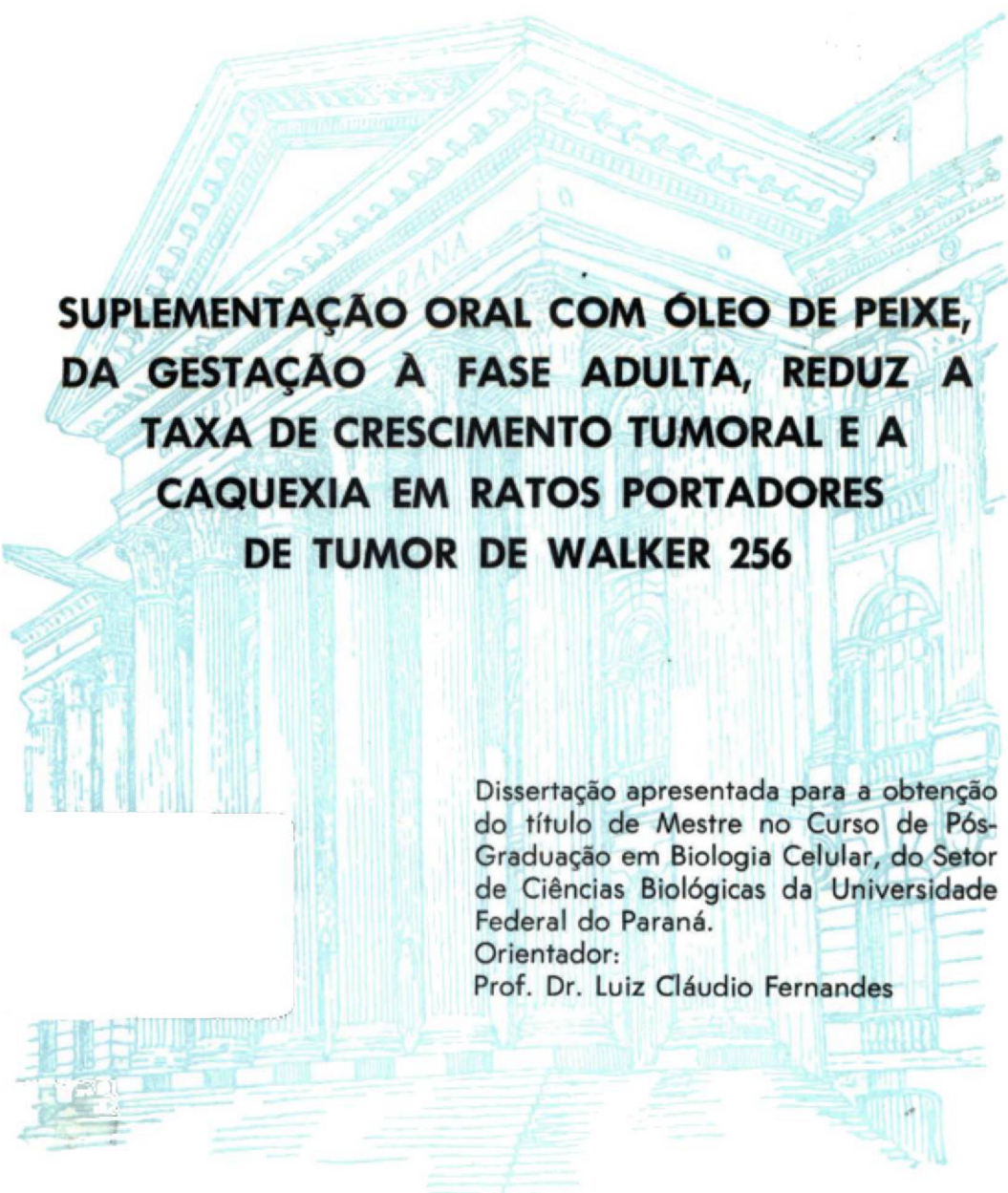


VALÉRIA GIGLIO TOGNI



**SUPLEMENTAÇÃO ORAL COM ÓLEO DE PEIXE,
DA GESTAÇÃO À FASE ADULTA, REDUZ A
TAXA DE CRESCIMENTO TUMORAL E A
CAQUEXIA EM RATOS PORTADORES
DE TUMOR DE WALKER 256**

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador:

Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes

CURITIBA

2002

VALÉRIA GIGLIO TOGNI

**SUPLEMENTAÇÃO ORAL COM ÓLEO DE PEIXE,
DA GESTAÇÃO À FASE ADULTA, REDUZ A
TAXA DE CRESCIMENTO TUMORAL E A
CAQUEXIA EM RATOS PORTADORES
DE TUMOR DE WALKER 256**

Dissertação apresentada para a obtenção
do título de Mestre no Curso de Pós-
Graduação em Biologia Celular, do Setor
de Ciências Biológicas da Universidade
Federal do Paraná.

Orientador:
Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes

CURITIBA


2002

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná

PARECER


A Comissão Examinadora de Dissertação de Mestrado "EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO ORAL CRÔNICA COM ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS (n-3) SOBRE O CRESCIMENTO TUMORAL E A SÍNDROME DA CAQUEXIA EM RATOS PORTADORES DE TUMOR DE WALKER 256", de autoria da Pós-Graduanda Valéria Giglio Togni, e composta pelos Professores: Dr Luiz Cláudio Fernandes (como Orientador e Presidente); Dr. Célio Kenji Miyasaka (USP); Dr. Silvio Sanches Veiga; (UFPR). Atribui individualmente as seguintes notas: Dr. Luiz Cláudio Fernandes, nota 100 (DEZ); Dr. Célio Kenji Miyasaka, nota 100 (DEZ.); e Dr. Silvio Sanches Veiga, nota 10,0 (DEZ). De acordo com o Regimento interno do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, a candidata foi: Aprovada com a nota 100 (DEZ), para a devida publicação o trabalho deve sofrer as modificações sugeridas. Em Curitiba, 01 de Março de 2002.



Dr. Luiz Cláudio Fernandes



Dr. Célio Kenji Miyasaka



Dr. Silvio Sanches Veiga

Este trabalho é dedicado aos meus pais, ao Cezar e a Vera.

AGRADECIMENTOS

Ao professor **Dr. Luiz Cláudio Fernandes**, pela paciência com que orientou os passos deste trabalho.

À equipe do Laboratório de Metabolismo Celular do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Paraná, pelo profissionalismo e dedicação

À professora **Dr^a Carolina Arruda de Oliveira Freire** pela confiança e por ser um exemplo a ser seguido

SUMÁRIO

RESUMO	xi
ABSTRACT.....	xiii
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	18
MATERIAL E MÉTODOS	19
RESULTADOS	30
DISCUSSÃO.....	52
CONCLUSÃO	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

RESUMO

Caquexia é a principal causa da morte das pessoas portadoras de tumor. O tumor de Walker 256 (W256) foi utilizado para estudar desenvolvimento da caquexia no câncer. Os mecanismos responsáveis pelo seu estabelecimento são desconhecidos porém, fatores circulantes produzidos pelo tumor e células do sistema imunológico e alterações metabólico-hormonais têm sido implicados. Alguns relatos mostraram que, ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 (PUFA n-3) podem ser agentes de quimioprevenção contra crescimento de tumor. Neste estudo, nós investigamos o efeito da exposição longa aos PUFAs n-3 sobre o crescimento tumoral e caquexia. Ratas Wistar após desmamar foram suplementadas com óleo de peixe, rico em PUFA n-3 ou óleo de coco (saturado), até idade adulta. E então, foram acasaladas com machos Wistar mantidos apenas com alimentação normal de laboratório. Ao longo da gestação e lactação, as fêmeas continuaram recebendo suplementação. Após 21 dias de idade, a descendência masculina recebeu a mesma dieta e suplementação das mães. A metade dos animais, após de 90 dias de idade, foi inoculada no flanco direito, com suspensão estéril de 2×10^7 células do W256 contidas em 1mL de tumor ascítico obtido de outro rato. No controle foi injetado salina 0.9%. Depois de 14 dias, os animais foram sacrificados por decapitação. O peso do corpo foi regularmente medido durante o período e o peso do tumor determinado no sacrifício. O sangue foi coletado e no soro foram mensuradas as concentrações de: lactato, glicose e lipídios. Fígado, músculos sóleo e gastrocnêmio foram dissecados e seus conteúdos de glicogênio determinados imediatamente. Um experimento separado, que usou o mesmo procedimento alimentar, foi utilizado para estudar a sobrevivência dos animais após 30 dias de inoculação do tumor. A suplementação com diferentes ácidos graxos não modificaram nenhum dos parâmetros bioquímicos dos animais não portadores de W256 quando comparados ao controle. Os portadores de tumor apresentaram hipoglicemia, hiperlaticidemia, redução de conteúdo de fígado e músculo, peso de corpo (17,8%) e hipertrigliceridemia quando comparados aos do controle, sendo que o peso do tumor foi de 19,4g. A suplementação com ácido graxo saturado não modificou esses parâmetros e a massa tumoral foi 17,5g. A suplementação com PUFA n-3 reduziu os valores de laticidemia, recuperou a glicemia e o glicogênio hepático em 92%, reduziu os valores de triglicerídeos e aumento colesterol-HDL. A massa do tumor foi 7,9g. Nossos resultados mostram que, o uso prolongado de PUFA n-3 pôde reduzir crescimento tumoral e caquexia, talvez por induzir alterações no metabolismo da célula tumoral. Além de aumentar a taxa sobrevivência destes animais.

ABSTRACT

Cachexia is the main cause of death in tumor-bearing people. Walker 256 tumor has been utilised to study cancer cachexia development. The mechanisms responsible for the establishment of cancer-cachexia are unknown, however, factors circulating produced by the tumor and immune cells had been implicated, as well as metabolic-hormone alterations. Some reports showed that polyunsaturated fatty acids omega-3 (PUFA n-3) are chemopreventive agents against tumor growth. In this study, we investigated the effect of long term exposure to the PUFAs n-3 on tumor growth and cachexia. Female rats, after weaning, were supplemented with fish oil, rich in PUFA n-3 or coconut oil (saturated), until adult age. They were mated with male Wistar had fed on normal laboratory chow. Throughout gestation and lactation the females continued to received fatty acid supplementation. After weaning (age 21 days) the male offspring received the same diet and supplementation as their mothers. After 90 days of age half of each group were injected in the right flank with a sterile suspension of 2×10^7 Walker tumor cells in one mL, obtained from an ascitic tumor-bearing rat. In the control were injected saline 0.9%. After a further 14 days, the animals were killed by decapitation using a quillotine. Body weight was regularly measured during the period and tumor weight was determined at sacrifice. At sacrifice blood was collected and serum prepared to measure the concentrations of glucose lactate and lipids. Liver and soleus and gastrocnemius muscles were dissected out and used immediately to measure glycogen content. A separate experiment using an identical feeding procedure was conducted in order to study the survival of the animals, except that rats were not sacrificed until 30 days post-tumor cell inoculation. The supplementation with different fatty acids did not change any biochemical parameter in the non-tumor bearing animals as compared to control. The tumor bearing ones showed hypoglycemia, hyperlacticidemia, reduction of content from liver and muscle, body weight (17,8%) and hypertriglyceridemia, as compared to non-tumor bearing rats. Tumor weight was 19,4g. Supplementation with saturated fatty acid did not modify these parameters and mass tumor was 17,5g. Supplementation with PUFA n-3 induced reduction of laticidemia to values, recovery of glycemia and liver glycogen stores in 92% with decrease of triacylglycerols and increase cholesterol-HDL. Tumor mass was 7,9g. Our results show that PUFA n-3, administered to long term to the animal, was able to reduce tumor growth and cachexia, possibly by inducing alterations in the tumor cell metabolism. In addition, it was able in promote increase in survival in these animals.

INTRODUÇÃO

O câncer está relacionado com distúrbios das regras fundamentais do comportamento celular nos organismos multicelulares. "As células cancerosas são definidas por duas propriedades hereditárias: (1) reproduzem-se em detrimento das normais, (2) invadem e colonizam territórios, normalmente, reservados para outras células" (ALBERTS et. al., 1997). Enquanto o padrão de crescimento do tecido normal não prejudica os tecidos vizinhos, o crescimento tumoral é peculiar, alterado ao longo do tempo, produzindo prejuízo de outros tecidos (GREENSTEIN, 1954).

Os tecidos malignos competem com o hospedeiro por nutrientes, provocando diferentes manifestações clínicas, cujas mais comuns são: astenia, anorexia, perda de peso, saciedade prematura e anemia (THEOLOGIDES, 1979). Assim, o desenvolvimento tumoral induz à debilidade do organismo hospedeiro. A anorexia e intenso catabolismo periférico caracterizam a denominada síndrome da caquexia no câncer (LAWSON et. al., 1982; THEOLOGIDES, 1979).

SÍNDROME DA CAQUEXIA

A síndrome da caquexia induzida pelo câncer resume o estado geral caótico dos indivíduos portadores de tumor, caracterizada por um conjunto de sinais e sintomas, os quais afetam a qualidade de vida e sobrevivência dos mesmos. O grau de caquexia está inversamente relacionado com o prognóstico de vida do paciente (DE WYS, 1985; HARVEY, 1979; OVERSEN, et. al., 1993b) e, está presente em dois terços dos indivíduos que morrem de câncer (ARGILES, 1999). Resultado de uma etiologia multifatorial, os mecanismos envolvidos na indução da caquexia no câncer, não são totalmente conhecidos, mas a diminuição da ingestão proteico-calórica (anorexia), impossibilitando a manutenção das reservas energéticas, é um dos achados mais freqüentes nos portadores de câncer (GIACOSA, 1996). No entanto, o fracasso na resposta dos indivíduos caquéticos ao apoio nutricional demonstrou que, o "definhamento" do portador não deva estar relacionado apenas com seu

comportamento alimentar deficiente, mas também com mudanças metabólicas ocasionadas pela presença do tumor (SAKURAI, 1998), semelhantes às aquelas observadas após trauma, sepsis, queimadura ou cirurgia e, possivelmente, induzidas por mediadores similares (BARBER, 2001)

Mediadores da caquexia

Nos últimos 20 anos, o estudo do desenvolvimento da síndrome da caquexia no câncer vem demonstrando o envolvimento de mediadores químicos capazes de promover mudanças metabólicas. Segundo alguns estudos, estes mediadores podem ser : a) humorais, como as citocinas pró-inflamatórias e proteínas de fase aguda ou b) tumorais, produtos sintetizados pelo próprio tumor (ARGILÉS, et. al., 1997; BARBER, et. al.,2001).

A elevação de algumas proteínas séricas como fibrinogênio, haptoglobina (WERNER,1979; FISCHER &GILL, 1975) e proteína -C reativa, associada à redução sérica de albumina e transferrina, são alterações bioquímicas conhecidas como "**resposta das proteínas de fase aguda**", que ocorrem devido a uma variedade de insultos orgânicos como, inflamações, infecções e câncer (BAUMANN and GAULDIE, 1994). A resposta das proteínas de fase aguda, em pacientes portadores de câncer de pâncreas, tem sido sugerida como um dos fatores humorais que levam a rápida perda de peso e a morte desses indivíduos (BARBER, et.al., 1999, 2001).

As citocinas pró-inflamatórias, secretadas pelas células do sistema imunológico frente ao estímulo invasor, são fatores humorais sugeridos como mediadores dos desarranjos metabólicos que levam ao desenvolvimento da caquexia em indivíduos portadores de câncer (AGGARWAL, et. al., 1985; AUCON, et. al., 1984; NATHAN, et. al., 1983). Entre as citocinas, o Fator de Necrose Tumoral (TNF), produzido por macrófagos (BEUTLER, et. al., 1985), foi associado à anorexia, febre e perda de peso em ratos portadores de tumor (DARLING, et al., 1990). Sua presença diminui a atividade da enzima lipase lipoproteica (LPL) no tecido adiposo, levando a hipertrigliceridemia por comprometimento da hidrólise de triacilgliceróis dos

quilomícrons (BEUTLER, et. al., 1985; FIELDING & HAVEL, 1977), redução da atividade da acetil CoA carboxilase (enzima lipogênica) e do transporte de glicose em adipócitos, comprometendo o substrato para lipogênese (TORTI et al., 1985). O TNF é reconhecido por vários receptores celulares, produzindo efeitos biológicos diversos como: promoção ou inibição do crescimento celular, angiogênese, citotoxicidade e imunomodulação (AGGARWAL e NATARAJAN, 1996). O desenvolvimento da caquexia em pacientes portadores de tumor foi observado mesmo na ausência do TNF (SOCHER et al., 1988), ou ainda o oposto, mesmo com níveis elevados de TNF, não foi observado o desenvolvimento do quadro caquético (BALKWILL, et. al., 1987), sugerindo que o TNF pode não ser o mediador da caquexia em humanos, ou não ser o único fator envolvido na instalação do quadro caquético em modelos animais. De fato, BLOCK, et. al., (1991), mostraram a influência da interleucina-6 (IL-6) na indução da caquexia, leucocitose e trombocitose em animais portadores de tumor. Foi também mostrado que, interleucina-2 (IL-2) (NOUCHI, et. al., 1996), IL-6 e Interferon- γ são mediadores da proteólise em alguns tipos de tumores (ALBRECH, 1996; MATTHYS et. al., 1997; NELSON et. al., 1994).

O hipermetabolismo, tradicionalmente observado em indivíduos portadores de tumor, gerando aumento do gasto energético, como a elevação da taxa de produção e reciclagem da glicose via lactato (ciclo de Cori), ou o aumento do "turnover" de proteínas, são respostas do organismo a injúria, induzidas por fatores humorais para reparação tecidual. No entanto, estas respostas são exacerbadas em indivíduos portadores de câncer, sugerindo o possível envolvimento de outros fatores (BARBER, 2001).

Evidências de que muitos tumores podem produzir fatores catabólicos, levando a depleção dos tecidos muscular e adiposo, foi mostrado a partir do experimento de COSTA, et. al., (1966) com carcinoma de camundongos Krebs-2. Eles sugeriram que produtos secretados pelo tumor poderiam levar a perda de gordura e peso. Estudos com adenocarcinoma de cólon de camundongo evidenciaram que fatores lipolíticos e proteolíticos, liberados pelo tumor, estavam envolvidos no desenvolvimento da síndrome da caquexia no animal hospedeiro (BECK, et.al., 1987).

De fato, FUJIKI, et. al.,(1997) mostraram a incapacidade dos fatores humorais, principalmente a IL-6, na indução do quadro caquético em animais portadores de adenocarcinoma de cólon, sugerindo que fatores derivados do tumor, como por exemplo, o Fator Indutor da Proteólise (PIF), possam atuar como cofatores dos mediadores humorais ou tumorais na produção da caquexia no câncer. KITADA, et. al.,(1980) mostraram que a mobilização de gorduras em animais portadores de linfoma, ocorria devido a um fator circulante no soro desses animais, o qual foi isolado e mostrado como fator mobilizador de lipídios (LMF) produzido por esse tipo de tumor.

Alterações Metabólico-Hormonais na Caquexia

As prostaglandinas (PG), leucotrienos (LT) e tromboxanas (TX) são eicosanóides, que estão entre os mais potentes reguladores das funções celulares, podendo ser produzidos, praticamente, por todas as células do organismo, incluindo as tumorais. Atuam, geralmente como hormônios locais, na sinalização parácrina, produzindo efeito biológico nas células vizinhas (MARKS, et. al., 1996). As prostaglandinas E (PGE_s) são sintetizadas a partir de ácidos graxos poliinsaturados de 20 átomos de carbono presentes nos fosfolipídios de membrana. O ácido araquidônico (AA) é o precursor mais comum dos eicosanóides e, devido à ação da enzima cicloxigenase- 2 (COX-2) é convertido em prostaglandinas E da série 2 (PGE₂) em resposta a um estímulo, como por exemplo, lesão celular. Seus efeitos, para proteger e reparar os danos causados ao organismo, estão associados à dor, febre, perda de apetite, vasodilatação e hipermetabolismo, (MARKS, et. al., 1996). A síntese e liberação de prostaglandinas podem ser estimulada ainda, por citocinas ou hormônios como as catecolaminas e vasopressina. DAYER et al., (1985) mostraram que a associação de IL-1 e TNF estimula a síntese de PGE₂ em vários tecidos periféricos, levando ao aumento do metabolismo tecidual. SMITH, et. al., (1993) mostraram que o aumento da degradação proteica, em animais portadores de adenocarcinoma de cólon (MAC16) foi acompanhado pela elevação de PGE₂ no músculo gastrocnêmio. Estudos sobre o envolvimento de PGE_s na indução da caquexia no câncer, mostraram que, em

ratos portadores de leucemia, o hipermetabolismo observado é induzido pela produção de PGE_s periféricas (ROE et. al., 1997).

Ratos portadores de tumor W256 apresentam concentrações séricas elevadas de PGE₂ e vasopressina, e foi sugerido estarem envolvidas nas alterações metabólicas e hormonais que induzem à caquexia nestes animais. Este estudo demonstrou que o tecido tumoral era o maior produtor de PGE₂ (SIDDIQUI e WILLIANS, 1987).

Interações Metabólicas entre Tumor de Walker 256 e Hospedeiro

George Walker em 1928 no John's Hopkins University School of Medicine observou o desenvolvimento espontâneo de tumor de glândulas mamárias de uma rata grávida, sem metástase e, diagnosticou como carcinoma. Em 1953 e 1954, esse tumor foi transplantado em ratos Sherman por inoculação subcutânea, sendo palpável em uma semana e levando a morte dos animais após seis semanas. Após 15 dias de inoculação, o tumor foi descrito como sendo uma massa firme, lobulada e encapsulada, produtor de metástases em linfonodos regionais, pulmonares e retroperitoniais (CAHILL et. al., 1943; EARLE, 1935; ELSÉN, 1940; McCOY and NEUMAN, 1956; MIDER et. al., 1948). O Tumor de Walker 256 (W256) apresenta dois subtipos: tipo A metastizante, que leva a anorexia terminal dos ratos portadores em aproximadamente 27 dias; e o tipo B que não forma metástase e induz a caquexia precoce do portador, levando a morte em 15 dias. Este último tipo apresenta crescimento rápido, é bastante invasivo e causa importantes mudanças metabólico-hormonais, as quais estão envolvidas no estabelecimento do quadro caquético, sendo portanto, um importante modelo de tumor para investigar questões sobre a caquexia induzida pelo câncer (BOECKH-HAEBISCH, et. al., 1998; FERNANDES, et. al., 1997; GUAITANI et. al., 1983; SEELAENDER, et. al., 1996). Esta linhagem de célula tumoral tem sido utilizada em vários estudos porque é espécie-específica para ratos e facilmente transplantada (FERNANDES, et. al., 1994).

Interações metabólicas entre o tumor e o hospedeiro são reguladas, de maneira geral, por mecanismo de "feedback" positivo que envolve anorexia e aumento da demanda energética do portador para o tumor, constituindo a chave do desenvolvimento da caquexia (ARGILES et al., 1997). Warburg, em 1930, demonstrou

que tumores agressivos consomem grandes quantidades de glicose, o que é condizente com a hipoglicemia observada nos indivíduos portadores destes tipos de tumores (HEBER et. al., 1985). Tumores que apresentam metabolismo preferencialmente anaeróbico, são responsáveis pela elevada concentração de ácido láctico sérico observada no hospedeiro (ARGILÉS et. al., 1997; HEBER et. al., 1985). O ácido láctico é reciclado novamente a glicose no fígado do hospedeiro (gliconeogênese), auxiliando na manutenção do nível sérico desse substrato. Assim, o tumor torna-se o maior consumidor de glicose, enquanto o portador é estimulado a fabricá-la. Esse mecanismo fisiológico, conhecido com ciclo de Cori, encontra-se aumentado o indivíduo portador de tumor, podendo representar um prejuízo energético de 300kcal/dia para o hospedeiro (EDEN et al., 1984). Assim, o metabolismo tumoral estimula a ativação de um mecanismo hepático compensatório no portador (pela hiperlaticidemia) para aumento da produção de glicose, que tenta suprir a demanda energética exacerbada pelo tumor.

