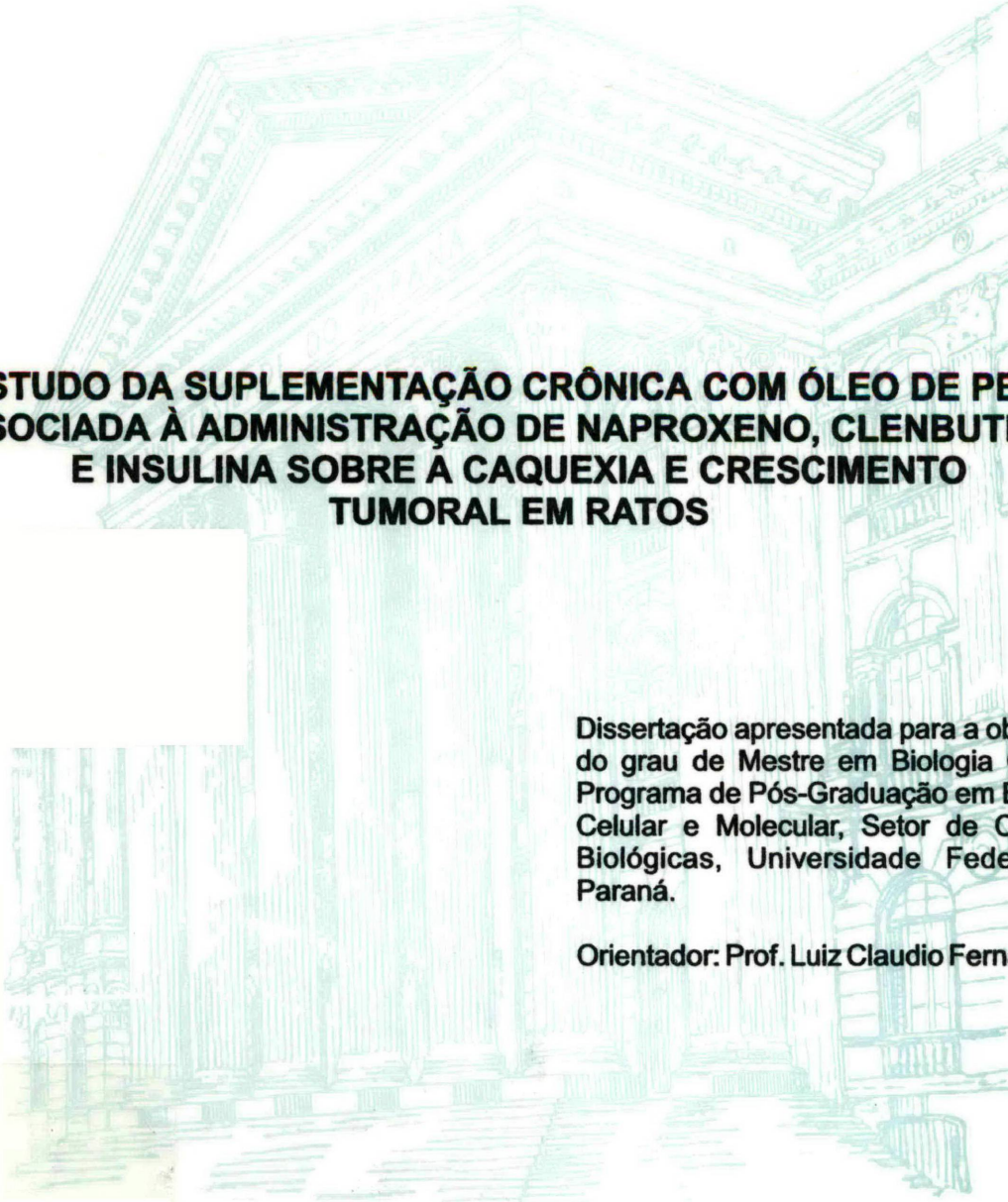


JOÃO AGADIR PINTO JUNIOR



**ESTUDO DA SUPLEMENTAÇÃO CRÔNICA COM ÓLEO DE PEIXE
ASSOCIADA À ADMINISTRAÇÃO DE NAPROXENO, CLENBUTEROL
E INSULINA SOBRE A CAQUEXIA E CRESCIMENTO
TUMORAL EM RATOS**

Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Luiz Claudio Fernandes

CURITIBA

2002

JOÃO AGADIR PINTO JUNIOR

**ESTUDO DA SUPLEMENTAÇÃO CRÔNICA COM ÓLEO DE PEIXE ASSOCIADA À
ADMINISTRAÇÃO DE NAPROXENO, CLENBUTEROL E INSULINA SOBRE A
CAQUEXIA E CRESCIMENTO TUMORAL EM RATOS**

**Dissertação apresentada para obtenção do
grau de Mestre em Biologia Celular,
Programa de Pós-Graduação em Biologia
Celular e Molecular, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do Paraná.**

Orientador: Prof. Luiz Claudio Fernandes

CURITIBA

2002

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

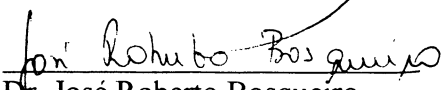
Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná
Instituto de Biologia Molecular do Paraná

PARECER

A Comissão Examinadora de Dissertação de Mestrado “ESTUDO DA SUPLEMENTAÇÃO CRÔNICA COM ÓLEO DE PEIXE ASSOCIADA À ADMINISTRAÇÃO DE NAPROXENO, CLENBUTEROL E INSULINA SOBRE A CAQUEXIA E CRESCIMENTO TUMORAL EM RATOS”, de autoria do pós-graduando **João Agadir Pinto Junior**, e com a Banca Examinadora constituída pelos Professores: Dr. Luiz Cláudio Fernandes (Orientador e Presidente do Departamento de Fisiologia da UFPR), Dr. José Roberto Bosqueiro (Universidade de Campinas) e Dr^a. Ruth Janice Guse Schadeck (Departamento de Biologia Celular – UFPR). Atribui individualmente as seguintes notas: Dr. Luiz Cláudio Fernandes, nota: 10,0 (DCZ); Dr. José Roberto Bosqueiro, nota: 10,0 (DCZ) e Dr^a. Ruth Janice Guse Schadeck, nota: 10,0 (DCZ). De acordo com as exigências do Regulamento do Program de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, o candidato foi: APROVADO com a nota: 10,0 (DCZ), para a devida publicação o trabalho deve sofrer as modificações sugeridas. Em Curitiba, 08 de novembro de 2002.



Dr. Luiz Cláudio Fernandes



Dr. José Roberto Bosqueiro



Dr^a. Ruth Janice Guse Schadeck

À minha esposa Andréa e ao meu filho
Ricardo, pelo amor e apoio indispensáveis
à realização de todas as minhas
atividades

AGRADECIMENTOS

Este trabalho jamais teria se realizado não fosse o auxílio de inúmeras pessoas, as quais cito a seguir, como forma de agradecimento:

Ao Prof. Luiz Claudio Fernandes, orientador.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFPR.

Aos colegas de laboratório.

Aos colegas da turma de mestrado.

Aos funcionários do Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

À Nelson Kuniyoshi e família.

À Telu K. Rebellato e família.

À Sandra Kiyomi Komno Saito e família

À Osni Caetano Pinto e família.

À Cleverson Luiz da Silva Pinto e esposa.

À todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

À Deus.

Meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	v
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 OBJETIVO.....	25
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4 RESULTADOS	39
5 DISCUSSÃO	66
6 CONCLUSÃO.....	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA	- Ácido araquidônico
AC	- Adenilato ciclase
ATP	- Adenosina trifosfato
BAT	- Tecido adiposo marrom
BCAA	- Aminoácidos de cadeia ramificada
CAM	- Calmodulina
cAMP	- Adenosina monofosfato cíclico
COX	- Cicloxigenase
DAG	- Diacilglicerol
DHA	- Ácido docosahexaenóico
EPA	- Ácido eicosapentaenóico
IFN- γ	- Interferon-gama
IL	- Interleucina
IP ₃	- Inositol trifosfato
LA	- Ácido linoléico
LMF	- Fator mobilizador de lipídios
LNA	- Ácido alfa-linolênico
LPL	- Lipase lipoprotéica
NK	- Célula natural killer
PG	- Prostaglandina
PKA	- Proteína quinase A

- PKC - Proteína quinase C
- PMF - Fator mobilizador de proteínas
- Plase - Fosfolipase
- PUFA - Ácido graxo poliinsaturado
- TAG - Triacilglicerol
- TNF- α - Fator de necrose tumoral-alfa
- TX - Tromboxana
- UCP - Proteína desacopladora da cadeia respiratória

RESUMO

Caquexia, associada ou não à anorexia, é uma síndrome frequentemente presente em indivíduos com câncer, caracterizada por intenso catabolismo periférico, levando à debilidade do organismo e prejudicando ou mesmo impossibilitando intervenções terapêuticas mais agressivas contra o câncer. Os mecanismos que induzem o estabelecimento da caquexia ainda não estão totalmente claros, mas as alterações metabólicas provocadas pela presença do tumor e resposta imunológica inadequada por parte do hospedeiro parecem estar envolvidos. Este estudo investigou o efeito da suplementação com óleo de peixe ao longo da vida, associada ou não à intervenções farmacológicas, sobre o crescimento tumoral e caquexia. Ratas Wistar foram suplementadas com óleo de peixe (poliinsaturado) ou óleo de côco (saturado), dose de 1g/Kg de peso corpóreo, desde o desmame (21 dias) até a fase adulta, incluindo períodos de gravidez e amamentação. A prole masculina gerada por estas ratas foi submetida ao mesmo protocolo. Ao completarem 90 dias, estes ratos foram inoculados com suspensão de células do tumor de Walker 256 (2×10^7 céls/mL), e ratos controle foram inoculados com solução salina. Quatro dias depois, iniciou-se tratamento com naproxeno, naproxeno + clenbuterol, ou naproxeno + clenbuterol + insulina. Quatorze dias após a inoculação, os animais foram sacrificados. Tumor, coração e baço foram removidos e pesados. Fígado, músculo sóleo e a porção branca do músculo gastrocnêmio foram retirados para mensuração do conteúdo de glicogênio. O sangue foi coletado para análises bioquímicas. Os grupos portadores de tumor sem suplementação e suplementado com óleo de côco não apresentaram diferença estatística entre si em nenhum dos parâmetros analisados. Entretanto, estes dois grupos tiveram pesos tumorais e concentrações séricas de lactato e triacilgliceróis significativamente maiores ($p < 0,05$), e quantidade de glicogênio, concentrações séricas de colesterol-HDL, insulina, glicose significativamente menores ($p < 0,05$) quando comparados aos demais grupos. Nenhuma suplementação ou tratamento provocou alterações nas concentrações séricas de colesterol e lipídios totais, e no peso do coração quando comparados aos grupos sem tumor. Quanto ao peso do baço, todos os

grupos portadores de tumor apresentaram valores maiores quando comparados aos grupos sem tumor, porém não apresentaram diferença estatística quando comparados entre si. A suplementação com óleo de peixe e o tratamento com naproxeno, naproxeno + clenbuterol, e naproxeno + clenbuterol + insulina, apresentaram resultados semelhantes entre si e quando comparados aos grupos sem tumor. Nossos resultados sugerem que os ácidos graxos poliinsaturados ω -3, presentes no óleo de peixe, e os fármacos utilizados, interferem no crescimento tumoral, reduzindo-o, e revertem o quadro caquético, sem provocar efeitos colaterais indesejáveis, melhorando a qualidade de vida dos pacientes e possibilitando intervenções mais agressivas contra o câncer.

ABSTRACT

Cachexia is a syndrome characterized by anorexia and intense peripheral catabolism, frequently observed in cancer patients. This syndrome hinders and, sometimes, makes aggressive therapeutic interventions, such as chemotherapy, impossible. The mechanisms that induce the appearance of cachexia are not fully clear yet, although metabolic alterations tumor-induced and inadequate immune response of host certainly are involved. This research investigates the effect of fish oil supplementation, along the life, associated or not with pharmacologic approaches, on tumor growth and cachexia. Female Wistar rats were supplemented with either fish oil (polyunsaturated) or coconut oil (saturated), since wean until adult phase. The generated male offspring were submitted to the same protocol. When these rats were 90 days-old, they and others non-supplemented used as control, were inoculated with a suspension of Walker 256 tumor cells (2×10^7 cells/mL). After 4 days, initiated the pharmacologic approaches with naproxen, naproxen + clenbuterol, or naproxen + clenbuterol + insulin. In 14th day after inoculation, the rats were sacrificed. Tumor, heart and spleen were excised and weighed. Liver, soleus muscle and white portion of gastrocnemius muscle were removed to glycogen content measurement. Blood was collected to biochemistry analysis. The non-supplemented and coconut oil supplemented tumor-bearing rats didn't show statistical difference among themselves in any analysed measurements; however, these two groups presented tumor weights and lactate and triacylglycerol blood levels significantly higher ($p < 0,05$), and hepatic and muscle glycogen content and cholesterol-HDL, insulin and glucose blood levels significantly lower ($p < 0,05$) as compared to all other groups. Neither supplementation nor treatment promoted alterations in total lipids and cholesterol blood levels and heart weight as compared to non-tumor groups. All tumor-bearing groups presented spleen weight significantly higher ($p < 0,05$) as compared to non-tumor groups, however, didn't present statistical difference as compared among themselves. The fish oil supplementation and the treatment with naproxen, naproxen + clenbuterol, or naproxen + clenbuterol + insulin, showed similar results among themselves and as compared to the non-tumor rats in all analysed

measurements, except spleen weight, cited above. Our results suggest that polyunsaturated fatty acids ω -3, present in fish oil, and the pharmacos used reduce tumor growth, revert cachexia and don't promote side effects undesirable, improving the patients' life quality and making possible more aggressive interventions against cancer.

INTRODUÇÃO

CÂNCER

Os cânceres são produtos de mutações que liberam as células dos controles normais de proliferação e sobrevivência celular. A progênie de apenas uma célula mutada, herda as mutações e origina um tumor com capacidade ilimitada de crescimento. As mutações que produzem células cancerosas afetam duas grandes classes de genes:

- a) genes de proliferação, conhecidos como proto-oncogenes, que codificam proteínas que normalmente auxiliam a divisão celular;
- b) genes de antiproliferação, conhecidos como genes supressores tumorais, que codificam proteínas que normalmente auxiliam na aplicação dos “freios” que suspendem o ciclo celular (ALBERTS et al, 1999).

A mutação em um proto-oncogene provoca a super-expressão ou hiperatividade da proteína por ele codificada, resultando em multiplicação celular excessiva; o gene mutante é então classificado como oncogene. Proliferação celular excessiva também será o resultado de mutações que inativem um gene supressor tumoral, por liberar a célula das restrições normais da multiplicação celular. Em uma célula diplóide normal existem duas cópias de cada gene supressor tumoral e ambas devem ser inativadas para que haja perda do controle da proliferação, pois uma única cópia é geralmente suficiente para a regulação normal do ciclo celular. Ao contrário, apenas uma cópia de um proto-oncogene precisa ser mutada em um oncogene para que ocorra um efeito semelhante (ALBERTS et al, 1999).

TUMOR DE WALKER 256

Embora haja, reconhecidamente, limitações em extrapolar resultados de modelos animais específicos para pacientes humanos, tais modelos experimentais são

úteis no estudo da caquexia, pois permitem a obtenção de informações de grupos homogêneos de animais no mesmo estágio da doença, livre de fatores secundários e com dieta controlada (EMERY, 1999).

Tumores experimentais com diferentes características morfológicas, que crescem em várias espécies de animais e afetam o hospedeiro com diferentes intensidades, têm sido amplamente investigados. O carcinoma de Walker 256 é um modelo apropriado para estudos sobre interações tumor-hospedeiro, sendo útil também para abordagens de tratamento farmacológico, suprimento nutricional e terapias antineoplásicas, visando possíveis intervenções contra a anorexia e a caquexia induzida pelo tumor (GUAITANI et al, 1983). O tumor ou carcinoma de Walker 256 apresenta dois subtipos: tipo A metastizante, que leva à 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 à morte em 15 dias. Este último tornou-se um importante modelo para estudos da caquexia induzida pelo câncer (GUAITANI et al., 1983).

CAQUEXIA

A perda de tecidos corpóreos, particularmente de massa muscular, está comumente associada à muitas formas de câncer e doenças crônicas, sendo denominada caquexia (MATTHYS & BILLIAU, 1997; TISDALE, 2000). A palavra caquexia deriva do grego *kakos* (ruim, mal) e *hexis* (condição) e pode ser utilizada para descrever qualquer doença que provoque perda tecidual no hospedeiro (THEOLOGIDES, 1979; TISDALE, 1997). É uma complicação frequentemente observada em pacientes com câncer, sendo caracterizada por acentuada perda de peso, perda de tecido muscular esquelético e de tecido adiposo. (WILLIAMS & SIDDIQUI, 1990; ARGILÉS et al 1997; COSTELLI et al 1999; TISDALE, 2001; YOUNES & NOGUCHI, 2000).

Este estado geral caótico está presente em dois terços dos indivíduos que morrem de câncer (WARREN, 1932), ou seja, o grau de caquexia está inversamente

relacionado com o prognóstico de vida do paciente (DEWYS, 1985; ARGILÉS et al, 1997). Como resultado de uma etiologia multifatorial envolvendo mecanismos neurológicos, metabólicos, imunológicos e endocrinológicos (PLATA-SALAMÁN, 2000), as variáveis que induzem o surgimento da caquexia no câncer não estão totalmente esclarecidas, mas a diminuição da ingestão protéico-calórica, impossibilitando a manutenção das reservas energéticas, anorexia, é um dos achados mais frequentes nos portadores de câncer (GROSVENOR et al, 1989; GIACOSA et al, 1996; TISDALE, 2001). No entanto, é improvável que a perda de peso em indivíduos com câncer surja primariamente da redução da ingestão alimentar, pelos seguintes motivos:

- a) a mudança da composição corporal na caquexia difere da encontrada na anorexia; durante a fome, a glicose utilizada pelo cérebro é substituída pelos corpos cetônicos. Isto leva a um decréscimo na gliconeogênese a partir de aminoácidos pelo fígado e, assim, poupa a massa muscular. Ao contrário, em pacientes caquéticos ocorre grande perda de massa muscular esquelética. (FEARON, 1992; TISDALE, 2001);
- b) suplementação nutricional não é capaz de repor a perda de massa corporal (TISDALE, 1997, 2001; ARGILÉS et al, 1997; COSTELLI et al, 1999); qualquer ganho de peso é transitório e corresponde a gordura e água e não massa magra (EVANS et al, 1985; TISDALE, 2001; ARGILÉS et al, 1997);
- c) a perda de músculo e tecido adiposo frequentemente precede a diminuição da ingestão alimentar, ou seja, a caquexia pode ocorrer sem anorexia (BIBBY et al, 1987; TISDALE, 2001);
- d) Em diferentes modelos experimentais, animais com a mesma restrição alimentar não têm a mesma perda de peso que seus pares portadores de tumor (LOWRY, 1991; ARGILÉS et al, 1997).

Sendo assim, a debilidade do portador não está relacionada apenas com seu comportamento alimentar deficiente, mas também com mudanças no metabolismo

intermediário ocasionadas pelo tumor (ARGILÉS et al., 1997; SAKURAI & KLEIN, 1998).

Faz-se necessário, portanto, compreender os mecanismos básicos pelos quais a anorexia e as alterações metabólicas responsáveis pela caquexia se instalam em indivíduos portadores de tumor.

ANOREXIA

A anorexia pode surgir de:

- a) alterações na percepção do gosto ou cheiro da comida (DEWYS, 1982; YOUNES & NOGUCHI, 2000; TISDALE, 2001; ARGILÉS et al, 1997);
- b) Sensação de saciedade precoce causada por tumores que envolvem o trato gastrintestinal resultando em obstrução mecânica, anormalidades na mucosa e distúrbios na digestão e absorção (KNOX, 1983; BALDUCCI & HARDY, 1985; YOUNES & NOGUCHI, 2000; TISDALE, 2001; ARGILÉS et al, 1997);
- c) Causas psicológicas como, por exemplo, depressão (BALDUCCI & HARDY, 1985; ARGILÉS et al, 1997);
- d) Disfunção no sistema adenilato-ciclase da membrana no hipotálamo (TISDALE, 2001). RIVERA et al (1987), ARGILÉS et al (1997), ARGILÉS & LÓPEZ-SORIANO (1990, 1991), GARCÍA-MARTINEZ et al (1994) e LÓPEZ-SORIANO et al (1996) levantaram a hipótese de que aumento nos níveis sanguíneos de lactato e ácidos graxos ou mudanças nos aminoácidos circulantes poderiam participar da resposta anoréxica.
- e) Aumento de triptofano no cérebro: o triptofano, precursor da serotonina, desempenha papel na patogênese da anorexia aumentando a atividade serotoninérgica do hipotálamo ventromedial. A entrada de triptofano no cérebro é regulada por um sistema de transporte específico dividido com aminoácidos de cadeia ramificada

(BCAA), sendo que a incidência de anorexia diminuiu após administração oral de BCAA (CANGIANO et al, 1996; TISDALE, 2001).

- f) Produção de citocinas, tais como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-1 (IL-1), agem diretamente no cérebro causando anorexia por inibição da resposta adaptativa alimentar normal ao déficit de energia (INUI, 1999); receptores para estas citocinas foram detectadas nas áreas envolvidas com o comportamento alimentar no hipotálamo (LAVIANO et al, 1996; TISDALE, 2001).

Tentativas de reverter a caquexia em pacientes com câncer, através de manipulação farmacológica da ingestão de alimentos, têm encontrado os mesmos problemas da suplementação nutricional. Embora o antagonista da serotonina, *ciproheptadina*, tenha efeito sobre o apetite, ele não evita a perda de massa progressiva nos pacientes caquéticos (KARDINAL et al, 1990; TISDALE, 2001; MacDONALD, 2000). Acetato de medroxiprogesterona melhora significativamente o apetite mas não há ganho de peso nos pacientes com doença avançada (DOWNER et al, 1993). O acetato de megestrol melhora o apetite levando a ganho de peso em parte dos pacientes tratados, porém este ganho de peso não está relacionado com aumento da massa corporal magra (LOPRINZI et al, 1990). O papel das citocinas na anorexia ainda não está totalmente claro, uma vez que a pentoxifilina, em doses capazes de diminuir os níveis de mRNA de TNF-alfa, não mostrou qualquer efeito benéfico sobre a anorexia ou caquexia de pacientes com câncer, indicando que não só o TNF-alfa participa da resposta inibitória do comportamento alimentar (GOLDBERG et al, 1995; TISDALE, 2001). Estes resultados sugerem que alterações metabólicas induzidas por produtos tumorais são significantes na perda tecidual em pacientes com caquexia.

METABOLISMO DA GLICOSE

A manutenção do peso corporal requer uma inter-relação entre assimilação e gasto de energia. Sendo assim, a fome é acompanhada por queda no consumo de oxigênio, enquanto o excesso de ingestão de carboidratos está associado

com aumento na termogênese. Esta inter-relação pode ser vista como um mecanismo para economizar energia quando o consumo de calorias é baixo e, prevenir a obesidade, quando há excesso de alimento. Na caquexia do câncer, entretanto, a frequente diminuição na ingestão de calorias não é acompanhada por queda no gasto de energia (ARGILÉS et al, 1997).

Diferentes mecanismos podem estar envolvidos neste gasto de energia aumentado:

- a) aumento da termogênese no tecido adiposo marrom (BAT): adipócitos marrons têm em suas mitocôndrias uma proteína de 32 kDa, denominada termogenina ou proteína desacopladora da cadeia respiratória (UCP), que tem como função liberar energia na forma de calor, sem utilizá-la para a síntese de ATP (NICHOLLS, 1983; BIANCHI et al, 1989; OUDART et al, 1995; ARGILÉS et al, 1997).
- b) Tumores consomem grandes quantidades de glicose resultando em uma liberação maciça de lactato; este é captado pelo fígado que sintetiza nova molécula de glicose. Este ciclo glicose-lactato-glicose é conhecido como Ciclo de Cori (CORI & CORI, 1925; FERNANDES, 1989; ARGILÉS et al, 1997). É um processo metabólico ineficiente, com balanço negativo na produção de energia, uma vez que menor número de moléculas de ATP resultam da glicólise do que são utilizadas para a síntese de glicose a partir do lactato (CORI & CORI, 1925; TAYEK, 1992; YOUNES & NOGUCHI, 2000; TISDALE, 1997, 2000).

