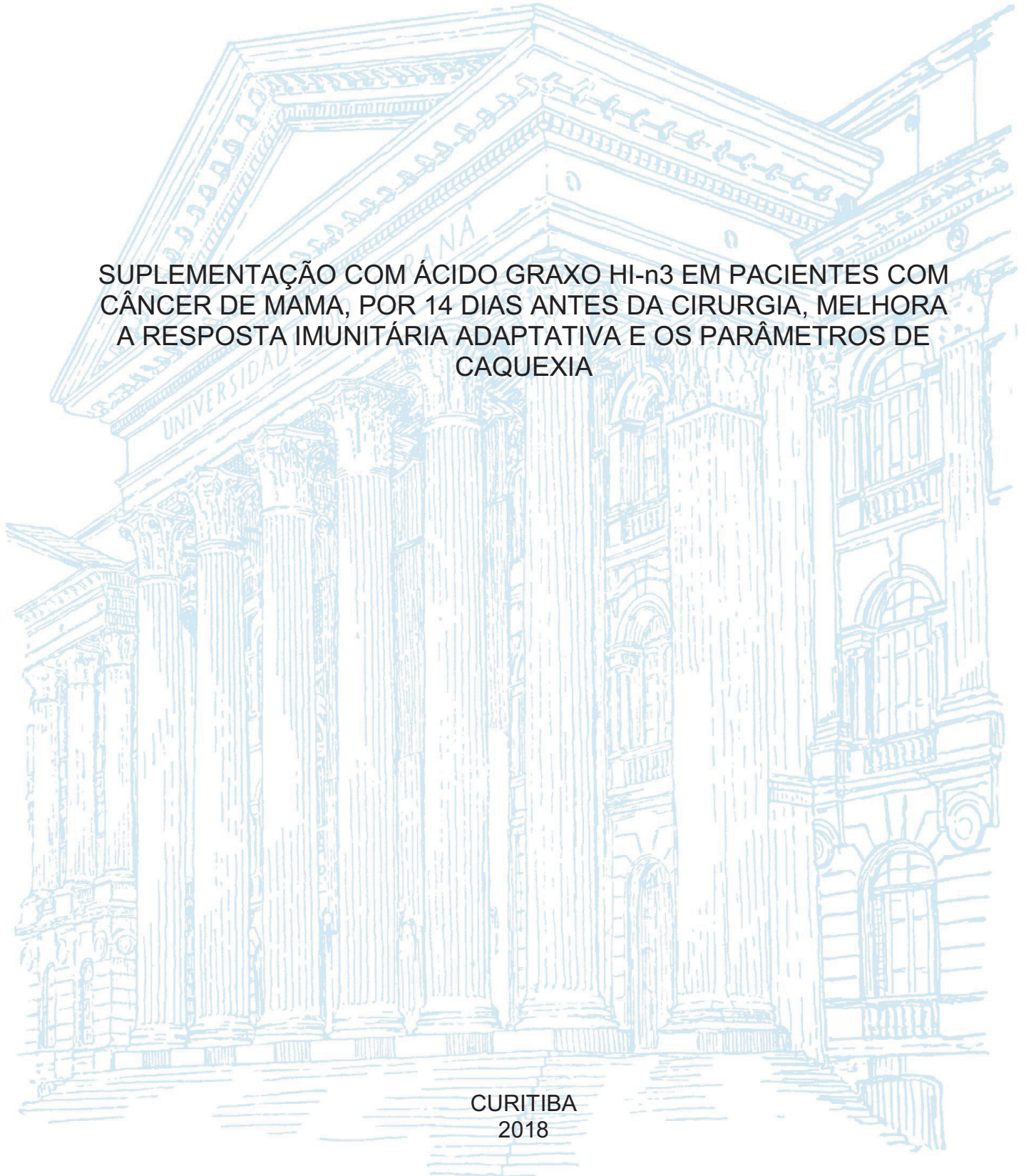


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIANA CARVALHO SCHLEDER

SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO GRAXO HI-n3 EM PACIENTES COM
CÂNCER DE MAMA, POR 14 DIAS ANTES DA CIRURGIA, MELHORA
A RESPOSTA IMUNITÁRIA ADAPTATIVA E OS PARÂMETROS DE
CAQUEXIA

CURITIBA
2018



JULIANA CARVALHO SCHLEDER

SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO GRAXO HI-n3 EM PACIENTES COM
CÂNCER DE MAMA, POR 14 DIAS ANTES DA CIRURGIA, MELHORA
A RESPOSTA IMUNITÁRIA ADAPTATIVA E OS PARÂMETROS DE
CAQUEXIA

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas da
Saúde, Universidade Federal do Paraná, como
requisito parcial à obtenção do Título de Doutora
em Fisiologia.

Orientador Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes

Co-orientadora Profa. Dra. Marcia Helena Appel

CURITIBA
2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9-1406)

Schleder, Juliana Carvalho.

Suplementação com ácido graxo Hi-n3 em pacientes com câncer de mama, por 14 dias antes da cirurgia, melhora a resposta imunitária adaptativa e os parâmetros de caquexia. / Juliana Carvalho Schleder. – Curitiba, 2018.

77 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Luiz Cláudio Fernandes.

Coorientador: Marcia Helena Appel.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

1. Mamas – Câncer. 2. Ácidos graxos Ômega-3. 3. Caquexia. 4. Sistema imunológico. I. Título II. Fernandes, Luiz Cláudio, 1960-. III. Appel, Marcia Helena. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

CDD (20. ed.) 616.99249



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



DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que **JULIANA CARVALHO SCHLEDER** no dia 19 de janeiro de dois mil e dezoito, no Setor de Ciências Biológicas (UFPR) defendeu sua Tese de Doutorado em Fisiologia, intitulada: **“SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO GRAXO HI-N3 EM PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA, POR 14 DIAS ANTES DA CIRURGIA, MELHORA A RESPOSTA IMUNITÁRIA ADAPTATIVA E OS PARÂMETROS DE CAQUIXIA”**, com a banca examinadora constituída pelos doutores: Profa. Dra. Andrea Novais M. Amaral (Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná PUC), Professora Doutora Profa. Dra. Anke Bergmann (Instituto Nacional do Câncer INCA), Professora Doutora Mirella Dias (Universidade Sul de Santa Catarina UNISUL), Professora Doutora Fabíola Iagher (Universidade Federal do Paraná – UFPR) e Professor Doutor Luiz Cláudio Fernandes (Universidade Federal do Paraná – UFPR) como orientador e presidente da Banca Examinadora. Tendo sido **Aprovada**, sendo que a emissão do diploma da mesma ficará condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Art. 61º do Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação, bem como do item III do artigo 80 da resolução 65/09 do CEPE-UFPR. Esta Declaração tem validade por 60(sessenta) dias, a partir da data de emissão da mesma.

Curitiba, 19 de janeiro de 2018.



Roberto Alves Guimarães
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia

Roberto Alves Guimarães
Matrícula UFPR - 202933
Secretário Pós-Graduação em Fisiologia / BL

Centro Politécnico – Caixa Postal 19031 – CEP: 81531-990 – Curitiba/PR
Telefones: (41) 3361-1714 – Fax (41) 3361-1714 – fisiologia@ufpr.br
www.bio.ufpr.br



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



PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado, a qual se submeteu **JULIANA CARVALHO SCHLEDER** para fins de obter o título de Doutor em Fisiologia pela Universidade Federal do Paraná, são de parecer à aprovação (aprovação/reprovação) da acadêmica.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação, bem como do item III do artigo 80 da resolução 65/09 do CEPE-UFPR.

Curitiba, 19 de janeiro de 2018.

Parecer (Aprovada/Reprovada)	Nome	Assinatura
APROVADA	Profa. Dra. Andrea Novais M. Amaral PUC-PR - Membro Titular	
APROVADA	Profa. Dra. Anke Bergmann INCA - Membro Titular	
Aprovada	Profa. Dra. Fabíola Iagher UFPR - Membro Titular	
Aprovada	Profa. Dra. Mirella Dias UNISUL - Membro Titular	
APROVADA	Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes UFPR - Membro Titular	

DEDICATÓRIA

Ao meu marido, amigo e confidente, Everson Marciano, por todo amor, cumplicidade, paciência e compreensão nos momentos em que me fiz distante, mesmo estando presente. E ao nosso filho Conrado, pois com poucos dias de vida já me faz uma pessoa melhor.

Aos meus pais Perci (in memorian) e Cordélia, grandes incentivadores e responsáveis por todas as minhas conquistas educacionais, agradeço por todo o amor e apoio incondicional e pela confiança depositada.

Às minhas irmãs Patrícia, Jessica e Priscila, meus alicerces.

Meu sobrinho e afilhado Gustavo e a minha sobrinha Nicolle.

Aos meus amigos que acompanharam de perto, ou de longe estes quatro anos de trabalho.

Aos meus residentes, futuras mentes brilhantes, por me ensinarem e se deixarem ensinar, alunos e verdadeiros motivos dos meus esforços.

E aqueles que foram e são meus pacientes, pois através de sua dor, sofrimento e confiança, permitiram o meu engrandecimento profissional e com suas lições de vida, me tornaram uma pessoa mais evoluída.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Luiz Cláudio Fernandes, meu orientador, por acreditar em mim, pela paciência, prontidão, por sua sapiência, compreensão, humanidade, incentivo, conselhos...enfim, são agradecimentos que não cessam.

A minha co-orientadora, amiga, “mãe”, professora Dra. Marcia Helena Appel, pela paciência, perseverança, conhecimento transferido, pelos puxões de orelha, pela dedicação, conselhos...mais agradecimentos que não cessam.

A professora Dra. Fabíola Iagher por seu apoio no início do processo e seu empenho para que o financiamento do projeto fosse viável.

A professora Dra. Katya Naliwaiko por toda a sua ajuda e conhecimento nos experimentos do HPLC e no LabMetab.

A doutoranda Stéfani Valéria Fisher por seu apoio, ajuda e amizade, desde o início do doutorado, e a mestranda Débora Coutinho por sua ajuda agora no final.

A Doris Naoko Suzumura, por termos sonhado juntas a conquista deste título e por ter me apresentado ao Prof. Luiz Cláudio.

Ao Dr. Sandro Bonatto, por seus conhecimentos nos experimentos iniciais.

A professora Dra. Andrea Novais Moreno Amaral por sua receptividade na PUCPR, conhecimento dispendido e disposição em nos auxiliar nas leituras no citômetro de fluxo.

Aos integrantes do Laboratório de Metabolismo: Jhonny, Bruna, Stéfanie, Dagliane, Stephanie, Andressa, Larisson, pelas ajudas nas leituras das placas e no funcionamento do LabMetab.

Aos alunos de iniciação científica Marcos e Ana Luísa por sua ajuda no processo de coletas e dados e experimentos.

A doutoranda Marianna Boia (Programa de Pós-Graduação da Biologia Celular) e ao Dr. Glaucio Valdameri (Programa de Pós Graduação em Ciência - Bioquímica), por seu auxílio nas coletas e análises dos dados.

Aos professores doutores do Programa de Fisiologia, em especial professores que ministraram aula ou participaram de algum processo meu de avaliação (por ordem alfabética): Ana Lucia Tararthuch, Ana Vitória F. da Silva, Anderson J. M. Andrade, Anita Nishiyama, Carolina Arruda O. Freire, Fernando Augusto Lavezzo Dias, Fernando Mazzilli Louzada, Luana Fischer, Luana Fischer, Marcelo M. Santos Lima,

Rafael Luiz Pereira, Ricardo Fernandez Perez, Rosalvo Tadeu H. Fogaça e Rosana N. de Moraes.

As professoras da Universidade Estadual de Ponta Grossa, Katia Paludo e Michele Dietrich de Moura Costa por passarem seu conhecimento de cultivo celular em uma disciplina na Universidade Estadual do Paraná.

Aos meus colegas do programa (em ordem alfabética) Amanda, Andriele, Carolina, Diego, Diogo, Jeferson, Paulo Guimaraes, por todo seu apoio e amizade durante as disciplinas.

Aos médicos do Serviço de Mama do Hospital Erasto Gaertner Dr. Sergio Bonatto Hatschbach, Dr. João Antônio Guerreiro, Dr. Reitan Ribeiro, que me abriram as portas para a realização do estudo com as suas pacientes. Bem como as residentes que estavam passando no serviço na época de coleta de dados Samela e Rafaela que colaboraram com a solicitação dos exames.

A toda equipe do laboratório do Hospital Erasto Gaertner, por sua paciência e auxílio nas coletas sanguíneas. A Equipe do TI por facilitar o acesso ao sistema Tasy®. As secretárias da Fisioterapia por seu auxílio no agendamento das pacientes e na entrega das cápsulas de óleo de peixe.

Ao secretário do Programa de Pós-Graduação Roberto, a técnica Heli, por seu apoio e prontidão em me auxiliar. E a “Claudinha”, secretária do prof. Luiz Cláudio, por ser esta pessoa incrível e por ter me facilitado a vida todas as vezes que solicitei ajuda.

A minha prima Professora Dra. Adriana Carvalho Pinto Vieira e a colega de profissão, comadre e amiga Professora Dra. Carolina Barreto Mozzini pelas revisões nas versões dos manuscritos.

A minha ex-aluna, ex-monitora, ex-residente, colega de trabalho, amiga Fernanda Aparecida Verner, por prontamente me auxiliar na coleta de última hora de um dado remanescente no prontuário eletrônico do Hospital Erasto Gaertner.

A Naturalis por gentilmente fornecer as cápsulas de HiOmega 3 e acreditar em nossa pesquisa.

Ao CNPq por seu financiamento e confiar na execução do projeto.

Ex-aluna, ex-monitora, colega de trabalho, amiga e irmã de coração Anaelisa Venâncio Antunes Pinto por ficar no meu lugar no consultório no período de experimentos e coletas de dados e por atender meus pacientes quando foi preciso.

A minha colega de trabalho, sócia e amiga Isadora Maria Correia Manosso Prestes, também por atender meus pacientes quando foi preciso, devido minha ausência em Ponta Grossa.

A equipe de fisioterapia do Hospital Universitário Regional dos Campos Gerais, pelas trocas de plantões, por ficarem no meu lugar, nos períodos de disciplinas de experimentos e coletas. As fisioterapeutas e amigas (em ordem alfabética) Jeanny Moletta Koss, Luciane Otto, Paula Motta, Thaiza Acosta Rebonato, e em especial a Débora Melo Mazzo, Grasieli Oliveira, Isadora Manosso Prestes, por me ajudarem ainda mais nesta fase final.

A Direção do Hospital Universitário Regional dos Campos Gerais e a Coordenação de Fisioterapia pela liberação para a minha formação.

Aos meus amigos (irmãos que escolhi) Lucas Miara Kiapuchiski e Thais Wistuba Kiapuchiski pela hospitalidade em Curitiba, e a Tia Dete e Tio Ademar também por cederem seu apartamento durante o período que fiquei em Curitiba para coleta dos dados.

A todos aqueles que, mesmo não sendo citados nominalmente, contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

***O sonho de vencer custa caro.
A força vem das dificuldades;
A sabedoria dos problemas;
E a coragem do perigo.***

(Perci Córdova Schleder)

RESUMO

Introdução: Ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 (AGPI n-3) têm sido utilizados como coadjuvantes no tratamento do câncer. **Objetivo:** Investigar o efeito da suplementação com 4g/dia de pacientes com câncer de mama por 14 dias antes da cirurgia com um óleo de peixe com concentração elevada de ácido eicosapentaenóico (EPA) chamado Hi-n3. Para tanto foram analisados função linfocitária e parâmetros metabólicos. **Material e métodos:** Ensaio clínico controlado com pacientes do sexo feminino (18-80 anos de idade), com câncer de mama e em tratamento no Hospital Erasto Gaertner em Curitiba-PR, foram divididas em dois grupos, não suplementadas (GC) e suplementadas com Hi-n3 (Hi-n3) por 14 dias previamente ao procedimento cirúrgico. Os experimentos foram conduzidos no tempo 0, antes da introdução da suplementação (T0) e 15 ao final do período de suplementação e antes da cirurgia (T15). Nos dois momentos foram coletadas amostras de sangue para determinação dos parâmetros hematológicos e para o isolamento de linfócitos. O plasma foi usado para mensurar parâmetros bioquímicos e outros parâmetros associados à caquexia relacionada ao câncer. E os linfócitos foram cultivados para determinação da proliferação e isotipados. **Resultados:** No GC os AGPI permaneceram inalterados, já no Hi-n3 houve alterações significativas ($p < 0,05$ T0 vs. T15), aumento do EPA e redução do ácido aracdônico. No GC T15 o número de eritrócitos, concentração de hemoglobina, % de hematócrito, leucócitos e neutrófilos foram superiores comparados com o T0 ($p < 0,05$). A suplementação com Hi-n3 não alterou esses parâmetros comparados com o T0 ($p > 0,05$ Hi-n3 T0 vs. T15). Em relação aos parâmetros bioquímicos referentes à caquexia, a suplementação com Hi-n3 ocasionou redução significativa na concentração de lactato, triacilgliceróis (TAG) e proteína C reativa (PCR) ($p < 0,05$ Hi-n3 T10 vs. T15). Os linfócitos provenientes das pacientes suplementadas com Hi-n3 apresentaram maior sensibilidade à presença de agente mitógeno em todos os tempos de cultivo analisados (24, 48 e 72h). Houve também aumento nos valores absolutos nas populações de CD4⁺ e CD8⁺ do grupo Hi-n3 em relação ao GC ($p < 0,01$ GC vs. Hi-n3 T15). **Conclusão:** A suplementação com Hi-n3 na dose de 4 g/dia por 14 dias provocou redução na concentração de lactato, TAG, PCR, aumento da proliferação linfocitária e das populações de CD4⁺ e CD8⁺ de linfócitos circulantes no sangue.

Palavras chave: Neoplasias da Mama; Sistema Imunológico; Caquexia; Ácidos Graxos Ômega-3.

ABSTRACT

Introduction: Polyunsaturated fatty acids n-3 has been used as a coadjuvant source for cancer treatment. **Objective.** To investigate the effect of a different fish oil supplementation, rich in eicosapentaenoic acid (EPA) named Hi-n3, in breast cancer patients for 14 days before surgery on lymphocyte function and metabolic parameters. **Material & Methods:** Female patients (18-80 years old) from Hospital Erasto Gaertner, Curitiba, PR bearing breast cancer were split into two groups non-supplemented (GC) and supplemented with fish oil Hi-n3 (Hi-n3) during 14 days, before surgery procedure. Experiments were conducted at time 0, before the introduction of supplementation (T0) and 15 (T15) at the end of the supplementation period and before surgery. Blood samples were collected at both times to determine hematological parameters and to isolate lymphocytes. Plasma was used to measure biochemical parameters and others associated with cancer-related cachexia. Lymphocytes were cultured and isotyped. **Results:** In GC, PUFA remained unchanged; in Hi-n3 there were significant alterations ($p < 0.05$ T0 vs. T15), increase of EPA and reduction of arachidonic acid. In the T15 GC the number of erythrocytes, hemoglobin concentration, % hematocrit, leukocytes and neutrophils were higher compared to T0 ($p < 0.05$). Hi-n3 supplementation did not alter these parameters compared to T0 ($p > 0.05$ Hi-n3 T0 vs. T15). In relation to the biochemical parameters related to cachexia, supplementation with Hi-n3 caused significant reduction in the concentration of lactate, triacylglycerols (TAG) and C-reactive protein (CRP) ($p < 0.05$ Hi-n3 T10 vs. T15). Lymphocytes from patients of Hi-n3 group showed greater sensitivity to the presence of mitogen in all culture times analyzed (24, 48 and 72h). There was also an increase in absolute values in the CD4⁺ and CD8⁺ populations of Hi-n3 in relation to GC ($p < 0.01$ GC vs. Hi-n3 T15). **Conclusion:** Supplementation with Hi-n3 at a dose of 4 g/day for 14 days resulted in a reduction in lactate concentration, TAG, CRP, increased lymphocyte proliferation, and circulating CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocyte populations in blood.