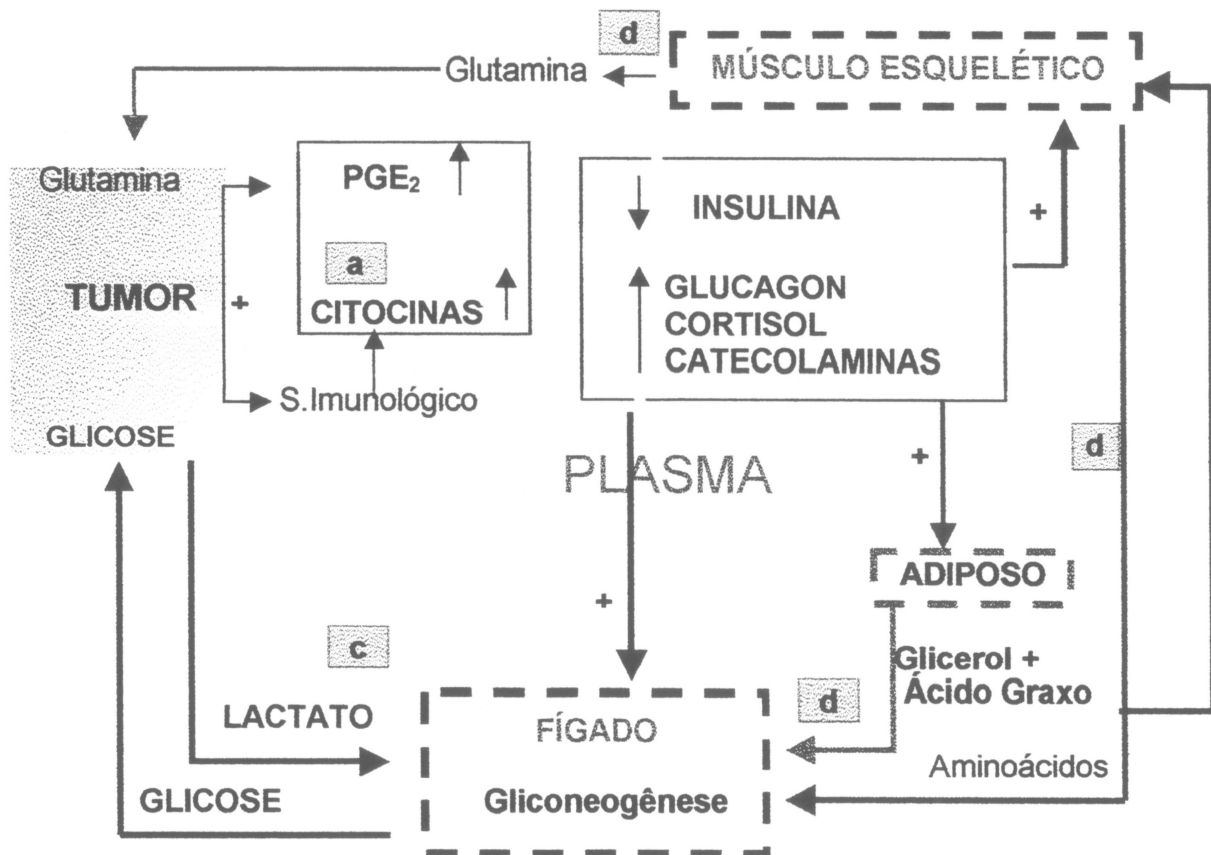
Apesar, da glicólise ser o principal processo para obtenção de energia nas células tumorais (LAZO, 1981; PEDERSEN, 1978; SCHNEIDER e HOGEBOM, 1950), a utilização de aminoácidos essenciais (leucina, valina e isoleucina), como substrato energético também é descrita, devido ao aumento da taxa de oxidação de leucina (ARGILÉS e LÓPEZ-SORIANO, 1990; COSTELLI et al., 1995), ou ainda, pela rápida captação de alanina e glutamina, observada em alguns tumores (FICHER e CHANCE, 1990). A glutamina é considerada um aminoácido não-essencial gliconeogênico, sua síntese ocorre, principalmente, no fígado e músculos esqueléticos. No entanto, em condições de maior demanda de glutamina, como infecção e neoplasia, os órgãos produtores não conseguem manter os níveis normais de glutamina plasmática, assim esta vem sendo reclassificada como aminoácido "condicionalmente essencial" (LACEY e WILMORE, 1990). O aumento da demanda de glutamina, a qual é requerida pelas células de proliferação rápida tais como, as tumorais e as do sistema imunológico, gera intenso catabolismo protéico no músculo esquelético, principal tecido responsável pela manutenção dos níveis plasmáticos desse aminoácido (FICHER e CHANCE, 1990; LAWSON et al., 1982).

A redução dos estoques de lipídios e a hiperlipidemia, observadas no hospedeiro, podem ser resultado do aumento da atividade lipolítica, liberando glicerol para a gliconeogênese hepática e ácidos graxos para serem utilizados como substrato alternativo da glicose pelos tecidos periféricos (THOMPSON et al., 1981).

Alterações no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas associadas à anorexia levando à perda de peso, foram observadas em indivíduos portadores de tumor W256 e de YOSHIDA (AH-130), sugerindo que tais alterações são secundárias a hipoinsulinemia e ou ao aumento de hormônios contra-reguladores tais como, catecolaminas, cortisol e glucagon (COSTELLI et al., 1999; TAYEK, 1992). De fato, a importância da redução na secreção de insulina para o desenvolvimento do quadro caquético foi demonstrada nos indivíduos portadores de tumor de Walker 256, o que induz a ativação das vias catabólicas no organismo hospedeiro (FERNANDES et al. 1990; COSTELLI et al., 1999). Efeito este, mais facilmente evidenciado pela degradação do glicogênio muscular e hepático, isto leva a disponibilização de glicose desses estoques energéticos do portador (RIVIERA et al., 1988).

Portanto, as alterações no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios ocorridas em indivíduos portadores de tumor W256 estão relacionadas com as interações metabólicas que o tumor faz com o hospedeiro (**esquema 1**) gerando: aumento da demanda energética e conseqüente ativação de um mecanismo hepático compensatório (gliconeogênese) para manutenção plasmática de glicose e de outros de substratos necessários para o metabolismo celular do hospedeiro, os quais são basicamente direcionados para o tumor, pela deficiência de insulina (o tumor é insulino-independente quanto à captação e metabolização de glicose) e aumento dos hormônios contra-reguladores, como cortisol, catecolaminas, glucagon e hormônio do crescimento (ARGILÉS et al., 1997; FERNANDES et al. 1990).

INTERAÇÕES METABÓLICAS NA CAQUEXIA



Esquema 1: Representação das principais interações metabólicas, desenvolvidas entre Tumor W256 e o hospedeiro, possíveis no quadro caquético. a- Mediadores químicos. b- Alterações Hormonais. c- Ciclo de Cori. d- Catabolismo dos Estoques Energéticos.

ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS n- 3

Os ácidos graxos desempenham diversos papéis biológicos. Além de armazenar energia e formar as membranas biológicas, os lipídios podem funcionar como cofatores enzimáticos, âncoras hidrofóbicas, hormônios e mensageiros intracelulares, produzindo efeitos biológicos específicos e essenciais.

Os ácidos graxos, constituintes dos principais lipídeos orgânicos, são ácidos carboxílicos com cadeia hidrocarbonada de 4 a 36 átomos de carbono, totalmente saturada, monoinsaturada ou poliinsaturada. Ácidos graxos insaturados, que apresentam apenas uma insaturação entre os átomos de carbonos da cadeia de hidrocarboneto, são classificados como monoinsaturados, e aqueles com duas ou mais insaturações, poliinsaturados (PUFAs). Na nomenclatura convencional, os átomos de carbono dos ácidos graxos podem ser numerados sistematicamente ou, identificados por letras a partir do grupo funcional (sistema de numeração Δ ou de letras gregas). também podem ser numerados a partir do carbono mais distante do grupo funcional. Assim, o carbono mais próximo ao carbono da carboxila (grupo funcional) pode ser identificado pelo número 2 ou pela letra α e, o carbono mais distante do grupo funcional de carbono ômega (ω). No sistema de numeração delta (Δ) as posições de todas as duplas ligações são indicadas por números, por exemplo: $\Delta^{9,12}$ ou 9,12, isto representa a existência de duas insaturações, uma entre C9 e C10 e a outra entre C11 e C12 a partir da carboxila (MONTGOMERY, et. al., 1994; MARKS, et. al., 1996). Na descrição da estrutura molecular dos ácidos graxos, a posição da insaturação a partir do grupo metil (ou carbono ω) é utilizada, como $\omega-6$ ou n-6. Estas conotações indicam que a 1ª insaturação se encontra entre o 6º e 7º carbonos a partir do final da cadeia (grupo metil). No entanto, as duplas ligações nunca são adjacentes nem conjugadas nos ácidos poliinsaturados, mas sim separadas por três átomos carbonos, conferindo à estrutura maior estabilidade e proteção contra a oxidação (ROSE, et. al., 1999).

Os ácidos graxos insaturados de cadeia longa (de 12 a 26C) podem ser divididos em quatro classes, segundo a posição da insaturação em relação ao grupo metil, e cujos nomes usuais ou convencionais devem indicar o número de átomos de carbono e de duplas ligações na molécula. Cada classe é composta por uma família, onde todos os seus membros podem ser sintetizados biologicamente a partir do ácido parental (**esquema 2**), mas não podem ser interconvertidas. (MONTGOMERY, et. al., 1994; MARKS, et. al., 1996; ROSE, et. al., 1999).

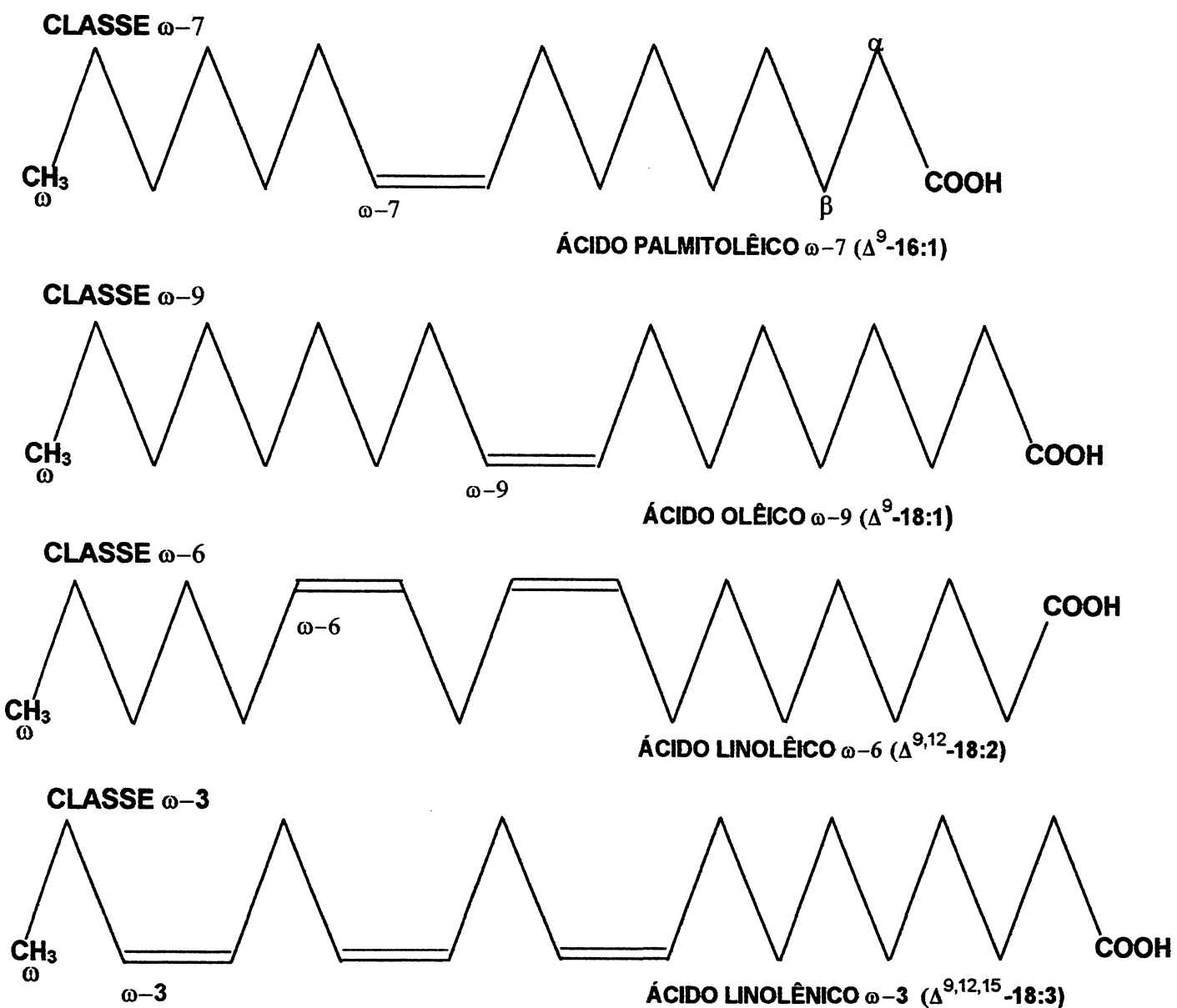
Ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa podem ser sintetizados pelos mamíferos, via lipogênese, utilizando a glicose como fonte de carbono para formar Acetil coenzima-A (Acetil CoA). O crescimento da cadeia do ácido graxo (alongamento) feito pela enzima ácido graxo sintase que, adiciona seqüencialmente 2 carbonos obtidos do Malonil CoA, produto da ação da enzima Acetil CoA carboxilase sobre a Acetil CoA. Através da lipogênese mamíferos sintetizam ácidos graxos insaturados parentais das classes ômega-7 (palmitolêico) e ômega-9 (Olêico). A partir deles todos os demais membros da mesma família por alongamentos e desaturações sucessivas. As desaturases dos mamíferos aumentam o grau de insaturação dos ácidos graxos adicionando duplas ligações extras, entre as duplas ligações já existentes e o grupo carboxila (DE GOMEZ DUMM & BRENNER, 1975), tomando inviável a lipogênese das classes n-6 e n-3, a menos que algum dos membros dessas famílias esteja presente na dieta. Por esse motivo os ácidos Linolêico (n-6) e α -Linolênico (n-3) são chamados de "essenciais" (**esquema 2**), porque não podem ser sintetizados no organismo, dessa forma devem ser providos pela dieta. Os n-6 (ou ω -6) são diinsaturados e estão presentes por exemplo: no óleo de soja e na semente de caju, já os n-3 (ou ω -3) são triinsaturados, encontrados por exemplo: no óleo de peixe e em algas marinhas (MARKS, et. al., 1996; ROSE, et. al., 1999).

O principal interesse fisiológico nesses ácidos graxos de cadeia longa poliinsaturado (PUFAs), está na sua estrutura molecular. As propriedades físicas e químicas como, solubilidade, flexibilidade e reatividade, são determinadas pelo tamanho da cadeia, grau e tipo de insaturação. Portanto, os ácidos graxos de cadeia longa saturados, são pouco flexíveis, praticamente insolúveis e mais estáveis, portanto, pouco reativos. O contrário ocorre com os PUFAs, cuja maioria apresenta isomeria geométrica, sendo que os isômeros *cis* (**esquema 2**) permitem que a molécula se

"dobro", aumentando a flexibilidade, solubilidade e, a instabilidade das duplas ligações aumenta sua reatividade (ROSE, et. al., 1999).

O ácido Linoléico (LA) é o principal precursor do ácido Araquidônico (AA), enquanto o ácido α -Linolênico (LNA) é o principal precursor do ácido eicosapentaenóico (EPA). Ambos são ácidos graxos poliinsaturados com 20 átomos de carbono que formam fosfolipídios das membranas biológicas. O LNA também é precursor do ácido docosahexaenóico (DHA), de 22 átomos de carbono, importante constituinte do tecido nervoso (ROSE, et. al., 1999).

Os ácidos Linoléico e Linolênico são substratos das mesmas desaturases, de forma que n-3 e n-6 competem, principalmente, pela Δ^4 e Δ^6 desaturases, sendo que n-3 apresenta maior afinidade pelas enzimas. Conseqüentemente, uma dieta rica em n-3 reduz as desaturações em n-6 levando a menor produção de ácido araquidônico (DE GOMEZ DUMM & BRENNER, 1975; HAGUE & CHRISTOFFERSEN, 1984). Esta inibição é atribuída tanto ao EPA, quanto ao DHA e ao ácido Linolênico (CHRISTIANSEN, et. al., 1991).



Esquema 2 - Estrutura dos ácidos parentais representantes de cada classes de ácidos graxos insaturados de cadeia longa. As ligações *cis* representadas em azul

FONTES DIETÉTICAS E ABSORÇÃO DOS PUFAS n-3

Os vegetais por serem capazes de adicionar duplas ligações entre C10 e o final da cadeia (grupo metil), sintetizam PUFAs n-3 e n-6 e são considerados alimentos ricos em n-3 e n-6. Da mesma forma, peixes marinhos ao se alimentarem do fitoplâncton podem acumular grandes quantidades de n-3 em seus tecidos (MARKS, et. al., 1996; INNIS, 1995). No entanto, a proporção de n-3 e n-6 é bastante variada nas diferentes espécies de peixes, principalmente, quanto aos conteúdos de EPA, DHA e AA (CHILDS, et. al., 1990; INNIS, 1995). PUUSTINEN, et.al, (1985) analisaram o conteúdo lipídico e a composição de ácidos graxos nos tecidos de doze espécies de peixes mais comuns no leste e norte da Europa, detectando percentuais diferentes de EPA e DHA nos tecidos das variadas espécies, sugerindo que qualquer efeito esperado pelo aumento na ingestão desses ácidos, através do consumo de óleo de peixe, poderia ser afetado pela fonte utilizada. SIMOPOULOS, (1991) relatou que os peixes americanos cujos lipídios apresentam maior percentual de EPA e DHA, respectivamente, são: Cavala Rei (7,7% e 9,2%), Salmão (7,7% e 5,8%), Arenque do Pacífico (7% e 5%) e Atum (6,1% e 20%).

CALDER, et. al., (1998) enfatizaram que o óleo de peixe usado para suplementação é, na verdade, uma preparação de óleos extraídos de tecidos de diversas espécies de peixe, especialmente de água fria ou morna. Esse óleo é rico em 3 tipos de PUFAs n-3: EPA (eicosapentaenóico; 20:5 n-3), docosapentaenóico (22:5 n-3) e o DHA (docosahexaenóico; 22:6 n-3).

Como mencionado anteriormente, o principal interesse fisiológico dos PUFAs n-3 está relacionado com suas propriedades físicas, químicas e na produção de seus efeitos biológicos, que serão discutidos posteriormente. De maneira que, qualquer tentativa de aumentar a ingestão desses ácidos deve ser garantida, não apenas pela quantidade existente na fonte, mas também por uma absorção intestinal eficiente. A eficiência da absorção dos PUFAs n-3 depende: do tipo de ácido e da forma como se apresenta na mucosa intestinal. Na forma de ácidos graxos livres, a eficiência da absorção de EPA e DHA é maior do que na forma de triacilglicerol (NELSON & ACKMAN, (1988); HUDSON & TISDALE, 1994). Mas, é o triacilglicerol (TAG) a forma dietética mais comum dos ácidos graxos presentes nos alimentos (MARKS, et. al., 1996).

HAYES, et. al. (2001), mostraram a importância da estrutura do triacilglicerol ingerido para sua absorção (tipo e posição do ácido na molécula de glicerol), evidenciando que os ácidos esterificados no carbono-2 do glicerol apresentam diferenças na absorção, transporte e metabolismo, quando comparados aos ácidos graxos esterificados na posição 1 e 3. Demonstrando que os ácidos graxos na posição-2 (sn-2) são absorvidos como 2-monoglicerol, podendo ser facilmente utilizado como esqueleto para constituição de fosfolipídios (AMATE, et. al., 1999; HAYES, 2001).

EFEITOS BIOLÓGICOS DOS PUFAS n-3

Os derivados do LNA, em particular, a DHA têm se mostrado como o principal constituinte dos fosfolipídios de membrana do cérebro humano e retina (LEBANON & FOLCH, 1957; ANDERSON, 1970). O DHA é essencial para a formação de novos tecidos, desenvolvimento neural e crescimento. Portanto, seu suprimento deve ser garantido, pela dieta da mãe, durante a gravidez e a amamentação, pois o status de PUFAs n-3 da criança está altamente correlacionado com o da mãe (AL et.al., 1995).

Os primeiros efeitos biológicos benéficos comprovados, clínica e experimentalmente, atribuídos aos ácidos graxos ômega-3 estão relacionados a sua eficácia no tratamento de doenças cardiovasculares (KREMER, et. al., 1991).

A biossíntese de eicosanóides a partir de ômega-6 é iniciada pela liberação de ácido araquidônico (5,8,11,14 -20:4) da membrana celular (pela ação da enzima Fosfolipase A₂) e convertido em prostaglandinas E da série₂, pela ação da cicloxigenase 2 (COX-2), geralmente em resposta as citocinas pró-inflamatórias (HWANG, et. al., 1998). O número de subscrição da série representa as insaturações existentes na cadeia linear de hidrocarboneto das PGs, sendo um dos fatores estruturais importantes para sua ação biológica. (MARKS, et. al., 1996).

Tanto n-3, quanto n-6 são importantes constituintes das membranas celulares e, suas diferenças estruturais podem produzir eicosanóides igualmente diferenciados. Assim, enquanto o AA é precursor de PGE₂, substância metabolicamente ativa, capaz de atuar na modulação da resposta imunológica, angiogênica, mitogênica e hormonal

(CALDER, 2001; HERSCHMAN, 1994), o EPA é precursor de PGE_3 , também pela ação da cicloxigenase, no entanto, é um metabólito menos ativo (NEEDLEMAN, et. al., 1979; FISCHER & WEBER, 1984).

A biossíntese de eicosanóides depende, em grande parte, do perfil de ácidos graxos incorporados à membrana plasmática, o qual pode ser alterado pela composição lipídica da dieta (CALDER, et. al., 1998, GOGOS, et. al., 1998), como por exemplo, através da suplementação com óleo de peixe rico em PUFAs n-3 (BOUDREAU, et. al., 1991; GRONN, et. al., 1991; FISCHER & WEBER, 1984).

Os estudos de CALDER, et. al., (1995, 1998) vêm demonstrando o lado benéfico das dietas com alto teor de gordura (20% do peso da dieta composto de gorduras) que diferem em sua composição de ácidos graxos n-3 e n-6. Dietas ricas em PUFAs n-3 apresentaram efeitos antiinflamatórios, cujos mecanismos podem estar relacionados à interferência na sinalização intracelular ou na expressão gênica de moléculas de superfície, modulando a resposta mediada por células (SANDERSON, et al, 1995). Devido a estes efeitos, os PUFAs n-3 foram sugeridos como forma de terapia na inflamação aguda e crônica, sobretudo as causadas por alteração da resposta imunológica, como as doenças auto-imunes (CALDER, 1998). Interessante foi à observação de que EPA e DHA apresentam diferentes ações imunomodulatórias, sendo os efeitos do EPA mais expressivos na atenuação da resposta imunológica que os produzidos pelo DHA (PETERSON, et. al., 1998).

Os PUFAs n-3 são, usualmente, encontrados em baixas concentrações nas células do sistema imunológico, ocorrendo o inverso para os PUFAs n-6 (principalmente o AA). As citocinas e as prostaglandinas trabalham juntas mediando os efeitos biológicos durante os processos inflamatórios, (como lipólise e proteólise e neovascularização) os quais podem agravar o quadro de doenças crônicas, como o câncer (CALDER, 2001; O' SULLIVAN, et. al., 1995).

Os estudos epidemiológicos foram os que despertaram o interesse sobre os possíveis efeitos benéficos dos ácidos graxos ômega-3 (n-3) como agentes protetores contra o câncer. Há vários relatos de sua habilidade em diminuir a incidência dos tipos mais comuns de câncer como os de próstata, cólon, mama, e útero em algumas populações. Os baixos índices de tumor de mama, endométrio e próstata observados em japoneses, esquimós e canadenses foram relacionados ao conteúdo de gordura da

dieta (ARNSTRONG & DOLL, 1975; HIRAYAMA, 1978; LANIER, et. al., 1976 e 1996). Esse efeito protetor foi atribuído ao alto consumo de peixe nessas populações, cujos principais componentes lipídicos eram os ácidos graxos ômega-3.

CAQUEXIA NO CÂNCER E PUFAs n-3

Estudos experimentais têm demonstrado que os ácidos graxos poliinsaturados da classe ômega-3 (PUFAs n-3), podem agir como agentes quimiossupressores na progressão de metástases câncer, (ROSE, et. al., 1996). Podem ainda, interferir na regulação do equilíbrio energético do organismo (CLARKE, 2000; PRINCE et. al., 2000), modulação da resposta imunológica (CALDER, 2001; LANZA-JACOBY, et. al., 2001), inibição da lipólise e degradação muscular em animais portadores de MAC16 (TISDALE, 1996).

Estudos recentes de SAUER, et. al., (2000) mostraram os efeitos anti-tumorais e anticaquéticos dos PUFAs n-3, sugerindo possível mecanismo de inibição do crescimento tumoral sinalizado pela estrutura diferenciada de metabólitos do EPA em relação aos produzidos pelo metabolismo do AA em animais portadores de hepatoma 7288CTC.

Nos últimos anos, vários estudos têm demonstrado o valor nutricional de determinados alimentos, principalmente vegetais, cujo alto consumo pode reduzir o risco de câncer de mama, próstata e colon. O potencial dos produtos naturais, com efeito protetor (agentes quimiopreventivos) contra o câncer de cólon e mama, foi demonstrado em estudos clínicos (GREENWALD, et. al., 1993).

DE DECKERE, (1999) sugeriu que um aumento no consumo de peixe (rico em PUFAs n-3), em países industrializados, pode reduzir o risco de câncer coloretal. COLQUHOUN et. al., (2001) mostraram que a presença de PUFAs n-3 na dieta de animais portadores de tumor de Walker 256 reduziram, significativamente a taxa de crescimento tumoral.