METABOLISMO DE LIPÍDIOS

A perda de gordura é frequentemente observada em doenças malignas avançadas, mas também pode ocorrer em pacientes com câncer em estágios precoces, quando o volume do tumor é ainda relativamente pequeno (COSTA et al, 1965;

YOUNES & NOGUCHI, 2000). ARGILÉS et al (1997) enumeraram três motivos para esta redução da massa adiposa:

- 1) aumento da lipólise, resultando em liberação de glicerol para a gliconeogênese hepática e ácidos graxos para serem utilizados como substrato alternativo à glicose pelos tecidos periféricos (THOMPSON et al, 1981). EDMONSON (1966) e TISDALE (2001) observaram que, interessantemente, a oxidação de ácidos graxos não é suprimida pela administração de glicose, como acontece em indivíduos normais;
- 2) diminuição da atividade da lipoproteína lipase (LPL), enzima responsável pela clivagem dos triacilgliceróis. O decréscimo de sua atividade reduz a captação de ácidos graxos pelos adipócitos, comprometendo o armazenamento de lipídios (THOMPSON et al, 1981; LANZA-JACOBY et al, 1984; NOGUCHI et al, 1991);
- 3) redução da lipogênese; TORTI et al (1985) relataram uma atividade menor das enzimas-chaves do processo de síntese *de novo* de ácidos graxos, acetil-CoA carboxilase e ácido graxo sintase.

KHAN & TISDALE (1999) e TISDALE (2001) relataram, ainda, a presença do fator mobilizador de lipídios (LMF), produzido pelas células tumorais, que agiria diretamente sobre os adipócitos estimulando a lipólise de maneira dependente de AMP-cíclico, através de mecanismo similar ao dos hormônios lipolíticos. Este fator foi isolado de um tumor murino indutor de caquexia – MAC 16 – e da urina de pacientes com carcinoma pancreático com perda de peso estabelecida (TODOROV et al, 1998).

METABOLISMO DE PROTEÍNAS

Fisiologicamente, durante o jejum, aminoácidos são mobilizados do músculo esquelético e, no fígado, são substratos para a gliconeogênese hepática. Porém, redução muito prolongada da ingestão alimentar leva à diminuição da degradação das proteínas musculares, evitando desequilíbrio de nitrogênio e depleção muscular. Este mecanismo de conservação de nitrogênio está ausente em indivíduos

portadores de câncer que desenvolvem caquexia, produzindo balanço negativo de nitrogênio (ARGILÉS et al., 1997).

ARGILÉS & LÓPEZ-SORIANO (1996), LECKER et al (1999) e TISDALE (2001) relataram que a perda de músculo esquelético em pacientes com câncer pode resultar da diminuição na síntese e/ou aumento na quebra de proteínas, sendo que a principal via responsável pelo catabolismo protéico é a dependente de ATP-ubiquitina; a ubiquitina se liga covalentemente à proteína servindo como sinal para degradação no proteossomo. Este processo requer ATP e contribui para o aumento no dispêndio de energia. Do mesmo modo, CARBÓ et al.(1997) afirmaram que o catabolismo exacerbado, que afeta o tecido muscular esquelético, tem como principal causa a hiperativação do sistema proteolítico dependente de ATP-ubiquitina.

MEDIADORES DA CAQUEXIA

O estudo crescente da síndrome da caquexia demonstrou o envolvimento de mediadores químicos na produção deste quadro, mediadores estes que podem originar-se do tumor ou do sistema imunológico do hospedeiro em resposta a um estímulo invasor (ARGILÉS et al, 1997).

COLEY (1893), um cirurgião nova-iorquino, observou que, em alguns de seus pacientes, havia regressão de tumores em resposta à infecção ou toxinas bacterianas. Mais recentemente, em 1975, identificou-se um mediador endógeno responsável por provocar necrose hemorrágica de tumor, que foi então denominado como fator de necrose tumoral - TNF (CARSWELL et al, 1975). Uma década mais tarde, outros pesquisadores isolaram um fator de macrófagos, estimulados por endotoxina, que inibiu a atividade da enzima LPL em cultura de adipócitos e, quando injetada em animais, promoveu muitos dos sinais da caquexia; esta molécula foi então denominada caquectina (BEUTLER et al, 1985a; BEUTLER et al, 1985b; MATTHYS & BILLIAU, 1997).

O TNF-alfa ou caquectina – que mais tarde revelaram-se idênticas - é um peptídeo de 17kDa com 157 aminoácidos, produzido principalmente por macrófagos e

monócitos. Mais tarde foi demonstrado ser também produzido por células T, células NK e mastócitos (MATTHYS & BILLIAU, 1997). Receptores para TNF têm sido identificados em praticamente todos os tecidos (BEUTLER & CERAMI, 1986). Sua meia-vida é de 14-18 minutos em humanos e 10 minutos em ratos (FLICK & GIFFORD, 1986). O TNF exerce uma variedade de efeitos, tais como promoção de crescimento, angiogênese, citotoxicidade, inflamação e imunomodulação (ARGILÉS et al, 1997).

O TNF, por diminuir a atividade da enzima LPL, induz hipertrigliceridemia por comprometer a captação de triacilgliceróis pelo tecido adiposo. Além disso, TNF inibe o transporte de glicose nos adipócitos, comprometendo o substrato para a lipogênese (ARGILÉS et al., 1997; TORTI et al., 1985). Entretanto, apesar do TNF ter importante papel como mediador da caquexia em indivíduos portadores de tumor, os desarranjos metabólicos observados nesta síndrome não podem ser explicados somente por este fator (ARGILÉS et al., 1997). O desenvolvimento da caquexia, em ratos portadores de tumor, foi observado mesmo na ausência do TNF, sugerindo o envolvimento de outras citocinas nas alterações metabólicas presentes na síndrome caquética, identificadas como interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6), γ -interferon (γ -IFN) e outras. As interleucinas são proteínas secretadas pelas células do sistema imunitário que têm como função, mediar as interações entre leucócitos para a produção da resposta imunológica, sem se ligar a antígenos. No entanto, elas podem ter origem e ação em outros tipos celulares, como é o caso das ILs 1 e 6 (ALBERTS et al., 1997). A IL-1, produzida principalmente por macrófagos e células endoteliais, é uma citocina inflamatória com atividades biológicas que, em muitos aspectos, assemelham-se àquelas do TNF, sendo capaz de inibir a atividade da enzima LPL e estimular a lipólise em adipócitos em cultura (MATTHYS & BILLIAU, 1997).

A IL-6, proteína de 26 kDa, possui amplo espectro de ação e é secretada por vários tipos celulares. Receptores específicos de alta afinidade para IL-6 estão distribuídos em muitas células diferentes por todo o organismo (YOUNES & NOGUCHI, 2000). BLACK et al (1991) observaram que a IL-6 foi capaz de promover, por si só, caquexia em ratos. MATTHYS & BILLIAU (1997) relataram ação estimulatória da IL-1 sobre a produção de IL-6, podendo haver produção de IL-1 por macrófagos infiltrados

no tumor que, por sua vez, potencializaria a produção de IL-6 por células tumorais, contribuindo para o processo caquético. ARGILÉS et al (1997) observaram que a associação de TNF e outras citocinas, tais como a IL-1, pode ser responsável pelo aumento na termogênese do tecido adiposo marrom contribuindo para o desequilíbrio no metabolismo de energia observado no estado caquético. Além disso, a presença de receptores para TNF em tecido muscular sugere que há uma ação direta desta citocina no processo proteolítico. Além do TNF e interleucinas, outra citocina certamente envolvida nos processos metabólicos que levam à caquexia é o interferon-gama (IFN- γ). Esta molécula produzida por células NK (natural killer) e T ativadas, possui ações biológicas que se sobrepõem àquelas do TNF (ARGILÉS et al, 1997). Embora o IFN- γ , assim como TNF- α e IL-1, provoque aumento na expressão gênica de ubiquitina em músculo esquelético de ratos, após administração endovenosa (LLOVERA et al, 1998), o nível sérico desta citocina não tem correlação com a perda de peso e anorexia de pacientes com câncer (MALTONI et al, 1997). Assim, pode-se dizer que as citocinas formam uma rede imuno-regulatória essencial para a defesa contra agentes nocivos, tais como vírus, bactérias, parasitas e células cancerosas. Entretanto, em doenças crônicas e persistentes, há o perigo de uma superprodução, quando então aparecem sintomas decorrentes de interações sinérgicas ou antagonistas entre estas citocinas (MATTHYS & BILLIAU, 1997).

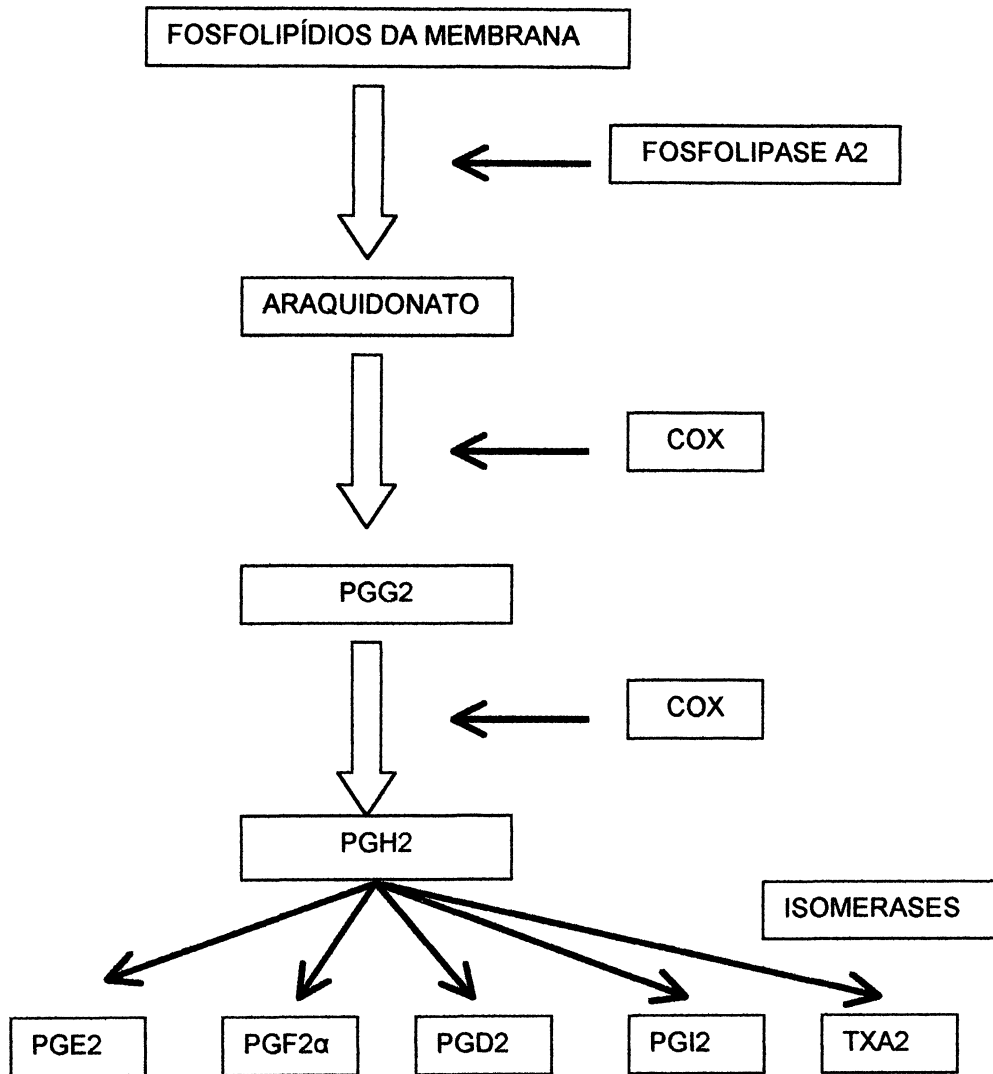
Além das citocinas, TISDALE (1997) observou que fatores catabólicos produzidos pelo tumor agiam diretamente sobre músculo esquelético e tecido adiposo. Tais fatores foram denominados, respectivamente, de fatores mobilizadores de proteínas (PMF) e fatores mobilizadores de lipídios (LMF).

Vários autores citam também as prostaglandinas da série E2 (PGE2) como atuantes na indução da caquexia (RODEMANN & GOLDBERG, 1982; ROE et al, 1997) e/ou promoção do crescimento tumoral (PRESCOTT & FITZPATRICK, 2000). As prostaglandinas são substâncias formadas a partir do ácido araquidônico pela ação da enzima ciclooxigenase – COX (esquema 1). A primeira etapa na síntese de prostaglandinas é a hidrólise do fosfolipídio da membrana resultando em araquidonato livre em uma reação catalisada pela fosfolipase A2. Então, por ação da COX, oxigênio

molecular é inserido no ácido araquidônico produzindo um intermediário instável, a prostaglandina G2 (PGG₂), que é convertida em prostaglandina H₂ (PGH₂). Após, isomerases específicas convertem PGH₂ em diferentes prostaglandinas, entre elas a PGE₂. (DANNENBERG et al, 2001).

Há duas isoformas de COX: a COX-1 é constitutiva na maioria dos tecidos e parece mediar a produção de PGs que controlam funções fisiológicas normais, tais como a manutenção da mucosa gástrica. A COX-2, indetectável em tecidos normais, é induzida por estímulos proinflamatórios e mitogênicos e age aumentando a síntese de prostaglandinas em tecidos inflamados e neoplásicos (DANNENBERG et al, 2001). PRESCOTT & FITZPATRICK (2000) afirmaram que uma vez que a COX-2 seja induzida e catalise a oxidação do ácido araquidônico, há produção de prostaglandinas e subprodutos altamente reativos, que podem acelerar o processo carcinogênico. Entretanto, o mecanismo pelo qual isto acontece ainda não está claro. É possível que a catálise pela COX-2 remova um agente de proteção e gere um ou mais agentes oncogênicos.

ESQUEMA 1 - Biossíntese de prostaglandinas. PG, prostaglandina; TX, tromboxana.
(Adaptado de DANNENBERG et al, 2001).



REVERSÃO DA CAQUEXIA

Sendo a síndrome da caquexia no câncer um quadro complexo e multifatorial que envolve alterações metabólicas, hormonais e imunológicas que induzem a anorexia e intenso catabolismo do hospedeiro (FERNANDES et al., 1991; TRACEY et al., 1987), esta não pode ser sanada apenas com suplementação oral, enteral ou parenteral (TISDALE, 1997; SAKURAI & KLEIN, 1998; PEARLSTONE et al., 1995). As estratégias farmacológicas sugeridas para reverter a caquexia devem atuar sobre os desarranjos metabólicos e combater a anorexia (ARGILÉS et al., 1997).

Corticóides e progestágenos são administrados com o objetivo de aumentar a ingestão protéico-calórica (ARGILÉS et al., 1997; PUCCIO & NATHANSON, 1997). No entanto, o aumento de peso dos portadores de câncer, demonstrado nestes casos, foi acompanhado pelo dobro do aumento da massa tumoral, ou ainda, com retenção líquida e nenhum aumento significativo de massa magra no hospedeiro (ARGILÉS et al., 1997).

A degradação intracelular de proteínas é dependente de duas vias básicas que operam em diferentes compartimentos. Uma via é lisossomal, envolvida na degradação de proteínas endocitadas e de membrana. A outra via é citosólica, ATP-dependente e requer como sinal um peptídeo denominado ubiquitina ligado à proteína a ser degradada (ARGILÉS & LÓPEZ-SORIANO, 1996). Este processo não-lisossomal tem sido indicado como mecanismo primário do catabolismo de proteínas musculares durante a caquexia no câncer (BARACOS, 2000). Proteínas “marcadas” com múltiplas ubiquitinas são alvo de degradação em estruturas chamadas proteossomos. Um proteossomo contém um cilindro central formado por proteases cujos sítios ativos parecem estar voltados para sua câmara interna (ALBERTS et al., 1999). LLOVERA et al (1998) observaram que a perda muscular na caquexia é causada por aumento na quebra de proteínas com pouco ou nenhuma mudança na síntese das mesmas e que diferentes citocinas, tais como TNF, IL-1 e IFN- γ , aumentam a expressão gênica da ubiquitina. A utilização de inibidores proteolíticos, que possam diminuir a ação do sistema proteolítico ATP-ubiquitina-dependente, e agentes proteogênicos foi sugerida

como possível estratégia para reversão da caquexia, pelas ações antagonistas destas moléculas às alterações no metabolismo de proteínas que ocorrem nos indivíduos caquéticos (TISDALE, 1997; MATTHYS & BILLIAU, 1997; BARACOS,2000). Neste ítem, tem se destacado a utilização de anabolizantes musculares, como os agonistas β_2 -adrenérgicos (STALLION et al., 1993) tais como o salmeterol, salbutamol (CARBÓ et al., 1997) e principalmente o clenbuterol (CARBÓ et al., 1997; HYLINDER et al., 1993). Agonistas β_2 -adrenérgicos causam crescimento e hipertrofia muscular, redução de gordura corporal e são capazes, em ratos caquéticos, de reverter a perda muscular através da inativação do sistema proteolítico ATP-dependente (CARBÓ et al, 1997).

A administração de insulina tem sido demonstrada ser capaz de reverter a caquexia e reduzir a velocidade de crescimento tumoral (FERNANDES, 1990), possivelmente devido aos seus efeitos anabólicos, minimizando a degradação de lipídios e proteínas (COSTELLI et al, 1999; PEARLSTONE et al,1994). FERNANDES et al (1991) observaram que, desde que a responsividade dos tecidos periféricos à insulina seja normal, a administração de insulina pode aumentar a utilização de glicose por estes tecidos, diminuindo a proteólise e também a disponibilidade de glicose para o tumor, reduzindo sua velocidade de crescimento.

Uma vez que vários tumores apresentam taxas elevadas de secreção de prostaglandinas, o uso de antiinflamatórios inibidores da enzima COX vem demonstrando eficácia no combate à caquexia em indivíduos portadores de tumor (HOMEM-DE-BITTENCOURT JR et al., 1989; SHIFF et al., 1996; LIAW et al., 1998). KRAUSE & DUBOIS (2000) observaram que há diminuição no risco de câncer de cólon em pessoas que fazem uso prolongado de antiinflamatórios não esteróides. GREENBERG & BARON (1996) e HLA et al (1999) relataram ação inibitória da COX-2 sobre a apoptose das células epiteliais do cólon. Sendo assim, a COX-2 têm se tornado um potencial alvo farmacológico para a prevenção de alguns tipos de câncer, tais como o de cólon, sendo que inibidores seletivos desta enzima têm reduzido a velocidade de crescimento de tumores estabelecidos e portanto alcançando bons resultados como coadjuvante de tratamentos convencionais (PRESCOTT & FITZPATRICK, 2000; DANNENBERG et al, 2001).

A associação de naproxeno – um antiinflamatório não esteróide inibidor de prostaglandinas – clenbuterol e insulina mostrou ser um tratamento eficaz para redução da velocidade de crescimento tumoral e reversão parcial da caquexia em ratos portadores do tumor de walker 256 (PIFFAR, 1999).

SAUER et al (2001) ressaltaram que fatores nutricionais também podem influenciar a carcinogênese e o crescimento de tumores, realçando ou atenuando processos neoplásicos. Dentre estes fatores, os ácidos graxos poliinsaturados, particularmente os pertencentes à família ômega-3 (ω -3), têm despertado interesse entre os pesquisadores devido às suas possíveis propriedades preventivas e/ou terapêuticas sobre o câncer e condições paraneoplásicas. Por outro lado, os ácidos graxos saturados têm sido associados à predisposição ao desenvolvimento de câncer.

ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS

Ácidos graxos são ácidos monocarboxílicos com cadeia normal e número par de átomos de carbono. Conforme a presença (ou ausência) de duplas ligações, são classificados da seguinte maneira:

- a) ácidos graxos saturados: sem duplas ligações;
- b) ácidos graxos monoinsaturados: uma dupla ligação;
- c) ácidos graxos poliinsaturados: duas ou mais duplas ligações (FELTRE & YOSHINAGA, 1975).

A nomenclatura dos ácidos graxos é feita pela numeração ou identificação por letras gregas dos átomos de carbono, a partir do grupo funcional carboxila – numeração Δ (delta) ou sistema de letras gregas – ou a partir do carbono mais distante da carboxila – sistema de numeração n ou ω (ALEXANDER, 1998; ROSE & CONNOLLY, 1999). Ver quadro 1.

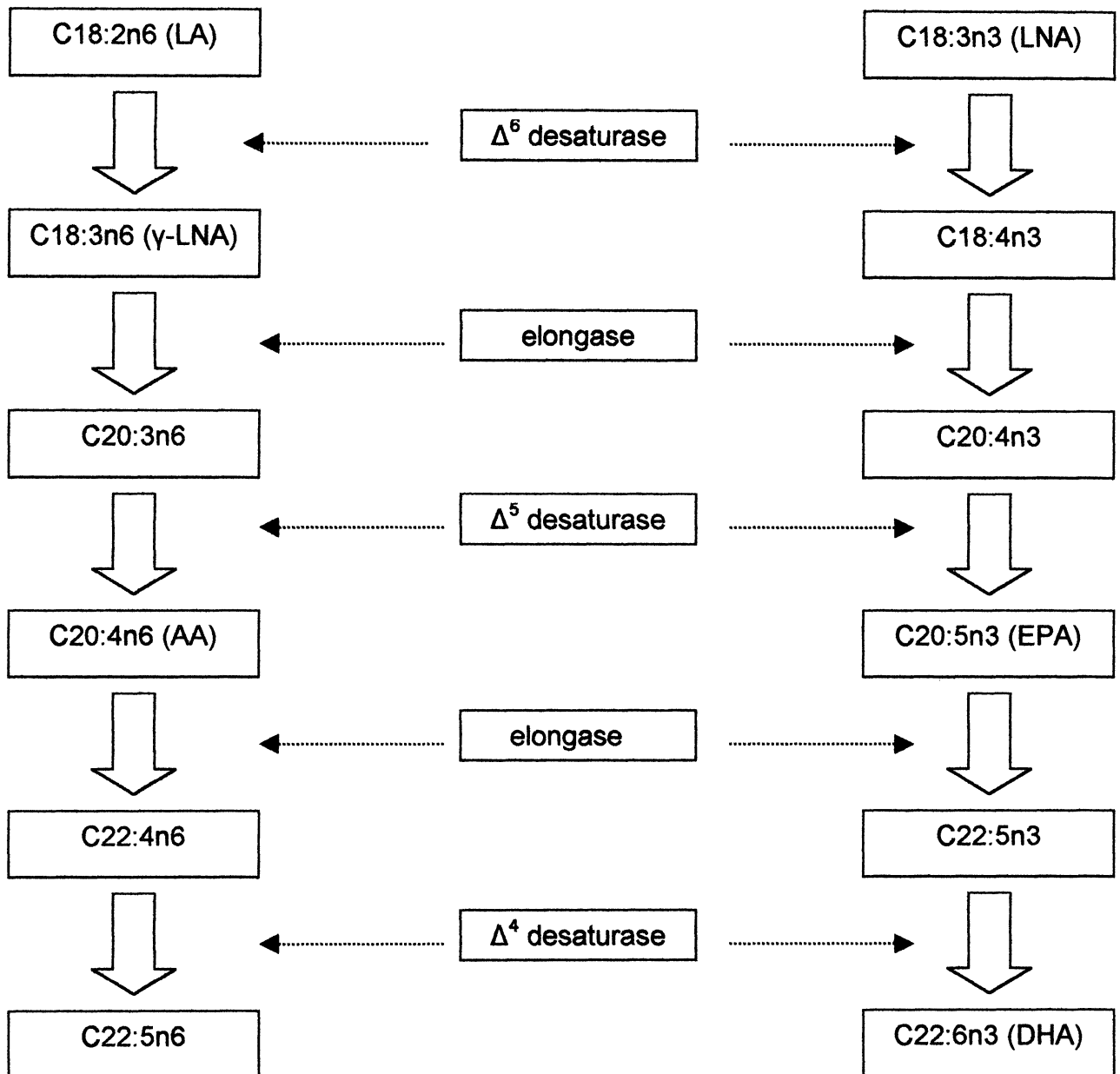
QUADRO 1 - No sistema n ou ω o número de átomos de carbono é mostrado após o C; o número de duplas ligações aparece após os dois pontos; o número após o n (ou ω) representa o local da primeira dupla ligação a partir do carbono mais distante da carboxila. No sistema Δ , os locais das duplas ligações, quando existentes, aparecem antes do número de átomos de carbono.

