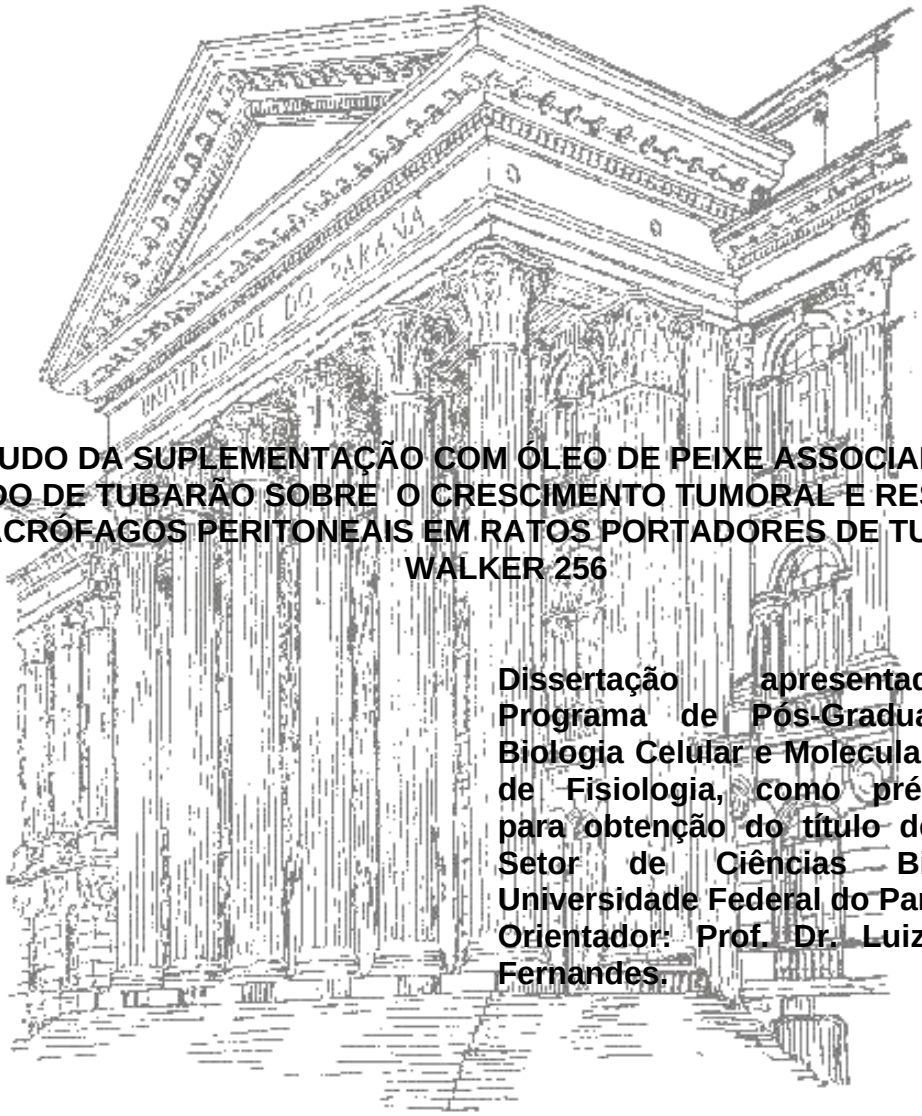
SÉRGIO RICARDO DE BRITO BELLO



ESTUDO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE ASSOCIADO AO DE FÍGADO DE TUBARÃO SOBRE O CRESCIMENTO TUMORAL E RESPOSTA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS EM RATOS PORTADORES DE TUMOR DE WALKER 256

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, na área de Fisiologia, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
Orientador: Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes.

CURITIBA
2007

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Dedico este trabalho à minha família pelo incentivo, apoio, comprometimento e dedicação na minha formação pessoal e profissional, bem como aos amigos de laboratório pela colaboração, amizade e trabalho em equipe.

AGRADECIMENTOS

Ao querido amigo e “chefe” Luiz Cláudio Fernandes pela orientação, paciência e oportunidade de realização de mais uma etapa de minha vida. Obrigado pelas infinitas correções, pelo carinho com que sempre nos tratou e pelo “ mulatoso” (café). Com seu grupo eu aprendi a trabalhar em equipe e respeitar as diferenças.

A Jenniffer pelo amor incondicional, pela compreensão, pelo incentivo e por fazer parte de minha vida em todos os momentos.

Em especial a Fabiola Iagher “Mis Alquyl” pela ajuda, pelas correções, pela paciência, pela dedicação e pela amizade.

Em especial aos amigos Everson Nunes “Vulgo Évinho da Fulvia” por colaborar com o meu aperfeiçoamento no desenvolvimento das técnicas, pelas caronas e pelo comprometimento. Em especial ao querido Sandro pela ajuda incondicional, por realmente “*ser professor dentro e fora da sala de aula*” e por ajudar sempre quando solicitado.

A minha querida amiga, irmã e chefe Fulvia Pirola da Costa pela oportunidade de trabalho, colaboração e compreensão, pela “Araci”, pelo “não pode”, pelo “excelenti”.

Aos estagiários, sem os quais não poderíamos concluir esta pesquisa, Janaina, Julianas, Wanessa, Day, Cintia, Flávia, Laércio.

Aos amigos e colaboradores Gleisson (pelo Dr. A bobrinha), Cris, Loli e seus gatos molhados, Lucieli, Paulo, Diogo, Carine, Carina, Luciana, Andressa, Fernanda Grando com seu sorriso inesquecível, Marcelo, Luis, Vanessa “loirão perigoso”

Ao biotério e aos ratinhos sem os quais não poderíamos desenvolver esta pesquisa.

A Universidade Federal do Paraná enquanto instituição que nos abre as portas e que nos oferece a oportunidade de crescimento e amadurecimento através de seu corpo técnico e de sua estrutura.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS..... iv
LISTA DE ABREVIATURAS..... vi
LISTA DE TABELAS E FIGURAS..... vii
RESUMO..... viii
ABSTRACT..... ix
1 INTRODUÇÃO..... 01
1.1 COMPORTAMENTO DAS CÉLULA TUMORAIS..... 03
1.2 TUMOR DE WALKER 256..... 05
1.3 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS MACRÓFAGOS..... 07
1.3.1 Macrófagos e espécies reativas de oxigênio..... 11
1.3.2 Macrófagos e óxido nítrico..... 13
1.4 LIPIDEOS, SISTEMA IMUNITÁRIO E CÂNCER..... 15
1.4.1 Ácidos graxos poliinsaturados n-3..... 17
1.4.2 Óleo de fígado de Tubarão..... 19
1.4.3 Gordura de coco..... 23
2 JUSTIFICATIVA..... 24
3 OBJETIVOS..... 25
4 MATERIAIS E MÉTODOS..... 26
4.1 AMOSTRA..... 26
4.2 OBTENÇÃO E INOCULAÇÃO DAS CÉLULAS DE TUMOR DE WALKER 256..... 29
4.3 METODOLOGIA PARA ENSAIO COM MACRÓFAGOS..... 29
4.3.1 Obtenção de Macrófagos..... 29
4.3.2 Soluções..... 30
4.3.3 Fagocitose..... 30
4.3.4 Produção de óxido nítrico..... 31
4.3.5 Volume lisossomal..... 31
4.3.6 Produção de ânion superóxido..... 32
4.3.7 Adesão..... 32
4.4 DETERMINAÇÃO DE PESO DOS TECIDOS..... 32
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... 33
6 RESULTADOS..... 34
7 DISCUSSÃO..... 51
8 CONCLUSÃO..... 62
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 63

