994).

De um modo geral, os dados mencionados acima têm apresentado grande variabilidade nos resultados no que diz respeito à relação entre dieta rica em PUFA e seus efeitos sobre o câncer. Um dos fatores que poderia gerar tais controvérsias seria a diferença na composição dos ácidos graxos na dieta. Então, as condições estabelecidas são importantes para explicar as diferenças nos resultados obtidos.

1.5 TUMOR DE WALKER 256

O tumor de Walker 256 foi descoberto por George Walker em 1928 no John's Hopkins University School of Medicine, o qual desenvolveu-se espontaneamente na região da glândula mamária de uma rata grávida e foi caracterizado como adenoma. A massa tumoral foi descrita como sendo uma massa firme, lobulada e encapsulada, produtora de metástases em linfonodos regionais, pulmonares e retroperitoniais (McCOY; NEUMAN, 1956; MIDER *et al.*, 1948).

Dois tipos de carcinomas de Walker 256 têm sido investigados por apresentarem diferenças na interação com o hospedeiro. O do tipo A, invasivo e metastizante, tem um lento ritmo de crescimento induzindo a anorexia e a caquexia somente na fase terminal, garantindo uma sobrevivência média de 27 dias. O tumor do tipo B, não-invasivo e de crescimento rápido, induz a caquexia precocemente com sobrevida de 15 dias. Este último tipo mencionado tornou-se importante modelo para estudos de caquexia induzida pelo câncer (GUAITANI *et al.* 1983) e foi o modelo experimental usado neste trabalho.

2. JUSTIFICATIVA

Os estudos sobre o papel dos ácidos graxos no organismo têm sido realizados com dietas ricas ou deficientes em PUFA n-3, sendo que o período de suplementação das dietas varia de 4 a 12 semanas e, na sua grande maioria, os experimentos utilizaram animais na fase adulta. Em adição, poucos estudos investigando os efeitos da suplementação crônica de PUFA n-3 sobre as funções imunitárias e crescimento tumoral ao longo de gerações têm sido realizados.

Dados de nosso laboratório têm mostrado que, o aumento do consumo de óleo de peixe em apenas 0,1%, da quantidade total de gordura ingerida por ratos, suplementados desde a gestação até a idade adulta, promoveu redução da caquexia e do crescimento do tumor de Walker-256 nesses animais, não induzindo a imunossupressão. Portanto, pequena alteração da dieta foi capaz de levar à redução do crescimento tumoral, sem prejudicar a resposta imunitária. Aparentemente, o efeito do PUFA n-3 parece ser sobre a célula tumoral e não por ativação do sistema imunitário. Esta hipótese está sobre investigação do nosso grupo.

Demonstramos que o PUFA n-3, administrado ao longo de uma geração (F1), foi hábil em reduzir a taxa de crescimento tumoral e a caquexia (TOGNI *et al.*, 2003). Nós fizemos a seguinte indagação: será que se o óleo fosse administrado ao longo de uma geração subsequente (F2), o efeito do óleo sobre o tumor e a caquexia seria aditivo ou potencializador?

3. OBJETIVOS

O presente trabalho objetiva investigar se ratos suplementados com óleo de peixe, rico em PUFA n-3, ao longo de duas gerações e posteriormente inoculados com células do tumor de Walker 256 têm a taxa de crescimento tumoral e caquexia diferente daquela observada em geração F1. Para alcançar este objetivo determinaremos:

- A evolução da massa corpórea dos animais antes e após inoculação do tumor;
- Peso do tumor;
- Produção de lactato a partir de glicose pelos linfócitos;
- Parâmetros bioquímicos sanguíneos como lactato e glicemia, conteúdo de glicogênio hepático e determinação do perfil lipídico no soro (colesterol, colesterol HDL e triacilgliceróis);
- A taxa de proliferação celular de linfócitos B e T pela incorporação da [2-¹⁴C]-timidina em DNA;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Para a realização deste estudo foram utilizados ratos da linhagem Wistar, mantidos pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Os animais foram submetidos a ciclo claro/escuro (12/12 horas), com temperatura controlada a 22 ± 1 °C, com água e alimentação *ad libitum*. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Metabolismo Celular no Departamento de Fisiologia do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, após aprovação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA).

4.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Ratas fêmeas (F0) foram divididas em 3 grupos distintos, sendo dois grupos suplementados com ácido graxo via oral, diariamente, desde o desmame até atingirem a maturidade sexual (90 dias): 1) Um grupo recebeu dieta suplementada com 1g/kg p.c. de óleo de peixe (ácido graxo poliinsaturado n-3). O óleo de peixe utilizado foi de uma preparação de lipídeos marinhos (cápsula de 1g de RP Scherer); 2) Outro recebeu suplementação alimentar com óleo de coco, ácido graxo saturado (Gordura de coco, Brasil: Refino de óleos LTDA.), na dose de 1g/kg p.c. e, 3) O grupo controle, que não recebeu suplementação.

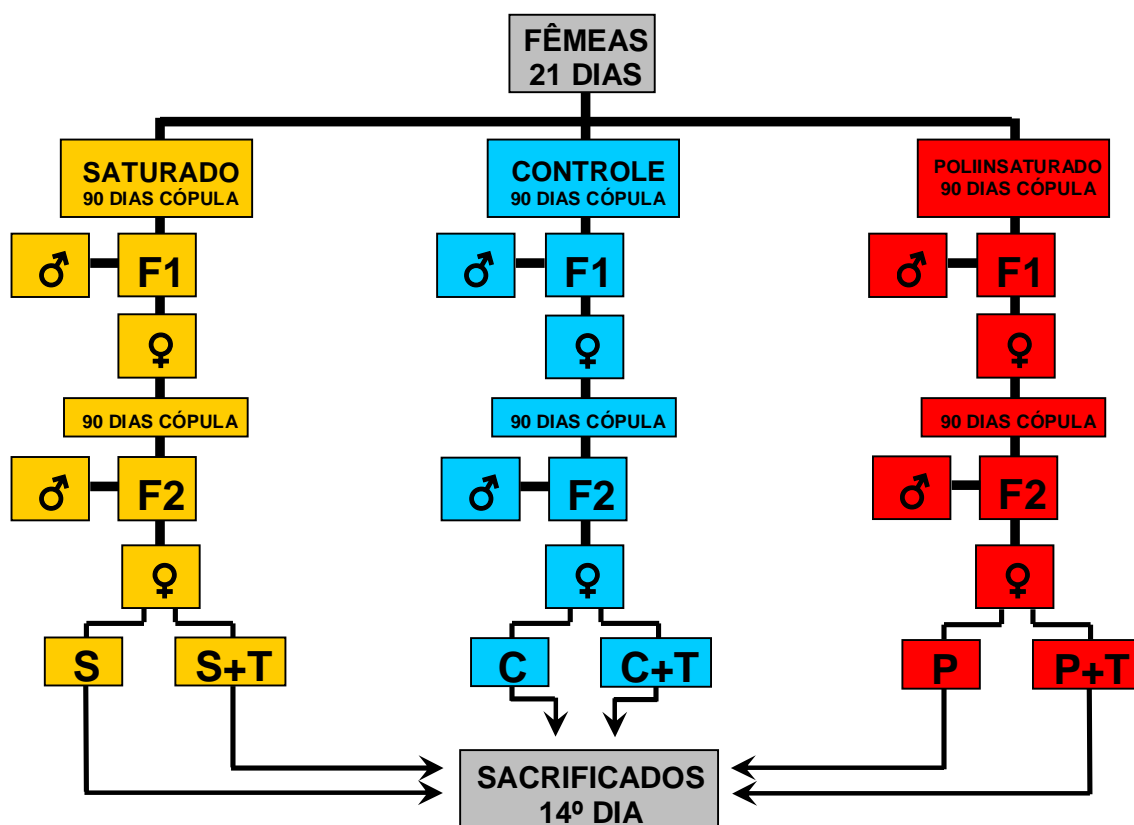
As fêmeas, então, foram colocadas para reprodução com machos, não submetidos a esta suplementação. A prole de fêmeas F1 resultante foi submetida ao mesmo tratamento da mãe logo após o desmame (21 dias) e, ao atingirem a maturidade sexual, foram também colocadas para acasalar com machos, não suplementados. Finalmente, após obtenção da prole de machos da segunda geração (F2), estes foram igualmente divididos em 3 grupos e suplementados como mencionado acima. E quando completaram 70 dias foram divididos em dois subgrupos, sendo a metade

inoculada com tumor de Walker 256 tipo B, segundo FERNANDES *et al.*, 1991 e a outra metade sem tumor (Esquema 2).

4.3 PROCEDIMENTOS

4.3.1 Obtenção e Transplante de Células do Tumor de Walker 256

A partir do sacrifício de um animal portador do tumor ascítico de Walker 256 tipo B, foram injetados 10 mL de solução salina 0,9% na cavidade abdominal tomando-se cuidado para não perfurar o intestino. Após massagear a região, o abdômen foi aberto (pequeno corte) e retirou-se o líquido com o auxílio de pipeta Pasteur. A seguir, foi feita a contagem das células em câmara de Neubauer usando azul de Tripán. Após a contagem, 1mL dessa suspensão, contendo 2×10^7 células, foi injetada subcutaneamente no flanco direito dos animais dos grupos experimentais (FERNANDES *et al.*, 1991). Os ratos controle receberam 1mL de salina 0,9%. A quantidade inoculada assegurou que a massa tumoral representasse pelo menos 7 a 10% do peso da carcaça do animal quando da finalização do período experimental. Após 14 dias, todos os animais foram sacrificados e vários parâmetros mensurados.



ESQUEMA 2: PROTOCOLO EXPERIMENTAL

4.3.2 Obtenção das Células do Sistema Imunitário

4.3.2.1 Obtenção dos Linfócitos

Dos animais sacrificados, baços, timos e linfonodos mesentéricos foram removidos e dissecados cirurgicamente. Os linfócitos de seus respectivos órgãos linfóides foram obtidos por compressão em cilindro de malha, composto por dois cilindros de aço inox de diferentes diâmetros, de modo que um se encaixe no outro, cujas extremidades contêm um sistema de malha. Através deste sistema foram obtidos linfócitos íntegros e isolados de gordura (VIEIRA *et al.*, 1990).

Uma parte dos linfócitos de cada órgão linfóide foi mergulhada em solução salina 0,9%, para filtragem em papel filtro especial (Whatman nº 105) e centrifugados (Eppendorf Centrifuge 5810 R) a 1200-1400 rpm, 4°C, durante seis minutos. Após a centrifugação, os linfócitos foram resuspendidos, filtrados e mergulhados em solução hemolítica por 15 minutos, em banho Maria a 37°C, para remoção das hemácias. Em seguida, foi centrifugada a amostra e lavada em salina 0,9%, e centrifugada mais 2 vezes como acima. Ao final, os linfócitos foram colocados para incubação, a fim de se mensurar a taxa de metabolismo de glicose pela produção de lactato por estas células, em tampão Krebs-Ringer.

Uma alíquota dos linfócitos de cada órgão linfóide foi retirada para quantificação protéica.

4.3.2.2 Incubação das Células Linfóides

As células foram incubadas em tampão Krebs-Ringer, pH 7,3, na presença de albumina sérica bovina (BSA) livre de gordura, a 1%, utilizando-se como substrato glicose 5,6 mM, por 60 minutos a 37° C em banho Maria sob agitação. Ao término da incubação, foi adicionado 0,2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 25% para interromper a reação. O material foi centrifugado a 14.100 rpm por 30 segundos e 0,5

mL do sobrenadante foi neutralizado com solução KOH 40% e TRIS / KOH (0,5M/2M) para a determinação do lactato.

4.3.3 Quantificação Protéica

As proteínas das células linfóides foram quantificadas pelo método de BRADFORD (1976) para mensuração da produção de lactato por estas células (nmol/h/mg de proteína). Este método se baseia na ligação do corante (Coomassie Brilliant Blue /G-250) com moléculas de proteínas da amostra, formando um complexo de cor azul. O corante reage, preferencialmente, em unidades de arginina e, numa extensão menor, com histidina, lisina, tirosina, triptofano e fenilalanina (COMPTON; JONES, 1985). Primeiramente, uma curva de calibração com BSA em concentrações entre 20 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ de uma solução mãe a 0,1%, preparada em água ultrapura (sistema MilliQ) foi obtida, onde 20 μL de concentrações crescentes foram adicionadas a 1 mL de solução de Bradford.

Após 5 minutos de repouso no escuro, leu-se em espectrofotômetro (PHARMACIA BIOTECH – ULTROSPEC 2000) em 595 nm, contra branco constituído de 20 μL de água ultrapura.

SOLUÇÃO BRADFORD (1000 mL)	
Coomassie Brilliant Blue /G-250	0,01%
Etanol	4,75%
Ácido fosfórico	8,5%

4.4 PARÂMETROS ANALISADOS

4.4.1 Determinação do Peso dos Tecidos

Durante o experimento, os animais foram pesados a cada dois dias no período da tarde, utilizando-se a balança Denver Instrument XL-410, previamente aferida.

Os ratos foram sacrificados por decapitação, utilizando-se uma guilhotina. O sangue foi coletado para análises bioquímicas e, em seguida, o tumor, o fígado e os tecidos linfóides como timo, baço e linfonodo mesetérico foram retirados e igualmente pesados.

4.5 PROCEDIMENTOS BIOQUÍMICOS

4.5.1 Determinação da Glicemia

A concentração de glicose circulante foi realizada pelo método enzimático colorimétrico, utilizando o sistema comercial Glicose E enzimática da Labtest, segundo TRINDER (1969). As amostras foram preparadas seguindo-se as instruções do fabricante.

A leitura de absorvância foi obtida em espectrofotômetro ULTROSPEC 2000 (Pharmacia) em 505 nm. A concentração de glicose foi expressa em mg/dL.

4.5.2 Determinação do Lactato Sérico

A concentração de lactato circulante foi determinada pelo método enzimático, segundo ENGLE e JONES (1978). Inicialmente, foi realizada a desproteinização do soro, pela adição de 50 μ L de ácido tricloroacético (TCA 25%) em 500 μ L de soro e a mistura agitada em vórtex e centrifugada por 1 minuto a 13.000 rpm. Em seguida, coletou-se 200 μ L do sobrenadante e adicionou-se 2 μ L de indicador universal para permitir a visualização da neutralização do soro, pela adição de KOH / TRIS (0,5 M / 2 M), sinalizando para a coloração verde, indicando pH 7,0. Em seguida, foi pipetado 100 μ L do soro neutralizado em tubos de ensaio contendo 1 mL do tampão do ensaio (descrito abaixo) e, após 45 minutos, foi efetuada a leitura de absorvância a 340 nm por espectrofotometria.

A partir da medida da absorbância para o lactato sérico, foi calculada a concentração em $\mu\text{mol/mL}$, pela fórmula:

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

sendo:

[Lactato] = concentração de lactato produzida

D. O. = densidade óptica

6,22 = constante

V = volume da amostra

V1 = volume da amostra + tampão de ensaio

V2 = volume do soro com proteínas + TCA

V3 = volume do soro com proteínas

V4 = volume do soro desproteínizado + volume de neutralização

V5 = volume do soro desproteínizado

Tampão de Ensaio (para 100 mL de H ₂ O destilada)	
EDTA	0,28 g
Glicina	2,8 g
Hidrato de Hidrazina	1,5 mL
LDh	0,4 mL
NAD ⁺	60 mg
pH	8,85

4.5.3 Determinação do conteúdo de glicogênio hepático

O conteúdo de glicogênio foi determinado segundo FERNANDES *et al.* (1991). O fígado do animal foi retirado, pesado (90 mg) e colocado em tubos de ensaio contendo 500 μL de KOH 1M e deixado em banho-maria a 70 °C por 30 minutos, para a digestão do tecido. Em seguida, o tecido foi homogeneizado em vórtex e 100 μL de cada amostra foram transferidas para tubos *ependorf* contendo 17,5 μL de ácido acético glacial e 500 μL do tampão acetato, pH 4,8, contendo amiloglucosidade 1%, e submetidas ao banho-maria (37 °C) por 3 horas. As amostras foram retiradas do banho e centrifugadas por 5 minutos a 15000 g, e 20 μL do sobrenadante de cada amostra foi

transferida para novos tubos de ensaio contendo 1 mL do reagente de cor do sistema GLICOSE PAP (LABTEST). Os tubos de ensaio foram deixados em banho-maria a 37 °C por 15 minutos. Após esse período, as amostras foram obtidas no espectrofotômetro em 505 nm e os resultados expressos como mg/100 mg de tecido.