TIPO	NOME	ESTRUTURA (sistema n ou ω)	ESTRUTURA (SISTEMA Δ)	OBSERVAÇÕES
SATURADO	Ácido láurico	C12:0	12:0	
	Ácido mirístico	C14:0	14:0	
	Ácido palmítico	C16:0	16:0	
	Ácido esteárico	C18:0	18:0	
MONOINSATURADO	Ácido palmitoléico	C16:1n7	9-16:1	Ácido parental
	Ácido oléico	C18:1n9	9-18:1	Ácido parental
POLIINSATURADO	Ácido linoléico	C18:2n6	9,12-18:2	Ácido parental
	Ácido γ -linolênico	C18:3n6	6,9,12-18:3	
	Ácido araquidônico	C20:4n6	5,8,11,14-20:4	
	Ácido α -linolênico	C18:3n3	9,12,15-18:3	Ácido parental
	Ác. Eicosapentaenóico	C20:5n3	5,8,11,14,17-20:5	
	Ác. Docosahexaenóico	C22:6n3	4,7,10,13,16,19-22:6	

As famílias dos ácidos graxos insaturados são designadas ômega-3 (ω -3), ômega-6 (ω -6) e ômega-9 (ω -9). Todos os membros de uma mesma família podem ser sintetizados biologicamente a partir do ácido parental, mas não podem ser interconvertidos (ROSE & CONNOLY, 1999). Através da lipogênese, mamíferos sintetizam ácidos graxos insaturados parentais das famílias ω -7 (palmitoléico) e ω -9 (oléico). A partir deles, todos os demais membros da mesma família podem ser sintetizados por alongamentos e desaturações sucessivas. As desaturases humanas podem inserir duplas ligações apenas entre o carbono 10 e o grupo carboxila, tornando inviável a lipogênese das classes ω -6 e ω -3, a menos que algum dos membros destas famílias estejam presentes na dieta. Por este motivo, os ácidos linoléico (ω -6) e α -linolênico (ω -3) são chamados de essenciais, pois devem estar presentes na dieta e podem ser convertidos em qualquer outro membro da respectiva família. Assim, o ácido alfa-linolênico é convertido em ácido eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), enquanto o ácido linoléico é o precursor do ácido araquidônico (AA). Estes eventos, resumidos no esquema 2, envolvem aumento no tamanho da cadeia e no grau de insaturação, através da adição de duplas ligações entre as já existentes e o grupo carboxila (DE GOMEZ DUMM & BRENNER, 1975; ROSE & CONNOLY, 1999).

O ácido linoléico, um ácido graxo poliinsaturado (PUFA) ω -6, é abundante na dieta ocidental, sendo o principal ácido graxo nos óleos de girassol, milho, soja, açafrão e semente de algodão. Embora seja um ácido graxo essencial, o consumo de modestas quantias – equivalente a 1% do total de calorias – é suficiente para prevenção contra a deficiência de ácidos graxos essenciais (SAUER et al, 2001).

ESQUEMA 2 - Metabolismo do ácido α -linolênico (LNA) para EPA e DHA e do ácido linoléico (LA) para ácido araquidônico (AA). (Adaptado de YOUDIM et al, 2000).

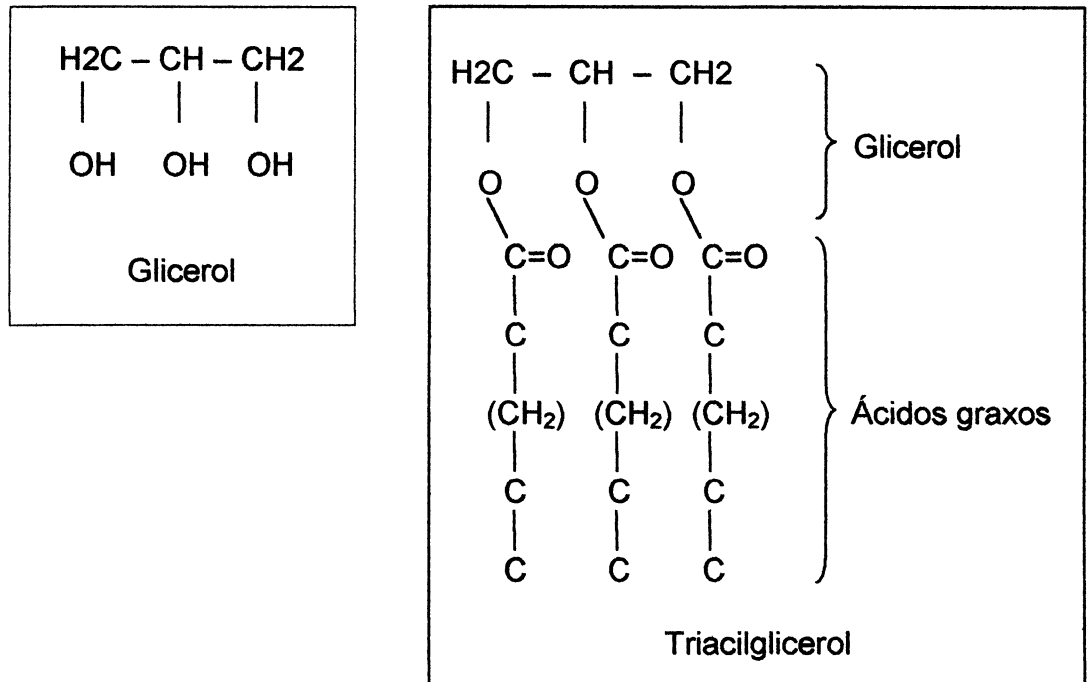


Os ácidos graxos poliinsaturados ω -3 (PUFAs ω -3) presentes em óleos vegetais estão principalmente na forma de ácido α -linolênico. Importantes fontes na dieta são o óleo de canola e o de soja. Óleos de peixes marinhos têm conteúdo maior de PUFAs ω -3, presentes na forma de ácido eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) (ALEXANDER, 1998).

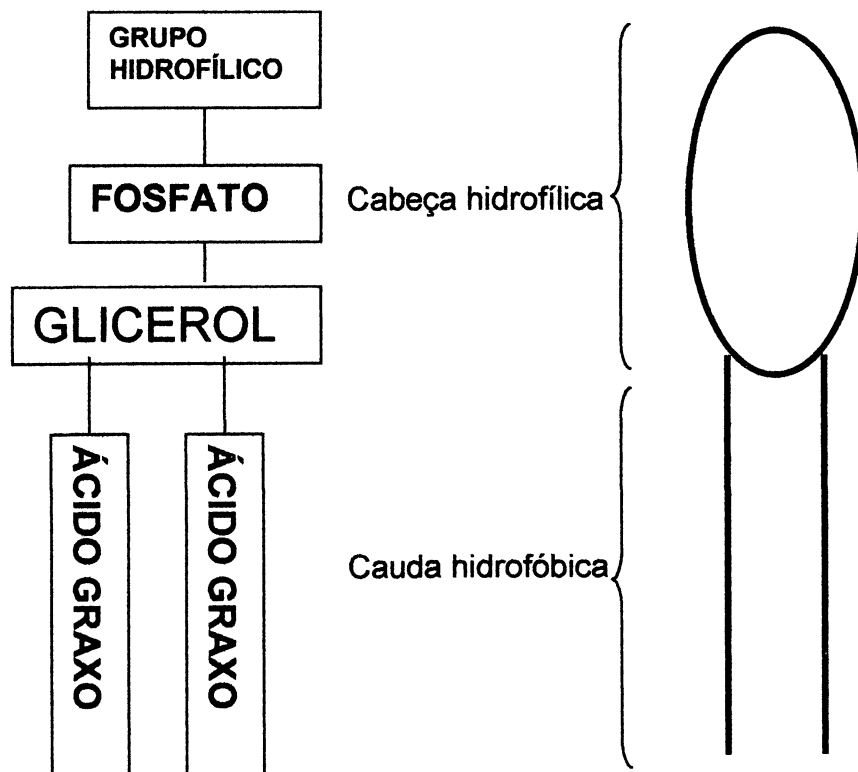
Nas células, os ácidos graxos servem como reserva de energia e são armazenados no citoplasma na forma de gotículas de moléculas de triacilgliceróis, que consistem de três cadeias de ácidos graxos ligadas a uma molécula de glicerol (esquema 3) (CURI et al, 2002).

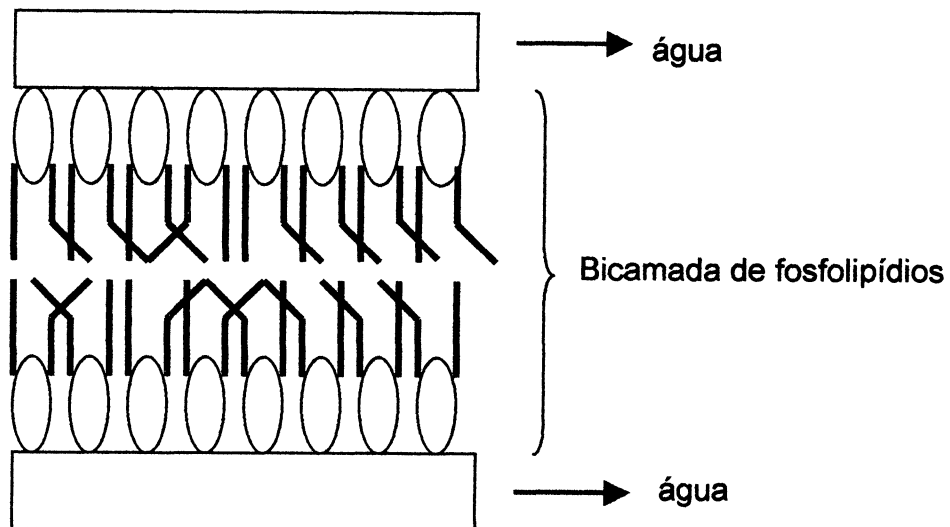
Os ácidos graxos também estão presentes nas membranas celulares, as quais são compostas principalmente de fosfolipídios, que diferenciam-se dos triacilgliceróis por possuírem apenas duas cadeias de ácidos graxos ligadas ao glicerol; a terceira posição do glicerol está ligada a um grupo fosfato hidrofílico que, por sua vez, está ligado a um outro composto hidrofílico pequeno, como por exemplo, a colina (esquema 4). Esta estrutura confere aos fosfolipídios propriedades físicas e químicas que lhes permitem formar membrana em meio aquoso, através da combinação de suas regiões hidrofóbicas de ácidos graxos, originando uma bicamada de lipídios, que é a base estrutural de toda membrana celular (esquema 5) (ALBERTS et al, 1999).

ESQUEMA 3 – Representação do glicerol e triacilglicerol



ESQUEMA 4 - Representação do fosfolípido.



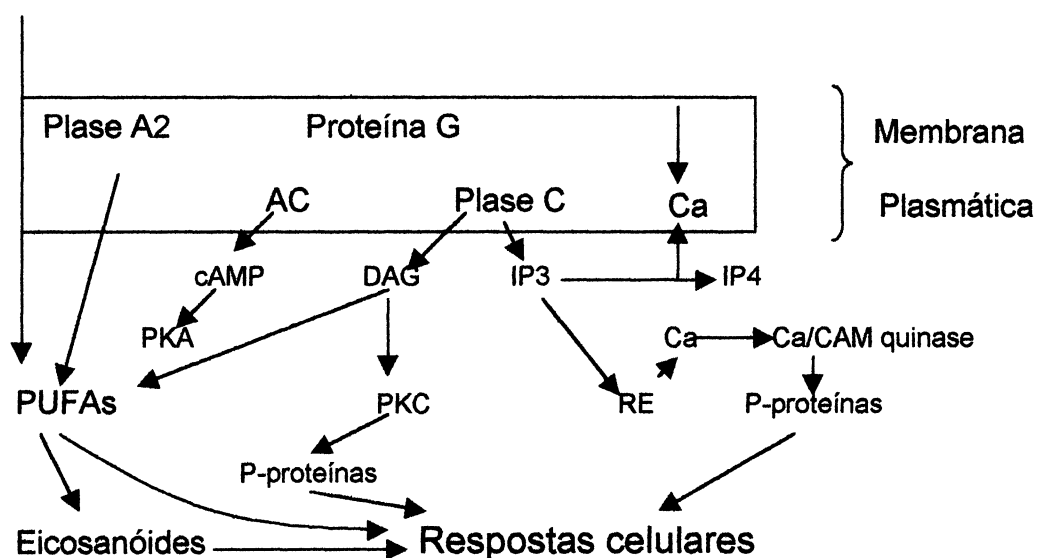
ESQUEMA 5 - Representação da membrana plasmática.

Os tipos de lipídios e sua distribuição na membrana celular podem ser alterados pela disponibilidade de lipídios presentes na dieta, particularmente pelos PUFAs. A composição lipídica da membrana celular exerce influência sobre sua fluidez, formação de receptores, ativação de vias de sinalização intracelular e outras respostas biológicas (ALEXANDER, 1998). Os principais ácidos graxos incorporados à membrana celular em humanos são o EPA e DHA (ω -3), ácido araquidônico (ω -6) e ácido oléico (ω -9). Sob uma variedade de estímulos, os ácidos graxos são liberados dos fosfolípidios para sofrer degradação enzimática e transformarem-se em eicosanóides. O ácido araquidônico, EPA e DHA são os principais substratos para a formação de eicosanóides (ALEXANDER, 1998). Eicosanóides são metabólitos do ácido araquidônico e incluem prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanas. Após ser removido da membrana pela fosfolipase, o ácido araquidônico é convertido em prostaglandina por ação das enzimas cicloxigenase 1 ou 2, como já comentado

anteriormente (ver esquema 1, p.12) (KRAUSE & DUBOIS, 2000; ATAY et al, 2000). Os eicosanóides derivados dos PUFAs ω -3 são menos potentes para induzir respostas celulares do que os derivados do ácido araquidônico e, assim, são usualmente associados com menor potência da resposta inflamatória (ALEXANDER, 1998). Alguns efeitos biológicos decorrentes do processo inflamatório, tais como lipólise, proteólise e neovascularização podem agravar o quadro de desordens crônicas, como no câncer (O'SULLIVAN et al, 1995; CALDER, 2001). Assim, os PUFAs ω -3 podem exercer efeito benéfico no tratamento e prevenção de tais desordens. Estudos epidemiológicos em esquimós e japoneses apontaram uma elevação na incidência de certos tipos de câncer – mama, cólon e próstata – após a ocidentalização da dieta de tais populações, resultado de menor consumo de peixe e maior de gordura saturada e PUFAs ω -6 (BANG et al, 1976; NIELSEN & HANSEN, 1980; KARMALI, 1996). Outros estudos relataram incidência e mortalidade reduzidas por certos tipos de câncer em populações com dietas ricas em PUFAs ω -3 (KAIZER et al, 1989; KROMHOUT, 1990; CAYGILL & HILL, 1995; CAYGILL et al, 1996; FINSTAD et al, 2000).

Vários estudos têm apontado também uma correlação entre PUFAs ω -3 e resposta imunológica atenuada, com influência destes ácidos graxos sobre a regulação e ação de citocinas, incluindo fatores de crescimento, linfocinas (interleucinas), TNF- α e β , interferon α , β e γ , e outros. As citocinas não entram nas células e seus efeitos sobre elas são exercidos via interação com receptores da membrana plasmática (KARMALI, 1996). Os mecanismos de transdução de sinais envolvem segundos mensageiros, tais como via adenilato ciclase e AMP cíclico, inositol 3 fosfato, diacilgliceróis e fosfolipases (esquema 6) (CLEMENS, 1991; KARMALI, 1996; ALEXANDER, 1998).

ESQUEMA 6 - Vias de sinalização celular. AC, adenilato ciclase; Plase A2, fosfolipase A2; PKA, proteína quinase A; PKC, proteína quinase C; DAG, diacilglicerol; IP3, inositol trifosfato; P-proteína, proteína fosforilada; CAM, calmodulina; cAMP, AMP cíclico; Plase C, fosfolipase C; RE, retículo endoplasmático.



Estudos clínicos e experimentais sugerem que os PUFAs ω -3 têm efeitos protetores contra o desenvolvimento, crescimento e progressão de vários tipos de câncer. Estes efeitos podem ser devido à redução da multiplicação celular, como observado em células cancerosas incubadas com tais ácidos graxos poliinsaturados (MENGHAUD et al, 1992; NOGUCHI et al, 1995; PANDALAI et al, 1996; SCHONBERG & SKORPEN, 1997; FINSTAD et al, 2000). Os mecanismos pelos quais os PUFAs ω -3 inibem crescimento tumoral, além de outros benefícios, tais como regulação do equilíbrio energético do organismo (CLARKE, 2000; PRICE et al, 2000; BARBER, 2001) e modulação da resposta imunológica (CALDER, 2001; LANZA-JACOBY et al, 2001), ainda não estão totalmente esclarecidos. MEYDANI (1996) observou que a

superprodução de citocinas presente em doenças crônicas, inflamatórias, autoimunes e neoplásicas pode ser reduzida por PUFAs ω -3. KARMALI (1996) sugeriu que a ação dos PUFAs ω -3 emerge de funções bioquímicas diversas e complexas do EPA e DHA como componentes estruturais dos fosfolipídios de membrana e do EPA como inibidor competitivo do metabolismo do ácido araquidônico, além da modulação da atividade de citocinas, particularmente do TNF, durante a caquexia no câncer. SAUER et al (2000) propuseram um mecanismo pelo qual os PUFAs ω -3, através de transdução de sinais, controlariam a assimilação de ácido linoléico pela célula tumoral inibindo a transcrição de fatores de crescimento. FINSTAD et al (2000) demonstraram que a assimilação e incorporação do EPA, dentro de corpos lipídicos intracelulares pode estar correlacionada à indução de apoptose em células leucêmicas. LIU et al (2001) ressaltaram a importância da razão entre PUFAs ω -6 e ω -3 na dieta, uma vez que o ácido araquidônico pode diminuir os efeitos benéficos do DHA e ser um fator significativo na mediação do crescimento tumoral. PETRIK et al (2000) afirmaram que os efeitos anticancerígenos da dieta com EPA estão relacionados com sua capacidade de reduzir o conteúdo ou o metabolismo do ácido araquidônico nos tecidos. Eles utilizaram um inibidor seletivo da enzima Δ^6 desaturase (ver esquema 2, p.18) para modificar o metabolismo do ácido araquidônico, e obtiveram decréscimo em número e tamanho de tumores em camundongos "nude" portadores de câncer de cólon humano. COLLETT et al (2001) observaram que os PUFAs ω -3 reduzem a presença de proteínas *ras* na membrana, afetando sua ativação. Em virtude do papel central desta classe de proteínas no desenvolvimento do câncer de cólon, este achado pode explicar em parte porque dietas com óleo de peixe previnem este tipo de câncer.

Sendo assim, parece lícito sugerir que os ácidos graxos poliinsaturados ω -3 poderiam ser utilizados como coadjuvantes no combate à caquexia no câncer, aliando-se a estratégias farmacológicas e fatores nutricionais, na busca de melhoria na qualidade de vida dos indivíduos portadores de tumor.

OBJETIVO

Suplementação alimentar com óleo de peixe (rico em ácidos graxos ω -3) melhora a capacidade do organismo em responder ao desenvolvimento de tumores e no estabelecimento da caquexia. Resposta semelhante é obtida em ratos portadores de tumor tratados com naproxeno, clenbuterol e insulina. O presente trabalho investigou se a associação destes fármacos com a suplementação nutricional induz a resultados melhores do que os obtidos individualmente com cada um deles.

MATERIAIS E MÉTODOS

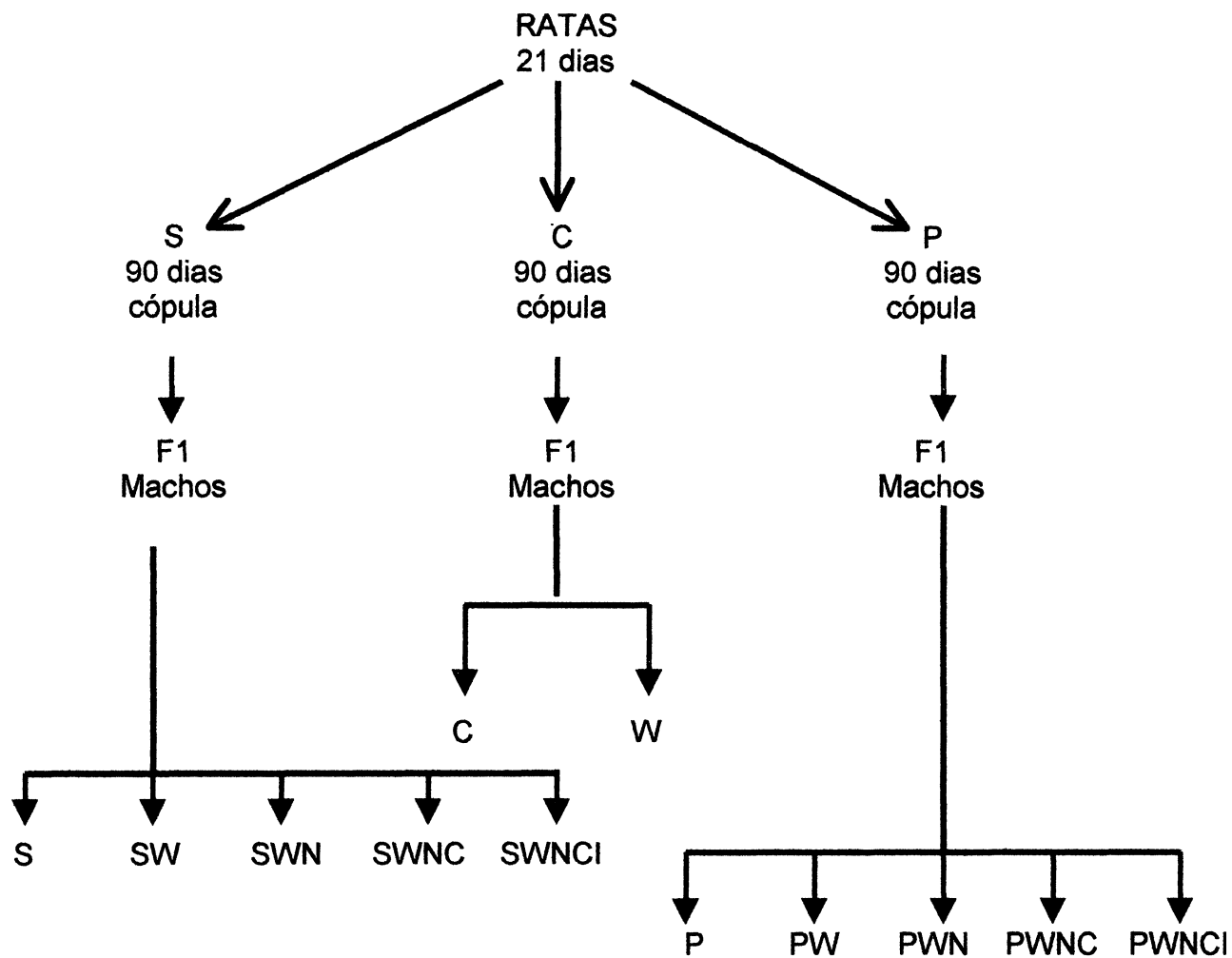
ANIMAIS E PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Ratas Wistar, com 21 dias de vida, obtidas do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, foram submetidas a ciclo claro/escuro (12/12 horas) com água e alimentação à vontade, em caixas com no máximo seis animais, em ambiente com temperatura controlada de $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e suplementadas diariamente com 1g/Kg p.c. de óleo de peixe (MaxEPA, Prodome), ou óleo de côco (Indústria Brasileira Refino de Óleos do Brasil Ltda.), até atingirem a maturidade sexual (90 dias), quando então foram colocadas para reprodução com machos não submetidos a esta suplementação. Os machos resultantes (F1) foram tratados da mesma maneira que as suas mães, divididos em três grupos conforme a suplementação alimentar: óleo de côco (grupo saturado), óleo de peixe (grupo poliinsaturado) e grupo controle. A cada dois dias foi monitorada a evolução da massa corpórea de todos os ratos em balança digital Denver Instrument XL-410, sempre no período vespertino. Ao atingirem a idade adulta (90 dias), estes ratos foram inoculados com suspensão de células (2×10^7 células/mL) obtidas do tumor ascítico de Walker 256 (W), quando então os grupos saturado (S) e poliinsaturado (P) foram divididos em 5 subgrupos cada um: não portador de tumor (denominados S e P, respectivamente), portador de tumor sem tratamento (denominados SW e PW), portador de tumor tratado com naproxeno (SWN e PWN), portador de tumor tratado com naproxeno + clenbuterol (SWNC e PWNC) e portador de tumor tratado com naproxeno + clenbuterol + insulina (SWNCI e PWNCI); e o grupo controle foi dividido em 2 subgrupos, um portador de tumor (W) e outro não portador de tumor (C), resultando num total de 12 grupos de trabalho (ver diagrama, p.27).

Os tratamentos foram iniciados 4 dias após a inoculação, quando o tumor era palpável, injetando-se 1U/100g de peso corpóreo, subcutaneamente a cada dois dias, insulina (NPH U-100, Biobras, Brasil); 0,1 mg/mL adicionados à água de beber, trocada diariamente, de naproxeno (Naprosyn, Sintex Corporation, USA); e 0,15 mg/Kg de peso corpóreo, injetado todos os dias subcutaneamente, de clenbuterol

(Ventipulmin, Boehringer Ingelheim, México). Após 14 dias da inoculação das células tumorais, os animais foram sacrificados.