LISTA DE ABREVIATURAS

AG: Ácidos graxos
APCs: Células apresentadoras de antígenos
ATP: Trifosfato de adenosina
DHA: ácido docosahexaenóico
DNA: Ácido desoxiribonucléico
EPA: Ácido eicosapentaenóico
EROS: Espécies reativas de oxigênio
g: gramas
GIF: *Glycosylation-inhibiting factor*
GMPc: Guanosina monofosfato cíclica
H_2O_2 : Peróxido de Hidrogênio
IL: Interleucina
INCA: Instituto Nacional do Câncer
iNOS:Óxido nítrico sintase induzível
LPS: Lipopolissacarídeo
MHC: Complexo principal de histocompatibilidade
MIF*: Macrophage Migration Inhibitory Factor*
MMPs: Metaloproteases
(n): Número de amostras
NF-KB: *Nuclear factor KB*
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NK: " Natural Killer"
NO: Óxido nítrico
NO-hb: Nitrosil hemoglobina
O_2^- : Ânion superóxido
OH^-: Radical hidroxila
PBS: Tampão de fosfato-salina
PDGF: Fator de crescimento derivado de plaquetas
PMA: *Phorbol Myristate Acetate*
PUFA: *Polyunsaturated fatty acid*
ROS: Espécies reativas de oxigênio
TGF-β: Fator de crescimento e transformação β
TNF-α: Fator de necrose tumoral-alfa
WK: Tumor de Walker 256

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

FIGURA 01	Interações entre célula epitelial cancerosa, células do estroma e componentes da matriz extracelular-Oncol. 2002	04
FIGURA 02	Tumor sólido de Walker 256 após 14 dias de inoculação/ Fonte: Laboratório de Metabolismo Celular-UFPR. Fotografia: Sérgio Ricardo de Brito Belo.	06
FIGURA 03	Tumor sólido de Walker 256 após extração e limpeza	07
FIGURA 04	Papel central dos macrófagos na imunidade e inflamação/ Fonte: Roitt.	09
FIGURA 05	Redução do O_2 a O^-_2 , e formação do H_2O_2 por dismutação espontânea ou pela atividade da enzima superóxido dismutase.	13
FIGURA 06	Ácidos graxos poliinsaturados como precursores de eicosanóides – prostaglandinas, tromboxanas e leucotrienos.	19
FIGURA 07	Estrutura química das moléculas de alquilglicerol mais comuns.	20
FIGURA 08	Estrutura química do 1-O-(2-metóxi)hexadecilglicerol, um alquilglicerol metóxi substituído encontrado no óleo de fígado de tubarão.	21
FIGURA 09	Estrutura química da molécula de esqualamina.	22
FIGURA 10	Gráfico de evolução dos pesos de cada grupo	41
FIGURA 11	Peso dos tumores	42
FIGURA 12	Adesão de macrófagos de animais sem tumor	43
FIGURA 13	Adesão de macrófagos de animais com tumor	44
FIGURA 14	Fagocitose de macrófagos de animais sem tumor	43
FIGURA 15	Fagocitose de macrófagos de animais com tumor	44
FIGURA 16	Volume lisossomal de macrófagos de animais sem tumor	45
FIGURA 17	Volume lisossomal de macrófagos de animais com tumor	46
FIGURA 18	Produção de ânion superóxido de macrófagos de animais sem tumor	47
FIGURA 19	Produção de ânion superóxido de macrófagos de animais com tumor	48
FIGURA 20	Produção de óxido nítrico de macrófagos de animais sem tumor	49
FIGURA 21	Produção de óxido nítrico de macrófagos de animais com tumor	50
FIGURA 22	Produção de Óxido Nítrico a partir da Arginina.	58

RESUMO

A cascata de eventos que levam ao processo oncológico tem despertado a atenção de muitos investigadores, especialmente em relação às gorduras monoinssaturadas e ácido linoléico. Em contrapartida, vários estudos têm demonstrado que a maior ingestão de ácidos graxos ômega 3 reduz os riscos de doenças crônico-degenerativas, e que os alquilgliceróis, presentes no óleo de fígado de tubarão, apresentam elevada atividade biológica, especialmente em processos neoplásicos. Este estudo visou investigar o efeito da suplementação com óleo de peixe em associação com o óleo de fígado de tubarão sobre o crescimento tumoral e atividade macrofágica de ratos Wistar portadores e não portadores de tumor de Walker 256. Ratos Wistar, pós desmame, foram suplementados com óleo de peixe, ou óleo de fígado de tubarão ou gordura de coco e associações (1g/kg p.c.) até a fase adulta. Ao completarem 70 dias, foram divididos em subgrupos, inoculados ou não com suspensão de células do tumor de Walker 256 (2x 10^7 céls/mL). No 14º após a inoculação do tumor, os animais foram ortotanasiados por decapitação. Os tumores foram retirados e pesados, os macrófagos peritoneais aspirados assepticamente para a mensuração da adesão, fagocitose e volume lisossomal., produção de óxido nítrico e de ânion superóxido. Nossos resultados mostram que a suplementação com os diferentes óleos e associações não provocaram elevação significativa da massa corpórea ($p>0,05$). O peso do tumor dos animais suplementados com gordura de coco (WS) foi maior que o dos ratos com tumor sem suplementação (W). Suplementação dos animais com óleo de tubarão (WT) ou óleo de peixe (WP) reduziu em aproximadamente 50% a massa tumoral ($p<0,05$ vs. W). A associação de ambos os óleos (WTP) não modificou este parâmetro, entretanto no grupo suplementado com gordura de coco e óleo de fígado de tubarão (WTS), a massa tumoral foi inferior à do grupo WS ($p<0,05$). Nos macrófagos de ratos sem tumor, com exceção da suplementação com gordura de coco, todos os demais grupos apresentaram incremento da adesão, sendo maior no grupo com óleo de peixe. Na presença do tumor este perfil se alterou onde apenas o grupo suplementado com óleo de fígado de tubarão apresentou aumento significativo ($p<0,05$) em relação aos demais grupos. Nos indivíduos com e sem tumor a suplementação com óleo de peixe elevou significativamente a fagocitose ($p<0,05$) não havendo diferença entre os demais grupos. O volume lisossomal aumentou nos animais sem tumor quando comparado ao controle e foi excepcional no grupo com peixe e gordura saturada e, no grupo com tumor todas as suplementações fizeram redução do volume exceto no grupo com óleo de peixe (WP). A produção de ânion superóxido foi expressiva pelos macrófagos PMA-estimulados de animais sem tumor suplementados com óleo de fígado de tubarão. Na presença de tumor isto só ocorreu no grupo com óleo de peixe (WP) e quando da associação com óleo de tubarão (WTP). A produção de óxido nítrico também se elevou com óleo de peixe em relação aos demais grupos sem e com tumor ($p<0,05$). Nossos dados sugerem que óleo de fígado de tubarão e óleo de peixe tem efeito anti-tumoral contudo sua associação não incrementou a redução da massa tumoral. No cenário de ausência ou presença de tumor ambos tem ação imunomoduladora, contudo comparativamente o óleo de peixe foi mais efetivo. A participação do sistema imunitário via macrófago no combate ao desenvolvimento tumoral não pode ser descartado por estes dados, contudo acreditamos que o macrófago deva ter papel coadjuvante.