TAMPÃO ACETATO (100 mL)	
Ácido acético (96%)	480 µL
Acetato de sódio	975 µL
pH	4,8

4.5.4 DETERMINAÇÃO DO PERFIL LIPÍDICO NO SORO.

4.5.4.1 Colesterol

A concentração de colesterol total circulante foi determinada pelo método enzimático, utilizando-se associação da reação de oxidação catalisada pela colesterol oxidase, após hidrólise dos ésteres de colesterol com a reação de TRINDER (1969), conforme sistema comercial Colesterol COD-ANA da Labtest.

As amostras foram preparadas segundo as instruções do fabricante e, após a medida da absorbância em 500 nm, foi expressa a concentração de colesterol total em mg/dL.

4.5.4.2 Colesterol HDL

Para determinação do colesterol HDL, foi utilizado o sistema para precipitação das lipoproteínas de baixa e de alta densidade (LDL e VLDL) e determinação do colesterol HDL no sobrenadante após centrifugação utilizando-se o sistema enzimático conforme sistema COLESTEROL HDL da Labtest, com leitura em absorbância a 500

nm. Após a medida da absorbância, foi expressa a concentração de colesterol HDL em mg/dL.

4.5.4.3 Triacilgliceróis

A concentração de triacilgliceróis circulantes foi determinada pelo método enzimático colorimétrico que utiliza quatro enzimas, conforme o sistema TRIGLICÉRIDES GPO-ANA da Labtest.

As amostras foram preparadas seguindo as instruções do fabricante e, após a leitura da absorbância, a concentração de triglicerídios foi expressa em mg/dL.

4.6 CULTIVO CELULAR

Uma vez isolados os linfócitos do baço, timo e linfonodo mesentérico, contendo inicialmente 2×10^5 células por poço, foram cultivados em meio de cultura RPMI-1640, enriquecido com 10% de soro fetal bovino e antibióticos (penicilina 10.000 U e estreptomicina 10 mg/L), em placas de 96 poços (volume final de 200 μ L), a 37° C em atmosfera de 95% O₂ e 5% CO₂ em ar. Os linfócitos foram estimulados com 20 μ L/poço de solução dos mitógenos concanavalina A (Con-A - 5 μ g/mL), estimulador da proliferação de linfócitos T e lipopolissacárideos (LPS - 10 μ g/mL), estimulador de proliferação de linfócitos B. Após 48 horas de cultivo, 20 μ L de (2-¹⁴C)-Timidina (0,02 μ Ci/poço) foram adicionadas em cada poço e as células incubadas por um período adicional de 18 horas, sob as mesmas condições descritas anteriormente.

Ao final das 66 horas, as células foram coletadas automaticamente em um coletor múltiplo (Skatron Combi Multiple Cell Harvester, UK) em papéis filtro cat. n° 11731 (Skatron Combi - UK). Os discos de papéis contendo a radioatividade incorporada no DNA foram transferidos para *vials* contendo 1 mL de líquido de

cintilação (BetaMaxTM) e foram levados para mensuração em contador Beckman LS 6000.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como médias \pm erro padrão da média (EPM) e submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA) seguido de pós-teste de Tukey, com nível de significância para $p < 0,05$, teste t de Student, quando indicado.

5. RESULTADOS

Na figura 1, estão apresentados os dados de peso (g) da prole gerada pelas fêmeas dos grupos controle (C), suplementado com gordura de coco (S) ou com óleo de peixe (P), no nascimento e no desmame (após 21 dias). As diferentes suplementações administradas às mães, não modificaram o ganho de peso total da prole, quando comparadas ao controle ou entre si.

Na figura 2, estão apresentados os dados, em porcentagem de variação de peso corpóreo da prole, desde o desmame (período de 21 dias) até a fase adulta (período de 70 dias), dos animais dos grupos controle (C), suplementado com gordura de coco (S) ou com óleo de peixe (P). As diferentes suplementações não alteraram significativamente o perfil de ganho de peso neste período quando comparadas entre si ou com o controle.

Os dados do peso do tumor (g) de Walker 256 dos animais sem suplementação (W), suplementados com gordura de coco (SW) ou com óleo de peixe (PW) estão apresentados na figura 3. Após 14 dias da inoculação, o peso do tumor no grupo portador de tumor suplementado com óleo de peixe (PW) foi 3 vezes menor quando comparado ao dos grupos W e SW ($p < 0,05$). A suplementação com gordura de coco não modificou o peso tumoral, quando comparado ao portador de tumor sem suplementação.

Na figura 4 estão apresentadas as concentrações de glicose sérica (mg/dL) dos animais do grupo controle sem suplementação (C), do grupo suplementado com gordura de coco (S) ou com óleo de peixe (P), dos animais portadores de tumor (W), portadores de tumor suplementados com gordura de coco (SW) ou com óleo de peixe (PW). Nos animais sem tumor, a suplementação com os diferentes ácidos graxos não promoveu alteração significativa da glicemia quando comparada à do grupo controle. Os animais portadores de tumor dos grupos W e SW apresentaram redução significativa da glicemia quando comparada à dos grupos C, S e P. No grupo PW houve recuperação da glicemia retornando aos valores normais ($p < 0,001$), sendo estatisticamente diferente quando comparado a W e SW ($p < 0,05$).

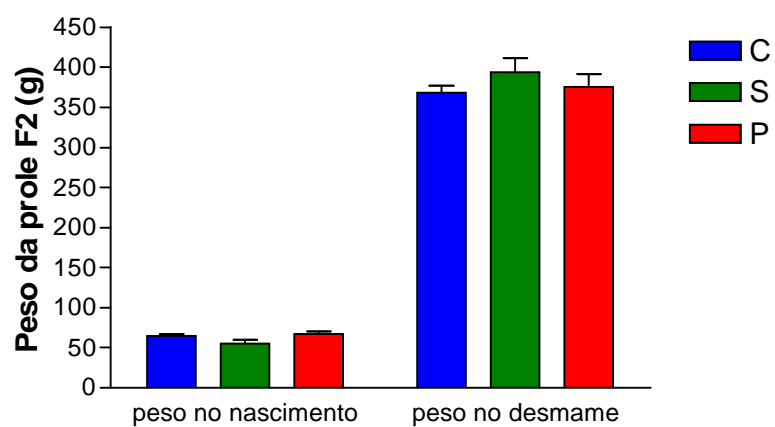


FIGURA 1: Peso total (g) das proles ao nascimento e no desmame geradas por mães sem suplementação (C), suplementados com gordura de coco (S) ou com óleo de peixe (P). Os dados estão apresentados como média \pm EPM do peso de 2 ninhadas geradas por 6 fêmeas de cada grupo.

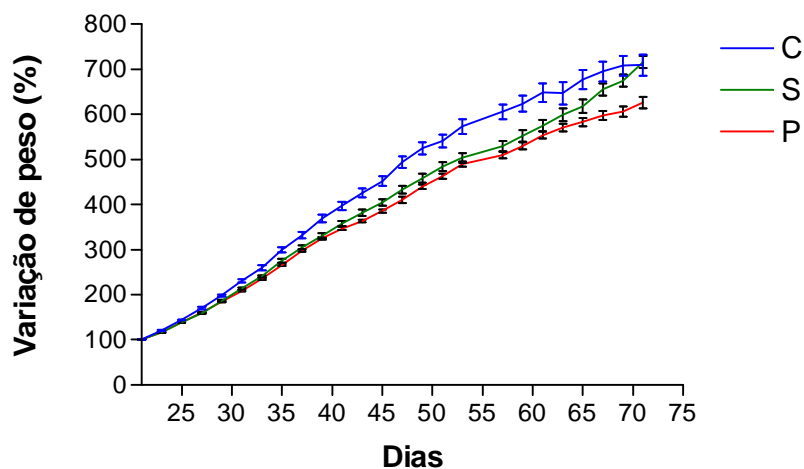


FIGURA 2: Variação do peso corpóreo (%) da prole dos animais controle sem suplementação (C), suplementados com gordura de coco (S) ou óleo de peixe (P), desde o desmame (21 dias) até a fase adulta (70 dias). O peso dos ratos no dia 21 foi considerado como 100%. Os dados estão apresentados como a média \pm EPM de 25 animais por grupo.

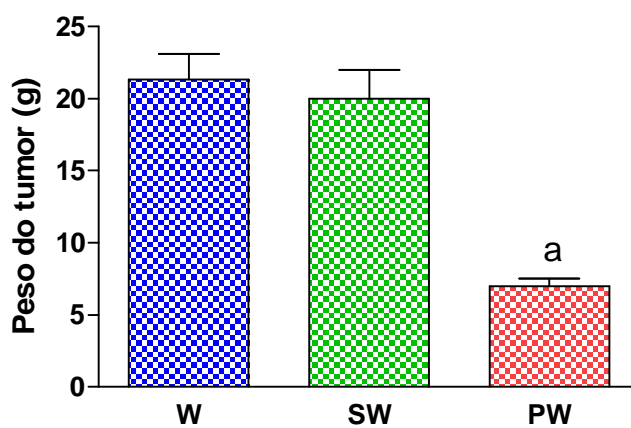


FIGURA 3: Peso fresco do tumor (g) dos animais portadores de tumor de Walker 256 dos grupos sem suplementação (W), suplementados com gordura de coco (SW) ou com óleo de peixe (PW). Os dados representam a média \pm EPM de 10 animais por grupo.

a Diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparada à dos grupos W e SW.

GRUPOS	MÉDIA	EPM
W	21.3	1.8
SW	20	2
PW	7	0.5

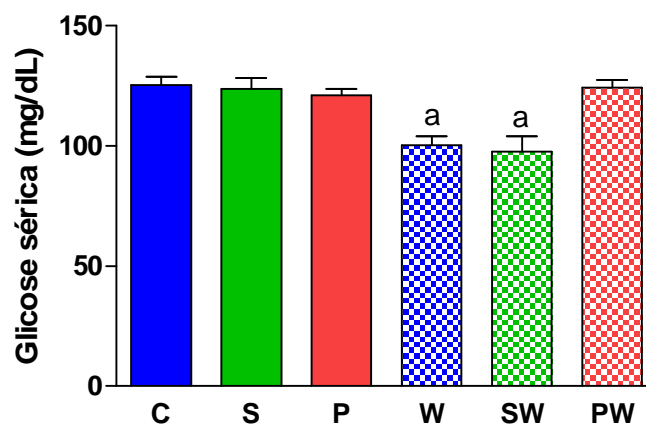


FIGURA 4: Concentração da glicose sérica (mg/dL) dos animais sem suplementação (C), suplementados com gordura de coco (S), ou com óleo de peixe (P), dos animais portadores de tumor (W), portadores de tumor suplementados com gordura de coco (SW) ou com óleo de peixe (PW). Os dados estão apresentados como a média \pm EPM de 14 animais do grupo C, 13 do grupo S e de 17 animais do grupo P e 12 de animais do grupo W, 8 do grupo SW e de 19 animais do grupo PW.

a Diferença significativa ($p < 0,001$) quando comparada aos grupos C, S, P e PW.

GRUPOS	MÉDIA	EPM
C	125.2	3.4
S	123.6	4.6
P	121.1	2.7
W	100.2	3.8
SW	97.70	6.2
PW	124.3	3.0

Na figura 5 estão apresentados os valores de lactato sérico ($\mu\text{mol/mL}$) dos grupos estudados. Os animais sem tumor suplementados com gordura de coco (S) ou com óleo de peixe (P) não apresentaram alteração significativa do lactato sérico quando comparada ao dos animais do grupo controle. Os animais portadores de tumor dos grupos W e SW apresentaram aumento de, aproximadamente 2 vezes na concentração de lactato sérico quando comparados aos dos grupos sem tumor ($p < 0,001$). Já no grupo PW, a laticidemia não foi diferente da observada no grupo controle ($p < 0,001$), entretanto foi 1,8 vezes menor ($p < 0,001$) que a laticidemia dos grupos W e SW.

Na figura 6 estão apresentados os dados da produção de lactato (nmol/h/mg de proteína), a partir de glicose, pelos linfócitos obtidos do baço dos animais dos grupos experimentais. Nos animais sem tumor, a suplementação com os ácidos graxos saturado (grupo S) e poliinsaturado (grupo P) não provocou mudança significativa na produção de lactato, por estas células, quando comparada à do grupo controle. A presença do tumor promoveu aumento de aproximadamente 2,5 vezes da produção de lactato nos grupos W e SW quando comparada à dos animais sem tumor (C, S e P). No grupo portador de tumor suplementado com óleo de peixe (PW), a produção de lactato não foi estatisticamente diferente da dos animais sem tumor, mas diferente quando comparada aos demais grupos portadores de tumor ($p < 0,05$).

Os dados sobre a produção de lactato (nmol/h/mg de proteína), a partir de glicose, pelos linfócitos obtidos do linfonodo mesentérico dos animais dos grupos estudados estão apresentados na figura 7. A suplementação com ácidos graxos saturado e PUFA não promoveu alteração significativa na produção de lactato quando comparado à do C ($p < 0,05$). Nos grupos portadores de tumor sem suplementação (W) e suplementados com gordura de coco a produção de lactato por estas células foi 3,5 vezes maior quando comparada à dos animais sem tumor. No grupo com tumor suplementado com óleo de peixe esta produção foi 1,6 vezes menor que à dos grupos W e SW ($p < 0,05$) e 1,7 vezes maior quando comparado aos animais sem tumor ($p < 0,05$).

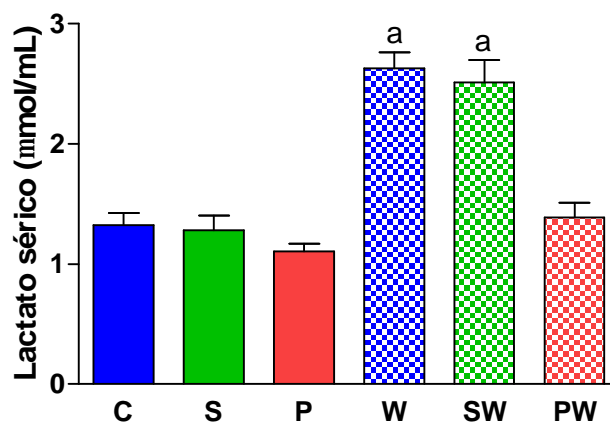


FIGURA 5: Concentração de lactato sérico ($\mu\text{mol/ml}$) dos animais do grupo controle (C), do grupo suplementado com gordura de coco (S) ou óleo de peixe (P), dos animais portadores de tumor (W), portadores de tumor suplementados com gordura de coco (SW) ou óleo de peixe (PW). Os dados estão apresentados como a média \pm EPM de 11 animais do grupo C, 10 do grupo S e de 13 animais do grupo P e 9 de animais do grupo W, 7 do grupo SW e de 14 animais do grupo PW.

a Diferença significativa ($p < 0,001$) quando comparada à dos grupos C, S, P e PW.