DIAGRAMA DE FASES DO EXPERIMENTO



C	grupo controle: animais sem tumor e/ou suplementação
W	Grupo com tumor: animais inoculados com tumor de Walker 256 que não receberam suplementação e/ou tratamento
S	Grupo saturado: animais suplementados com ácido graxo saturado (óleo de coco)
SW	Grupo saturado com tumor: animais suplementados com ácido graxo saturado e inoculados com tumor de Walker 256
SWN	Grupo saturado com tumor tratado com naproxeno
SWNC	Grupo saturado com tumor tratado com naproxeno + clenbuterol
SWNCI	Grupo saturado com tumor tratado com naproxeno + clenbuterol + insulina
P	Grupo poliinsaturado: animais suplementados com ácido graxo poliinsaturado ômega-3 (óleo de peixe)
PW	Grupo poliinsaturado com tumor: animais suplementados com ácido graxo poliinsaturado e inoculados com tumor de Walker 256
PWN	Grupo poliinsaturado com tumor tratado com naproxeno
PWNC	Grupo poliinsaturado com tumor tratado com naproxeno + clenbuterol
PWNCI	Grupo poliinsaturado com tumor tratado com naproxeno + clenbuterol + insulina

OBTENÇÃO E TRANSPLANTE DAS CÉLULAS TUMORAIS

Em um animal portador de tumor ascítico de Walker 256 foi injetado 10 mL de solução salina, após seu sacrifício por deslocamento cervical. Com auxílio de pipeta Pasteur de plástico, coletou-se o líquido ascítico peritoneal, obtendo-se um volume aproximado de 30-40 mL. Uma alíquota de 0,1 mL foi retirada para contagem do número de células. Após contagem em câmara de Neubauer, utilizando o corante vital azul de Trypan, 1mL da suspensão (contendo 2×10^7 células) foi injetado subcutaneamente nos animais (FERNANDES et al., 1991). Os ratos do grupo controle foram inoculados com 1mL de solução salina 0,9%.

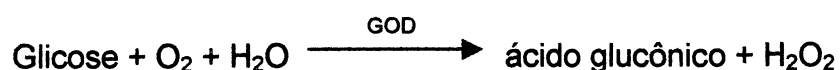
DETERMINAÇÃO DO PESO DO TUMOR, BAÇO E CORAÇÃO

Após o sacrifício, tumor, baço e coração foram removidos do animal e pesados em balança Denver Instrument XL-410.

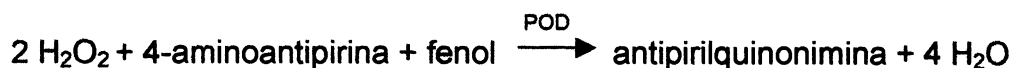
PROCEDIMENTOS BIOQUÍMICOS

1. Determinação das concentrações plasmáticas

- a) Glicose: pelo método enzimático colorimétrico, utilizando-se kit da Labtest Diagnóstica, segundo TRINDER (1969). As amostras foram preparadas seguindo instruções do fabricante. A glicose oxidase (GOD) catalisa a oxidação da glicose de acordo com a seguinte reação:



O peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, sob ação catalisadora da peroxidase (POD), através de uma reação oxidativa de acoplamento, formando uma antipirilquinonimina vermelha cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de glicose na amostra.

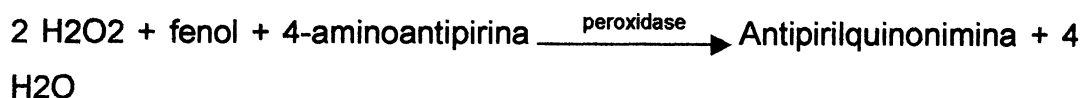
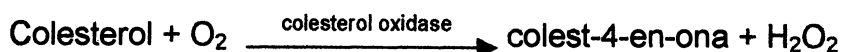


A leitura das absorvâncias das amostras foram feitas em 505 nm, e a concentração de glicose foi determinada através do seguinte cálculo:

$$\text{Glicose (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância da amostra}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 100$$

- b) Insulina: por radioimunoensaio. Este método é baseado na competição entre a insulina de porco marcada com radioisótopo ^{125}I e a insulina de rato fria (não marcada) pelo anticorpo anti-insulina produzido na cobaia. Mantendo-se constante a quantidade de hormônio radioativo e do anticorpo, a formação do complexo insulina marcada – anticorpo depende da quantidade de insulina fria presente na solução padrão. O complexo antígeno – anticorpo pode ser facilmente precipitado pela adsorção do hormônio ao polietileno glicol (PM 6000), uma modificação do método original que utilizava uma anti-gamaglobulina de cobaia produzida no coelho como precipitante, conforme MORGAN & LAZAROW (1963) e PUPO & MARREIRO (1970). A concentração do hormônio na amostra foi determinada pela quantificação de radiação gama.
- c) Colesterol total: pelo método enzimático colorimétrico, utilizando-se kit da Labtest Diagnóstica. As amostras foram preparadas seguindo instruções do fabricante. A concentração de colesterol total é determinada de acordo com as seguintes reações:





Os ésteres de colesterol são hidrolisados pela colesterol esterase a colesterol livre e ácidos graxos. O colesterol livre é oxidado pela colesterol oxidase a colest-4-en-ona e peróxido de hidrogênio. Na presença de peroxidase e peróxido de hidrogênio, o fenol e a 4-aminoantipirina são oxidados formando a antipirilquinonimina. A intensidade da cor vermelha formada na reação final é diretamente proporcional à concentração do colesterol na amostra.

A leitura das absorbâncias das amostras foi feita em 500 nm, e a concentração de colesterol determinada através do seguinte cálculo:

$$\text{Colesterol (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância da amostra} \times 200}{\text{Absorbância do padrão}}$$

d) Colesterol HDL: pelo método enzimático, utilizando-se kit da Labtest Diagnóstica. As amostras foram preparadas seguindo instruções do fabricante. A concentração de colesterol HDL é determinado de acordo com o seguinte princípio:

As lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e de baixa densidade (LDL) são precipitadas e, após centrifugação, o colesterol ligado às lipoproteínas de alta densidade (HDL) é determinado no sobrenadante.

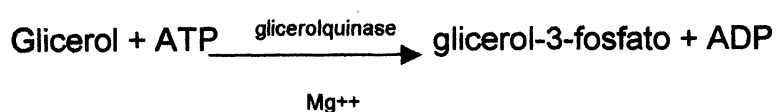
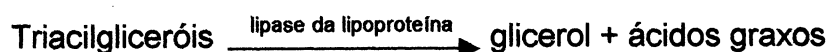
A leitura das absorbâncias das amostras foi feita em 500 nm, e a concentração de colesterol determinada através do seguinte cálculo:

$$\text{Colesterol HDL (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância da amostra} \times 40}{\text{Absorbância do padrão}}$$

e) Lipídios totais: por método colorimétrico, utilizando-se kit da CELM – Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos (FRINGS & DUNN, 1970). As amostras foram preparadas seguindo instruções do fabricante. Os lipídios séricos, incluindo os ácidos graxos insaturados livres e esterificados e o colesterol livre e seus ésteres, reagem com a vanilina em meio fosfórico, primeiramente reagindo em ácido sulfúrico aquecido. O cromógeno rosa violáceo assim obtido é lido espectrofotometricamente em 530 nm e é proporcional à concentração dos lipídios totais da amostra, que é determinada através do seguinte cálculo:

$$\text{Lipídios totais (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância da amostra} \times 1000}{\text{Absorbância do padrão}}$$

f) Triacilgliceróis: pelo método enzimático colorimétrico, utilizando-se kit da Labtest Diagnóstica. As amostras foram preparadas seguindo instruções do fabricante. A concentração de triacilgliceróis é determinada de acordo com as seguintes reações:



O glicerol liberado na hidrólise dos triacilgliceróis, catalisada pela lipase da lipoproteína, é convertido pela ação da glicerolquinase em

glicerol-3-fosfato, que é oxidado a dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio na presença da glicerolfosfato oxidase. A reação de acoplamento que ocorre entre peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e ESPAS, é catalisada pela peroxidase produzindo a quinoneimina. A intensidade da cor violeta formada é diretamente proporcional à concentração dos triacilgliceróis na amostra.

A leitura das absorvâncias das amostras foi feita em 540 nm, e a concentração de triacilgliceróis determinada através do seguinte cálculo:

$$\text{triacilgliceróis (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância da amostra} \times 200}{\text{Absorbância do padrão}}$$

g) Lactato: por método enzimático. Inicialmente é feita a desproteinização do soro (500 µL), adicionando-se 50 µL de ácido tricloroacético a 25% (TCA), sendo a mistura agitada em vórtex e centrifugada por um minuto a 13000 rpm. Após, coleta-se 200 µL do sobrenadante e adiciona-se 2 µL de indicador universal para permitir a visualização da neutralização do soro por adição de KOH/TRIS (0,5M/2M), sinalizada pela coloração verde, indicando pH 7,0. Em seguida, 100 µL do soro neutralizado é pipetado em tubos contendo 1 mL do tampão de ensaio, e após 45 minutos faz-se a leitura a 340 nm no espectrofotômetro.

A concentração de lactato foi determinada através do seguinte cálculo:

$$\text{Lactato } (\mu\text{mol/mL}) = \frac{\text{DO}}{6,22} \times \frac{\text{V1}}{\text{V2}} \times \frac{\text{V3}}{\text{V4}} \times \frac{\text{V5}}{\text{V6}}$$

DO = densidade ótica da amostra

6,22 = constante

V1 = volume da amostra + tampão de ensaio

V2 = volume da amostra

V3 = volume do soro + TCA

V4 = volume do soro

V5 = volume do soro desproteínizado + volume de neutralização

V6 = volume do soro desproteínizado

TAMPÃO DE ENSAIO (para 100 mL de água destilada)	
EDTA	0,28 g
Glicina	2,8 g
Hidrato de hidrazina	1,5 mL
LDh	0,4 mL
NAD ⁺	60 mg
PH	8,85

2. Determinação do conteúdo de glicogênio por método enzimático:

No fígado e tecido muscular esquelético mensurou-se o conteúdo de glicogênio, conforme LEIGHTON et al (1985). Amostras de fígado e dos músculos esqueléticos sóleo (vermelho) e gastrocnêmio (porção branca) foram retiradas dos animais e colocadas em tubos de ensaio contendo 500 μ L de KOH 1M em banho de aproximadamente 70°C por 20 a 30 minutos, para a digestão destes tecidos. Em seguida, coletou-se 100 μ L de cada amostra e adicionou-se 17,5 μ L de ácido acético glacial e 500 μ L de tampão acetato com amiloglicosidase a 1% e novamente levadas ao banho (37°C por 2 horas). Após este período, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 12000 rpm e coletou-se 100 μ L de cada amostra. Este volume foi colocado em tubos de ensaio contendo 1 mL de tampão trietanolamina (TEA) +ATP + NADP + Hexoquinase/glicose-6-fosfato desidrogenase (HKG6PDh). Depois de 40 minutos, efetuou-se a

leitura espectrofotométrica a 340 nm e determinou-se o conteúdo de glicogênio através do seguinte cálculo:

Conteúdo de glicogênio ($\mu\text{mol/g}$ de tecido) = densidade ótica x 8,85 x 1/peso úmido (g)

TAMPÃO ACETATO (100 mL)	
Ácido acético glacial	480 μL
Acetato de sódio	975 mg
PH	4,8

TAMPÃO TEA (100 mL)	
Trietanolamina	5,6 g
MgSO ₄	0,074 g
ATP	0,2 g
NADP	0,015 g
HKG6PDh	300 μL
PH	7,5

3. Determinação dos produtos de peroxidação lipídica:

Os produtos da peroxidação lipídica do tecido tumoral foram mensurados como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), seguindo método descrito por MIYASAKA et al, 2001. O conteúdo de

proteínas dos tecidos foi mensurado conforme método descrito por BRADFORD (1976), usando albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

ANÁLISE HISTOLÓGICA DO TECIDO TUMORAL

Fragmentos de 5 a 10 mm² do tecido tumoral dos grupos portadores de tumor tratados com naproxeno (SWN e PWN) foram fixados por imersão em ALFAC (etanol 80%, formol 37-47 %, ácido acético glacial na proporção 17:2:1) por 16 horas. A seguir, as peças sofreram processo de desidratação, através da passagem por uma sequência crescente de álcoois, diafanização em xilol, e inclusão em parafina, quando ficaram 2 horas na estufa a 60°. Depois disso, o material foi emblocado em paraplast e passou pelo processo de trimagem, quando as peças são posicionadas no ápice de uma pirâmide esculpida no bloco. Após a trimagem, o material foi levado ao micrótomo (Leica RM 2145) onde foram feitos cortes de 5 µm, os quais foram distendidos em lâminas de vidro e cobertos com albumina para adesão dos cortes na lâmina, que então passaram pelo processo de montagem permanente, constituído de 5 etapas: desparafinização com xilol; hidratação com uma série decrescente de álcoois (100 a 70 %); coloração com hematoxilina e eosina; desidratação com uma série crescente de álcoois (70 a 100 %); e finalmente a montagem, quando uma lamínula foi colocada sobre o material com o auxílio de uma resina. Os tempos utilizados foram:

Fixação em ALFAC: 16 horas.

Desidratação:

Álcool 70%	1,5 h
Álcool 80%	1,5 h
Álcool 90%	1,5 h
Álcool 95%	1,5 h
Álcool 100%	30 min
Álcool 100%	30 min
Álcool 100%	30 min

Diafanização:

Álcool 100% + xilol (1:1)	1h
Xilol	1h
Xilol	1h

Desparafinização:

Xilol	5 min
Xilol	5 min
Xilol + álcool	5 min

Hidratação:

Álcool 100%	5 min
Álcool 100%	5 min
Álcool 90%	5 min
Álcool 70%	5 min

Coloração:

Hematoxilina	1 min 30 seg
Eosina	30 Seg

Desidratação:

Álcool 70%	1 min
Álcool 90%	1 min
Álcool 100%	5 min
Álcool 100%	5 min

Montagem:

Xilol	5 min
Xilol	5 min

Montagem com resina e lamínula

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média dos grupos experimentais e analisados estatisticamente pelo método Anova com pós-teste de Tukey e teste "t" de Student, com significância para $p < 0,05$.

RESULTADOS

A figura 1 mostra a variação do peso corpóreo em porcentagem, durante a gravidez, das ratas suplementadas com óleo de peixe (P) ou óleo de côco (S) desde o desmame até a fase adulta (21 a 90 dias). Não houve diferença significativa na variação do peso entre estes grupos quando comparados entre si e com o grupo controle (C), sem suplementação.

A prole obtida, machos, foram submetidos ao mesmo protocolo de suplementação nutricional de suas mães e também não apresentaram diferença significativa na variação do peso corpóreo (%) desde o desmame até a fase adulta (Fig. 2), quando comparados entre si.

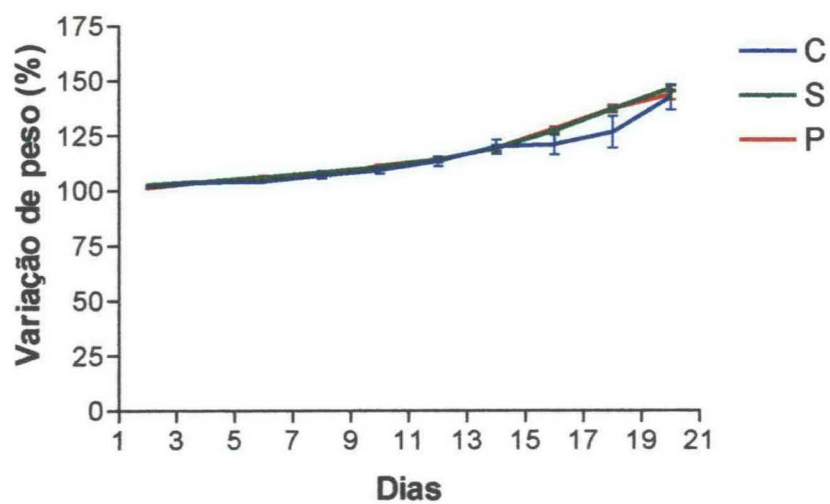


FIGURA 1: Variação do peso corpóreo (%) das ratas durante a gestação (21 dias). Os dados estão apresentados como média \pm EPM. C(n=4); S(n=8); P(n=7).

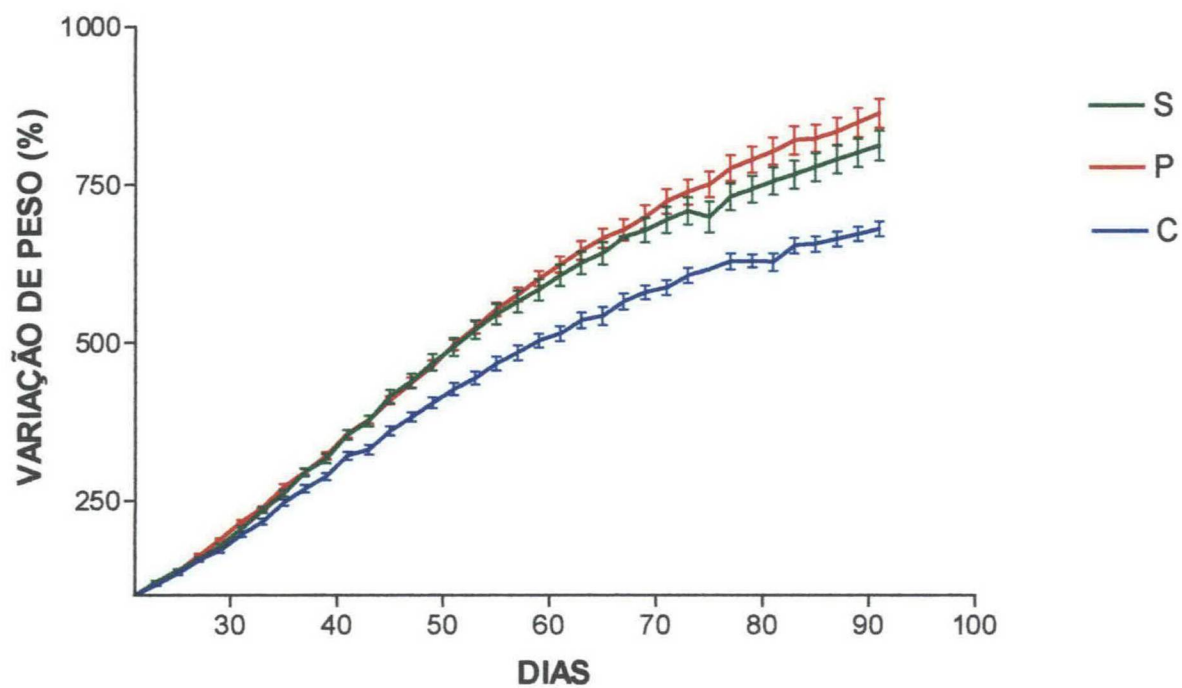


FIGURA 2: Variação do peso corpóreo (%) dos ratos desde o desmame (21 dias) até a fase adulta (90 dias). O peso do rato no dia 21 foi considerado como 100%. Os dados estão apresentados como média \pm EPM. C(n=11); S(n=45); P(n=37).

O peso corpóreo dos animais inoculados ou não com tumor está apresentado na tabela 1. Os animais sem tumor dos grupos controle (C), suplementado com óleo de côco (S) ou óleo de peixe (P), tiveram ganho de peso ao final de 14 dias da inoculação da solução salina, em média 7,6%. Já no grupo com tumor (W) houve uma perda de 5,7% da massa corpórea. No grupo suplementado com gordura saturada e portador de tumor (SW), esta perda alcançou 8,3%. Em ambos os grupos a perda foi significativa quando comparada aos grupos sem tumor mas não foi diferente quando comparada entre si. O grupo portador de tumor suplementado com gordura poliinsaturada (PW), óleo de peixe, teve ganho de peso de 4%, diferença significativa quando comparada aos grupos W e SW, e não estatisticamente diferente quando comparada à dos grupos sem tumor e aos submetidos aos diferentes tratamentos. Da mesma forma, os grupos portadores de tumor que receberam tratamento com naproxeno, naproxeno + clenbuterol, e naproxeno + clenbuterol + insulina suplementados com óleo de peixe ou de côco, não apresentaram diferença estatística quando comparados entre si e aos grupos sem tumor, mas foram significativamente diferentes quando comparados aos grupos W e SW, tendo ganho de peso de 7,8%, em média.

TABELA 1: Peso corpóreo dos animais no dia da inoculação do tumor (dia 01) e no dia do sacrifício (dia 14), peso do tumor e peso da carcaça expressos em gramas. Os dados estão apresentados como média \pm EPM. *Diferença significativa quando comparado aos demais grupos ($p < 0,001$), mas sem diferença entre si. C(n=10); S(n=10); P(n=12); W(n=11); SW(n=15); PW(n=5); SWN(n=8); SWNC(n=5); SWNCI(n=8); PWN(n=9); PWNC(n=8); PWNCI(n=7).

	C	S	P	W	SW	PW	SW N	SW NC	SW NCI	PW N	PW NC	PW NCI
PESO DIA 01 (g)	325.8 \pm 15.23	315.6 \pm 10.30	334.3 \pm 8.79	340.8 \pm 11.21	322.9 \pm 7.37	290.2 \pm 18.25	307.3 \pm 14.62	308.2 \pm 27.15	349.6 \pm 7.11	344.0 \pm 16.25	334.3 \pm 15.40	345.0 \pm 16.93
PESO DIA 14 (g)	348.6 \pm 15.97	344.3 \pm 8.69	356.3 \pm 9.35	345.8 \pm 10.78	321.5 \pm 9.46	310.0 \pm 18.43	336.1 \pm 12.68	332.0 \pm 24.19	390.4 \pm 3.27	372.1 \pm 17.31	367.4 \pm 16.65	386.7 \pm 22.23
PESO TUMOR (g)	-	-	-	29.49 \pm 2.28	24.94 \pm 1.38	8.01 \pm 1.89	9.35 \pm 1.37	9.17 \pm 1.66	8.28 \pm 1.21	6.51 \pm 1.36	4.25 \pm 0.70	6.76 \pm 1.64
PESO CARÇAÇA (g)	-	-	-	320.9 \pm 10.27	296.5 \pm 10.44	302.0 \pm 19.47	326.8 \pm 13.07	322.8 \pm 23.13	382.1 \pm 2.83	366.2 \pm 15.97	363.0 \pm 16.54	380.0 \pm 22.17
VARIAÇÃO (%)	7.02 \pm 0.90	9.36 \pm 1.18	6.65 \pm 1.05	-5.71* \pm 1.57	-8.32* \pm 1.86	4.02 \pm 0.76	6.74 \pm 2.07	5.27 \pm 2.39	9.53 \pm 1.78	6.66 \pm 1.38	8.65 \pm 0.78	9.79 \pm 1.55

Na figura 3, tem-se o peso do tumor (g) nos grupos estudados. No grupo W, o tumor alcançou 29,49 g e no grupo SW 24,94 g, não sendo diferentes entre si. No grupo PW, o peso foi de 8,01 g. Ao adicionar o tratamento com naproxeno, o peso foi de 9,34 no grupo SWN e de 6,51 no grupo PWN, pesos semelhantes entre si e ao grupo PW, mas estatisticamente diferentes quando comparados aos grupos W e SW. A adição de clenbuterol ao tratamento não promoveu redução adicional do peso do tumor, que ficou próximo ao induzido pelo tratamento com naproxeno. A adição de insulina ao tratamento não alterou o peso do tumor, ficando este similar ao encontrado nos grupos tratados com naproxeno e naproxeno + clenbuterol, mas foram significativamente menores quando comparados aos dos grupos W e SW. Em resumo, os animais dos grupos W e SW apresentaram peso tumoral aproximadamente 3 vezes maior quando comparados aos dos animais dos outros grupos. Quando expressos como porcentagem (%) do peso corpóreo no dia do sacrifício, os resultados foram semelhantes, mantendo-se aproximadamente a mesma proporção entre os grupos (Fig. 4).

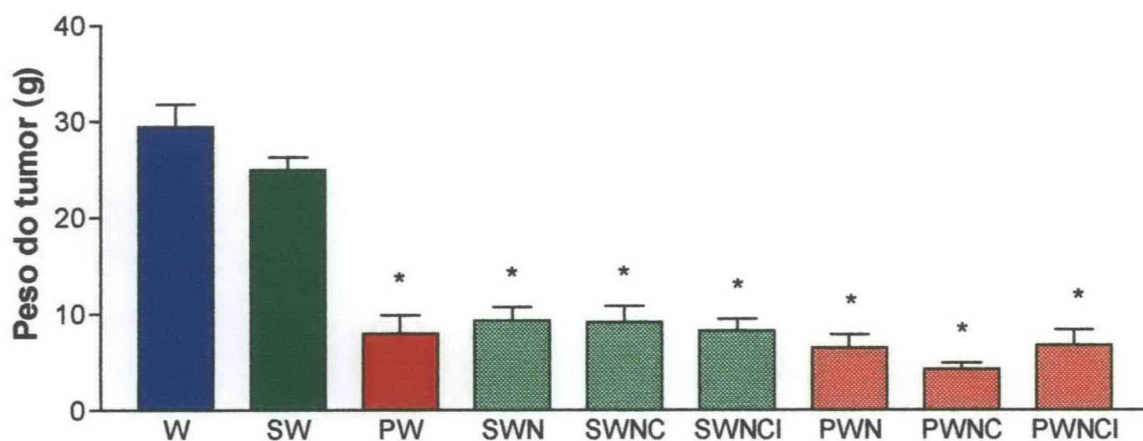


FIGURA 3: Peso fresco do tumor (g). *Diferença significativa quando comparados aos grupos W e SW ($p < 0,001$). Os dados estão apresentados como média \pm EPM. W(n=11); SW(n=15); PW(n=5); SWN(n=8); SWNC(n=5); SWNCI(n=8); PWN(n=9); PWNC(n=8); PWNCI(n=7).