Key words: Breast Neoplasms; Immune System; Cachexia; Fatty Acids, Omega-3.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Separação dos componentes sanguíneos	233
Figura 2: Apresentação do pellet da nuvem de linfócitos	244
Figura 3: Plaqueamento para cultivo de linfócitos	255
Figura 4: Mudanças na coloração para avermelhado do reagente AlamarBlue® (Biosource®)	255
Figura 5: Linha do tempo das etapas da pesquisa.....	30
Figura 6: Desenho da pesquisa.....	311
Figura 7: (A) Proliferação de linfócitos sem estímulo; (B) Proliferação de linfócitos na presença de mitógeno	39
Figura 8: (A) População de linfócitos CD4 ⁺ ; (B) População de linfócitos CD8 ⁺ ; (C) Razão entre CD4 ⁺ e CD8 ⁺	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Caracterização biométrica das pacientes	32
Tabela 2: Caracterização neoplásica e tratamento das pacientes	333
Tabela 3: Concentração de ácidos graxos (%) nas amostras de eritrócitos das pacientes	35
Tabela 4: Parâmetros hematológicos pré e pós-suplementação com Hi-n3	37
Tabela 5: Parâmetros bioquímicos pré e pós-suplementação com Hi-n3	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	–	Ácido araquidônico
AG	–	Ácidos graxos
AGPI	–	Ácidos graxos poli-insaturados
BLS	–	Biópsia de linfonodo sentinela
BMMC	–	4-bromometil-7-metóxi coumarina
CDI	–	Carcinoma ductal invasor
CDis	–	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
CLI	–	Carcinoma lobular invasivo
CM	–	Carcinoma mucinoso
CO	–	Colesterol total
Con A	–	Concanavalina A
Cont.	–	Contagem
COX	–	Cicloxygenase
CPK	–	Creatinina fosfoquinase
D	–	Direita
DHA	–	Ácido docosahexaenóico
DNA	–	Ácido desoxirribonucleico
DP	–	Desvio padrão
E	–	Esquerda
EA	–	Esvaziamento axilar (linfonodectomia)
EPA	–	Ácido eicosapentaenóico
FITC	–	Detector FL1; emissão 530 ± 30 nm, excitação máxima de 493 nm
GC	–	Grupo controle
HDL	–	Lipoproteína de alta densidade
HEG	–	Hospital Erasto Gaertner
HER2	–	Proteína HER2 (<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>)
HIF-1	–	Fator 1 induzível por hipóxia
Hi-n3	–	Hiomega 3 ou grupo suplementado
HPLC	–	<i>High-performance liquid chromatography</i> (Cromatografia líquida de alta performance)

i	–	Inconclusivo
LDL	–	Lipoproteína de baixa densidade
MRM	–	Mastectomia radical modificada
MS	–	Mastectomia simples
n-3 ou ω -3	–	Ômega 3
n-6 ou ω -6	–	Ômega 6
OP	–	Óleo de peixe
PBS	–	Tampão fosfato salina
PCR	–	Proteína C reativa
PE	–	Detector FL3; emissão 495 ± 30 nm, excitação máxima de 525 nm
Quart.	–	Quadractectomia
QT	–	Quimioterapia
RE	–	Receptor de estrogênio
RP	–	Receptor de progesterona
SFB	–	Soro fetal bovino
T0	–	Tempo zero – antes da introdução da suplementação
T15	–	Tempo quinze – final do período de suplementação e antes da cirurgia
TAG	–	Triacilgliceróis
TNM	–	Tumor linfonodo metástase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	20
2.1. OBJETIVO GERAL	20
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. SELEÇÃO DE INDIVÍDUOS	21
3.2. AVALIAÇÃO INICIAL – QUESTIONÁRIO DIRIGIDO.....	21
3.3. AVALIAÇÃO SANGUINEA LABORATORIAL.....	22
3.3.1. Proliferação de linfócitos	23
3.3.2. Análise de marcadores de superfície	26
3.3.3. Análise do perfil lipídico por cromatografia líquida de alta performance - HPLC	27
3.4. SUPLEMENTAÇÃO COM ÔMEGA-3.....	299
3.5. REAVALIAÇÃO LABORATORIAL	29
3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
4. RESULTADOS	31
5. DISCUSSÃO	41
6. CONCLUSÃO	52
7. REFERÊNCIAS	53
8. APÊNCIDE 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	66
9. APÊNCIDE 2 – FICHA DE AVALIAÇÃO	69
10. ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUIS	73
11. ANEXO 2 – FICHA TÉCNICA DO PRODUTO – CÁPSULA DE HIOMEGA 3	74

1. INTRODUÇÃO

O câncer, em geral, é caracterizado por inúmeras alterações genômicas e/ou epigenômicas que se acumulam nas células e, por alterações que podem modificar o estroma celular e criar microambiente favorável à proliferação celular (CHIN; GRAY, 2008; CURTIS et al., 2012; NIK-ZAINAL et al., 2012; STEPHENS et al., 2012).

O câncer de mama é o mais comum entre as mulheres sendo considerado o segundo tipo mais frequente no mundo, respondendo por 25,2% dos casos novos a cada ano (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2016). A Organização Mundial da Saúde estima que, por ano, ocorram mais de 1.050.000 casos novos de câncer de mama em todo o mundo (CAVALCANTI et al., 2012). Para o ano de 2016, o INCA estimou o surgimento de 57.960 casos novos de câncer de mama, equivalente a um aumento de 28,1% (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2016), e espera-se 83.035 casos em 2020 (GLOBOCAN 2012 - IARC, 2016).

Ao que tudo indica, o câncer de mama é o resultado da interação de fatores genéticos com estilo de vida, hábitos reprodutivos e o meio ambiente (JOHNSON-THOMPSON; GUTHRIE, 2000; NIK-ZAINAL et al., 2012). Evidências apontam que 90%-95% dos cânceres de mama são esporádicos (não-familiares) (NASCIMENTO; SILVA; MACHADO, 2009) e decorram de mutações somáticas que se verificam durante a vida (KOUMOUTSAKOS; PIVKIN; MILDE, 2012), e que 5%-10% sejam hereditários (familiares) devido à herança de mutação germinativa ao nascimento, que confere a estas mulheres suscetibilidade ao câncer de mama (NIK-ZAINAL et al., 2012).

A idade é o principal fator de risco com taxas de incidência que aumentam rapidamente após os 50 anos (CAVALHEIRO et al., 2012; DAVIES, 2011) e, posteriormente, ocorre esse aumento de forma mais lenta (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2014). Entretanto, existem outros fatores de risco que já estão bem estabelecidos, como por exemplo aqueles relacionados à vida reprodutiva da mulher (menarca precoce) (MATOS; PELLOSO; CARVALHO, 2010), nuliparidade (GHIASVAND et al., 2012), idade da primeira gestação a termo acima dos 30 anos (DAVIES, 2011), uso de anticoncepcionais orais, menopausa tardia e terapia de reposição hormonal, história familiar de câncer da mama e alta densidade do tecido mamário (razão entre o tecido glandular e o tecido adiposo da mama) (INSTITUTO

NACIONAL DO CÂNCER, 2014), e obesidade (GHIASVAND et al., 2012; LLAVÉRIAS et al., 2011). Além desses, a exposição à radiação ionizante, mesmo em baixas doses, particularmente durante a puberdade (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2014), bem como tipo de dieta (LLAVÉRIAS et al., 2011), consumo de álcool (HARRIS; BERGKVIST; WOLK, 2012; MENEZES et al., 2015), tabagismo (MOURA et al., 2014), inatividade física (DAVIES, 2011) e diabetes mellitus tipo II (BOYLE et al., 2012; ZHANG et al., 2012b) também são considerados fatores de risco.

O principal e mais comum sinal é a presença de massa indolor e dura na mama, outros sinais e sintomas encontrados são: irritação ou ondulação da pele, dor nas mamas ou mamilos, hiperemia, escamação ou espessamento da pele do mamilo ou mama, secreção mamilar, e linfonodomegalia (ACS - AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017a). O exame inicial para detecção precoce do câncer de mama é a mamografia (CANDELARIA et al., 2017). As modalidades adjuntas mais comuns são a ultrassonografia (CANDELARIA et al., 2017; HUANG; LUO; ZHANG, 2017) e ressonância nuclear magnética (CANDELARIA et al., 2017; ZHANG; SUN; MESUROLLE, 2017). A biópsia faz-se necessária para viabilização de exames anatomopatológico e imunoistoquímica para definição do diagnóstico (CANDELARIA et al., 2017).

O câncer de mama representa um grupo heterogêneo de tumores, cujo comportamento e resposta à terapia são determinados pelas características biológicas subjacentes (RAKHA; GREEN, 2016). Os cânceres de mama possuem várias classificações (GOBBI, 2012), as mais comuns são de acordo com a sua topografia, ductal, localizado no ducto mamário, e lobular, no lóbulo da mama (GOBBI, 2012). Quanto a sua fase, *in situ*, células neoplásicas estão localizadas apenas no tecido originário, e invasor, quando já atingiu outros tecidos. Se são hormônio-dependentes, apresentam superexpressão ou expressão basal de receptores, ou triplo negativo, isto é, não possuem receptores de estrogênio ou de progesterona e têm quantidades normais de HER2 (RAKHA; GREEN, 2016).

O estadiamento do tumor é feito de acordo com a Classificação TNM (T: tumor, N: N: linfonodo, M: metástase). O tamanho do tumor deve ser dado pelo maior diâmetro do componente invasivo, com a medida macroscópica confirmada pela medida microscópica, enquanto o status linfonodal avalia a presença ou ausência de metástase regional ou peri-tumoral e, por fim, a presença ou não de metástase à

distância (DAVIES, 2011). O estadiamento clínico, e a presença de receptores de estrogênio são fatores prognósticos e servem de parâmetro para a estimativa de sobrevida dos pacientes (VAZQUEZ et al., 2016), classificações de estadiamento clínico versus TNM e receptores vide

APÊNDICE 1.

O tratamento do câncer de mama pode ser curativo ou paliativo e realizado por diversas estratégias terapêuticas como a cirurgia, radioterapia (tratamentos locais), hormonioterapia, e quimioterapia (tratamentos sistêmicos). Estes últimos podem ser tratamentos exclusivos, neoadjuvantes (antes da cirurgia) ou adjuvantes (depois da cirurgia) (DAVIES, 2011; SAMPAIO et al., 2012; ZHANG et al., 2010).

A terapia hormonal só é eleita para tratamentos de câncer de mama com células que apresentam positividade para receptores de estrogênio e/ou progesterona, ou seja, tumores hormônio-dependentes. O mecanismo de ação dos agentes hormonais é por redução da concentração destes hormônios no organismo ou, bloqueio ou redução de receptores destes hormônios das células, ocasionando a diminuição do crescimento tumoral, ou risco de recidiva (ACS - AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017b).

A quimioterapia é utilizada de forma neoadjuvante quando há comprometimento linfonodal, quando o tumor é agressivo, ou muito extenso, ou para favorecer cirurgias conservadoras (ACS - AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017c; CANDELARIA et al., 2017). O tratamento adjuvante tem como objetivos, a diminuição da chance de recidiva, em decorrência de possíveis micrometástases ocultas e aumentar a sobrevida dos pacientes (ACS - AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017c; FERRARO et al., 2013; GLICKMAN; SAWYERS, 2012; HIRSCH; ILIOPOULOS; STRUHL, 2013). A quimioterapia como tratamento exclusivo é usada em tumores irressecáveis e tem o objetivo de melhorar a sobrevida do paciente (ACS - AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017c).

A radioterapia no tratamento do câncer de mama pode ser exclusiva ou adjuvante, associada ou não ao tratamento quimioterápico (DEANTONIO et al., 2010; PINNARÒ et al., 2010). Seu efeito é local e sempre é indicada após cirurgias conservadoras (DARBY et al., 2011; SHAH et al., 2016), pós mastectomias de tumores aderidos na parede torácica, ou tumores com pouca margem de segurança e em cadeias de drenagem quando há comprometimento linfonodal. Para neoplasias malignas de mama sua aplicação é feita de duas formas: externa, em todo o volume mamário e com reforço (*Boost*) no leito tumoral; ou intra-operatório (HICKEY et al., 2016).

A cirurgia é o processo mais utilizado (MAJEWSKI et al., 2012; SAMPAIO et al., 2012), com objetivo curativo (ACS - AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017d; BENSON; DUMITRU; MALATA, 2016; CATANUTO; ROCCO; NAVA, 2016; HOUVENAEGHEL et al., 2016; MANNING; SACCHINI, 2016) ou paliativo (ACS - AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017d). As cirurgias podem ser conservadoras, como a lumpectomia (retirada do tumor com margem de segurança) (HOUVENAEGHEL et al., 2016), quadrantectomia (ressecção de um quadrante mamário) (BOFF et al., 2015), ou radicais, as mastectomias (CATANUTO; ROCCO; NAVA, 2016). As mastectomias podem ser subdivididas em simples (retirada da glândula mamária), radical modificada (retirada da glândula mamária, linfonodos axilares ou biópsia de linfonodo sentinela), tipo Patey quando há retirada do músculo peitoral menor, e tipo Madden quando há preservação dos músculos peitorais, e a radical clássica tipo Halsted (retirada da glândula mamária, linfonodos axilares e músculos peitoral maior e menor) (BOFF et al., 2015).

Os tratamentos associados variam de acordo com sua recomendação baseada no risco de recorrência. Contudo, nos casos de tumores irresssecáveis, o tratamento é paliativo, basicamente realizado com quimioterapia associado ou não à radioterapia (BRUCE et al., 2012).

Com base nas complicações advindas do câncer em si e de seus tratamentos, pesquisas estão sendo feitas objetivando formas de prevenir o aparecimento da doença, ou minimizar essas complicações, focando melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Neste ensejo, várias pesquisas têm investigado os efeitos da dieta sobre o risco de desenvolver câncer de mama (COMBA et al., 2010; EGEBERG et al., 2008; HARDMAN et al., 2011; KIM et al., 2009; NIK-ZAINAL et al., 2012; SUZUKI et al., 2008; THIÉBAUT et al., 2009), e os pesquisadores enfatizam a importância de se investigar esta questão mais a fundo.

Estudos prévios mostraram que a ingestão de peixes traz benefícios aos pacientes com câncer (GERBER, 2012; GLEISSMAN; JOHNSEN; KOGNER, 2010; PATTERSON et al., 2011; ZHANG et al., 2012a). Porém, devido a mudanças nos hábitos alimentares da vida moderna e às características do mundo ocidental a ingestão de peixes foi reduzida. Para suprir a deficiência de nutrientes encontrados nestes alimentos, suplementos alimentares como óleo de peixe (OP), vêm tornando-se cada vez mais populares.

O OP tem se consolidado como uma das principais fontes de ácido graxo poli-insaturado (AGPI). Os ácidos graxos (AG) são cadeias de átomos de carbono, ligados a átomos de hidrogênio podendo ter vários tamanhos. Recebem classificação de acordo com a quantidade de carbonos que apresenta, cadeia curta (com dois a quatro átomos), de cadeia média (com seis a dez átomos) e cadeia longa (acima de doze átomos) (CURI; POMPEIA; MIYASAKA; ARAÚJO, 2002).

Ao longo da cadeia podemos encontrar dois tipos de ligações químicas, em diversas posições, originando assim as diferentes famílias de ácidos graxos que são encontradas na natureza. São classificados como saturados ou insaturados, dependendo da ausência ou presença de duplas ligações carbono-carbono. Quando os átomos de carbono estão ligados aos átomos de hidrogênio (exceto os dois últimos na cadeia), denominam-se saturados. Quando dois átomos de carbono adjacentes na cadeia estão ligados a apenas uma molécula de hidrogênio, uma dupla ligação ocorre entre os pares de carbono este tipo de ácido graxo é chamado de insaturado. Assim, ácidos graxos com apenas uma dupla ligação na cadeia carbônica são denominados monoinsaturadas e aqueles com duas duplas ligações ou mais são denominados AGPI (CALDER, 1998).

Há duas importantes famílias de AGPI: a família ômega-6 ($\omega-6$ ou $n-6$), que recebeu esta nomenclatura por conter sua primeira dupla ligação entre o sexto e sétimo átomo de carbono a partir do terminal metila do átomo de carbono, esta família é derivada do AG essencial linoléico, chamado de essencial devido os mamíferos não serem capazes de sintetizá-los, conseqüentemente, necessitam ser fornecidos pela dieta, o ácido linoléico é convertido em ácido araquidônico (AA); e a família ômega-3 ($\omega-3$ ou $n-3$), tem sua primeira dupla ligação entre o terceiro e quarto átomo de carbono a partir do terminal metila do átomo de carbono, derivada do AG essencial α -linolênico que é convertido em ácido eicosapentaenóico (EPA) e em ácido docosahexaenóico (DHA) (BOUGNOUX et al., 2009; INNIS, 2003, 2007; LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, 2014; VAUGHAN; HASSING; LEWANDOWSKI, 2013).

Dentre os benefícios da ingestão do n-3 ressalta-se a redução no risco de desenvolvimento de câncer em mulheres, sejam tumores ginecológicos (AREM et al., 2013; DJURIC et al., 2013; GERBER, 2012; MANDAL et al., 2012; SCZANIECKA et al., 2013) e/ou de mama (STEHR; HELLER, 2006). Entretanto, quando a doença já está instalada, evidências apontam: redução do volume tumoral (BELO et al., 2010; PATTERSON et al., 2011), devido alterações nas propriedades das células

neoplásicas como proliferação, invasão, metástase, apoptose e ativação das células de defesa do organismo (BERQUIN; EDWARDS; CHEN, 2008; CALDER, 2013); redução da caquexia secundária ao tumor quimicamente induzido (BONATTO et al., 2004; MUND et al., 2007; PINTO et al., 2004; PIZATO et al., 2005); potencialização da quimioterapia em pacientes com câncer metastático (BOUGNOUX et al., 2009); além de redução da recidiva local (BOUGNOUX et al., 2010).

No caso do câncer de mama já houve descrição no meio científico de que o n-3 inibe o crescimento tumoral e melhora o resultado no tratamento. Sua ação antitumoral baseia-se na alteração da composição lipídica da membrana plasmática, remodelando sua arquitetura (CORSETTO et al., 2011; THIÉBAUT et al., 2009) e consequentemente afetando o desenvolvimento físico e as propriedades químicas de ligações lipídicas, devido mudanças na barreira fosfolipídica (MANDAL et al., 2012; SIGNORI et al., 2011).

Além de agir sobre as células neoplásicas, a suplementação com AGPI n-3 também tem efeito sobre o sistema imunitário, atuando sobre a fagocitose, produção de espécies reativas de oxigênio, migração leucocitária, proliferação e controle da produção de citocinas, e moléculas de adesão. O mecanismo de ação deste AGPI é baseado nas alterações da fluidez de membranas, das vias de transdução de sinal, da transcrição gênica, da modificação protéica, do metabolismo celular, da despolarização mitocondrial e da liberação de cálcio (RODAKCI et al., 2012).

AGPI n-3 vêm sendo utilizados como recurso coadjuvante nutracêutico no tratamento de cânceres. Suplementação com OP por pelo menos 30 dias com duas cápsulas de OP por dia, tem sido benéfica, contudo as doses e os mecanismos moleculares para que ocorram estes eventos celulares ainda não estão totalmente definidos (BERQUIN; EDWARDS; CHEN, 2008; MANDAL et al., 2012; THIÉBAUT et al., 2009).