ABSTRACT

Fats and fatty acids in general have been implicated in câncer development, in particular those from n-6 poliunsaturated fatty acids (PUFA) family. On contrary n-3 PUFA family has ant-cancer properties. Several studies have been shown that n-3 PUFA intake reduce the risk for chronic-degenerative disease development and that alkylglycerols, present in high amount in shark liver oil also have biological properties in neoplasic process. This study aimed to investigate the effect of the association of fish oil and shark liver oil supplementation in non-tumor-bearing and tumor-bearing rats on tumor growth and peritoneal macrophage activity. Wistar rats after weaning were supplemented at a level of 1 g/kg body weight per day provided as single bolus using a pipette with regular chow, coconut fat, fish oil, shark liver oil and association of saturate fat with shar liver oil or fish oil and shark liver oil. At 90 days of age half of the animal were inoculated in the right flanki with a sterile suspension of 2×10^7 Walker 256 tumor cells, obtained from an ascetic tumor-bearing rat. Fourteen days after tumor inoculation, the animals were killed by decapitation using a guillotine, tumors were removed and peritoneal macrophages harvested. Non-tumor and tumor-bearing animals fed regular chow are referred to as C and W, those supplemented with coconut fat are refereed to as S and WS, shark liver oil are refereed to as T and WT, fish oil referred to as P and WP, association of coconut fat and shark liver oil referred to as TS and WTS, and fish oil with shark liver oil are referred to as TP and WTP. Tumor weight in WS group was higher when compared to the other groups ($p<0.05$). WT and WP groups have 50% lower tumor growth whem compared to W group. The association of both supplementation (WTP) did not cause any further reduction ($p>0.05$). Peritoneal macrophage from non-tumor-bearing rats supplemented with coconut fat did increase adhesion, however in all those group the adhesion increased significantly where in the P group was higher ($p<0.05$). In the presence of tumor there was a shift for shark liver oil group being the highest ($p<0.05$). Phagocytosis was increased by all supplementation and their association even in the presence of tumor. Lisossomal volume increased markedly in the P group and also in the S. In the presence of tumor except in the fish oil supplementation all groups presented reduction of lisossomal volume. Superoxide production in the non-tumor-bearing animals was increased in the shark liver oil supplemented PMA-stimulated. In the presence of tumor there was a shift to fish oil group. Nitric oxide production increased in the fish oil group tumor or non-tumor-bearing. Our results suggest the either fish oil and shark liver oil have anti-tumor properties and their association did not increase the reduction of tumor growth. Regarding to macrophage activity in the absence or presence of tumor both have immunomodulatory effect however fish oil was more effective. The participation of immune system by macrophage in the tumor growth can not be discharged but we believe that these cells play a coadjuvant role.

1 INTRODUÇÃO

Segundo o INCA-Instituto Nacional do Câncer, em 2006 ocorreram 467.440 casos de câncer, havendo destaque entre próstata e pulmão para o sexo masculino e mama e colo de útero para o sexo feminino; dados estes que seguiram o mesmo padrão de distribuição observado no mundo. A morbimortalidade associada ao câncer observado em países desenvolvidos é maior do que em países em desenvolvimento. Algumas formas particulares de câncer, como o de cólon e reto, próstata e mama feminina são mais freqüentes em países desenvolvidos, enquanto outras, como de estômago, esôfago e de colo de útero têm maior incidência nos países em desenvolvimento (GARÓCOLO; *et al.*, 2004).

Atualmente as sociedades industrializadas apresentam elevado consumo de gordura saturada e ácidos graxos trans, baixo consumo de ácidos graxos ω-3, carboidratos complexos e fibras alimentares. Além disso, a relação ω-6/ω-3 aumentou oito vezes durante a evolução, quando comparada à dos indivíduos durante o período Paleolítico (CIBEIRA & GUARAGNA, 2006). O câncer é resultante na maioria dos casos, por mutação ou ativação anormal de genes celulares também chamados de oncogenes, os quais são responsáveis pelo controle do crescimento e mitose celular. O desenvolvimento das várias formas mais comuns de câncer resulta de interações entre fatores endógenos e ambientais, sendo a dieta o mais notável fator ambiental. Acredita-se que cerca de 35% de vários tipos de câncer ocorrem em função de dietas inadequadas (GARÓCOLO; *et al.*, 2004). O processo tumoral é complexo e envolve múltiplos estágios: iniciação, promoção, progressão e disseminação (CURI; *et al*., 2002). Já para outros autores, a teoria de Berenblum postula que o câncer apresenta dois estágios distintos, sendo eles a iniciação e a promoção. A primeira é uma fase de proliferação rápida e ocorrência de mutações, e a segunda, envolve um agente promotor, considerando-se que seus efeitos incluam modificações no crescimento, transporte e metabolismo celular (OTTO, 2002). Mesmo que a etiologia do câncer ainda não esteja totalmente estabelecida, fatores como o fumo, infecções, inflamação e carcinógenos presentes na dieta contribuem para a carcinogênese humana (CURI; *et al.,* 2002).

Várias são as modalidades de tratamento oncológico e dentre elas, a quimioterapia é a mais utilizada, podendo estar associada ou não à radioterapia, cirurgia, imunoterapia e hormonioterapia. O protocolo de tratamento é instituído de acordo com o tipo de tumor, seu comportamento biológico, localização, extensão da doença, idade e condições gerais do paciente (COSTA & LIMA, 2002). A quimioterapia antineoplásica apresenta como finalidade eliminar células tumorais do organismo. Em contrapartida é tóxica para células normais, especialmente as localizadas na medula óssea e células da mucosa. Sua indicação depende de uma série de fatores como a idade do paciente, seu estado nutricional, as funções renal, hepática e pulmonar, a presença de infecções, metástases e o tipo de tumor (FONSECA; *et al.*, 2000).

Pacientes com câncer disseminado apresentam-se suscetíveis a infecções em função do prejuízo na resposta imunológica humoral e a mediada por células. Tumores da medula óssea, incluindo cânceres com metástase para a medula e leucemias que surgem na medula, podem interferir com o crescimento e o desenvolvimento de linfócitos normais e de outros leucócitos. Além disso, tais tumores podem produzir substâncias as quais interferem no desenvolvimento ou função linfocitária (ABBAS & LICHTMAN, 2005).

O aumento das perspectivas de vida de pacientes oncológicos transformou o câncer em doença crônica, sujeitando os portadores a mais sofrimento proveniente do tumor, sendo comum à presença de fadiga, dor, dispnéia, alterações cognitivas, perda de apetite, caquexia, náuseas e depressão (MOTA & PIMENTA; 2002). Os efeitos colaterais mais encontrados na maioria dos pacientes submetidos à quimioterapia são náuseas e vômitos, podendo ocorrer sinais e sintomas como palidez cutânea, taquicardia, hiperpnéia, astenia, tontura, sudorese e dor na região da garganta e do epigástrio (FONSECA; *et al.*, 2000).