Os efeitos inibitórios dos PUFAs n-3 sobre o crescimento tumoral parecem depender do tipo de tumor e das quantidades de PUFAS n-3 e n-6 existentes na dieta (MUKUTMONI-NORRIS, et. al., 1999). Experimentos com ratos atimicos portadores de tumor de cólon humano mostraram que, a dieta rica em PUFAs n-3 não promovem o crescimento tumoral, já os efeitos da dieta rica em PUFAs n-6 dependem da "fase" em que ocorre a suplementação: antes da inoculação das células tumorais estes promovem o desenvolvimento do tumor, o que não ocorre quando os animais são suplementos após o estabelecimento do câncer (CALDER, et. al., 1998)

A maioria dos estudos envolvendo a suplementação com PUFAs n-3 no câncer, foram realizados após o desenvolvimento da doença e do quadro caquético, ou ainda por 6 a 8 semanas antes da inoculação do tumor, demonstrando a eficácia no tratamento agudo e subcrônico. Mesmo as pesquisas direcionadas à prevenção do câncer, que vêm caracterizando os PUFAs n-3 como agentes quimiopreventivos, estão voltadas, em sua maioria, à proteção contra a reincidência de novos tumores em indivíduos já tratados de um câncer primário (ROSE, et. al., 1999). No entanto, os estudos experimentais sobre o uso dos ômega-3 como suplemento nutricional, de forma crônica são escassos. Os efeitos benéficos da suplementação oral com ômega-3 no desenvolvimento do câncer em indivíduos saudáveis, inserida na dieta da mãe e continuada na geração seguinte, simulando uma situação natural de mudança de hábito alimentar, não foram evidenciados e portanto merecem investigação.

OBJETIVO

Uma vez que já foram demonstrados vários efeitos benéficos da suplementação com ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 (PUFA n-3) no tratamento agudo de determinados tipos de tumores, nós aventamos a hipótese de que a suplementação oral crônica com os mesmos, introduzida na alimentação da mãe através do óleo de peixe, deva melhorar a capacidade do organismo responder à implantação de tumor de Walker 256 e desenvolvimento do quadro caquético dos filhos também suplementados. O presente trabalho pretende investigar esta hipótese.

Para alcançar este objetivo, avaliamos os seguintes parâmetros:

- Peso corpóreo dos animais, desde o desmame (21 dias) até a fase adulta (69 dias) e durante o crescimento tumoral (14 dias).
- Peso do tumor.
- Porcentagem de sobrevivência de ratos portadores de tumor
- Glicemia
- Lactato sérico
- Conteúdo de glicogênio hepático, no músculo sóleo e gastrocnêmio.
- Perfil de ácidos graxos no leite materno, tecido tumoral e fígado, avaliado por cromatografia líquida de alta performance (HPLC).
- Evolução da massa corpórea da mãe geradora de F1, peso da ninhada no nascimento e no desmame.
- Análise morfológica da massa tumoral.

MATERIAL E MÉTODOS

ANIMAIS

Ratos Wistar obtidos do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, foram submetidos a ciclo claro/escuro (12/12 horas) com água e alimentação à vontade em ambiente com temperatura controlada de $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

REAGENTES, ENZIMAS, SOLUÇÕES E ÁCIDOS GRAXOS

Todos os componentes dos tampões, dos solventes e os álcoois foram obtidos da Reagen Quimibrás Industria Brasileira SA. Lactato desidrogenase, amiloglicosidase, Hexoquinase/glicose-6-fosfato desidrogenase, NAD, NADH, NADPH, ATP, os reagentes utilizados na preparação do material para microscopia de luz e HPLC foram provenientes da Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA). Acetonitrila (ACN) foi adquirida da Mallinckrodt (HPLC grade). O óleo de peixe obtido de cápsulas de 1g de MaxEPA (Prodome) contendo 180mg de EPA e 120mg de DHA. Óleo de coco da Industria Brasileira Refino de Óleos Brasil LTDA (São Paulo, SP, BR). Os fragmentos de tecido analisados por microscopia óptica foram emblocados em Paraplastic Histotec Merck (Germany). Foram utilizados os seguintes ácidos graxos como padrões para análise por HPLC: ácido dodecanóico (láurico, C12:0), ácido tetradecanóico (mirístico, C14:0), ácido hexadecanóico (palmítico, C16:0), ácido 9-hexadecenóico (palmitoleico, C16:1), ácido octadecanóico (esteárico, C18:0), ácido 9-octadecenóico (olêico, C18:1), ácido 9,12-octadecadienóico (linolêico, C18:2), ácido 9,12,15-octadecatrienóico (linolênico, C18:3), ácido 5,8,11,14 - eicosatetraenóico (araquidônico, C20:4), ácido 5,8,11,14,17-eicosapentenóico (C20:5) e ácido 4,7,10,13,16, 19 docosahexaenóico (C22:6). Misturas para derivatização e solventes utilizados na cromatografia foram: Bromometil-metóxi-coumarin e 18-crown-6 e Acetonitrila (ACN). Para a cromatografia por HPLC, a água foi destilada, desionizada e filtrada em equipamento Easypure RF. Todos os solventes foram filtrados antes do uso (filtros para soluções hidrofóbicas ou hidrofílicas de $0,45\mu\text{m}$) e os padrões solubilizados em ACN :THF (1:1) e filtrados em Millex-LCR13 de $0,45\mu\text{m}$.

A tabela abaixo mostra a composição, em porcentagem de ácidos graxos contidos no óleo de coco (NISHIYAMA-NARUKE, et. al., 1999) e dos principais ácidos graxos poliinsaturados contidos em uma cápsula de MaxEPA (óleo de peixe), segundo as informações dadas pela Industria Brasileira Refino de Óleos Brasil LTDA.

*Composição de Ácidos Graxos (%)	Óleo de coco
Ácido Láurico (12:0)	43.47 ± 0.47
Ácido Mirístico (14:0)	22.93 ± 0.34
Ácido Palmítico (16:0)	8.42±0.18
Ácido Palmitolêico (9-16:1)	0.53±0.07
Ácido Esteárico (18:0)	4.39±0.64
Ácido Olêico (9-18:1)	17.03±0.33
Ácido Linolêico (9,12-18:2)	3.33±0.18
Ácido Linolênico (9,12,15-18:3)	0.50±0.17
Composição de Ácidos Graxos (%)	Óleo de peixe
Ácido Eicospentaenóico (5,8,14,17-20:5)	18.0
Ácido docosaheptaenóico (4,7,10,13,16,19-22:6)	12.0

OBTENÇÃO E TRANSPLANTE DAS CÉLULAS DO TUMOR DE WALKER 256

Em um animal portador do tumor Walker 256 ascítico, injetou-se 10mL de solução salina 0,9% na cavidade abdominal, tomando-se cuidado para não perfurar intestino. Após massagear a região, abriu-se o abdome e retirou-se o líquido através de OPpeta Pasteur. A seguir procedeu-se a contagem das células em câmara de Neubauer e 1mL dessa suspensão contendo 2×10^7 células foi injetado subcutaneamente no flanco direito dos animais dos grupos experimentais, sem anestesia. A quantidade inoculada, assegurou que a massa tumoral representasse 7 a 10% do peso da carcaça do animal quando da finalização do período experimental. No grupo Controle foi injetado 1mL de salina 0,9%.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

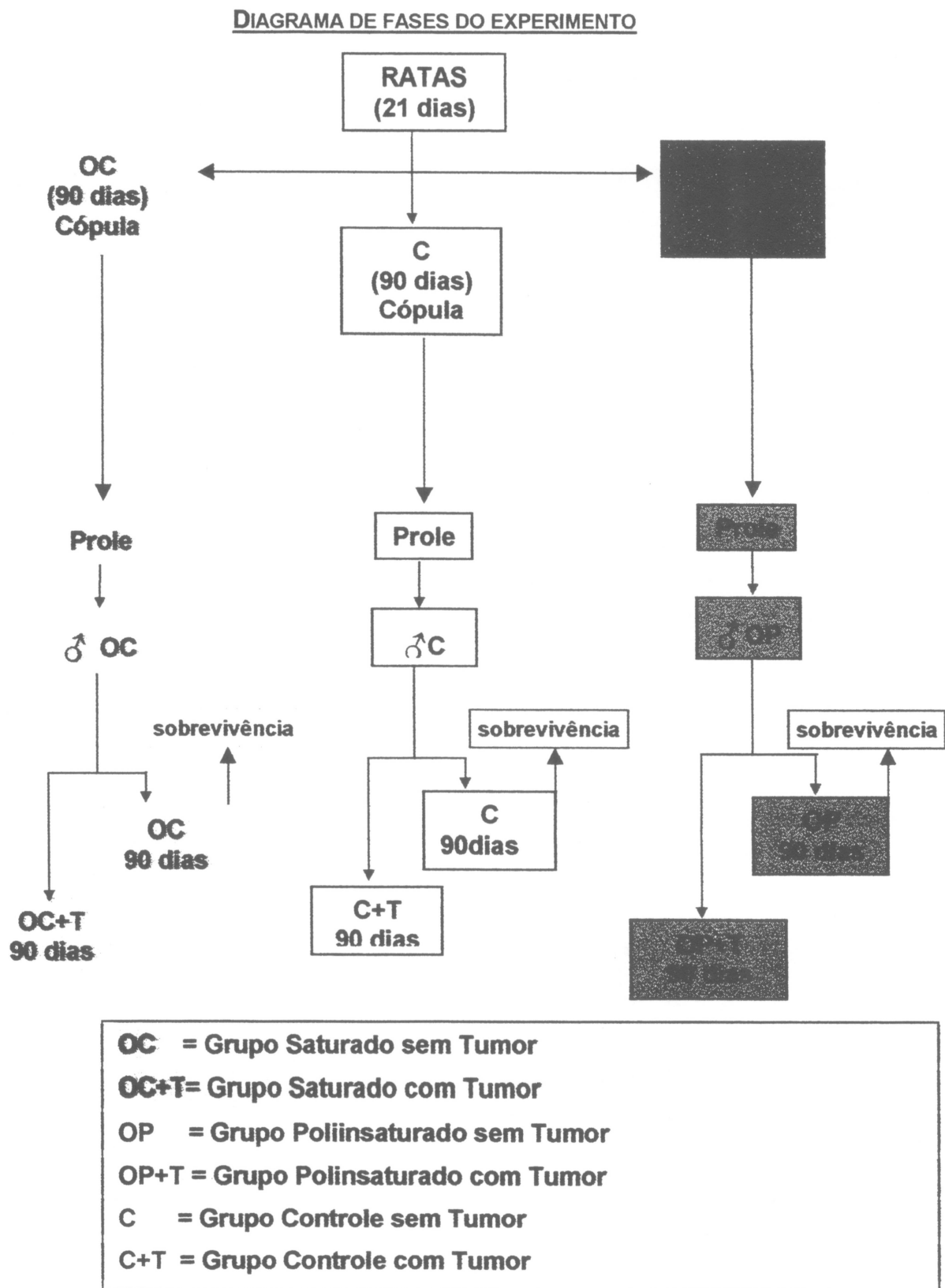
Ratas Wistar fêmeas, com 21 dias foram divididas em 3 grupos: controle (C); suplementadas com 1g/kg p. c de óleo de coco, grupo saturado (OC) e suplementadas com 1g/kg p. c de óleo de peixe, grupo poliinsaturado (OP). Os óleos foram administrados oralmente, através de micropipeta, todos os dias durante o período de 70 dias (do desmame até a maturidade sexual). Ao atingirem a maturidade sexual (90 dias de idade) foram colocadas em contato com machos adultos, não submetidos a esta suplementação, gerando uma prole. Essas mães, durante todo o período gestacional (21 dias) e de amamentação (21 dias) continuaram recebendo suplementação diária. Após o nascimento, efetuamos os seguintes procedimentos:

1- Das mães, retiramos o leite após o desmame, no 22º dia, para posterior análise da composição de ácidos graxos.

2- Da prole gerada, os machos com 21 dias foram também divididos em 3 grupos e suplementados (mesmo procedimento descrito para as mães) e tiveram seus pesos corpóreos monitorados a cada 2 dias. (**Esquema 3**). Estes ao atingirem a idade adulta (90 dias), foram inoculados com suspensão de células (2×10^7 células/mL) obtidas do tumor sólido de Walker 256 (W256) ou 1mL de solução salina 0,9% (no grupo controle). A suplementação e o monitoramento peso corpóreo nunca foram interrompidos. Após 14 dias os animais foram sacrificados, sendo o sangue, fígado e músculo esquelético retirados para posterior análise bioquímica. O tumor foi retirado, pesado e submetido a análise morfológica

3- Um experimento separado, que usou o mesmo procedimento alimentar, animais inoculados com células do W256 foram utilizados para determinar a taxa de sobrevivência. Durante o período de 30 dias, esses animais foram contados de 5 em 5 dias e no 30º dia todos os sobreviventes foram sacrificados.

Esquema 3:



DETERMINAÇÃO DO PESO DO TUMOR E CORPÓREO

Os pesos dos animais e do tumor foram aferidos em balança digital Denver Instrument XL-410. Durante o experimento, os animais foram pesados a cada dois dias sempre no período da tarde após as 16h, utilizando-se balança Denver Instrument XL-410.

DETERMINAÇÃO DA TAXA DE SOBREVIVÊNCIA

Foi preparado um outro grupo de animais (dos respectivos grupos), também inoculados com tumor W256, e acompanhados por 30 dias, com o objetivo de se determinar o número de animais que sobreviveram. A cada 5 dias, estes eram contados para se determinar a porcentagem de sobrevivência, através do número de animais que permaneciam vivos nos respectivos grupos até o final do período. No 31º dia todos animais foram sacrificados.

PROCEDIMENTOS BIOQUÍMICOS

A) **DETERMINAÇÃO DA GLICEMIA.** Foi realizada pelo método enzimático colorimétrico, utilizando-se Kit Glicose E enzimática da Labtest, segundo TRINDER, (1969). As amostras foram preparadas seguindo-se as instruções do fabricante do Kit. A Glicose presente na amostra foi dosada segundo a reação:



A intensidade da cor formada é diretamente proporcional à quantidade de glicose na amostra de soro. A leitura de absorbância feita no espectrofotômetro ULTROAPEC 2000 (Pharmacia) a 505nm, e a concentração de glicose foi calculada segundo a fórmula:

$$[\text{Glicose}] = \frac{\text{D.O. amostra}}{\text{D.O. padrão}} \times n \quad \text{e expressa em mg/dL}$$

-[Glicose] = Concentração de glicose na amostra

-D.O. = Densidade ótica

-n = Concentração do padrão

B) DETERMINAÇÃO DO LACTATO SÉRICO. Foi determinado por método enzimático não colorimétrico. Inicialmente, foi feita a desproteinização do soro (500 μ L), adicionando-se 50 μ L de ácido tricloroacético (TCA 25%) e a mistura agitada em vórtex e centrifugada por 1 min a 13000 rpm. Em seguida, coletou-se 200 μ L do sobrenadante e adicionou-se 2 μ L de indicador universal para permitir a visualização da neutralização do soro, pela adição de KOH/TRIS (0,5M/2M), sinalizada pela coloração verde, indicando pH 7.0. Em seguida, 100 μ L do soro neutralizado foi pipetado em tubos de ensaio contendo 1 mL do tampão de ensaio, e após 45 minutos efetuou-se a leitura a 340nm.

A medida da absorbância para o lactato sérico, foi calculada pela fórmula:

$$[\text{Lactato}] = \frac{D.O}{6,22} \times \frac{V1}{V} \times \frac{V2}{V3} \times \frac{V4}{V5} \text{ e expresso em } \mu\text{mol/mL}$$

-[Lactato] = Concentração de lactato produzido

-D.O.= Densidade ótica da amostra

-6,22 = Constante

-V1 = Volume da amostra + tampão de dosagem

-V = Volume da amostra para ensaio

-V2 = Volume do soro + TCA

-V3 = Volume do soro

-V4 = Volume do soro desproteinizado + volume de neutralização

-V5 = Volume do soro desproteinizado

TAMPÃO DE ENSAIO (PARA 100 mL)	
EDTA	0,28g
Glicina	2,8g
Hidrato de Hidrazina	1,5mL
LDh	0,4mL
NAD ⁺	60mg
pH	8.85

C) DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE GLICOGÊNIO. No fígado e tecido muscular esquelético mensurou-se o conteúdo de glicogênio, conforme LEIGHTON, et.al., (1988). Amostras do fígado e músculo esquelético retiradas dos animais, foram colocadas em diferentes tubos de ensaio contendo 500 µL de KOH (1M) em banho a aproximadamente 70°C por 20 a 30 minutos, para digestão dos tecidos. Em seguida 100 µL de cada amostra foi colocada em tubo de ensaio contendo 17 µL de ácido acético glacial e 500 µL do tampão acetato com amiloglicosidase (para 100 mL de tampão utilizou-se 0,1 mL de amiloglicosidase - atividade 5000-8000 U/mL). As amostras foram, então levadas ao banho-maria 37°C por 2 horas. Ao retirá-las do banho, centrifugou-se por 2 minutos a 8000 rpm e 100 µL do sobrenadante de cada amostra foram pipetados e colocados em tubos de ensaio contendo 1000 µL do tampão Trietanolamina (TEA)+ATP+NADP+HK-G6PDh (tampão de ensaio). Após 40 minutos efetuou-se a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 340nm.

O conteúdo de glicogênio existente na amostra foi expresso em µmol/g de tecido e calculado pela fórmula:

$$\text{Cont.Glicogênio} = \text{D.O.} \times 8,85 \times \frac{1}{m}$$

-D.O. = Densidade ótica amostra

-8,85 = Constante

-m = massa de tecido colhido (g)

TAMPÃO ACETATO (PARA 100 mL)	
Ác. acético glacial(96%)	480 µL
Acetato de Na ⁺	975 mg
pH	4.8

TAMPÃO DE ENSAIO (PARA 100 mL)	
Trietanolamina	5,6 g
MgSO ₄	0,074 g
ATP	0,490 g
NADP	0,050 g
HK/G6PDh	600 µL
pH	7.5

D) DETERMINAÇÃO DO COLESTEROL TOTAL. Foi realizado pelo método enzimático não colorimétrico, conforme Kit Colesterol COD-ANA da Labtest. O colesterol total foi determinado utilizando-se associação da reação de oxidação catalisada pela colesterol oxidase, após hidrólise dos ésteres de colesterol com a reação de TRINDER (1969), com leitura de absorbância em 500 nm. As amostras foram preparadas segundo instruções do fabricante do Kit, e após a leitura foi calculada a concentração de colesterol em mg/dL.

E) DETERMINAÇÃO COLESTEROL HDL. Utilizou-se o sistema para precipitação das lipoproteínas de baixa e de alta densidade (LDL e VLDL) e determinação do colesterol HDL no sobrenadante após centrifugação utilizando-se o sistema enzimático conforme Kit COLESTEROL HDL da Labtest, com leitura de absorbância a 500 nm. Após a leitura da absorbância, a concentração de colesterol HDL foi expressa em mg/dL.

F) DETERMINAÇÃO DOS LIPÍDIOS TOTAIS: Os lipídios do soro reagem com ácido sulfúrico, formando o "íon carbonium", que reage com grupamento carbonil ativado do reagente de cor, produzindo um complexo róseo, que tem absorção máxima em torno de 535nm. A determinação dos lipídios totais do soro pela metodologia sulfofosfovanilina, foi feita segundo Kit Lípidios Totais da Labtest. Seguindo-se as instruções do fabricante do Kit, as amostras foram preparadas e após a leitura da absorbância, a concentração de lipídios totais foi expressa em mg/dL.

G) DETERMINAÇÃO DE TRIACILGLICERÓIS (TAG). Foram determinados pelo método enzimático colorimétrico que utiliza quatro enzimas, conforme o Kit TRIGLICÉRIDES GPO-ANA da Labtest. O glicerol liberado pela hidrólise dos TAG contidos no soro, catalisada pela lipase da lipoproteína é convertido pela ação da glicerolquinase e Mg^{++} em glicerol-3-fosfato, que é oxidado a dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio na presença de glicerolfosfato oxidase. A reação de acoplamento entre o peróxido de

hidrogênio, 4-aminoantipirina e 4-Clorofenol é catalisada pela peroxidase produzindo a antipirilquinoneimina que tem máximo de absorvância em 510 nm. As amostras foram preparadas seguindo as instruções do fabricante, e após a leitura da absorvância, a concentração de TGA foi expressa em mg/dL.

H) ANÁLISE DE ÁCIDOS GRAXOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE. A análise da composição de ácidos graxos do tecido tumoral, tecido hepático e do leite foi feita por Cromatografia Líquida de Alta Performance (High Performance Liquid Chromatography ou HPLC) - Shimadzu. Equipamento com duas bombas (modelo LC-10AD), autoinjeter (mod. SIL-10A) e detector de fluorescência (mod. RF-535). A coluna analítica utilizada para a separação dos ácidos graxos derivatizados foi de fase reversa: shim-pack CLC-C₈ 4,6 mm i.d.x 25 cm com partículas de 5 µm (Shimadzu) precedida de pré-coluna (shim-pack G-ODS 8,0 mm i. d .x 1,5 cm). O software para integração e registro de dados foi o Class LC-10, versão 1,4. Esta análise foi feita a partir do extrato de ácidos graxos obtido através extração lipídica seguida da saponificação das amostras dos tecidos.

Extração dos lipídeos existentes nas amostras foi feita através da adaptação da metodologia descrita por Folch, et. al., (1957). A cada amostra de tecido ou leite foram adicionados 0,5 mL de metanol seguido de agitação, procedimento que promove a desnaturação das proteínas. Em seguida adicionou-se 1mL de clorofórmio e 0,4 mL de PBS; os tubos foram agitados em vórtex e centrifugados a 15.000 rpm por 1 minuto. Este procedimento promove a formação de uma solução bifásica, cuja fase superior (hidrometanólica) foi separada para a reextração. Esta fase foi transferida para outro tubo Eppendorf e foi adicionado 0,5 mL de clorofórmio e 0,5 mL de metanol, novamente agitada em vórtex, centrifugada e a fase superior descartada. Aos extratos clorofórmicos resultantes das duas extrações foi adicionado 1 mL da solução de clorofórmio:metanol:água, na proporção de 3:47:48 (solvente de Folch). Cada amostra foi agitada e centrifugada e, descartou-se a fase superior (hidrometanólica). A fase resultante (orgânica) foi evaporada em Speed-vac (Refrigerated Condensation Trap - SC 110 - Savant). Em seguida, cada tubo foi submetido a uma corrente de N₂ à temperatura ambiente para posterior extração de ácidos graxos.

Saponificação das amostras para obtenção dos ácidos graxos existentes nos extratos lipídicos obtidos dos tecidos e do leite foram ressuspensos em 100 μ L de metanol e saponificadas com 2 mL de uma solução alcalina em metanol (1 mol/L de hidróxido de sódio em metanol a 90%) a 37^oC, permanecendo em banho-maria sob agitação por 2 horas (Beyer & Jensen, 1989; Hamilton et al., 1992; Nishiyama-Naruke et al., 1998). Em seguida, a solução alcalina foi acidificada até, pH 3.0 com ácido clorídrico 1 mol/L. Os ácidos graxos contidos nesta solução foram extraídos 3 vezes com 2 mL de hexano. O solvente foi evaporado e as amostras guardadas em ambiente de N₂, protegidas da luz, à -20 °C, até a derivatização com Bromometil-Metóxi-Coumarin (BMMC) e posterior análise por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC).

Para a análise dos ácidos graxos derivatizados, através do detector de fluorescência, foram realizadas injeções de volumes que variaram de 10 a 50 μ L dos derivados diluídos. O fluxo foi de 1,2 mL/min à temperatura ambiente. Os compostos foram detectados fluorimetricamente, com excitação a 325 nm e emissão a 398 nm. Quanto à fase móvel, foi realizado um gradiente binário com acetonitrila e água. O gradiente linear consistiu de 77 a 90% de acetonitrila até 40 min., os quais foram constantemente desgaseificados com gás hélio.

Reação dos ácidos graxos com Bromometil-Metóxi-Coumarin. A reação foi realizada segundo o método descrito por Abushufa *et alii.*, 1994. Preparou-se os reagentes: de Bromometil-Metóxi-Coumarin dissolvidos em 1 g/mL de acetonitrila (reagente 1), 26,5 mg de 18-crown-6 e 100 mg de carbonato de potássio dissolvidos em 5 ml de acetonitrila (reagente 2). A solução foi sonicada por 30 minutos e outros 5 ml foram adicionados. O sobrenadante foi separado do precipitado e a solução foi estocada em temperatura de 4^oC a 8^oC. As amostras foram reconstituídas em 100 μ L de acetonitrila, homogeneizada em vórtex e filtrada. Após 30 seg., foram adicionados 100 μ L do reagente 1 e 100 μ L do reagente 2. As amostras foram novamente homogeneizadas e mantidas a 60^oC por 15 minutos. Após, estas foram diluídas em igual volume de acetonitrila e transferidas para frascos, onde foram mantidos à 10^oC até o momento da injeção.

I) PREPARO DO MATERIAL BIOLÓGICO PARA ESTUDO POR MICROSCOPIA DE LUZ.

Fragmentos de 5 à 10mm² do tecido tumoral (5 peças de cada grupo experimental) foram fixados em ALFAC (para preparação de 100 mL:85ml de etanol 80%, 10mL de formol e 5mL de ácido acético glacial) por 16 horas. A seguir, os fragmentos de tecido foram desidratados em série alcoólica (80% a 100%), permanecendo 1 hora e 30 min em cada álcool para posterior diafanização em xilol. Para vaporização do xilol, as peças foram embutidas em parafina comum, permanecendo em estufa à 60°C por 2 horas e 30 min. A seguir o material foi emblocado em paraplastic e cortados (cortes de 5 µm) no Micrótomo Leica. Após a montagem das lâminas, os corte foram desparafinizados (2 banhos de xilol de 5 min cada) e hidratados em série alcoólica decrescente (100% a 70%). Em seguida foram corados com Hematoxilina de Harris e Eosina, e fotografados em fotomicroscópio Zeiss Axiophot.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados estão apresentados como médias \pm erro padrão da média dos grupos experimentais e as diferenças estatísticas foram determinadas por one way ANOVA e pós-teste de TUKEY, com nível de significância para $p < 0,05$.