Levando em consideração a urgência para o início do tratamento oncológico, pois os pacientes, em grande parte das vezes, não podem esperar 30 dias ou mais para ter os efeitos biológicos da suplementação com OP, principalmente aqueles que serão submetidos ao tratamento cirúrgico, levantou-se o questionamento de que se o OP enriquecido com EPA (Hiomega 3 – Hi-n3), cuja concentração de EPA tem o dobro da usual, poderia propiciar os mesmos efeitos daqueles provocados quando se utiliza OP por 30 dias.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos da suplementação por 14 dias com Hi-n3, previamente a cirurgia, sobre parâmetros sanguíneos (bioquímicos e celulares) de pacientes recém diagnosticadas com câncer de mama.

A escolha deste tempo de suplementação foi por ser o tempo médio de pré-operatório no serviço onde foi realizada a pesquisa.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar pré e pós suplementação:

- Parâmetros lipídicos e hematológicos (bioquímicos e celulares);
- Perfil dos AGPI nos eritrócitos;
- Proliferação linfocitária em cultura;
- População dos linfócitos CD4⁺ e CD8⁺;

E posteriormente comparar esses dados do grupo controle com o grupo suplementado.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este ensaio clínico controlado foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Erasto Gaertner (HEG) sob o número de registro CAAE: 28099014.7.0000.0098 (ANEXO 1).

A seleção dos indivíduos foi realizada no Ambulatório de Ginecologia e Mastologia do HEG. As coletas de amostras sanguíneas foram realizadas na mesma instituição.

3.1. SELEÇÃO DE INDIVÍDUOS

A seleção da amostra foi feita no período de março a outubro de 2016, e a distribuição os indivíduos nos grupos: grupo controle (GC) e suplementado com OP (Hi-n3) foi feita de forma alternada, conforme eram atendidas no ambulatório. Foram incluídas mulheres de 18 a 80 anos de idade, que possuíam diagnóstico de neoplasia maligna de mama. Foram excluídas do estudo mulheres que já tinham feito suplementação com OP; que tinham alimentação baseada em alimentos que possuíam n-3 em grande concentração (consumo diário de peixes, algas marinhas, crustáceos, brócolis, espinafre, azeite de oliva, nozes, rúcula, folha de mostarda, óleo de fígado de bacalhau, semente de chia, óleo ou semente de linhaça); que por quaisquer motivos não realizaram a suplementação proposta pelo estudo, esta suplementação era monitorada semanalmente, pois as pacientes recebiam a quantia exata de cápsulas para 7 dias, depois deveriam voltar para pegar as cápsulas para a próxima semana.

3.2. AVALIAÇÃO INICIAL – QUESTIONÁRIO DIRIGIDO

Após aceite e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE 2), a primeira avaliação, determinada como Tempo Zero (T0), foi realizada no dia seguinte a consulta na qual receberam a informação que seriam submetidas ao procedimento cirúrgico. Neste momento as pacientes do grupo Hi-n3

foram orientadas a iniciar a suplementação no mesmo dia da avaliação e a interrupção da suplementação ao final do 14º dia. As pacientes do GC foram orientadas a manter sua alimentação como de costume.

A avaliação foi realizada sempre pelo mesmo pesquisador iniciando com a aplicação de uma ficha de coleta de dados (APÊNDICE 3). Esses dados consistiram em: idade, caracterização biométrica, hábitos alimentares para identificação do consumo de alimentos ricos em n-3, pois dietas prévias ricas em n-3 poderiam interferir na quantidade de n-3 de ambos os grupos, e ainda, características neoplásicas e tratamentos realizados.

3.3. AVALIAÇÃO SANGUINEA LABORATORIAL

As pacientes foram submetidas a duas coletas de sangue (T0 e Tempo Quinze – T15 – após os 14 dias) para análise do hemograma completo, contagem de plaquetas, glicemia, lactatemia, triacilgliceróis (TAG), perfil lipídico (lipoproteína de baixa densidade – LDL, lipoproteína de alta densidade – HDL, colesterol total – CO) (realizados no HEG); e quantificação de DHA e EPA, e proliferação linfocitária (realizados no Laboratório de Metabolismo Celular da Universidade Federal do Paraná – UFPR; e isotipagem das populações de CD4⁺ e CD8⁺ (realizada em parceria com a Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUCPR). O sangue foi coletado por profissional treinado, durante o exame de rotina do próprio serviço de Mastologia e Ginecologia do HEG como parte do protocolo pré-operatório.

O sangue de cada paciente nos tempos T0 e T15 foi coletado e armazenado em 2 vacutainers não siliconizados (BD Minas Gerais, Brasil) de 4 mL com o anticoagulante K₃EDTA e mantido à temperatura ambiente até o processamento (no mesmo dia da coleta). Adotados todos os procedimentos assépticos dentro do fluxo laminar, 2 mL de sangue foram alíquotados e centrifugados a 2.325 xg, à temperatura de 21 °C, durante 10 min. Após separadas as camadas (plasma – sobrenadante / células sanguíneas – infranadante), foram feitas alíquotas de amostras de eritrócitos e plasma. O restante foi homogeneizado e adicionado aos outros 4 mL do segundo vacutainer para nova centrifugação, para isolamentos dos linfócitos, análise de proliferação linfocintára e isotipagem.

3.3.1. Proliferação de linfócitos

3.3.1.1. Obtenção de linfócitos

Os 6 mL de sangue foram adicionados a um tubo de 15 mL contendo 3 mL de Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich®) e levado para centrifugação a 400 xg, à temperatura de 21 °C, por um período de 30 min. Os componentes sanguíneos foram separados, sendo a camada superior composta por plasma (descartada), em seguida por nuvem com as células mononucleares (predominantemente linfócitos – por convenção, ao longo deste trabalho será chamado somente de linfócitos), a subsequente por Histopaque 1077 e a inferior por eritrócitos. A camada superior foi desprezada e a nuvem linfocitária foi coletada e transferida para outro tubo de 15 mL.

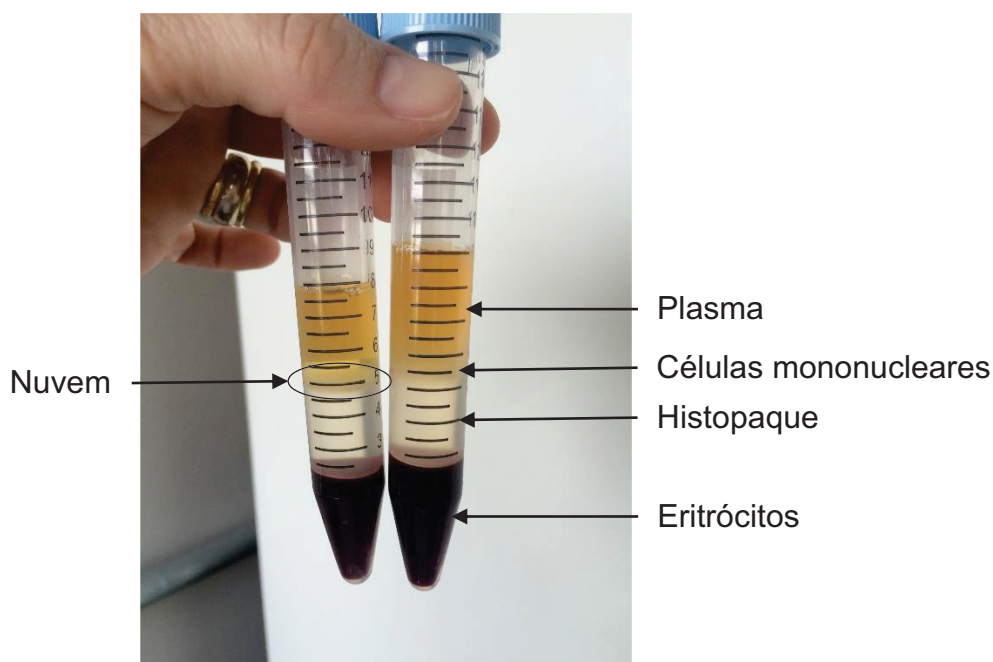


Figura 1: Separação dos componentes sanguíneos
Fonte: Dados da pesquisa

3.3.1.2. Contagem das células linfocitárias

Para a contagem das células linfocitárias foi descartado o plasma da parte superior do tubo e recolhida a nuvem com linfócitos. À nuvem foram adicionados 10 mL da solução tampão fosfato salina pH 7,4 (PBS). Após a homogeneização, foi realizada centrifugação a 1.453 xg, à temperatura ambiente, por 5 min. O

sobrenadante foi desprezado e o pellet de células foi ressuspensionado em 10 mL de PBS novamente. Quando o pellet apresentava muitos eritrócitos, foi utilizada solução hemolítica (2,06 g de trishidroximetilaminometano, 7,702 g de cloreto de amônio e quantidade suficiente para 1 L de água miliQ) 10 mL, durante 15 min, a 37 °C, e posteriormente as células foram novamente lavadas com PBS. A contagem de células foi feita em câmara de Neubauer e a viabilidade determinada pela coloração azul de Tripán (0,2% em PBS).

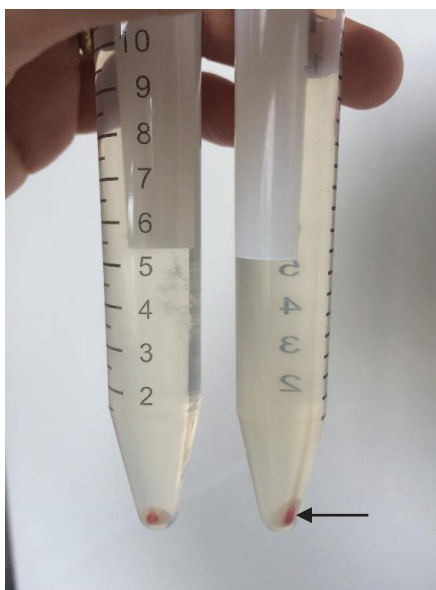


Figura 2: Apresentação do pellet de linfócitos da nuvem contaminado com eritrócitos (seta)
Fonte: Dados da pesquisa

3.3.1.3. Cultivo dos linfócitos

Os linfócitos foram cultivados em placas com fundo chato e transparente de 96 poços. Cada poço foi preenchido com 160 μL de solução de células contendo 5×10^4 células/poço ressuspensas em meio de cultura RPMI-1640 enriquecido com 10% de soro fetal bovino, contendo antibióticos (1:100) (penicilina 10.000 U e estreptomicina 10 mg/L), estimuladas ou não com 20 μL /poço do mitógeno Concanavalina A (Con A) (Sigma-Aldrich®) [0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$] e 20 μL /poço (10%v/v) do detector de atividade metabólica AlamarBlue® (Biosource®).

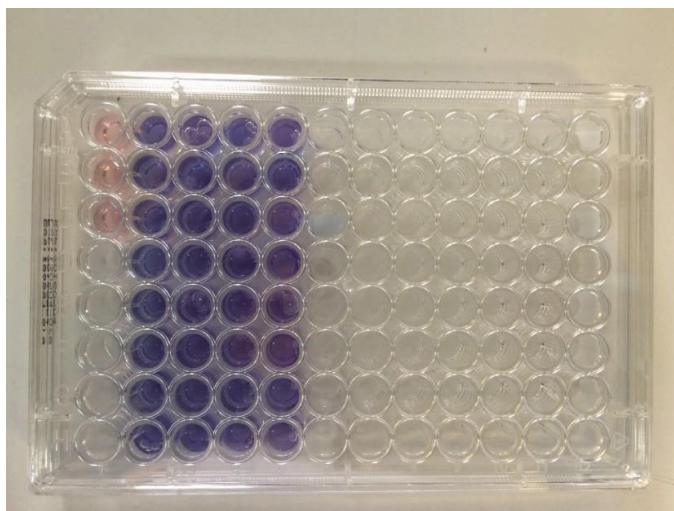


Figura 3: Plaqueamento para cultivo de linfócitos
Fonte: Dados da pesquisa

3.3.1.4. Determinação da proliferação linfocitária absoluta

O sistema incorpora um indicador de oxidação-redução AlamarBlue® (Biosource®), que muda a cor do meio de cultivo em resposta à redução química provocada pelas células, como resultado do crescimento celular, passando da cor azul para a cor avermelhada. A determinação das absorvâncias nos comprimentos de onda 570 nm e 600 nm foram realizadas no leitor multifuncional de microplaca Infinite 200® (Tecan®), nos momentos 0 h, 24 h, 48 h e 72 h após o plaqueamento.

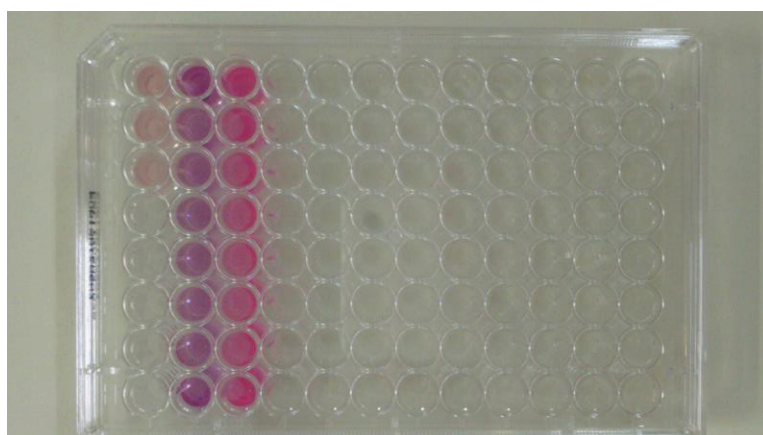


Figura 4: Mudanças na coloração para avermelhado do reagente AlamarBlue® (Biosource®)
Fonte: Dados da pesquisa

Descontado o valor da absorbância do meio de cultura das médias dos poços estimulados e não estimulados com Con A, foi possível determinar a proliferação absoluta e o índice de proliferação dos linfócitos. A absorbância absoluta foi obtida pela subtração da absorbância do comprimento de onda de 600 nm do comprimento de onda de 570 nm.

3.3.2. Análise de marcadores de superfície

3.3.2.1. Preservação dos linfócitos para subtipagem

O restante da solução com células foi centrifugada a 2.325 g, à temperatura ambiente, durante 1 min. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas com muito cuidado em 300 μ L de PBS (4 °C) para garantir a completa homogeneização e desfazer completamente os grumos. Esta etapa é essencial para o sucesso da próxima fase que será realizada por citometria de fluxo. A esta solução foi acrescentado, gota a gota, 700 μ L de etanol absoluto, previamente resfriado a -20 °C. As células preservadas em etanol 70%, foram mantidas em freezer a -20 °C até o momento da análise dos marcadores da população de CD4⁺ e CD8⁺.

3.3.2.2. Determinação quantitativa dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺

Para a determinação da presença dos marcadores de superfície para linfócitos T auxiliar (CD4⁺) e linfócitos T citotóxicos (CD8⁺), os linfócitos foram lavados duas vezes em PBS e ressuspendidos em 1 mL de tampão de ligação (PBS com SFB 5%), incubados com 20 μ L de anticorpos monoclonais contra CD4⁺ marcado com PE (detector FL3; emissão 495 \pm 30 nm, excitação máxima de 525 nm) e 20 μ L de anticorpos contra CD8⁺ marcado com FITC (detector FL1; emissão 530 \pm 30 nm, excitação máxima de 493 nm) ambos da BD Pharmingen[®] por 90 min, protegidos da luz, a temperatura ambiente. Os anticorpos não ligados foram removidos pela lavagem com tampão PBS e as células foram ressuspendidas em 1 mL de PBS. A leitura foi realizada por citometria de fluxo FACSCalibur[®] (BD Pharmingen[®]) (PUC/PR) e as análises dos resultados foram feitas no FlowJo[®] LLC.

3.3.3. Análise do perfil lipídico por cromatografia líquida de alta performance - HPLC

A ingestão das cápsulas, a absorção dos AG e a incorporação de Hi-n3 nos eritrócitos foram confirmadas pela determinação das concentrações de EPA e DHA em relação ao total de ácidos graxos nos eritrócitos, através da HPLC (Varian, Palo Alto, CA, EUA), utilizando a mesma amostra sanguínea coletada e aliqotada como descrito.

A análise do perfil de AG consistiu em 4 etapas:

3.3.3.1. Extração lipídica

A amostra de eritrócitos previamente congelada em -80 °C foi descongelada em recipiente com gelo triturado. Alíquota de 100 µL foi colocada em tubo de ensaio de vidro e a ele foi adicionado 1,33 mL clorofórmio/metanol (2:1), o tubo foi agitado em vórtex. Adicionou-se 0,240 mL de metanol e novamente o tubo foi agitado em vórtex. Desta forma, foi possível preservar os lipídios numa fase orgânica e precipitar as proteínas numa fase metanólica. A solução foi centrifugada a 5.000 xg, por 10 min, à temperatura ambiente. A fase superior foi transferida para outro tubo, adicionando 0,480 mL de clorofórmio, 0,410 mL de água ficando uma relação de sobrenadante/infranadante de 40/60, posteriormente foi agitado em vórtex. Foi aguardado o tempo para reconstituição espontânea do sistema bifásico e descartado o sobrenadante. A solução inferior foi lavada por 3 vezes com a solução de Folch e todas as vezes foi descartada a fase hidrometanólica. A fase orgânica foi submetida a evaporação em fluxo de nitrogênio gasoso em banho-maria a 37 °C, por aproximadamente 20 min (FOLCH; LEES; STANLEY, 1957).

3.3.3.2. Saponificação dos extratos lipídicos

Os extratos lipídicos obtidos, bem como alíquotas de Hi-n3 e eritrócitos, foram resuspendidas em 0,1 mL de metanol e saponificados com 2,0 mL de uma solução alcalina em metanol (hidróxido de sódio 1M em metanol a 90%), a 37 °C por 2 h, em banho-maria com agitação (BEYER e JENSEN, 1989; HAMILTON et al., 1992; NISHIYAMA-NARUKE et al., 1998). A solução alcalina foi acidificada até aproximadamente pH 3,0, com ácido clorídrico 1M. Os ácidos graxos em solução foram extraídos 3 vezes com 2,0 mL de hexano. O solvente foi evaporado em nitrogênio gasoso e as amostras guardadas protegidas da luz, a -20 °C, até a derivatização com 4-bromometil-7-metóxi coumarina (BMMC).

3.3.3.3. Derivatização dos ácidos graxos

A reação de derivatização foi baseada no método descrito por Abushufa et al. (1994). O reagente 1 foi preparado adicionando-se 10 mg de BMMC em 10 mL de acetonitrila. O reagente 2 foi preparado adicionando-se 26,5 mg de 18-crown-6 e 100 mg de carbonato de potássio em 5 mL de acetonitrila. O reagente 2 foi sonicado por 30 min e outros 5 mL de acetonitrila foram adicionados. O sobrenadante foi separado do precipitado e a solução estocada a 4-8 °C. As amostras contendo ácidos graxos a serem derivatizados foram reconstituídas em 100 mL de acetonitrila e homogeneizadas em vórtex. Após 30 segundos, foram adicionados 100 µL do reagente 1, e 100 µL do reagente 2. As amostras foram novamente homogeneizadas, mantidas a 60 °C por 15 min e em seguida transferidas para frascos apropriados para injeção.

3.3.3.4. Identificação e quantificação de AGPI n-3 por HPLC

A identificação dos AGPI derivatizados foi efetuada pelo detector de fluorescência, onde foram realizadas injeções de volumes que variam de 10 a 50 µL dos derivados diluídos. O fluxo era de 1,0 mL/min, à temperatura controlada de 23 °C.

Os compostos foram detectados fluorimetricamente com excitação a 325 nm e emissão a 398 nm. Quanto à fase móvel, foi realizado gradiente binário com acetonitrila e água, iniciando com a proporção de 77:23% (acetonitrila:água) e finalizando com 90:10%, em um total de 55 min.

A coluna analítica utilizada para a separação dos ácidos graxos derivatizados foi a C-8 de fase reversa (25 cm × 4,6 mm i.d., 5 µm de partícula). A mistura de padrões de ácidos graxos foi obtida da empresa Sigma-Aldrich®.