GRUPOS	MÉDIA	EPM
C	1.323	0.104
S	1.280	0.124
P	1.105	0.067
W	2.626	0.132
SW	2.508	0.192
PW	1.387	0.122

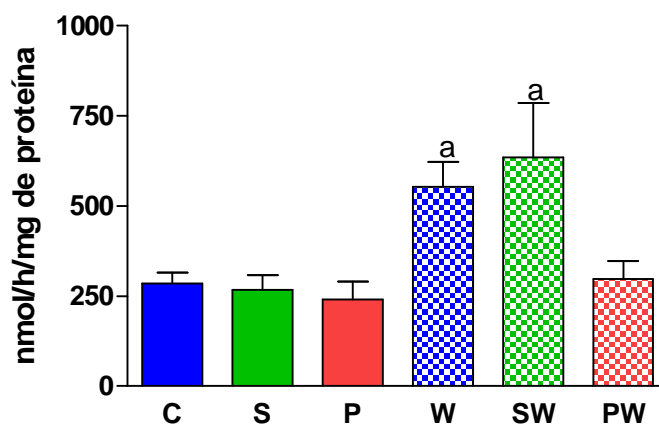


FIGURA 6: Produção de lactato (nmol/h/mg de proteína) pelos linfócitos do baço incubados com glicose 5,6 mM, BSA 1% em tampão KR durante 1 hora a 37 °C, dos animais do grupo controle (C), do grupo suplementado com gordura de coco (S) ou óleo de peixe (P), dos animais portadores de tumor (W), portadores de tumor suplementados com gordura de coco (SW) ou óleo de peixe (PW). Os dados representam a média \pm EPM de 5 incubações em quaduplicata.

a Diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparada à dos grupos C, S, P e PW.

GRUPOS	MÉDIA	EPM
C	285	30
S	268	40
P	240	50
W	553	70
SW	635	150
PW	297	50

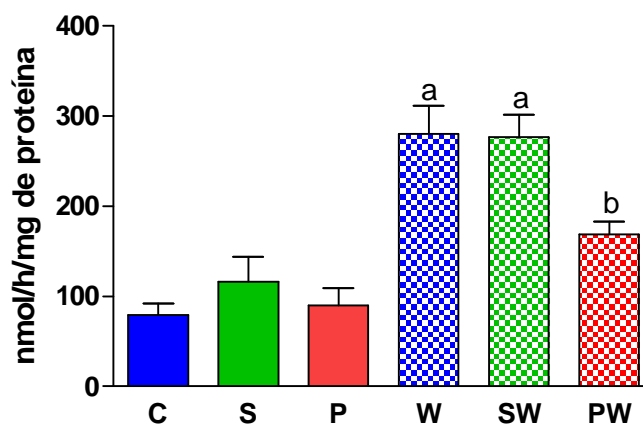


FIGURA 7: Produção de lactato (nmol/h/mg de proteína) pelos linfócitos do linfonodo mesentérico incubados com glicose 5,6 mM, BSA 1% em tampão KR durante 1 hora a 37 °C, dos animais do grupo controle (C), do grupo suplementado com gordura de coco (S), ou óleo de peixe (P), dos animais portadores de tumor (W), portadores de tumor suplementados com gordura de coco (SW) ou óleo de peixe (PW). Os dados representam a média \pm EPM de 5 incubações em quaduplicata.

a Diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado à dos grupos C, S, P e PW.

b Diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado aos animais sem tumor.

GRUPOS	MÉDIA	EPM
C	79.53	12.33
S	116.2	27.75
P	90.07	18.84
W	280.2	31.24
SW	276.5	25.08
PW	168.6	14.49

Os valores do conteúdo de glicogênio hepático (mg/100 mg de tecido) estão apresentados na figura 8. Nos grupos suplementados com gordura de coco (S) ou óleo de peixe (P), o conteúdo de glicogênio hepático foi de $3,97 \pm 0,51$ e de $3,81 \pm 0,31$, respectivamente, os quais não foram diferentes entre si ou quando comparados ao do grupo controle ($4,46 \pm 0,25$). A presença do tumor promoveu redução de 2,28 vezes, em média, no grupo W quando comparado ao dos grupos de animais sem tumor C, S, e P ($p < 0,05$). No grupo portador de tumor suplementado com gordura de coco (SW), o conteúdo de glicogênio hepático foi de $2,85 \pm 0,43$, significativamente diferente quando comparado ao dos grupos C e PW. Já no grupo PW, a suplementação com óleo de peixe recuperou o conteúdo de glicogênio hepático aos valores normais e promoveu aumento de 2,7 e 1,7 vezes, respectivamente, quando comparado ao do W e ao do SW e, portanto, não foi diferente estatisticamente quando comparado ao dos grupos sem tumor (C, S e P).

A concentração sérica de colesterol (mg/dL) dos grupos estudados está apresentada na figura 9. Nos grupos suplementados com gordura de coco (S) ou óleo de peixe (P), a concentração foi de $62,53 \pm 4,77$ e de $60,52 \pm 3,03$, respectivamente, as quais não foram diferentes quando comparadas entre si ou com a do grupo controle ($59,52 \pm 3,39$). Nos animais portadores de tumor suplementados com gordura de coco (SW), a concentração sérica de colesterol foi de $54,18 \pm 5,59$, enquanto que nos animais portadores de tumor suplementados com óleo de peixe (PW) foi de $53,87 \pm 3,02$. No grupo portador de tumor e sem suplementação (W), a concentração foi de $51,54 \pm 3,13$. Nenhum destes grupos apresentou diferença significativa entre si ou quando comparados aos grupos sem tumor.

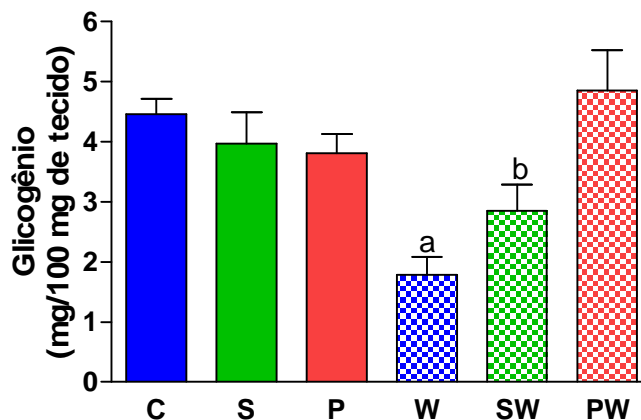


FIGURA 8: Conteúdo de glicogênio hepático (mg/100 mg de tecido) dos animais do grupo controle (C), suplementados com gordura de coco (S) ou óleo de peixe (P), portadores de tumor (W), portadores de tumor suplementados com gordura de coco (SW) ou óleo de peixe (PW). Os dados estão apresentados com média \pm EPM de 9 animais do grupo C, 4 do grupo S e de 3 animais do grupo P, 10 de animais do grupo W, 10 do grupo SW e de 10 animais do grupo PW.

a Diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparada ao C, S e P.

b Diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparada ao C e PW.

GRUPOS	MÉDIA	EPM
C	4.463	0.250
S	3.974	0.511
P	3.812	0.310
W	1.788	0.293
SW	2.849	0.434
PW	4.851	0.671

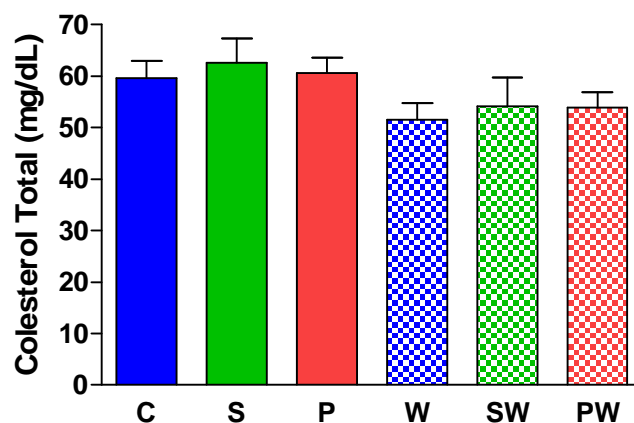


FIGURA 9: Concentração sérica de colesterol (mg/dL) dos animais do grupo controle (C), do grupo suplementado com gordura de coco (S) ou com óleo de peixe (P) e dos animais do grupo portadores de tumor (W), portadores de tumor suplementados com gordura de coco (SW) ou com óleo de peixe (PW). Os dados estão apresentados com média \pm EPM de 29 animais do grupo C, 22 do grupo S e de 29 animais do grupo P e 26 de animais do grupo W, 16 do grupo SW e de 27 animais do grupo PW.

GRUPOS	MÉDIA	EPM
C	59.52	3.39
S	62.53	4.767
P	60.52	3.029
W	51.54	3.133
SW	54.18	5.598
PW	53.87	3.016

Os valores da concentração sérica de colesterol-HDL (mg/dL) dos grupos experimentais estão apresentados na Figura 10. As diferentes suplementações não alteraram a concentração sérica de colesterol-HDL, nos indivíduos sem tumor, quando comparada à do grupo controle. A concentração de colesterol-HDL no grupo C foi de $28,86 \pm 2,99$, no grupo S de $27,74 \pm 4,15$ e no grupo P de $25,53 \pm 2,79$. Nos animais portadores de tumor (W), a concentração sérica de colesterol-HDL foi de $19,01 \pm 2,12$, significativamente menor quando comparada à do grupo C. Nos indivíduos portadores de tumor suplementados com gordura de coco (SW) ou óleo de peixe (PW), a concentração foi de $21,44 \pm 3,50$ e $17,79 \pm 3,20$, respectivamente, não apresentando diferença significativa entre si ou quando comparadas aos demais grupos.

Na Figura 11, estão apresentadas as concentrações séricas de triacilgliceróis (mg/dL). Nos grupos suplementados com gordura de coco ou óleo de peixe (S e P), a concentração foi, respectivamente, $100,2 \pm 10,99$ e $79,16 \pm 6,43$, não diferentes quando comparadas entre si ou com à do grupo controle ($80,63 \pm 6,91$). Nos animais portadores de tumor (W), a concentração sérica de triacilglicerol foi de $106,7 \pm 10,98$, nos animais portadores de tumor suplementados com gordura de coco (SW), a concentração foi de $82,65 \pm 8,77$, enquanto que nos animais portadores de tumor suplementados com óleo de peixe (PW) foi de $92,60 \pm 6,46$. Não foi determinado diferenças significante entre os grupos estudados.

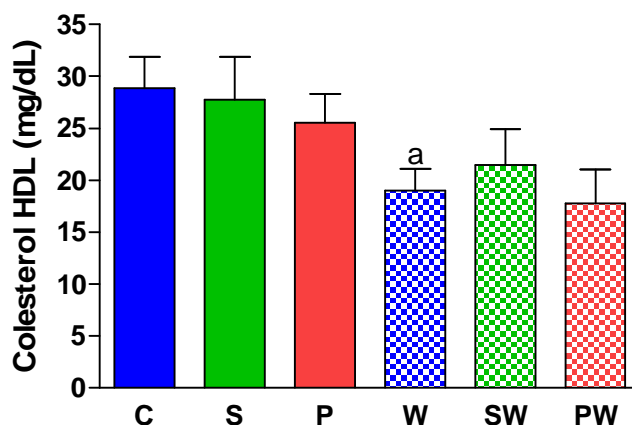


FIGURA 10: Concentração sérica de colesterol HDL (mg/dL) dos animais do grupo controle (C), do grupo suplementado com gordura de coco (S) ou com óleo de peixe (P) e dos animais do grupo portadores de tumor (W), portadores de tumor suplementados com gordura de coco (SW) ou com óleo de peixe (PW). Os dados estão apresentados como a média \pm EPM de 23 animais do grupo C, 17 do grupo S e de 19 animais do grupo P e 21 de animais do grupo W, 17 do grupo SW e de 18 animais do grupo PW.

a Diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparada à do grupo C, analisado pelo teste “t”.

GRUPOS	MÉDIA	EPM
C	28.86	2.996
S	27.74	4.147
P	25.53	2.794
W	19.01	2.119
SW	21.44	3.500
PW	17.79	3.201

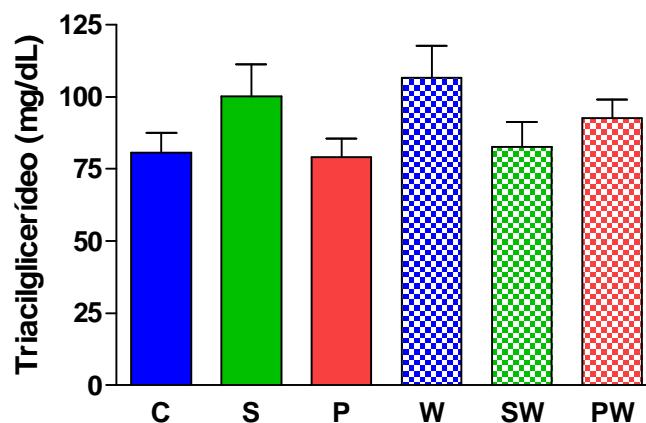


FIGURA 11: Concentração sérica de triacilglicerol (mg/dL) dos animais do grupo controle (C), do grupo suplementado com gordura de coco (S), do grupo suplementado com óleo de peixe (P) e dos animais do grupo portadores de tumor (W), portadores de tumor suplementados com gordura de coco (SW) e portadores de tumor suplementados com óleo de peixe (PW). Os dados estão apresentados com média \pm EPM de 25 animais do grupo C, 18 do grupo S e de 24 animais do grupo P e 22 de animais do grupo W, 13 do grupo SW e de 23 animais do grupo PW.

GRUPOS	MÉDIA	EPM
C	80.63	6.906
S	100.2	10.99
P	79.16	6.432
W	106.7	10.98
SW	82.65	8.768
PW	92.60	6.462

O peso do baço expresso como porcentagem do peso corpóreo, no dia do sacrifício, está apresentado na Figura 12. O peso do baço nos animais sem tumor suplementados com os diferentes ácidos graxos (S e P) não teve diferença significativa quando comparado ao do grupo controle ou entre si. Nestes animais, o peso do baço foi, em média 0,18% do peso corpóreo. A presença do tumor provocou, em média, aumento do peso do baço de aproximadamente 3,9 vezes quando comparado ao dos animais sem tumor (grupos C, S e P, $p < 0,001$). Entre os animais dos grupos portadores de tumor (W, SW e PW), o peso do baço correspondeu, em média, a 0,72%, diferindo estatisticamente quando comparado ao dos animais sem tumor ($p < 0,001$).

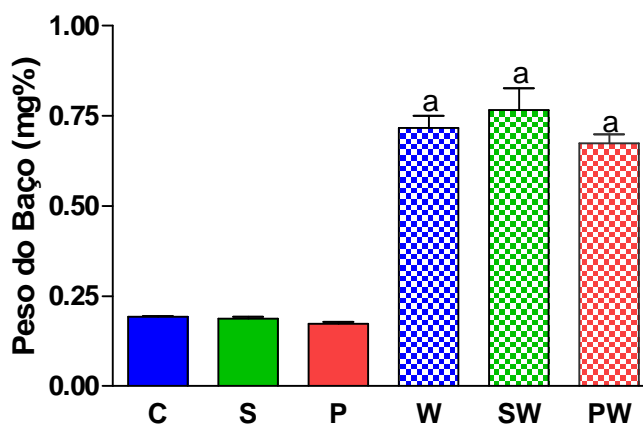


FIGURA 12: Peso do baço, expresso como porcentagem do peso corpóreo, dos animais no dia do sacrifício do grupo controle (C), do grupo suplementado com gordura de coco (S) ou óleo de peixe (P), dos animais portadores de tumor (W), portadores de tumor suplementados com gordura de coco (SW) ou com óleo de peixe (PW). Os dados estão apresentados com média \pm EPM de 33 animais do grupo C, 26 do grupo S e de 32 animais do grupo P e 31 de animais do grupo W, 20 do grupo SW e de 34 animais do grupo PW.

a $p < 0,001$ quando comparado ao C, S e P.