RESULTADOS

Na figura 1 estão apresentados os dados em porcentagem de variação do peso corpóreo das mães das Proles utilizadas no experimento, desde o desmame (21 dias) até a fase adulta, dos grupos controle (C), suplementado com óleo de coco (OC), ou suplementados com óleo de peixe (OP). Animais controle apresentaram ganho de peso de até 400% neste período. A suplementação com os diferentes tipos de ácidos graxos não alterou a porcentagem de variação de peso, quando comparadas entre si ou com o grupo controle ($p>0,05$).

Na figura 2, estão apresentados os dados de ganho de peso corpóreo (%) das mães durante o período gestacional dos grupos: controle (C), suplementado com óleo de coco (OC) ou suplementado com óleo de peixe (OP), durante a gravidez (21 dias). A suplementação com os diferentes tipos de ácidos graxos não alterou, significativamente ($p>0,05$), o ganho de peso quando comparadas ao grupo controle ou entre si.

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

Na figura 3 estão apresentados os dados em porcentagem de variação do peso corpóreo da prole, desde o desmame até a fase adulta (período de 70 dias), dos animais dos grupos controle (C), suplementados com óleo de coco, (OC) ou suplementados com óleo de peixe (OP). Animais do grupo C apresentaram ganho de peso de até 800% neste período. As diferentes suplementações não alteraram, significativamente ($p>0,05$), a porcentagem de variação de peso quando comparadas entre si ou com o controle.

Na figura 4, estão apresentados os valores do peso fresco do tumor (g) dos animais portadores de tumor (C+T) e dos portadores de tumor suplementados com: óleo de coco (OC+T) ou óleo de peixe (OP+T), logo após terem sido sacrificados. Houve redução significativa ($p<0,05$) da massa tumoral no grupo OP+T, sendo o tumor 2,5 vezes menor quando comparado à dos grupos C+T e OC+T.

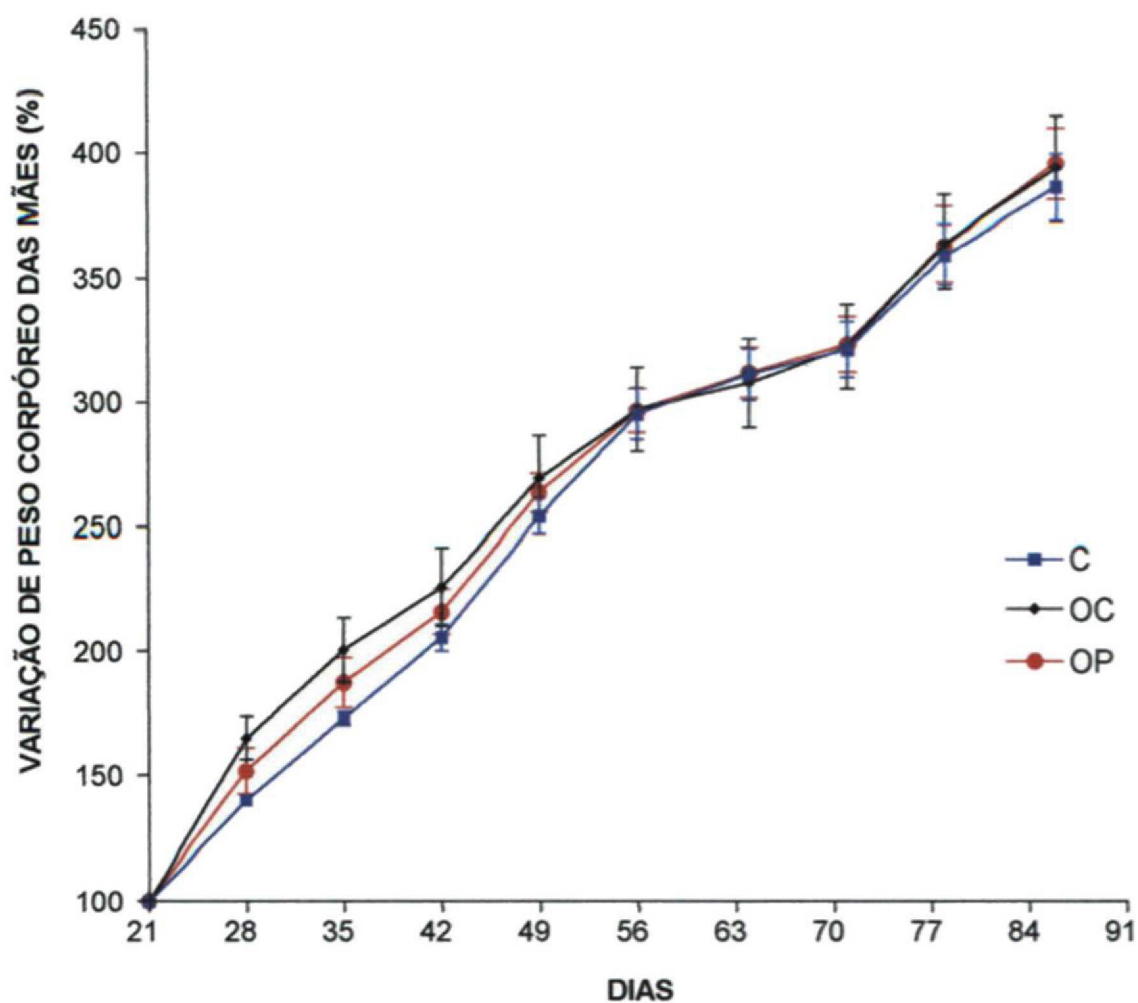


FIGURA 1: Porcentagem de variação de peso corpóreo (%) das fêmeas progenitoras das proles estudadas, do grupo controle (C), do grupo suplementado com óleo de coco (OC) e do grupo suplementado com óleo de peixe (OP), desde o desmame (21 dias) até a fase adulta (91 dias), em intervalos de 7 dias. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média de 18 animais por grupo.

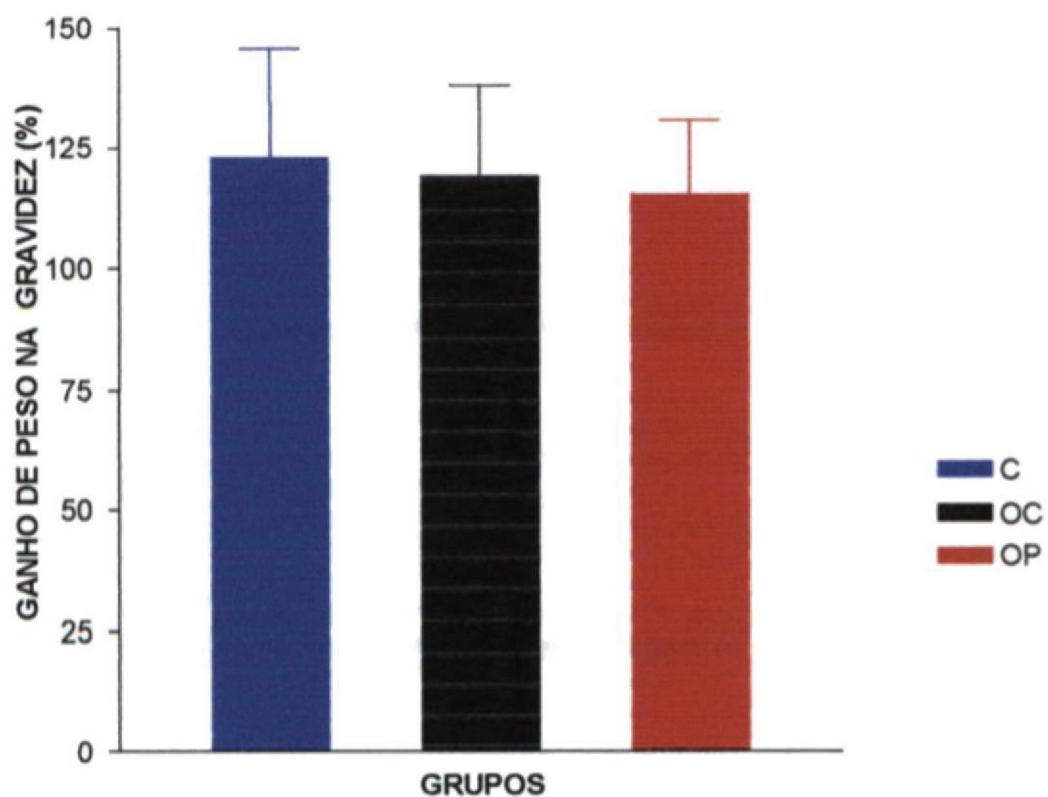


FIGURA 2. Ganho de peso corpóreo das Fêmeas (%), durante o período gestacional: do grupo controle (C), do grupo suplementado com óleo de coco (OC) e do grupo suplementado com óleo de peixe (OP), durante a gravidez (21 dias) em intervalos de 7 dias. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média de 10 animais por grupo.

TABELA 1: Peso total (g) das Proles geradas por mães dos grupos controle (C), suplementado com óleo de coco (OC) ou com óleo de peixe (OP), no nascimento e no desmame (período de 21 dias). Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média de 3 ninhadas (90 animais) geradas por 6 fêmeas de cada grupo.

PROLE	GRUPO C	GRUPO OC	GRUPO OP
PESO (g) NO NASCIMENTO	63,44 \pm 5,62	56,90 \pm 4,16	55,20 \pm 4,19
PESO (g) NO DESMAME	315,78 \pm 30,62	293,80 \pm 20,25	281,86 \pm 22,2

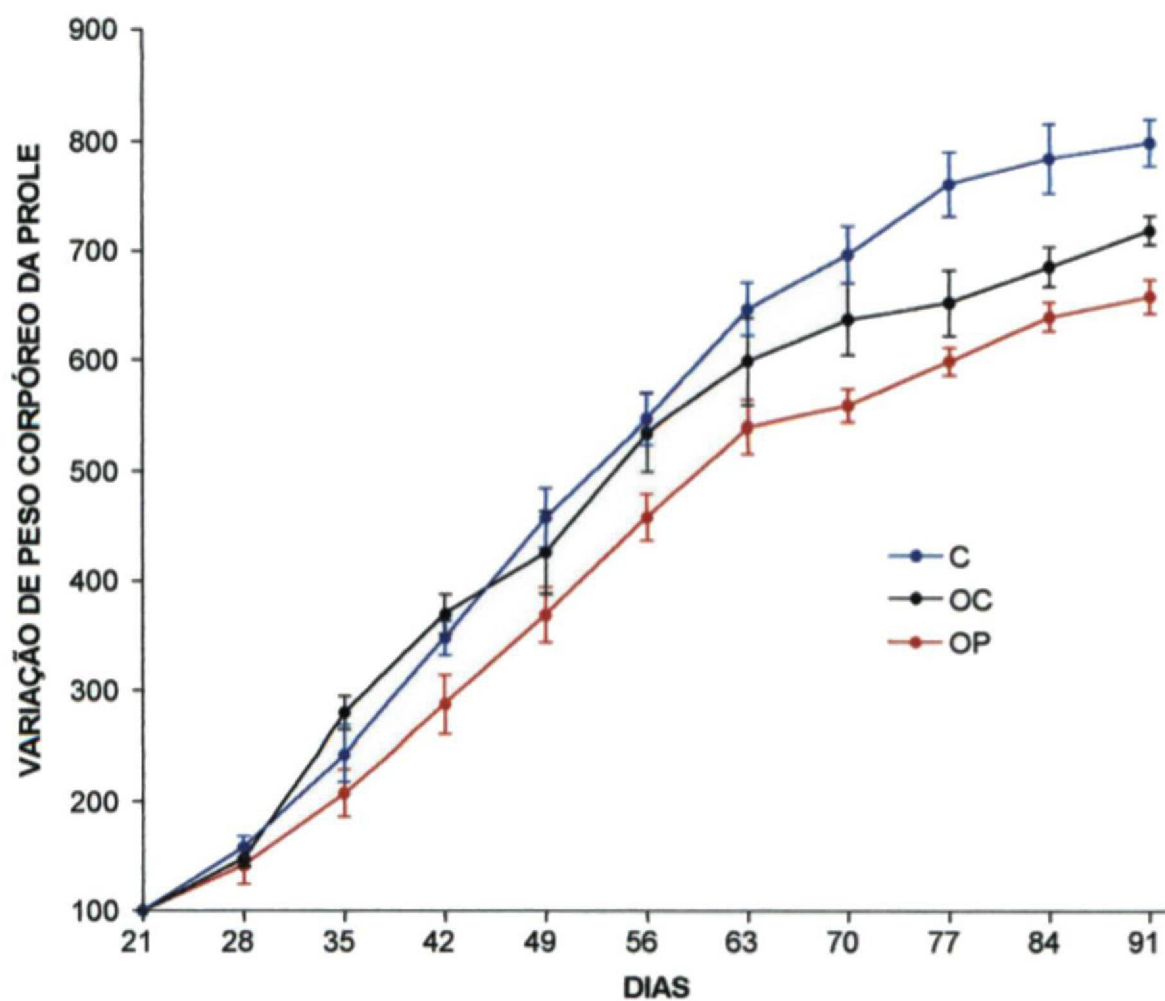


FIGURA 3: Porcentagem de variação de peso corpóreo da prole dos grupos controle (C), suplementado com óleo de coco (OC) e suplementado com óleo de peixe (OP), desde o desmame (21 dias) até a fase adulta (91 dias), em intervalos de 7 dias. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média de 18 animais por grupo.

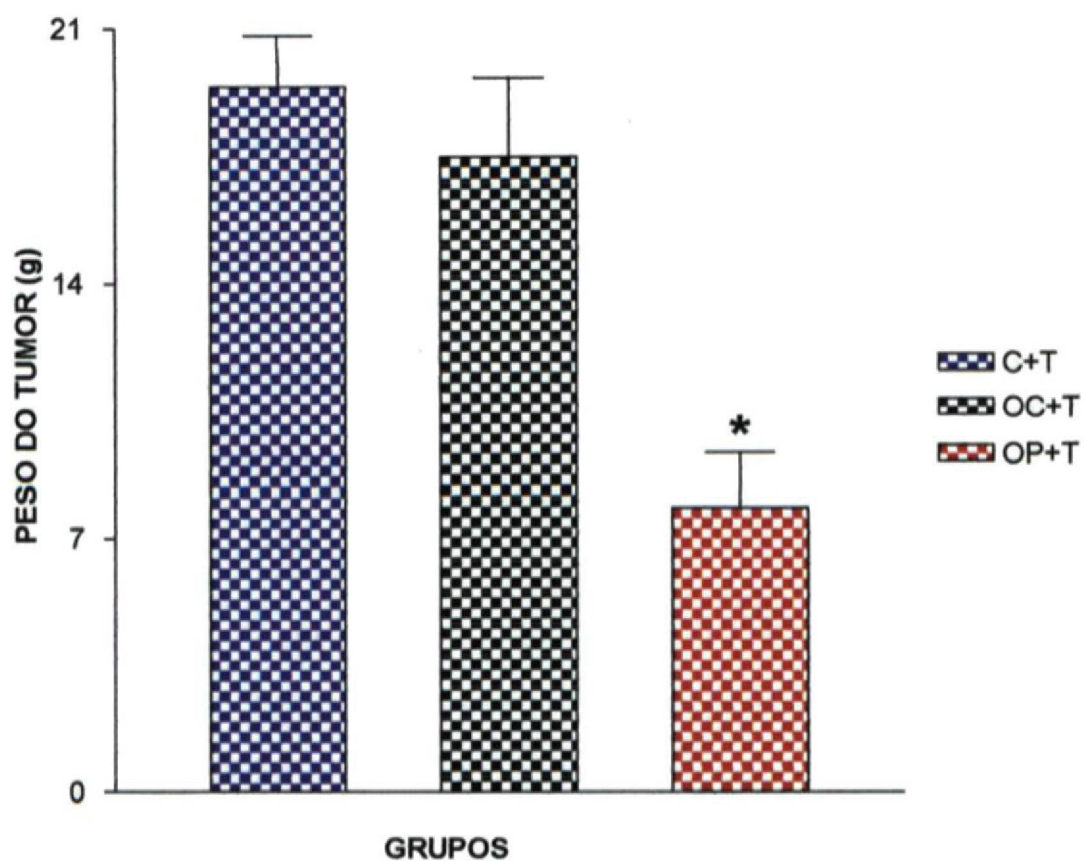


FIGURA 4: Peso fresco do tumor (g) dos animais portadores de tumor (C+T) e dos animais portadores de tumor suplementados com: óleo de coco (OC+T) ou óleo de peixe (OP+T). * Diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparada ao grupo C+T e OC+T. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média de 12 animais do grupo C+T, 10 animais do grupo OC+T e de 12 animais do grupo OP+T.

Na tabela 2 estão apresentados os dados do peso corpóreo (g), antes da inoculação do tumor e após 14 dias da inoculação, peso fresco do tumor (g), peso da carcaça (peso do animal subtraído o peso do tumor) dos animais do grupo portadores de tumor (C+T), dos grupos portadores de tumor suplementados com óleo de coco (OC+T) ou óleo de peixe (OP+T). Ao final de 14 dias, no grupo C+T o tumor representou 7,49% do peso corpóreo do animal, 6,24% no grupo OC+T e 2,84% no grupo OP+T. A porcentagem de variação de peso corpóreo no grupo C+T foi de -6,7%, no grupo OC+T foi de -6% e no OP+T -1,3%.

Na figura 5 estão apresentadas as concentrações de glicose sérica (mg/dL) dos animais do grupo controle (C), do grupo suplementado com óleo de coco (OC), do grupo suplementado com óleo de peixe (OP), dos animais portadores de tumor (C+T), portadores de tumor suplementados com óleo de coco (OC+T) e portadores de tumor suplementados com óleo de peixe (OP+T). Todos os grupos portadores de tumor apresentaram redução significativa da glicemia quando comparados aos grupos C, OC e OP. O grupo OP+T mostrou recuperação da glicemia quando comparado aos grupos C+T e OC+T ($p < 0,05$), mas não retornou aos valores normais ($p < 0,05$).

Na figura 6 estão apresentados os valores de lactato sérico ($\mu\text{mol/mL}$) dos animais do grupo controle (C), do grupo suplementado com óleo de coco (OC); do grupo suplementado com óleo de peixe (OP), do grupo portador de tumor (C+T), portador de tumor suplementado com óleo de coco (OC+T) ou suplementado com óleo de peixe (OP+T). Animais sem tumor suplementados com óleo de coco (OC) ou com óleo de peixe (OP) não apresentaram alteração do lactato sérico quando comparados ao animais do grupo C ($p > 0,05$). Os animais portadores de tumor dos grupos C+T e OC+T tiveram aumento de, aproximadamente 1,6 vez na concentração de lactato sérico quando comparados ao grupo sem tumor ($p < 0,05$). Já no grupo OP+T, a laticidemia não foi diferente da observada no grupo controle ($p > 0,05$), mas foi 1,4 vez menor ($p < 0,05$) que a laticidemia dos grupos C+T e OC+T.

TABELA 2: Peso corpóreo, do tumor e da carcaça dos animais portadores de tumor do grupo (C+T), portadores de tumor suplementados com óleo de coco (OC+T) ou óleo de peixe (OP+T) no período de 14 dias. [#] Diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparada aos grupos C+T e OC+T. Os dados estão representados como média \pm erro padrão da média de 12 animais do grupo C+T, 10 do grupo SAT+T e de 12 animais do grupo OP+T.

	GRUPOS DOS RATOS PORTADORES DE TUMOR W256		
	C+T	OC+T	OP+T
PESO CORPÓREO (g) ANTES DA INOCULAÇÃO DO TUMOR	257,3 \pm 10,7	282,2 \pm 12,3	271,4 \pm 9,3
PESO CORPÓREO (g) NO 14 ^º DIAS DE INOCULAÇÃO DO TUMOR	258,90 \pm 8,90	280,2 \pm 6,8	276,8 \pm 11,3
PESO DO TUMOR (g)	19,4 \pm 1,4	17,5 \pm 2,2	7,87 \pm 1,50 [#]
PESO DA CARÇAÇA (g)	239,0 \pm 9,2	262,70 \pm 7,3	269,0 \pm 12,6
VARIAÇÃO DO PESO CORPÓREO (g)	- 17,8 \pm 3,3	- 19,5 \pm 9,6	- 2,4 \pm 5,5
VARIAÇÃO DO PESO CORPÓREO (%)	- 6,7 \pm 1,2	- 6,0 \pm 2,70	- 1,3 \pm 2,2

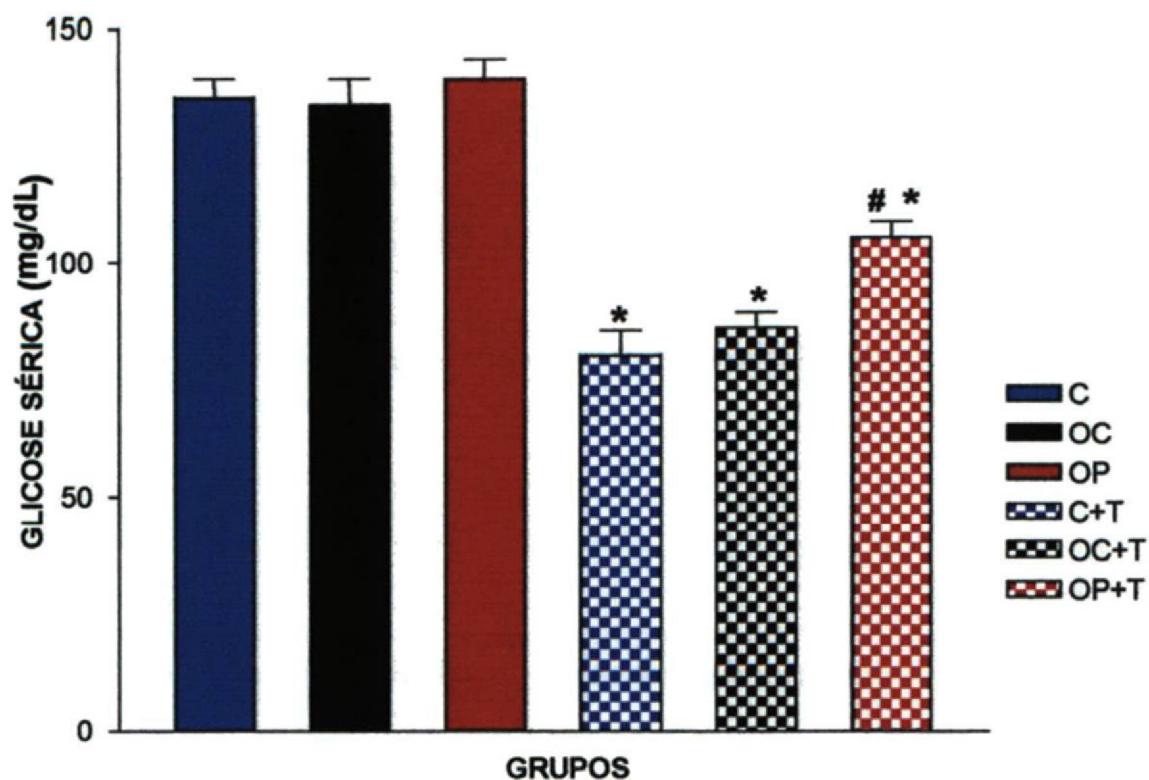


FIGURA 5: Concentração da glicose sérica (mg/dL) dos animais do grupo controle (C), do grupo suplementado com óleo de coco (OC), do grupo suplementado com óleo de peixe (OP), dos animais portadores de tumor (C+T), portadores de tumor suplementados com óleo de coco (OC+T) e portadores de tumor suplementados com óleo de peixe (OP+T). *Diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparada aos grupos C, OC e OP. #Diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparada aos grupos C+T e OC+T. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média de 25 animais do grupo C, 15 do grupo OC e de 15 animais do grupo OP e de 14 animais do grupo C+T, 17 do grupo OC+T e de 13 animais do grupo OP+T.