A caquexia oncológica é uma freqüente complicação observada em pacientes com tumores malignos e a origem da desnutrição nestes pacientes é multifatorial. A anorexia pode ser atribuída a alterações no paladar e no olfato, ou a mudanças na regulação hipotalâmica da alimentação. Distúrbios de digestão e absorção acompanham alguns tipos de tumores. A demanda nutricional do tumor encontra-se aumentada devido a alterações provocadas pela neoplasia ou pelo estresse do hospedeiro. As perdas de massa magra encontram-se aceleradas pela proteólise da

musculatura esquelética e pelo consumo da gordura corpórea. A mobilização acelerada e o consumo dos depósitos de proteínas dos tecidos periféricos do hospedeiro,ocorrem para suportar a gliconeogênese e a defasagem na síntese de proteínas de fase aguda. Em contraste, a simples inanição está associada com relativas economias de tecidos magros com preferencial consumo de gordura (YOUNES & NOGUCHI, 2000). Cerca de 50% dos pacientes cancerosos apresentam caquexia em estágios avançados da doença, o que gera diminuição da sobrevida, estando presentes perda de peso, anorexia, liberação de citocinas pró-inflamatórias e aumento do catabolismo o qual envolve diminuição do tecido adiposo e da massa muscular, gerando perdas de proteínas totais, " *turnover*" aumentado de glicerol ácidos graxos e aumento da gliconeogênese (CURI;*et al.* , 2002).

1.1 Comportamento das células tumorais

Células consideradas sadias, especialmente as caracterizadas por elevado potencial proliferativo como enterócitos, fibroblastos e linfócitos, apresentam suas atividades coordenadas por sinais promotores e supressores de crescimento. Ao contrário disto, as células neoplásicas apresentam proliferação intensa, rápida e descontrolada, presença da estimulação autócrina ou independente de fatores de crescimento para se proliferar pela própria secreção destes fatores, inibição de contato, diminuição de adesão e perda do controle intracelular do processo proliferativo (CURI, 2000). As células cancerosas diferem das células sadias por não respeitarem os limites normais de crescimento celular. Essas células não precisam dos mesmos fatores de crescimento necessários ao crescimento de uma célula normal, apresentam baixa capacidade de aderência, o que favorece o deslocamento entre os tecidos, a entrada na corrente sangüínea e o transporte para todas as partes do corpo, e apresentam também capacidade de produzir fatores angiogênicos que promovem o crescimento de novos vasos sanguíneos para dentro do tumor facilitando sua nutrição. As células cancerosas competem com as células normais pelos nutrientes, o que acaba sendo agravado ainda pela sua capacidade proliferativa. Na realidade, todos os neoplasmas dependem de suporte estrutural,

nutricional, vascular e humoral, os quais são supridos pelo próprio organismo (CURI, 2000).

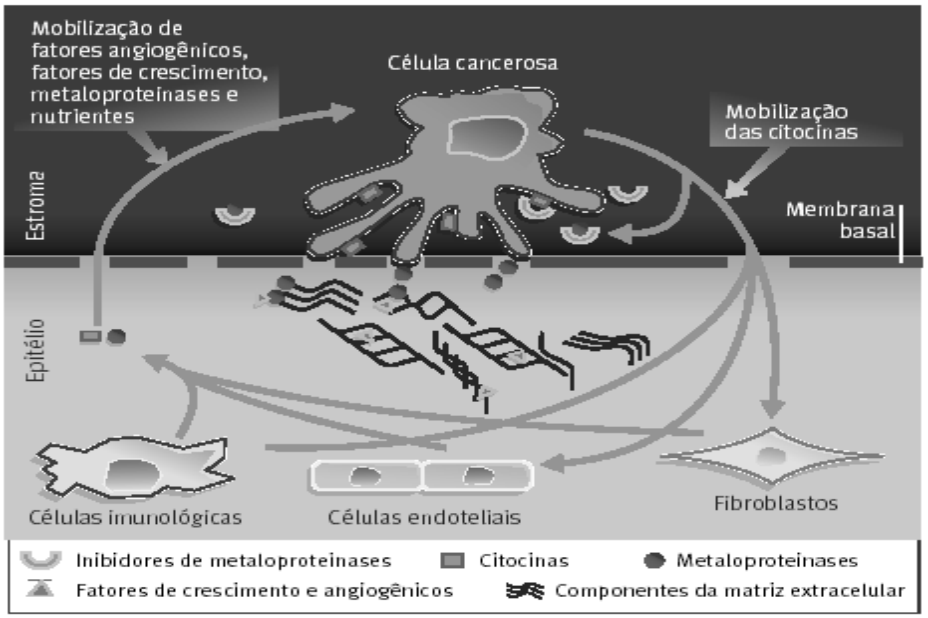


Figura 1: Interação entre célula epitelial cancerosa, células do estroma e componentes da matriz extracelular. Fonte: Oncol, 2002.

As propriedades microscópicas das células cancerosas envolvem o pleomorfismo em que as células apresentam tamanho e formato variáveis, o hipercromatismo em que a cromatina nuclear cora-se de forma mais acentuada, o polimorfismo onde o núcleo é maior e varia em formato e, por último, arranjos cromossomais anormais, os quais determinam translocações, troca de materiais entre os cromossomos, deleções e adições entre outros (OTTO, 2002).

Sob o ponto de vista cinético, ocorre perda do controle da proliferação celular, perda da capacidade de diferenciação, instabilidade cromossomal, capacidade de metástases e presença de propriedades bioquímicas alteradas em decorrência das modificações do padrão enzimático ou de alterações do DNA (OTTO, 2002). Comparadas a uma célula normal, células neoplásicas apresentam menor número de mitocôndrias, diminuição da capacidade respiratória, alteração do comportamento

das enzimas envolvidas na atividade glicolítica, redução da atividade redox no citosol e tipo e quantidades dos transportadores de glicose (CURI, 2000).

Tumores malignos apresentam taxa metabólica elevada, mecanismo este adaptativo à taxa de proliferação rápida das células neoplásicas. O consumo acentuado de glicose é marcante, ocorrendo competição entre esse tipo celular e as normais pelo substrato nutricional circulante e pelos estoques do organismo (CURI, 2000). Dentre os nutrientes, a glicose, através da via glicolítica, desempenha papel importante no crescimento da massa tumoral e migração de células cancerosas para outros tecidos (BECKNER; et al. 1990). Enquanto que em células normais existe uma proporção entre glicólise e ciclo de Krebs, nas células neoplásicas ocorre quase que exclusivamente a glicólise, tendo como produto o lactato (BAGGETTO, 1997). Finalizando as reações de glicólise, o fluxo de piruvato gera 38 mols de ATP por mol de glicose e determina a inibição da glicólise no citosol e formação do lactato. Tal mecanismo, conhecido como efeito Pasteur, constitui um dos mecanismos de controle metabólico em células normais. A perda do controle glicolítico ou efeito de Pasteur, está particularmente relacionada a tumores malignos e também é conhecida como efeito Crabtree (DANG, *et al.,*1997).