W	SW	PW	SWN	SWNC	SWNCI	PWN	PWNC	PWNCI
29.49 \pm 2.284	24.94 \pm 1.384	8.009 \pm 1.892	9.345 \pm 1.369	9.173 \pm 1.661	8.286 \pm 1.205	6.507 \pm 1.361	4.256 \pm 0.702	6.761 \pm 1.635

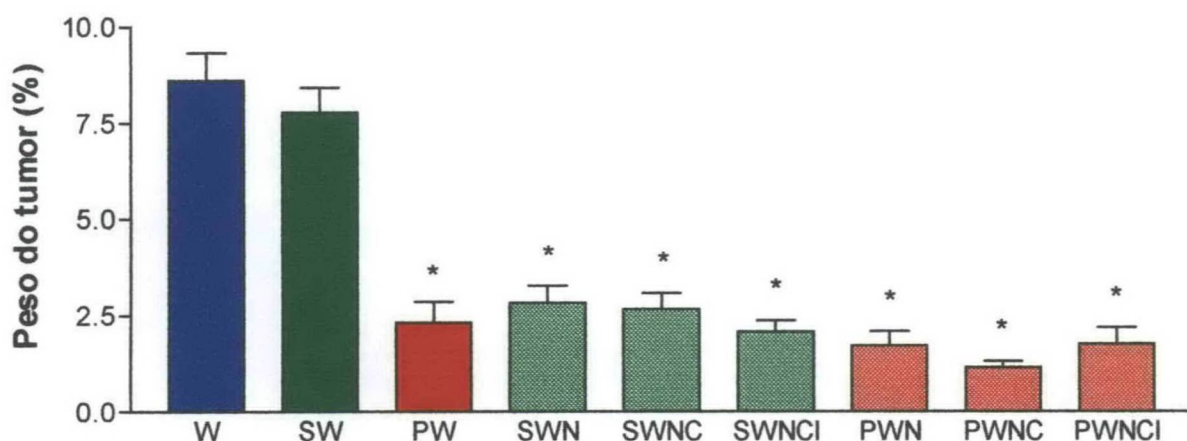


FIGURA 4: Peso fresco do tumor expresso como porcentagem (%) do peso corpóreo no dia do sacrifício. *Diferença significativa quando comparados aos grupos W e SW ($p < 0,001$). Os dados estão apresentados como média \pm EPM. W(n=11); SW(n=15); PW(n=5); SWN(n=8); SWNC(n=5); SWNCI(n=8); PWN(n=9); PWNC(n=8); PWNCI(n=7).

W	SW	PW	SWN	SWNC	SWNCI	PWN	PWNC	PWNCI
8.61	7.78	2.32	2.83	2.68	2.09	1.72	1.15	1.76
\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
2.28	0.64	0.53	0.45	0.41	0.28	0.38	0.17	0.42

A tabela 2 apresenta o conteúdo de glicogênio ($\mu\text{mol/g}$ de tecido) no fígado, músculo sóleo e porção branca do músculo gastrocnêmio nos 12 grupos de trabalho. O conteúdo de glicogênio hepático não foi alterado significativamente nos animais sem tumor pela suplementação com óleo de côco ou peixe. Nos animais com tumor (W), houve redução significativa deste conteúdo em 41%, em média, quando comparado ao dos grupos sem tumor. No grupo com tumor suplementado com óleo de côco (SW), a redução do conteúdo de glicogênio hepático também foi de 41% quando comparado ao dos grupos sem tumor ($p < 0,05$), mas não foi significativamente diferente quando comparado ao do grupo W. No grupo suplementado com óleo de peixe e portador de tumor (PW), a redução foi de 19% no conteúdo de glicogênio hepático quando comparado à dos grupos sem tumor, não sendo estatisticamente diferente, apesar da tendência. Nos grupos com tumor suplementados com óleo de côco ou peixe e tratados com naproxeno (SWN e PWN), o conteúdo de glicogênio foi significativamente maior (aproximadamente 2,3 vezes) quando comparado a W e SW e não foi estatisticamente diferente quando comparado ao dos animais sem tumor. Contudo, a associação da suplementação com óleo de côco ou peixe com naproxeno + clenbuterol (SWNC e PWNC) e naproxeno + clenbuterol + insulina (SWNCI e PWNCI), levou a um aumento significativo (69%, em média) no conteúdo de glicogênio hepático quando comparado ao dos animais sem tumor, e a um aumento ainda maior (178%, em média) quando comparado ao dos grupos W e SW.

O conteúdo de glicogênio no músculo sóleo dos animais suplementados com óleo de peixe (P) foi significativamente maior quando comparado ao dos grupos C e S, os quais, por sua vez, não foram diferentes entre si. Nos grupos W e SW houve redução de 23% e 35% quando comparado ao dos grupos C e S e ao do grupo P, respectivamente. Não houve diferença estatística no conteúdo de glicogênio entre W e SW. No grupo portador de tumor suplementado com óleo de peixe (PW), o conteúdo de glicogênio no músculo sóleo não apresentou diferença estatística quando comparado ao dos grupos sem tumor, mas foi significativamente maior (42%) quando comparado ao dos grupos

W e SW. Nos grupos tratados com naproxeno (SWN e PWN), o conteúdo de glicogênio foi significativamente maior quando comparado ao dos grupos C, S, W e SW, mas não apresentou diferença estatística quando comparado ao do grupo P e PW. Por sua vez, a adição de clenbuterol e de clenbuterol + insulina ao tratamento (grupos SWNC, SWNCI, PWNC e PWNCI), promoveu ganho significativo, 79% em média, quando comparado ao dos grupos não portadores de tumor e de 148% quando comparado ao dos grupos W e SW.

Na porção branca do músculo gastrocnêmio, o conteúdo de glicogênio nos animais sem tumor suplementados com óleo de côco (S) ou óleo de peixe (P) foi de 43,11 $\mu\text{mol/g}$ de tecido, em média, não apresentando diferença significativa quando comparados entre si ou com o do grupo controle. No grupo com tumor (W), este conteúdo foi de 30,40 $\mu\text{mol/g}$ de tecido, significativamente menor ($p < 0,05$) quando comparado ao dos grupos sem tumor. No grupo com tumor suplementado com óleo de côco (SW), o conteúdo de glicogênio no músculo gastrocnêmio também foi significativamente menor ($p < 0,05$) quando comparado ao dos grupos C, S e P, e não apresentou diferença quando comparado ao do grupo W. Os grupos tratados com naproxeno (SWN e PWN), naproxeno + clenbuterol (SWNC e PWNC) e naproxeno + clenbuterol + insulina (SWNCI e PWNCI), não apresentaram diferença significativa quanto ao conteúdo de glicogênio quando comparados entre si ou ao dos grupos sem tumor, mas apresentaram resultados significativamente maiores quando comparados ao dos grupos W e SW.

Tabela 2: Conteúdo de glicogênio no fígado, músculo sóleo e músculo gastrocnêmio ($\mu\text{mol/g}$ de tecido). Os dados estão apresentados como média \pm EPM (n). *Diferença significativa quando comparado com os demais grupos ($p < 0,05$). [§]Diferença significativa quando comparado aos grupos C e S ($p < 0,05$). #Diferença significativa quando comparado aos grupos C, S, P e PW ($p < 0,05$).

	C	S	P	W	SW	PW	SW N	SW NC	SW NCI	PW N	PW NC	PW NCI
Fígado	101.9 \pm 12.61 (14)	107.6 \pm 14.08 (12)	111.0 \pm 12.55 (12)	64.89* \pm 5.20 (12)	65.08* \pm 5.03 (20)	89.41 \pm 2.57 (15)	144.6 \pm 23.67 (7)	167.9# \pm 24.32 (7)	166.1# \pm 21.04 (7)	155.8 \pm 24.10 (7)	190.5# \pm 29.44 (7)	201.1# \pm 28.00 (7)
Músculo sóleo	27.39 \pm 1.13 (10)	29.19 \pm 1.29 (12)	34.17 [§] \pm 1.56 (11)	21.60* \pm 1.38 (10)	22.55* \pm 1.61 (14)	31.49 \pm 2.23 (18)	37.10 [§] \pm 1.55 (9)	53.17# \pm 5.24 (10)	51.81# \pm 6.06 (10)	42.26 [§] \pm 4.43 (10)	49.61# \pm 5.00 (8)	62.72# \pm 4.52 (8)
Músculo gastrocnêmio	41.41 \pm 4.20 (11)	42.22 \pm 3.96 (13)	44.01 \pm 3.74 (10)	30.40* \pm 2.13 (10)	31.51* \pm 1.86 (13)	40.17 \pm 2.39 (17)	39.29 \pm 2.92 (10)	42.25 \pm 2.89 (10)	44.38 \pm 5.49 (9)	41.45 \pm 3.64 (11)	43.00 \pm 3.46 (12)	47.94 \pm 3.58 (10)

Na tabela 3 está apresentado o conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) do tecido tumoral, o qual não apresentou variações significativas entre os grupos estudados. Nos grupos SW e PW, o conteúdo de TBARS foi, respectivamente, de 7,86 e 7,25 $\mu\text{mol/mg}$ de proteína, sem diferença estatística entre si ou quando comparado ao conteúdo de TBARS do grupo W (9,27 $\mu\text{mol/mg}$ de proteína). O tratamento com naproxeno (grupos SWN e PWN), naproxeno + clenbuterol (grupos SWNC e PWNC) e naproxeno + clenbuterol + insulina (grupos SWNCI e PWNCI), não provocou mudanças significativas no conteúdo de TBARS (8,67 $\mu\text{mol/mg}$ de proteína, em média), quando comparado ao dos grupos W, SW e PW.

Grupos	Conteúdo de TBARS ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteína)
W	9.27 ± 1.20
SW	7.86 ± 0.63
SWN	10.24 ± 0.79
SWNC	7.2 ± 2.99
SWNCI	8.34 ± 2.89
PW	7.25 ± 0.91
PWN	9.83 ± 1.47
PWNC	8.38 ± 0.40
PWNCI	8.07 ± 1.00

TABELA 3: Conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no tecido tumoral ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteína). Os dados estão apresentados como média \pm EPM. W(n=11); SW(n=15); PW(n=5); SWN(n=8), SWNC(n=5); SWNCI(n=8) PWN(n=9); PWNC(n=8); PWNCI(n=7).

Na figura 5 está apresentado o peso do coração, expresso em porcentagem do peso corpóreo, no dia do sacrifício. Nos animais suplementados com óleo de peixe (grupo P) ou óleo de côco (grupo C), o peso do coração correspondeu, respectivamente, a 0,35% e 0,36% do peso corpóreo, semelhantes entre si e ao grupo controle (0,38%). Nos grupos portadores de tumor, os resultados não foram estatisticamente diferentes (0,37%, em média) quando comparados entre si e com os dos grupos sem tumor. A adição de clenbuterol ao tratamento (grupos SWNC, SWNCI, PWNC e PWNCI) não promoveu alteração significativa do peso do coração quando comparado aos demais grupos.

Na figura 6, o peso do baço está apresentado como porcentagem do peso corpóreo no dia do sacrifício. Nos animais sem tumor (grupos C, S e P), o peso do baço foi, em média 0,18% do peso corpóreo, resultado que correspondeu a aproximadamente metade dos valores encontrados para os animais dos grupos portadores de tumor ($p < 0,05$). Nos grupos tratados com naproxeno (SWN e PWN), naproxeno + clenbuterol (SWNC e PWNC) e naproxeno + clenbuterol + insulina (SWNCI e PWNCI), o peso do baço correspondeu, em média, a 0,39%, não havendo diferença estatística quando comparado ao dos grupos W, SW ou PW (média de 0,43%), mas significativamente maior quando comparado ao dos grupos C, S e P.

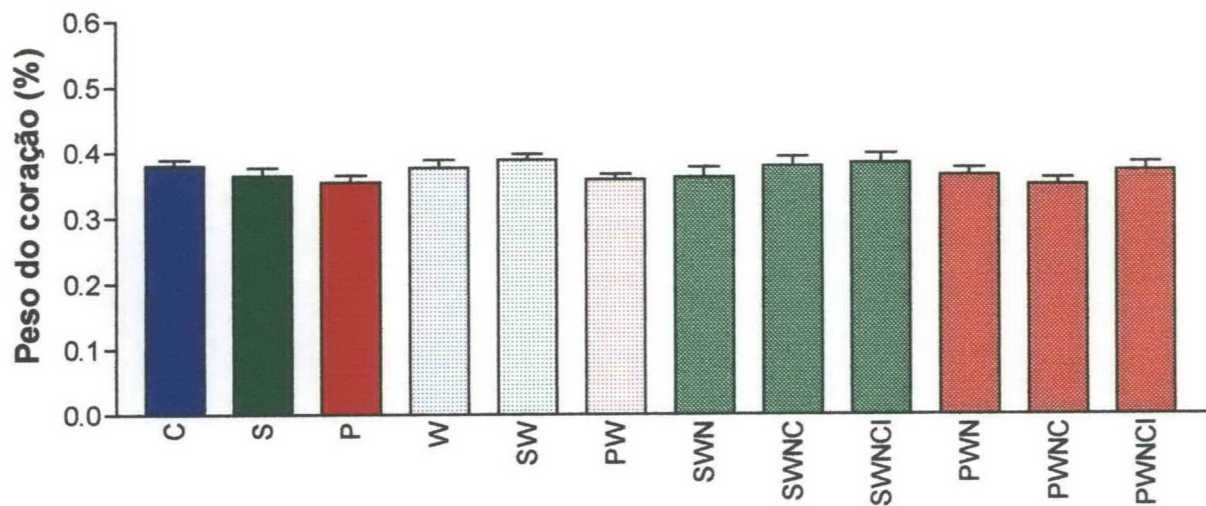


FIGURA 5: Peso do coração expresso como porcentagem do peso corpóreo no dia do sacrifício. Os dados estão apresentados como média \pm EPM. C(n=14); S(n=17); P(n=20); W(n=13); SW(n=25); PW(n=20); SWN(n=12); SWNC(n=15); SWNCI(n=14); PWN(n=15); PWNC(n=14); PWNCI(n=14).

C	S	P	W	SW	PW	SWN	SWNC	SWNCI	PWN	PWNC	PWNCI
0.38	0.36	0.35	0.38	0.39	0.36	0.36	0.38	0.38	0.36	0.35	0.37
\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
0.008	0.012	0.011	0.012	0.009	0.008	0.015	0.014	0.014	0.011	0.010	0.012

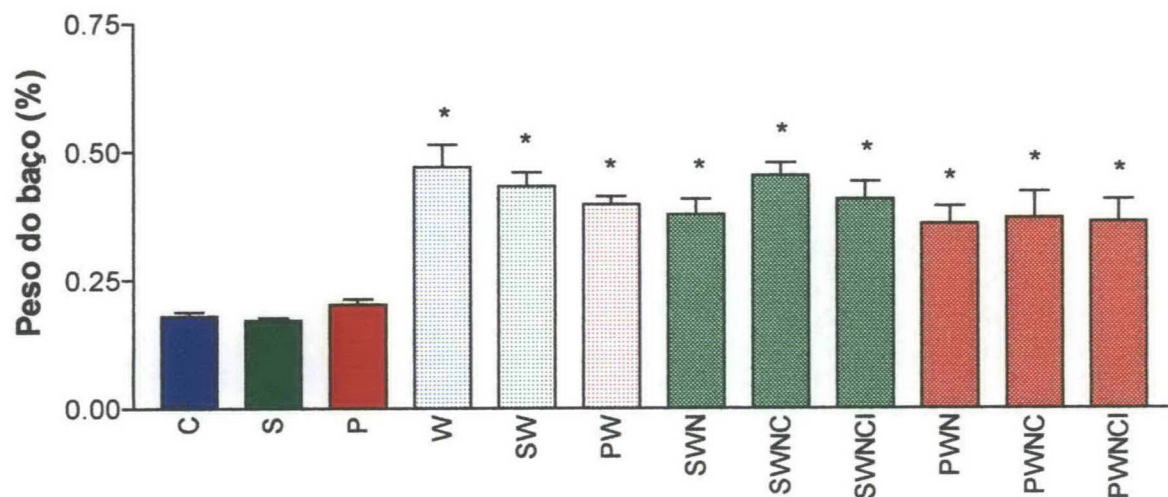


FIGURA 6: Peso do baço expresso como porcentagem do peso corpóreo no dia do sacrifício. *Diferença significativa quando comparado aos animais sem tumor ($p < 0,05$). Os dados estão apresentados como média \pm EPM. C(n=15); S(n=17); P(n=20); W(n=9); SW(n=20); PW(n=11); SWN(n=9), SWNC(n=12); SWNCI(n=10) PWN(n=15); PWNC(n=11); PWNCI(n=11).

C	S	P	W	SW	PW	SWN	SWNC	SWNCI	PWN	PWNC	PWNCI
0.18	0.17	0.20	0.47	0.43	0.40	0.38	0.45	0.41	0.36	0.37	0.36
\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
0.009	0.006	0.011	0.044	0.027	0.015	0.030	0.024	0.035	0.034	0.051	0.044

A figura 7 apresenta as concentrações séricas de colesterol (mg/dL) dos grupos estudados. Nos grupos suplementados com óleo de côco ou óleo de peixe (S e P), a concentração foi, respectivamente, de 75,19 mg/dL e 73,73 mg/dL, não diferentes quando comparados entre si ou com a do grupo controle (73,51 mg/dL). Nos animais portadores de tumor suplementados com óleo de côco (grupos SW, SWN, SWNC e SWNCI), a concentração sérica de colesterol foi, em média, de 65,11 mg/dL, enquanto nos animais suplementados com óleo de peixe (grupos PW, PWN, PWNC e PWNCI) foi de 63,09 mg/dL. No grupo sem suplementação (W), a concentração foi de 73,60 mg/dL. Nenhum destes grupos apresentou diferença estatística entre si ou quando comparados aos grupos C, S e P, quanto à concentração de colesterol plasmática.

As concentrações séricas de lipídios totais não apresentaram variações significativas entre os grupos estudados (Fig. 8). Nos grupos suplementados com óleo de côco ou óleo de peixe (S e P), as concentrações de lipídios totais foram, respectivamente, de 367,4 mg/dL e 321,6 mg/dL. Nos grupos SW e PW, 314 mg/dL e 342,7 mg/dL, respectivamente. O tratamento com naproxeno (grupos SWN e PWN), naproxeno + clenbuterol (grupos SWNC e PWNC) e naproxeno + clenbuterol + insulina (grupos SWNCI e PWNCI), não provocou mudanças significativas nas concentrações séricas de lipídios totais (285,4 mg/dL, em média), quando comparados à dos grupos controle (315,7 mg/dL) e controle com tumor (318,3 mg/dL).

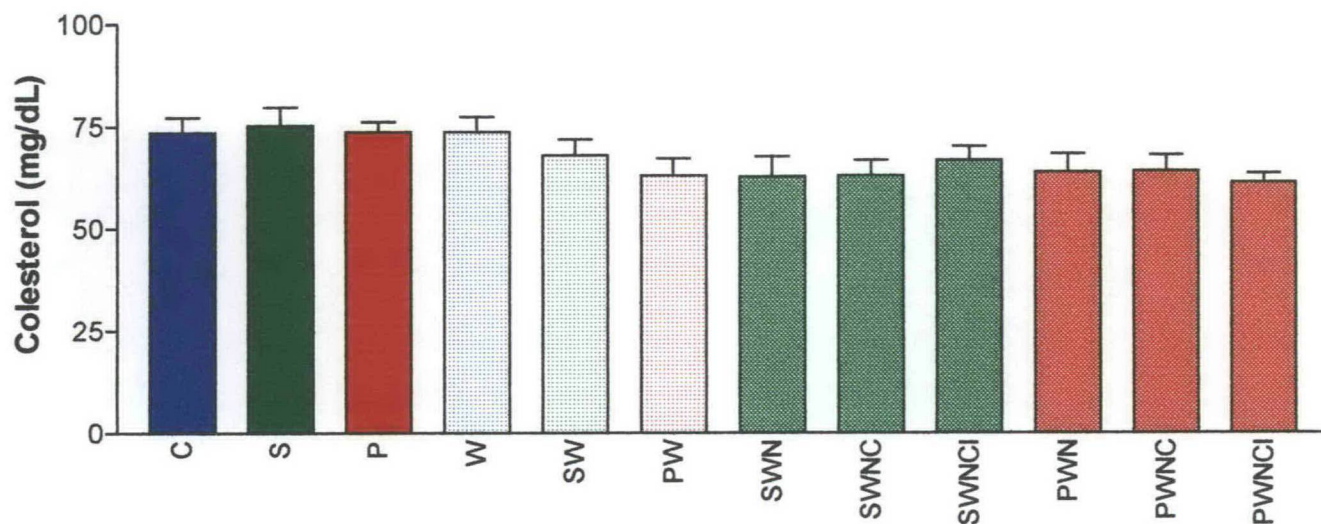


FIGURA 7: Concentração sérica de colesterol nos grupos estudados. Os dados estão apresentados como média \pm EPM. C(n=17); S(n=10); P(n=15); W(n=11); SW(n=18); PW(n=11); SWN(n=14), SWNC(n=11); SWNCI(n=13) PWN(n=14); PWNC(n=11); PWNCI(n=10).

C	S	P	W	SW	PW	SWN	SWNC	SWNCI	PWN	PWNC	PWNCI
73.5	75.9	73.7	73.6	68.0	62.9	62.7	63.0	66.8	63.9	64.2	61.3
\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
3.6	4.5	2.5	3.7	3.9	4.3	4.9	3.7	3.3	4.4	3.9	2.3

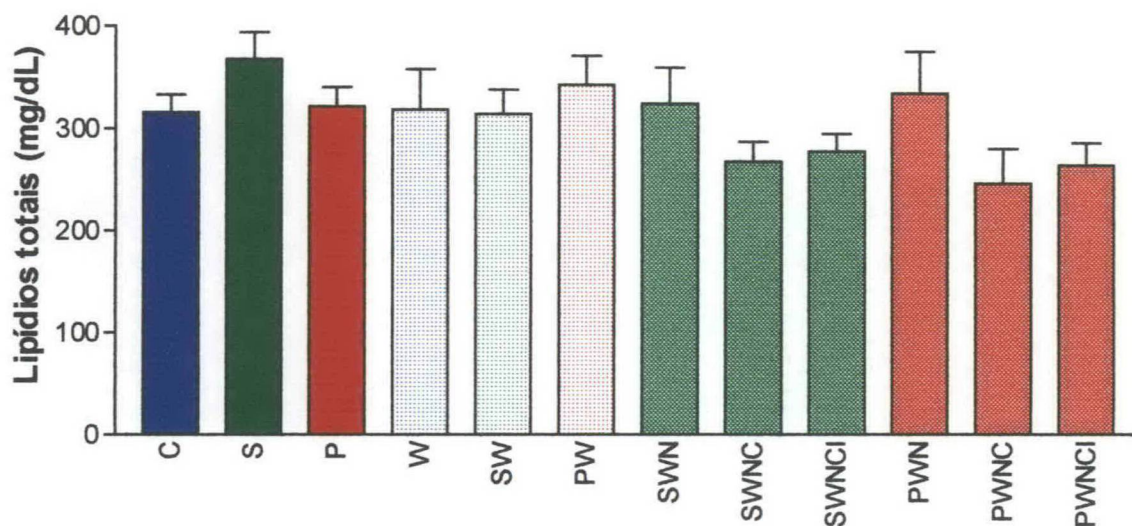


FIGURA 8: Concentração sérica de lipídios totais nos grupos estudados. Os dados estão apresentados como média \pm EPM. C(n=19); S(n=10); P(n=16); W(n=10); SW(n=14); PW(n=14); SWN(n=11), SWNC(n=10); SWNCI(n=10) PWN(n=10); PWNC(n=11); PWNCI(n=10).

C	S	P	W	SW	PW	SWN	SWNC	SWNCI	PWN	PWNC	PWNCI
315.7	367.4	321.6	318.3	314.0	342.7	324.0	267.6	277.4	334.0	246.0	263.7
\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
17.2	26.3	18.7	39.1	23.8	28.0	35.1	19.4	17.3	40.8	34.2	22.1

As concentrações séricas de triacilgliceróis (TAG) estão apresentadas na figura 9. Nos animais dos grupos W e SW as concentrações foram, respectivamente, de 167,4 mg/dL e 162,2 mg/dL, sem diferença significativa entre si, mas estatisticamente diferentes quando comparadas a todos os outros grupos. No grupo PW, o valor foi de 97,47 mg/dL, semelhante à dos grupos sem tumor, mas significativamente menor (aproximadamente 40,8%) quando comparado à dos grupos W e SW. Os grupos SWN, SWNC, SWNCI, PWN, PWNC e PWNCI apresentaram valores semelhantes entre si (91,1 mg/dL, em média) e não foram diferentes ($p > 0,05$) quando comparados aos dos grupos C, S, P e PW (108,9 mg/dL em média).