GRUPOS	MÉDIA	EPM
C	0.1917	0.004
S	0.1868	0.005
P	0.1727	0.005
W	0.7175	0.033
SW	0.7660	0.061
PW	0.6729	0.025

A taxa de proliferação dos linfócitos obtidos do linfonodo mesentérico, após 66 h de cultivo, na presença do mitógeno concanavalina A (Con-A – 5 µg/mL) ou do lipopolissacarídeo (LPS – 10 µg/mL) está apresentada na Figura 13. A taxa de proliferação foi expressa como índice de estimulação em relação à ausência de estímulo.

Na presença de Con-A, a taxa de proliferação dos linfócitos foi de 22,1 vezes no grupo C, 11,2 vezes no S, 4,6 vezes no P, 11,4 vezes no W, 7,1 vezes no SW e 0,9 vezes no PW. Nos animais sem tumor, a suplementação com gordura de coco ou com óleo de peixe promoveu redução significativa na taxa de proliferação celular de 1,96 e 4,8 vezes, respectivamente, quando comparadas à do C ($p < 0,05$). No grupo com tumor (W), a taxa de proliferação foi de 1,9 vezes menor quando comparada à do C. Nos grupos de animais portadores de tumor e suplementados com gordura de coco (SW) ou óleo de peixe (PW) a taxa de proliferação foi de 1,6 e 12,9 vezes menor, quando comparadas à do W, respectivamente.

Na presença de LPS, a taxa de proliferação dos linfócitos elevou-se de 3,8 vezes no C, 3,4 vezes no S, 1,8 vezes no P, 8,6 vezes no W, 1,5 vezes no SW e 0,96 vezes no PW. A suplementação com gordura de coco (S) não alterou a taxa de proliferação quando comparada à do C, contudo, a suplementação com óleo de peixe (P) promoveu redução significativa de 2,2 vezes quando comparada à do controle ($p < 0,05$). No grupo com tumor (W) a taxa de proliferação foi de 2,2 vezes maior quando comparada à do C. A suplementação com gordura de coco ou óleo de peixe nos grupos portadores de tumor (SW e PW) promoveu redução significativa da proliferação de 5,6 e 9 vezes, respectivamente, quando comparada à do W ($p < 0,05$).

Na Figura 14, está apresentada a taxa de proliferação dos linfócitos obtidos do baço, após 66 h de cultivo, na presença do mitógeno concanavalina A (Con-A – 5 µg/mL) ou de lipopolissacarídeo (LPS – 10 µg/mL). A taxa de proliferação foi expressa como índice de estimulação em relação à ausência de estímulo.

Na presença de Con-A, a taxa de proliferação dos linfócitos T foi de 1,6 vezes no grupo C, 1,5 vezes no S, 1,2 vezes no P, 1,7 vezes no W, 3,3 vezes no SW e 0,8 vezes no PW. Nos animais sem tumor, a suplementação com gordura de coco (S) não

alterou a taxa de proliferação quando comparada à do C, entretanto a suplementação com óleo de peixe (P) promoveu redução significativa da proliferação celular de 1,3 vezes quando comparada à do grupo C ($p < 0,05$). No grupo com tumor (W) a taxa de proliferação foi similar à do C. A suplementação com gordura de coco (SW) nos grupos portadores de tumor promoveu aumento significativo da proliferação celular de 1,9 vezes e redução de 2 vezes, no PW quando comparada à do W ($p < 0,05$).

Na presença de LPS, a taxa de proliferação dos linfócitos B elevou-se de 2,9 vezes no grupo C, 1,3 vezes no S, 1,7 vezes no P, 1,2 vezes no W, 0,9 vezes no SW e 0,5 vezes no PW. Nos animais sem tumor, as diferentes dietas (S e P) promoveram redução significativa na taxa proliferativa de 2,2 e 1,7 vezes, respectivamente, quando comparadas à do C ($p < 0,05$). No grupo W, a presença do tumor reduziu a taxa proliferativa em 2,4 vezes quando comparada à do C. As dietas com gordura de coco (SW) ou com óleo de peixe (PW) nos grupos portadores de tumor reduziram a proliferação celular em 1,5 e 2,6 vezes, respectivamente, quando comparadas à do W ($p < 0,05$).

A taxa de proliferação dos linfócitos obtidos do timo, após 66 h de cultivo, na presença do mitógeno concanavalina A (Con-A – 5 $\mu\text{g/mL}$) ou de lipopolissacarídeo (LPS – 10 $\mu\text{g/mL}$) está apresentada na Figura 15. A taxa de proliferação foi expressa como índice de estimulação em relação à ausência de estímulo.

Na presença de Con-A, a taxa de proliferação dos linfócitos T foi de 30,6 vezes no grupo C, 3,7 vezes no S, 1,3 vezes no P, 4,8 vezes no W, 1,1 vezes no SW e 0,5 vezes no PW. As suplementações com gordura de coco (S) ou com óleo de peixe (P) promoveram redução significativa de 8,4 e 22,9 vezes, respectivamente, quando comparadas à do C ($p < 0,05$). No grupo W, a presença do tumor elevou a taxa proliferativa de 6,4 vezes quando comparada à do C. As suplementações com gordura de coco (SW) ou com óleo de peixe (PW) nos grupos portadores de tumor promoveram redução significativa na taxa de proliferação de 4,3 e 9 vezes, respectivamente, quando comparadas à do W.

Na presença de LPS, a taxa de proliferação dos linfócitos B elevou-se de 2,7 vezes no C, 1,6 vezes no S, 1,0 vezes no P, 4,2 vezes no W, 2,1 vezes no SW e 0,5

vezes no PW. As diferentes dietas (S e P) promoveram redução significativa na taxa proliferativa de 1,6 e 2,6 vezes, respectivamente, quando comparada à do C. No grupo com tumor (W), a taxa de proliferação celular elevou-se de 1,6 vezes quando comparada à do C. As suplementações com gordura de coco ou óleo de peixe nos grupos portadores de tumor (SW e PW) promoveu redução significativa da proliferação celular de 2,0 e 9 vezes, respectivamente, quando comparada à do W ($p < 0,05$).

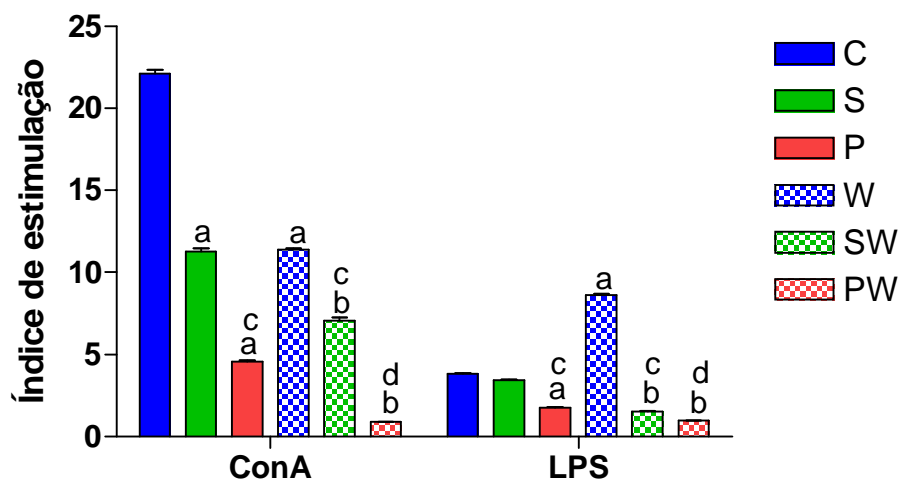


FIGURA 13: Proliferação de linfócitos apresentada como índice de estimulação dos linfócitos do linfonodo mesentérico de ratos do grupo controle (C), grupo suplementado com gordura de coco (S) ou com óleo de peixe (P), portadores de tumor (W), portadores de tumor suplementados com gordura de coco (SW) ou com óleo de peixe (PW). Os dados estão apresentados como a média \pm EPM de 5 experimentos em sextuplicata de um pool de 2 animais por experimento.

a Diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparada à do grupo C.

b Diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparada à do grupo W.

c Diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparada à do grupo S.

d Diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparada à do grupos P e SW.

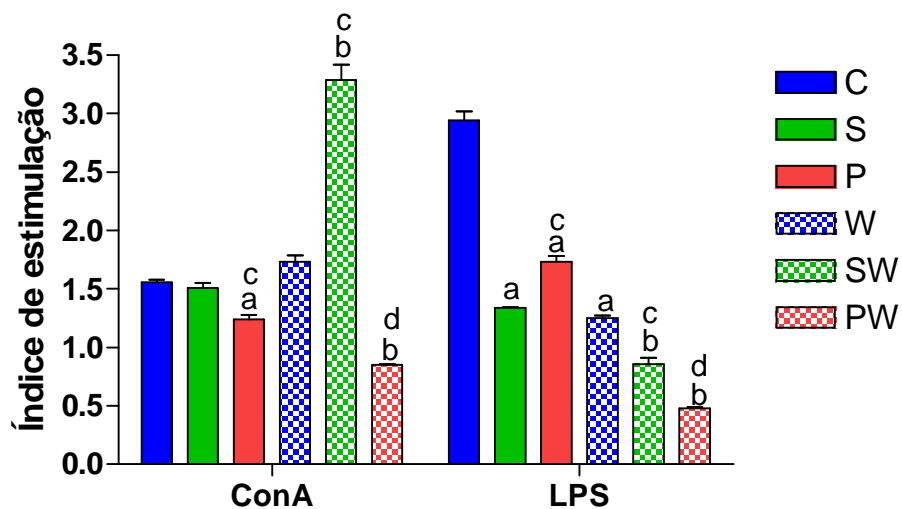


FIGURA 14: Proliferação de linfócitos apresentada como índice de estimulação de linfócitos de baço de ratos do grupo controle (C), grupo suplementado com gordura de coco (S) ou com óleo de peixe (P), portadores de tumor (W), portadores de tumor suplementados com gordura de coco (SW) ou com óleo de peixe (PW). Os dados estão apresentados como a média \pm EPM de 5 experimentos em sextuplicata de um pool de 2 animais por experimento.

a Diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparada à do grupo C.

b Diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparada à do grupo W.

c Diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparada à do grupo S.

d Diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparada à dos grupos P e SW.

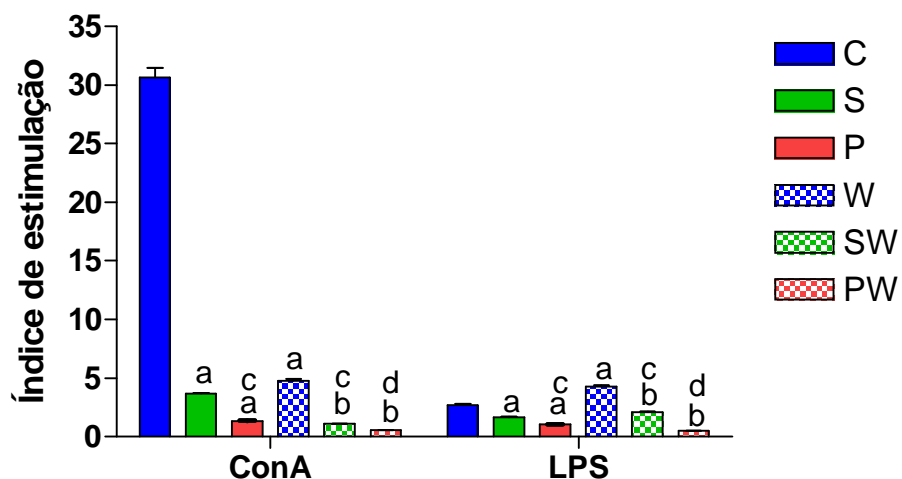


FIGURA 15: Proliferação de linfócitos apresentada como índice de estimulação de linfócitos do timo de ratos do grupo controle (C), grupo suplementado com gordura de coco (S) ou com óleo de peixe (P), portadores de tumor (W), portadores de tumor suplementados com gordura de coco (SW) ou com óleo de peixe (PW). Os dados estão apresentados como média \pm EPM de 5 experimentos em sextuplicata de um pool de 2 animais por experimento.

a Diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparada à do grupo C.

b Diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparada à do grupo W.

c Diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparada à do grupo S.

d Diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparada à dos grupos P e SW.

6. DISCUSSÃO

O estudo dos efeitos dos ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) da dieta sobre o câncer intensificou-se na década de 80. A relação entre o consumo de gorduras e o câncer tem sido talvez melhor demonstrada nas populações de esquimós, que consomem dietas ricas em PUFA n-3 e apresentam baixa incidência de câncer, doenças inflamatórias e auto-imunes (KROMANN; GREEN, 1980). Similarmente, os japoneses, que também consomem elevada quantidade desses ácidos graxos, apresentam baixa incidência de câncer de próstata e de mama (WOUTERSEN *et al.*, 1999; KAIZER *et al.*, 1989). Estudos epidemiológicos têm mostrado relação entre consumo de gordura e câncer. NIELSEN e HANSEN (1980) relataram aumento na incidência de câncer de mama, cólon e próstata em populações de esquimós e japoneses imigrantes. A explicação para este achado foi a de que eles passaram a ingerir menos PUFA n-3 e mais gordura saturada e PUFA n-6.

A grande maioria dos trabalhos na literatura tem investigado o efeito de dietas, pobres ou ricas (8-20%), de determinado tipo de ácido graxo sobre o desenvolvimento tumoral (CALDER *et al.*, 1998; PETRIK *et al.*, 2000). Em 2003, TOGNI *et al.*, fizeram abordagem nova, tentando responder qual seria o efeito da suplementação com óleo de peixe em geração F1, elevando a concentração de gordura na dieta em 0,1%. Seus resultados demonstraram que o tumor teve crescimento significativamente reduzido, com reversão da caquexia. Baseado no trabalho destes autores, nós fizemos outra pergunta: será que o efeito observado em F1 pela suplementação com óleo de peixe, seria potencializado, aditivo ou igual em geração F2, submetida ao mesmo protocolo? Assim, procuramos comparar nossos resultados àqueles obtidos pelos de TOGNI *et al.*, (2003).

A suplementação crônica com óleo de peixe, via oral, desde o desmame até a fase adulta por duas gerações (F2) não promoveu alteração no ganho de peso da prole, investigada ao nascimento e ao desmame (Figura 1), bem como durante o processo de crescimento até a fase adulta (Figura 2), entre os grupos alimentados com ração controle (C) e suplementados com gordura de coco (S) ou com óleo de peixe (P).

Nossos dados corroboram os de TOGNI *et al.*, (2003) e Ota (2002), que também trabalharam com a geração F1, demonstrando que a dose utilizada na suplementação não foi capaz de promover ganho adicional de peso. Comparando os dados aqui relatados com os dos autores mencionados acima, temos que a suplementação administrada não foi capaz de promover aumento de peso intra-geração. ARTEBURN *et al.* (2000), em estudo com ratas grávidas, observaram que a administração, por gavagem, de DHA (contida no componente DHASCO) na dose de 1,25g/Kg de peso corpóreo/dia também não alterou o peso destas ratas quando comparadas ao grupo controle, nem o peso de seus filhotes. Portanto, nossos dados de F2 corroboram este outro achado.