1.2 Tumor de Walker 256

Segundo FERNANDES (1995), o tumor de Walker 256 é um carcinosarcoma, que se desenvolveu espontaneamente na região da glândula mamária de uma rata grávida e que foi descoberto em 1928 por George Walker no John`s Hopkins University School of Medicine. Foi localizado na parede abdominal esquerda com tamanho semelhante ao de uma noz. O que se observou foi que durante a lactação o tumor regredia, mas retomava o crescimento após o desmame (EARLE, 1935). Em 1935 e 1954, esse tumor foi transplantado em ratos Sherman por inoculação subcutânea, sendo palpável em uma semana, levando a morte dos animais após seis semanas. Após 15 dias do transplante subcutâneo, o tumor foi descrito como uma massa firme, esférica, lobulada e parcialmente encapsulada, promovendo metástases nos linfonodos pulmonares, regionais e ocasionalmente retroperitoniais (DUNN, 1945; LIKELY; *et al.,* 1952; MIDER;*et al*., 1948; McCOY & NEUMAN, 1956).

Dois subtipos de carcinosarcomas de Walker 256 têm sido utilizados por apresentarem diferenças marcantes na interação com o organismo do hospedeiro. O tipo A, invasivo e metastatizante, tem lento ritmo de crescimento induzindo à anorexia e caquexia somente na fase terminal, garantindo sobrevivência média de 27 dias. Ao contrário, o tipo B, não-invasivo e de crescimento rápido, induz à anorexia e à caquexia precoce com sobrevida de somente 15 dias. Logo, esse último tornou-se importante modelo para estudos da caquexia induzida pelo câncer (GUAITANI *et al*., 1983). As figuras 2 e 3 demonstram seu desenvolvimento no flanco subcutâneo de ratos Wistar e seu aspecto após sua extração.

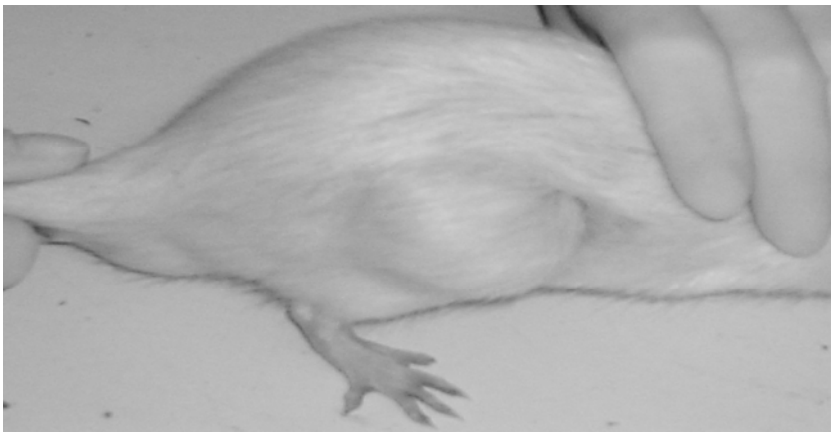


Figura 2: Tumor sólido de Walker 256 após 14 dias de inoculação/ Fonte: Laboratório de Metabolismo Celular-UFPR. Fotografia: Sérgio Ricardo de Brito Belo.

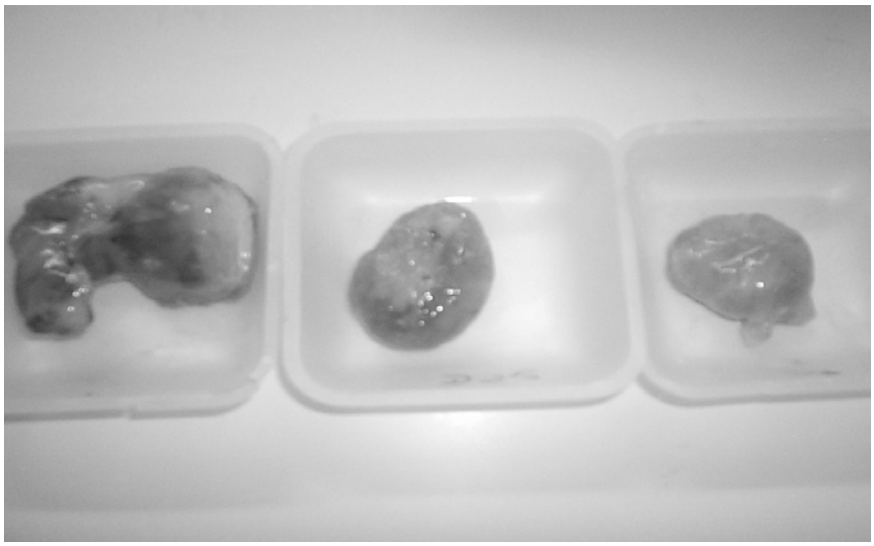


Figura 3: Tumor sólido de Walker 256 após extração e limpeza/Fonte: Laboratório de Metabolismo Celular-UFPR. Fotografia: Sérgio Ricardo de Brito Bello.

1.3 Características gerais dos macrófagos

Macrófagos são células da primeira linha de defesa do sistema imunitário (COUTINHO, 2004) cujo papel é relevante no processo inflamatório, assim como no controle do surgimento de células tumorais (TANG, *et al.*, 2000). São originados de células pluripotentes da linhagem mielóide encontradas na medula óssea e circulam no sangue periférico sob a forma de monócitos antes de migrarem para os tecidos onde ocorrerá sua diferenciação (ERWIG, *et al*., 1998). Uma vez formados, os monócitos permanecem na medula óssea por aproximadamente 24 horas antes de entrarem na circulação periférica (VAN DER BERG, *et al*., 2001), aonde permanecem em média por 25 horas (AUGER & ROSS, 1992). Após migrarem para os tecidos, podem assumir formas morfológicas diferenciadas, sendo como exemplos as micróglias do sistema nervoso central, as células de Kupffer no fígado, os macrófagos alveolares no pulmão e os osteoclastos nos ossos (ABBAS & LICHTMAN, 2005). Apresentam movimento amebóide ativo e sua capacidade funcional, bem como seu estado morfológico, é dependente de seu estado ativado ou não ativado e sua respectiva localização (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2000). Caracterizam-se por serem células grandes, com forma irregular, medindo entre 10-

80 μm de diâmetro, com núcleo irregular excentricamente posicionado, 1 ou 2 nucléolos e cromatina dispersa. Apresentam complexo de Golgi desenvolvido e número variável de vesículas de endocitose, assim como grande número de mitrocôndrias e superfície irregular onde são encontrados microvilos (AUGER & ROSS, 1992; CALDER, 1998). Desempenham papéis importantes nas respostas imunes inatas e de adaptação, e são ativados por produtos microbianos como as endotoxinas e por citocinas das células T como o IFN-γ. Quando ativados, eliminam microorganismos pela fagocitose, produzem citocinas pró-inflamatórias e apresentam antígenos às células T auxiliares. O caráter aniônico da membrana plasmática é dado basicamente pela presença do ácido n-acetilneuramínico (NANA) ou ácido siálico, assim como pelos grupamentos sulfatos e carboxílicos dos aminoácidos encontrados em glicosaminoglicanas e grupamentos fosfato de fosfolipídeos (SOEIRO, *et al.,* 1994).

Sofrem ação ainda do MIF-*Macrophage Migration Inhibitory Factor,* também chamado de GIF (*Glycosylation-inhibiting factor*); citocina liberada por linfócitos cujo papel é inibir a migração de células peritoneais normais como macrófagos. Foi descrito que a supressão de MIF provoca redução da resposta ao LPS e a bactérias Gram-negativas, demonstrada pelo decréscimo da atividade de NF-κB e da produção de TNF-α pelos macrófagos (OLIVEIRA & SILVA, 2004). Assim, a MIF facilita a detecção de endotoxinas, permitindo que as células que se encontram próximo das "portas de entrada" respondam rapidamente a bactérias invasoras (OLIVEIRA & SILVA, 2004)..