3.4. SUPLEMENTAÇÃO COM ÔMEGA-3

A suplementação das pacientes foi realizada com cápsulas de Hi-n3, gentilmente fornecidas pela Naturalis® (Naturalis Nutrição & Farma Ltda). Cada cápsula continha 1.000 mg de OP na proporção de 0,54 g de EPA e 0,1 g de DHA (ficha técnica em ANEXO 2), confirmadas por prévia análise de HPLC (76,34% EPA e 23,66% DHA). As pacientes receberam as cápsulas gratuitamente, em pacotes com doses semanais e, foram instruídas a ingerirem as cápsulas, duas após o almoço e duas após o jantar, juntamente com líquido de sua preferência (não alcoólico), totalizando 2,16 g/dia de EPA e 0,4 g/dia de DHA. As participantes também foram orientadas a manter seus hábitos alimentares durante o estudo para que não houvesse alterações na ingestão alimentar.

3.5. REAVALIAÇÃO LABORATORIAL

Consistiu na reavaliação de todas as variáveis sanguíneas após os 14 dias de suplementação com Hi-n3 sendo determinado este como T15.

Para melhor entendimento das etapas deste estudo a Figura 5 apresenta o *design* experimental desta pesquisa:

4. RESULTADOS

Foram selecionadas a partir dos prontuários médicos para participarem do estudo, 150 mulheres, de 27 a 76 anos de idade, que possuíam diagnóstico de neoplasia maligna de mama. Cento e vinte e três pacientes não foram incluídas devido insucesso no contato inicial ou não aceitarem participar do estudo. Apenas 27 foram incluídas, destas foram excluídas duas que já suplementavam com OP; uma que tinha alimentação baseada em alimentos que possuíam n-3 em grande concentração (consumo diário de peixes); e duas foram consideradas perda, pois não realizaram a suplementação proposta pelo estudo (esqueceram de suplementar por dias). Portanto, a amostra foi constituída por 22 pacientes, divididas em dois grupos, GC e Hi-n3 (Figura 6). Foi realizado o cálculo amostral no software G Power v.1., assumindo-se um erro tipo I (α) de 5%, poder do teste de 80%, obtendo-se um n de 11 sujeitos.

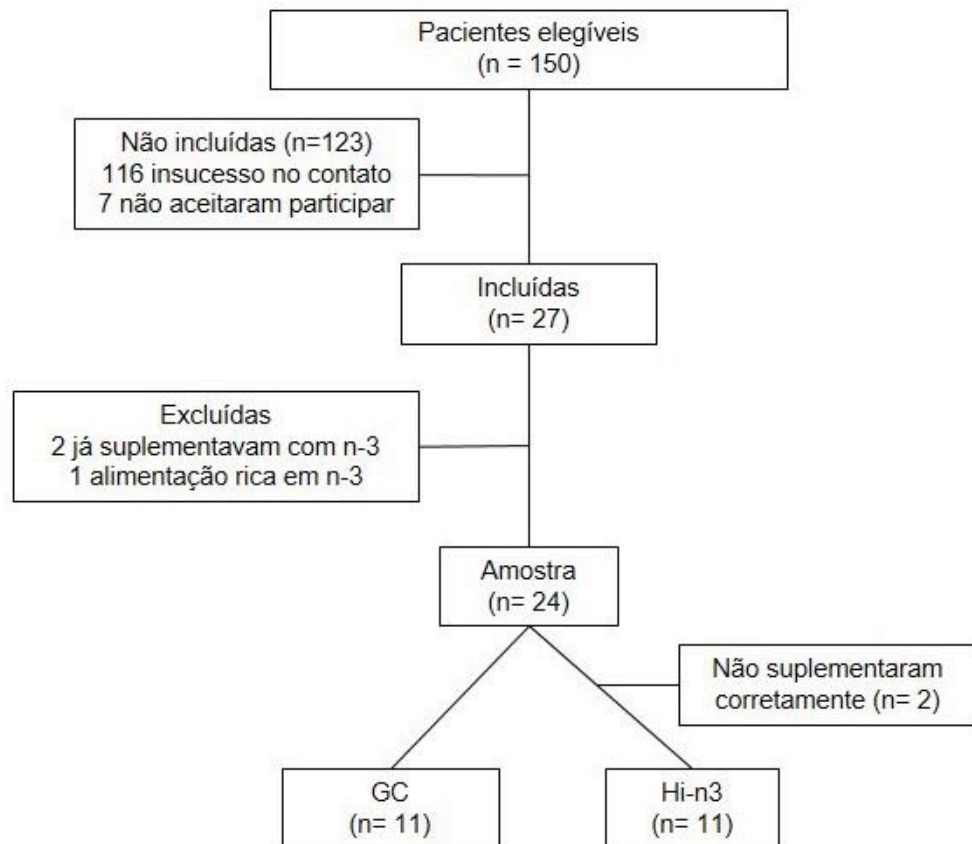


Figura 6: Desenho da pesquisa

Ambos os grupos apresentavam características físicas homogêneas, como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1: Caracterização biométrica das pacientes

	GC = 11		Hi-n3 = 11		<i>p</i> *
	mediana	Q1-Q3	mediana	Q1-Q3	
Idade (anos)	54	52-58	51	36-69	0,92
Peso (kg)	77,50	61,25-86,0	72,00	58,0-84,0	0,70
Altura (m)	1,58	1,54-1,64	1,57	1,55-1,66	0,97
IMC (kg/m ²)	31,18	28,03-33,85	29,59	22,97-37,33	0,55

Q1 – Primeiro quartil. Q3 – Terceiro quartil. IMC – Índice de massa corporal. *Comparação entre grupos utilizando o teste de student t.

Em ambos os grupos o tipo histológico mais frequente foi o carcinoma ductal invasor (Tabela 2), os estadiamentos clínicos variaram de iniciais a avançados. A maioria das pacientes recebeu tratamento neoadjuvante, sendo a quimioterapia o mais frequente. No GC a quadractomia foi o procedimento cirúrgico mais adotado, no Hi-n3 a quadrantectomia foi realizada em metade das pacientes.

Tabela 2: Caracterização neoplásica e tratamento das pacientes

Tipo Histológico	Receptor Hormonal	Estadiamento Clínico	Performance Status de Karnofsky	Tratamento Neoadjuvante	Tipo de Cirurgia	
					Mama	Axila
GC	RE+/RP+/HER2-	IIB	100	não	quad.	EA
	RE-/RP-/HER2-	IIIA	100	sim	quad.	EA
	RE-/RP-/HER2-	IIB	100	sim	quad.	EA
	RE+/RP+/HER2-	IA	100	não	setorectomia	BLS
	RE+/RP+/HER2-	IA	100	não	quad.	BLS
	RE+/RP+/HER2+	IIA	100	não	quad.	-
	RE+/RP+/HER2-	IIA	90	sim	quad.	BLS
	RE+/RP+/HER2-	IA	100	não	quad.	BLS
	RE+/RP+/HER2- / RE-/RP-/HER2-	IIIB	60	sim	MRM D + MS E	BLS
	RE+/RP+/HER2-	IIA	100	sim	quad.	EA
	RE-/RP-/HER2-	IIIB	60	sim	MRM	-
	RE+/RP+/HER2-	IIB	100	sim	MRM	-
	RE+/RP+/HER2+	IIB	100	sim	MRM	-
RE-/RP-/HER2+	IIIA	100	sim	MRM	-	
RE+/RP+/HER2+	IIIB	100	sim	quad.	EA	
RE+/RP+/HER2-	IIA	100	não	quad.	EA	
RE+/RP+/HER2 i	IIA	100	não	quad.	EA	
RE+/RP+/HER2-	IIIA	80	sim	recusou tratamento		
RE-/RP-/HER2-	IIIA	80	sim	quad.	EA	
RE-/RP-/HER2+	IIB	100	não	MRM	BLS	
RE+/RP+/HER2-	IIB	100	sim	quad.	EA	
RE-/RP-/HER2 i	IA	100	sim	quad.	EA	

CDI – carcinoma ductal invasor; CM – carcinoma mucinoso; CDIs – carcinoma ductal *in situ*; CLI – carcinoma lobular invasivo; RE – receptor de estrogênio; RP – receptor de progesterona; HER2 – proteína HER2 (*human epidermal growth factor receptor 2*); i – inconclusivo; quart. – quadrantectomia; EA – esvaziamento axilar (linfonodectomia); BLS – biópsia de linfonodo sentinela; MRM – mastectomia radical modificada; D – direita; E – esquerda; MS – mastectomia simples.

Em relação aos hábitos de vida do GC, três das pacientes eram tabagistas, nenhuma relatou etilismo e apenas duas relataram que os sintomas da doença interferiam nas atividades cotidianas de acordo com o índice de performance status de Karnofsky. No grupo Hi-n3 cinco relataram tabagismo, uma etilismo e todas eram capazes de realizar suas atividades sem que a doença interferisse.

O perfil lipídico demonstrou que inicialmente (T0) ambos os grupos eram semelhantes. Após 14 dias de suplementação (T15), as análises realizadas nos eritrócitos permitiram identificar redução significativa de AG mirístico nas pacientes do grupo Hi-n3 ($p < 0,01$ T0 vs. T15) e araquidônico ($p = 0,03$ T0 vs. T15), este segundo mostrou inclusive diferença estatística entre os grupos ($p = 0,05$ T15 GC vs. Hi-n3). Houve também redução significativa do percentual do ácido linoleico na comparação entre os grupos após a suplementação ($p = 0,01$ T15 GC vs. Hi-n3) Também foi possível comprovar significativo aumento de 195,58% do EPA ($p = 0,03$ T0 vs. T15), com diferença entre os grupos ($p = 0,01$ T15 GC vs. Hi-n3). Quanto ao aumento de 34,49% no DHA ($p = 0,06$ T0 vs. T15) pode-se inferir relevância biológica (Tabela 3).

Tabela 3: Concentração de ácidos graxos (%) nas amostras de eritrócitos das pacientes

Ácido graxo	GC			Hi-n3			p^{\dagger}	p^{\ddagger}
	T0 média ± DP	T15 média ± DP	p^*	T0 média ± DP	T15 média ± DP	p^*		
Ácido laurico (12:0)	ND	ND	-	ND	ND	-	-	-
Ácido mirístico (14:0)	2,14 ±0,84	0,66 ±0,38	0,25	1,95 ±0,33	0,55 ±0,12	<0,01	0,81	0,71
Ácido palmítico (16:0)	29,33 ±1,08	26,98 ±1,05	0,19	27,61 ±3,16	26,99 ±1,00	0,83	0,67	0,99
Ácido esteárico (18:0)	10,03 ±0,62	9,46 ±1,62	0,76	9,56 ±0,75	8,32 ±0,44	0,17	0,66	0,39
Ácido oleico (18:1 n-9)	16,26 ±4,07	16,02 ±0,59	0,93	15,45 ±3,48	17,56 ±0,54	0,52	0,89	0,10
Ácido linoleico (18:2 n-6)	23,53 ±0,82	20,96 ±0,82	0,13	20,35 ±2,64	17,45 ±0,48	0,20	0,24	0,01
AA (20:4 n-6)	27,63 ±1,45	25,38 ±1,67	0,35	23,43 ±0,63	19,50 ±0,99	0,03	0,07	0,05
EPA (20:5 n-3)	0,55 ±0,01	0,65 ±0,19	0,68	0,68 ±0,36	2,01 ±0,31	0,03	0,74	0,01
DHA (22:6 n-3)	4,89 ±1,30	4,96 ±1,23	0,97	4,293 ±0,70	5,77 ±0,25	0,06	0,71	0,43

DP – desvio padrão. *Comparação pareada entre T0 e T15. †Comparação entre controle e Hi-n3 no T0. ‡Comparação entre controle e Hi-n3 no T15. ND – não detectado. AA – ácido araquidônico. EPA – ácido ecosapentaenóico. DHA – ácido docosahexaenóico. Foram injetadas de 8-12 amostras por grupo avaliado.

A Tabela 4 apresenta os parâmetros hematológicos e a Tabela 5 apresenta os parâmetros bioquímicos de ambos os grupos. Inicialmente os grupos eram homogêneos do ponto de vista hematológico e bioquímico. Como pode ser observado, a lactatemia se apresentou limítrofe superior aos valores de referência (exceto Hi-n3 T15), e a PCR estava acima dos valores de referência para todos os grupos e tempos estudados, o restante dos parâmetros séricos estavam todos dentro dos valores normais para mulheres.

No GC, quando comparado o T0 e T15, houve elevação significativa no número de eritrócitos, na concentração de hemoglobina, no percentual do hematócrito, e no número de leucócitos e neutrófilos (GC T0 vs. T15).

Para o Hi-n3, quando comparado o T0 e T15, estes mesmos parâmetros os valores permaneceram inalterados ($p>0,05$). O único parâmetro que deu diferença significativa foi a contagem de plaquetas ($p<0,05$ Hi-n3 T0 vs T15).

Quanto aos parâmetros bioquímicos (Tabela 5), analisados para o GC, estes se mantiveram iguais se comparado o T0 e após 15 dias da coleta inicial, apesar da presença do câncer (GC T0 vs. GC T15 $p>0,05$). Por outro lado, a suplementação com Hi-n3 causou redução significativa na concentração de lactato, TAG e da PCR no plasma (GS T0 vs. GS T15 $p\leq 0,05$). Os demais parâmetros não se alteraram pela suplementação.

Tabela 4: Parâmetros hematológicos pré e pós-suplementação com Hi-n3

	GC = 11		Hi-n3 = 11		p*	p†	p‡				
	T0		T15					T0		T15	
	Mediana (Q1 - Q3)	Mediana (Q1 - Q3)	Mediana (Q1 - Q3)	Mediana (Q1 - Q3)				Mediana (Q1 - Q3)	Mediana (Q1 - Q3)	Mediana (Q1 - Q3)	Mediana (Q1 - Q3)
Eritrócitos (milhões/mm ³)	4,68 (4,50 - 4,97)	4,73 (4,45 - 5,30)	4,97 (4,44 - 5,24)	4,93 (4,71 - 5,20)	0,02	0,69	0,72	0,47			
Hemoglobina (g/dL)	13,85 (13,28 - 13,90)	14,00 (12,78 - 14,88)	14,50 (13,40 - 13,60)	14,35 (14,05 - 14,78)	0,04	0,35	1,00	0,59			
Hematócrito (%)	42,70 (40,90 - 44,00)	43,30 (42,15 - 47,25)	45,60 (42,70 - 46,00)	44,75 (44,48 - 45,73)	<0,01	0,10	0,58	0,96			
Leucócitos (/mm ³)	8,070 (6,360 - 8,740)	9,530 (9,233 - 9,898)	6,365 (5,353 - 7,613)	8,815 (7,843 - 10,085)	0,03	0,07	0,25	0,95			
Eosinófilos (/mm ³)	178,00 (163,00 - 193,0)	162,50 (99,50 - 220,80)	178,00 (113,50 - 349,80)	241,00 (153,50 - 444,00)	0,25	0,84	0,88	0,33			
Basófilos (/mm ³)	54,00 (0,00 - 88,00)	0,00 (0,00 - 69,00)	68,00 (41,00 - 77,00)	35,00 (0,00 - 54,00)	1,00	0,67	0,63	0,52			
Linfócitos (/mm ³)	1.800 (1.636 - 2.128)	2.535 (2.052 - 2.988)	1.652 (1.445 - 2.052)	2.208 (1.893 - 2.921)	0,25	0,75	0,19	0,46			
Monócitos (/mm ³)	535,00 (444,30 - 643,30)	498,00 (424,00 - 684,00)	536,00 (440,80 - 697,50)	531,00 (444,00 - 639,30)	0,36	0,79	0,81	0,83			
Bastões (/mm ³)	156,00 (127,00 - 175,00)	185,00 (168,80 - 196,00)	165,00 (131,50 - 185,00)	161,00 (137,00 - 202,00)	0,13	0,75	0,88	0,38			
Neutrófilos (/mm ³)	4.452 (3.846 - 5.683)	6.163 (4.665 - 6.616)	3.835 (2.984 - 4.864)	5.568 (5.065 - 5.872)	0,03	0,13	0,13	0,41			
Cont. de plaquetas (/mm ³)	280.000 (248.000 - 325.000)	251.000 (228.000 - 257.000)	310.000 (210.000 - 337.000)	272.000 (201.000 - 281.000)	0,06	0,43	0,04	0,26			

Cont. – Contagem. *Comparação pareada entre T0 e T15. †Comparação entre controle e Hi-n3 no T0. ‡Comparação entre controle e Hi-n3 no T15.

Tabela 5: Parâmetros bioquímicos pré e pós-suplementação com Hi-n3

	GC = 11				Hi-n3 = 11			
	T0		T15		T0		T15	
	Mediana (Q1 - Q3)	Mediana (Q1 - Q3)	Mediana (Q1 - Q3)	Mediana (Q1 - Q3)	Mediana (Q1 - Q3)	Mediana (Q1 - Q3)	Mediana (Q1 - Q3)	Mediana (Q1 - Q3)
Lactatemia (mg/dL)	2,10 (1,50 - 2,30)	2,15 (2,08 - 2,93)	1,00	2,40 (1,80 - 2,80)	1,90 (1,40 - 2,13)	0,03	0,09	0,03
Glicemia (mg/dL)	98,00 (88,00 - 113,00)	91,50 (84,75 - 101,00)	0,81	89,00 (86,00 - 98,00)	97,00 (84,75 - 108,5)	0,37	0,22	0,34
TAG (mg/dL)	140,40 (111,80 - 165,50)	178,00 (164,00 - 253,8,5)	0,13	124,0 (107,00 - 146,00)	87,00 (83,75 - 93,75)	0,03	0,11	<0,01
CO (mg/dL)	216,50 (203,80 - 262,30)	219,50 (201,50 - 266,50)	0,21	208,0 (199,50 - 221,80)	200,50 (182,50 - 227,80)	0,81	0,15	0,09
LDL (mg/dL)	134,80 (122,00 - 158,60)	138,00 (118,80 - 166,00)	0,31	122,0 (93,25 - 133,20)	124,00 (99,40 - 137,80)	0,15	0,31	0,15
HDL (mg/dL)	50,00 (42,00 - 66,00)	49,00 (46,00 - 62,00)	0,44	51,00 (45,75 - 59,00)	51,00 (50,00 - 55,00)	0,60	0,93	0,62
CPK (U/L)	51,00 (39,00 - 63,00)	70,50 (58,50 - 76,50)	0,13	56,00 (53,00 - 69,00)	72,00 (64,50 - 81,00)	0,44	0,16	0,20
PCR (mg/dL)	2,15 (1,15 - 2,77)	1,50 (1,20 - 1,80)	0,50	2,35 (2,05 - 3,07)	2,00 (1,55 - 2,45)	0,05	0,84	0,31

TAG – triacilglicerol; CO – colesterol total; LDL – Lipoproteína de baixa densidade; HDL – Lipoproteína de alta densidade; CPK – creatinina fosfoquinase; PCR – proteína C reativa. *Comparação pareada entre T0 e T15. †Comparação entre controle e Hi-n3 no T0. ‡Comparação entre controle e Hi-n3 no T15.

A Figura 7 mostra a proliferação de linfócitos ao longo das 72h de permanência das células em cultivo para de ambos os grupos nos T0 e T15, na ausência e presença de Con A. No contexto geral, as pacientes do GC no início (T0) tem uma capacidade de resposta que declina com 14 dias (T15), porém as suplementadas com Hi-n3 tem resposta proliferativa dos linfócitos mantenham um padrão mais elevado.