Estudos prévios têm demonstrado que dieta rica em PUFA n-3, usualmente na forma de óleo de peixe, é capaz de reduzir o crescimento tumoral em vários modelos de animais (BOUDREAU *et al.*, 2001; CALDER *et al.*, 1998; PETRIK *et al.*, 2000). Em nosso protocolo, a suplementação com óleo de peixe foi capaz de reduzir de forma significativa a taxa de crescimento tumoral (Figura 3) em cerca de 3 vezes, quando comparada à dos grupos alimentados com dieta padrão (W) ou com gordura de coco (SW). Em seu trabalho anterior, TOGNI *et al.* (2003) também observaram redução do crescimento tumoral, em aproximadamente 2,3 vezes. Apesar da redução ser um pouco maior na geração F2, esta não foi significativamente diferente quando comparada à geração F1. Isto, portanto, nos leva a sugerir que não há efeito aditivo nesta geração quanto ao efeito do óleo de peixe em reduzir a taxa de crescimento tumoral.

A caquexia é uma síndrome complexa considerada causa primária da maioria das mortes dos pacientes portadores de câncer e está associada a diferentes manifestações clínicas (TISDALE, 1996). Dentre os vários sintomas nos indivíduos que possuem a doença, anorexia e perda de peso parecem ser um dos achados mais frequentes (GIACOSA *et al.*, 1996). Acompanhante frequente do câncer, a caquexia nem sempre está diretamente relacionada à taxa de crescimento do tumor. Pacientes com grandes tumores podem não apresentar sinais desta síndrome, enquanto em outros a caquexia pode estar presente mesmo com o tumor representando apenas 0,01% do

peso corporal, mostrando que as alterações metabólicas induzidas pela caquexia dependem do tipo de câncer presente nos pacientes (NATHANSON; HALL, 1974).

Caquexia em ratos com tumor de Walker 256 pode ser monitorada bioquimicamente através da glicemia, laticidemia, triacilglicerolemia e conteúdo de glicogênio hepático e muscular. Os valores da glicemia encontrados foram significativamente reduzidos (Figura 4) e os de lactato sérico elevados (Figura 5) nos animais portadores de tumor (W), quando comparados aos dos animais sem tumor. Estes dois parâmetros são fundamentais para caracterização do quadro caquético nestes animais. De fato, por serem ávidas consumidoras de glicose (FERNANDES *et al.*, 1991), as células do tumor de Walker 256 induziram a hipoglicemia (Figura 4) e a hiperlaticidemia (Figura 5). Nos animais portadores de tumor suplementados com óleo de peixe (PW), a glicemia e a laticidemia foram similares às dos animais sem tumor. Já nos animais com tumor mas suplementados com gordura saturada (SW), a glicemia e laticidemia foram idênticas às dos animais do grupo W. Este achado corrobora os de TOGNI *et al.* (2003) que utilizaram o mesmo protocolo, demonstrando o efeito anti-caquético do óleo de peixe em ratos portadores de tumor, suplementados cronicamente até a primeira geração. Assim, tanto a geração F1 quanto a F2, cronicamente suplementados com óleo de peixe, têm resultados semelhantes quanto à reversão da caquexia, onde novamente não observamos efeito aditivo. Estudos anteriores mostraram que a maioria dos tumores sólidos obtém sua energia a partir do metabolismo anaeróbico da glicose (WARBURG, 1956; NOLOP *et al.*, 1987). Entretanto, a metabolização da glicose pelas células tumorais é um processo metabólico de baixo rendimento energético, uma vez que apenas duas moléculas de ATPs são produzidas por molécula de glicose consumida. Desse modo, células tumorais, que possuem rápida proliferação, consomem grandes quantidades de glicose e são responsáveis por elevadas concentrações de ácido láctico sérico (ARGILÉS; ALVAREZ; LOPES-SORIANO, 1997).

A caracterização da caquexia foi confirmada, além dos parâmetros circulantes (glicemia e laticidemia), também pelo conteúdo de glicogênio hepático (Figura 8), onde ratos portadores de tumor de Walker 256, sem suplementação ou suplementados

com gordura de coco, tiveram redução de 40% de conteúdo de glicogênio hepático quando comparado ao do grupo controle. Nos animais portadores de tumor suplementados com óleo de peixe, o conteúdo de glicogênio hepático foi semelhante aos valores apresentados pelos grupos sem tumor, suplementados ou não. TOGNI *et al.* (2003) relataram que animais portadores de tumor de Walker 256 tiveram redução de 38% do conteúdo de glicogênio hepático e, similarmente, a suplementação com óleo de peixe recuperou este parâmetro aos valores do grupo controle. Assim, novamente encontramos que F1 e F2 parece ter comportamento similar com relação ao conteúdo de glicogênio hepático, indicando não haver efeito aditivo intra-geração.

Em relação à lipemia dos animais estudados, as diferentes suplementações não alteraram significativamente as concentrações séricas de colesterol (Figura 9) e de triacilglicerol (Figura 11) dos grupos de animais sem tumor e dos animais portadores de tumor. Para os níveis de colesterol HDL (Figura 10), as diferentes dietas não alteraram significativamente este parâmetro entre os animais estudados, com exceção dos animais portadores de tumor não suplementados (W). Neste grupo, a presença do tumor promoveu redução significativa da concentração de colesterol HDL quando comparada aos demais grupos. De fato, como consequência da elevada taxa lipolítica promovida pela síndrome da caquexia, há aumento de ácidos graxos livres e triacilgliceróis no plasma, e redução dos níveis de colesterol HDL. Esta hiperlipidemia encontrada tanto em humanos quanto em modelos animais experimentais, está associada com a produção de fatores catabólicos produzidos pelo próprio tumor, como o fator mobilizador de lipídeos (LMF) e pela redução da atividade da enzima lipase lipoprotéica (LPL), responsável pela clivagem dos triacilgliceróis circulantes e armazenamento dos ácidos graxos no tecido adiposo (TISDALE, 1997; COSTELLI *et al.*, 1999). O LMF age diretamente no tecido adiposo estimulando a lipólise, de maneira dependente de AMPc, para liberação de ácidos graxos e glicerol, através de mecanismo similar ao dos hormônios lipolíticos. Além disso, as citocinas produzidas por células do sistema imunitário e pelo próprio tumor agem reduzindo a LPL, resultando em aumento do fluxo de lipídios na circulação (TISDALE, 2001).

O efeito quimioprotetor dos PUFA n-3 contra o crescimento tumoral é relatado na literatura (ROSE; CONNOLLY, 1999), porém os mecanismos pelos quais esses ácidos graxos exercem esta função não são totalmente conhecidos e não foram investigados neste estudo. Entretanto, os possíveis mecanismos pelos quais o óleo de peixe pode diminuir o crescimento tumoral incluiriam modulação da apoptose, alterações na produção de eicosanóides, taxa de peroxidação lipídica no tumor e/ou alterada resposta do sistema imunitário entre outros. Em adição, óleo de peixe reduziria a caquexia simplesmente por reduzir o crescimento tumoral e ou, mais ativamente, através da produção alterada dos mediadores inflamatórios que foram mostradas participarem da patogênese da caquexia (TISDALE, 1996).

Estudos realizados com animais ou em humanos, *in vitro* ou através da administração de dieta de lipídeos, têm relatado importante papel dos variados ácidos graxos na modulação da apoptose (DE PABLO; PUERTOLLANO; DE CIENFUEGOS, 2002). Sabe-se que células tumorais apresentam crescimento descontrolado e são capazes de sobreviver na ausência de fatores de crescimento, necessários às suas equivalentes normais. Além disso, muitas células tumorais, de alguma forma, falham em entrar em apoptose, fato esse que pode ser importante não somente para o desenvolvimento do tumor primário, mas também favorecer o processo metastático (COOPER, 2001). Neste contexto, uma das maneiras de se controlar o crescimento de células tumorais seria a indução das mesmas à apoptose. Embora haja controvérsias, vários estudos têm proposto que os ácidos graxos n-3, por diferentes mecanismos, induziriam células tumorais à apoptose (DE PABLO; PUERTOLLANO; DE CIENFUEGOS, 2002). Isto seria possível via processo mitocondrial (DE PABLO *et al.*, 1999) ou modulação de Bcl-2, por exemplo (REDDY AVULA *et al.*, 1999). ARITA *et al.* (2001) relataram que PUFA n-3 modulam a apoptose em células HL-60, pela ativação da cascata de caspases, através da liberação do citocromo c, associado à despolarização da membrana mitocondrial. Outros estudos mostraram que ácidos graxos poliinsaturados, presentes no óleo de peixe, desencadeiam a apoptose pela supressão da expressão de Bcl-2 e aumento da expressão de Fas-L (REDDY AVULA *et al.*, 1999; TYURINA *et al.*, 1997).

Outro mecanismo anti-tumoral dos PUFA n-3 sugerido é a alteração da biossíntese de eicosanóides (CALDER, 2001a). Em condições normais, eicosanóides são sintetizados, principalmente, a partir do ácido araquidônico (AA), PUFA n-6 presente em maior concentração nos fosfolipídios de membrana, pela ação das enzimas cicloxigenase ou lipoxigenase. De fato, os eicosanóides produzidos a partir do AA apresentam potência biológica mais potente que àqueles derivados do ácido eicosapentaenóico (EPA), PUFA n-3 (CALDER, 1998b, 1997).

A eficácia do PUFA n-3 contra tumorigênese é defendida através da competição dos substratos AA e EPA pelas mesmas enzimas (Esquema 1). Assim, aumentando-se a ingestão de óleo de peixe, rico em EPA e DHA, esses substituiriam o AA nas membranas celulares. A redução do conteúdo de AA nos tecidos refletiria em menor atividade da COX₂ ou até mesmo sua inibição e, portanto, uma menor produção de eicosanóides derivados de AA, como as prostaglandinas (PG) (CALDER, 2001).

Tem sido mostrado na literatura que a conversão do AA em prostaglandina E₂ (PGE₂) contribui para o crescimento tumoral, através da modulação da apoptose e proliferação celular (McENTEE; WHELAN, 2002). Numerosos estudos têm demonstrado que o nível de PGE₂ em vários tumores ou até mesmo a capacidade biossintética do tumor por esse metabólito são mais elevados quando comparados aos dos tecidos normais (BENNETT *et al.*, 1983; CHULADA *et al.*, 2000). SIDDIQUI e WILLIAMS (1990) relataram que ratos portadores de tumor de Walker 256 apresentam níveis elevados de PGE₂ circulante, quando comparados aos dos animais controle, sendo o tumor sua principal fonte. Outros autores têm relatado “*up-regulation*” de COX₂ e níveis elevados de PGE₂ com a carcinogênese de mama (BADAWI *et al.*, 1998; TAPIERO *et al.*, 2002). Em adição, COX₂ é comumente expressa em várias formas de câncer, incluindo àqueles do trato gastrointestinal (CHULADA *et al.*, 2000; LLOR *et al.*, 2003; XIONG *et al.*, 2003; ROYNETTE *et al.*, 2004), próstata (HUSSAIN; GUPTA; MUKHTAR, 2003), esôfago (SHAMMA *et al.*, 2000), pulmão, bexiga (SWEENEY *et al.*, 2002) entre outros. A COX₂ está envolvida em uma variedade de funções celulares importantes que levam a tumorigênese, como promoção de crescimento celular e inibição do processo apoptótico, que resultam em

aumento de número e tamanho de tumores. Além disso, COX₂ é capaz de aumentar a adesão celular e motilidade, que são mecanismos responsáveis pelos processos de invasão e angiogênese, essenciais para o crescimento do tumor e metástase (CAO; PRESCOTT, 2002; XIONG *et al.*, 2003). Notavelmente, estudos epidemiológicos, clínicos e experimentais relatam que NSAID (drogas anti-inflamatórias não-esteroidais), particularmente inibidores seletivos de COX₂, têm sido usados para reduzir o risco de desenvolvimento de alguns cânceres, além de suprimirem o crescimento de tumores, demonstrando que a modulação de COX₂ pode ter efeitos benéficos sobre o desenvolvimento do câncer. (THUN; HENLEY; PATRONO, 2002). Da mesma maneira, ácidos graxos poliinsaturados n-3 da dieta podem exercer efeitos anti-tumorais por inibirem competitivamente a atividade de COX₂ ou por reduzir sua expressão (SINGH; HAMID; REDDY, 1997; BADAWI *et al.*, 1998). Neste contexto, importante ressaltar que Paro (2003), trabalhando com ratos portadores de tumor de Walker 256 suplementados com óleo de peixe durante uma geração (F1), mostrou que a expressão de COX-2 estava significativamente reduzida quando comparada aos controles não suplementados ou aos animais suplementados com gordura de coco. Além de todas estas evidências, há relatos também evidenciando que os PUFA n-3 apresentam efeitos anti-tumorais via mecanismos independentes da COX₂ (BOUDREAU *et al.*, 2001).

Outra possibilidade dos efeitos anti-tumorigênicos dos PUFA n-3 é com relação à peroxidação lipídica (ROSE; CONNOLLY, 1999; CALDER, 2001d; TAPIERO *et al.*, 2002). A ação tumoricida destes ácidos graxos parece ser dependente da habilidade em aumentar a concentração de radicais livres e, conseqüentemente a taxa de peroxidação lipídica nas células tumorais (DAS, 1999).

Radicais livres são moléculas que possuem elétrons livres em sua órbita externa, sendo altamente instáveis e reativas. Procuram estabilidade às custas de outros elementos moleculares, tais como ácidos nucleicos, proteínas, lipídeos, dentre outros. Portanto, a estabilidade de um radical livre pode ser obtida a partir da desestruturação elétrica de moléculas vitais. Em condições normais, a ação dos radicais livres é opoicionada pela ação dos antioxidantes endógenos tais como superóxido desmutase,

catalase e glutathione peroxidase (KOLANJIAPPAN; MANOHARAN; KAYALUIZHI, 2002).

Um dos alvos preferidos dos radicais livres são os ácidos graxos insaturados, encontrados na dupla camada de lipídeos das membranas celulares e vitais para o seu funcionamento. Quando ocorre a reação dos radicais livres com estes ácidos graxos insaturados, ocorre também alteração em nível de membrana, que vai conseqüentemente alterar toda a célula. Com a alteração da estrutura da membrana, há a formação de peróxidos lipídicos, que são substâncias altamente deletérias para o organismo, pois comprometem a capacidade seletiva das membranas celulares, favorecendo assim, um fluxo (entrada e saída) indiscriminado de metabólitos da célula. Isto provoca ruptura seguida de morte celular (MASOTTI; CASALI; GALEOTTI, 1988; CHEESEMAN, 1993).

É descrito que células tumorais são menos susceptíveis à peroxidação lipídica do que células normais (CHEESEMAN, 1993). Outros dizem exatamente o oposto. Os mecanismos de peroxidação lipídica em células tumorais ainda não foram elucidados e seus estudos são controversos. Células malignas apresentam concentrações reduzidas ou elevadas de antioxidantes e lipídeos de membranas alterados, características estas que talvez confirmem a estas células menor ou maior resistência à peroxidação lipídica (MASOTTI; CASALI; GALEOTTI, 1988; CHEESEMAN, 1993; KOLANJIAPPAN; MANOHARAN; KAYALUIZHI, 2002). Além disso, tem-se sugerido que o fator limitante para a taxa de peroxidação lipídica em células tumorais parece ser a menor disponibilidade de ácidos graxos poliinsaturados nestas células (CHEESEMAN, 1993; KOLANJIAPPAN; RAMACHANDRAN; MANOHARAN, 2003).