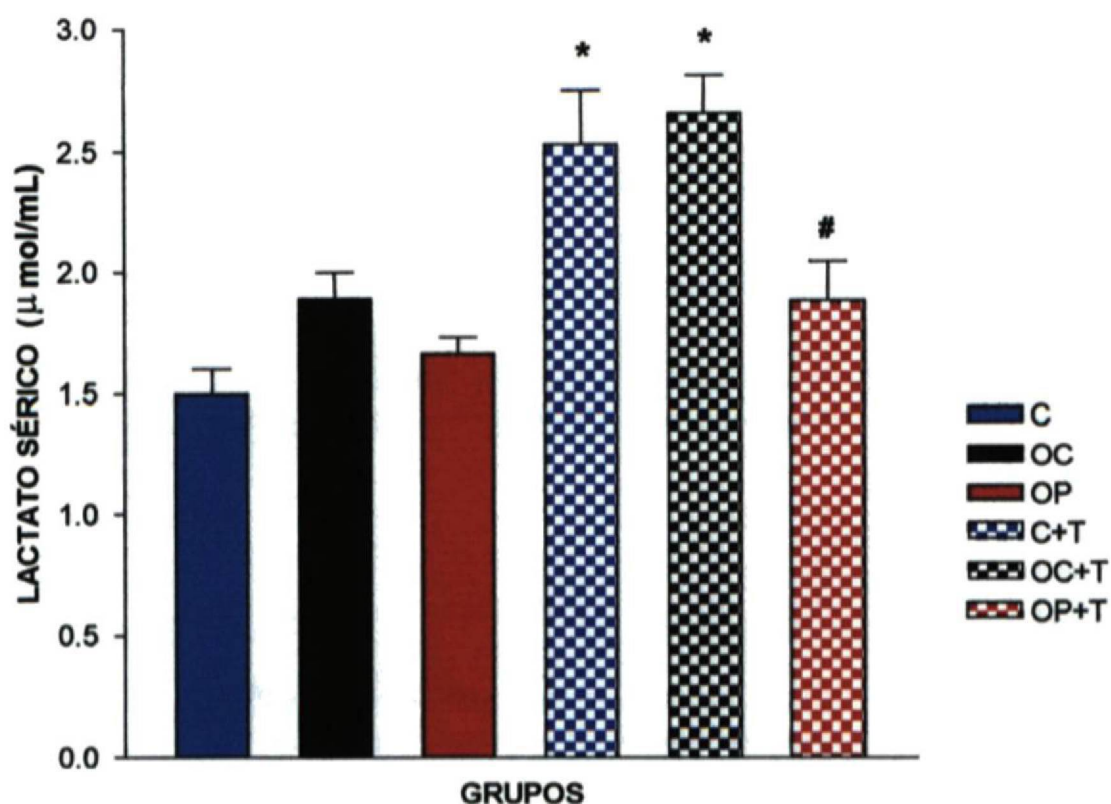


FIGURA 6: Lactato sérico ($\mu\text{mol/mL}$) dos animais do grupo controle (C), do grupo suplementado com óleo de coco (OC), do grupo suplementado com óleo de peixe (OP) e dos animais do grupo portadores de tumor (C+T), portadores de tumor suplementados com óleo de coco (OC+T) e portadores de tumor suplementados com óleo de peixe (OP+T). *Diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparada aos grupos C, OC e OP. #Diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparada aos grupos C+T e OC+T. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média de 18 animais do grupo C, 15 animais do grupo SA, 15 animais do PI e de 14 animais do grupo C+T, 12 do grupo OC+T e de 16 animais do grupo OP+T.

Na tabela 3 estão apresentados os valores de conteúdo de glicogênio ($\mu\text{mol/g}$ de tec.) no fígado, músculo sóleo, músculo gastrocnêmio e as concentrações séricas (mg/dL) de colesterol, colesterol HDL e triacilgliceróis dos animais do grupo controle (C), suplementados com óleo de coco (OC), suplementados com óleo de peixe (OP) e dos animais portadores de tumor (C+T), portadores de tumor suplementados com óleo de coco (OC+T) e portadores de tumor suplementados com óleo de peixe (OP+T). Nos animais suplementados com óleo de coco (OC) ou óleo de peixe (OP) não houve alteração significativa do conteúdo de glicogênio hepático e muscular, quando comparados ao grupo C. O conteúdo de glicogênio hepático foi reduzido em 1,7 vezes nos grupos C+T e OC+T e em 1,15 vezes no grupo OP+T, quando comparado ao dos animais não portadores de tumor (C). A suplementação com óleo de coco (OC) ou com óleo de peixe, não afetou o conteúdo de glicogênio dos músculos sóleo (vermelho) e gastrocnêmio (branco) quando comparado ao do grupo controle (C). Animais portadores de tumor (C+T) e portadores de tumor suplementados com óleo de coco (OC+T) tiveram redução de 1,5 e 1,7 vezes no conteúdo de glicogênio do músculo sóleo quando comparados aos grupos C, OC e OP ($p < 0,05$). No grupo OP+T não houve redução significativa ($p > 0,05$) do conteúdo de glicogênio do músculo sóleo, não sendo diferentes do grupo controle. No músculo gastrocnêmio, a redução do conteúdo glicogênio no grupo C+T e no OC+T foi de, aproximadamente, 1,4 vezes quando comparados ao C e de 1,6 vezes quando comparados ao OC e OP. Nos ratos do grupo OP+T os valores de conteúdo de glicogênio foram 1,3 vezes maior que a dos grupos C+T e OC+T, no entanto, ainda permaneceram reduzidos ($p < 0,05$) quando comparados ao dos animais do grupo controle.

Animais suplementados com óleo de coco não tiveram alteração da concentração de colesterol sérico quando comparados ao grupo controle. Nos animais suplementados com óleo de peixe (OP) o colesterol sérico foi 1,2 e 1,3 vezes menores quando comparados aos grupos C e SA (tabela 3). Quando comparados aos grupos C e SA, a concentração sérica de colesterol dos animais portadores de tumor (C+T) foi, respectivamente, 1,3 e 1,4 vezes menor. No grupo OP+T houve redução da concentração sérica de colesterol de 1,4 vezes quando comparada à dos grupos C ou OC.

Nos ratos dos grupos suplementados com óleo de coco (OC e OC+T), a concentração sérica de colesterol obtidos não foi diferente ($p>0,05$) das observadas nos demais grupos (tabela 3).

A concentração sérica de colesterol HDL (tabela 3) não foi alterada pelos diferentes tipos de suplementação, nos indivíduos sem tumor, quando comparada à do grupo controle ($p<0,05$). Nos grupos de animais portadores de tumor houve redução de 1,8 vezes do colesterol HDL, quando comparados aos grupos não portadores de tumor C ou OC e de 1,7 vezes quando comparados ao grupo OP ($p<0,05$).

Animais do grupo OP (tabela 3) apresentaram redução de 1,4 vezes na concentração de triacilglicerol sérico (TAG), quando comparados ao grupo C ($p<0,05$). Animais do grupo C+T tiveram aumento de 1,7 e 2 vezes na concentração de TAG quando comparados ao grupo C e OC respectivamente ($p<0,05$). Nos grupos OC+T e OP+T tiveram aumento de 1,3, de 1,6 e de 1,7 vezes na concentração sérica de triacilglicerol, quando comparados aos grupos C, OC e OP ($p<0,05$) respectivamente. Nos grupos OC+T e OP+T a concentração sérica de TAG foi 1,3 vezes menor quando comparada ao grupo C+T ($p<0,05$).

TABELA 3: Conteúdo de glicogênio hepático e muscular ($\mu\text{mol/g}$ de tec) e concentração sérica (mg/dL) de colesterol, colesterol HDL e triacilglicerol dos animais do grupo controle (C), animais suplementados com óleo de coco (OC), animais suplementados com óleo de peixe (OP), dos animais portadores de tumor não suplementados (C+T), portadores de tumor suplementados com óleo de coco (OC+T) e portadores de tumor suplementados com óleo de peixe (OP+T). ^aDiferença significativa ($p<0,05$) quando comparado aos grupos C. ⁺Diferença significativa ($p<0,05$) quando comparado aos grupos C e OC. ^{*}Diferença significativa ($p<0,05$) quando comparado aos grupos C, OC e OP. ^bDiferença significativa ($p<0,05$) quando comparado aos grupos C+T. [#]Diferença significativa ($p<0,05$) quando comparado aos grupos C+T e OC+T. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média de 25 animais do grupo C, 15 do grupo OC e de 15 animais do grupo OP e de 14 animais do grupo C+T, 11 do grupo OC+T e de 13 animais do grupo OP+T.

PARÂMETRO METABÓLICO	GRUPOS CONTROLE			GRUPOS PORTADORES TUMOR W256		
	C	OC	OP	C+T	OC+T	OP+T
Glicogênio Hepático ($\mu\text{mol/g}$ tec.)	111,1 \pm 4,4	101,6 \pm 7,3	105,0 \pm 7,9	65,5 \pm 6,7 [*]	67,1 \pm 6,3 [*]	96,3 \pm 4,3 ^{*#}
Glicogênio Sóleo ($\mu\text{mol/g}$ tec.)	36,5 \pm 2,2	35,6 \pm 2,8	36,2 \pm 3,7	23,7 \pm 2,0 [*]	21,1 \pm 1,3 [*]	28,4 \pm 1,6
Glicogênio Gastrocnêmio ($\mu\text{mol/g}$ tec.)	43,1 \pm 2,0	48,9 \pm 3,5	50,3 \pm 3,5	29,4 \pm 1,6 [*]	30,1 \pm 2,2 [*]	39,2 \pm 1,4 ^{*#}
Colesterol Sérico (mg/dL)	76,53 \pm 2,5	81,0 \pm 6,1	62,3 \pm 2,1 ⁺	56,9 \pm 4,4 ⁺	64,5 \pm 4,3	55,8 \pm 2,3 ⁺
Colesterol HDL-sérico (mg/dL)	40,5 \pm 1,4	40,4 \pm 1,9	38,2 \pm 1,0	21,5 \pm 1,9 [*]	20,1 \pm 1,3 [*]	24,2 \pm 1,4 [*]
Triacilglicerol sérico (mg/dL)	84,9 \pm 12,2	70,2 \pm 12,6	68,6 \pm 9,0 ^a	145,6 \pm 14,8 [*]	110,0 \pm 16,9 ^{*b}	119,9 \pm 12,9 ^{*b}

A figura 7 apresenta a curva de sobrevivência (%) dos animais portadores de tumor (C+T) e dos portadores de tumor suplementados com: óleo de coco (OC+T) ou óleo de peixe (OP+T). Respectivamente 10, 15 e 12 animais dos grupos C+T, OC+T e OP+T foram inicialmente inoculados com a suspensão de células tumorais, sendo estes considerados como 100%. Após 5 dias da inoculação, 93% dos animais do grupo OC+T continuavam vivos, enquanto que nos grupos C+T e OP+T 100% dos animais estavam vivos. Após 10 dias da inoculação 80% animais continuavam vivos no grupo OC+T, enquanto que nos grupos C+T e OP+T não houve alteração. No 15º dia todos os grupos apresentaram redução da porcentagem de animais sobreviventes, apenas 40% dos animais no grupo SAT+T, 90% no C+T e 83% no OP+T. No 20º dia nos grupos C+T e OC+T restavam 80% e 27% respectivamente, enquanto que no grupo OP+T não houve morte neste intervalo. No 25º dia todos os grupos apresentaram queda da curva de sobreviventes, sendo que 13% animais no grupo OC+T, 40% no C+T e 50% no OP+T permaneciam vivos. Ao final de 30 dias da inoculação, quando os animais foram sacrificados, 30% dos animais estavam vivos no grupo C, 13% no OC+T e 50% no grupo OP+T, mostrando que a suplementação com óleo de peixe tende a melhorar a taxa de sobrevivência em ratos portadores de W256.

A tabela 4 apresenta a composição de ácidos graxos no tumor (%) dos grupos experimentais. Nos grupos (OC+T) ou (OP+T) houve alteração na composição dos ácidos graxos no tumor, quando comparados entre si e com o grupo não suplementado (C+T). A porcentagem de ácido mirístico (14:0) e láurico (12:0) foram, respectivamente 1,6 e 4,6 vezes menor no grupo OP+T quando comparado ao grupo C+T ($p < 0,05$), enquanto a porcentagem dos ácidos ômega-3: eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) foram, respectivamente 1,5 e 1,7 vez maior que as observadas no grupo C+T ($p < 0,05$), sendo ainda 3,9 e 2,8 vezes maior que as porcentagens destes ácidos no grupo OC+T ($p < 0,05$). Já no grupo OC+T, houve aumento significativo na proporção dos ácidos linolênico (18:3 n-3) e linolêico (18:2 n-6) quando comparada aos grupos C+T e OP+T, enquanto a porcentagem dos ácidos araquidônico (20:4 n-6), oléico (18:1 n-9), esteárico (18:0) e palmítico (16:0) foram significativamente menores no grupo OC+T, quando comparadas aos demais grupos ($p < 0,05$).

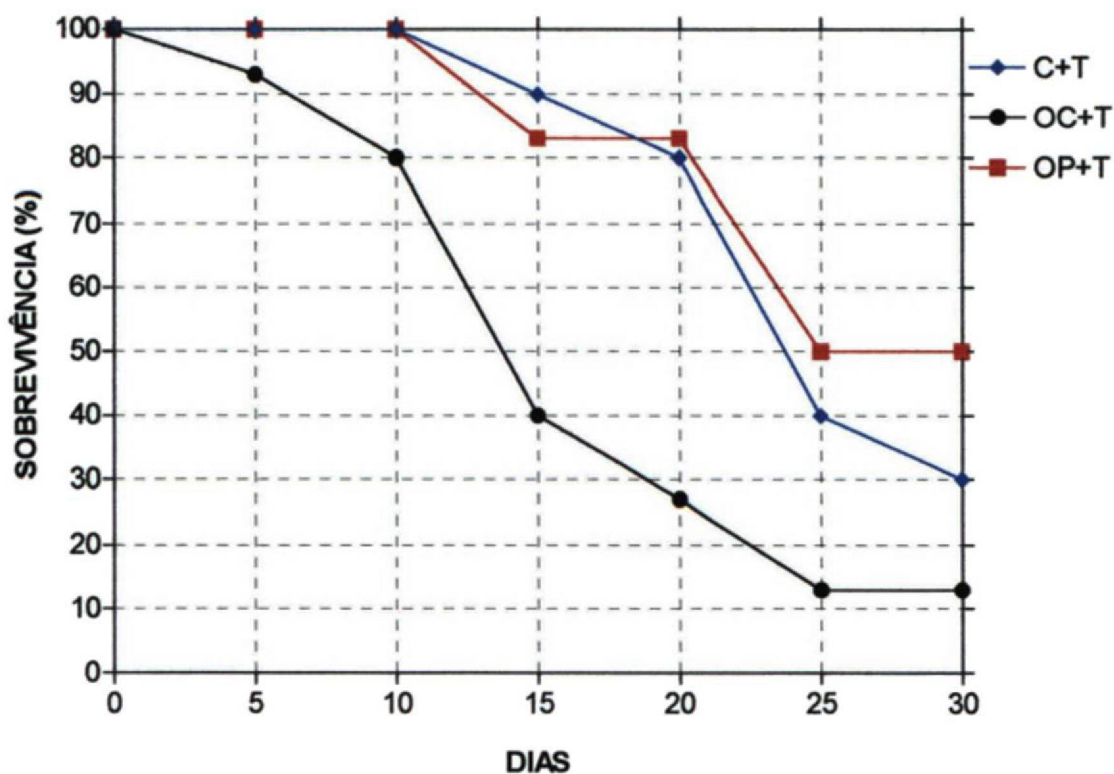


FIGURA 7: Curva de sobrevivência (%) dos animais portadores de tumor do grupo controle (C+T) e dos animais portadores de tumor suplementados com: óleo de coco, (OC+T) e óleo de peixe (OP+T). Os dados representam a porcentagem de animais vivos ao longo de 30 dias. O número inicial de animais no grupo C+T foi de 10; no grupo OC+T foi de 15 e de 12 animais no grupo OP+T. No 30º dia, quando todos os animais sobreviventes foram sacrificados, restavam 3 ratos no grupo C+T, 2 no grupo OC+T e 6 animais no grupo OP+T.

TABELA 4: Composição de ácidos graxos no tecido tumoral (%) dos animais portadores de tumor não suplementados (C+T), suplementados com óleo de coco (OC+T) ou suplementados com óleo de peixe (OP+T). ^aDiferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado aos grupos C+T.. [#]Diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado aos grupos C+T e OC+T. ^bDiferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado aos grupos C+T e OP+T. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média de 11 animais do grupo C+T, 8 do grupo OC+T e de 6 animais do grupo OP+T.

	GRUPOS		
	C+T	OC+T	OP+T
ESTEÁRICO (18:0)	14.5 \pm 0.54	9.8 ^b \pm 0.97	18.9 \pm 2.03
PALMÍTICO (16:0)	20.3 \pm 0.2	18.0 ^b \pm 0.7	20.7 \pm 0.8
MIRÍSTICO (14:0)	3.2 \pm 0.2	2.6 \pm 0.15	1.97 [#] \pm 0.4
LÁURICO (12:0)	3.14 \pm 0.45	1.8 \pm 0.17	0.7 ^a \pm 0.2
PALMITOLÊICO (16:1 n-7)	0.6 \pm 0.13	3.36 \pm 0.36	–
OLÊICO (18:1 n-9)	14.9 \pm 0.2	19.8 ^b \pm 0.6	15.6 \pm 0.8
LINOLÊICO (18:2 n-6)	19.5 \pm 0.6	30.02 ^b \pm 1.2	21.04 \pm 2.7
LINOLÊNICO (18:3 n-3)	0.55 \pm 0.03	1.7 ^b \pm 0.1	0.54 \pm 0.1
AA (20:4 n-6)	17.1 \pm 0.85	9.2 ^b \pm 0.7	16.0 \pm 0.97
EPA(20:5 n-3)	0.9 \pm 0.13	0.3 ^b \pm 0.02	1.35 [#] \pm 0.21
DHA (22:6 n-3)	3.3 \pm 0.08	2.02 \pm 0.13	5.7 [#] \pm 1.24

A figura 8 apresenta a relação entre os índices de insaturação no tecido tumoral dos grupos de animais portadores de tumor não suplementados (C+T), suplementados com óleo de coco (OC+T) ou suplementados com óleo de peixe (OP+T), cujos valores foram 150; 139 e 164 respectivamente. No grupo de animais portadores de tumor suplementados com óleo de peixe houve aumento de 9,4% no índice de insaturação do tumor, quando comparado ao C+T e de 18,3% quando comparado ao grupo OC+T.

Na figura 9 estão apresentadas as porcentagens de ácidos graxos poliinsaturados ω -3 e ω -6 presentes no tumor dos animais dos grupos portadores de tumor (C+T) e portadores de tumor suplementados com óleo de coco (OC+T) ou com óleo de peixe (OP+T). A porcentagem de n-3 no tumor do grupo OP+T foi, respectivamente, 1,5 e 2 vezes maior que àquelas encontradas nos grupos C+T e OC+T.

FIGURA 8: Índice de insaturação do tecido tumoral (%) dos grupos portadores de tumor não suplementados (C+T), suplementados com óleo de coco (OC+T) ou suplementados com óleo de peixe (OP+T).

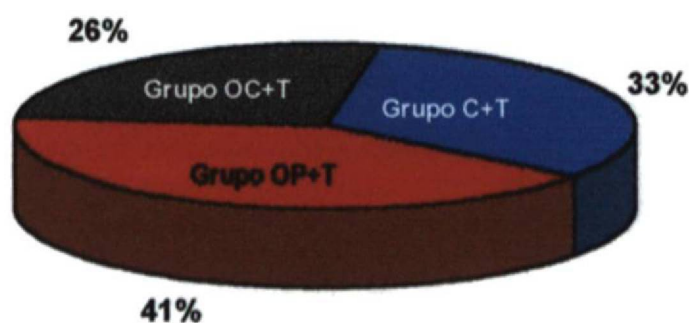
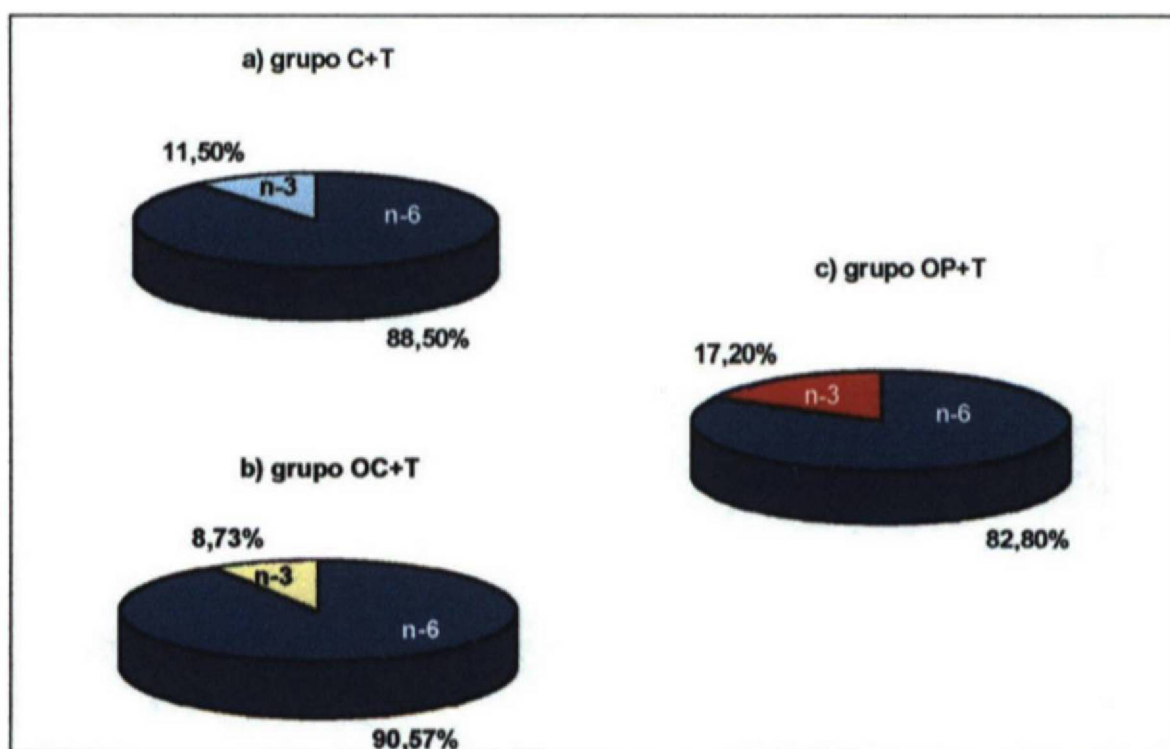


FIGURA 9: Porcentagens dos ácidos graxos n-3 e n-6 presentes no tumor dos animais dos grupos: a) portadores de tumor (C+T), b) portadores de tumor suplementados com óleo de coco (OC+T) e c) portadores de tumor suplementados com óleo de peixe (OP+T).



Na tabela 5 estão apresentados os valores de porcentagem de ácidos graxos e o índice de insaturação no fígado do grupo de animais controle (C); suplementados com óleo de coco (OC), suplementados com óleo de peixe (OP) portadores de tumor (C+T), portadores de tumor suplementados com óleo de coco (OC+T) e portadores de tumor suplementados com óleo de peixe (OP+T). No grupo OP a porcentagem de EPA foi 3 vezes maior quando comparada aos grupos C e OC, enquanto que a proporção do DHA foi 1,5 vez maior que a do grupo C. Já no grupo OP+T, houve aumento de 2,5 vezes na proporção de EPA quando comparada à grupos C, e de 3 vezes quando comparada ao grupo OC+T. O grupo OP+T apresentou, ainda, redução 1,3 vez na porcentagem de ácido láurico, quando comparado ao C e de 1,1 vez na porcentagem de ácido linolênico quando comparado ao C+T. Animais não portadores de tumor, quando suplementados com óleo de peixe tiveram aumento de 1,2 vez no índice de insaturação hepático, quando comparados aos animais controle. Os animais portadores de tumor dos grupos C+T, OC+T e OP+T apresentaram menores índices de insaturação hepático, respectivamente, 216, 237 e 210 quando comparados aos animais não portadores de tumor.

A tabela 6 apresenta a composição de ácidos graxos (%) e o índice de insaturação do leite extraído das mães dos grupos controle (C), suplementadas com óleo de coco (OC) ou suplementadas com óleo de peixe (OP), logo após o desmame da prole. O grupo PI apresentou aumento significativo de EPA e DHA, sendo que a proporção destes ácidos foi, 1,0 e 1,2 vezes maior que às proporções observadas nos grupos C e OC respectivamente. Houve ainda, redução de 1,4 vez na proporção do ácido palmítico no grupo OP quando comparado ao grupo C e OC e, aumento de 1,41 vez na proporção de ácido láurico quando comparado ao C. O leite das mães suplementadas com óleo de peixe (OP) apresentou índice de insaturação 1,6 vez maior que os índices dos grupos C e OC.

Na figura 10 estão apresentadas as fotos do tecido tumoral dos animais portadores de tumor (C+T), portadores de tumor suplementados com óleo de coco (OC+T) ou com óleo de peixe (OP+T); em microscopia óptica. As diferentes suplementações não produziram alterações morfológicas importantes no tecido tumoral quando comparados ao grupo não suplementado (C).

TABELA 5: Porcentagens de ácidos graxos e o índice de insaturação no fígado dos animais não suplementados (C), suplementados com óleo de coco (OC), suplementados com óleo de peixe (OP) e dos animais portadores de tumor não suplementados (C+T), portadores de tumor suplementados com óleo de coco (OC+T) e portadores de tumor suplementados com óleo de peixe (OP+T). ^aDiferença significativa ($p < 0,05$) quando comparada aos grupos C. ^{*}Diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparada aos grupos C, OC, C+T e OC+T. ^bDiferença significativa ($p < 0,05$) quando comparada aos grupos C+T. [#]Diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparada aos grupos OC+T. Os dados estão apresentados como média \pm EPM de 6 animais do grupo C, 6 do grupo OC e de 6 animais do grupo OP e de 7 animais do grupo C+T, 7 do grupo OC+T e de 7 animais do grupo OP+T.