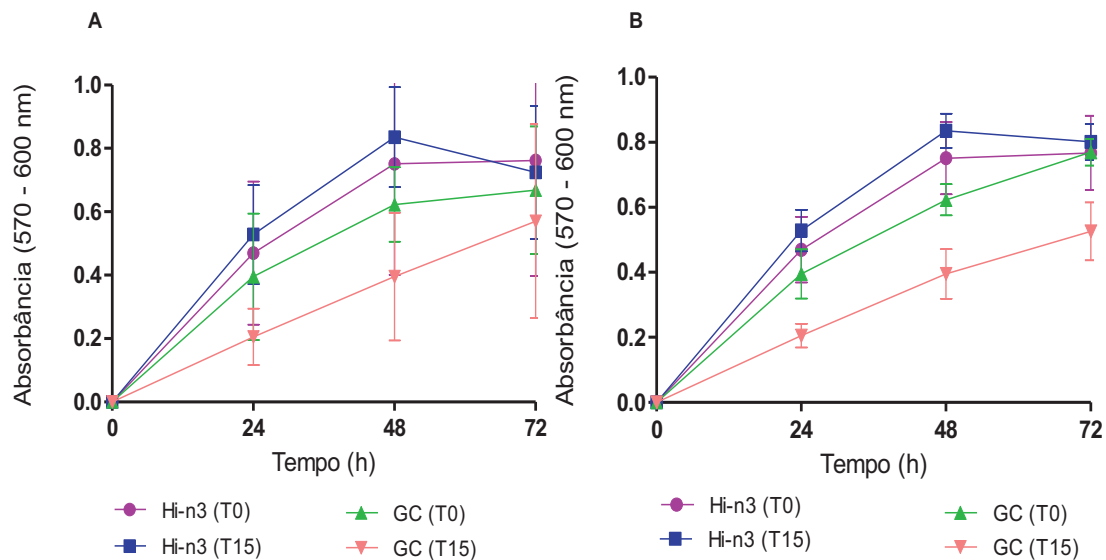


Figura 7: (A) Proliferação de linfócitos sem estímulo; (B) Proliferação de linfócitos na presença de mitógeno.

Na ausência de agente estimulante (Figura 7A) a proliferação celular em 24h não foi diferente entre ambos os grupos ($p=0,79$). O incremento da proliferação linfocitária, com e sem Con A, manteve-se em 48h e 72h (exceto Hi-n3 T15), porém também sem diferença significativa quando comparados os grupos ($p=0,28$ e $p=0,14$ respectivamente). Nestes momentos de avaliação (48h e 72h) foram observadas diferenças estatísticas (intragrupo) ($p<0,01$) a partir do plaqueamento (0h) em ambos os grupos, tanto no T0 quanto no T15.

Ao avaliar o comportamento das células na presença de agente estimulador da proliferação (Figura 7B), observou-se maior sensibilidade dos linfócitos em ambos os tempos (T0 e T15) e grupos (GC e Hi-n3) ($p<0,01$). No T15 com significância estatística em 24h ($p=0,03$ GC vs. Hi-n3) e 48h ($p=0,01$ GC vs. Hi-n3).

A população de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ obtidos do sangue das pacientes em T0 e T15 está apresentada na Figura 8. No T15 o GC teve redução na população de ambos os tipos de linfócitos, e a suplementação com Hi-n3 causou aumento, porém somente a de CD4⁺ foi significativa ($p < 0,05$), no entanto, é possível dizer que o acréscimo da população de CD8⁺ teve relevância biológica. A comparação entre os grupos no T15 mostrou diferença significativa ($p < 0,01$) tanto para CD4⁺ quanto para CD8⁺. Como houve redução simultânea na população tanto de CD4⁺, quanto de CD8⁺ no GC, e aumento no grupo Hi-n3, não houve alterações significativas em relação a razão de CD4⁺/CD8⁺ em ambos os grupos.

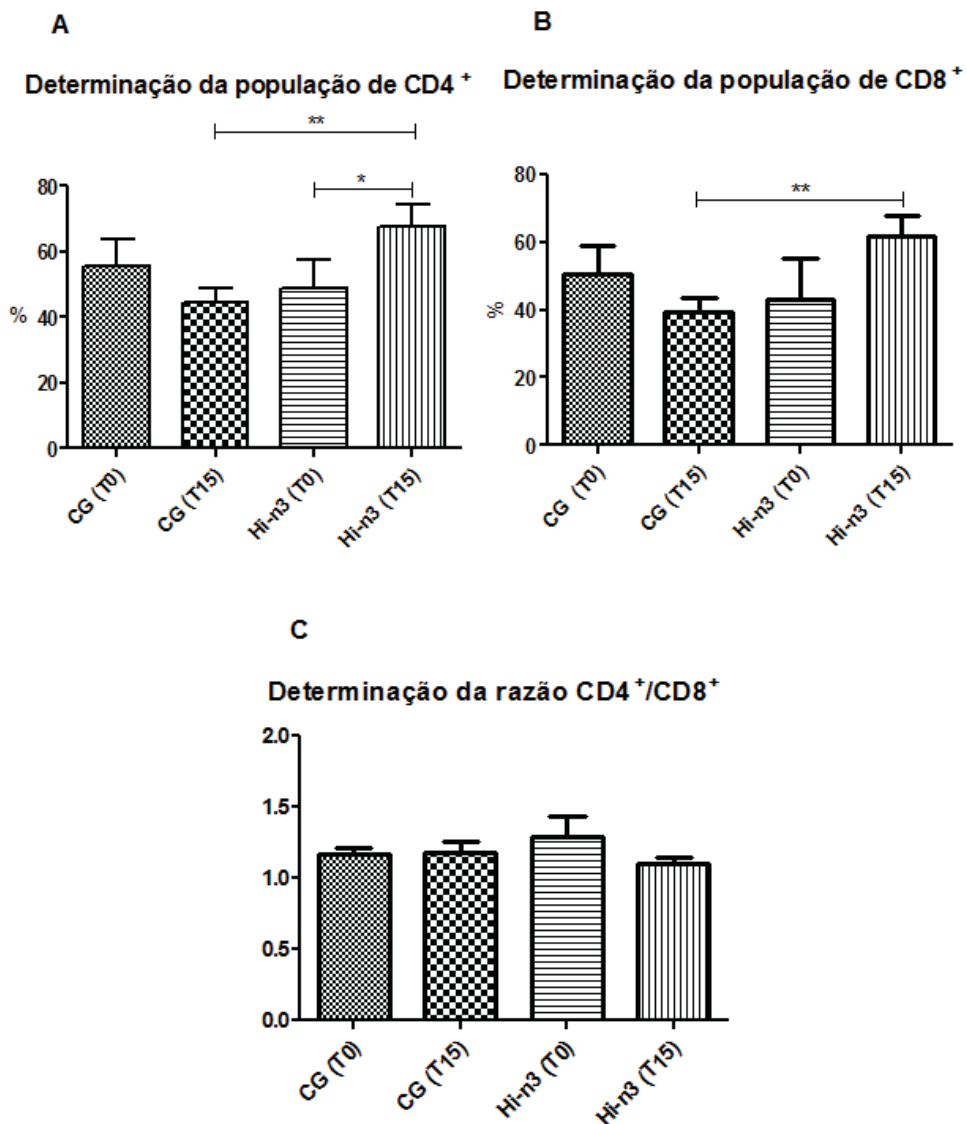


Figura 8: (A) População de linfócitos CD4⁺; (B) População de linfócitos CD8⁺; (C) Razão entre CD4⁺ e CD8⁺. Os valores de A e B indicam média do percentual de 10.000 eventos. * $p < 0,05$ (T0 vs T15). ** $p < 0,01$ (GC vs. Hi-n3).

5. DISCUSSÃO

O câncer de mama é pouco frequente antes dos 35 anos e de acordo com o Instituto Nacional de Câncer (2017) é mais incidente após os 50 anos. O presente estudo teve sua amostra constituída por pacientes com idade acima dos 35 anos, demonstrando que o grupo que aderiu à pesquisa se enquadra no perfil nacional. Ainda sobre a caracterização da amostra, considerando a classificação do IMC, todas as pacientes se enquadravam na categoria de sobrepeso ou obesas ($IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$) (WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000). A obesidade tem sido associada diretamente ao desenvolvimento e progressão do câncer de mama em decorrência do aumento de uma variedade de condições crônicas, como a inflamação (HARRIS, 2014).

O tipo histológico mais frequentemente diagnosticado nos grupos estudados foi o carcinoma ductal invasor. De acordo com a literatura, em estudo realizado com 107 pacientes com idade entre 25-75 anos com diagnóstico de câncer de mama, verificou-se que o carcinoma ductal invasor também foi o mais frequente, seguido pelo carcinoma lobular invasor (VAYSSE et al., 2017). A maioria das pacientes da pesquisa recebeu tratamento neoadjuvante, e a quimioterapia foi o mais frequente, pois de acordo com as recomendações do Consenso Internacional de Estado Atual e o Futuro da Terapia Neoadjuvante no Câncer de Mama toda a quimioterapia deve ser ofertada ao paciente antes ou após a cirurgia, ao invés de dividi-la em pré e pós-operatório (KAUFMANN et al., 2012).

No entanto, vale ressaltar que pacientes suplementados com 2 g/dia de OP, toleram mais ciclos de quimioterapia e apresentam tempo de sobrevida maior (CHAGAS et al., 2017). No entanto, esta variável não foi verificada nesta pesquisa.

Na amostra o procedimento cirúrgico mais adotado foi a quadractomia, o que corrobora com o que foi descrito por Vaysse et al., (2017) cujas cirurgias conservadoras equivaleram 71% dos casos.

As pacientes do Hi-n3, foram orientadas a ingerir as cápsulas de Hi-n3 no almoço e jantar, ou seja, refeições que continham gorduras para a estimulação da secreção de bile, garantindo absorção otimizada do n-3 (SCHUCHARDT; HAHN, 2013). A secreção da bile no momento da suplementação da cápsula é importante por promover a emulsificação da gordura em microgotas, o que permite acesso adequado

às enzimas digestivas. A enzima digestiva pancreática hidroliza a gordura em AG e monoacilgliceróis, que por sua vez são absorvidos pela mucosa intestinal. Desta forma são absorvidos pelo sistema linfático e, subsequentemente, caem na corrente sanguínea (QIN et al., 2017), fazendo suas interações tanto com o plasma, quanto com as células sanguíneas.

Uma revisão sistemática demonstrou que o percentual em massa do DHA é maior nos eritrócitos que no plasma, e de EPA são semelhantes (plasma e eritrócitos). Este fato nos levou a optar analisar a incorporação destes AGPI na série eritrocitária do sangue, tendo em vista o curto período de suplementação desta pesquisa (HU et al., 2017).

Os percentuais nos eritrócitos dos ácidos palmítico, oléico, linoléico e araquidônico se apresentaram mais presentes nos grupos no T0 devido aos três primeiros serem os AG mais comuns na dieta ocidental (LOTTEBERG, 2009) e o último ser o AGPI mais abundante nos eritrócitos (HARRIS et al., 2005). No T15, o EPA e o DHA competiram pela incorporação com o AA e outros AG da família n-6, o que explica a redução do araquidônico em 5,88% e o aumento do EPA e DHA em 1,36% e 0,81%, respectivamente.

A priori parecem mudanças sutis, embora com significância estatística. No entanto, ao se considerar que os efeitos da suplementação são dose-dependentes (WALKER et al., 2015), destaca-se que neste estudo a suplementação foi realizada por apenas 14 dias e, que possivelmente, a substituição seria proporcionalmente maior se o tempo de suplementação fosse aumentado.

Salienta-se que o AA é um AG metabolizado pela cicloxigenase (COX) e transformado numa variedade de produtos que medeiam e modulam inúmeros processos biológicos, entre eles, reações inflamatórias, angiogênese, atividade imunológica e neoplasias (WILLIAMS; MANN; DUBOIS, 2000).

Outro ponto relevante é a incorporação do EPA e do DHA nos eritrócitos em tão pouco tempo. Estudos prévios sobre a farmacocinética do n-3, demonstraram que o DHA precisou de 6 semanas de suplementação para apresentar alguma alteração na incorporação na membrana fosfolipídica dos eritrócitos (ARTERBURN; HALL; OKEN, 2006; MARANGONI et al., 1993) e o EPA foi em menor tempo (MARANGONI et al., 1993). Porém, sem descrição precisa, os autores sugeriram que estas mudanças ocorrem nas células precursoras na medula óssea (MARANGONI et al.,

1993). E, ao se levar em consideração o tempo de vida dos eritrócitos (aproximadamente 120 dias), apenas uma pequena fração desta série vermelha do sangue circulante o n-3 teria incorporado em sua membrana fosfolipídica durante a eritropoiese, o que nos induz a inferir que este não é o único mecanismo de incorporação do n-3, podendo ele ser incorporado também nas células circulantes.

Em relação ao hemograma, no GC, quando comparado o T0 e T15, houve elevação significativa, porém ainda dentro dos valores normais de referência, no número de eritrócitos, na concentração de hemoglobina, no percentual do hematócrito, e no número de leucócitos e neutrófilos, provavelmente respostas do organismo frente a presença do câncer de mama. Todavia estas mudanças não ocorreram no grupo Hi-n3, nos levando a inferir que o n-3 consegue inibir alterações nas células sanguíneas secundárias a evolução da doença.

O esquema de suplementação com n-3 proposto para este estudo reduziu pouco, mas significativamente as plaquetas das pacientes. Este mesmo resultado foi encontrado no estudo de Larson et al. (2011), o qual foi realizado com 30 pacientes, com esquema de suplementação de 28 dias 3,4 g/dia de n-3. Em outro estudo realizado com modelo animal (porcos) observou-se que no grupo suplementado com n-3 o acúmulo de plaquetas foi significativamente menor (THORWEST et al., 2000). Ainda, em estudo realizado *in vitro* demonstrou-se que a incorporação de n-3 na membrana plaquetária desencadeou uma maior sensibilidade das plaquetas (LEUNG et al., 2015).

O impacto da suplementação de n-3 sobre o organismo de pacientes em pré-operatório pode ser favorável, pois afeta a função plaquetária, sem interferir negativamente na hematologia. Isto ocorre porque o n-3 altera drasticamente a composição lipídica das plaquetas em um curto período de tempo, alterando os eventos de sinalização plaquetária (LARSON et al., 2011, 2013; LEUNG et al., 2015) da ativação da integrina mediada pelo colágeno, reduzindo aproximadamente 50% a secreção de grânulos α e a exposição à fosfatidilserina (LARSON et al., 2011, 2013), e prejudicando a fosforilação de tirosina induzida por colágeno (LARSON et al., 2011). Além da atuação sobre as plaquetas, pensando em cascata de coagulação, há evidências que comprovam que o n-3, inibe a formação de trombose (KUMA et al., 2013; LARSON et al., 2013; THORWEST et al., 2000), e modula a lesão induzida por isquemia após a trombólise espontânea ou terapêutica (THORWEST et al., 2000). Isto

ocorre pelo fato de alterar o processamento de proteínas precursoras de trombina (LARSON et al., 2013), aumentar o tempo de oclusão e acúmulo abrupto de fibrina em condições de fluxo (LARSON et al., 2013), aumentar a atividade da proteína S no sistema de anticoagulação da proteína C ativada (KUMA et al., 2013), e inibir a atividade do tromboxano (LARSON et al., 2011) por ocupar o local ativo da cicloxigenase (WERNER et al., 2017). No entanto, nenhum destes parâmetros foram avaliados em nosso estudo.

A suplementação de 4 g/dia de Hi-n3 por 14 dias reduziu a lactatemia, PCR e TAG. A redução destes parâmetros bioquímicos também foi observada em pacientes oncológicos, após suplementação de 2 g/dia de OP comum, porém somente após 30 dias ou mais (BONATTO et al., 2012; SUZUMURA et al., 2016).

Estes três parâmetros são alguns dos indicadores de caquexia presente em pacientes oncológicos (BILIR et al., 2015; SILVA, 2006), pois ela é acompanhada de extensas alterações metabólicas consistindo em aumento do gasto energético no repouso e perturbação do metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios (GRABIEC et al., 2013).

Desta forma, especula-se que existem três diferentes mecanismos inter-relacionados que podem afetar o catabolismo em curso e a via de energia protéica: primeiro, redução da ingestão de energia e do apetite; segundo, mecanismo inflamatório; e o último, fatores metabólicos sistêmicos (BILIR et al., 2015).

A hipóxia do tecido tumoral causada pelo aumento da irrigação sanguínea local ativa o fator de transcrição HIF-1 (fator 1 induzível por hipóxia), resulta em aumento na glicólise que leva ao acúmulo de lactato e a ativação do ciclo de ineficiente energia de Cori¹.

Já a perda de tecido adiposo é causada pelo aumento da indução de lipólise (ARNER; LANGIN, 2014; DAS et al., 2011; GRABIEC et al., 2013; SILVA, 2006) por fator de mobilização de lipídios e substâncias pró-inflamatórias (GRABIEC et al., 2013), o que reflete no aumento dos TAG (SILVA, 2006; TSOLI; SWARBRICK; ROBERTSON, 2016) e da PCR plasmáticos nestes pacientes.

O metabolismo celular alterado é uma característica do câncer. O aumento da demanda energética exigida pela proliferação descontrolada e crônica das células

¹ A glicose é degradada até lactato pelas células neoplásicas e o lactato é reconvertido em glicose no fígado (SILVA, 2005).

malignas, somado ao microambiente dos tumores malignos sólidos com regiões oxigenadas e outras hipóxicas, requer modificações metabólicas celulares (HANAHAN; WEINBERG, 2011; ROLAND et al., 2014). Portanto, a população de células tumorais é heterogênea, com perfis metabólicos diferentes, que variam de acordo com a disponibilidade de alguns substratos como, oxigênio, glicose e lactato (SONVEAUX et al., 2008). Com base nisto, o metabolismo do lactato possui papel crítico para a sobrevivência das células tumorais (KENNEDY; DEWHIRST, 2010; ROLAND et al., 2014; SONVEAUX et al., 2008). Nos tumores onde a disponibilidade de oxigênio é limitada e oscilante, as células sofrem adaptações metabólicas como a mudança para glicólise aeróbica – efeito de Warburg (DHUP et al., 2012; DOHERTY; CLEVELAND, 2013), que resulta em aumento da taxa de glicólise, oxi-redução do piruvato e aumento da produção de lactato (DOHERTY; CLEVELAND, 2013; MENYHÁRT et al., 2016). As células tumorais hipóxicas dependem da glicólise anaeróbica para produzir ATP, o que leva à produção de lactato (ROLAND et al., 2014) aumentando a sua taxa no organismo. Como o lactato está relacionado indiretamente com várias atividades biologicamente significantes nos tumores agindo como regulador ou mediador (DE SAEDELEER et al., 2012; DHUP et al., 2012; LU; FORBES; VERMA, 2002; SONVEAUX et al., 2012; (VÉGRAN et al., 2011) acaba favorecendo a proliferação e sobrevivência das células cancerígenas. Por isso, é possível dizer que a inibição do metabolismo do lactato representa uma abordagem terapêutica potencial para o câncer (ROLAND et al., 2014).

Um estudo realizado com 32 pacientes com câncer de mama em tratamento quimioterápico suplementadas com 4 g/dia de OP, relatou redução significativa das concentrações de lactato sérico após 60 dias de suplementação (SUZUMURA et al., 2016). Os efeitos do n-3 sobre a lactatemia não depende de longa suplementação, pois outro estudo relatou que o pico de lactatemia sérica de voluntários saudáveis, após teste de esforço em bicicleta ergométrica, estava reduzido em 52% após suplementação de 0,2 g n-3 AGPI/kg em cápsulas com 120 mg EPA e 333 mg DHA por 3 dias consecutivos (DELODDER et al., 2015). Com base nisso, devido a característica anti-catabólica e conseqüentemente anti-caquética do n-3, o uso do Hi-n3 favorece a minimização do estímulo das vias catabólicas, o que explicaria a redução na concentração de lactato no presente estudo.