TOGNI *et al.* (2003) relataram que as células do tumor de Walker 256, de ratos suplementados com óleo de peixe continha maior concentração de EPA e DHA, quando comparado aos de animais sem suplementação. Isto sugere que os ácidos graxos poliinsaturados n-3 (que apresentam maior número de duplas ligações) foram incorporados às membranas das células tumorais, facilitando a peroxidação de lipídeos de membrana e, como conseqüência, redução do crescimento tumoral. Neste contexto, GARCIA (2004) encontrou maior taxa de peroxidação em ratos com tumor,

submetidos ao mesmo protocolo de TOGNI *et al.* (2003). Isto nos permite aventar que a maior taxa de peroxidação encontrada nestes animais poderia explicar, pelo menos em parte, o mecanismo envolvido na menor taxa de crescimento tumoral destes animais.

Outra hipótese possível para explicar a redução do crescimento tumoral seria através de ativação do sistema imunitário. A hipertrofia do baço (esplenomegalia) pode ser consequência da atividade exacerbada do sistema imunitário frente a um agente agressor (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1994). Em nossos experimentos, a presença do tumor promoveu aumento significativo do peso do baço, dos animais portadores de tumor submetidos ou não às diferentes suplementações, quando comparado ao dos grupos sem tumor (Figura 12), indicando ativação da resposta imunitária.

Experimentalmente, uma das maneiras de se avaliar a função linfocitária é testar *in vitro* a taxa de proliferação dessas células em resposta a um agente mitogênico. No presente estudo, utilizamos concanavalina A (Con-A) e lipopolissacarídeo (LPS) para estimulação de linfócitos T e B, respectivamente. A resposta proliferativa de linfócitos foi mensurada pela incorporação de timidina radiomarcada no DNA das células.

Inúmeros trabalhos sobre os efeitos dos ácidos graxos sobre a função linfocitária têm mostrado resultados bastante controversos (CALDER, 1995; ALEXANDER, 1998; CALDER *et al.*, 2002), que podem ser explicados por diferentes razões. Por exemplo, a maioria deles utilizou animais de laboratórios (ratos, camundongos, coelhos, macacos, etc.) em suas experimentações e poucos foram realizados em humanos. Em geral, quando os estudos são feitos em animais, estes são submetidos a dietas ricas ou pobres em gorduras, a fim de se comparar seus efeitos sobre a proliferação de linfócitos *ex vivo*, entre outras respostas linfocitárias (CALDER, 1996; 1998a). Tais estudos têm encontrado que dietas ricas em gordura resultam em redução das funções linfocitárias quando comparadas a dietas pobres em gordura. Contudo, o efeito preciso depende sobretudo da concentração de gordura usada nas dietas e suas fontes. Resumidamente, dentre as dietas ricas, a ordem de potência de inibição é gordura saturada < óleo ricos em PUFA n-6 ≤ óleo de oliva ≤

óleo de linhaça \leq óleo de peixe (CALDER, 1998a). Todavia, a extensão de inibição mencionada por vários estudos, usando o mesmo tipo de óleo, é variável. Estas discrepâncias provavelmente devem-se ao protocolo experimental que incluem: diferenças na quantidade de gordura da dieta, no tempo de suplementação, nas espécies de animais usados e, em particular, no tipo de soro utilizado em culturas de linfócitos *ex vivo*.

Vários estudos *in vitro* sobre efeitos dos ácidos graxos nos linfócitos, onde os lipídeos foram adicionados às culturas de linfócitos, estes influenciaram a capacidade proliferativa dessas células estimuladas com mitógenos. Baixas concentrações de ácidos graxos (menor que 5 μM) estimulam a proliferação enquanto que concentrações maiores (10-15 μM) a inibem (KELLY; PARKER, 1979). Apesar de todas as divergências, a maioria dos estudos concorda que a extensão da inibição da proliferação de linfócitos depende do grau de insaturação e do comprimento da cadeia dos ácidos graxos (CALDER, 1998a).

Em humanos, KELLEY; BRANCH; IACONO, (1989) e KELLEY *et al.*, (1992) demonstraram que a redução no consumo total de gordura (de 41% a 25% da energia total), resulta em aumento da proliferação de linfócitos, em resposta a Con-A ou fitohemaglutinina (PHA), sugerindo que dietas ricas em gorduras suprimem a proliferação. Estudos que têm investigado a influência de óleo de peixe sobre as funções linfocitárias mostram-se bastante conflitantes. Na maioria dos estudos, o óleo de peixe é administrado em cápsulas aos voluntários, onde os principais ácidos graxos poliinsaturados são EPA e DHA. Alguns experimentos mostraram que suplementação com PUFA n-3 além de reduzir a proliferação de linfócitos, pode estar acompanhada de menor produção de IL-2 pelos linfócitos (MEYDANI *et al.*, 1991; GALLAI *et al.*, 1993) e adicionalmente, menor produção de IFN- γ (GALLAI *et al.*, 1993) ou ainda, não afetar a produção de IL-2 e IFN- γ (THIES *et al.* 2001). Por outro lado, outros estudos relataram que suplementação com óleo de peixe não altera a proliferação de linfócitos e produção daquelas citocinas (YAQOOB *et al.*, 2000). As razões para os diferentes resultados experimentais não são bem esclarecidas, mas podem estar relacionadas a diferentes protocolos experimentais como preparações das células em

cultura, quantidades de óleos e características dos voluntários (sexo, idade e dieta habitual).

De modo geral, os dados da literatura, sejam eles experimentos realizados em humanos ou em modelos animais, têm mostrado que dieta rica em óleo de peixe (usualmente acima de 15%) reduz a taxa de proliferação de linfócitos, além de influenciar a produção de citocinas (CALDER, 1996; SANDERSON; YAQOUB; CALDER, 1997). Além disso, a maioria dos estudos mencionados anteriormente, tem sido realizados por um período de 4 a 12 semanas. No entanto, são poucos os dados experimentais abordando o efeito da suplementação crônica com óleo de peixe sobre as respostas imunitárias ao longo de gerações e em baixas concentrações.

Em nosso estudo, incrementamos em apenas 0,1% a quantidade total de gordura ingerida pelo rato. O animal foi exposto, cronicamente, a este ambiente de ácido graxo (embrião até fase adulta). O perfil proliferativo de seus linfócitos, obtidos do linfonodo mesentérico (Figura 13) e do timo (Figura 15) mostrou-se bastante similar, diferindo apenas na magnitude da resposta. No timo, na presença de Con-A, os linfócitos dos animais sem tumor suplementados com gordura de coco (S) tiveram taxa de proliferação menor que a do grupo C. Entretanto, a suplementação com óleo de peixe reduziu significativamente a taxa de proliferação quando comparada a do grupo C e a do com gordura de coco (S). O mesmo foi observado quando do estímulo com LPS. Como mencionado acima, a literatura é farta de resultados que demonstram o efeito inibitório dos ácidos graxos poliinsaturados n-3 sobre a proliferação de linfócitos e atividades de linfócitos T (CALDER, 2001a; KELLEY 2001; GIL, 2002). Assim, os resultados obtidos com nosso protocolo estão de acordo com os da literatura. Se esta resposta acontece também em relação à produção de citocinas precisa ser avaliada. Bonatto (2003) usando o mesmo protocolo, entretanto analisando função fagocitária, encontraram que não há modificação da resposta de macrófagos, quanto aos parâmetros imunológicos de fagocitose, retenção lisossomal, produção de H_2O_2 , O_2^- e $TNF\alpha$, elevando-se apenas a produção de NO.

Em todos os animais portadores de tumor (W, SW e PW), o perfil proliferativo dos linfócitos foi similar ao de seus correspondentes sem tumor (C, S e P), na presença

de Con-A, porém o índice de estimulação foi comparativamente menor. Estes dados indicam que a presença do tumor, de alguma forma, levou à imunossupressão. Mesmo pela suplementação com óleo de peixe, não houve inibição adicional da proliferação pela presença do tumor.

A imunodeficiência é comum em muitos pacientes com câncer. Os distúrbios imunológicos provocados pelo câncer agravam-se com o progresso da doença e podem ser acompanhados da redução do número de linfócitos T e suas funções. Ainda, funções alteradas de macrófagos acarretam danos na hipersensibilidade do tipo tardio (HADDEN, 1999). Os mecanismos pelos quais o câncer pode provocar tal imunossupressão não são conhecidos, mas várias hipóteses foram aventadas. No estágio final da doença, provavelmente, os animais portadores de tumor de Walker 256 encontravam-se em intenso quadro de caquexia, onde o maior aporte nutricional, proveniente da degradação de diversos tecidos, estaria sendo desviado para o crescimento de células tumorais. Assim como estas células, os linfócitos necessitam dos mesmos nutrientes e, na ausência destes, a proliferação linfocitária ficaria comprometida. Além disso, o tumor de Walker 256 é um grande produtor de PGE₂ (SIDDIQUI; WILLIAMS, 1987). Este eicosanóide não apenas promove a sobrevivência das células tumorais (CHULADA *et al.*, 2000), contribuindo para o estabelecimento da caquexia, como também é potente supressor de proliferação de linfócitos T (HADDEN, 2003) e atua inibindo as respostas imunitárias de células Th1, que favorecem a destruição tumoral (HARRIS *et al.*, 2002).

Na presença de LPS, a taxa de proliferação dos linfócitos do timo no grupo W foi significativamente maior quando comparada à do grupo controle (C). Nos animais portadores de tumor e suplementados com as diferentes dietas (SW e PW), a taxa de proliferação foi menor quando comparada à do grupo W. Mais uma vez, estes dados mostram que o óleo de peixe não promoveu inibição adicional da taxa de proliferação dos linfócitos.

No linfonodo mesentérico, o perfil proliferativo dos linfócitos de todos os grupos de animais estudados foi bastante similar ao do timo, na presença de ambos os mitógenos (Con-A ou LPS), apenas variando na amplitude das respostas.

No baço, o perfil proliferativo dos linfócitos foi diferente dos outros dois tecidos linfóides. Na presença de Con-A, os linfócitos dos animais sem tumor, suplementados com óleo de peixe tiveram taxa de proliferação significativamente menor que à do grupo C e à do grupo suplementado com gordura de coco (S). Na presença de tumor (W), a taxa de proliferação não se alterou quando comparada à dos animais sem tumor, porém nos grupos portadores de tumor e tratados com os diferentes ácidos graxos (SW ou PW), a taxa de proliferação elevou-se marcadamente e reduziu, respectivamente, quando comparada à do W. Estes dados sugerem que, de alguma maneira, a suplementação com gordura de coco quando na presença de tumor, promoveu aumento da proliferação dos linfócitos.

Na presença de LPS, os linfócitos dos animais sem tumor nas diferentes suplementações (S ou P) tiveram taxa de proliferação significativamente menor quando comparada à do C. Nos grupos de animais portadores de tumor (W, SW e PW) o perfil proliferativo dos linfócitos se repetiu, como nos grupos de animais portadores de tumor do timo e linfonodo mesentérico.

A razão da diferença de resposta entre linfócitos do timo ou linfonodo mesentérico e baço talvez esteja no papel destes tecidos linfóides secundários. Portanto, os dados obtidos de determinado tecido linfóide têm que ser analisado com cuidado, pois não representam o “status” de todo tecido imunitário.

As células de defesa quando ativadas necessitam de energia, a qual deve ser provida pela glutamina ou glicose, principalmente (ARDAWI; NEWSHOLME, 1985). A produção de lactato, a partir de glicose pelos linfócitos obtidos do baço (Figura 6) ou linfonodo mesentérico (Figura 7) dos animais sem tumor, não foi diferente entre si. Entretanto, a presença do tumor incrementou significativamente sua produção pelos linfócitos dos animais sem suplementação (W) ou suplementados com gordura de coco (SW), o que demonstra que estas células estavam sendo exigidas imunitariamente. Interessantemente, a suplementação com óleo de peixe fez com que a produção de lactato pelos linfócitos do baço retornasse aos valores dos animais sem tumor e à dos linfócitos do linfonodo mesentérico reduzissem quando comparados aos W e WS, entretanto ficando ainda maior que à dos sem tumor. Isto sugere que o óleo de peixe,

de alguma forma, foi hábil em reduzir a produção de lactato a partir de glicose. O mecanismo pelo qual isto ocorre não foi investigado neste trabalho.

7. CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que a suplementação com óleo de peixe durante duas gerações não foi capaz de promover efeitos aditivos ou potencializados quanto à redução da taxa de crescimento tumoral e caquexia em ratos, quando comparados com estudos de geração F1. Em adição, o sistema imunitário desempenha papel secundário quanto à capacidade de reduzir a taxa de crescimento tumoral, onde o óleo de peixe parece ter efeito diretamente sobre a célula tumoral.

8. REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Imunologia celular e molecular**, Rio de Janeiro: Revinter, 1995.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Biologia molecular da célula**, 3ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.

ALBINO, A.P. JUAN, G.; TRAGANOS, F.; REINHART, L.; CONNOLLY, J.; ROSE, D.P.; DARZYNKIEWICZ, Z. Cell cycle arrest and apoptosis of melanoma cells by docosahexaenoic acid: association with decreased pRb phosphorylation. **Cancer Research**, v. 60, p. 4139-4145, 2000.

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. **Experimental Eye Research**, v. 10, p. 339, 1970.

ANDERSON, G.J.; CONNOR, W.E. Accretion of n-3 fatty acids in the brain and retina of chick fed a low linolenic acid diet supplemented with docosahexaenoic acid. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 59, n.6, p. 1338-1346, 1994.

ARDAWI, M.S.M.; NEWSHOLME, E.A. Metabolism in lymphocytes and its importance in the immune response. **Essays in Biochemistry**, v. 21, p. 1-44, 1985.

ARGILÉS, J.M.; ALVAREZ, B.; LOPES-SORIANO, F.J. The metabolism basis of cancer cachexia. **Medicinal Research Reviews**, v. 17, n.5, p. 477-498, 1997.

ARGILÉS, J.M.; COSTELLI, P.; CARBO, N.; PALLARES-TRUJILLO, J. LÓPEZ-SORIANO, F.J. Tumor growth and nitrogen metabolism in host. **International Journal of Oncology**, v. 14, n.3, p. 479-486, 1999.

ARGILÉS, J.M.; MOORE-CARRASCO, R.; BUSQUETS, S.; LÓPEZ-SORIANO, F.J. Catabolic mediators as target for cancer cachexia. **Drug Discovery Today**, v. 8, n. 8, p. 838-844, 2003a.

ARGILÉS, J.M.; MOORE-CARRASCO, R.; FUSTER, G.; BUSQUETS, S.; LÓPEZ-SORIANO, F.J. Cancer cachexia: the molecular mechanisms. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 35, p. 405-409, 2003b.

ARITA, K.; KOBUCHIC, H.; UTSUMIA, T.; TAKEHARAB, Y.; AKIYAMAND, J.; HORTONE, A.A.; UTSUMIB, K. Mechanism of apoptosis in HL-60 cells induced by

n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. **Biochemical Pharmacology**, v. 62, p. 821-828, 2001.

ARTERBURN, L.M.; BOSWELL, K.D.; HENWOOD, S.M.; KYLE, D.J. A developmental safety study in rats using DHA - and ARA - rich single - cell oils. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, n. 9, p. 763-771, 2000.

ASHES, J.R.; SIEBERT, B.D.; GULATI, S.K.; CUTHBERTSON, A.Z.; SCOTT, T.W. Incorporation of n-3 fatty acids of fish oil into tissue and serum lipids of ruminants. **Lipids**, v. 27, 629-631, 1992.

BADAWI, A.F.; EL-SOHEMY, A.; STEPHEN, L.L.; GHOSHAL, A.K.; ARCHER, M.C. The effect of dietary n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids on the expression of cyclooxygenase 1 and 2 and levels of p21^{ras} in rat mammary glands. **Carcinogenesis**, v. 19, n. 5, p. 905-910, 1998.