Enquanto células apresentadoras de antígeno (APCs), os macrófagos podem interagir através de uma variedade extensa de moléculas extracelulares, onde se incluem proteínas e polissacarídeos livres, internalizando-as e submetendo-as a mudanças metabólicas intracelulares e apresentando-as em sua superfície em associação com moléculas MHC II, sendo assim reconhecidas pelos linfócitos T (UNANUE, 1987). Em outras palavras, dentro da resposta imunitária, os macrófagos fagocitam os antígenos degradando-os através de sistemas enzimáticos em fragmentos menores e associando-os ao complexo de histocompatibilidade principal da classe I e classe II (MHC-I e MHC-II), os quais ficam disponíveis para a apresentação aos linfócitos $TCD8^+$ E $CD4^+$ (CURI, 2000). Em suma, os macrófagos

participam em múltiplos eventos regulatórios (Figura 4), destacando-se a inibição ou promoção do processo inflamatório, reparo e renovação de tecidos, ação tumoricida e microbicida e importante mediação da interação entre a imunidade inata e específica (WOODS, *et al.,* 2000).

Baseado no livro Imunologia de Roitt

Figura 4: Papel central dos macrófagos na imunidade e inflamação/ Fonte: Roitt.

A atividade dos macrófagos infiltrados na massa tumoral pode ser regulada por substâncias liberadas pelo tumor, reprimindo assim a resposta desta célula, ao passo que outros estudos demonstram efeito facilitador do macrófago no desenvolvimento de determinados tumores sólidos pela liberação de fatores os quais favorecem a angiogênese, o que permite maior aporte de nutrientes e oxigênio para

o tecido tumoral (YOUNG, *et al.,*1998, KLIMP, *et al.*, 2002; DAEMEN, 2002). Segundo Hildebrand e Cols. (2002) e Leek e Cols (1996), macrófagos são capazes de promover a angiogênese pela secreção de enzimas proteolíticas que degradam a matriz extracelular em função principalmente das metaloproteases de matriz tipo 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9), bem como pela ação de fatores de crescimento como o TGF-β, PDGF, VEGF. Entretanto, macrófagos associados a tumores também liberam interferons, angiotensina, fator plaquetário 4 e trombospondina, que inibem a angiogênese e consequentemente a proliferação de células endoteliais (SUNDERKOTTER, *et al.,* 1994).

Em estado quiescente, os macrófagos residentes apresentam taxa metabólica baixa e realizam parcialmente glutaminólise e glicólise (ARDAWI & NEWSHOLME, 1993), ao passo que quando estimulados, aumenta-se sua capacidade secretória (RAPOLEE,1988) e geralmente, são dois estímulos seqüenciais, sendo o primeiro inicializador e o segundo disparador (PICK, MIZEL; 1981). Já para outros autores, macrófagos ativados apresentam baixa atividade secretora, porém com marcada capacidade de produção de metabólitos reativos do oxigênio como H_2O_2, O_2^-, OH^- e NO, relevantes para sua atividade microbicida e tumoricida (JORENS, *et al.*,1995). A ativação macrofágica gera uma série de modificações metabólicas a fim de possibilitar a proliferação dos linfócitos e elevação da atividade dos processos de síntese de diferentes substâncias envolvidas na resposta imunitária. O aumento da taxa metabólica busca manter o fornecimento de precursores para síntese de proteínas, RNA, DNA, lipídios estruturais, reguladores intermediários da colesterogênese e derivados, assim como o fornecimento de ATP (CALDER, 1998). Dentro de parâmetros gerais, os produtos secretados pelos macrófagos incluem as lisozimas (GORDON, *et al*.,1974) hidrolases ácidas (LASSER, 1986; NATHAN,1987), proteases neutras como as colagenases, elastases e angiotensina convertase (NATHAN,1987; SILVERSTEIN & FRIEDLAND, 1979), inibidores de enzimas (NATHAN, 1987; NATHAN & MURRAY, 1980), elementos do sistema complemento (BRADE, 1980; WALEY & LAPPIN, 1981), fatores de coagulação (PRIDZ, 1978), espécies reativas do oxigênio (BABIOR, 1984), intermediários do metabolismo do ácido araquidônico (SAMMUELSON, *et al.,* 1978, BOONEY & DAVES, 1984), citocinas como o fator de necrose tumoral (TNF-α), interferon IF-γ, fator de crescimento e transformação (TGF) e interleucinas (DINARELLO, 1985; CERAMI &

BEAUTLER, 1988, LARSER, *et al*.,1989, KUNKEL, *et al.,*1990; LEWIS, *et al.,* 1991; ADAMS, *et al.,* 1994).

A função mais relevante de macrófagos é a fagocitose, processo seletivo que busca não eliminar células e estruturas do próprio organismo e que prioriza superfícies ásperas, visto que as substâncias próprias dos tecidos apresentam superfícies lisas, bem como apresentam revestimentos protéicos protetores os quais repelem os fagócitos, ao passo que as partículas estranhas e de tecidos mortos são desprovidas desses revestimentos protéicos tornando-as mais propensas ao processo fagocitário. Além disso, evidencia-se dentro desses processos de seleção fagocitária o reconhecimento de certos materiais estranhos pelo sistema imunitário. Os macrófagos quando associados ao tumor, apresentam funções complexas em relação as pilhas de células neoplásicas e as evidências sugerem que os mesmos são peças relevantes no circuito inflamatório e na progressão do tumor (MANTOVANI*, et al.,* 2002).

1.3.1 Macrófagos e espécies reativas de oxigênio

Diversos estímulos induzem, em fagócitos, eventos metabólicos, tais como a "explosão" respiratória em que são produzidas espécies reativas de oxigênio (BRANDT, *et al*., 2003). Radical livre é definido como qualquer átomo, molécula ou fragmento de molécula contendo um ou mais elétrons desemparelhados nas suas camadas de valência (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989). Os principais radicais livres compreendem o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_20_2) e o radical hidroxila (OH^-). Tais metabólitos podem se combinar com o óxido nítrico para formar outros intermediários reativos do nitrogênio. Considera-se que a liberação extracelular de baixas concentrações desses potentes mediadores pode aumentar a expressão de quimiocinas, citocinas e moléculas de adesão endotelial de leucócitos, amplificando processos que culminam na resposta inflamatória. Entretanto, em concentrações elevadas a liberação desses mediadores químicos pode prejudicar o próprio organismo, visto que estão envolvidos com lesão endotelial, conseqüente aumento da permeabilidade vascular e inativação de anti-proteases, favorecendo a

ação de proteases e aumentando a destruição da matriz extracelular (ROBBINS, 1996, STITES, *et al.,* 1997, ROITT*, et al.,* 1994).