Quanto ao mecanismo inflamatório envolvido na caquexia oncológica e na carcinogênese é sabido que a PCR é biomarcador de processo inflamatório sistêmico (NELSON et al., 2017), e pode estar aumentado nos casos de câncer devido à resposta inflamatória crônica desregulada presente nesta doença (AGGARWAL; GEHLOT, 2009). Desta forma, intervenções para reduzir este parâmetro podem ajudar a reduzir o risco de desenvolvimento desta doença (AGNOLI et al., 2017) e quando já instalada, pode ajudar a reduzir a caquexia associada a ela. A concentração de n-3 está inversamente relacionada com a PCR no organismo (BERSCH-FERREIRA et al., 2017; CHAGAS et al., 2017). Uma justificativa para esta relação inversa está baseada na superexpressão da COX-2 no processo inflamatório e na carcinogênese, decorrente do metabolismo do AA já relatadas no meio científico (HARRIS, 2014; WANG; DUBOIS, 2010). O bloqueio desta via, inibe a carcinogênese, tem efeitos antineoplásicos (HARRIS, 2014) e anticaquéticos (WERNER et al., 2017). Assim, uma maior demanda de n-3 no organismo gera competição com o AA, em decorrência de maior afinidade da COX-2 pela família n-3, a produção de eicosanoides pró-inflamatórios fica inibida, servindo como substrato alternativo para a COX e lipoxigenase, resultando em substratos anti-inflamatórios, as resolvinas e protectinas (BARBALHO et al., 2011; GREENE et al., 2011; MASON; CHEN; THOMPSON, 2010; WERNER et al., 2017). É válido ressaltar que, estas mudanças nas cascatas inflamatórias causadas pela suplementação com n-3 não é unanimidade, pois quando testada em adultos saudáveis sem processo inflamatório ativo, não foi encontrada redução da PCR (MULDOON et al., 2015). Na pesquisa, não encontramos estudos com Hi-n3 em pacientes oncológicos, o único encontrado analisou o efeito da suplementação com 2 cápsulas (Hi-n3)/dia em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico, e seus resultados também mostraram redução na PCR em relação ao controle (BORGES et al., 2016). Todavia, eles não tiveram o mesmo objetivo que o nosso estudo ao utilizar o Hi-n3 no lugar de OP comum, pois a suplementação realizada no estudo foi por 12 semanas.

As concentrações de lactato e a PCR tem efeito significativo sobre o tempo de sobrevida dos pacientes oncológicos. E mais, o aumento das concentrações séricas da PCR é um preditor de evolução da caquexia (BILIR et al., 2015).

Recente metanálise de ensaios clínicos randomizados concluiu que a suplementação com n-3 reduz as concentrações de TAG séricos (ZHANG et al.,

2016), isto ocorre devido à combinação de redução na síntese hepática de TAG e maior depuração deles na circulação (HARRIS et al., 2008). Entretanto, de acordo com a Associação Americana de Endocrinologistas Clínicos e o Colégio Americano de Endocrinologia (JELLINGER et al., 2017) pacientes com hipertriacilglicerolemia (>500 mg/dL) devem ser suplementados com 2 a 4 g/dia de OP n-3 como tratamento. Já a atualização do Consenso de 2016 para Terapias para Redução do LDL-colesterol no gerenciamento de risco de doença cardiovascular aterosclerótica não indica a suplementação com n-3 para pacientes com hipertriacilglicerolemia severa.

Como pode ser observado na Tabela 5, os três parâmetros bioquímicos avaliados relacionados à caquexia oncológica não estavam tão alterados devido as alterações evidentes serem encontradas em tumores mais avançados, o que era um dos critérios de exclusão da pesquisa.

Outro ponto sobre os parâmetros bioquímicos é que a suplementação com Hi-n3 não reduziu o colesterol total sérico (Tabela 1), no entanto, houve uma redução significativa do ácido mirístico (Tabela 3) que é um preditor do colesterol sérico (BRADBURY et al., 2010), nos levando a pensar que um tempo de suplementação um pouco maior também teria reduzido este parâmetro.

Ambos grupos (GC e Hi-n3) apresentaram proliferação de linfócitos, o que indica que neste momento não havia comprometimento do sistema imunológico, porém o grupo Hi-n3 apresentou maior proliferação quando desafiado por agente mitógeno (Con A). Os linfócitos devem se adaptar a uma ampla gama de estressores ambientais como parte de seu desenvolvimento normal, durante os quais eles sofrem um processo drástico de remodelação metabólica (BUCK; O'SULLIVAN; PEARCE, 2015).

O metabolismo e a função do sistema imunológico estão intimamente ligados, mudanças no metabolismo das células e dos níveis do sistema determinam aumento ou supressão desse sistema (COE; KISHORE; MARELLI-BERG, 2014). É evidente que processos diversos se integram com sinalização de linfócitos, regulação de genes e função para moldar o metabolismo dos linfócitos (BUCK; O'SULLIVAN; PEARCE, 2015), dentre eles a incorporação de AGPI. Os AGPI podem exercer nas células vasta influência na estrutura e funcionalidade das células, como alterações no comportamento celular pela incorporação nas membranas afetando o conteúdo da camada fosfolipídica (colesterol) e atividade de receptores, servindo como substrato

para metabólitos de sinalização, afetando processos celulares, como proliferação e apoptose (ABEL; RIEDEL; GELDERBLUM, 2014), além de interferir no estado de ativação, exposição a antígeno, sinais inflamatórios e nutrientes microambientais disponíveis (BUCK; O'SULLIVAN; PEARCE, 2015).

As dietas de n-3 estão associadas a um menor percentual de linfócitos ativados após a estimulação, mas com uma resposta proliferativa aumentada aos mitógenos (ROBINSON; FIELD, 1998). No entanto, sem uma quantidade mínima de AG essenciais não ocorre proliferação de linfócitos, uma vez que, na ausência destas moléculas na célula, seu crescimento fica prejudicado, sendo possível afirmar que a síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA) de linfócitos é estimulada quando apresenta baixas concentrações de AG essenciais e inibida com altas concentrações (KARSTEN; SCHÄFER; SCHAUDER, 1994), fato este que deve ter ocorrido no presente estudo, pois com o tempo de suplementação curto provavelmente as concentrações de n-3 neste estágio não tinham se elevado a ponto de provocar inibição.

O mecanismo pelo qual o n-3 altera a proliferação dos linfócitos ainda não está claro. Algumas hipóteses aventam um possível mecanismo de ação pela síntese de eicosanóides, em que a ingestão de EPA diminuiria a produção dos eicosanóides derivados do AA e aumentaria as quantidades de derivados de EPA que possui ação regulatória quando administrado em baixas doses (BETIATI et al., 2013; CALDER, 2009; CALDER; KEW, 2002).

Estudos mais recentes apontam que o DHA geralmente suprime a função de linfócitos devido incorporação que modifica sua composição molecular: a organização dos *rafts* (microdomínios), e no domínio não-*raft* e, conseqüentemente, no agrupamento proteico da membrana fosfolipídica, alterando assim, a sua função celular (SHAIKH, 2010, 2012).

O presente estudo mensurou a população de linfócitos T auxiliares e citotóxicos, e a sua razão. A suplementação com Hi-n3 causou aumento na população de CD4⁺ e CD8⁺ no sangue periférico de mais de 35%, enquanto que o GC mostrou redução próxima a 20%. Este comportamento dos linfócitos T também foi observado num trabalho realizado com pacientes recém diagnosticadas com câncer de mama e suplementadas por 30 dias com 2 g/dia de EPA + DHA. Os autores atribuem a redução da população dos linfócitos no grupo placebo ao mecanismo de produção de

substâncias supressoras do sistema das células tumorais para burlar o sistema de defesa do organismo e a manutenção da população de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e sua proporção no grupo suplementado, ao efeito adaptativo da imunidade causado pelo n-3 (PAIXÃO et al., 2017).

O n-3 têm a habilidade de modular a resposta imunitária (PESTKA et al., 2014; SHINTO et al., 2011), e o mecanismo pelo qual ele altera a proliferação das células T ainda não está totalmente elucidado. Um possível mecanismo de ação é pela síntese de eicosanóides, gerados a partir do metabolismo do EPA e do DHA, mediadores lipídicos com ação regulatória, ou seja, menos inflamatórios, incorporados na membrana plasmática das células T. Esta membrana é formada por uma bicamada de fosfolipídios fluidos com *rafts* lipídicos, compostos de colesterol e esfingolipídios, onde estão localizadas as principais proteínas de transdução de sinais, favorecendo ou alterando as funções de sinalização transmembranar, com consequente diminuição da produção dos eicosanóides derivados do AA (pró-inflamatórios), e perda membranária de um fenótipo de células T pró-inflamatórias (BETIATI et al., 2013; CALDER, 2009; CALDER; KEW, 2002; MCMURRAY; BONILLA; CHAPKIN, 2011).

Na sinapse imunológica com as células apresentadoras de antígenos, estes sítios de contato servem como plataformas para a migração de receptores de células T, receptores de co-ativação e mediadores de sinalização celular, suprimindo a transdução de sinal e a translocação/ativação nuclear de fatores de transcrição (FAN et al., 2004; FRIEDL; DEN BOER; GUNZER, 2005; GEYEREGGER et al., 2005; KIM et al., 2009; SHAIKH, 2010; YOG et al., 2010).

Os efeitos do n-3 sobre o sistema imunitário são dose dependentes, ou seja, altas doses de AG produzem ações imunoinibitórias (CALDER, 1995), enquanto doses baixas possuem ação imunoestimulatória (CALDER, 1995; CALDER; KEW, 2002). Como a suplementação com Hi-n3 foi de apenas 14 dias, pode-se dizer que mesmo se dobrando a quantidade de cápsulas utilizada em estudos prévios de nosso grupo, aparentemente não alcançou concentrações que seriam inibitórias, o que justifica o comportamento da população dos linfócitos nesta pesquisa.

Além dos efeitos do n-3 sobre o sistema imunológico propriamente dito, é importante enfatizar que o desenvolvimento e a metástase dos cânceres mamários são influenciados, e até mesmo conduzidos por células do sistema imunológico e mediadores inflamatórios associados ao microambiente do tumor. O equilíbrio entre a

imunidade antitumoral e a inflamação promotora de tumores determina se o tumor irá progredir, ser controlado, ou eliminado.

A inflamação induzida durante a progressão natural do tumor é provavelmente uma das principais razões pelas quais o sistema imunológico não pode restringir indefinidamente a expansão do câncer de mama (JIANG; SHAPIRO, 2014), portanto a ação do n-3 como agente anti-inflamatório pode ser promissora para os pacientes com esta doença. Outro ponto a salientar é a apoptose induzida por células imunológicas (JIANG; SHAPIRO, 2014; KAEWKANGSADAN et al., 2016). Mas, devido à falta de acesso a peça tumoral, não foi possível analisar o tipo de morte celular para o presente estudo.

No câncer de mama a função imunitária difere entre os fenótipos ou subtipos biológicos (ER negativo, HER-2 negativo e triplonegativo) (LIU; MA, 2014; MIYAN et al., 2016). As células T CD4⁺ são reguladores críticos das respostas imunitárias (GUTRANTIEN et al., 2013), e os linfócitos citotóxicos CD8⁺, tem atividade antitumoral clinicamente significativa. Os linfócitos livres no sangue representam apenas 2% do armazenamento total de linfócitos e são facilmente afetados por muitos fatores fisiológicos e patológicos (JIA et al., 2014). No entanto, quando infiltrados no tecido tumoral, vários estudos relatam que o CD8⁺ pode ser considerado um marcador de bom prognóstico para a sobrevivência de pacientes com câncer de mama (CHEN et al., 2014; JIANG; SHAPIRO, 2014; MAO et al., 2016), embora Li et al. (2014) não tenham encontrado esta associação. Devido ao pequeno número da amostra, nosso estudo não correlacionou o fenótipo dos TU das pacientes com a população de células T circulantes no sangue.

Durante diferentes estágios do desenvolvimento do câncer, o sistema imunológico pode identificar e destruir as células neoplásicas, ou promover seu crescimento (JIANG; SHAPIRO, 2014; MAO et al., 2016). Com base neste cenário, terapias visando o sistema imunológico emergiram como uma modalidade de tratamento para o câncer de mama e as estratégias imunoterapêuticas baseadas nos efeitos do n-3 são examinadas em modelos pré-clínicos e clínicos e se mostram favoráveis.

Como a cirurgia é a principal modalidade de tratamento de pacientes com câncer de mama e, como este procedimento induz à imunomodulação, com resposta pró-inflamatória e leucocitose (BOOMSMA et al., 2010), um equilíbrio adaptativo

imunitário pode ajudar a prevenir a imunossupressão pós-cirurgia e riscos como a disseminação de tumores em a circulação (GOLDFARB; BEN-ELIYAHU, 2006).

O EPA se incorpora na membrana dos eritrócitos e das plaquetas após 24 horas de suplementação a atinge seu pico no quarto dia (DELODDER et al., 2015). Fato que nos leva a afirmar que o início da suplementação com n-3, mesmo que poucos dias antes da cirurgia poderá acarretar efeitos benéficos para pacientes oncológicos. Entretanto, alterações cardiovasculares foram citadas 20 min após infusão endovenosa (DELODDER et al., 2015) o que demonstra que os efeitos do n-3 não são exclusivamente baseados na incorporação da membrana plasmática de estruturas do organismo, incentivando pesquisas futuras.

É válido ressaltar que a suplementação deve ser feita diariamente, pois seus efeitos dependem da oferta diária do n-3 e não somente da dose final (BROWNING et al., 2014). O estado nutricional é um fator que contribui para a competência do sistema imunológico (CALDER; KEW, 2002). O n-3 pode potencialmente promover direta ou indiretamente imunomodulação ou atuar diretamente nas células neoplásicas (BETIATI et al., 2013). Compreender a regulação metabólica que interfere no sistema imunológico adaptativo e como a disponibilidade de nutrientes e os fatores microambientais influenciam sua função fornecerão uma visão mais aprofundada sobre a biologia das células imunitárias e podem levar a novas abordagens para o tratamento do câncer (BUCK; O'SULLIVAN; PEARCE, 2015). Todavia, ainda estamos em processo de análise da função dos linfócitos, para verificar as citocinas pró- e anti-inflamatórias na circulação e do cultivo de linfócitos fator-alfa de necrose tumoral – TNF- α e interleucina 10 – IL-10, interleucina 1 beta – IL-1 β , e interleucina 6 – IL-6.

Nossa pesquisa não objetivou verificar as vias de sinalização para constatar a atuação direta sobre as células neoplásicas, mas sugerimos como estudos futuros identificar o tipo de morte celular no tecido tumoral, se por necrose ou apoptose. Outro ponto que foi identificado e também como sugestão para estudos futuros seria analisar os efeitos deste esquema de suplementação no pós-operatório.

6. CONCLUSÃO

Após 14 dias de suplementação com Hi-n3 foi demonstrado incorporação dos AGPI n-3 pelo organismo, com conseqüente redução da concentração sanguínea de lactato, TAG e PCR, aumento da proliferação linfocitária e das populações de CD4⁺ e CD8⁺.

Com base nestes achados, sugerimos a suplementação com 4 g/dia de Hi-n3 para mulheres com câncer de mama em pré-operatório.

REFERÊNCIAS

ABEL, S.; RIEDEL, S.; GELDERBLOM, W. C. A. Dietary PUFA and cancer. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 73, n. 3, p. 361–367, 2014.

ACS - AMERICAN CANCER SOCIETY. **Breast Cancer Signs and Symptoms**. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/about/breast-cancer-signs-and-symptoms.html>>. Acesso em: 3 fev. 2017a.

ACS - AMERICAN CANCER SOCIETY. **Hormone Therapy for Breast Cancer**. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/treatment/hormone-therapy-for-breast-cancer.html>>. Acesso em: 3 fev. 2017b.

ACS - AMERICAN CANCER SOCIETY. **Chemotherapy for Breast Cancer**. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/treatment/chemotherapy-for-breast-cancer.html>>. Acesso em: 3 fev. 2017c.

ACS - AMERICAN CANCER SOCIETY. **Surgery for Breast Cancer**. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/treatment/surgery-for-breast-cancer.html>>. Acesso em: 3 fev. 2017d.

AGGARWAL, B. B.; GEHLOT, P. Inflammation and cancer: how friendly is the relationship for cancer patients? **Current Opinion in Pharmacology**, v. 9, n. 4, p. 351–369, 2009.

AGNOLI, C. et al. Biomarkers of inflammation and breast cancer risk: a case-control study nested in the EPIC-Varese cohort. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 12708, 2017.

ALEXANDER, D. D. et al. Meta-Analysis of Long-Chain Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids (LC ω -3PUFA) and Prostate Cancer. **Nutrition and Cancer**, v. 67, n. 4, p. 543–554, 2015.

AREM, H. et al. Omega-3 and omega-6 fatty acid intakes and endometrial cancer risk in a population-based case-control study. **European Journal of Nutrition**, v. 52, n. 3, p. 1251–1260, 2013.

ARNER, P.; LANGIN, D. Lipolysis in lipid turnover, cancer cachexia, and obesity-induced insulin resistance. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 25, n. 5, p. 255–262, 2014.

ARTERBURN, L.; HALL, E.; OKEN, H. Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 83, n. 6(S), p. 1467S–1476S, 2006.

BARBALHO, S. M. et al. Papel dos ácidos graxos ômega 3 na resolução dos processos inflamatórios. **Medicina**, v. 44, n. 3, p. 234–40, 2011.

BELO, S. R. B. et al. Walker-256 tumor growth is inhibited by the independent or associative chronic ingestion of shark liver and fish oil: A response linked by the

increment of peritoneal macrophages nitrite production in Wistar rats. **Nutrition Research**, v. 30, n. 11, p. 770–776, 2010.

BENSON, J. R.; DUMITRU, D.; MALATA, C. M. Oncologic safety of conservative mastectomy in the therapeutic setting. **Gland surgery**, v. 5, n. 1, p. 37–46, 2016.

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

BERSCH-FERREIRA, Â. C. et al. Association between polyunsaturated fatty acids and inflammatory markers in patients in secondary prevention of cardiovascular disease. **Nutrition**, v. 37, n. 2016, p. 30–36, 2016.

BERSCH-FERREIRA, Â. C. et al. Association between polyunsaturated fatty acids and inflammatory markers in patients in secondary prevention of cardiovascular disease. **Nutrition**, v. 37, n. 2017, p. 30–36, 2017.

BETIATI, D. D. S. B. et al. Effects of omega-3 fatty acids on regulatory T cells in hematologic neoplasms. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v. 35, n. 2, p. 119–25, 2013.

BILIR, C. et al. The prognostic role of inflammation and hormones in patients with metastatic cancer with cachexia. **Medical oncology (Northwood, London, England)**, v. 32, n. 3, p. 56, 2015.

BOFF, R. A. et al. (EDS.). **Compendio de Mastologia: abordagem multidisciplinar**. Caxias do Sul: Lorigraf, 2015.

BONATTO, S. J. R. et al. Lifelong exposure to dietary fish oil alters macrophage responses in Walker 256 tumor-bearing rats. **Cellular Immunology**, v. 231, n. 1–2, p. 56–62, 2004.

BONATTO, S. J. R. et al. Fish oil supplementation improves neutrophil function during Cancer chemotherapy. **Lipids**, v. 47, n. 4, p. 383–389, 2012.

BOOMSMA, M. F. et al. Breast cancer surgery-induced immunomodulation. **Journal of Surgical Oncology**, v. 102, n. 6, p. 640–648, 2010.

BORGES, M. C. et al. Ácidos Graxos Ômega-3, Estado Inflamatório E Marcadores Bioquímicos De Pacientes Com Lúpus Eritematoso Sistêmico: Estudo Piloto. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 2016.