BAKKER, N.; VAN'T VEER, P.; ZOCK, P.L. Adipose fatty acids and cancers of the breast, prostate and colon: an ecological study. EURAMIC Study Group. **International Journal of Cancer**, v. 72, n.4, p. 587-591, 1997.

BARBER, M.D. Cancer cachexia and its treatment with fish-oil-enriched nutritional supplementation. **Nutrition**, v. 17, p. 751-755, 2001.

BARBER, M.D.; ROSS, J.A.; FEARON, K.C.H. Changes in nutritional, functional and inflammatory markers in advanced pancreatic cancer. **Nutrition and Cancer**, v. 35, 1999.

BARBER, M.D. ROSS, J.A.; VOSS, A.C.; TISDALE, M.J.; FEARON, K.C. The effect of an oral nutritional supplement enriched with fish oil on weight-loss in patients with pancreatic cancer. **British Journal of Cancer**, v. 81, n.1, p. 80-86, 1999.

BARTSCH, H.; NAIR, J.; OWEN, R.W. Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. **Carcinogenesis**, v. 20, p. 2209-2218, 1999.

BATES, D.; CARTLIDGE, N.E.F.; FRENCH, J.M.; JACKSON, M.J.; NIGHTINGALE, S.; SHAW, D.A.; SMITH, S.; WOO, E.; HAWKINS, S.A.; MILLAR, J.H.D.; BELIN, J.; CONROY, D.M.; GILL, S.K.; SIDEY, M.; SMITH, A.D.; THOMPSON, R.H.S.; ZILKHA, K.; GALE, M.; SINCLAIR, H.M. A double-blind controlled trial of long chain n-3 polyunsaturated fatty acids in the treatment of multiple sclerosis. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 52, p. 18-22, 1989.

BENNETT, A.; BERSTOCK, D.A.; CARROLL, M.A.; STAMFORD, L.F.; WILSON, A.J. Breast cancer, its recurrence, and patient survival in relation to tumor prostaglandins. **Advances in Prostaglandin, Thromboxane, and Leukotriene Research**, v. 12, p. 299-302, 1983.

BERNE, R.M.; LEVY, M.N. KOEPPEN, B.M.; STANTON, B.A. **Fisiologia**, 4ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2000.

BITTNER, S.B.; TUCKER, W.F.G.; CARTWRIGHT, I.; BLEEHEN, S.S. A double-blind, randomised, placebo-controlled trial of fish oil in psoriasis. **Lancet**, p. 378-380, 1988.

BJERVE, K.S. n-3 fatty acid deficiency in man. **Journal of Internal Medicine Supplement**, v. 225, p. 171-175, 1989.

BONATTO, S.J.R. **Avaliação da resposta imunitária em macrófagos de ratos F1, portadores de tumor de Walker 256, suplementados cronicamente com óleo de peixe**. Curitiba, 2003. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular, área de concentração Fisiologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

BORGHANS, J.A.M.; NOEST, A.J.; DE BOER, R.J. How specific should immunological memory be? **Journal of Immunology**, v. 163, n.2, p. 569-575, 1999.

BOUDREAU, M.D.; SOHN, K.H.; RHEE, S.H.; LEE, S.W.; HUNT, J.D.; HWANG, D.H. Suppression of tumor cell growth both in nude mice and in culture by n-3 polyunsaturated fatty acids: mediation through cyclooxygenase-independent pathways. **Cancer Research**, v. 61, p. 1386-1391, 2001.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Programas de Controle de Câncer- Pro-Onco. **"O Problema do Câncer no Brasil"**. 4.ed. Rio de Janeiro, 1997.

CALDER, P.C. Dietary fatty acids and the lymphocyte functions. **Proceedings of Nutrition Society**, v. 57, p. 487-502, 1998a.

CALDER, P.C. Fat chance of immunomodulation. **Trends Immunology Today**, v. 19, n. 6, p. 244-277, 1998b.

CALDER, P.C. Fatty acids, dietary lipids and lymphocyte functions. **Biochemical Society Transactions**, v. 23, p. 302-309, 1995.

CALDER, P.C. Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of n-3 polyunsaturated fatty acids. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 55, p. 737-774, 1996.

CALDER, P.C. N-3 polyunsaturated fatty acids and immune cell function. **Advances in Enzyme Regulation**, v. 37, p. 197-237, 1997.

CALDER, P.C. N-3 Polyunsaturated fatty acids and mononuclear phagocyte function. **In: Medicinal Fatty Acids in Inflammation**. Edited by J. Kremer, Birkhauser Verlag, Basel (Switzerland), p. 1-27, 1998c.

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

CALDER, P.C. The ratio of n-6 to n-3 fatty acids in the diet: Impact on T lymphocyte function. **European Journal of Lipid Science Technology**, v. 103, p. 390-398, 2001b.

CALDER, P.C. ω -3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. **Polyunsaturated Fatty Acids in Inflammation, Cancer and Bone Metabolism**, v. 88, p. 109-116, 2001c.

CALDER, P.C. The effect of dietary fatty acids on the immune response and susceptibility to infection. **Nutrition, Immunity and Infections in Infants and Children**, v. 45, p. 137-172, 2001d.

CALDER, P.C.; DAVIS, J.; YAQOOB, H.; PALA, H.; THIES, F.; NEWSHOLME, E.A. Dietary fish oil suppresses human colon tumor growth in athymic mice. **Clinical Science**, v. 94, p. 303-331, 1998.

CALDER, P.C.; DECKELBAUM, R.J. Fats in the new millennium: more complexity but understanding? **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 4, p. 89-91, 2001.

CALDER, P.C.; NEWSHOLME, E.A. Polyunsaturated fatty acids suppress human peripheral blood lymphocyte proliferation and interleukin-2 production. **Clinical Science**, v. 82, p. 695-700, 1992.

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

CALDER, P.C.; YAQOUB, P.; HARVEY, D.J.; WATTS, NEWSHOLME, E.A. The incorporation of fatty acids by lymphocytes and the effect on fatty acid composition and membrane fluidity. **Biochemical Journal**, v. 300, p. 509-518, 1994.

CANGIANO, C. LAVIANO, A.; MUSCARITOLI, M.; MEGUID, M.M.; CASCINO, A.; ROSSI FANELLI, F. Cancer cachexia: new pathogenic and therapeutic insights. **Nutrition**, v. 12 (supp), n.1, p. 48-51, 1996.

CAO, Y.; PRESCOTT, S.M. Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer. **Journal of Cellular Physiology**, v. 190, p. 279-286, 2002.

CAPONE, S.; BAGGA, D.; GLASPY, J.A. Relationship between omega-3 and omega-6 fatty acids ratio and breast cancer. **Nutrition**, v. 13, n. 9, p. 822-824, 1997.

CAYGILL, C.P.; CHARLETT, A.; HILL, M.J. Fat, fish, fish oil and cancer. **British Journal of Cancer**, v. 74, n.1, p. 159-164, 1996.

CHEESEMAN, K.H. Mecanismos and effects of lipid peroxidation. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 14, p. 191-197, 1993.

CHULADA, P.C.; THOMPSON, M.B.; MAHLER, J.F.; DOYLE, C.M.; GAUL, B.W.; LEE, C.; TIANO, H.F.; MORHAM, S.G.; SMITHIES, O.; LANGENBACH, R. Genetic disruption of Ptg-1, as well as of Ptg-2, reduces intestinal tumorigenesis in *Min* mice. **Cancer Research**, v. 60, p. 4705-4708, 2000.

CLELAND, L.G.; FRENCH, J.K.; BETTS, W.H.; MURPHY, G.A., ELLIOT, M.J. Clinical and biochemical effects of dietary fish oil supplements in rheumatoid arthritis. **The Journal of Rheumatology**, v. 15, p. 1471-1475, 1988.

COMPTON, S.J.; JONES, C.G. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. **Annals of Biochemistry**, v. 151, p. 369-374, 1985.

COOPER, G.M. **A Célula: uma abordagem molecular**. 2ed. Porto Alegre: Artemed, 2001.

COSTELLI, P.; TESSITORE, L.; BATETTA, B.; MULAS, M.F.; SPANO, O.; PANI, P.; BACCINO, F.M.; DESSI, S. Alterations of lipid and cholesterol metabolism in cachectic tumor-bearing rats are prevented by insulin. **The Journal of Nutrition**, v. 129, n.3, p. 700-706, 1999.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. **Robbins: patologia estrutural e funcional**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

DAS, U.N. Beneficial effect of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in the management of systemic lupus erythematosus and its relationship to the cytokine

network. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 51, p. 207-213, 1994.

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

DE PABLO, M.A.; PUERTOLLANO, M.A.; DE CIENFUEGOS, G.A. Biological and clinical significance of lipids as modulators of immune system functions. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 5, p. 945-950, 2002.

DE PABLO, M.A.; SUSIN, S.A.; JACOTOT, E.; LAROCLETTE, N.; COSTANTINI, P.; RAVAGNAN, L.; ZANZAMI, N.; KROEMER, G. Palmitate induces apoptosis via a direct effect on mitochondria. **Apoptosis**, v. 4, p. 81-87, 1999.

DE WYS, W.D. Management of cancer cachexia. **Seminars in Oncology**, v. 12, 452. 1995.

DOLL, R.; PETO, R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 66, p. 1191-1308, 1981.

DOMMELS, Y.E.M.; ALINK, G.M.; VAN BLADEREN, P.J.; VAN OMMEN, B. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids and colorectal carcinogenesis: results from cultured colon cells, animal models and human studies. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 0, p. 1-11, 2002.

DREYFUS, C.A. Marine oils and their effects. **Nutrition**, v. 50(Pt 2): p. 38-45, 1992.

DUNLOP, R.J.; CAMPBELL, C.W. Cytokines and advanced cancer. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 20, n.3, p. 214-232, 2000.

ENDRES, S.; GHORBANI, R.; KELLEY, V.E.; GEORGILIS, K.; LONNEMANN, J.W.; VAN DER MEER, J.W.; CANNON, J.G.; ROGERS, T.S.; KLEMPNER, M.; WEBER, P.C., and *et al.* The effects of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. **The New England Journal of Medicine**, v. 320, p. 265-271, 1989.

ENGLE, P.C.; JONES, J.B. Causes and elimination of erratic blanks in enzymatic metabolite assays involving the use of NAD⁺ in alkaline hydrazine buffers: improved conditions for the assay of L-glutamate, L-lactate, and other metabolites. **Analytical Biochemistry**, v. 88, p. 475-484, 1978.

ESCRICH, E.; SOLANAS, M.; SOLER, M.; RUIZ DE VILLA, M.C.; SÁNCHEZ, J.A.; SEGURA, R. Dietary polyunsaturated n-6 lipids effects on the growth and fatty

acid composition of rat mammary tumors. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 12, p. 536-549, 2001.

EVANS, W.K.; NIXON, D.W.; DALY, J.M.; ELLENBERG, S.S.; GARDNER, L.; WOLFE, E.; SHEPHERD, F.A.; FELD, R.; GRALLA, R.; FINE, S.; KEMENY, N.; JEEJEEBHOY, K.N.; HEYMSFIELD, S.; HOFFMAN, F.A. A randomized trial of oral nutritional support versus ad lib nutritional intake during chemotherapy for advanced colorectal and non-small-cell lung cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 5, p. 113-124, 1987.

FEARON, K.C.H. The mechanisms and treatment of weight loss in cancer. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 2, p.98, 1992.

FEARON, K.C.H.; MOSES, A.G.W. Cancer cachexia. **International Journal of Cardiology**, v.85, p. 73-86, 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**, v. 1, p. 259-268, 1991.

GALLAI, V.; SARCHIELLI, P.; TREQUATTRINI, A.; FRANCESCHINI, M.; FLORIDI, A.; FIRENZE, C.; ALBERTI, A.; DI BENEDETTO, D.; STRAGLIOTTO, E. Cytokine secretion and eicosanoid production in the peripheral blood mononuclear cells of MS patients undergoing dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids. **Journal of Neuroimmunology**, v. 56, p. 143-153, 1993.

GARCIA, E.M. **Determinação da taxa de peroxidação lipídica no tumor de Walker 256 de ratos suplementados cronicamente com óleo de peixe**. Curitiba, 2004. Dissertação, Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

GIACOSA, A.; FRASCIO, F.; SUKKAR, S.G.; RONCELLA, S. Food intake and body composition in cancer cachexia. **Nutrition**, v. 12(1 Suppl), p. 20-23, 1996.

GIL, A. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory diseases. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 56, p.388-396, 2002.

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.

HADDEN, J.W.; The immunology and immunotherapy of breast cancer: an update. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 21, p. 79-101, 1999.

HADDEN, J.W. Immunodeficiency and cancer: prospects for correction. **International Immunopharmacology**, v. 3, p. 1061-1071, 2003.

HANSEN PETRIK, M.B.; McENTEE, M.F.; CHIU, C.H.; WHELAN, J. Antagonism of arachidonic acid is linked to the antitumorigenic effect of dietary eicosapentaenoic acid in Apc^{Min/+} mice. **Biochemical and Molecular Action of Nutrients**, v. 130, p. 1153-1158, 2000.

HARRIS, S.G.; PADILLA, J.; KOUMAS, L.; RAY, D.; PHIPPS, R.P. Prostaglandins as modulators of immunity. **Trends in Immunology**, v. 23, p. 144-150, 2002.

HARRIS, W.S.; CONNOR, W.E.; LINDSEY, S. Will dietary omega-3 fatty acids change the composition of human milk? **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 40, p. 780-785, 1984.

HARBIGE, L.S. Dietary n-6 and n-3 fatty acids in immunity and autoimmune disease. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 57, n. 4, p. 555-562, 1998.

HAUGE; T.A.; CHRISTOFFERSEN, B.O. Effect of dietary fats on arachidonic acid and eicosapentaenoic acid biosynthesis and conversion of C22 fatty acids in isolated liver cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 796, p. 205-217, 1984.

HUBBARD; N.E.; ERICKSON; K.L. Role of dietary oleic-acid in linoleic acid-enhanced metastasis of a mouse mammary-tumor. **Cancer Letters**, v. 56, 165-171, 1991.

HUSSAIN, T.; GUPTA, S.; MUKHTAR, H. Cyclooxygenase-2 and prostate carcinogenesis. **Cancer Letters**, v. 191, n. 2, p. 125-135, 2003.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; CAPRA, J.D., **Imunologia: o sistema imunológico na saúde e na doença**. 4.ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000.

JELINSKA, M.; TOKARZ, A.; OLEDZKA, R.; CZORNIUK-SLIWA, A. Effects of dietary linseed, evening primrose or fish oils on fatty acid and prostaglandin E₂ contents in the rat livers and 7,12-dimethylbenz[a] anthracene-induced tumours. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1637, p. 193-199, 2003.

JIANG, W.G.; BRYCE, R.P.; HORROBIN, D.F. Essential fatty acids: molecular and cellular basis of their anti-cancer action and clinical implications. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 27, n.3, p. 179-209, 1998.

KAIZER, L.; BOYD, N.F.; KRIUKOV, V.; TRITCHLER, D. Fish consumption and breast cancer risk: an ecological study. **Nutritional and Cancer**, v. 12, n. 1, p. 61-68, 1989.

KARMALI, R.A. Historical perspective and potencial use of n-3 fatty acids in therapy of cancer cachexia. **Nutrition**, v.12, n.1, p. 2-4, 1996.

KELLEY, D.S. Modulation of human immune and inflammatory responses by dietary fatty acids. **Nutrition**, v. 17, p. 669-673, 2001.