A figura 10 apresenta as concentrações séricas de colesterol-HDL (mg/dL). Nos grupos C, S e P, as concentrações foram, respectivamente, 35,69, 37,66 e 34,66, sem diferença estatística quando comparadas entre si e significativamente maiores (aproximadamente 2,5 vezes) quando comparadas à dos grupos W (14,76) e SW (14,93). O grupo PW apresentou concentração de colesterol-HDL de 29,14, estatisticamente diferente quando comparada à dos grupos W e SW, mas não diferente da dos grupos sem tumor. Os grupos que receberam tratamento com naproxeno (SWN e PWN), naproxeno + clenbuterol (SWNC e PWNC) e naproxeno + clenbuterol + insulina (SWNCI e PWNCI) apresentaram valores de 30,35 mg/dL em média, semelhantes aos dos grupos sem tumor (C, S, P e PW); entretanto, foi aproximadamente 2 vezes maior quando comparado ao dos grupos W e SW.

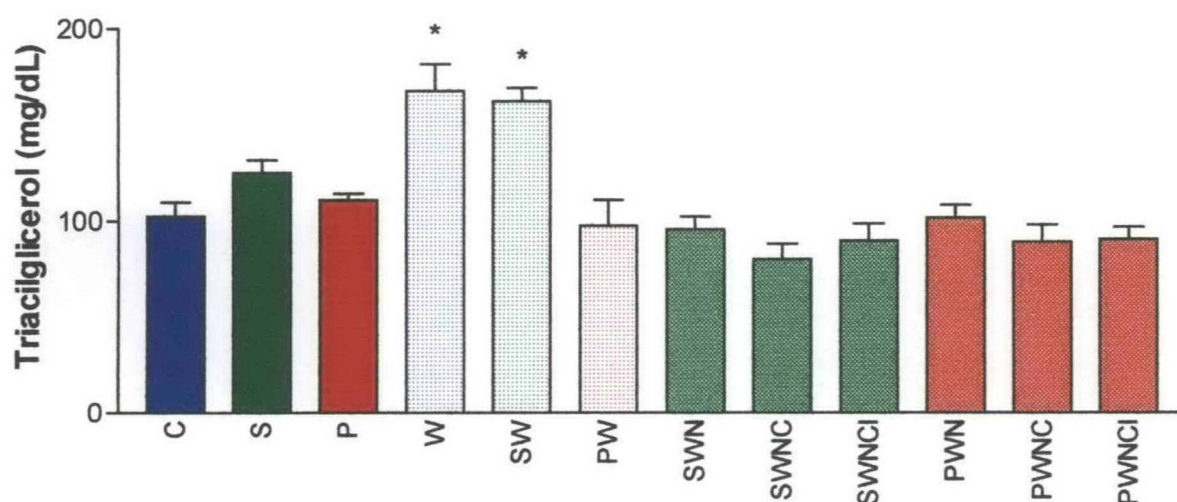


FIGURA 9: Concentração sérica de triacilgliceróis nos grupos estudados. Os dados estão apresentados como média \pm EPM. *Diferença significativa quando comparado à dos demais grupos ($p < 0,05$). C(n=15); S(n=12); P(n=11); W(n=13); SW(n=17); PW(n=13); SWN(n=12), SWNC(n=11); SWNCI(n=12) PWN(n=9); PWNC(n=11); PWNCI(n=14).

C	S	P	W	SW	PW	SWN	SWNC	SWNCI	PWN	PWNC	PWNCI
102.5	125.1	110.8	167.4	162.2	97.5	95.3	80.0	89.7	101.7	89.2	90.3
\pm 7.0	\pm 6.6	\pm 3.4	\pm 14.0	\pm 6.9	\pm 13.4	\pm 6.7	\pm 7.8	\pm 8.8	\pm 6.4	\pm 8.7	\pm 6.5

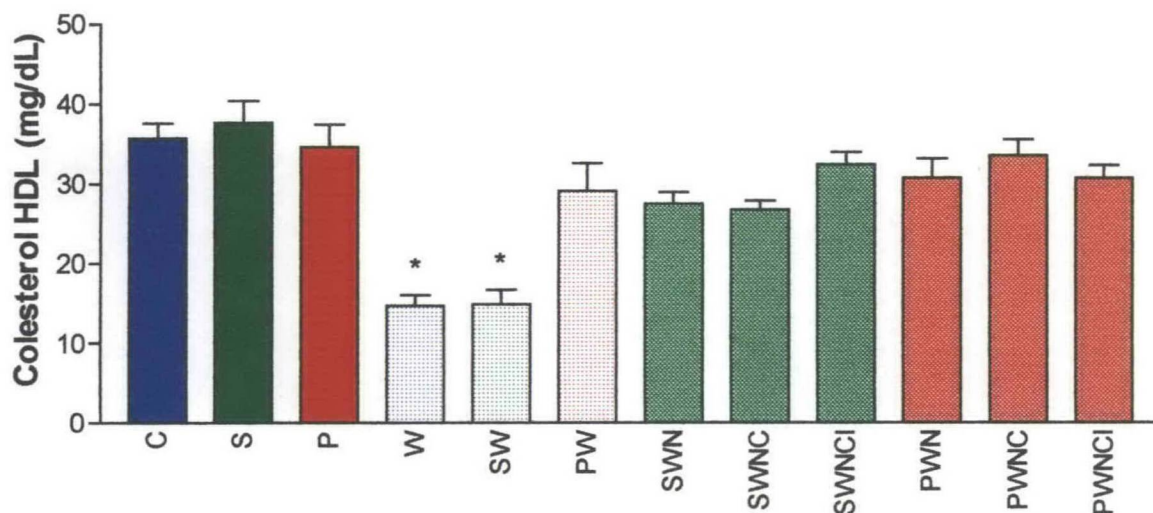


FIGURA 10: Concentração sérica de colesterol HDL nos grupos estudados. Os dados estão apresentados como média \pm EPM. *Diferença significativa quando comparado à dos demais grupos ($p < 0,05$). C(n=16); S(n=9); P(n=10); W(n=12); SW(n=12); PW(n=12); SWN(n=12), SWNC(n=11); SWNCI(n=14) PWN(n=14); PWNC(n=14); PWNCI(n=14).

C	S	P	W	SW	PW	SWN	SWNC	SWNCI	PWN	PWNC	PWNCI
35.7	37.6	34.6	14.8	14.9	29.1	27.5	26.8	32.5	30.8	33.6	30.8
\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
1.9	2.7	2.8	1.3	1.8	3.5	1.5	1.1	1.5	2.4	2.0	1.7

Na figura 11, estão apresentadas as concentrações séricas de lactato ($\mu\text{mol/mL}$). Os grupos que receberam tratamento com naproxeno (SWN e PWN), naproxeno + clenbuterol (SWNC e PWNC) e naproxeno + clenbuterol + insulina (SWNCI e PWNCI), tiveram resultados similares, não havendo diferença estatística (média de 2,09 $\mu\text{mol/mL}$) quando comparados entre si ou ao dos grupos C, S, P e PW (2,15 $\mu\text{mol/mL}$, em média). Nos grupos W e SW, as concentrações séricas de lactato foram, respectivamente, de 2,74 $\mu\text{mol/mL}$ e 2,82 $\mu\text{mol/mL}$, estatisticamente diferentes quando comparadas às de todos os outros grupos ($p < 0,05$).

A figura 12 apresenta as concentrações séricas de glicose (mg/dL). Nos animais do grupo W, a glicemia foi de 109,4 mg/dL, semelhante ao grupo SW, que foi de 114,2 mg/dL. Estes dois grupos apresentaram valores significativamente menores quando comparados aos de todos os outros grupos (140,5 mg/dL, em média).

Na figura 13 estão apresentadas as concentrações séricas de insulina ($\mu\text{U/mL}$). Nos grupos W e SW, as concentrações (25,79 e 25,96 $\mu\text{U/mL}$, respectivamente) foram significativamente menores quando comparadas à dos grupos C, S e P (75,33 $\mu\text{U/mL}$ em média). Os grupos PW, SWN, SWNC, PWN e PWNC apresentaram valores sem diferença estatística entre si (59,34 $\mu\text{U/mL}$ em média) ou aos grupos C, S e P, mas foram significativamente maiores quando comparados aos dos grupos W e SW. A adição de insulina ao tratamento (grupos SWNCI e PWNCI) não promoveu alterações significativas na concentração sérica deste hormônio (média de 60,54 $\mu\text{U/mL}$) quando comparada à dos grupos tratados com naproxeno ou naproxeno + clenbuterol, ou quando comparada à dos grupos não portadores de tumor.

A figura 14 mostra fotos do tecido tumoral, em microscopia óptica, dos animais tratados com naproxeno e suplementados com óleo de côco (a) ou com óleo de peixe (b). Não foram observadas diferenças morfológicas importantes entre estes dois grupos.

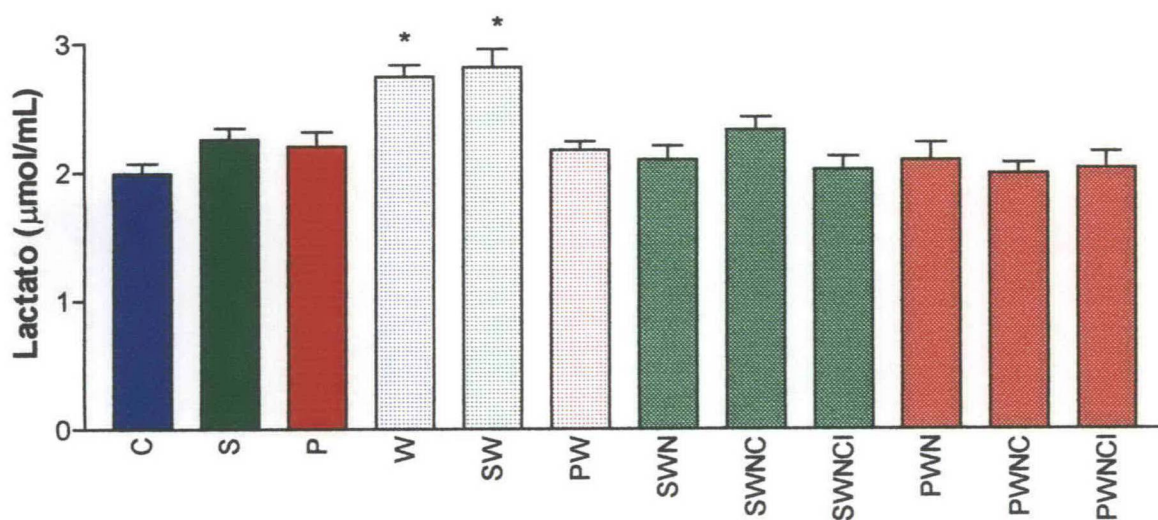


FIGURA 11: Concentração sérica de lactato nos grupos estudados. Os dados estão apresentados como média \pm EPM. *Diferença significativa quando comparado à dos demais grupos ($p < 0,05$). C(n=12); S(n=13); P(n=10); W(n=14); SW(n=21); PW(n=22); SWN(n=12), SWNC(n=12); SWNCI(n=13) PWN(n=12); PWNC(n=14); PWNCI(n=13).

C	S	P	W	SW	PW	SWN	SWNC	SWNCI	PWN	PWNC	PWNCI
1.99	2.26	2.20	2.74	2.82	2.17	2.10	2.33	2.02	2.10	2.00	2.04
\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
0.08	0.08	0.11	0.09	0.14	0.07	0.11	0.10	0.11	0.14	0.09	0.13

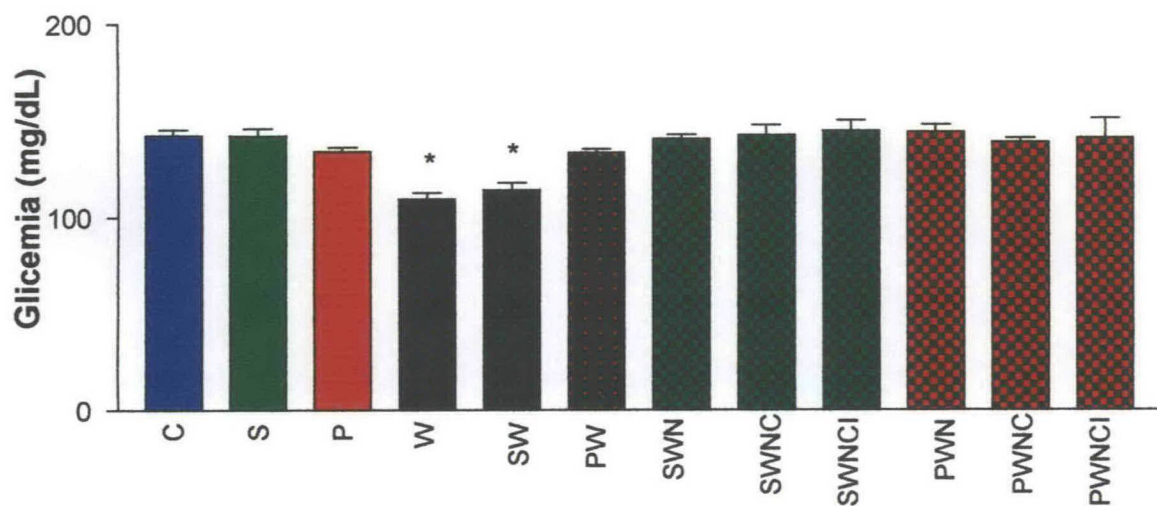


FIGURA 12: Concentração sérica de glicose nos grupos estudados. Os dados estão apresentados como média \pm EPM. *Diferença significativa quando comparado à dos demais grupos ($p < 0,05$). C(n=16); S(n=15); P(n=9); W(n=9); SW(n=13); PW(n=19); SWN(n=14), SWNC(n=12); SWNCI(n=11) PWN(n=11); PWNC(n=13); PWNCI(n=14).

C	S	P	W	SW	PW	SWN	SWNC	SWNCI	PWN	PWNC	PWNCI
142.4	142.3	134.1	109.4	114.2	133.6	140.8	142.8	144.9	144.3	139.1	141.2
\pm 3.0	\pm 3.5	\pm 2.3	\pm 3.3	\pm 3.8	\pm 2.0	\pm 2.2	\pm 5.3	\pm 5.5	\pm 3.9	\pm 2.1	\pm 10.3

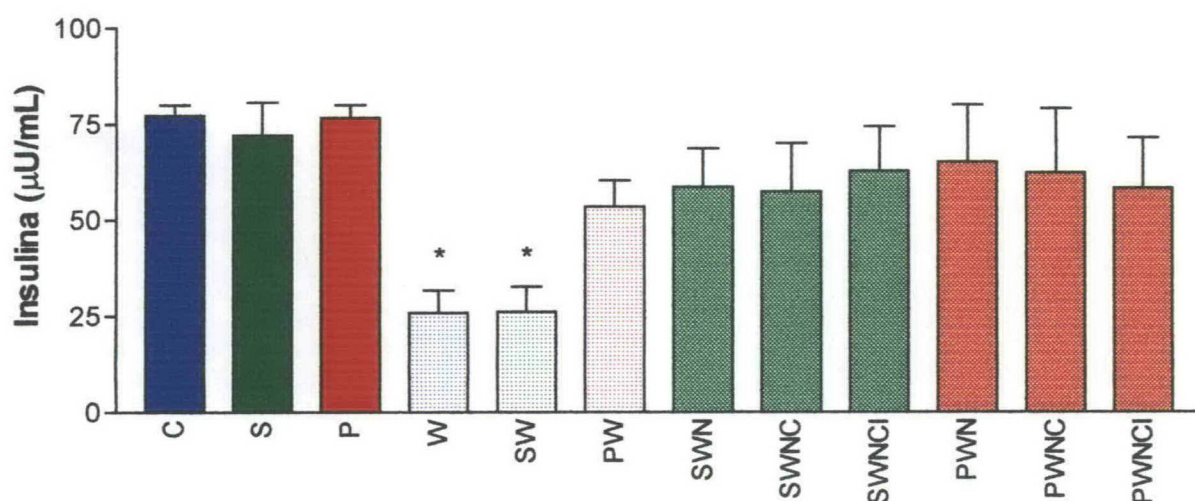
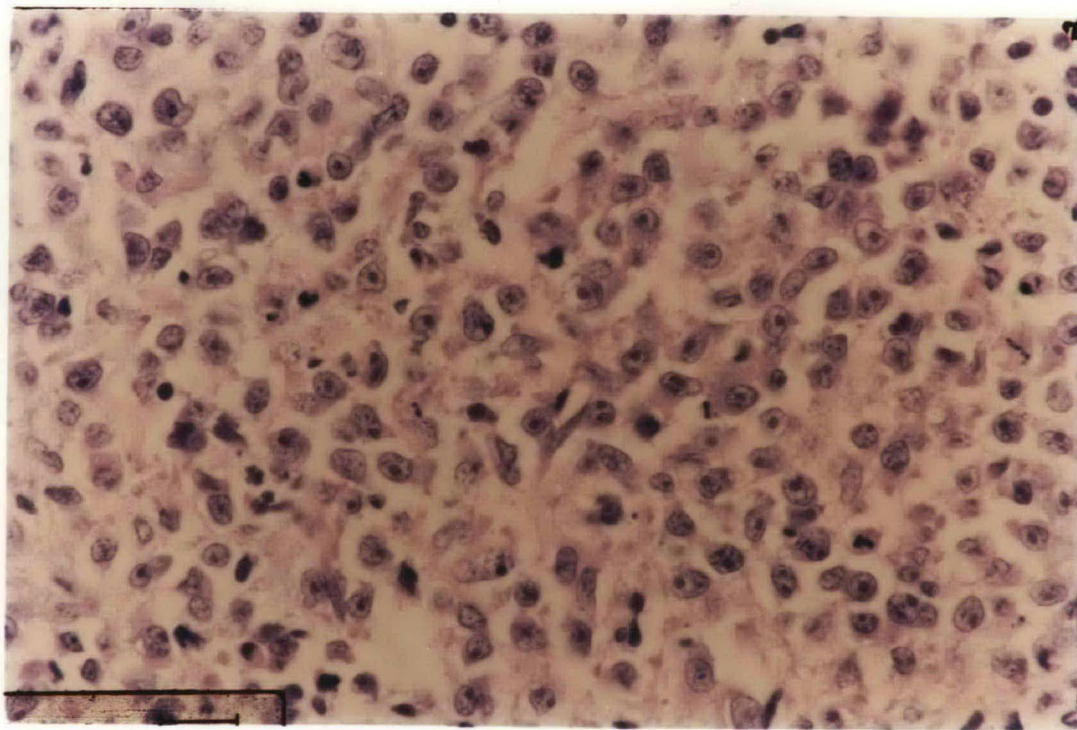


FIGURA 13: Concentração sérica de insulina nos grupos estudados. Os dados estão apresentados como média \pm EPM. *Diferença significativa quando comparado à dos demais grupos ($p < 0,05$). C(n=4); S(n=3); P(n=5); W(n=7); SW(n=7); PW(n=8); SWN(n=7), SWNC(n=2); SWNCI(n=5) PWN(n=3); PWNC(n=2); PWNCI(n=4).

C	S	P	W	SW	PW	SWN	SWNC	SWNCI	PWN	PWNC	PWNCI
77.2	72.1	76.7	25.8	26.0	53.4	58.6	57.3	62.8	65.1	62.3	58.3
\pm 2.8	\pm 8.6	\pm 3.2	\pm 5.9	\pm 6.6	\pm 6.7	\pm 9.9	\pm 12.7	\pm 11.6	\pm 15.0	\pm 16.8	\pm 13.1

a



b

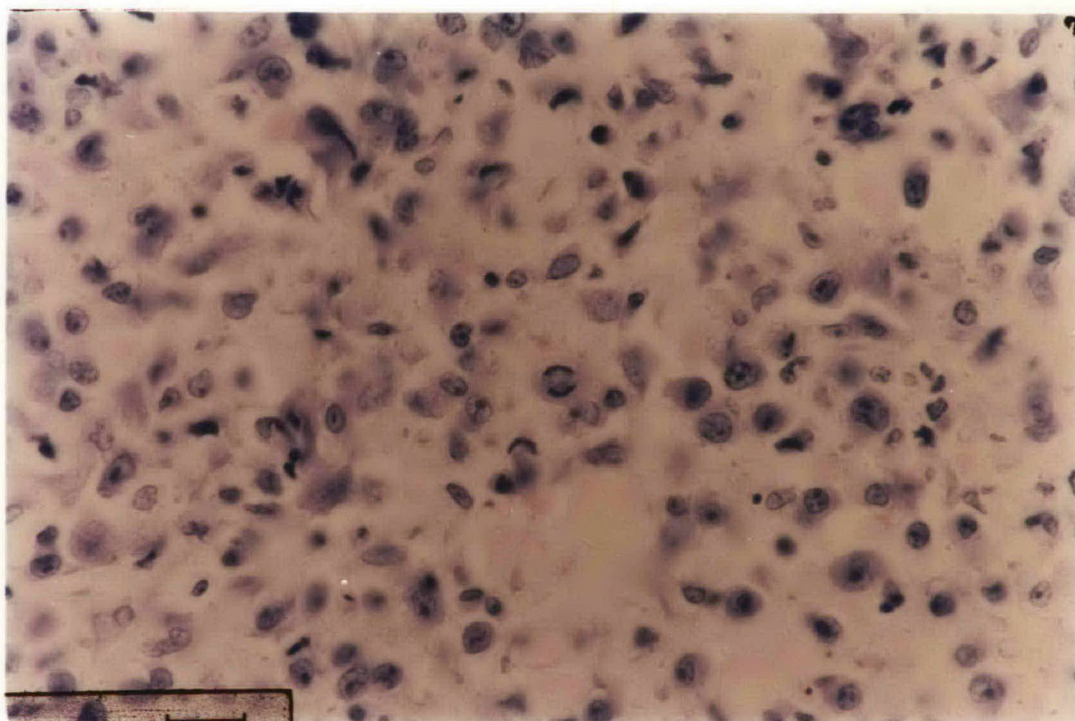


FIGURA 14: Fotografia de lâminas do tumor de Walker 256 de ratos tratados com naproxeno e suplementados com óleo de côco (a) ou óleo de peixe (b). Coloração H.E. Barra = 16 μ m.

DISCUSSÃO

Ácidos graxos poliinsaturados ω -3 (PUFAs ω -3) são essenciais para o crescimento e desenvolvimento normal (POMPÉIA, 2002). Evidências experimentais e epidemiológicas sugerem que eles desempenham papel importante na prevenção e tratamento do câncer e outras doenças inflamatórias e autoimunes (KARMALI, 1996; SIMOPOULOS, 1999; ROSE & CONNOLY, 1999). Estudos epidemiológicos, particularmente em populações migrantes, indicam uma relação entre o consumo de gordura e câncer. Tais estudos levam a crer que, quando pessoas migram para regiões onde o consumo de gordura saturada é mais alto, eles passam a ter uma suscetibilidade aumentada para certos tipos de câncer (GRUNDY, 1999). Assim, a ocidentalização dos hábitos alimentares de esquimós e japoneses, que passaram a ingerir menos peixe e mais gordura saturada e PUFAs ω -6, levou a um aumento na incidência de câncer de mama, cólon e próstata (BANG et al, 1976; NIELSEN & HANSEN, 1980), enquanto dietas ricas em ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) ômega-3 têm sido relacionadas à incidências mais baixas destes mesmos tipos de câncer (LIMA et al, 2002; KAIZER et al, 1989; KROMHOUT, 1990). Estudos experimentais reforçam os indícios dos efeitos protetores dos PUFAs ω -3 sobre o desenvolvimento e progressão de tais tumores (MENGEAUD et al, 1992; NOGUCHI et al, 1995; PANDALAI et al, 1996; SCHONBERG & SKORPEN, 1997; FINSTAD et al, 2000). A mudança na razão entre PUFAs ω -6 e ω -3 nos últimos cem anos, que passou de aproximadamente 1-4:1 para 20:1, foi mostrada por SIMOPOULOS (1999), Ter sido causada pelo aumento no consumo de óleos vegetais, ricos em PUFAs ω -6, e pelo decréscimo no consumo de peixes, ricos em PUFAs ω -3. CALDER & MILES (2000) relataram que, entre 1960 e 1990, o consumo do ácido linoléico, precursor da família ω -6, aumentou de 8% para 16% no Reino Unido, coincidindo com o período no qual a incidência de alergias na infância teve expressivo aumento.