BOUGNOUX, P. et al. Improving outcome of chemotherapy of metastatic breast cancer by docosahexaenoic acid: a phase II trial. **British journal of cancer**, v. 101, n. 12, p. 1978–1985, 2009.

BOUGNOUX, P. et al. Fatty acids and breast cancer: Sensitization to treatments and prevention of metastatic re-growth. **Progress in Lipid Research**, v. 49, n. 1, p. 76–86, 2010.

BOYLE, P. et al. Diabetes and breast cancer risk: a meta-analysis. **British Journal of Cancer**, v. 107, n. 9, p. 1608–1617, 2012.

BRADBURY, K. E. et al. The serum fatty acids myristic acid and linoleic acid are better predictors of serum cholesterol concentrations when measured as molecular percentages rather than as absolute concentrations. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 91, n. 2, p. 398–405, 2010.

BROWNING, L. M. et al. Compared with Daily, Weekly n-3 PUFA Intake Affects the Incorporation of Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid into Platelets and Mononuclear Cells in Humans. **Journal of Nutrition**, v. 144, n. 5, p. 667–672, 2014.

BRUCE, J. et al. Chronic preoperative pain and psychological robustness predict acute postoperative pain outcomes after surgery for breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 107, n. 6, p. 937–946, 2012.

BUCK, M. D.; O'SULLIVAN, D.; PEARCE, E. L. T cell metabolism drives immunity. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 212, n. 9, p. 1345–1360, 2015.

CALDER, P. C. Fatty acids, dietary lipids and lymphocyte functions. **Biochem Soc Trans**, v. 23, n. 2, p. 302–309, 1995.

CALDER, P. C. Fatty acids and immune function: relevance to inflammatory bowel diseases. **International reviews of immunology**, v. 28, n. 6, p. 506–534, 2009.

CALDER, P. C. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: Nutrition or pharmacology? **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 75, n. 3, p. 645–662, 2013.

CALDER, P. C.; KEW, S. The immune system: a target for functional foods? **British Journal of Nutrition**, v. 88, n. S2, p. S165, 2002.

CANDELARIA, R. P. et al. Incremental Cancer Detection of Locoregional Restaging with Diagnostic Mammography Combined with Whole-Breast and Regional Nodal Ultrasound in Women with Newly Diagnosed Breast Cancer. **Academic Radiology**, v. 24, n. 2, p. 191–199, 2017.

CATANUTO, G.; ROCCO, N.; NAVA, M. B. Surgical decision making in conservative mastectomies. **Gland Surgery**, v. 5, n. 1, 2, p. 69–74, 2016.

CAVALHEIRO, J. A. et al. Sexual function and chemotherapy in postmenopausal women with breast cancer. **BMC Women's Health**, v. 12, n. 1, p. 28, 2012.

CHAGAS, T. R. et al. Oral fish oil positively influences nutritional-inflammatory risk in patients with haematological malignancies during chemotherapy with an impact on long-term survival: A randomised clinical trial. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, p. 1–12, 2017.

CHEN, Z. et al. Intratumoral CD8⁺ cytotoxic lymphocyte is a favorable prognostic marker in node-negative breast cancer. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014.

CHIN, L.; GRAY, J. W. Translating insights from the cancer genome into clinical practice. **Nature**, v. 452, n. 7187, p. 553–563, 2008.

COE, D. J.; KISHORE, M.; MARELLI-BERG, F. Metabolic regulation of regulatory T cell development and function. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. NOV, p. 1–6, 2014.

COMBA, A. et al. Effect of ω -3 and ω -9 fatty acid rich oils on lipoxygenases and cyclooxygenases enzymes and on the growth of a mammary adenocarcinoma model. **Lipids in health and disease**, v. 9, p. 112, 2010.

CORSETTO, P. A et al. Effects of n-3 PUFAs on breast cancer cells through their incorporation in plasma membrane. **Lipids in health and disease**, v. 10, n. 1, p. 73, 2011.

CURI, R.; POMPEIA, C.; MIYASAKA, C. K.; ARAÚJO, J. P. **Entendendo a gordura - os ácidos graxos**. 1. ed. São Paulo: Manole, 2002.

CURTIS, C. et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. **Nature**, 2012.

DARBY, S. et al. Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: Meta-analysis of individual patient data for 10 801 women in 17 randomised trials. **The Lancet**, v. 378, n. 9804, p. 1707–1716, 2011.

DAS, S. K. et al. Adipose Triglyceride Lipase Contributes to Cancer-Associated Cachexia. **Science**, v. 333, n. 6039, p. 233–238, 2011.

DAVIES, E. L. Breast cancer. **Medicine**, v. 40, n. 1, p. 5–9, 2011.

DEANTONIO, L. et al. Hypofractionated radiotherapy after conservative surgery for breast cancer: analysis of acute and late toxicity. **Radiation oncology (London, England)**, v. 5, n. 1, p. 112, 2010.

DELODDER, F. et al. Incorporation and washout of n-3 PUFA after high dose intravenous and oral supplementation in healthy volunteers. **Clinical Nutrition**, v. 34, n. 3, p. 400–408, 2015.

DHUP, S. et al. Multiple biological activities of lactic acid in cancer: influences on tumor growth, angiogenesis and metastasis. **Current pharmaceutical design**, v. 18, n. 10, p. 1319–30, 2012.

DJURIC, Z. et al. Lifestyle factors associated with serum N-3 fatty acid levels in breast cancer patients. **Breast**, v. 21, n. 4, p. 608–611, 2013.

DOHERTY, J.; CLEVELAND, J. Targeting lactate metabolism for cancer therapeutics. **The Journal of clinical investigation**, v. 123, n. 9, p. 3685–3692, 2013.

EGEBERG, R. et al. Meat consumption, N-acetyl transferase 1 and 2 polymorphism and risk of breast cancer in Danish postmenopausal women. **European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)**, v. 17, n. 1, p. 39–47, 2008.

FAN, Y.-Y. et al. Dietary Docosahexaenoic Acid Suppresses T Cell Protein Kinase C Lipid Raft Recruitment and IL-2 Production. **J. Immunol.**, v. 173, n. 10, p. 6151–6160, 2004.

FERRARO, D. A et al. Inhibition of triple-negative breast cancer models by combinations of antibodies to EGFR. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 5, p. 1815–20, 2013.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for isolation and purification of total lipid from animal tissue. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, p. 497–509, 1957.

FRIEDL, P.; DEN BOER, A. T.; GUNZER, M. Tuning immune responses: Diversity and adaptation of the immunological synapse. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 7, p. 532–545, 2005.

GERBER, M. Omega-3 fatty acids and cancers: a systematic update review of epidemiological studies. **British Journal of Nutrition**, v. 107, n. S2, p. S228–S239, 2012.

GEYEREGGER, R. et al. Polyunsaturated fatty acids interfere with formation of the immunological synapse. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 77, n. 5, p. 680–688, 2005.

GHIASVAND, R. et al. Postmenopausal breast cancer in Iran; risk factors and their population attributable fractions. **BMC Cancer**, v. 12, n. 1, p. 414, 2012.

GLEISSMAN, H.; JOHNSEN, J. I.; KOGNER, P. Omega-3 fatty acids in cancer, the protectors of good and the killers of evil? **Experimental Cell Research**, v. 316, n. 8, p. 1365–1373, 2010.

GLICKMAN, M. S.; SAWYERS, C. L. **Converting cancer therapies into cures: Lessons from infectious diseases** CellElsevier Inc., , 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.015>>

GLOBOCAN 2012 (IARC). **Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide**. Disponível em:

<http://globocan.iarc.fr/old/burden.asp?selection_pop=24076&Text-p=Brazil&selection_cancer=3152&Text-c=Breast&pYear=8&type=0&window=1&submit=Execute>. Acesso em 14 de janeiro de 2017.

GOBBI, H. Classificação dos tumores da mama: atualização baseada na nova classificação da Organização Mundial da Saúde de 2012. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 6, p. 463–474, 2012.

- GOLDFARB, Y.; BEN-ELIYAHU, S. Surgery as a risk factor for breast cancer recurrence and metastasis: mediating mechanisms and clinical prophylactic approaches. **Breast disease**, v. 26, p. 99–114, 2006.
- GRABIEC, K. et al. Systemic and local mechanisms leading to cachexia in cancer. **Postępy higieny i medycyny doświadczalnej (Online)**, v. 67, p. 1397–409, 2013.
- GREENE, E. R. et al. Regulation of inflammation in cancer by eicosanoids. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, v. 96, n. 1–4, p. 27–36, 2011.
- GU-TRANTIEN, C. et al. CD4+ follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. **The Journal of clinical investigation**, v. 123, n. 7, p. 1–20, 2013.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.
- HARDMAN, W. E. et al. Dietary Walnut Suppressed Mammary Gland Tumorigenesis in the C(3)1 TAG Mouse. **Nutrition and cancer**, v. 63, n. 6, p. 960–970, 2011.
- HARRIS, H. R.; BERGKVIST, L.; WOLK, A. Alcohol intake and mortality among women with invasive breast cancer. **British journal of cancer**, v. 106, n. 3, p. 592–5, 2012.
- HARRIS, R. B. et al. Fatty acid composition of red blood cell membranes and risk of squamous cell carcinoma of the skin. **Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention**, v. 14, n. 4, p. 906–912, 2005.
- HARRIS, R. E. Cyclooxygenase-2 (cox-2) and the inflammogenesis of cancer. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 10, n. 5, p. 677–692, 2014.
- HARRIS, W. S. et al. Omega-3 fatty acids and coronary heart disease risk: Clinical and mechanistic perspectives. **Atherosclerosis**, v. 197, n. 1, p. 12–24, 2008.
- HICKEY, B. et al. Partial breast irradiation for early breast cancer. **The Cochrane database of systematic reviews**, n. 7, p. CD007077, 2016.
- HIRSCH, H. A.; ILIOPOULOS, D.; STRUHL, K. Metformin inhibits the inflammatory response associated with cellular transformation and cancer stem cell growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 3, p. 972–7, 2013.
- HOUVENAEGHEL, G. et al. Is breast conservative surgery a reasonable option in multifocal or multicentric tumors? **World Journal of Clinical Oncology**, v. 7, n. 2, p. 234, 2016.
- HU, X. F. et al. Conversion ratios of n-3 fatty acids between plasma and erythrocytes: a systematic review and meta-regression. **British Journal of Nutrition**, v. 117, n. 8, p. 1162–1173, 2017.
- HUANG, Q.; LUO, Y.; ZHANG, Q. Breast ultrasound image segmentation: a survey.

International Journal of Computer Assisted Radiology and Surgery, 2017.

INNIS, S. M. Perinatal biochemistry and physiology of long-chain polyunsaturated fatty acids. **Journal of Pediatrics**, v. 143, n. 4 Suppl, p. S1--8, 2003.

INNIS, S. M. Dietary (n-3) Fatty Acids and Brain Development 1 , 2. n. 13, p. 855--859, 2007.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **INCA - CÂNCER - Tipo - Mama**. Disponível em:

<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/cancer_mama>. Acesso em: 26 maio. 2015.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativa de câncer no Brasil 2016**.

Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/tabelaestados.asp?UF=BR>>.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Câncer de Mama**. Disponível em:

<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/cancer_mama++>. Acesso em: 15 out. 2017.

JELLINGER, P. S. et al. American Association of Clinical Endocrinologists and American College of Endocrinology Guidelines for Management of Dyslipidemia and Prevention of Cardiovascular Disease. **Endocrine Practice**, v. 23, n. Supplement 2, p. 1--87, 2017.

JIA, Y. et al. Levels of lymphocyte subsets in peripheral blood prior treatment are associated with aggressive breast cancer phenotypes or subtypes. **Medical Oncology**, v. 31, n. 6, p. 981, 2014.

JIANG, X.; SHAPIRO, D. J. The Immune System and Inflammation in breast cancer. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 382, n. 1, p. 673--682, 2014.

JOHNSON-THOMPSON, M. C.; GUTHRIE, J. Ongoing research to identify environmental risk factors in breast carcinoma. **Cancer**, v. 88, n. 5 Suppl, p. 1224--1229, 2000.

KAEWKANGSADAN, V. et al. Crucial Contributions by T Lymphocytes (Effector, Regulatory, and Checkpoint Inhibitor) and Cytokines (TH1, TH2, and TH17) to a Pathological Complete Response Induced by Neoadjuvant Chemotherapy in Women with Breast Cancer. **Journal of Immunology Research**, v. 2016, p. 4--7, 2016.

KARSTEN, S.; SCHÄFER, G.; SCHAUDER, P. Cytokine production and DNA synthesis by Human peripheral Lymphocytes in response to Palmitic, Stearic, Oleic, and Linoleic acid. **Journal of Cellular Physiology**, v. 161, n. 1, p. 15--22, 1994.

KAUFMANN, M. et al. Recommendations from an International Consensus Conference on the Current Status and Future of Neoadjuvant Systemic Therapy in Primary Breast Cancer. **Annals of Surgical Oncology**, v. 19, n. 5, p. 1508--1516, 2012.

KENNEDY, K. M.; DEWHIRST, M. W. Tumor metabolism of lactate: the influence and therapeutic potential for MCT and CD147 regulation. **Future Oncology**, v. 6, n. 1, 2010.

KIM, J. et al. Fatty fish and fish omega-3 fatty acid intakes decrease the breast cancer risk: a case-control study. **BMC cancer**, v. 9, p. 216, 2009.

KOUMOUTSAKOS, P.; PIVKIN, I.; MILDE, F. **The Fluid Mechanics of Cancer and Its Therapy** *Annual Review of Fluid Mechanics*, 2012.

KUMA, H. et al. Beneficial effect of EPA (20:5 n-3 PUFA) on preventing venous thromboembolism: A rat tail thrombosis model experiment. **Thrombosis Research**, v. 131, n. 1, p. 107–108, 2013.

LARSON, M. K. et al. Omega-3 fatty acids modulate collagen signaling in human platelets. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 84, n. 3–4, p. 93–98, 2011.

LARSON, M. K. et al. Exogenous modification of platelet membranes with the omega-3 fatty acids EPA and DHA reduces platelet procoagulant activity and thrombus formation. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 304, n. 3, p. C273-9, 2013.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. São Paulo: Artmed, 2014.

LEUNG, S. L. et al. Modulation of platelet membrane function via exogenous lipid moiety exposure alters platelet responsiveness to shear. **Proceedings of the Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, EMBS**, v. November, p. 266–269, 2015.

LI, Y. et al. Relationship between IL-10 expression and prognosis in patients with primary breast cancer. **Tumor Biology**, v. 35, n. 11, p. 11533–11540, 2014.

LIU, J.; MA, D. The Role of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids in the Prevention and Treatment of Breast Cancer. **Nutrients**, v. 6, n. 11, p. 5184–5223, 2014.

LLAVERIAS, G. et al. Role of cholesterol in the development and progression of breast cancer. **American Journal of Pathology**, v. 178, n. 1, p. 402–412, 2011.

LOTTENBERG, A. M. P. Importância da gordura alimentar na prevenção e no controle de distúrbios metabólicos e da doença cardiovascular. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 53, n. 5, p. 595–607, 2009.

MAJEWSKI, J. M. et al. **Qualidade de vida em mulheres submetidas à mastectomia comparada com aquelas que se submeteram à cirurgia conservadora: uma revisão de literatura** *Ciência & Saúde Coletiva*, 2012.

MANDAL, C. C. et al. miR-21 is targeted by omega-3 polyunsaturated fatty acid to regulate breast tumor CSF-1 expression. **Carcinogenesis**, v. 33, n. 10, p. 1897–

1908, 2012.

MANNING, A. T.; SACCHINI, V. S. Conservative mastectomies for breast cancer and risk-reducing surgery: the Memorial Sloan Kettering Cancer Center experience. **Gland surgery**, v. 5, n. 1, p. 55–62, 2016.

MAO, Y. et al. The prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer: A systematic review and meta-analysis. **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, p. 1–13, 2016.

MARANGONI, F. et al. Changes of 11-3 and 17-6 fatty acids in plasma and circulating cells of normal subjects , after prolonged administration of 20:5 (EPA) and 22:6 (DHA) ethyl esters and prolonged washout. v. 1210, p. 55–62, 1993.

MASON, J. K.; CHEN, J.; THOMPSON, L. U. Flaxseed oil-trastuzumab interaction in breast cancer. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 8–9, p. 2223–2226, 2010.

MATOS, J. C. DE; PELLOSO, S. M.; CARVALHO, M. D. D. B. Prevalência de fatores de risco para o câncer de mama no município de Maringá , Paraná. **Revista Latino-Americano Enfermagem**, v. 18, n. 3, p. 57–64, 2010.

MCMURRAY, D. N.; BONILLA, D. L.; CHAPKIN, R. S. n-3 Fatty acids uniquely affect anti-microbial resistance and immune cell plasma membrane organization. **Chemistry Physics Lipids**, v. 164, n. 7, p. 626–635, 2011.

MENEZES, R. F. DE et al. Alcohol consumption and the risk of cancer in Brazil: A study involving 203,506 cancer patients. **Alcohol**, v. 49, n. 7, p. 747–51, 2015.

MENYHÁRT, O. et al. Guidelines for the selection of functional assays to evaluate the hallmarks of cancer. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1866, n. 2, p. 300–319, 2016.

MIYAN, M. et al. Differential tumor infiltration by T-cells characterizes intrinsic molecular subtypes in breast cancer. **Journal of Translational Medicine**, v. 14, n. 1, p. 227, 2016.

MOURA, M. A. D. S. et al. The magnitude of the association between smoking and the risk of developing cancer in Brazil: a multicenter study. **BMJ open**, v. 4, n. 2, p. 1–8, 2014.

MULDOON, M. F. et al. Fish oil supplementation does not lower C-reactive protein or interleukin-6 levels in healthy adults. **Journal of Internal Medicine**, v. 279, p. 98–109, 2015.

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

NASCIMENTO, T. G. DO; SILVA, S. R. DA; MACHADO, A. R. M. **Auto-exame de**

mama: significado para pacientes em tratamento quimioterápico *Revista Brasileira de Enfermagem*, 2009.

NELSON, S. H. et al. The Association of the C-Reactive Protein Inflammatory Biomarker with Breast Cancer Incidence and Mortality in the Women's Health Initiative. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 26, n. 7, 2017.

NIK-ZAINAL, S. et al. Mutational processes molding the genomes of 21 breast cancers. **Cell**, v. 149, n. 5, p. 979–993, 2012.

PAIXÃO, E. M. DA S. et al. The effects of EPA and DHA enriched fish oil on nutritional and immunological markers of treatment naïve breast cancer patients: a randomized double-blind controlled trial. **Nutrition Journal**, v. 16, n. 1, p. 71, 2017.

PATTERSON, R. E. et al. Marine Fatty Acid Intake Is Associated with Breast Cancer Prognosis 1 , 2. **The Journal of Nutrition**, p. 201–206, 2011.

PEROU, C. M. *+ et al. Molecular portraits of human breast tumours. [Letter]. **Nature**, v. 406, n. august, p. 747–752, 2000.

PESTKA, J. J. et al. Comparative effects of n-3, n-6 and n-9 unsaturated fatty acid-rich diet consumption on lupus nephritis, autoantibody production and CD4+ T cell-related gene responses in the autoimmune NZBWF1 mouse. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, 2014.

PINNARÒ, P. et al. Accelerated hypofractionated radiotherapy as adjuvant regimen after conserving surgery for early breast cancer: interim report of toxicity after a minimum follow up of 3 years. **Journal of experimental & clinical cancer research : CR**, v. 29, p. 9, 2010.

PINTO, J. A. et al. Fish oil supplementation in F1 generation associated with naproxen, clenbuterol, and insulin administration reduce tumor growth and cachexia in Walker 256 tumor-bearing rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 15, n. 6, p. 358–365, 2004.