KELLEY, D.S.; BRANCH, L.B.; IACONO, J.M. Nutrition modulation of human immune status. **Nutrition Research**, v. 9, p. 965-975, 1989.

KELLEY, D.S.; DOUGHERTY, R.M.; BRANCH L.B.; TAYLOR, P.C. IACONO, J.M. Concentration of dietaty n-6 polyunsaturated fatty acids and human immune status. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 62, p. 240-244, 1992.

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

KOLANJIAPPAN, K.; MANOHARAN, S.; KAYALUIZHI, M. Measurement of erythrocyte lipids, lipid peroxidation antioxidants and osmotic fragility in cervical and 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.

KREMMER, J.M.; LAWRENCE, D.A.; JUBIZ, W.; DI GIACOMO, R.; RYNES, K.; BARTHOLOMEY, L.E.; SHERMAN, M. Dietary fish oil and olive oil supplementation in patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 33, p. 810-820, 1990.

KROMANN, N.; GREEN, A. Epidemiological studies in the Upernavik District, Greenland. Incidence of some chronic diseases 1950-1974. **Acta Medica Scandinavica**, v. 208, n. 5, p. 401-406, 1980.

KROMHOUT, D. The importance of N-6 and N-3 fatty acids in carcinogenesis. **Medical Oncology and Tumor Pharmacotherapy**, v.7, n. 2-3, p. 173-6, 1990.

LEE, T.H. HOOVER, R.L.; WILLIAMS, J.D.; SPERLING, R.I.; RAVALESE, J.; SPUR, B.W.; ROBINSON, D.R.; COREY, E.J.; LEWIS, R.A.; AUSTEN, K.F. Effect of dietary enrichment with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on in vitro neutrophil and monocyte leukotriene generation and neutrophil function. **The New England Journal of Medicine**, v. 312, p. 1217-1224, 1985.

LIMA, M.M.R.; MOREIRA, N.X.; SANTOS, B.M.A.; MANCINI FILHO, J.; FERNANDES, L.C. **Ácidos graxos e câncer**. In: Entendendo a gordura: os ácidos

graxos. Manole, São Paulo, 2002.

LLOR, X.; PONS, E.; ROCA, A.; ALVAREZ, M.; MANE, J.; FERNANDEZ-BANARES, F.; GASSULL, M.A. The effects of fish oil, olive oil, oleic acid and linoleic acid on colorectal neoplastic processes. **Clinical Nutrition**, v. 22, n. 1, p. 71-79, 2003.

MAKRIDES, M.; NEUMANN, M.A.; GIBSON, R.A. Effect of maternal docosahexaenoic acid (DHA) supplementation on breast milk composition. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 50, p. 352-357, 1996.

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

McCOY, T.A.; NEUMAN, R.E. The cultivation of Walker carcinosarcoma 256 in vitro from cell suspensions. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 16, p. 1221-1229, 1956.

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

MEYDANI, S.N. LICHTENSTEIN, A.H.; CORNWALL, S.; MEYDANI, M.; GOLDIN, B.R.; RASMUSSEN, H.; DINARELLO, C.A.; SCHAEFER, E.J. Immunological effects of National Cholesterol Education Panel Step-2 diets with and without fish-derived n-3 fatty acid enrichment. **Journal of Clinical Investigation**, v. 92, p. 105-113, 1993.

MEYDANI, S. N. Effects of (n-3) polyunsaturated fatty acids on cytokine production and their biologic function. **Nutrition**, v. 12, p. 8-14, 1996.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C.A. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. **Current Opinion in Immunology**, v. 9, n.1, p. 4-9, 1997.

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 International Cancer**, v. 6, p. 409-20, 1948.

MIYASAKA, C.K.; MANCINI, J.; LAJOLO, F.M.; CURI, R. Implicações clínicas e nutricionais dos ácidos graxos poliinsaturados ω -3 dos óleos de peixe. **Laes & Haes**, São Paulo, v. 1, n. 98, p. 68-75, 1996.

MOSMANN, T.R.; SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. **Immunology Today**, v. 17, p. 138-146, 1996.

NATHANSON, L.; HALL, T.C.; A spectrum of tumors that produce paraneoplastic

syndromes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.230, n.367, 1974.

NIELSEN, N.H; HANSEN, J.P. Breast cancer in Greenland - slected epidemiological, clinical and histological features. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 98, n. 3, p. 287-299, 1980.

NITENBERG, G.; RAYNARD, R. Nutritional support of the cancer patient: issues and dilemmas. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 34, p. 137-168, 2000.

NIXON, D.W.; LAWSON, D.W.; KUTNER, M.; ANSLEY, J.; SCHWARZ, M.; HEYMSFIELD, S.; CHAWLA, R.; CARTWRIGHT, T.H.; RUDMAN, D. Hyperalimantation of the cancer patient with protein-calorie undernutrition. **Cancer Research**, v. 41, p. 2038-45, 1981.

NOLOP, K.B.; RHODES, C.G.; BRUDIN, L.H.; BEANEY, R.P.; KRAVSZ, T.; JONES, T. *et al.* Glucose utilization *in vivo* by human pulmonary neoplasm. **Cancer**, v. 60, p. 2682-9, 1987.

OVESEN, L.; ALLINGSTRUP, L.; HANNIBAL, J.; MORTENSEN, E.L.; HANSEN, O.P. Effect of dietary counseling on food intake, body weight, response rate, survival, and quality of life in cancer patients undergoing chemotherapy: a prospective, randomised study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 11, 2043-9, 1993.

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.

OTTERY, F.D., WALSH, D.; STRAWFORD, A. Pharmacologic Management of Anorexia/Cachexia. **Seminars in Oncology**, v. 25, n.2, suppl6, p. 35-44, 1998.

PETREK, J.A.; HUDGINS, L.C; LEVINE, B; HO, M; HIRSCH, J. Breast cancer risk and fatty acids in the breast and abdominal adipose tissues. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 86, n.1, p. 53-56, 1994.

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

POMPÉIA, C.; LOPES, L.R.; MIYASAKA, C.K.; PROCÓPIO, J.; SANNOMIYA, P.; CURI, R. Effect of fatty acids on leukocyte function. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 1255-1268, 2000.

POMPÉIA, C.; PROCÓPIO, J; CURI, R. Fatty acids and the immune system.

Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 35, n.2, p. 165-194, 1999.

PRENTICE, R.L.; SHEPPARD, L. Dietary fat and cancer: consistency of the epidemiologic data, and disease prevention that may follow from a practical reduction in fat consumption. **Cancer Causes & Control**, v. 1, n.1, p.81-97, discussion 99-109, 1990.

PURASIRI, P.; MURRAY, A.; RICHARDSON, S.; HEYS, S.D.; HORROBIN, D.; EREMIN, O. Modulation of cytokine production in vivo by dietary essential fatty acids in patients with colorectal cancer. **Clinical Science**, v. 87, n.6, p. 711-717, 1994.

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

REDDY AVULA, C.P.; ZAMAN, A.K.; LAWRENCE, R.; FERNANDES, G. Induction of apoptotic mediators in Balb/c splenic lymphocytes by dietary n-3 and n-6 fatty acids. **Lipids**, v. 34, p. 921-927, 1999.

ROFE, A.M.; BOUGEOSIS, C.S.; COYLE, P.; TAYLOR, A.; ABDI, E.A. Altered insulin response to glucose in weight-losing cancer patients. **Anticancer Research**, v. 14, n.2B, p. 647-650, 1994.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; DAVID, M. **Imunologia**. 5. ed. São Paulo: Manole, 1999.

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

ROSE, D.P.; CONNOLLY, J.M., RAYBURN, J.; COLEMAN, M. Influence of diets containing eicosapentaenoic or docosahexaenoic acid on growth and metastasis of breast cancer cells in nude mice. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 87, p. 587-592, 1995.

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. **The Journal of Rheumatology**, v. 19, p. 1505-1510, 1992.

ROYNETTE, C.E.; CALDER, P.C.; DUPERTUIS, Y.M.; PICHARD, C. n-3 Polyunsaturated fatty acids and colon cancer prevention. **Clinical Nutrition**, v. 23, n. 2, p. 139-151, 2004.

RUAN, C.; LIU, X.; MAN, H.; MA, X.; LU, G.; DUAN, G. DEFRANCESCO, C.A.; CONNOR, W.E. Milk composition in women from five different regions of China: the

great diversity of milk fatty acids. **Journal of Nutrition**, v. 125, p. 2993-8, 1995.

SANDERSON, P.; YAQOOP, P.; CALDER, P.C. Effects of dietary manipulation upon rats spleen lymphocyte functions and the expression of lymphocyte surface molecules. **Journal of Nutritional and Environmental**, v. 5, p. 119-132, 1997.

SASAKI, S.; HORACSEK, M. KESTELOOT, H. An ecological study of the relationship between dietary fat intake and breast cancer mortality. **Preventive Medicine**, v. 22, p. 187-202, 1993.

SAKURAI, Y.; KLEIN, S. Metabolic alteration in patients with cancer: nutritional implications. **Surgery Today**, v. 28, n.3, p. 247-257, 1998.

SAUER, L.A.; DAUCHY, R.T.; BLASK, D.E. Mechanism for the Antitumor and Anticachectic Effects of n-3 Fatty Acids. **Cancer Research**, v. 60, p. 5289-5295, 2000.

SCROFERNEKER, M.L.; POHLMANN, P.R. **Imunologia básica e aplicada**. 1.ed. Porto Alegre: Sagra Luzzatto, 1998.

SHAMMA, A.; YAMAMOTO, H., DOKI, Y.; OKAMI, J.; KONDO, M.; FUJIWARA, Y.; YANO, M.; INOUUE, M.; MATSUURA, N.; SHIOZAKI, H.; MONDEN, M. Up-regulation of cyclooxygenase-2 in squamous carcinogenesis of the esophagus. **Clinical Cancer Research**, v. 6, p. 1229-1238, 2000.

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

SIDDIQUI, R.A.; WILLIAMS, J.F.; Tentative identification of the toxohormones of cancer cachexia: roles of vasopressin prostaglandin E₂ and cachectin-TNF. **Biochemistry International**, v. 20, p. 787-797, 1990.

SIMOPOULOS, A. P. Evolutionary aspects of Ômega-3 fatty acids in the food supply. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 60, n. 5-6, p. 421-429, 1999.

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

SINGH, J.; HAMID, R.; REDDY, B.S. Dietary fat and colon cancer: modulation of cyclooxygenase-2 by types and amount of dietary fat during the postinitiation stage of colon carcinogenesis. **Cancer Research**, v. 57, p. 3465-3470, 1997.

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. **Journal of Clinical Investigation**, v. 82, n.4, p.1321-5, 1988.

STRASSMANN, G., JACOB, C.O., EVANS, R., BEALL, D., FONG, M. Mechanisms of experimental cancer cachexia. Interaction between mononuclear phagocytes and colon 26 carcinoma and its relevance to IL-6 mediated cancer cachexia. **Journal of Immunology**, v. 148, p. 3674-3679, 1992.

SWEENEY, C.J.; MARSHALL, M.S.; BARNARD, D.S.; HEILMAN, D.K.; BILLINGS, S.D.; CHENG, L.; MARSHALL, S.J.; YIP-SCHNEIDER, M.T. Cyclooxygenase-2 expression in primary cancers of the lung and bladder compared to normal adjacent tissue. **Cancer Detection and Prevention**, v. 26, p. 238-244, 2002.

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

THE BRITISH NUTRITION FOUNDATION. **n-3 Fatty Acids and Health**. Briefing Paper, July, 1999.

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

THIES, F.; NEBE-VON-CARON, G.; POWELL, J.R.; YAQOUB, P.; NEWSHOLME, E.A.; CALDER, P.C. Dietary supplementation with γ -linolenic acid or with fish oil decreases T lymphocyte proliferation in healthy older humans. **Journal of Nutrition**, v. 131, p. 1918-1927, 2001.

THUN, M.J; HENLEY, S.J; PATRONO, C. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs as Anticancer Agents: Mechanistic, Pharmacologic, and Clinical Issues. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 94, n. 4, p. 252-266, 2002.

TISDALE, M.J. Cancer anorexia and cachexia. **Nutrition**, v. 17, p. 438-442, 2001.

TISDALE, M.J. Cancer cachexia. **British Journal of Cancer**, v. 63, p. 337-342, 1991.

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

TISDALE, M.J. Cancer cachexia. **Anticancer Drugs**, v. 4, n. 2, p. 115-125, 1993.

TISDALE, M.J. Induction of lipolysis and muscle protein degradation by EPA in cancer cachexia. **Nutrition**, v. 12(suppl), p. 531-533, 1996.

TISDALE, M.J.; DHESI, J.K. Inhibition of weight loss by ω -3 fatty acids in an experimental cachexia model. **Cancer Research**, v. 50, p. 5022-5026, 1990.

TOGNI, V.; OTA, C.C.C.; FOLADOR, A.; TCHAIKOVSKI JÚNIOR, O.; AIKAWA, J.; YAMAZAKI, 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, n. 1, p. 52-58, 2003.

TRINDER, R. Determination of glucose in the blood using glucose oxidase with alternative oxygen acceptor. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 6, p. 24-27, 1969.

TYURINA, Y.Y.; TYURIN, V.A.; CARTA, G.; QUINN, P.J.; SCHOR, N.F.; KAGAN, V.E. Direct evidence for antioxidant effect of Bcl-2 in PC12 rat pheochromocytoma cells. **Archives of Biochemistry Biophysics**, v. 344, p. 413-423, 1997.

UNANUE, E. R.; BENACERRAF, B. **Bases celulares da imunidade**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1986.

VAN HOUWELINGEN, A.C.; PULS, J.; HORNSTRA, G. Essential fatty acids status during early human development. **Early Human Development**, v. 31, n.2, p. 97-111, 1992.

VIEIRA, R.; NASCIMENTO, R.; ARIZAWA, S.; CURI, R. Development of equipments for lymphocytes isolation and culture. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Paraná, v. 33, p. 819-829, 1990.

VOET, D.; VOET, J.G.; PRATT, C.W. **Fundamentos de bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, 2000.

XIONG, B.; SUN, T.J.; YUAN, H.Y.; HU, M.B.; HU, W.D.; CHENG, F.L. Cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis in colorectal cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v.9, n. 6, p. 1237-1240, 2003.

WARGURB, O. On the origin of cancer cells. **Science**, v. 123, p. 309-314, 1956.

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.; FEARON, K.C.H.; MAINGAY, J.P.; ROSS, J.A. Down-regulation of the acute-phase response in patients with pancreatic cancer cachexia oral eicosapentaenoic acid is mediated via suppression of interleukin-6. **Clinical Science**, v. 92, p.215, 1997.

WOUTERSEN, R.A.; APPEL, M.J.; VAN GARDEREN-HOETMER, A.; WIJNANDS, M.V. Dietary fat and carcinogenesis. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 443, p. 111-127, 1999.

YAQOOB, P.; PALA, H.S.; CORTINA-BORJA, M.; NEWSHOLME, E.A.; CALDER, P.C. Encapsulated fish oil enriched in α -tocopherol alters plasma phospholipid and mononuclear cell fatty acid compositions but not mononuclear cell functions. **European journal of Clinical Investigation**, v. 30, p. 260-274, 2000.

ZIBOH, V.A.; COHEN, K.A.; ELLIS, C.N.; MILLER, C.; HAMILTON, T.A.; KRAGBALLE, K.; HYDRICK, C.R.; VOORHEES, J.J. Effects of dietary supplementation of fish oil on neutrophil and epidermal fatty acids. Modulation of clinical course of psoriatic subjects. **Archives of Dermatology**, v. 122, n. 11, p. 1277-1282, 1986.