ÁCIDOS GRAXOS NO FÍGADO	GRUPOS						
	(%)	C	OC	OP	C+T	OC+T	OP+T
Láurico		0,4 \pm 0,05	0,9 \pm 0,2	0,3 \pm 0,03 ^a	3,0 \pm 1,1	1,3 \pm 0,8	0,2 \pm 0,04 ^a
EPA		1,0 \pm 0,2	1,2 \pm 0,3	3,6 \pm 0,1 [*]	1,3 \pm 0,5	0,8 \pm 0,2	2,5 \pm 0,3 ^{a#}
Linolênico		0,8 \pm 0,1	1,4 \pm 0,7	0,8 \pm 0,2	0,8 \pm 0,3	0,8 \pm 0,2	0,7 \pm 0,05 ^b
DHA		10,9 \pm 1,7	15,2 \pm 1,2	17,2 \pm 1,6 ^b	8,3 \pm 3,2	10,0 \pm 1,3	9,6 \pm 0,7
Mirístico		0,1 \pm 0,0	0,5 \pm 0,3	0,1 \pm 0,1	2,7 \pm 1,0	1,4 \pm 0,6	0,4 \pm 0,1
Araquidônico		33,1 \pm 4,6	34,4 \pm 4,2	34,6 \pm 2,1	24,8 \pm 9,4	29,0 \pm 2,6	21,9 \pm 1,8
Palmitolêico		ND	ND	ND	ND	ND	ND
Linolêico		20,8 \pm 2,5	18,9 \pm 1,5	21,0 \pm 2,0	24,1 \pm 9,1	22,7 \pm 1,0	21,1 \pm 1,4
Palmitico		9,0 \pm 1,2	11,0 \pm 3,0	7,5 \pm 1,0	15,9 \pm 6,0	13,9 \pm 2,4	16,7 \pm 0,9
Oléico		8,4 \pm 0,7	8,3 \pm 0,5	7,8 \pm 0,5	9,8 \pm 3,7	9,3 \pm 1,6	7,9 \pm 0,5
Estearico		4,5 \pm 0,9	5,9 \pm 1,9	4,3 \pm 1,3 ^a	8,2 \pm 3,1	10,5 \pm 1,9	13,6 \pm 0,8
Índice de insaturação		255,2	285,1	311,8	215,9	237,1	209,9

TABELA 6: Composição de ácidos graxos no leite (%) das fêmeas não suplementadas (C), suplementadas com óleo de coco (OC) e suplementadas com óleo de peixe (OP).
^aDiferença significativa ($p < 0,05$), quando comparado aos grupos C. ^bDiferença significativa ($p < 0,05$), quando comparado aos grupos C e OC. Os dados estão representados como média \pm erro padrão da média de 12 animais do grupo C, 7 do grupo OC e de 7 animais do grupo OP.

ÁCIDOS GRAXOS NO LEITE (%)	GRUPOS		
	C	OC	OP
LÁURICO (12:0)	9,18 \pm 0,52	11,64 \pm 0,54	12,96 ^a \pm 1,68
EPA(20:5 n-3)	4,34 \pm 1,62	3,6 \pm 2,3	8,0 ^b \pm 0,7
LINOLÊNICO (18:3 n-3)	2,45 \pm 0,69	1,46 \pm 0,72	1,87 \pm 0,83
DHA (22:6 n-3)	2,07 \pm 0,48	2,3 \pm 0,72	4,84 ^b \pm 0,9
MIRÍSTICO(14:0)	5,96 \pm 1,21	3,48 \pm 1,75	3,47 \pm 1,14
AA (20:4 n-6)	5,5 \pm 2,2	2,2 \pm 0,2	3,4 \pm 0,9
PALMITOLÉICO (16:1 n-7)	1,53 \pm 0,48	2,02 \pm 0,4	1,94 \pm 0,63
LINOLÉICO (18:2 n-6)	32,7 \pm 3,2	31,7 \pm 4,2	26,3 \pm 3,2
PALMÍTICO (16:0)	17,46 \pm 2,1	17,5 \pm 1,75	12,74 ^b \pm 3,02
OLÉICO (18:1 n-9)	13,35 \pm 0,92	14,54 \pm 0,67	13,68 \pm 2,04
ESTEÁRICO (18:0)	5,15 \pm 1,28	4,28 \pm 0,97	3,34 \pm 0,65
ÍNDICE DE INSATURAÇÃO	143,5	125,8	156,4

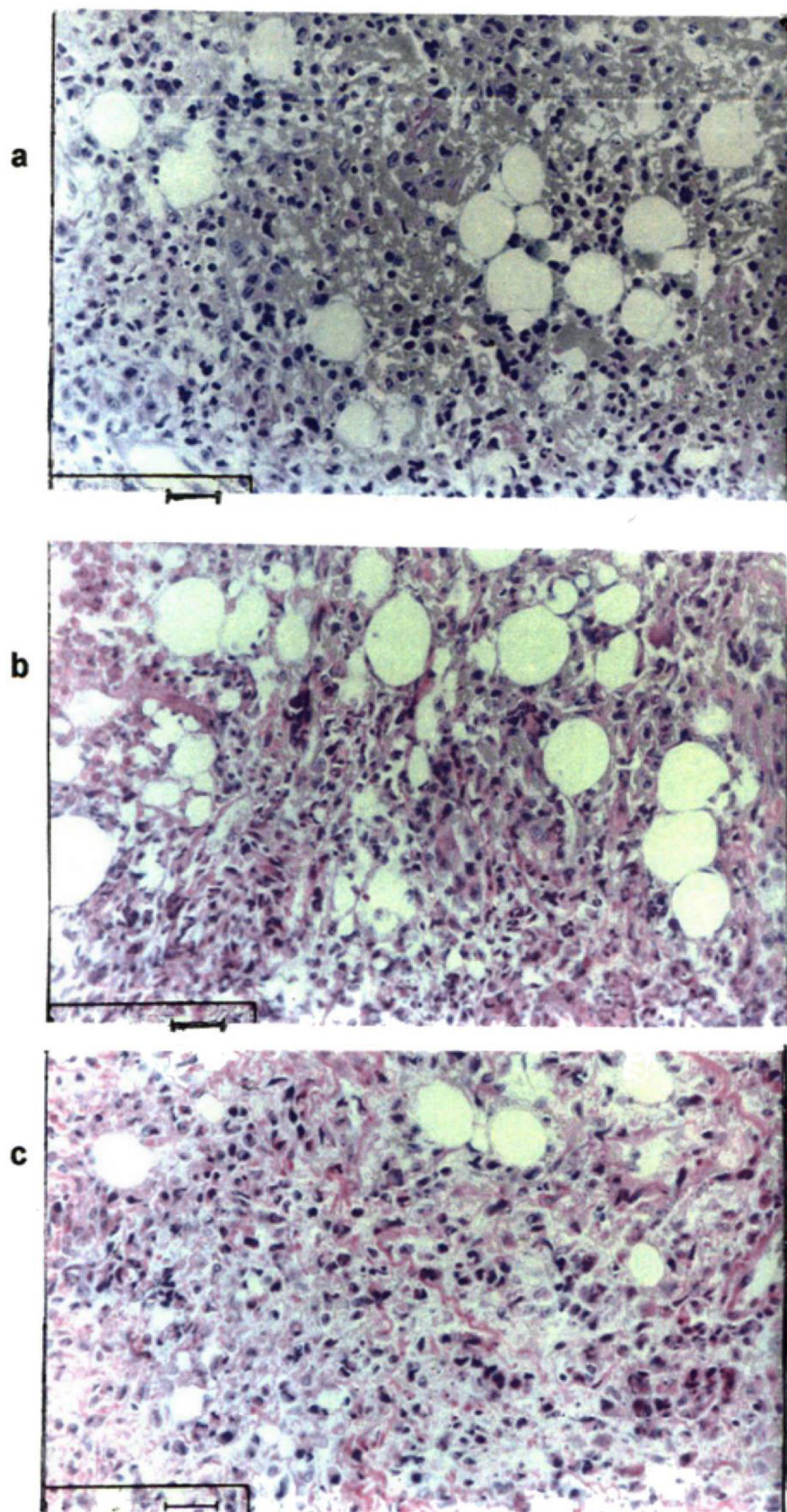


FIGURA 10: Lâmina do tumor de Walker 256 dos ratos não suplementados (a), suplementados com óleo de coco (b) ou suplementados com óleo de peixe (c). Lâmina corada com hematoxilina-eosina e observada em aumento de 40x.

DISCUSSÃO

Caracterizada por, perda progressiva de peso corpóreo, intenso catabolismo e anorexia, a caquexia é um tipo de síndrome paraneoplásica (TISDALE, 1999), que reflete o efeito, potencialmente letal dos tumores malignos (TESSIDORE, et. al., 1994). A diferença fundamental entre a perda de peso que ocorre durante o jejum e a decorrente da caquexia induzida pelo câncer, é que esta não responde satisfatoriamente a hiperalimentação (BRENNEN, 1977; NIXON, et. al., 1981). Outra importante diferença é que, durante o jejum a perda de peso deve-se, principalmente à perda de massa gorda, enquanto que na caquexia ocorre também perda de massa muscular (TISDALE, 1999).

O crescimento tumoral demanda energia, a qual é provida pelo portador devido, em parte, a ação de mediadores liberados pelas células do sistema imune e também pelas células tumorais, induzindo à caquexia (BECK e TISDALE, 1987; NORTON, et. al., 1985; THEOLOGIDES, 1972). Como consequência, a depleção dos estoques energéticos (glicogênio hepático e muscular, proteínas musculares e triglicerídeos) do hospedeiro é estabelecida. Além disso, o tumor utiliza a glicólise anaeróbica como principal processo de metabolização desse substrato, cujo baixo rendimento, resulta a hipoglicemia e hiperlaticidemia no portador (BARAI, et. al., 1980; HERBER, et. al., 1985; BAGGETO, 1997). Neste estudo, o crescimento tumoral foi associado com o menor ganho de peso (tabela 2), estoque de glicogênio hepático e muscular reduzidos (tabela 3), hipoglicemia (figura 5) e hiperlaticidemia (figura 6). Assim, este modelo animal induziu à caquexia.

O estudo dos aspectos nutricionais da epidemiologia do câncer tem sugerido que, modificações no conteúdo lipídico da dieta são fatores de risco para o desenvolvimento de tumores malignos, como por exemplo o câncer de mama (ROSE, 1997). O conteúdo de ácidos graxos da dieta humana vem sendo alterado desde o período Paleolítico (SIMOPOULLOS, 1989). Enquanto que, na antiguidade, as gorduras correspondiam a 22% das exigências energéticas da dieta humana e a proporção de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) ω -6/ ω -3 era de 1:1, hoje esta porcentagem pode chegar a 40% e a proporção PUFAs ω -6/ ω -3 varia de 25:1 a 50:1

(BARTNIKOWSKA, et. al., 1997). Esse desequilíbrio na razão ω -6/ ω -3 tem sido mostrado ser importante fator de risco para o desenvolvimento de neoplasias, desordens cardiovasculares, imunológicas e metabólicas. Em função disso, tem sido sugerido que, a suplementação dietética com PUFA ω -3 pode ser utilizada na profilaxia de tais desordens (BARTNIKOWSKA, et. al., 1997; INNIS, et. al., 1995; OTTEN, et. al., 1997; PULLMANN, et. al., 1997; ROSE, et. al., 1999).

Estudos prévios têm mostrado que dieta rica em PUFA ω -3, usualmente na forma de óleo de peixe, pode reduzir o crescimento tumoral em vários modelos de animais (BOUDREAU, et. al., 2001; CALDER, et. al., 1998; MUKUTMONI-NORRIS, et. al., 2000; PETRIK, et. al., 2000). Contudo, a maioria destes estudos tem usado um delineamento experimental onde, o fornecimento da dieta modificada iniciou-se na fase aguda, antes da inoculação do tumor ou, imediatamente após a inoculação (BRADEN e CARROL, 1986; CALDER, et. al., 1998; FRITSCH e JOHNSTON, 1990; PETRIK, et. al., 2000).

Neste estudo nós objetivamos investigar o efeito da exposição, ao longo da vida, aos ácidos graxos saturados ou PUFA ω -3 sobre o crescimento tumoral e caquexia. Observamos que a exposição, desde a fase embrionária até a fase adulta (ao longo da vida) ao ácido graxo ω -3, foi hábil em reduzir o crescimento tumoral, melhorar a sobrevida e prevenir, parcialmente a caquexia em ratos portadores de tumor de Walker 256 (W256). Nos animais suplementados com óleo de peixe, o crescimento tumoral foi reduzido em 60% (figura 4) e isto foi acompanhado por redução do lactato sérico quando comparados aos valores do controle (figura 6), manutenção do estoque de glicogênio hepático e muscular (92% daquele dos animais não portadores de tumor) e recuperação parcial da concentração de glicose sérica (tabela 3 e figura 5, respectivamente). Também, estes animais perderam 1,3% da massa corpórea, enquanto houve redução de 6% no peso corpóreo dos outros animais dos grupos portadores de tumor (tabela 2). Assim, uma simples intervenção nutricional levou a um notável efeito sobre o crescimento tumoral e na resposta metabólica do animal portador de tumor.

Em adição, animais sadios submetidos, ao longo da vida, à suplementação com os PUFAs ω -3 não apresentaram alteração significativa na evolução do peso corpóreo durante os estágios de desenvolvimento (tabela 1 e figura 3). O mesmo ocorreu com o peso corpóreo das mães suplementadas com os diferentes ácidos graxos (figura 1), mesmo durante o período gestacional (figura 2).

A suplementação prolongada com óleos poliinsaturados (PUFAs n-3) em indivíduos saudáveis, como medida profilática contra alguns tipos de câncer poderia levar ao prejuízo de outras funções em longo prazo. O aumento das concentrações plasmáticas de triacilglicerol (TAG) e colesterol foi mostrado ser importante fator de risco para o estabelecimento de doenças coronarianas. Neste estudo, demonstramos que o aumento da ingestão de ômega-3 reduziu significativamente, os valores séricos de colesterol total e triacilglicerol quando comparados ao do controle (tabela 3). De fato, STARK, et. al. (2000) mostraram que o óleo de peixe é, altamente efetivo em reduzir os níveis séricos de TAG em humanos, diminuindo a razão TAG/HDL-Colesterol. ROCHE, et. al. (1999) sugeriram ainda, que o aumento de ω -3 dietético está inversamente relacionado com a mortalidade por doenças coronarianas. Já nos animais portadores de tumor a concentração de TAG estava aumentada (tabela 3), o que pode ser explicado pela produção de fatores lipolíticos e as alterações metabólicas da condição caquética (TISDALE, 1996). O óleo de peixe, também foi capaz de reduzir os níveis séricos de TAG dos animais portadores de tumor (tabela 3).

Os mecanismos pelos quais os ácidos graxos da família ômega-3 se opõe ao crescimento tumoral e ao desenvolvimento do quadro caquético são desconhecidos e não foram investigados neste estudo. Contudo, estes efeitos parecem estar relacionados com sua estrutura molecular (grau e posição de insaturações). Apesar de pequena a diferença estrutural com outros PUFAs (dupla ligação no carbono ω -3), esta poder comprometer a funcionalidade da célula tumoral (SAUER, et. al., 2000). Assim, o aumento da peroxidação lipídica, alteração da biossíntese de eicosanóides e regulação da expressão gênica no tumor, ou modulação da produção de mediadores da resposta inflamatória alterada do hospedeiro, são os possíveis mecanismos que têm sido sugeridos para explicar os efeitos antitumorais e anticaquéticos dos ácidos graxos ômega-3 (BARBER, 2001; CALDER, 2001; MOREIRA, et. al., 2001; PETRIK, et. al., 2000; ROSE, 1999; TISDALE, 1999).

Vários mecanismos sugeridos para explicar os efeitos protetores dos PUFAs n-3 contra o câncer, mostram os ômega-3 atuando, diretamente no tecido tumoral e portanto estes devem ser incorporados pelo tumor. Estudos experimentais têm mostrado que a composição lipídica da dieta pode alterar a composição de ácidos graxos nos tecidos, os quais podem influenciar o comportamento biológico das células (BURNS, et. al., 1987; CALDER, et. al., 1998; MOREIRA, et. al., 2001; TISDALE, 1996; GOGOS, et. al., 1998). De fato, os diferentes ácidos graxos suplementados modificaram a composição de ácidos graxos do tecido tumoral (tabela 4). Nos animais suplementados com óleo de peixe houve elevação de 50% e 70% da quantidade de ácido eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), respectivamente, quando comparados à do tumor nos animais não suplementados. Na figura 9, observa-se o aumento da proporção de PUFAs n-3 no perfil lipídico do tumor no grupo suplementado com óleo de peixe, quando comparada a dos demais grupos experimentais. Assim, é plausível que os PUFAs possam agir através de mecanismos que alterem, diretamente o metabolismo da célula do tumor de W256.

O aumento na quantidade de duplas ligações pode favorecer o processo de oxidação/peroxidação de lipídios, o qual parece ter importante papel no crescimento tumoral e cujos mecanismos ainda não estão bem esclarecidos (MASOTTI, et. al., 1988). Assim, o EPA (20:5, n-3) e o DHA (20:6, n-3), do óleo de peixe, são mais propensos a peroxidação que o ácido araquidônico (20:4, n-6) ou que os ácidos monoinsaturados. De fato, nossos resultados mostraram um aumento de 9% no índice de insaturação no tecido tumoral dos animais suplementados com óleo de peixe em relação ao do grupo portadores de tumor e de 13% quando comparado ao do grupo saturado. Produtos da peroxidação lipídica, tais como como, aldeídos saturados derivados dos PUFAs são, reconhecidamente capazes de alterar biomoléculas e contribuir para o processo de envelhecimento (REFSGAARD, et. al., 2000). Alguns estudos têm mostrado que a inibição do crescimento tumoral, causada pelos PUFAs, podem ser resultado da atividade citotóxica dos produtos da sua peroxidação, induzindo a lise da célula do tumor de mama (ROSE, et. al., 1999). Outro estudo recente mostrou, a redução de 35% a 46% do crescimento tumoral, em animais portadores de W256, alimentados com dieta rica em EPA, que foi acompanhado pelo aumento da taxa de peroxidação lipídica (COLQUHOUN, et. al., 2001).

Os eicosanóides, sintetizados a partir do ácido araquidônico (AA), um PUFA n-6 presente em fosfolipídios de membrana pela ação da cicloxigenase-2 (COX-2), são mediadores de diversos efeitos biológicos importantes, como a angiogênese, processos inflamatórios e regulação da expressão gênica. SIDDIQUI e WILLIAMS, (1987) relataram que ratos portadores de tumor de Walker 256 tinham altos níveis de PGE₂ circulantes, quando comparados aos dos animais do grupo controle e que o tumor era a principal fonte de PGE₂. HOMEM-DE-BITTENCOURT, et. al., (1989), mostraram o papel das PGE₂ como mediador químico das alterações metabólicas envolvidas na produção da síndrome da caquexia em ratos portadores de W256. Nossos estudos anteriores, demonstraram que Naproxeno (inibidor de cicloxigenase) foi o principal responsável pela redução do crescimento do tumor W256 em animais portadores tratados com esse antiinflamatório (PIFFAR, 1999; TOGNI, 2000). A regulação da expressão gênica de enzimas responsáveis pela biossíntese de eicosanóides a partir do AA, como a COX-2, tem sido mostrada ser capaz de controlar a apoptose celular através, principalmente, da produção de PGE₂ (TANG, et. al., 1996). Evidências de que os PUFAs n-3 podem reduzir o crescimento tumoral, por influenciar a expressão gênica e induzir a apoptose, foi evidenciado nas células do tumor de pâncreas humano *in vitro* (LAI, et., al., 1996). A hipótese de que dieta rica em ômega-3, possa reduzir o crescimento tumoral, através da menor produção de PGE₂ é viável, pois alterações deste eicosanóide parecem estar ligadas à ativação da apoptose celular (CONNOLLY & ROSE, 1997). A angiogênese, essencial para o crescimento de tumores sólidos, é mediada por vários fatores, incluindo as prostaglandina E₂ (PGE₂), sendo assim, esta também desempenha importante papel no desenvolvimento tumoral, como fator angiogênico (FOLKMAM, 1990). Além disso, estudos com tumor de cólon, também demonstraram a eficácia do EPA em inibir o crescimento tumoral reduziu a concentração de PGE₂ (BOUDREAU, et. al., 2001; NEEDLEEMAN, et. al., 1979; FISCHER & WEBER, 1984). Tem sido sugerido, que o aumento da quantidade de EPA incorporado à membrana plasmática, induz a competição entre os substratos pela cicloxigenase. Isto leva a menor produção de eicosanóides a partir do AA, os quais são essenciais para o desenvolvimento tumoral (KRAMER, et. al., 1996). SAUER, et. al., 2000, mostraram o efeito anti-tumoral exercido pela administração de EPA e ácido Linolênico (18:3 n-3) em roedores portadores de hepatoma 7288CTC, quando

comparado à administração de AA e ácido Linolêico, sugerindo que esse efeito tenha sido causado pela inibição do transporte, incorporação e conversão do ácido Linolêico em ácido Hidroxiocetadecadienóico (13- HODE), identificado como importante mitógeno para o hepatoma 7288CTC. Esta inibição por PUFA n-3 foi, provavelmente, devido a sua estrutura molecular, a qual é reconhecido por receptor acoplado à proteína G inibitória, promovendo redução dos níveis de AMPc intracelular. Isto demonstra mais um possível mecanismo dos PUFAs n-3, envolvendo sinalização celular, na inibição do crescimento tumoral. Portanto, os PUFA n-3 poderiam reduzir a massa tumoral e caquexia, por diminuírem a produção de PGE₂, permitindo então que ocorra o processo de apoptose nas células tumorais (CONNOLLY & ROSE, 1997; ROSE, et. al, 1999) ou, por diminuírem os fatores angiogênicos necessários ao tumor (ANTI, et. al., 1992, BARTRAN, et. al., 1993; CHANG, et. al., 1998; CONNOLLY & ROSE, 1997; FOLKMAM, 1990; LATHAM, et. al., 1999; MASFERRER, et. al., 2000; MUKUTMONI-NORRIS, et. al., 2000;), ou ainda inibirem a produção de eicosanóides específicos ou a sinalização celular, todos essenciais para o metabolismo tumoral (BOUDREAU, et. al., 2001; KRAMER, et. al., 1996; SAUER, et. al., 2000).

Entre as citocinas pro-inflamatórias, o Fator de Necrose Tumoral (TNF), produzido por macrófagos (BEUTLER, et. al., 1985), o Interferon -gama (IFN- γ) e as Interleucinas (IL-1, IL-2 e IL-6) produzidas por linfócito (BARBER, et. al., 2000; CALDER, 1998; TODOROF, et. al., 1996; NORTON, et. al. 1985; STRASSMANN, et. al., 1992) têm sido mostradas importantes substâncias envolvidas no desenvolvimento da caquexia, são mediadores humorais do quadro caquético (ARGILÉS, et. al., 1997; TISDALE, 1996). Os PUFAs n-3 são capazes de alterar a produção dessas citocinas em animais experimentais (CALDER, 1997, 1998) e em humanos (ENDRES, et. al., 1989). Portanto, são hábeis na modulação da resposta inflamatória (PETERSON, et. al, 1998), auxiliando tanto na ativação de linfócitos como na expressão de moléculas de superfície (SANDERSON, et. al., 1995). De fato, os PUFAs n-3 foram demonstrado serem capazes de alterar diferentes tipos de resposta imunológica, por mecanismos não totalmente esclarecidos (CALDER, 2001; LANZA-JACOBY, et. al.,2001). Desse modo, os PUFAs podem reduzir a formação de mediadores humorais do quadro caquético no câncer (CALDER, 2001). TISDALE, (1996), demonstrou que a caquexia, em animais portadores de adenocarcinoma de cólon (MAC16), é caracterizada por

intensa lipólise e proteólise. A ocorrência de um fator mobilizador de lipídios produzido por este tipo de tumor, responde pela atividade lipolítica nos adipócitos destes animais, e cuja sinalização celular é feita através da Adenil ciclase e aumento dos níveis de AMPc intracelular. O efeito foi inibido pelo EPA, possivelmente, através de sinalização celular via proteína G_i , da mesma maneira como foi sugerida para o tecido tumoral. Assim, o EPA foi capaz de reduzir o efeito deste agente lipolítico nos adipócitos. Em adição, o EPA também foi capaz de inibir a proteólise nestes animais, por diminuir a síntese de PGE_2 no músculo esquelético, provavelmente devido à competição pela enzima cicloxigenase. Estes achados, associado aos estudos de CALDER, (1997 e 1998), suportam nossos resultados que mostraram a reversão parcial do quadro caquético, nos animais portadores de tumor suplementados com óleo de peixe. Assim, é plausível que os PUFAs n-3 possam afetar, tanto a produção dos mediadores pró-inflamatórios e tumorais que induzem à caquexia, mas também seus efeitos nos órgãos-alvo, portanto, reduzindo o quadro caquético.

Apesar de diversos trabalhos evidenciarem os efeitos benéficos dos ácidos graxos ômega-3, principalmente na modulação da resposta imunológica (CALDER, et. al., 1997, 1998, 2001; LANZA-JACOBY, et. al., 2001), na inibição do crescimento tumoral e desenvolvimento da caquexia (BARBER, 2000; ROSE, et. al.; SAUER, 2000; TISDALE, 1996) os mecanismos para estes efeitos não estão esclarecidos.