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

QIN, Y. et al. A novel self-micro-emulsifying delivery system (SMEDS) formulation significantly improves the fasting absorption of EPA and DHA from a single dose of an omega-3 ethyl ester concentrate. **Lipids in Health and Disease**, v. 16, n. 1, p. 204, 2017.

RAKHA, E. A.; GREEN, A. R. Molecular classification of breast cancer: what the pathologist needs to know. **Pathology**, p. 1–9, 2016.

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

RODACKI, L. F. et al. Fish-oil supplementation enhances the effects of strength training in elderly women. **Journal of Clinical Nutrition**, n. 3, p. 428–436, 2012.

ROLAND, C. L. et al. Cell surface lactate receptor GPR81 is crucial for cancer cell survival. v. 74, n. 18, p. 5301–5310, 2014.

SAMPAIO, H. A. DE C. et al. Influência do Tipo de Terapia Antineoplásica sobre Marcadores Antropométricos e Dietéticos em Mulheres Portadoras de Câncer de Mama Influence of the Type of Cancer Treatment Performed on the Body Composition and Diet of Women with Breast Cancer. **Câncer de Mama, Tratamento, Nutrição**, v. 58, n. 2, p. 223–230, 2012.

SCHUCHARDT, J. P.; HAHN, A. Bioavailability of long-chain omega-3 fatty acids. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 89, n. 1, p. 1–8, 2013.

SCZANIECKA, A. K. et al. **Dietary intake of specific fatty acids and breast cancer risk among postmenopausal women in the VITAL Cohort**, 2013.

SHAH, C. et al. Management of Ductal Carcinoma In Situ of the Breast. **JAMA Oncology**, v. 2, n. 8, p. 1083, 2016.

SHAIKH, S. R. Diet-induced docosahexaenoic acid non-raft domains and lymphocyte function. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 82, n. 4–6, p. 159–164, 2010.

SHAIKH, S. R. Biophysical and Biochemical Mechanisms by Which Dietary N-3 Polyunsaturated Fatty Acids from Fish Oil Disrupt Membrane Lipid Rafts. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, n. 2, p. 101–105, 2012.

SHINTO, L. et al. The Effects of Omega-3 Fatty Acids on Matrix Metalloproteinase-9 Production and Cell Migration in Human Immune Cells: Implications for Multiple Sclerosis. **Autoimmune Diseases**, v. 2011, p. 1–6, 2011.

SIGNORI, C. et al. Chemoprevention of breast cancer by fish oil in preclinical models: Trials and tribulations. **Cancer Research**, v. 71, n. 19, p. 6091–6096, 2011.

SILVA, M. P. N. DA. Síndrome da anorexia-caquexia em portadores de câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52, n. 1, p. 59–77, 2006.

SONVEAUX, P. et al. Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 12, p. 3930–3942, 2008.

STEHR, S. N.; HELLER, A. R. Omega-3 fatty acid effects on biochemical indices following cancer surgery. **Clinica Chimica Acta**, v. 373, n. 1–2, p. 1–8, 2006.

STEPHENS, P. J. et al. The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. **Nature**, 2012.

SUZUKI, R. et al. Dietary lignans and postmenopausal breast cancer risk by

oestrogen receptor status: a prospective cohort study of Swedish women. **British journal of cancer**, v. 98, n. 3, p. 636–640, 2008.

SUZUMURA, D. N. et al. Fish Oil Supplementation Enhances Pulmonary Strength and Endurance in Women Undergoing Chemotherapy. **Nutrition and Cancer**, v. 68, n. 6, p. 935–942, 2016.

THIÉBAUT, A. C. M. et al. Dietary intakes of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids and the risk of breast cancer. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 124, n. 4, p. 924–931, 2009.

THORWEST, M. et al. Dietary fish oil reduces microvascular thrombosis in a porcine experimental model. **Thrombosis Research**, v. 99, n. 2, p. 203–208, 2000.

TSOLI, M.; SWARBRICK, M. M.; ROBERTSON, G. R. Lipolytic and thermogenic depletion of adipose tissue in cancer cachexia. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 54, p. 68–81, 2016.

VAUGHAN, V. C.; HASSING, M.-R.; LEWANDOWSKI, P. A. Marine polyunsaturated fatty acids and cancer therapy. **British journal of cancer**, v. 108, n. 3, p. 486–92, 2013.

VAYSSE, C. et al. Inflammation of mammary adipose tissue occurs in overweight and obese patients exhibiting early-stage breast cancer. **npj Breast Cancer**, v. 2017, n. May, p. 1–9, 2017.

VAZQUEZ, F. et al. Retrospective analysis of breast cancer prognosis among young and older women in a Brazilian cohort of 738 patients, 1985-2002. **Oncology Letters**, v. 12, p. 4911–4924, 2016.

WALKER, C. G. et al. The Pattern of Fatty Acids Displaced by EPA and DHA Following 12 Months Supplementation Varies between Blood Cell and Plasma Fractions. **Nutrients**, v. 7, p. 6281–6293, 2015.

WANG, D.; DUBOIS, R. N. Eicosanoids and cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 10, n. 3, p. 181–193, 2010.

WERNER, K. et al. Dietary supplementation with n-3-fatty acids in patients with pancreatic cancer and cachexia: marine phospholipids versus fish oil - a randomized controlled double-blind trial. **Lipids in Health and Disease**, v. 16, n. 1, p. 104, 2017.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity : Preventing and Managing the Global Epidemic. 2000.

WILLIAMS, C. S.; MANN, M.; DUBOIS, R. N. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. **Oncogene**, v. 18, n. 55, p. 7908–7916, 2000.

YOG, R. et al. n-3 Polyunsaturated Fatty Acids Suppress Mitochondrial Translocation to the Immunologic Synapse and Modulate Calcium Signaling in T Cells. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 10, p. 5865–5873, 2010.

ZHANG, H. et al. A mechanism underlying the effects of polyunsaturated fatty acids on breast cancer. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 30, n. 3, p. 487–494, 2012a.

ZHANG, M.; SUN, S.; MESUROLLE, B. The Impact of Pre-Operative Breast MRI on Surgical Waiting Time. **Plos One**, v. 12, n. 1, p. e0169756, 2017.

ZHANG, N. et al. Huaier aqueous extract inhibits proliferation of breast cancer cells by inducing apoptosis. **Cancer Science**, v. 101, n. 11, p. 2375–2383, 2010.

ZHANG, P.-H. et al. Increased risk of cancer in patients with type 2 diabetes mellitus: A retrospective cohort study in China. **BMC Public Health**, v. 12, n. 1, p. 567, 2012b.

ZHANG, Y. Y. et al. Efficacy of omega-3 polyunsaturated fatty acids supplementation in managing overweight and obesity: A meta-analysis of randomized clinical trials. **The journal of nutrition, health & aging**, p. 1–6, 2016.

APÊNDICE 1

ESTADIAMENTO CLÍNICO DO CÂNCER DE MAMA E SUA RESPECTIVA CLASSIFICAÇÃO TMN

Estadiamento Clínico	TNM
0	T _{is} N0 M0
I	T1 a T2 N0 M0
IIa	T3 N0 M0
IIb	T4 N0 M0
IIIa	T1 a T2 N1 M0
IIIb	T3 a T4 N1 M0
IIIc	Qualquer T N2 M0
IV	Qualquer T Qualquer N M1

Is – in situ

CLASSIFICAÇÃO QUANTO AOS RECEPTORES HORMONAIIS

Grupo	ER	PR	HER-2	Gradação
Luminal A	+	+	-	Baixa
Luminal B	+	+	+	Intermediária
HER-2	-	-	+	Alta
Basal ou Triplo negativo	-	-	-	Alta

ER – receptor de estrogênio; PR receptor de progesterona; HER-2 – receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2.

Fonte: Perou et al., 2000.

APÊNDICE 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Essas informações estão sendo fornecidas para participação da voluntária

no estudo “**SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE EM PACIENTES COM CANCER DE MAMA E SEUS EFEITOS SOBRE A FUNCIONALIDADE DE LINFÓCITOS E NEOPLASIAS MALIGNAS DE MAMA *IN VITRO***”, que visa investigar os efeitos da suplementação com óleo de peixe sobre a funcionalidade de linfócitos e células neoplásicas de mama em pacientes com câncer de mama. O estudo tempo um tempo previsto de execução de novembro de 2014 à abril de 2017.

A sua participação no referido estudo será no sentido de responder questionários relevantes à pesquisa os quais verificarão seus dados pessoais e clínicos, verificação de hábitos alimentares para identificação do consumo de alimentos ricos em ácido graxo ômega-3, e ainda, dados referentes a patologias prévias, comorbidades, medicações em uso, e tratamentos realizados.

Durante o exame de rotina do próprio setor de ginecologia e mama do HEG como protocolo pré-operatório e um dia antes da sua cirurgia será realizada coleta de sangue (será retirada uma amostra de 10ml de sangue com seringa e agulha por profissionais treinados) por punção periférica da veia do antebraço.

Nesta pesquisa haverá dois grupos dentre os quais você será sorteado para participar, o grupo suplementado e o grupo não suplementado.

Se você for sorteado para o grupo não suplementado, você não receberá as cápsulas de Hiomega-3 e seguirá rotina do serviço de ginecologia e mama. Caso você seja sorteado para o grupo suplementado, você receberá as cápsulas de Hiomega-3 (óleo de peixe) fornecidas gratuitamente pela Naturalis® (Naturalis Nutrição & Farma Ltda). Cada cápsula contém 1000mg de óleo de peixe. E deverá ingerir as cápsulas duas após o almoço e duas após o jantar juntamente com líquido, totalizando 4 g/dia de óleo de peixe. É importante manter seus hábitos alimentares durante o estudo para que não haja alterações na ingestão dietética, inclusive manter-se sem a ingestão de peixes de águas salgadas frias e profundas (ex.: salmão, agulhão, arenque, anchova, linguado, congrio, sardinha, enguia, bacalhau). Poderão ocorrer alguns efeitos colaterais que podem surgir ao ingerir uma dose superior a 12g/dia (o que não é o

propósito desta pesquisa). Esses efeitos incluem: vômitos, mau hálito, eructação, azia, náuseas, diarreia, desconforto abdominal e sangramentos nasais, pois pode impedir a coagulação do sangue aumentando a chance de sangramento. Altas doses de óleo de peixe também podem aumentar os níveis de colesterol. Caso isso ocorra serão dados os suportes necessários para que volte ao seu estado normal. Não há riscos previstos para os participantes dessa pesquisa.

Caso se faça necessário suporte médico ou de qualquer outro profissional devido eventos adversos ligados às avaliações e/ou suplementação alimentar com o óleo de peixe os pesquisadores fornecerão todo o suporte.

Para ambos os grupos, após a cirurgia, o pesquisador analisará uma parte da peça cirúrgica retirada para verificar se houve algum comportamento atípico celular do que é relatado na literatura científica.

Não há benefício direto para o participante, no entanto, trata-se de uma pesquisa experimental testando a hipótese de que a suplementação alimentar com óleo de peixe possa melhorar a funcionalidade de linfócitos e células neoplásicas de mama em pacientes com câncer de mama. Contudo, somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. As principais investigadoras são a Dra. Juliana Carvalho Schleder Fone: (42) 8811-8996 e Dra. Doris Naoko Suzumura: (41) 9644-0697, podendo entrar em contato sempre que sentir necessidade. Caso tenha também alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), no HEG – Rua Dr. Ovande do Amaral, 201 – Bairro Jardim das Américas – Fone: (41) 3218-0300.

Enfatizamos que é garantida a sua liberdade para retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar deste estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade do tratamento na Instituição.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as de outros participantes, não sendo divulgada a identificação de nenhum participante.

É de direito do participante, ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

É compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo **“SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE EM PACIENTES COM CANCER DE MAMA E SEUS EFEITOS SOBRE A FUNCIONALIDADE DE LINFÓCITOS E NEOPLASIAS MALIGNAS DE MAMA *IN VITRO*”**.

Eu discuti com a Dra. Juliana Carvalho Schleder sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

Assinatura do Pesquisador

Data ____ / ____ / ____

APÊNDICE 3**FICHA DE AVALIAÇÃO**

Nº do Prontuário: _____

Data: ___/___/_____

Iniciais do participante: _____ Idade: _____

Endereço: _____

Telefone: (____) _____ (____) _____

Grau de escolaridade: _____

Ocupação: _____

Comorbidades: _____

Medicações em uso: _____

Patologias prévias: _____

Tratamentos prévios: _____

Tabagismo? () S () N

Se sim: carga tabágica _____/dia

Alcoolismo? () S () N

Se sim: carga alcóolica _____/dia

Estatura: _____ Massa corpórea: _____ IMC: _____

Tipo de alimentação:

() Peixe; () Algas marinhas; () Crustáceos; () Brócolis; () Espinafre; () Azeite de oliva; () Nozes;

() Rúcula; () Folha de mostarda; () Óleo de fígado de bacalhau; () Semente de chia; () Óleo de linhaça; () Semente de linhaça.

Frequência e quantidade de ingesta dos alimentos:

Performance Status de Karnofsky: _____

Condição	%	Comentários
Apto para realizar suas atividades normais e trabalhar. Não necessita de nenhum cuidado pessoal.	100	Normal; sem queixas; sem evidência da doença.
	90	Apto para realizar suas atividades normais; poucos sinais e sintomas da doença.
	80	Realiza suas atividades normais com esforço; alguns sinais ou sintomas da doença.
Inapto para trabalhar. Apto para viver em casa e cuidar da maior parte de suas necessidades pessoais. Necessita de assistência em graus variáveis.	70	Cuida de si mesmo; inapto para realizar suas atividades normais ou executar trabalho ativo.
	60	Requer assistência ocasional, mas está apto para cuidar da maior parte das suas necessidades.
	50	Requer assistência considerável e cuidados médicos freqüentes.
Inapto para cuidar de si mesmo. Requer o equivalente ao cuidado hospitalar ou institucional. A doença pode estar progredindo rapidamente.	40	Incapacitado; requer cuidado especial e assistência.
	30	Severamente incapaz; está indicada a hospitalização, porém a morte não é iminente.
	20	A hospitalização é necessária, muito doente, necessita de tratamento de suporte ativo.
	10	Moribundo; processo fatal progredindo rapidamente.
	0	Morte.

Diagnóstico patológico: _____

Tipo

histológico: _____

TMN: _____

Estadiamento clínico: _____

Tratamentos: () Quimioterapia () Radioterapia () Cirurgia () Hormonioterapia

Protocolo de quimioterapia que está sendo realizado: _____

Ciclo de quimioterapia: _____

Atualmente pratica atividade física? Sim () Não ()

Se sim: Qual? _____

Frequência _____

Quando iniciou? _____

Houve diminuição da execução das atividades de vida diária? Sim () Não ()

Se sim: Há quanto tempo? _____

Por quê? _____

Realiza algum tipo de tratamento fisioterapêutico? Sim () Não ()

Se sim: Qual? _____

Há quanto tempo? _____

Por quê? _____

Avaliação laboratorial

<u>PARÂMETRO</u>	<u>AVALIAÇÃO INICIAL</u>	<u>AVALIAÇÃO FINAL</u>
Hemograma completo:		
<i>Eritrograma</i>		
Hemácias		
Hemoglobina		
Hematócrito		
<i>Leucograma</i>		
Leucócitos		
Neutrófilos		
Segmentados ou bastões		
Linfócitos		
Monócitos		
Eosinófilos		
Basófilos		
Contagem de Plaquetas		
Lactatemia:		
Glicemia:		
Triacilglicerol:		
Colesterol Total:		
Lipoproteína de baixa intensidade:		
Lipoproteína de alta intensidade:		

ANEXO 1

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



ERASTO GAERTNER

COMBATER O CÂNCER COM HUMANISMO, CIÊNCIA E AFETO



ONAD

R. Dr. Ovande do Amaral, 201 - Jardim das Américas - Curitiba/PR/Brasil
 CEP 81.520-060 - Fone: 55 41 3361-5000 - www.erastogaertner.com.br

Curitiba, 23 de Setembro de 2014.

À
 Ilma Sr^a
Juliana Carvalho Schleder
 Pesquisador Responsável

Prezado (a) Pesquisador,

Informo que o projeto de pesquisa intitulado: **“Suplementação com óleo de peixe em pacientes com câncer de mama e seus efeitos sobre a funcionalidade de linfócitos e neoplasias malignas de mama in vitro”**, número de protocolo **P.P. nº 2319**, foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e ficou **APROVADO**.

Atenciosamente,

Coordenador do CEP
Dr. Jordan Zanetti Silva

Dr. Jordan Zanetti Silva
 Coordenador do Comitê de
 Ética em Pesquisa
 HEG - Hospital de Especialidades
 - Curitiba - PR - 14.457

Membros do CEP:

Camila Brandão Polakowski – Nutricionista
 Claudia Ely de Oliveira e Silva – Assistente Social
 César Costa - Fisioterapeuta
 Dinarte Orlandi – Estatístico
 Edenice de Oliveira Santana – Enfermeira
 Jeanine Marie Nardin – Farmacêutica
 Jordan Zanetti Silva – Médico
 Ítala Villaça Duarte – Psicóloga
 José Carlos Wiederkehr – Adm. de Empresas
 Márcia Bobak – Enfermeira
 Marina Lopes – Nutricionista

Patrícia Blasco Silva - Nutricionista
 Olair Carlos Beltrame – Farmacêutico
 Ignez de Oliveira Ise – membro da comunidade
 Albino Surek – suplente membro da comunidade
 Priscila L. Leite Silva – Farmacêutica
 José Claudio Casali da Rocha – Médico
 Emerson Czachorowski - Farmacêutico
 Luiza Souza Rodrigues - Bioquímica

ANEXO 2

FICHA TÉCNICA DO PRODUTO – CÁPSULA DE HIOMEGA 3

Informações Técnicas

Os **Ácidos Graxos Poli-insaturados Omega-3** não são produzidos pelo corpo humano, e por isso, devem ser obtidos por meio da alimentação. O Ácido Graxo Eicosapentaenoico (EPA) é precursor de substâncias anti-inflamatórias (prostaglandinas E3). Além disso, a forma dos ácidos graxos em Triglicerídeos (TG), naturalmente presente nos peixes de água gelada, garante um aproveitamento 70% superior quando comparado à forma dos ácidos graxos em Etil Ester (EE), presentes em outros óleos de peixe.

APRESENTAÇÃO Embalagens com 60 cápsulas de 1000mg

COMPOSIÇÃO Cada cápsula de 1000mg contém um concentrado de Óleo de Peixe rico em Ácidos Graxos Poli-insaturados Omega-3 com alta concentração de EPA, na forma TG.

COMPOSIÇÃO DA CÁPSULA Gelatina Farmacêutica, Glicerina e Água.

MODO DE USAR Adultos: aconselha-se a ingestão de uma cápsula, duas vezes ao dia, antes das principais refeições.

CUIDADOS DE CONSERVAÇÃO Conservar ao abrigo de luz, calor e umidade.

Registro no Ministério da Saúde 4.1480.0006.001-4

INFORMAÇÃO NUTRICIONAL		
Porção 2.0g (2 cápsulas)		
QUANTIDADE POR PORÇÃO		% VD(*)
Valor Energético	18kcal = 76kJ	1
Carboidratos	0g	0
Proteínas	0g	0
Gorduras Totais	2,0g	4
Gorduras Saturadas	0g	0
Gorduras Trans	0g	**
Gordura Poliinsaturadas:	1,6g	**
Ácido Eicosapentaenoico	1,1g	**
Ácido Docosahexaenoico	0,2g	**
Fibra Alimentar	0g	0
Sódio	0mg	0
Vitamina E	4,0mg	40

* % Valores Diários com base em uma dieta de 2000kcal ou 8400KJ. Seus valores diários podem ser maiores ou menores, dependendo das suas necessidades energéticas. ** VD não estabelecido.