Para alguns autores, dentre os radicais citados, o radical hidroxila (OH^-) e o ânion superóxido (O_2^-) são os mais relevantes pois são formados durante o processo natural ou exacerbado de redução de O_2 no interior de mitocôndrias (BENZI, 1993). Já o peróxido de hidrogênio (H_20_2), surge no interior das células quando o O_2 é reduzido divalentemente (Figura 5) ou quando o ânion O_2^- sofre dismutação espontânea ou catalisada (PEREIRA, 1994). Sua reatividade mais marcante, pode ser avaliada pelo menor tempo de vida média que possui em função de sua instabilidade eletrônica. O OH^- e o O_2^- possuem tempo respectivo de vida de 1x 10^{-9} e 1x 10^{-6} segundos, enquanto o H_20_2 superior a 10^{-2} segundos (PEREIRA, 1996).

A fim de se proteger, o organismo lança mão de mecanismos químicos e enzimáticos. Nesse sentido, a dieta enquanto adequada no que diz respeito ao consumo de α-tocoferol (vitamina E), β-caroteno, selênio, acido ascórbico (vitamina C), glutationa reduzida (GSH), diminuem a ação tóxica das espécies reativas de oxigênio (EROs). Quando expostos, os organismos sintetizam enzimas antioxidantes como as superóxido dismutase (CuZn-SOD - citosólica e extracelular; Mn-SOD - mitocondrial), catalase (hemeenzima) e glutationa peroxidase (GPX - dependentes e não-dependentes de selênio) para decompor O^{2-}, H_2O_2 e lipoperóxidos (YU, 1994).

Após serem expostos a um estímulo adequado, os fagócitos polimorfonucleares e mononucleares sofrem mudanças metabólicas, aumentando o consumo principalmente de oxigênio, que chega a atingir níveis 50 vezes maiores que os observados quando as células encontram-se em repouso. Associado a isto, evidencia-se aumento na oxidação da glicose, pela via hexose monofosfato, com produção de NADPH.

A adenina-difosfato-nicotinamida oxidase doa elétron, promovendo a redução do O_2 a O^-_2 e este, por dismutação espontânea, ou pela atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), é transformado em H_2O_2 (Figura 5).

$$2\ O_2 + NADPH \rightarrow 2\ O_2^- + NADP+ + H+$$

SOD

$$2\ O_2^- + 2\ H+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

Figura 5: Redução do O_2 a O^-_2 , e formação do H_2O_2 por dismutação espontânea ou pela atividade da enzima superóxido dismutase.

A geração de H_2O_2 é um processo natural e de acordo com as atividades celulares, entretanto a liberação de quantidades consideráveis induz a quebra da fita de DNA e/ou perturbações no citoesqueleto, levando a morte celular. Compostos que estimulam macrófagos, fazendo-os liberar H_2O_2 em pequenas concentrações, são fundamentais, pois auxiliam na resposta imunológica (ALMEIDA, *et al*., 2005).

1.3.2. Macrófagos e Óxido Nítrico

O óxido nítrico encontra-se envolvido em processos fisiológicos como neurotransmissão, controle de pressão sangüínea, inflamação, reações imunológicas e nos mecanismos de defesas contra microorganismos e tumores (COSTA; *et al.,* 2003). Constitui um radical livre gasoso, inorgânico, incolor, com sete elétrons do nitrogênio e oito de oxigênio, tendo um elétron desemparelhado. Até a década de 80, era considerado membro de uma família de poluentes ambientes indesejáveis e carcinógeno potencial, e atualmente, traduz-se em um dos mais importantes mediadores de processos intra e extracelulares (DUSSE; *et al.,* 2003). Entretanto, seu descontrole no processo de síntese está envolvido com doenças cardiovasculares, autoimunidade, rejeição de transplantes, doenças degenerativas, sepsis, genotoxicidade e surgimento de neoplasias. O óxido nítrico apresenta ação antitumoral, porém toda atividade depende das quantidades geradas e da interação das células do hospedeiro com o tumor. Entretanto, já foi atribuído ao óxido nítrico a

iniciação da carcinogênese em células com inabilidade de gerá-lo, o que associado a outros fatores, poderia levar ao descontrole da citoestase e diferenciação celular, favorecendo a propagação de um clone maligno. Em tumores, o NO assume importância na neovascularização, contribuindo para a manutenção do fluxo sanguíneo adequado. (COSTA; *et al*., 2003). A produção de NO se dá através de reação identificada em que a L-arginina é transformada em um intermediário, a N-hidroxi-L-arginina com a presença de Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-hidrogênio (NADPH) e Ca^{+2} sendo necessário mais NADPH e O_2 para a formação de L-citrulina e NO (FLORA FILHO & ZILBERSTEIN, 2000). O aminoácido L-arginina é considerado semi-essencial, pois apesar de ser produzido pelo organismo, suas quantidades são insuficientes, já que faz parte do ciclo da uréia e é utilizado na síntese de creatinina e fornece ornitina para a síntese de poliaminas. E por se apresentar em concentrações insuficientes, ocorre neo-síntese nos túbulos proximais renais a partir da citrulina (FLORA & ZILBERSTEIN, 2000). O NO é derivado do aminoácido L-arginina pela atividade da enzima de três dioxigenases denominadas óxido nítrico sintases (NOS), sendo que dois isômeros destas enzimas são expressos na forma constitutiva (cNOS) em células do endotélio, nos neurônios e músculo esquelético. Já o terceiro isômero induzido (iNOS) é identificado nas células do sistema imunitário, inclusive nos macrófagos (QUEIROZ; *et al.,* 2006). O óxido nítrico é potencialmente tóxico, e essa toxicidade se faz presente em situações de estresse oxidativo, geração de intermediários de oxigênio e deficiência do sistema antioxidante. Corresponde ao principal mediador citotóxico de células imunológicas efetoras ativadas e constitui a mais importante molécula reguladora do sistema imunitário (DUSSE; *et al.,* 2003). Algumas doenças como a diabetes mellitus, artrite, e hepatite viral estão ligadas a um aumento na produção de NO, que pode ser considerada uma molécula tóxica, causadora de mutação no DNA e indução de apoptose em macrófagos e hepatócitos (OLIVEIRA; *et al*., 2004).

Sua detecção em laboratório constitui-se em um desafio pelas pequenas quantidades obtidas e por sua meia vida ser extremamente curta, em torno de 4 a 6 segundos no plasma, e 10 a 60 segundos nos tecidos. Dentre as metodologias utilizadas para a sua mensuração estão à ressonância eletrônica para-magnética (EPR), e a quiminescência e detecção eletroquímica com a utilização de sensores intravasculares, caracterizando-se assim em métodos diretos. Existem ainda os

indiretos por dosagem plasmática ou urinária de nitrato e nitrito, da GMPc, do co-produto L-citrulina, da detecção de nitrosil hemoglobina (NO-hb) das hemácias circulantes, da quantidade histoquímica da NOS e de resíduos de 3-nitrotirosina, formados pela ação do $ONOO^-$ sobre os resíduos tirosina das proteínas. Em âmbito clínico, a detecção de 3-nitrotirosina por HPLC tem sido um marcador promissor (DUSSE; *et al.,* 2003).