A análise do tecido tumoral, por Microscopia de luz, com o objetivo de avaliar os aspectos morfológicos do tecido tumoral, revelou que a infiltração de células do sistema imunológico no tumor não foi diferente entre os grupos experimentais (figura 10). Assim, a redução da massa tumoral não foi associada à alteração morfológica do tecido tumoral. Contudo, isto não exclui a possibilidade de existirem alterações morfofuncionais intracelulares, pois a Microscopia Óptica tem limitações técnicas.

Como citamos e evidenciamos nos resultados anteriores, a composição lipídica da dieta pode alterar a composição de ácidos graxos nos tecidos (BURNS, et. al., 1987; CALDER, et. al., 1998; MOREIRA, et. al., 2001; TISDALE, 1996; GOGOS, et. al., 1998). De fato, os diferentes tipos de ácidos graxos suplementados modificaram a composição dos ácidos graxos no fígado dos animais portadores e não portadores de tumor (tabela 5). A presença do tumor tendeu a aumentar a proporção de ácido graxo láurico, mirístico, palmítico e esteárico no fígado dos animais portadores de tumor,

quando comparados aos dos animais do grupo controle. MOREIRA, et. al., (2001), investigando os efeitos do crescimento do tumor Walker 256 sobre a composição de ácidos graxos monoinsaturado nos tecidos do portador, mostraram que o crescimento tumoral reduziu o índice de insaturação no fígado dos animais portadores de tumor. Eles sugeriram que isto se deva, às alterações metabólico-hormonais induzidas pelo tumor, favorecendo a peroxidação lipídica nos tecidos não tumorais, somadas ao fato de que o tumor exporta, para o fígado do portador, os produtos de sua própria peroxidação lipídica (aldeídos, por exemplo). De fato, podemos observar a redução do índice de insaturação no fígado de todos os grupos de indivíduos portadores de tumor (tabela 5). No fígado do grupo suplementado com óleo de peixe, também houve a redução do grau de insaturação e a porcentagem de EPA estava aumentada, quando comparada a do grupo controle.

ARTERBURN, et. al., (2000) mostraram que a suplementação, com até 1,25g/kg de p.c. de PUFA n-3 por dia, durante um período de 90 dias (suplementação sub-crônica), não apresentou toxicidade e aumentou, significativamente, os níveis de EPA e DHA no cérebro, coração e fígado de animais saudáveis. Nossos resultados corroboram os de ARTERBURN, et. al.,(2000) onde, por utilizarmos uma dose menor (1g/kg), podemos concluir que, também havia ausência de toxicidade e aumento de 3 vezes na porcentagem de EPA e de 1,5 vezes na porcentagem de DHA no fígado dos animais suplementados com de óleo de peixe, quando comparadas àquelas do grupo controle (tabela 5).

A significativa correlação, entre o conteúdo de DHA no plasma e no leite materno e destes, com os fosfolípidios no plasma do filho, mostrou a importância da composição lipídica da dieta materna e da amamentação para a o recém-nascido (JENSEN, et. al., 2000). Os achados de WANG, et. al., (2000) mostraram que em mulheres japonesas, cuja dieta é rica em EPA e DHA, havia maior quantidade destes ácidos no leite, formando especificamente, fosfatidiletanolamina e fosfatidilinositol, formadores das membranas celulares do bebê. De fato, o aumento do conteúdo de PUFA n-3 na dieta materna induziu ao aumento das concentrações de EPA e DHA no plasma, plaquetas e eritrócitos dos ratos recém-nascidos (YEH, et. al., 1990). Níveis

elevados de DHA foram detectados no fígado e cérebro dos fetos e ratos recém-nascidos cujas mães foram suplementadas com óleo de peixe durante a gravidez e a lactação, sugerindo que pode-se começar a suplementação com os ômega-3 mesmo antes do nascimento, através da mãe (YONEKUBO, et. al., 1993). Nossos resultados (tabela 6), corroboram com os da literatura, mostrando aumento de, aproximadamente, 2 vezes no conteúdo de EPA e DHA e de 1,6 vezes no índice de insaturação do leite das mães suplementadas com óleo de peixe, quando comparados ao leite das mães do grupo controle, garantindo o aumento da proporção de ω -3 para a prole, desde a fase embrionária.

GODOS, et. al., (1998) mostraram que, pacientes portadores de câncer de pâncreas terminal, alimentados com PUFAs n-3, resistem melhor ao tumor, prolongando o tempo de vida. Eles sugerem que este efeito dos PUFAs n-3 possa resultar da melhora dos mecanismos de defesa do hospedeiro, associado às alterações na composição da membrana plasmática das células tumorais, tornando-as mais suscetíveis aos mecanismos de defesa, ou ainda, devido à mudança no metabolismo de PGE₂ nas células tumorais. Nossos dados corroboram os da literatura onde, a suplementação com ω -3 aumentou em 67% a taxa de sobrevivência dos animais, quando comparada a dos animais não suplementados e em 74% quando comparada a dos portadores de tumor suplementados com óleo de coco (figura 7). BARBER, et. al., (2001), relataram o efeito de um suplemento nutricional, enriquecido com óleo de peixe, sobre a drástica perda de peso em pacientes portadores de câncer de pâncreas. Mostraram que após a 3ª semana de suplementação, os pacientes apresentaram ganho médio de 1 kg, já na 7ª semana a média de ganho foi de 2 kg, e isso foi acompanhado por aumento do tempo normal de sobrevivência de 4 meses para 8 meses, sendo equiparando ao aumento obtido com o tratamento quimioterápico agressivo. BARBER, et. al., (1991) sugerem ainda que, suplementos nutricionais enriquecidos com óleo de peixe têm, o potencial de ser um meio seguro e efetivo de prevenir a drástica perda de peso e aumentar o tempo de vida dos pacientes portadores de câncer avançado.

Cabe salientar que, nós adicionamos na dieta do animal, a qual é composta de 4% de gordura, uma porcentagem equivalente a 0,1%, ou seja, temos 4,1% de gordura presente na dieta e esta foi hábil em reduzir o crescimento tumoral e o grau de caquexia, bem como a sobrevida dos animais com tumor. Os dados na literatura, em sua maioria (ROSE, et. al, 1999; BARBER, 1998), utilizaram dietas ricas em ácidos graxos, variando de 8% a 20% (CALDER, et. al., 1998; PETRIK, et al., 2000; YAQOOB, et. al., 1995). Assim, pequena alteração da dieta, na quantidade de gordura para elevar as porcentagens de PUFA n-3, pode ter efeito quimioprotetor ou até mesmo quimiosupressor contra o crescimento tumoral.

CONCLUSÕES

Nossos resultados mostraram que a suplementação oral com óleo de peixe, ao longo da vida, reduziu o crescimento tumoral e o grau de caquexia e aumentou o tempo de sobrevivência do animal portador de tumor de Walker 256.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADERKA D., FISHER, S., LEVO, Y., HOLTMANN, H., HAHN, T. & WALLACH, D. Cachectin tumor necrosis factor production by cancer patients. **Lancet ii**, 1190, 1985.

ADERKA, D., ENGELMANN H., HORNIK, V., SKORNICK, Y., LEVO, Y., WALLACH, D. & KUSHTAI, G. Increased serum levels of soluble receptors for tumors necrosis factor in cancer patients. **Cancer Res.**, 5:5602-07, 1991.

AGGARWAL, B.B. and NATARAJAN, K. Tumor necrosis factors: developments during the last decade. **Eur. Ciytokine Netw.**, 7,93, 1996

AL, M.D.M., VAN HOUWELINGER, A.C and HORNSTRA, G. Maternal essential fatty acid patterns during normal pregnancy and its relationship with the neonatal essential fatty acid status. **British J. of Nutr.**, 74:55-68, 1995.

ALAM, S.Q., REN, Y.F. and ALAM B.S. (³H)forskolin-and (³H)dihydroalprenolon-binding sites and adenylate cyclase activity in heart of rats fed diets containing different oil. **Lipids**, 23:207-213, 1988.

ALBERTS, B.; **Biologia Molecular da Célula**, 3 ed. Porto Alégre, Artes Médicas, 1256-9, 1997.

ALBRECHT, J.T. Cachexia and anorexia in malignancy. **Hematol. Oncol. Clin. North. Am.**; Aug;10(4):791-800, 1996.

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

ANTI, M; MARRA, G.; ARMELAO, F.; BARTOLI, G.M.; FICARELLI, R.; PERCESEPE, A.; De VITIS, I.; MARIA, G.; SOFO, L.; RAPACCINI, G.L.; GENTILONI, N; PICCIONI, E.; MIGGIANO, G. Effect of n-3 fatty acids on rectal mucosal cell proliferation in subjects at risk for colon cancer. **Gastroenterology** 103:883-91, 1992.

ARGILES, J.M. ; ALVAREZ, B.; LOPES-SORIANO, F.J. The metabolism basis of cancer cachexia. **Med. Res. Rer.**, Sep;17(5):477-98, 1997.

ARGILÉS, J.M.; COSTELLI, P.; CARBO, N.;PALLARES-TRUJILLO, J.;LOPES-SORIANO, F.J. Tumor growth and nitrogen metabolism in host. **Inst. J. oncol.**, Mar, 14(3):479-86, 1999.

ARMSTRONG, B & DOLL, R. Enviremmential factor and cancer incidence and mortality in different countries with special reference to dietary practices. **Inst. J. Cancer.**, 15:617, 1975.

ARTERBURN, M. L.; BOSWELL, D K.; KOSKELO, E-K; KASSNER, L. S.; KELLY, C.; and KYLE, J. D. A Combined Subchronic (90-Day) Toxicity and Neurotoxicity Study of a Single-cell Source of Docosahexaenoic Acid Triglyceride (DHASCO Oil). **Food and Chemical Toxicology**, 38:35-40, 2000.

AUCON, P. E.; WEBB, A C.;ROSENWASSER, L. J.;MUCCI, S. F.; RICH, A.; WOLFF, S. M.; DINARELLO, C. A. Nucleotide sequence of human monocyte interleukin-1 precursor cDNA. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, 81:7907-11, 1994.

BADALAMENTI, S.; SALERNO, F. et al. Renal effects of dietary supplementation with fish oil in cyclosporine-treated liver transplant recipients. **Hepatology**, 22(6):1695, 1995.

BALLOU, L.R and CHEUNG. W.Y. Inhibition of human platelet phospholipase A₂ activity by unsaturated fatty acids. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** , 82:371-75, 1985.

BALKWILL, F.; BURKS, F; TALBOT, D.. Evidence for tumor necrosis factor/vachectin production in cancer. **Lancet**. 11:3229, 1987

BARACOS, V.; ROEDEMAN, H.P.; DINARELLO, C. A.; GOLDBERG, A. L. Stimulation of muscle protein degradation and prostaglandin E₂ release by leukocytic pyrogen: A mechanism for the increased degradation of muscle proteins during fever. **N. Engl. J. Med.**, 308:553-8, 1983.

BARAI, B.; DeWys, W. Assay for presence of anorexic substance in urine of cancer patients. **Proc. Am. Assoc. Cancer Res.**;21:378, 1980.

BARBER, M. D. POWELL, J. J.; LYNCH, S. F.; FEARON, K. C. H.; ROSS, J. A. A polymorphism of the interleukin- 1 β gene influences survival in pancreatic cancer. **Br J Cancer**, 83:1443, 2000.

BARBER, M. D. Cancer cachexia and its Treatment with Fish-oil-Enriched Nutritional supplementation. **Nutrition**, 17:751-55, 2001.

BARTNIKOWSKA, E; OBIEDZINSKI, M. W. Unsaturated fatty acids omega-3. I. Structure, sources, determination, metabolism in organism. **Rocz Panstw Zakl Hig**, 48(4):381-97, 1997.

BARTRAN, H.P, GOSTNER, A., SCHEPPACH, W., REDDY, B.S., RAO, C.V.; DUSEL, G.; RICHTER, F.; RICHTER, A.; KASPER, H. Effects of of fish oil on rectal cell proliferation, mucosal fatty acids, and prostaglandin E₂ release in healthy subjects at risk for colon cancer. **Gastroenterology** 105:1317-22, 1993

BAUMANN, H; GAULDIER, J. The acute phase response. **Immunol. Today**, 15:74-80, 1994.

BAYORH, M.A.; WILLIAMS, E.F.; OGBOLU, E.C.; WALKER, C.E.; MANOR, E.L.; BROWN, L.G.; CHENAULT, V.M. Effects of MaxEPA on salt-induced hypertension: relationship to [3H]nitrobenzylthioinosine binding sites. **Clin. Exp. Hypertens.**, 18(1):37-49, 1996

BEACH, R.S., GERSCHWIN, M.E. and HURLEY, L.S. Dietary zinc modulation of Moloney sarcoma virus oncogenesis. **Cancer Res.**, 41:552-9, 1981.

BECK, S.A.; SMITH, K. L. TISDALE, M.J. Anticachectic and antitumor effects of eicosapentaenoic acid and its effect on protein turnover. **Cancer. Res.**, 51:60-89, 1991.

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

BEISEL, W.R. Metabolic response to infection. **Annu. Rev. Med.**, 26:9-20, 1975

BESSEY, P.Q., WATTERS, J.M., AOKI, T.T. & WILMORE, D.W. Combined hormonal infusion simulates the metabolic response to injury. **Ann. Surg.** 200:264-81, 1984.

BEUTLER, B; GREENWALD, D; HULMES, J. D.; CHANG, M; PAN; Y.C.E.; MATHISON, J; ULEVITCH, R.; CERAMI, A. Identity of tumor necrosis factor and macrophage-secreted factor cachectin. **Nature**, 316:552-4, 1985.

BLOCK, K; GARRETT, I, R; MUNDY, G,R. Chinese Hamster ovary cells transfected with the murine IL-6 gene cause hypercalcemia as well as cachexia, leukytosis and thrombocytosis in tumor bearing nude mice. **Endocrinology**; 128:2657, 1991.

BRADEN, L. M. and CARROLL, K. K. Dietary polyunsaturated fat in relation to mammary carcinogenesis in rats. **Lipids**, 21:285-88, 1986.

BRENNAN, M. F. Uncomplicated starvation versus cancer cachexia. **Cancer Res**, 37:2359, 1977.

BOECKH-HAEBISCH, E. M.; FERNANDES, L. C.; PONZONI, M.; SEELAENDER, M. C. & CURI, R. Cationic and water content in blood, skeletal muscle and liver of food restricted and Walker 256 tumor-bearing rats. **Cancer Research Therapy and control**, 5:213-19, 1998.

BOUDREAU, M. D.; CHAMUGAM, P. S.; HART, S.N.; LEE, S. J.; HWANG, D. H.; Lack of a drive response by dietary n-6 fatty acids of constant ratio of n-3 to n-6 fatty acids in suppressing eicosanoid biosynthesis from arachidonic acids. **Am. J. Clin Nutr.**, 54:111-17., 1991

BURT, M.E. AOKI, T.T., GORSCHBOTH, C.M. & BRENNAN, M.F. Peripheral tissue metabolism in cancer bearing man. **Ann. Surg.** 198:685-91, 1983.

BURNS, C. P. & SPECTOR, A. A. Membrane fatty acid modification in tumour cells: a potential therapeutic adjunct. **Lipids**, 22:178-84, 1987.

CAHILL, W.M.; DUNNING, W.F. and SMITH, A. H. A free choice dietary study of tumor-bearing rats. **Cancer research**, 3:830-2, 1943

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

CALDER, P.C.; DAVIS, J. YAQOUB, H; PALA, H.; THIES, F.; and NEWSHOLME. Dietary fish oil suppresses human colon tumor growth in athymic mice. **Clinical Science.**, 94:303-31, 1998.

CALDER, P.C. Dietary fatty acids and the immune system. **Nutr. Rev.** 56:S70-S83, 1998.

CALDER, P.C. Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of n-3 polyunsaturated fatty acids. **Proc. Nutr. Soc.**, 55:737-74, 1996.

CALDER, P.C. More good news about fish oil. **Nutrition, (Editorial) 17**; 2:158-59, 2001

CANGIANO, C., LAVIANO, A., MUSCARITOLI, M., MEGUID, M.M., CASCINO, A. & FANELLI, F.R. Cancer anorexia: New pathogenic and therapeutic insights. **Nutrition**; 12 supp. 1:S48-S51, 1996.

CERSOSIMO E., PISTERS, P.W.T., PESOLA, G., McDERMOTT, K., BAJORUNAS, D. & BRENNAN, M.F. Insulin secretion and action in patients with pancreatic cancer. **Cancer** 67:486-93, 1991.

CHALLISS, R.A. Espinal, J; Newsholme, E.A Insulin sensitivity of rates glycolysis and glycogen synthesis in soleus epitrochlearis and hemi-diaphragm muscles isolated from sedentary rats. **Biosci. Rep.** 3:675-79, 1983

CHILDS, M.T.; KING, I. B.; & KNOPP, R. H. Divergent lipoprotein responses to fish oils at various ratios of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. **Am. J. Clin Nutr.**, 52:632-39., 1990.

CHANG W, -C.L., CHAPKIN, R.S., LUPTON, J. R. Fish oil blocks azoximethane-induced rat colon tumorigenesis by increasing cell differentiation and apoptosis rather than decreasing cell proliferation. **J Nutr.**; 128:491-497, 1998

CHLEBOWSKI, R.T.; BULCAVAGE, L.; GROSVENOR, M.; OKTAY, E.; BLOCK, J.B.; CHLEBOWSKI, J.; ALI, I.; ELASHOFF, R. Hydrazine sulfate induce on nutritional status and survival in non-small-cell lung cancer. **J. Clin. Oncol.**, 8(1):9-15, 1990.

CHRISTIANSEN, E.N.; LUND, J. S.; RORTVIET, T; & RUSTAN, A. C. Effect of dietary n-3 and n-6 fatty acids on fatty acid desaturation in rat liver. **Biochim. Biophys. Acta**, 1082,57-62, 1991.

CLARKE, S.D. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a mechanism to improve energy balance and insulin resistance. **Br. J. Nutr.** , 83(suppl 1): S59-66, 2000

COHEN, A. CHEN-B, J.Y.; SEPKOVIC, D.V. & SUGIE, S. Effect of varying proportions of dietary menhaden and corn oil on experimental rat mammary tumor promotion. **Lipids**, 28:449-56, 1993.

COLQUHOUN, A; RAMOS, K. L.; SCHUMACHER, R. I. Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid effects on tumour mitochondrial metabolism, acyl CoA metabolism and cell proliferation. **Cell Biochem. Funct.** 2:97-105, 2001.

COSTA, G.; HOLLAND, J.F. Effect of Krebs-2 carcinoma on the lipid metabolism of male Swiss mice. **Cancer Res.**, 22:1081, 1966.

COSTELLI, P.; TESSITORE, L.; BATETTA, B; MULAS, M.F.; SPANO, O; PANI,P.; BACCINO, F.M.; DESSI, S. Alterations of lipid and cholesterol metabolism in cachectic tumor-bearing rats are prevented by insulin. **J. Nutr.** Mar, 129(3):700-6, 1999.

COOPER, A.L., GIBBONS, L., HORAN, M.A., LITTLE, R.A. and ROTHWELL, N.J. Effect of dietary fish oil supplementation on fever and cytokine production in human volunteers. **Clin. Nutr.**, 12:321-28, 1993.

DAYER, J.M.; BEUTLER, B.; CERAMI, A. Cachectin Tumor Necrosis Factor stimulates collagenase and prostaglandin E₂ production by human synovial cells and dermal fibroblasts. **J. Exp. Med.**, 162:2163-8, 1985.

De GOMEZ DUMM, N. T., & BRENNER, R.R. Oxidative desaturation of alpha-Linolenic, and stearic acids by human liver microsomes. **Lipids.**, 10:315-17, 1975.

DEVCHAND, P.R., KELLER, H., PETER, J.M., VAZQUEZ, M., GONZALEZ, F.J. and WAHLI, W. The PPAR α -leukotriene B₄ pathway to inflammation control. **Nature**, 384:39-43, 1996.

De WYS, W.D., BEGG, C., LAVIN, P.T., BAND. P.R., BENNET, J.M., BERTINO, J.R., COHEN, M.H., DOUGLASS, H.O., ENGSTRON, P.F., EZDINLI, E.Z., HORTON, J., JOHNSON, G.J., MOERTEL, C.G., OKEN, M.M., PERLIA, C., ROSENBAUN C., SILVERSTEIN, M.N., SKELL, R.T., SPONZO, R.W. & TORMEY, D.C. Prognostic effect of weight loss prior to chemotherapy in cancer patients. **Am. J. Med.** 69:491-97, 1980.

DE WYS, W.D. Management of cancer cachexia. **Semin. Oncol.**, 12:452, 1985.
DREVON, C.A.; NENSETER, M. S.; BRUDE, I. R.; FINSTAD, H.S.; KOLSET, S.O.; RUSTAN, A.C. Omega -3 fatty acids- nutritional aspects. **Can. J. Cardiol.** 11G:47G-54G, 1995.

EARLE, W.R. A study of the Walker rat mammary carcinoma 256 in vivo and in vitro. **Am. J. Cancer**, 24:566-612, 1935

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

ELSEN, M.J. Transplantable carcinoma of the rat breast. **Am. J. Cancer**, 39:36-44, 1940.

ENDRES, S., GHORBANI, R., KELLEY, V.E., GEORGILIS, K., LONNEMANN, G., VAN DER MEER, J.W.M., CANNON, J.G., ROGERS, T.S., KLEMPNER, M.S., WEBER, P.C., SCHAEFER, E.J., WOLFF, S.M. and DINARELLO, C.A. The effects of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. **N.E.J.N.**,320:265-271, 1989.

ENGLE, P.C. & JONES, J.B. Causes and elimination of erratic blanks in enzymatic metabolite assays involving the use of NAD in alkaline hydrazine buffers: improved conditions for the assay of L-glutamate, L-lactate, and other metabolites. **Anal. Biochem.**, 88:475-84, 1978

ERMAN, A. and NASJLETTI, A. Enhancement of renal medulla prostaglandin synthetase following dexamethasone treatment in the rat. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 121:255, 1984.

FALCONER, J.S., FEARON, K.C.H., PLESTER, C.E., ROSS, J.A. & CARTER, D.C. Cytokines, the acute-phase response, and resting energy expenditure in cachectic patients with pancreatic cancer. **Ann. Surg.**, 219:325-31, 1994.

FERNANDES, L.C., CARPINELLI, A.R., HELL, N.S. and CURI, R. Improvement of cancer cachexia and decrease of Walker 256 tumor growth by insulin administration in rats. **Cancer Ther. Control**, 1:259-68, 1991.

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

FERNANDES, L.C., MACHADO, U.F., NOGUEIRA, C.R., CARPINELLI, A.R and CURI, R. Insulin secretion in Walker 256 tumor cachexia. **A.J.P.**, 258:E1033-E1036, 1990.

FERNANDES, L.C., MARQUES DA COSTA, M.M. and CURI, R. Metabolism of glucose, glutamine and pyruvate in lymphocytes from Walker 256 tumor-bearing rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 27:2539-43, 1994.

FERNANDES,L.C.; MATTOZO,C.A.; MACHADO,U.F., ROSA,L.F., CURI,R. Insulin treatment can abolish changes in glucose and glutamine metabolism of lymphocytes and macrophages caused by the implantation of the Walker 256 tumor. **Cell. Biochem. Funct**, Sep;14(3):187-92, 1996.

FERNANDES, L. C.; NOGUEIRA, C. R.; MACHADO, U. F.; CARPINELLI, A. R.; & CURI, R. Reversion of Walker256 tumor cachexia by insulin treatment: possible mechanism involved and perspectives for future research. **Endocrine-Related Cancer**, 4:1-10, 1997.

FERNANDES, G., NAIR, M., ONOE, K., TANAKA, T., FLOYD R. and GOOD, R.A. Impairment of cell-mediated immunity functions by dietary zinc deficiency in mice, **PNAS USA**, 76(1):457-61, 1979.

FIELDING, C. J. & HAVEL, R.J. Lipoprotein lipase. **Arch. Pathol. Lab. Med.**; 101:225-9, 1977.

FISCHER, C. L. & GILL, C.W. Acute phase protein. In: **Serum protein abnormalities: Diagnostic and clinical aspects**. Ed. Reitzmann and J.C Daniels. Boston, p.331, 1975.

FOLKMAN J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? **Natl. Cancer Inst. (Editorial)** 82:4-5, 1990

FRITSCHKE, K. L. and JOHNSTON, P. V. Effects of dietary alpha linolenic acid on growth, metastasis fatty acid profile and prostaglandin production of two murine mammary adenocarcinomas. **J Nutr**, 120:1601-09, 1990.

GAGNON, B ; BRUERA, E. A review of the drug treatment of cachexia associated with cancer. **Drugs**, May;55(5):675-88, 1998.

GIACOSA, I.; FRASCIO, F. ; SUKKAR, S.G. ; RONCELLA, S. Food intake and body composition in cancer cachexia. **Nutrition**, Jan; 12(1 Suppl):S20-3, 1996.

GIBSON, R.A., NEUMAN, M.A. and MAKRIDES, M. Effect of increasing breast milk docosahexaenoic acid on plasma and erythrocyte phospholipid fatty acids and neural indices of exclusively breast fed infants. **Eur. J. Clin. Nutr.** 51:578-584, 1997.

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

GOLDEN, M.H.N., GOLDEN, B.E., HARLAND, P.S.E.G. and JACKSON, A.A. Zinc and immunocompetence in protein-energy malnutrition. **Lancet**, 1(8076):1226, 1978.