A caquexia, principal obstáculo no tratamento do câncer é caracterizada por alterações metabólicas, hormonais e imunológicas. Nos ratos portadores do tumor de Walker 256, ela está relacionada diretamente ao tamanho do tumor, entretanto há

tumores com tamanho muito pequeno em relação à massa corpórea que induzem caquexia (YOUNES & NOGUCHI, 2000). Na figura 4, encontramos que, nos grupos W e SW, o tumor representou aproximadamente 8% da massa corpórea e a caquexia pode ser confirmada ao analisarmos hipoglicemia (figura 12), hiperlaticidemia (figura 11), hipertriacilgliceridemia (figura 9), baixa concentração sérica de colesterol-HDL (figura 10) e perda de massa corpórea de 5,7% e 8,3%, respectivamente (tabela 1). O glicogênio hepático, importante fonte de reserva para a manutenção da glicemia, foi significativamente menor nestes animais quando comparado aos animais não portadores de tumor (tabela 2). Assim, a suplementação com óleo de côco não exerceu nenhuma ação contrária aos efeitos do crescimento tumoral. Por outro lado, no grupo suplementado cronicamente com óleo de peixe, houve redução significativa da massa tumoral, que representou apenas 2,3% da massa corpórea (figura 4). Como consequência, a glicemia, laticidemia e concentrações séricas de triacilgliceróis e colesterol-HDL, ficaram próximos aos valores dos animais sem tumor (figuras 12, 11, 9 e 10, respectivamente), e o glicogênio hepático apresentou valores próximos aos do grupo controle (12% abaixo) e, em relação aos grupos W e SW, houve recuperação de aproximadamente 66%. Hormonalmente, temos que a insulina, principal hormônio anabólico do metabolismo intermediário, nos grupos W e SW teve sua concentração plasmática significativamente reduzida (figura 13). Este achado foi demonstrado previamente por FERNANDES et al (1990), onde os autores defenderam que a hipoinsulinemia seria um dos muitos agentes contribuidores para o estabelecimento da caquexia. No grupo PW, a insulinemia teve sua concentração similar à dos grupos sem tumor, o que novamente sugere menor grau de caquexia nestes animais. Portanto, reafirmamos aqui os achados epidemiológicos e experimentais do efeito quimioprotetor dos PUFAs ω -3 sobre o crescimento tumoral. O mecanismo pelo qual estes ácidos graxos agem não foi objeto de investigação deste estudo. Há correntes de pesquisadores que defendem uma ação direta dos PUFAs ω -3 sobre as células tumorais e outros acreditam que eles melhoram a resposta imunológica. Ambas hipóteses devem ser testadas.

Os efeitos benéficos dos PUFAs ω -3 têm sido relacionados com suas propriedades antiinflamatórias, antitrombóticas e hipolipidêmicas, entre outras (SIMOPOULOS, 1999). Postula-se que tais efeitos sejam resultado da competição pelas mesmas enzimas que regulam o metabolismo do ácido araquidônico e a síntese de eicosanóides (TAPIERO et al, 2002; PETRIK et al, 2002). DIGGLE et al (2000) sugeriu que os PUFAs apresentam efeitos antiproliferativos sobre células de divisão rápida, não apenas as neoplásicas. De fato, consumo de óleo de peixe levou à redução de mitoses nas células da cripta, a unidade de proliferação do epitélio da mucosa intestinal (PELL et al, 1994; JOHNSON, 2002). Estudos utilizando suplementação nutricional com tipos diferentes de ácidos graxos em várias dosagens têm sido realizados a fim de estabelecer seus efeitos, mecanismos de ação, quantidades seguras para serem incluídas nos hábitos alimentares, e quantidades terapêuticas contra doenças inflamatórias e/ou crônicas, como o câncer (PETRIK et al, 2000; BABA et al, 2000; BASU et al, 2000; STARK et al, 2000; JENSEN et al, 2000; POULOS et al, 2001; ROBINSON et al, 2001).

Em nosso trabalho, a suplementação oral com PUFA ω -3 foi realizada desde o desmame até a fase adulta – período de 70 dias – em animais cujas mães também haviam sido submetidas à mesma suplementação. Não ocorreram diferenças significativas na variação do peso corpóreo entre os grupos suplementados com óleo de côco ou óleo de peixe (grupos S e P, respectivamente) quando comparados ao grupo sem suplementação (grupo C), seja na geração F1 ou durante a fase gestacional de suas mães, conforme demonstrado nas figuras 1 e 2. Sendo assim, pode-se afirmar que a suplementação nutricional com óleo de peixe nas doses utilizadas neste estudo (1g/Kg de peso) não promoveu ganho ou perda de peso corpóreo nos animais, o que seria indesejado.

Entre os animais portadores de tumor, os grupos sem suplementação (W) e suplementado com óleo de côco (SW) apresentaram resultados semelhantes entre si, com variação negativa do peso da carcaça (peso no dia do sacrifício após a retirada do tumor) em relação ao peso no dia da inoculação do tumor, -5,7% e -8,3%, respectivamente, indicando presença da síndrome da caquexia. Todos os outros grupos

portadores de tumor (PW, SWN, SWNC, SWNCI, PWN, PWNC e PWNCI) apresentaram variação do peso da carcaça não diferente dos grupos sem tumor, C, S e P (tabela 1). Além disso, os animais com tumor suplementados com óleo de peixe (grupo PW), não apresentaram diferenças significativas das concentrações séricas de colesterol, lipídios totais, triacilgliceróis, lactato, glicose, colesterol-HDL e insulina quando comparados aos animais dos grupos não portadores de tumor, ao contrário dos animais dos grupos W e SW, que apresentaram hipoinsulinemia, hipoglicemia, hiperlactacidemia, hipertriacilgliceridemia e níveis mais baixos de colesterol-HDL quando comparados aos grupos C, S e P. Isto indica que a suplementação com óleo de peixe neutralizou as mudanças nas concentrações séricas provocadas pelo tumor, sem promover malefícios no grupo sem tumor (P), o qual, quando analisados os mesmos parâmetros, apresentou resultados semelhantes aos grupos C e S (figuras 7 a 13). Estas alterações no metabolismo dos lipídios são também observadas em pacientes humanos com câncer e consideradas importantes fatores que, entre outros, podem levar à uma menor sobrevida (BARTLETT et al, 1994; BARTLETT et al, 1995; COSTELLI et al, 1999). Altos níveis de TAG têm sido observados em pacientes e animais experimentais durante o desenvolvimento de uma ampla variedade de tumores, associado à perda de massa adiposa corpórea e atividade alterada da enzima LPL, que regula a retirada de TAG do sangue para os tecidos (KERN & NORTON, 1988; CARBÓ et al, 1994; COSTELLI et al, 1999). A taxa de peroxidação lipídica do tecido tumoral não apresentou variação entre os grupos estudados (tabela 3), sugerindo que o aumento na peroxidação lipídica não é o mecanismo de ação dos PUFAs ω -3 contra células do tumor de Walker 256.

Entretanto, os efeitos anticâncer do óleo de peixe parecem mais claros quando os pesos tumorais são analisados. Tanto os valores absolutos em gramas quanto os valores expressos como porcentagem do peso corpóreo no dia do sacrifício, são aproximadamente 3,5 vezes mais baixos no grupo PW quando comparados aos grupos W e SW (figuras 3 e 4). Resultados semelhantes foram obtidos por YAM et al (2001), onde 4% de óleo de peixe na dieta, 7 dias antes da inoculação do carcinoma pulmonar de Lewis, fez com que os tumores primários fossem aproximadamente 2,5

vezes menores quando comparados a ratos com óleo de soja na dieta. PETRIK et al (2000), em estudo com camundongos, obtiveram tumores intestinais menores em número e tamanho ao suplementar um grupo com ácido eicosapentaenóico (EPA) na dose de 15 g/Kg de peso corpóreo durante 8 semanas, quando comparados ao grupo suplementado com ácido oléico. Em contraste, GRIFFINI et al (1998) relataram aumento de metástase hepática em ratos com carcinoma de cólon que receberam dieta com óleo de peixe.

No presente trabalho, além de pesos tumorais maiores, os grupos W e SW apresentaram quantidades significativamente menores de glicogênio hepático e muscular quando comparados aos grupos não portadores de tumor (tabela 2). Por outro lado, o grupo PW apresentou valores próximos aos grupos C, S e P, reforçando a hipótese de ação anticarcinogênica do óleo de peixe, confirmando os resultados de TOGNI (2002).

A regulação do sistema imunológico também pode estar associada aos potenciais benefícios da suplementação com óleo de peixe. Neste estudo, a presença do tumor promoveu aumento do peso do baço, expresso como porcentagem do peso corpóreo no dia do sacrifício, independentemente da suplementação utilizada. Assim, os grupos W, SW e PW apresentaram valores semelhantes entre si e significativamente mais altos quando comparados aos grupos sem tumor (figura 6), sugerindo ativação da resposta imunológica. AZEVEDO et al (2002) afirmaram que as células envolvidas nas funções imunitárias têm conteúdo elevado de PUFAs em suas membranas plasmáticas, e tais funções dependem de eventos associados à membrana. A alteração destes PUFAs pode levar à produção alterada de citocinas (IL-1, IL-6, TNF), sendo que os mediadores derivados de ácidos graxos ω -3 são considerados menos ativos do que os derivados de ácidos graxos ω -6. Além disso, PUFAs ω -3 resultam em níveis aumentados de peroxidação lipídica, levando à redução ainda maior da resposta imunitária do hospedeiro (MEYDANI, 1996). Portanto, mudanças na dieta podem alterar a composição e a função das membranas das células do sistema imune (ROBINSON et al, 2001). O tipo de gordura ingerido na dieta parece, assim, ter papel relevante na prevenção e tratamento de vários tipos de câncer, sendo os PUFAs ω -3, presentes no

óleo de peixe, relacionados à decréscimo no risco desta doença (REDDY, 2000; CAYGILL et al, 1996).

Além da manipulação nutricional, a quimioprevenção também auxilia na atenuação dos problemas decorrentes das alterações metabólicas promovidas pelo câncer. Quimioprevenção refere-se à administração de agentes químicos naturais ou sintéticos, que possam bloquear o início e/ou o desenvolvimento do tumor (REDDY, 2000). Dentre estes, destacam-se fármacos denominados de antiinflamatórios não esteróides, os AINEs. Em nosso trabalho, a administração do AINE naproxeno (grupos SWN e PWN) diminuiu o peso do tumor e aumentou a quantidade de glicogênio no fígado e nos músculos sóleo e gastrocnêmio quando comparado aos grupos W e SW, sem, no entanto, potencializar os efeitos obtidos com a suplementação com óleo de peixe no grupo PW. Este resultado reitera inúmeros outros estudos que utilizaram AINEs como agente antitumoral (REDDY et al, 1987; HOMEM-DE-BITTENCOURT JR et al, 1989; RAO et al, 1995; PIFFAR, 1999; MASFERRER et al, 2000). Os mecanismos anticâncer pelos quais agem estes AINEs ainda não estão totalmente esclarecidos. Evidências apontam para inibição da enzima ciclooxigenase (COX), que por sua vez modula a síntese de prostaglandinas, que afetam a proliferação celular, crescimento tumoral e resposta imune (REDDY, 2000). Há duas isoformas da enzima COX: a COX-1 é constitutiva e exerce papéis “housekeeping”, como, por exemplo, proteção da mucosa gástrica. A COX-2 não está presente nos tecidos normais, mas é induzida rapidamente por citocinas inflamatórias, promotores tumorais, fatores de crescimento e oncogenes, sendo superexpressada em locais de inflamação e em muitos tipos de tumor (PRESCOTT & FITZPATRICK, 2000; DANNENBERG et al, 2001). Estudo de LEE et al (2001) sugere que a expressão de COX-2 pode ser induzida também por ácidos graxos saturados, mas não por ácidos graxos insaturados. Inibidores seletivos da COX-2 têm mostrado resultados similares aos outros AINEs, sem apresentar efeitos adversos no trato gastrintestinal (DANNENBERG et al, 2001). KIRSCHENBAUM et al (2001) e DANNENBERG et al (2001) observaram que a COX-2 pode promover desenvolvimento tumoral através de vários mecanismos, incluindo a geração de radicais livres e agentes carcinogênicos, aumento da proliferação celular, diminuição da apoptose e indução de

angiogênese. PRESCOTT & FITZPATRICK (2000) afirmaram que o decréscimo nos níveis de ácido araquidônico livre, provocado pela COX-2, elimina um sinal apoptótico, uma vez que altas concentrações de ácido araquidônico livre promove apoptose independentemente da formação de prostaglandinas. Dentre as prostaglandinas resultantes da catálise do ácido araquidônico pela COX, a prostaglandina E2 (PGE2) tem sido considerada das mais atuantes em estimular a secreção de vários fatores de crescimento, podendo ser a responsável pela indução de angiogênese nos tecidos cancerosos (TSUJII et al, 1998), além de estar envolvida no controle de degradação de proteínas musculares durante estados patológicos, contribuindo para o agravamento da caquexia em pacientes com câncer (RODEMANN & GOLDBERG, 1982; SIDDIQUI & WILLIAMS, 1987). Entretanto, CASSANO et al (2000) relataram que a PGE2 pode não desempenhar papel direto no estímulo à proliferação de células cancerosas. HANIF et al (1996) observaram diminuição na proliferação de células de câncer de cólon em presença de AINE por uma via não dependente de prostaglandina. Em nosso trabalho, a análise do tecido tumoral em microscopia óptica (figura 14) não mostrou alterações morfológicas entre os grupos tratados, confirmando estudos anteriores de TOGNI (2002), que não encontrou diferenças morfológicas no tecido tumoral de ratos submetidos ao mesmo protocolo de suplementação, porém sem intervenção farmacológica. Contudo, isto não exclui a possibilidade de existirem alterações morfofuncionais teciduais e intracelulares, considerando-se a subjetividade e limitações técnicas de análises em microscopia óptica. Assim, apesar dos mecanismos de ação antitumoral dos AINEs não estarem completamente claros, tais fármacos podem ser úteis para a prevenção e tratamento de vários tipos de câncer.

Perda de peso é um dos sinais característicos da caquexia. Em nosso trabalho, concomitantemente com o naproxeno, foi administrado clenbuterol, um agonista β_2 -adrenérgico, com a finalidade de contrabalançar a perda de tecido muscular esquelético que ocorre na caquexia. Quando analisado o conteúdo de glicogênio hepático, os grupos tratados com naproxeno + clenbuterol (SWNC e PWNC), assim como os tratados com naproxeno + clenbuterol + insulina (SWNCI e PWNCI), não apresentaram diferenças entre si, mas tiveram conteúdo significativamente maior

de glicogênio quando comparados aos dos grupos C, S, P e PW. No músculo gastrocnêmio, não houve diferença estatística entre os grupos estudados. Todavia, no músculo sóleo, os grupos SWNC, PWNC, SWNCI e PWNCI apresentaram conteúdo de glicogênio significativamente maior quando comparados aos dos grupos C, S, P e PW. Isto pode ter sido provocado pela hipertrofia do músculo e conseqüentemente maior capacidade de armazenamento de glicogênio. Os resultados estão de acordo com relatos prévios de que agonistas β 2-adrenérgicos podem antagonizar a depleção de tecido muscular esquelético em ratos caquéticos portadores de tumor, através da inativação da via proteolítica dependente de ATP-ubiquitina, restaurando a quebra de proteínas a níveis normais, além de aumentar a capacidade de síntese protéica (CARBÓ et al, 1997; COSTELLI et al, 1995; ARGILÉS & LÓPEZ-SORIANO, 1996). Entretanto, estudos com ratos têm mostrado que altas doses de clenbuterol podem causar efeitos adversos, como redução da performance atlética e aumento da massa cardíaca (BAKKER et al, 1998). Em trabalho de STALLION et al (1993) utilizando outro agonista β 2-adrenérgico, o cimaterol, observou-se aumento da massa cardíaca na dose de 0,60 mg/Kg/dia, enquanto o pico de efeitos anabólicos foi alcançado com dose de 0,30 mg/Kg/dia. No presente trabalho, os animais que receberam a dose de 0,15 mg/Kg/dia de clenbuterol (grupos SWNC, SWNCI, PWNC e PWNCI) não apresentaram aumento do peso do coração, expresso como porcentagem do peso corpóreo no dia do sacrifício, quando comparados a todos os outros grupos (figura 5). Portanto, a dose por nós utilizada foi provavelmente hábil em promover aumento da massa muscular esquelética e não induzir aumento da massa muscular cardíaca, efeito este indesejado, pois poderia levar a anormalidades cardíacas.

Além do clenbuterol, outro agente anabolizante utilizado neste trabalho, no intuito de restabelecer a ordem metabólica alterada pela caquexia, foi a insulina. FERNANDES et al (1990) observaram que as ilhotas de ratos portadores do tumor de Walker 256 tinham menor secreção de insulina quando comparadas com as de ratos controles. Em outro estudo, FERNANDES et al (1991) relataram que a administração de insulina melhorou a ingestão alimentar e promoveu ganho de peso em ratos portadores do tumor de Walker 256. Uma vez que as células deste tumor não dependem de

insulina para captar glicose, a administração de insulina poderia aumentar a utilização de glicose pelos tecidos periféricos, diminuindo a disponibilidade desta glicose para o tumor. Além disso, DAS (2001) sugere que a insulina pode funcionar como molécula antiinflamatória, antagonizando os efeitos deletérios do fator de necrose tumoral, TNF. COSTELLI et al (1999) observaram que a administração de insulina previne a perda de tecido adiposo e preserva a ingestão alimentar adequada, contribuindo para a manutenção do peso corpóreo. Além disso, o tratamento com insulina pode abolir mudanças no metabolismo da glicose em linfócitos e macrófagos de ratos portadores do tumor de Walker 256 (FERNANDES et al, 1996). Ao ter seus níveis normalizados pela administração exógena, contrapõe-se aos efeitos catabólicos decorrentes de seu decréscimo, sendo importante na regulação do metabolismo dos lipídios e carboidratos, além de neutralizar a ação dos hormônios contrareguladores, glucagon e catecolaminas (COSTELLI et al, 1999). Em trabalho de BARTLETT et al (1994), a administração de insulina foi associada à de hormônio do crescimento (GH) e somatostatina, observando-se redução do crescimento tumoral e aumento do conteúdo de proteínas no tecido muscular esquelético. Embora, neste estudo, os animais que receberam insulina associada a naproxeno + clenbuterol (grupos SWNCI e PWNCI) tenham apresentado resultados semelhantes àqueles dos outros grupos tratados (SWN, SWNC, PWN e PWNC), nós acreditamos na importância da insulina em contrabalançar o efeito lipolítico do clenbuterol.

Assim, os grupos que receberam tratamento (SWN, SWNC, SWNCI, PWN, PWNC e PWNCI) apresentaram resultados semelhantes ao grupo suplementado com óleo de peixe (PW) quanto ao crescimento tumoral, confirmando estudos anteriores feitos com a suplementação ou o tratamento isoladamente (PIFFAR, 1999; TOGNI, 2000, 2001), sem, entretanto, haver potencialização dos efeitos com a soma das duas estratégias, suplementação + tratamento. Entretanto, os agentes clenbuterol e insulina foram importantes para modificar o grau de caquexia, quando se analisa o conteúdo de glicogênio hepático e do músculo sóleo, comportamento este que não ocorre quando da presença do óleo de peixe sozinho ou associado ao naproxeno. Nós sugerimos que a administração de inibidores específicos da enzima COX-2 associado a

agentes anabolizantes (clenbuterol e insulina) em doses que não provoquem efeitos adversos ou prejudiquem tratamentos convencionais, como a quimioterapia, devam ser implementados na prática médica. Além disso, como método de prevenção a vários tipos de câncer, informações sobre hábitos alimentares saudáveis devem ser levadas à população a fim de reduzir o consumo de gordura saturada e poliinsaturada ω -6 e, cautelosamente, incentivar o consumo de alimentos ricos em PUFA ω -3, uma vez que seus mecanismos de ação ainda carecem de completo esclarecimento.

Em suma, o protocolo deste estudo demonstrou que a redução da caquexia e o decréscimo na velocidade de crescimento tumoral, permitem aos pacientes com câncer suportar tratamentos mais agressivos, aumentando as chances de cura e melhorando a qualidade de vida.

CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que a suplementação, ao longo da vida, com óleo de peixe, reduziu o crescimento do tumor de Walker 256 em ratos. Quando associada a tratamento com naproxeno, naproxeno + clenbuterol, e naproxeno + clenbuterol + insulina, a caquexia foi totalmente revertida, entretanto, a taxa de redução do crescimento tumoral não aumentou quando comparada com a suplementação somente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS,B; BRAY,D; LEWIS,J; RAFF,M; ROBERTS, K; WATSON,J.D. **Biologia molecular da célula**, 3ed., Artmed, Porto Alegre, 1997.
- ALBERTS,B; BRAY,D; JOHNSON,A; LEWIS,J; RAFF,M; ROBERTS,K; WALTER,P. **Fundamentos da biologia celular: uma introdução à biologia molecular da célula**, Artmed, Porto Alegre, 1999.
- ALEXANDER,J.W. Immunonutrition: the role of ω -3 fatty acids. **Nutrition** **14(7-8)**:627-33, 1998.
- ARGILÉS,J.M; LÓPEZ-SORIANO,F.J. The effects of tumour necrosis factor-alpha (cachetin) and tumour growth on hepatic amino acid utilization in the rat. **Biochem J** **266(1)**:123-6, 1990.
- ARGILÉS,J.M; LÓPEZ-SORIANO,F.J. The energy state of tumor-bearing rats. **J Biol Chem** **266(5)**:2978-82, 1991.
- ARGILÉS,J.M; LÓPEZ-SORIANO,F.J. The ubiquitin-dependent proteolytic pathway in skeletal muscle: its role in pathological states. **Trends Pharmacol Sci** **17(6)**:223-6, 1996.
- ARGILÉS,J.M; ALVAREZ,B; LÓPEZ-SORIANO,F.J. The metabolic basis of cancer cachexia. **Med. Res. Rev.** **17(5)**:477-98, 1997.
- ATAY,S; TARNAWSKI,A.S; DUBOIS,A. Eicosanoids and the stomach. **Prostaglandins & other Lipid Mediators** **61**:105-24, 2000.
- AZEVEDO,R.B; SILVA,L.P; LEMOS,A.P.C; MIYASAKA,C.K; LACAVA,Z.G.M. **Controle da resposta inflamatória por ácidos graxos**. In: Entendendo a gordura: os ácidos graxos. Manole, São Paulo, 2002.
- BABA,N.H; GHOSSOUB,Z; HABBAL,Z. Differential effects of dietary oils on plasma lipids, lipid peroxidation and adipose tissue lipoprotein lipase activity in rats. **Nutrition Res** **20**:1113-23, 2000.
- BAKKER,A.J; HEAD,S.I; WAREHAM,A.C; STEPHENSON,G. Effect of clenbuterol on sarcoplasmic reticulum function in single skinned mammalian skeletal muscle fibers. **Am J Physiol** **274 (Cell Physiol 43)**:C1718-C1726, 1998.
- BALDUCCI,L; HARDY,C. Cancer and malnutrition – a critical interaction: a review. **Am J Hematol** **18(1)**:91-103, 1985.
- BANG,H.O; DYERBERG,J; HJORNE,N. The composition of food consumed by Greenland Eskimos. **Acta Med Scand** **200**:69, 1976.

BARACOS,V.E. Regulation of skeletal-muscle-protein turnover in cancer-associated cachexia. **Nutrition** **16**:1015-18, 2000.

BARBER,M.D. Cancer cachexia and its treatment with fish-oil-enriched nutritional supplementation. **Nutrition** **17**:751-55, 2001.

BARTLETT,D.L; CHARLAND,S.L; TOROSIAN,M.H. Growth hormone, insulin and somatostatin therapy of cancer cachexia. **Cancer** **73**:1499-1504, 1994.

BARTLETT,D.L; CHARLAND,S.L; TOROSIAN,M.H. Reversal of tumor associated hyperglucagonemia as treatment for cancer cachexia. **Surgery** **118**:87-97, 1995.

BASU,S; SMEDMAN,A; VESSBY,B. Conjugated linoleic acids induces lipid peroxidation in humans. **FEBS Letters** **468**:33-6, 2000.

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 cachetin. **Nature** **316**:552-4, 1985 a.

BEUTLER,B; MAHONEY,J; LE TRANG,N et al. Purification of cachetin, a lipoprotein-lipase-suppressing hormone secreted by endotoxin-induced RAW 264.7 cells. **J Exp Med** **154**:631, 1985 b.

BEUTLER,B; CERAMI,A. Cachetin and tumor necrosis factor as two sides of the same biological coin. **Nature** **320**:584-88, 1986.

BIANCHI,A; BRUCE,J; COOPER,A.L; CHILDS,C; KOLHI,M; MORRIS,I.D; MORRIS-JONES,P; ROTHWELL,N.J. Increased brown adipose tissue activity in children with malignant disease. **Horm Metab Res** **21(11)**:640-1, 1989.

BIBBY,M.C; DOUBLE,J.A; ALI,S.A; FEARON,K.C; BRENNAN,R.A; TISDALE,M.J. Characterization of a transplantable adenocarcinoma of the mouse colon producing cachexia in recipient animals. **J. Natl. Cancer Inst.** **78(3)**:539-46, 1987.