GRONN, M.; GERHITZ., C.; CHRISTENSEN, F.; LEVERSEN, A.; OSC, I.; HAGVE, T. A.; CHRISTEPHERSEIN, O. Dietary n-6 fatty acids inhibit the incorporation of dietary n-3 fatty acids in thrombocyte and serum phospholipids in human controlled dietetic study. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.** 51:255-67, 1991

GREENWALD, P.: MALONE, W. F., CERNY, M.F.; STERN, H. R. Cancer prevention research trials. **Adv Cancer Res.** 61:1-23, 1993.

HAGUE, T. A.; CHRISTEFFERSEN, B. O. Effect of dietary fats on arachidonic acid and eicosapentaenoic acid biosynthesis and conversion of C22 fatty acids in isolated liver cells. **Biochim.Biophys. Acta**, 796:205-17, 1984.

HASLETT, P.A. Anticytokines approaches to the treatment of anorexia and cachexia. **Semin. Oncol.** Apr;25(2suppl 6):53-7, 1998

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

HEBER, D.;BYERLY, C. O.; CHLEBOWSKI, R.T. Medical abnormalities in the cancer patient. **Cancer**, 55:225-9, 1985.

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

HIRAYAMA, T. Epidemiology of breast cancer with special reference to the role of diet. **Prev. Med.** 7:173-195. 1978

HOLIAN, O. and NELSON, R. Action of long-chain fatty acids on protein kinase C activity: Comparison of omega and omega-3 fatty acids. **Anticancer Res.**, 12:975-980, 1992.

HOLROYDE, C.P., SKUTCHES, C.L., BODEN, G. & REICHARD, G.A. Glucose metabolism in cachectic patients with colorectal cancer. **Cancer Res.** 44:5910-13, 1984.

HUDSON, E.A.; BECK, S.A.; TISDALE, M.J.; Kinetics of the inhibition of tumour growth in mice by eicosapentaenoic acid- reversal by linoleic acid. **Biochem. Pharmacol.**,45:21-89, 1993.

HWANG, D.; SCOLLARD, D; BYME, J. & LEVINE, E. Expression of cyclooxygenase-1 na cyclooxygenase-2 in breast cancer. **J. Natl. Cancer Inst.**, 90:455-66. 1998.

IKEMOTO, S; TAKAHASHI, M; TSUNODA, N; MARUYAMA, K; ITAKURA, H; EZAKI, O. High-fat diet-induced hyperglycemia and obesity in mice: differential effects of dietary oils. **Metabolism**. 12:1539-45, 1996.

INNIS, S.M. Essential fatty acids in growth and development. **Progress in Lipid Res.**, 30:39-103, 1991.

IWATA, T., INCEFY, G.S., TANAKA, T., FERNANDES, G., MENENDEZ-BOTET, C.J., PIH, K., GOOD, C.A. Circulating thimic hormone levels in zinc deficiency. **Cell Immunol.**, 47(1):100-5, 1979.

LANZA-JACOBY, S; FLYNN, J. T; MILLER, S. Parenteral supplementation with a fish oil emulsion prolongs survival and improves rat lymphocyte function during sepsis. **Nutrition**, 17(2):112-6, 2001.

JENSEN, C. L.; MAUDE, M.; ANDERSON, R. E.; HEIRD, W. C. Effect of docosahexaenoic acid supplementation of lactating women on the fatty acid composition of breast milk lipids and maternal and infant plasma phospholipids. **Am J Clin Nutr**, 71(1Suppl):292S-9S, 2000.

KANG, J.X and LEAF, A. Evidence of free polyunsaturated fatty acids modify Na⁺ channels by directly binding to the channel proteins. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, 93:3542-46, 1996.

KELLER, H., DREYER, C., MEDIN, J., MAHFOUDI, A., OZATO, K. and WAHLI, W. Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, 90:2160-64, 1993.

KNAPP, M.L., AI-SHEIBANI, S., RICHES, P.G., HANHAM, I.W.F. & PHILIPS, R.H. Hormonal factors associated with weight loss in patients with advanced breast cancer. **Ann. Clin. Bioch.**, 28:480-86, 1991.

KREMER, J.M. Clinical studies of omega -3 fatty acids supplementation in patients who have rheumatoid arthritis. **Rheum. Dis. Clin. North. Am.**, 17:391-402, 1991.

KRYVENKO, O.M. Effect of alpha-tocopherol and phospholipids with omega-3 fatty acids on membrane properties. **WMJ**; 71(5):127-31, 1999.

KURZROCK R., REDMAN, J., CABANILLAS, F., JONES, D., ROTHBERG, J. & TALPAZ, M. Serum interleukin 6 levels are elevated in lymphoma patients and correlate with survival in advanced Hodgkin's disease and with B symptoms. **Cancer Res.**, 53:2118-22, 1993.

LAI, P. B. S.; ROSS, J. A.; FEARSON, K. C. H.; ANDERSON, J. D. & CARTER, D. C. Cell cycle arrest and induction of apoptosis in pancreatic cancer cells exposed to eicosapentaenoic *in vitro*. **Br. J Cancer**, 74:1375-83, 1993.

LANGSTEIN, H.N. & NORTON, J.A. Mechanisms of cancer cachexia. **Hemat. Onc. Clin. N. Amer.** 5:103-23, 1991.

LANIER, A. P.; BENDER, T. R.; BLOT, W.J. FRAUMENI, J. F. & HULBURT, W. B. Cancer incidence in Alaska natives **Inst. J. Cancer.** , 18:402-412, 1976

LANIER, A. P; KELLY, J.J.; SMITH, B HARPSTER, A.P ; DAVIDSON, A.M. Alaska native cancer update: incidence rates. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 5:749-751, 1996

LANZA-JACOBY, S.; FLYNN, J. T.; MILLER, S. Parenteral supplementation with a fish oil emulsion prolongs survival and improves lymphocyte function during sepsis. **Nutrition.**, 17:112, 2001.

LATHAM, P; LUND, E.K.; JOHNSON, I.T. Dietary n-3 PUFA increases the apoptotic response to 1,2-dimethylhydrazine, reduces mitosis and suppresses the induction of carcinogenesis in the rat colon. **Carcinogenesis**, 20:645-50, 1999.

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

LEBANON, F.N. & FOLCH, J. Structure of brain tissue acids. **Physiol. Rev.** V.37, p.539, 1957

LEE, T.H., HOOVER, R.L., WILLIAMS, J.D., SPERLING, R.I., Ravalese, J., Spur B.W., Robinson, D.R., Corey, E.J., Lewis, R.A. and Austin K.F. Effect of dietary enrichment with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on in vitro neutrophil and monocyte leukotriene generation and neutrophil function. **N.E.J.M.**, 312:1217-24, 1985.

LEIGHTON, B; BUDOHOSKI, L; LOZEMAN, F.J.; CHALLISS, R.; NEWSHOLME, E.A The effects of prostaglandins E1, E2 and F2 and indomethacin on the sensitivity of glycolysis and glycogen synthesis to insulin in the stripped soleus muscle. **Biochem. J.** 277:337-40, 1985.

McCOY, T. A. and NEUMAN, R.E. The cultivation of Walker carcinosarcoma 256 in vitro from cell suspensions. **J. Nat. Cancer Inst.**, 16:1221-9, 1956.

MAHONEY, S.M., BECK, S.A. & TISDALE, M.J. Comparison of weight loss induced by recombinant tumor necrosis factor with that produced by a cachexia-inducing tumor. **Brit. J. Cancer** 57:385-89, 1988.

MALASANOS, T.H. & STACPOOLE, P.W. Biological effects of omega-3 fatty acids in diabetes mellitus. **Diabetes C**; 14:1160-79, 1991.

MARKS, B. D.; MARKS, A.D.SMITH, C.M. **Basic Medical Biochemistry**. Ed. Willians and Wilkins, 1996.

MARTINEZ, M. Tissue levels of polyunsaturated fatty acids during early human development. **J. Pediatrics** 120:S129-S138, 1992.

MASFERRER, J.L.; LEAHY, K.M; KOKI, A.T.; ZWEIFEL, B.S.; SETTLE,S.L.; WOERNER, B.M.; EDWARDS, A.D.; FLICKINGER, A.G.; MOORE, R.J. and

MIDER, G. B. ; TESLUK, H., and MORTON, J.J. Effects of Walker carcinoma 256 on food intake, body weight and nitrogen metabolism of growing rats. **Acta Unio Internat. Cancr., Louvain**, 6:409-20, 1948.

SEIBERT, K. Antiangiogenic and Antitumor Activities of Cyclooxygenases-2 Inhibitors. **Cancer Res.** 60: 1306-11, 2000.

MATTHYS, P.; BILLIAU, A. CytoKines and cachexia. **Nutrition**, 13(9):763-70, 1997.

MASOTTI, L.; CASALI, E & GALEOTTI, T. Lipid peroxidation in tumour cells. **Free Radical Biology and Medicine**, 4:377-86, 1988.

McNAMARA, M.J., ALEXANDER, H.R. & NORTON, J.A. Cytokines and their role in the pathophysiology of cancer cachexia. **J. Parent. Ent. Nutrition** 16 suppl:50S-55S, 1992.

MEYDANI, S.M., LICHTENSTEIN, A.H., CORNWAL, S., MEYDANI, M., GOLDIN, B.R., RASMUSSEN, H., DINARELLO, C.A. and SCHAEFER, E.J. Immunological effects of National Cholesterol Education Panel Step-2 diets with and without fish-derived n-3 fatty acid enrichment. **J. Clin. Invest.**, 92:105-113, 1993.

MICCHIE, H.R., SPRIGGS, D.R., MANOGUE, K.R., SHERMAN, M.L., REVHAUG, A., O'DWYER, S.T., ARTHUR, K., DINARELLO, C.A. CERAMI, A., WOLFF, S.M., KUFEL, D.W. & WILMORE, D.W. Tumor necrosis factor and endotoxin induce similar metabolic responses in human beings. **Surgery**, 104:280-86, 1988.

MONTEGOMERY, R; CONWAY, T.; SPECTOR, A.A. **Biochemistry- A case oriented approach**. 5^o ed. Ed. CV Mosby Company, Iowa, City Iowa. USA. 1994

MOREIRA, N. X; CURI, R.; PADOVESE, R. and MANCINI-FILHO, J. Incorporation of dietary *trans* monounsaturated fatty acids into tissues of Walker 256 tumor-bearing rats. **Braz. J Med Biol Res**, 34:501-08, 2001.

MURPHY, R.C.; PICKEIL, W.C.; CULP, B.R. & LANDS, W.E.M. Tetraene and pentaene leukotrienes: selective production from murine mastocytoma cells after dietary manipulation. **Prostaglandins**, 22:613-22, 1981.

MUKUTMONI-NORRIS M; HUBBARD, N.E.; ERICKSON, K.L. Modulation of murine mammary tumor vasculature by dietary n-3 fatty acids in fish oil. **Cancer Letters**; 15:101-109, 2000.

NATHAN, C. V.; MURRAY, H.W.; WIEBE, M.E. RUBIN, B. W. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. **J. Exp. Med.**, 158:670-89, 1983.

NELSON, K.A.; WALSH, D.; SHEEHAN, F.A. The cancer anorexia-cachexia syndrome. **Journal of Clinical Oncology**; 12:213-25, 1994

NEEDLEMAN, P; RAZ. A.; MINKEIS, M.S.; FERRENDELLI, J. A. Z & SPECHER, H. Triene prostaglandins prostacyclin and thromboxane biosynthesis and unique biological properties. **Proc. Natl. Acad Sci. USA**. 76:944-48, 1970.

NISHIYAMA - NARUKE, A; SOUZA, J. A., CARNELLÓS, M; CURI, R*. HPLC Determination of underivatized fatty acids saponified at 37⁰ C analysis of fatty acids in oils and tissues. **Analytical Letters**, 31(14), 2565-76, 1998.

NIXON, D. W.; LAWSON, D. H.; KUTENER, M. Hyperalimentation of the cancer patients with protein- calorie undernutrition. **Cancer Res**; 41:2038, 1981.

NORTON, J. A.; MOLEY, J. F.; GREEN, M. V.; CARSON, R. E.; MORRISON, D. Parabolic transfer of cancer anorexia in mice. *Cell*; 45:5547, 1985.

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

O'SULLIVAN, S. T.; LEDERER, J. A. HORGAN, A. F. Major injury leads to predominance of the T-helper-2 Lymphocyte phenotype and diminished interleukin-12 production associated it decreased resistance to infection. **Ann. Surg.**, 222:182., 1995

OTTEN, W; LAIZZO, P. A.; EICHINGER, H. M. Effects of a high n-3 fatty acid diet on membrane lipid composition of heart and skeletal in normal swine with the genetic mutation for malignant hyperthermia. **J. Lipid Res**, 38(10):2023-34, 1997.

OVERSEN, L., HANNIBAL, J & MORTENSEN, E.L. The interrelationship of weight loss, dietary intake, and quality of life in ambulatory patients with cancer of the lung, breast, and ovary. **Nutrition and Cancer** 19:159-67, 1993.

OVERSEN, L.; ALLINGSTRUP, L.; HANNIBAL, J.; MORTENSEN, E.L.; HANSEN, O. P. Effects of dietary of life in cancer patients undegoing chemotreraapy: a prospective randomised study. **J. Clin. Oncol.**, 11:2043, 1993.

PEARLSTONE, D.B.; WOLF, R.F.; BERMAN, R.S.; BURT, M.; BRENNAN, M.F. Effect of systemic insulin on protein kinetics in postoperative cancer patients. **Ann. Surg. Oncol.**, Jul;1(4):321-32, 1994

PEKAREK, R.S., SANDSTEAD, H.H., JACOB, R.A. and BARCOME, D.F. Abnormal cellular immune responses during acquired zinc deficiency. **Am. J. Clin. Nutr.**, 32:1466, 1979

PETERSON, L. D.; JEFFERY, N. M.; THIES, F.; SANDERSON, P.; NEWSHOLME, E. A.; CALDER, P. C. Eicosapentaenoic and docosahexanoic acids alter rat spleen leukocytes fatty acid composition and prostaglandin E₂ production but have different effects on lymphocyte functions and cell-mediated immunity. **Lipids**, 33,2:171-80, 1991.

PETRIK, M.B.H.; McENTEE, M.F.; CHIU, C-H and WHELAN, J. Antagonism of Arachidonic Acid Is Linked to the Antitumorigenic Effect of Dietary Eicosapentaenoic Acid in *Apc^{Min/+}* Mice. **Journal of Nutrition**, 130:1156-58, 2000.

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

PRESTON, T., FEARON, K.C.H., McMiLLIAM, D.C., WINSTANLEY, F.P., SLATER, C., SHENKIN, A. & CARTER, D.C. Effect of ibuprofen on the acute-phase response and protein metabolism in patients with cancer and weight loss. **Brit. J. Surg.**, 82:229-34, 1995.

PRINCE, P.T; NELSON, C. M.; CLARKE, S. D. Omega-3 polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. **Curr. Opin. Lipidol.**, 11(1): 3-7, 2000.

PULLMANN, R; SAMEL, M. Relation between levels of essential fatty acids in maternal milk, in maternal blood and in the blood of neonates 1 and 5 days after birth. **Bratisl Lek Listy**, 98,12:695-700, 1997.

REFSGAARD, H. H. F.; TSAI, L; and STADTMAN, E. R. Biochemistry modifications of proteins by polyunsaturated fatty acid peroxidation products. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, 97(2):611-16, 2000.

RIVIERA, S; AZCÓN-BIETO, J; LÓPEZ-SORIANO, F.J.; MIRALPEIX, M; ARGILÉS, J.M. Amino acid metabolism in tumor-bearing mice. **Biochem. J.**; 249:443-9, 1988.

ROCHE, H.M.; GIBNEY, M.J. Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and triacylglycerol metabolism in the postprandial state. **Lipids**; 34S:259-65, 1999.

ROE, S.Y., COOPER, A; MORRIS, I.D.; ROTHWELL, N.J. Involvement of prostaglandins in cachexia induced by T-cell leukemia in the rat. **Metabolism**, Apr46(4):359-65, 1997.

ROSE, D. P.; CONNOLLY, J. M. Omega-3 fatty acids on human breast cancer growth and metastasis in nude mice. **J. Natl. Cancer Inst.**; 85:1745-47, 1994.

ROSE, D. P. & CONNOLLY, J. M. Dietary fat and breast cancer metastasis by human tumor xenografts. **Breast Cancer Res Triat**; 46:225-37, 1997.

ROSE, D. P.; CONNOLLY, J.M. Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. **Pharmacology & Therapeutics**, 83:217-44, 1999.

ROUBENOFF, R., ROUBENOFF, R.A., WARD, L.M., HOLLAND, S.M. & HELLMAN, D.B. Rheumatoid cachexia: Depletion of lean body mass in rheumatoid arthritis. Possible association with tumor necrosis factor. **J. Rheum**, 19:1505-10, 1992.

SAKURAI, Y ; KLEIN, S. Metabolic alteration in patients with cancer: nutritional implications. **Surg. Today**, 28(3):247-57, 1998.

SANDERSON, P; YAQOOP,P; CALDER P.C. Effects of dietary manipulation upon rats spleen lymphocyte functions and the expression of lymphocyte surface molecules. **J. Nutr. Environ**; 5:119-32, 1995.

SAUER, L. A.; DAUCHY, R. T.; BLASK, D. E. Mecanism for the antitumor and anticachectic effects of n-3 fatty acids. **Cancer Res.** 15,60(18):5289-95, 2000.

SCHWARTZ, S.S., ZEIDLER, A., MOOSA A.R., KUKU, S.F. & RUBENSTEIN, A.H. A prospective study of glucose tolerance, insulin, C-peptide, and glucagon responses in patients with pancreatic carcinoma. **Dig. Dis.** 23:1107-14, 1978.

SEELAENDER, M. C.; RODRIGUES, M.C.P.S.; BOECKH-HAEBISCH, E. & CURI, R. Hormonal alterations in Walker256 tumor-bearing rats: possible role of calcium for the maintenance of cachexia. **Cancer Research Therapy and Control**, 5:29-33, 1996.

SMITH, K.L.; TISDALE, M.J. Mechanism of muscle protein degradation in cancer cachexia. **Br, J. Cancer**, 68:314, 1993.

SIDDIQUI, R.A. ; WILLIAMS, J.F. Interactions of vasopressin and prostaglandin e E₂ in the development of cancer cachexia. **Med. Sci.**, 15:45-6, 1987.

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

SPEIZER, L.A., WATSON, M.J. and BRUTON, L.L. Differential effects of omega-3 fish oils on protein kinase activities *in vitro*. **A.J.P.**261:E109-E114, 1991.

STAAL-VAN DEN BREKEL, A.J., DENTENER, M.A., SCHOLS., A.M.W.J., BUURMAN, W.A. & WOUTERS, E.F.M. Increased resting energy expenditure and weight loss are related to a systemic inflammatory response in lung cancer patients. **J. Clin. Oncol.**, 13:2600-05, 1995.

STARK, K. D.; PARK, E. J.; MAINES, V. A.; HOLUB, B. J. Effect of a fish-oil concentrate on serum lipids in postmenopausal women receiving and not receiving hormone replacement therapy in a placebo-controlled double-blind trial. **Am J Clin Nutr**, 72(2):389-94, 2000.

STARNEs, H.F., WARREN, R.S., JEEVANANDAM, M., GABRILOVE, J.L., LARCHIAN, W., OETTGEN, H.F. & BRENNAN, M.F. Tumor necrosis factor and the acute metabolic response to tissue injury in man. **J. Clin. Invest**, 82:1321-25, 1988.

STRASSMANN, G., FONG, M., KENNEY, J.S. & JACOB, C.O. Evidence for the involvement of interleukin 6 in experimental cancer cachexia. **J. Clin. Invest.**, 89:1681-84, 1992.

SUMIDA, C., VALLETE, G. and NUNEZ, E.A. Interaction of unsaturated fatty acids with rat liver glucocorticoid receptors: studies to localise the site of interaction. **Acta Endocr.**, 129:348-55, 1993.

TAKAHASHI, M; PRZETAKIEWIEZ, M.; ONG, A.; BOREK, C & LOWENSTEIN, J.M. Effect of ω -3 and ω -6 fatty acids on transformation of cultured cells by irradiation and transfection. **Cancer Res.** 53:154-162, 1992.

TESSITORE, L.; BONELLI, G.; BACCINO, F.M. Early development of protein metabolic perturbations in liver and skeletal muscle of tumor-bearing rats. A model system for cancer cachexia. **Biochem. J.**, 241:153-9, 1987.

TESSITORE, L.; COSTELLI, P.; BACCINO, F.M.; Humoral mediation for cachexia in tumor-bearing rats. **Br. J. Cancer.**, Jan;67(1):15-23, 1993.

TISDALE, M. J. Cancer cachexia: metabolic alterations and clinical manifestations. **Nutrition**, Jan;13(1):1-7, 1997.

TISDALE, M.J. Mechanism of lipid mobilisation associated with cancer cachexia: Interaction between the polyunsaturated fatty acid, eicosapentaenoic acid and inhibitory guanine nucleotide-regulatory protein. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 48:105-09, 1993.

TISDALE, M.J. Induction of lipolysis and muscle protein degradation by EPA in cancer cachexia. **Nutrition**, 12(suppl):531-33, 1996.

TITOV, V.N. Fatty acids transport in the blood by lipoproteins as macromolecules: facts and a hypothesis. **Usp. Fiziol. Nauk.**, 30(3):23-37, 1999.

TODOROF, P.; CARIUK, P.; McDEVITT, T.; COLES, B.; FEARON, K.; TISDALE, M. Characterization of a cancer cachectic factor. **Nature**, 379:739-42, 1996.

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

TORRAS, J.; SOTO, K.; RIERA, M.; HERRERO, I.; VALLES, J.; CRUZADO, J.M.; ALSINA, J.; GRINYO, J.M. Changes in renal hemodynamics and physiology after normothermic ischemia in animals supplemented with eicosapentaenoic acid. **Transpl. Int.**, 9:S455-S459, 1996.

THEOLOGIDES, A. Pathogenesis of cachexia in cancer: a review and a hypothesis. **Cancer**, 29:489, 1972.

THOMPSON, M.P.; KOONS, J. E.; TAN, E. T. H. and GRIGOR, M. R. Modified Lipoprotein Lipase Activities Rates of Lipogenesis and Lipolysis as Factor Leading to Lipid Depletion in C57BL mice-bearing the preputial Glan Tumor ESR-586. **Cancer Res.**, 41:3228-232, 1981.

TRINDER, R. Determination of glucose in blood using glucose with alternative oxygen acceptor. **Ann. Clin. Biochem.**, 6:24-7, 1969.

UAUY R., PEIRANO, P., HOFFMAN, D., MENA, P., BRICH, D. and BIRCH, E. Role of essential fatty acids in the function of the developing nervous system. **Lipids** 31:S167-S176, 1996.

VALLETE, G., VANET, A., SUMIDA, C. and NUNEZ, E.A. Modulatory effects of unsaturated fatty acids on the binding of glucocorticoids to rat liver glucocorticoid receptors. **Endocrinology**, 129:1363-69, 1991.

VASKONEN, T.; LAAKSO, J.; MERVAALA, E.; SIEVI, E.; KARPPAENEN, H. Interrelationships between salt and fish oil in stroke-prone spontaneously hypertensive rat. **Blood Press**, 5(3):178-189, 1996.

VAN HOUWELINGER, A.C., DALBY, SORENSEN, J., HORNSTRA, G. Essential fatty acid status in neonates after fish-oil supplementation during late pregnancy. **Brit. J. Nutr.**, 74:723-31, 1995.

VESSBY, b. Dietary fat and insulin action in humans. **Br. J. Nutr.** 83 (Suppl):S91-6, 2000.

WALLACE, F.A., YAQOUB,P; MILES, E.A. and CALDER, P.C. Dietary fat influences the production of Th1-but not Th2-derived cytokines. **Lipids** 34:S141, 1999.

WANG, L.; SHIMIZU, W; KANEKO, S; HANAKA, S.; ABE, T.; SHIMASAKI, H.; HISAKI, H.; NAKAJIMA, H. Comparison of the fatty acid composition of total lipids and phospholipids in breast milk from Japanese women. **Pediatr Int**, 42(1):14-20, 2000.

WARREN,S The immediate causes of death in cancer.**Am.Med.Sc**,184:610-16,1935.

WATTERS, J.M.; BESSEY,P.Q.; DINARELLO,C.A.; WOLFF,S.M. & WILMORE, D.W. Both inflammatory and endocrine mediators stimulate host responses to sepsis. **Arch. Surg.** 121:179-90, 1986.

WELLS, J. Infant and follow-on formulas:the next decade. **BNF Nutrition Bulletin**; 23 (suppl. 1):23-34, 1998.

WIGMORE, S.J., FEARON, K.C.H. and ROSS, J.A. Modulation of human hepatocyte acute phase protein production in vitro by n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. **Annals of Surgery**, 225:103-11, 1997.

YAQOOB, P; NEWSHOLME, E. A.; CALDER, P C. The effect of dietary lipid manipulation on rat lymphocytes subsets and proliferation. **Immunogy**, 82:603-10,1994.

ZIPSER, R.D. Effects of selective inhibition of thromboxane inhibition on renal function in humans. **Am. J. Physiol.**, 248:F753, 1985.