BLACK, K; GARRET,I.R; MUNDY,G.R. Chinese hamster ovarian cells transfected with the murine interleukin-6 gene cause hypercalcemia as well as cachexia, leukocytosis and thrombocytosis in tumor-bearing nude mice. **Endocrinol.** **128**:2657-59, 1991.

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

CALDER,P.C; MILES,E.A. Fatty acids and atopic disease. **Pediatr Allergy Immunol** **13(Suppl)**:29-36, 2000.

CALDER,P.C. More good news about fish oil. **Nutrition** **17(2)**:158-60, 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.

CARBÓ,N; LÓPEZ-SORIANO,J; TARRAGÓ,T; GONZÁLEZ,O; LLOVERA,M; LÓPEZ-SORIANO,F.J; ARGILÉS,J.M. Comparative effects of β_2 -adrenergic agonists on muscle waste associated with tumour growth. **Cancer Letters** 115:113-18, 1997.

CARSWELL,F.A; OLD,L.J; KASSEL,R.L; GREEN,S; FIORE,N; WILLIAMSON,B. Na endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proc Natl Acad Sci USA** 72(9):3666-70, 1975.

CASSANO,G; GASPARRE,G; SUSCA,F; LIPPE,C; GUANTI,G. Effect of prostaglandin E2 on the proliferation, Ca²⁺ mobilization and cAMP in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. **Cancer Lett** 152:217-22, 2000.

CAYGILL,C.P.J; HILL,M.J. Fish, n-3 fatty acids and human colorectal and breast cancer mortality. **Eur J Cancer Prev** 4:329-32, 1995.

CAYGILL,C.P; CHARLETT,A; HILL,M.J. Fat, fish, fish oil and cancer. **Br J Cancer** 74:159-64, 1996.

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.

CLEMENS,M.R. Free radicals in chemical carcinogenesis. **Klin Wochenschr** 69(21-23):1123-34, 1991.

COLEY,W.B. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas; with a report of ten original cases. **Am J Med Sci** 105:487-511, 1893.

COLLETT,E.D; DAVIDSON,L.A; FAN,Y.Y; LUPTON,J.R; CHAPKIN,R.S. n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids differentially modulate oncogenic Ras activation in colonocytes. **Am J Physiol Cell Physiol** 280:C1066-75, 2001.

CORI,C.F; CORI,G.T. The carbohydrate metabolism of tumors. Changes in the sugar, lactic acid, and CO₂-combining power of blood passing through a tumor. **J Biol Chem** 66:397-405, 1925.

COSTA,G; SAMAL,B; BRENNAN,J et al. Changes in the composition of human muscle during the growth of malignant tumors. **Proc Am Assoc Cancer Res** 6:12, 1965.

COSTELLI,P; LLOVERA,M; CARBÓ,N; LÓPEZ-SORIANO,F.J; TESSITORE,L; BACCINO,F.M; ARGILÉS,J.M. Muscle protein waste in tumor-bearing rats is effectively antagonized by a β_2 -adrenergic agonist (clenbuterol). **J Clin Invest** 95:2367-72, 1995.

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 Nutrition** 129(3):700-6, 1999.

CURI,R; POMPÉIA,C; MIYASAKA,C.K; PROCOPIO,J. **Entendendo a gordura: os ácidos graxos**. Manole, São Paulo, 2002.

DANNENBERG,A.J; ALTORKI,N.K; BOYLE,J.O; DANG,C; HOWE,L.R; WEKSLER,B.B; SUBBARAMAIAH,K. Cyclo-oxygenase 2: a pharmacological target for the prevention of cancer. **Lancet Oncol** 2:544-51, 2001.

DAS,U.N. Is insulin an antiinflammatory molecule? **Nutrition** 17:409-13, 2001.

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.

DEWYS,W.D. Pathophysiology of cancer cachexia: current understanding and areas for future research. **Cancer Res** 42:721s-726s, 1982.

DEWYS,W.D. Management of cancer cachexia. **Semin. Oncol.** 12: 452, 1985.

DIGGLE,C.P; PITT,E; ROBERTS,P; TREJDOSIEWICZ,L.K; SOUTHGATE,J. N-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids induce cytostasis in human urothelial cells independent of p53 gene function. **J Lipid Res** 41:1509-15, 2000.

DOWNER,S; JOEL,S; ALLBRIGHT,A; PLANT,H; STUBBS,L; TALBOT,D; SLEVIN,M. A double blind placebo controlled trial of medroxyprogesterone acetate (MPA) in cancer cachexia. **Br J Cancer**, 67(5):1102-5, 1993.

EDMONSON,J.H. Fatty acid mobilization and glucose metabolism in patients with cancer. **Cancer** 19:277, 1966.

EMERY,P.W. Cachexia in experimental models. **Nutrition** 15:600-603, 1999.

EVANS,W.K; MAKUCH,R; CLAMON,G.H; FELD,R; WEINER,R.S; MORAN,E; BLUM,R; SHEPHERD,F.A; JEEJEEBHOY,K.N; DEWYS,W.D. Limited impact of total parenteral nutrition on nutritional status during treatment for small cell lung cancer. **Cancer Res.** 45:3347, 1985.

FEARON,K.C.H; The mechanisms and treatment of weight loss in cancer. **Proc. Nutr. Soc.** 51(2):251-65, 1992.

FELTRE,R; YOSHINAGA,S. **Química Orgânica**. Moderna, São Paulo, 1975.

FERNANDES,L.C. **Papel da insulina na caquexia e no crescimento do tumor de walker 256 in vivo**. Dissertação de mestrado, São Paulo, 1989.

FERNANDES,L.C; MACHADO,U.F; NOGUEIRA,C.R; CARPINELLI,A.R; CURI,R. Insulin secretion in Walker 256 tumor cachexia. **Am. J. Physiol.** **258(6Pt1):E1033-6**, 1990.

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

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

FINSTAD,H.S; DYRENDAL,H; MYHRSTAD,M.C.W; HEIMLI,H; DREVON,C.A. Uptake and activation of eicosapentaenoic acid are related to accumulation of triacylglycerol in Ramos cells dying from apoptosis. **J Lipid Res** **41:554-63**, 2000.

FLICK,O; GIFFORD,G. Pharmacokinetics of murine tumor necrosis factor. **J. Immunopharmacol.** **8(1):89-97**, 1986.

FRINGS,C.S; DUNN,R.T. A colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulfo-phospho-vanilin reaction. **Am J Clin Pathol** **53(1):89-91**, 1970.

GARCIA-MARTINEZ,C; LÓPEZ-SORIANO,F.J; ARGILÉS,J.M. Alanine metabolism in rats bearing the Yoshida AH-130 ascites hepatoma. **Cancer Lett** **87:123-30**, 1994.

GIACOSA,I; FRASCIO,F; SUKKAR,S.G; RONCELLA,S. Food intake and body composition in cancer cachexia. **Nutrition** **12(1 suppl.):520-3**, 1996.

GOLDBERG,R.M; LOPRINZI,C.L; MAILLIARD,J.A; O'FALLON,J.R; KROOK,J.E; GHOSH,C; HESTORFF,R.D; CHONG,S.F; REUTER,N.F; SHANAHAN,T.G. Pentoxifyline for treatment of cancer anorexia and cachexia? A randomized, double blind, placebo-controlled trial. **J Clin Oncol** **13(11):2856-9**, 1995.

GREENBERG,E.R; BARON,J.A. Aspirin and other nonsteroid anti-inflammatory drugs as cancer-preventive agents. **Iarc Sci Publ** **139:91-8**, 1996.

GRIFFINI,P; FEHRES,O; KLIEVERIK,L; VOGELS,I.M.C; TIGCHELAAR,W; SMORENBURG,S.M; VAN NOORDEN,C.J.F. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids promote colon carcinoma metastasis in rat liver. **Cancer Res** **58:3312-19**, 1998.

GROSVENOR,M; BULCAVAGE,L; CHLEBOWSKI,R.T; Symptoms potentially influencing weight loss in a cancer population. Correlations with primary site, nutritional status, and chemotherapy administration. **Cancer** **63(2):330-4**, 1989.

GRUNDY,S.M. The optimal ratio of fat-to-carbohydrate in the diet. **Annu Rev Nutr** 19:325-41, 1999.

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

HANIF,R; PITTAS,A; FENG,Y; KOUTSOS,M.I; QIAO,L; STAIANO-COCO,L; SHIFF,S.I; RIGAS,B. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on proliferation and on induction of apoptosis in colon cancer cells by a prostaglandin-independent pathway. **Biochem Pharmacol** 52:237-45, 1996.

HLA,T; BISHOP-BAILEY,D; LIU,C.H; SCHAEFERS,H.J; TRIFAN,O.C. Cyclooxygenase-1 and -2 isoenzymes. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology** 31:551-7, 1999.

HOMEM-DE-BITTENCOURT JR,P.I; PONTIERI,V; CURI,R; LOPES,O.V. Effects of aspirin-like drugs on Walker 256 tumor growth and cachexia in rats. **Brasilian J. Med. Biol. Res.** 22:1039-42, 1989.

HYLTANDER,A; SVANINGER,G; LUNDHOLM,K. The effect of clenbuterol on body composition in spontaneously eating tumour-bearing mice. **Bioscience reports** 13(6):325-31, 1993.

INUI,A. Neuropeptide Y: a key molecule in anorexia and cachexia in wasting disorders? **Molecular Medicine Today**, Feb:79-85, 1999.

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(1 suppl):2925-95, 2000.

JOHNSON,I.T. Anticarcinogenic effects of diet-related apoptosis in the colorectal mucosa. **Food and Chemical Toxicology** 40:1171-8, 2002.

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

KARDINAL,C.G; LOPRINZI,C.L; SCHAID,D.J; HASS,A.C; DOSE,A.M; ATHMANN, L.M; MAILLIARD,J.A; McCORMACK,G.W; GERSTNER,J.B; SCHRAY,M.F. A controlled trial of cyproheptadine in cancer patients with anorexia and/or cachexia. **Cancer** 65(12):2657-62, 1990.

KARMALI,R.A. Historical perspective and potential use of n-3 fatty acids in therapy of cancer cachexia. **Nutrition** 12(1):S2-S4, 1996.

KHAN,S; TISDALE,M.J. Catabolism of adipose tissue by a tumour-produced lipid-mobilising factor. *Int J Cancer* **80**:444, 1999.

KERN,K.A; NORTON,J.A. Cancer cachexia. *J Parent Ent Nutr* **2**:286-98, 1988.

KIRSCHENBAUM,A; LIU,X.H; YAO,S; LEVINE,A.C. The role of cyclooxygenase-2 in prostate cancer. *Urology* **58**(Suppl 2 A):127-31, 2001.

KNOX,L.S. Nutrition and cancer. *Nurs Clin North Am* **18**(1):97-109, 1983.

KRAUSE,W; DUBOIS,R.N. Eicosanoids and the large intestine. *Prostaglandins & others Lipids Mediators* **61**:145-161, 2000.

KROMHOUT,D. The importance of N-6 and N-3 fatty acids in carcinogenesis. *Med Oncol Tumor Pharmacother* **7**(2-3):173-6, 1990.

LANZA-JACOBY,S; LANSEY,S.C; MILLER,E.E; CLEARY,M.P. Sequential changes in the activities of lipoprotein lipase and lipogenic enzymes during tumor growth in rats. *Cancer Res* **44**(11):5062-7, 1984.

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.

LAVIANO,A; MEGUID,M.M; YANG,Z.J; GLEASON,J.R; CANGIANO,C; FANELLI,F.R. Cracking the riddle of cancer anorexia. *Nutrition* **12**(10):706-10, 1996.

LECKER,S.H; SOLOMON,V; MITCH,W.E; GOLDBERG,A.L. Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Nutr* **129**(1S Suppl):227S-237S, 1999.

LEE,J.Y; SOHN,K.H; RHEE,S.H; HWANG,D. Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through toll-like receptor 4. *J Biol Chem* **276**:16683-89, 2001.

LEIGHTON,B; BUDOHOSKI,L; LOZEMAN,F.J; CHALLISS,R.A; NEWSHOLME,E.A. The effect of prostaglandins E₁, E₂ and F₂ alpha and indomethacin on the sensitivity of glycolysis and glycogen synthesis to insulin in stripped soleus muscles of the rat. *Biochem J* **227**:337-40, 1985.

LIAW,C.C; CHEN,J.J; WANG,C.H; CHANG,H.K; HUANG,J.J. Tumor fever in patients with nasopharyngeal carcinoma: clinical experience of 67 patients. *Am. J. Clin. Oncol.* **21**(4):422-25, 1998.

LIMA, M.M.R; MOREIRA, N.X; SANTOS, B.M.A; MANCINI FILHO, J; FERNANDES, L.C. **Ácidos graxos e câncer**. In: Entendendo a gordura: os ácidos graxos. Manole, São Paulo, 2002.

LIU, G; BIBUS, D.M; BODE, A.M; MA, W.Y; HOLMAN, R.T; DONG, Z. Omega 3 but not omega 6 fatty acids inhibit AP-1 activity and cell transformation in JB6 cells. **PNAS** **98(13)**:7510-15, 2001.

LLOVERA, M; CARBÓ, N; LOPEZ-SORIANO, J; GARCIA-MARTINEZ, C; BUSQUETS, S; ALVAREZ, B; AGELL, N; COSTELLI, P; LOPEZ-SORIANO, F.J; CELADA, A; ARGILÉS, J.M. Different cytokines modulate ubiquitin gene expression in rat skeletal muscle. **Cancer Lett** **133**:83, 1998.

LÓPEZ-SORIANO, J; ARGILÉS, J.M; LÓPEZ-SORIANO, F.J. Lipid metabolism in rats bearing the Yoshida AH-130 ascites hepatoma. **Mol Cell Biochem** **165(1)**:17-23, 1996.

LOPRINZI, C.L; ELLISON, N.M; SCHAID, D.J; KROOK, J.E; ATHMANN, L.M; DOSE, A.M; MAILLIARD, J.A; JOHNSON, P.S; EBBERT, L.P; GEERAERTS, L.H. Controlled trial of megestrol acetate for the treatment of cancer anorexia and cachexia. **J Natl Cancer Inst** **82(13)**:1127-32, 1990.

LOWRY, S.F. Cancer cachexia revisited: old problems and new perspectives. **Eur J Cancer** **27(1)**:1-3, 1991.

MACDONALD, N. Cachexia-anorexia workshop. **Nutrition** **16**:1007-8, 2000.

MALTONI, M; FABBRI, L; NANNI, O; SCARPI, E; PEZZI, L; FLAMINI, E; RICCOBON, A; DERNI, S; PALLOTTI, G; AMADORI, D. Serum levels of tumour necrosis factor alpha and other cytokines do not correlate with weight loss na anorexia in cancer patients. **Support Care Cancer** **5**:130, 1997.

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; 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.

MENGEAUD, V; NANO, J.L; FOURNEL, S; RAMPAL, P. Effects of eicosapentaenoic acid, gamma-linolenic acid and prostaglandin E1 on three human colon carcinoma cell lines. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids** **47(4)**:313-9, 1992.

MEYDANI, S.N. Effect of (n-3) polyunsaturated fatty acids on cytokine production and their biologic function. **Nutrition** **12**:S8-S14, 1996.

MIYASAKA,C.K; MENDONÇA,J.R; NISHIYAMA,A; ALVES DE SOUZA,J.A; PIRES DE MELO,M; PHITON-CURI,T.C; CURI,R. Comparative effects of fish oil given by gavage and fish oil-enriched diet on leukocytes. **Life Sciences** 69:1739-51, 2001.

MORGAN,C.R; LAZAROW,A. Immunoassay of insulin: two antibody system: plasma insulin levels of normal, subdiabetic and diabetic rats. **Diabetes** 12:115-21, 1963.
NICHOLLS,D.G. The thermogenic mechanism of brown adipose tissue. **Biosci Rep** 3(5):431-41, 1983.

NIELSEN,N.H; HANSEN,J.P. Breast cancer in Greenland-selected epidemiological, clinical and histological features. **J Cancer Res Clin Oncol** 98(3):287-99, 1980.

NOGUCHI Y; VYDELINGUM,N.A; YOUNES,R.N; FRIED,S.K; BRENNAN,M.F. Tumor-induced alterations in tissue lipoprotein lipase activity and mRNA levels. **Cancer Res** 51(3):863-9, 1991.

NOGUCHI,M; EARASHI,M; MINAMI,M; KINOSHITA,K; MIYAZAKI,I. Effects of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid on cell growth and prostaglandin E and leukotriene B production by a human breast cancer cell line (MDA-MB 231). **Oncology** 52:458-64, 1995.

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.

LOUDART,H; CALGARI,C; ANDRIAMAMPANDRY,M; LEMAHO,Y; MALAN,A. Stimulation of brown adipose tissue activity in tumor-bearing rats. **Can J Physiol Pharmacol** 73(11):1625-31, 1995.

PANDALAI,P.K; PILAT,M.J; YAMAZAKI,K; NAIK,H; PIENTA,K.J. The effects of omega-3 and omega-6 fatty acids on in vitro prostate cancer growth. **Anticancer Res** 16(2):815-20, 1996.

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** 1(4):321-32, 1994.

PEARLSTONE,D.B; LEE,J; ALEXANDER,R.H; CHANG,T.H; BRENNAN,M.F; BURT,M. Effect of enteral and parenteral nutrition on amino acids levels in cancer patients. **JPEN** 19(3):204-8, 1995.

PELL,J.D; BROWN,J.C; JOHNSON,I.T. Polyunsaturated fatty acids of the n-3 series influence intestinal crypt cell production in rats. **Carcinogenesis** 15:1115-9, 1994.

PETRIK, M.B.H; McENTEE, M.F; CHIU, C.H; WHELAN, J. Antagonism of arachidonic acid is linked to the antitumorigenic effect of dietary eicosapentaenoic acid in *Apc^{Min/+}* mice. *J Nutrition* **130**:1153-58, 2000.

PETRIK, M.B.H; McENTEE, M.F; JOHNSON, B.T; OBUKOWICZ, G; MASFERRER, J; ZWEIFEL, B; CHIU, C.H; WHELAN, J. Selective inhibition of Δ -6 desaturase impedes intestinal tumorigenesis. *Cancer Lett* **175**:157-63, 2002.

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.

PLATA-SALAMÁN, C.R. Central nervous system mechanisms contributing to the cachexia-anorexia syndrome. *Nutrition* **16**:1009-12, 2000.

POMPÉIA, C. **Essencialidade dos ácidos graxos.** In: Entendendo a gordura: os ácidos graxos. Manole, São Paulo, 2002.

POULOS, S.P; SISK, M; HAUSMAN, D.B; AZAIN, M.J; HAUSMAN, G.J. Pre- and postnatal dietary conjugated linoleic acid alters adipose development, body weight gain and body composition in Sprague-Dawley rats. *J Nutrition* **131**:2722-31, 2001.

PRESCOTT, S.M; FITZPATRICK, F.A. Cyclooxygenase-2 and carcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* **1470**:M69-M78, 2000.

PRICE, 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.

PUCCIO, M; NATHANSON, L. The cancer cachexia syndrome. *Semin. Oncol.* **24**(3):277-87, 1997.

PUPO, A.A; MARREIRO, D. Dosagem de insulina pelo radioimunoensaio com duplo anticorpo. *Rev Assoc Med Bras* **16**:153, 1970.

RAO, C.V; RIVENSON, A; SIMI, B; ZANG, E; KELLOFF, G; STEELE, V; REDDY, B.S. Chemoprevention of colon carcinogenesis by sulindac, a nonsteroidal antiinflammatory agent. *Cancer Res* **55**:1464-72, 1995.

REDDY, B.S; MARUYAMA, H; KELLOFF, G. Dose-related inhibition of colon carcinogenesis by dietary piroxicam, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, during different stages of rat colon tumor development. *Cancer Res* **47**:5340-46, 1987.

REDDY, B.S. Novel approaches to the prevention of colon cancer by nutritional manipulation and chemoprevention. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **9**:239-47, 2000.

RIVERA,S; LÓPEZ-SORIANO,F.J; AZCÓN-BIETO,J; ARGILÉS,J.M. Blood amino acid compartmentation in mice bearing Lewis lung carcinoma. **Cancer Res** **47(21)**:5644-6, 1987.

ROBINSON,L.E; CLANDININ.M.T; FIELD,C.J. R3230AC rat mammary tumor and dietary long-chain (n-3) fatty acids change immune cell composition and function during mitogen activation. **J Nutrition** **131**:2021-27, 2001.

RODEMANN,H.P; GOLDBERG,A.L. Arachidonic acid, prostaglandin E₂ and F_{2α} influence rates of protein turnover in skeletal and cardiac muscle. **The Journal of Biological Chemistry** **257**:1632-38, 1982.

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** **46(4)**:359-65, 1997.

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

SAKURAI,Y; KLEIN,S. Metabolic alteration in patients with cancer: nutritional implications. **Surg Today** **28(3)**:24757, 1998.

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

SAUER,L.A; DAUCHY,R.T; BLASK,D.E. Polyunsaturated fatty acids, melatonin, and cancer prevention. **Bioch Pharmacol** **61**:1455-62, 2001.

SCHONBERG,S.A; SKORPEN,S. Paracetamol counteracts docosahexaenoic acid-induced growth inhibition of A-427 lung carcinoma cells and enhances tumor cell proliferation in vitro. **Anticancer Res** **17(4A)**:2443-8, 1997.

SHIFF,S.J; KOUTSOS,M.I; QIAO,L; RIGAS,B. Nonsteroidal antiinflammatory drugs inhibit the proliferation on colon adenocarcinoma cells: effects on cell cycle and apoptosis. **Exp Cell Res** **222(1)**:179-88, 1996.

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

SIMOPOULOS,A.P. Essential fatty acids in health and chronic disease. **Am J Clin Nutr** **70(Suppl)**: 560S-9S, 1999.

STALLION,A; FOLEY-NELSON,T; CHANCE,W.T; FISCHER,J.E. Effects of increased β₂-agonist dose in tumor-bearing animals. **Nutrition and Cancer** **20(3)**:251-60, 1993.

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** 72:389-94, 2000.

TAPIERO,H; BA,G.N; COUVREUR,P; TEW,K.D. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies. **Biomed Pharmacother** 56:215-22, 2002.

TAYEK,J.A. A review of cancer cachexia and abnormal glucose metabolism in humans with cancer. **J Am Coll Nutr** 11(4):445-56, 1992.

THEOLOGIDES,A. Cancer cachexia. **Cancer** 43(5 Suppl):2004-12, 1979.

THOMPSON,M.P; KOONS,J.E; TAN,E.T.H; GRIGOR,M.R. Modified lipoprotein lipase activities, rates of lipogenesis, and lipolysis as factors leading to lipid depletion in C57BL mice bearing preputial gland tumor ESR-586. **Cancer Res** 41:3228-32, 1981.

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

TISDALE,M.J. Metabolic abnormalities in cachexia and anorexia. **Nutrition** 16:1013-14, 2000.

TISDALE,M.J. Cancer anorexia and cachexia. **Nutrition** 17:438-42, 2001.

TODOROV,P.T; McDEVITT,T.M; MEYER,D.J; UYAMA,H; OHKUBO,I; TISDALE,M.J. Purification and characterization of a tumour lipid-mobilizing factor. **Cancer Res** 58(11):2353-8, 1998.

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 de especialização. Curitiba, 2000.

TOGNI,V.G. **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 de mestrado. Curitiba, 2002.

TORTI,F.M; DIEKMANN,B; BEUTLER,B; CERAMI,A; RINGOLD,G.M. Macrophage factor inhibits adipocyte gene expression: na "in vitro" model of cachexia. **Science** 229:867-9, 1985.

TRACEY,K.J; LOWRY,S.F; FAHEI III,T.J; ALBERT,J.D; FONG,Y; HESSE,D; BEUTLER,B; MANOGUE,K.K; CALVANO,S; WEI,H; CERAMI,A; SHIRES,G.T. Cachetin/Tumor necrosis factor induces lethal shock and stress hormone responses in the dog. **Surg Ginecol & Obstet** 164:415-22, 1987.

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

TSUJII,M; KAWANO,S; TSUJI,S; SAWAOKA,H; HORI,M; DUBOIS,R. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. **Cell** 93:705-16, 1998.

WARREN,S. The immediate causes of death in cancer. **Am J Med Sci** 184:610, 1932.

WILLIAMS,J.F; SIDDIQUI,R.A. Biochemistry of cancer cachexia: review of results, a new hypothesis and a proposal for treatment. **Med Sci Res** 18:3-10, 1990.

YAM,D; PELED,A; SHINITZKY,M. Suppression of tumor growth and metastasis by dietary fish oil combined with vitamins E and C and cisplatin. **Cancer Chemother Pharmacol** 47:34-40, 2001.

YOUDIM,K.A; MARTIN,A; JOSEPH,J.A. Essential fatty acids and the brain: possible health implications. **Int J Devl Neuroscience** 18:383-99, 2000.

YOUNES,R.N; NOGUCHI,Y. Pathophysiology of cancer cachexia. **Rev Hosp Clin Fac Med S Paulo** 55(5):181-93, 2000.