1.4 Lipídeos, sistema imunitário e câncer

A alimentação é um dos fatores de risco com grande impacto no desenvolvimento e progressão de alguns tipos específicos de câncer (YIP; *et al*., 1999, SCHULMAN, *et al*., 2002). Dietas ricas em gorduras saturadas e carnes vermelhas e deficientes em fibras, podem ter significados clínicos elevados na promoção do tumor (SAXE*, et al.,* 2001). Experimentos e estudos epidemiológicos têm evidenciado estreita relação entre características qualitativas da dieta e ocorrência de doenças crônico-degenerativas como as doenças cardiovasculares, o diabetes mellitus não insulino-dependente, diferentes tipos de câncer e obesidade. As modificações observadas nas últimas décadas apontam para menor contribuição dos carboidratos no consumo calórico total, bem como sua substituição por gorduras, principalmente na década de 70 para 80, lembrando que a participação das proteínas pouco se alterou ao longo do estudo (MONDINI& MONTEIRO,1994).

A alta ingestão de lipídios induz a diversas alterações no organismo, que envolvem a modulação do tipo e quantidade de eicosanoides produzidos, ou modificações da expressão gênica, alterações do metabolismo energético, fluidez de membranas, função imunológica e produção e hormônios, entre outras (CURI; *et al*., 2002). Os lipídios provenientes da dieta interferem na fluidez de membrana pois, comprometem o comportamento dos receptores da superfície celular e as interações entre células. Além disso, a alimentação como um todo, pode alterar o perfil de hormônios esteróides e desse modo, modificar o risco de neoplasia ao longo da vida. Dietas ricas em gordura, principalmente em gorduras saturadas, tendem a aumentar o risco de desenvolvimento de neoplasias (MONDINI, MONTEIRO;1994). Em adição, apresentam maior densidade e a deposição da gordura dietética nos tecidos

corporais, demandam menos gasto de energia em comparação a deposição de gordura derivada de carboidratos e proteínas (AHMED & HOLUB; 1984).

As estimativas são de que 30% a 60% de todos os cânceres em homens e mulheres apresentem relação com a dieta, e alimentos ricos em gorduras foram associados a maior incidência de câncer de colo, próstata e mama (OTTO, 2002). Além disso, a quantidade e o tipo de gordura consumida influenciam as concentrações sanguíneas de colesterol e lipoproteínas. Os lipídios e gorduras envolvem uma série de diferentes substâncias hidrofóbicas capazes de desempenhar vários papéis no organismo, tais como reserva de energia, composição das membranas, cofatores enzimáticos, transportadores de elétrons, formação de pigmentos os quais absorvem luz, âncoras hidrofóbicas, agentes emulsificantes, hormônios e mensageiros intracelulares (LEHNINGER, *et al*., 2000). Sua estrutura é composta de ácidos graxos ou/e moléculas diretamente a eles relacionadas, como os álcoois, aldeídos ou aminas, e com isso, a compreensão de sua estrutura química, bem como de suas características físicas, químicas e biológicas, são fundamentais para o estudo de seu metabolismo e funções (NETTLETON, 1995).

A cascata de eventos que leva ao processo oncológico tem despertado a atenção de muitos investigadores, especialmente em relação às gorduras (ARONSON, *et al.,* 1999). Gorduras saturadas, monoinsaturadas e ácido linoléico têm sido apontados como vilões (NELSON & BRAWER, 1985**;** HANASH, *et al.,*2000). O ácido linoléico (18:2 n-6) e o acido linolênico (18:3 n-3) são precursores da produção de eicosanóides (prostaglandinas, tromboxanas e leucotrienos), e alguns desses eicosanóides têm sido relacionados com o desenvolvimento de tumores, interferindo na proliferação celular, na resposta imunológica, na invasão tecidual e metastização, (REITER & DEKERNION,2003; SCHULMAN, *et al*., 2002) assim como na fluidez transmembrana que por sua vez pode modificar receptores da superfície celular e interação entre células (YIP, *et al.,*1999). Outras linhas de pesquisa sugerem que os efeitos dos ácidos graxos na carcinogênese provêm da formação de radicais livres em função de sua oxidação (SHUURMAN, *et al*.,1999).

A indução do câncer em modelos animais e o cultivo de células neoplásicas contribuem para demonstrar os mecanismos de ação dos ácidos graxos, lembrando que há correlação entre os tipos de ácidos graxos da dieta e a ocorrência de

cânceres de diversas etiologias, o comportamento metastático e a caquexia decorrente do crescimento tumoral (CURI, *et al*., 2002).

1.4.1 Ácido Graxos Poliinsaturados n-3

No processo de formação de tumores, incluindo-se a iniciação, promoção, latência, crescimento e metástases, a gordura proveniente da dieta tem papel relevante. O ácido linoléico (ω-6) tem sido considerado como a base na indução e nas metástases de tumores, sendo que a razão ômega 6 (ω-6): ômega 3 (ω-3) parece ser fundamental, já que os ácidos graxos ω-3 (ácido linolênico) são inibidores competitivos dos efeitos dos ácidos graxos ω-6 (CIBEIRA & GUARAGNA, 2006).

Os ácidos graxos poliinsaturados (PUFA- *Polyunsaturated Fatty Acid*) são formados por duas grandes famílias: a família n-3 (ômega -3 ou ω-3) derivada do ácido graxo essencial α-linolênico e a família n-6 (ômega -6 ou ω-6) derivada do ácido graxo essencial linoléico (JIANG, *et al*., 1998; CALDER, 2001). Particularmente em relação ao ômega -3, somente a partir de 1980 descobriu-se sua necessidade na dieta, considerando-se suas propriedades profiláticas no aparecimento de distúrbios neurológicos e visuais (CURI, *et al.,* 2002). O consumo de peixes, grandes fontes de PUFA n-3, reduz de maneira significativa o risco de doenças cardiovasculares (HE, *et al.,*2002). A utilização de peixes como fontes de substâncias de interesse medicinal é fenômeno historicamente antigo e geograficamente disseminado (ANDRADE & NETO, 2005). Atenção especial tem sido dada ao ácido graxo α-linolênico (LNA, 18:3n3), eicosapentaenóico (EPA, 20:5n3) e docosahexanóico (DHA, 22:6n3) (SOUZA; *et al.*, 2005). Outras fontes de ω-3 são os óleos vegetais de linhaça e canola e os fitoplânctons marinhos de locais frios.

Estes últimos são fontes de ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) encontrados em grandes concentrações nos óleos de peixes de águas frias e profundas, como a sardinha, cavala, salmão, truta e atum (FETT, *et al.,* 2001). Os ácidos graxos pertencentes à família ω-3, particularmente o

EPA, interferem na produção de prostaglandina trombótica e tromboxana ou são transformados em prostaglandinas antitrombóticas e devido aos estudos com os eicosanóides (figura 6), têm se conhecido as suas ações vasculares e hemostáticas (VISENTAINER, *et al*., 2000).

Entre outros efeitos, os PUFA da família ômega-3 apresentam efeito imunossupressor, inibindo proliferação de linfócitos, a produção de anticorpos e citocinas, a expressão de moléculas de adesão e a atividade de células citotóxicas (CURI*, et al.*, 2002). Sua suplementação, sob a forma de óleo de peixe, reduz a produção de citocinas, interleucina 1 (IL-1) interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral (TNF) por células mononucleares, e interessantemente esse efeito se mantém por várias semanas após a interrupção da suplementação (COOPER, *et al.,* 1993). Seu papel modulador sobre o sistema imunitário tem sido descrito por estudos epidemiológicos, clínicos e em animais experimentais (CALDER, 1998), sendo que a proliferação de linfócitos e ativação de macrófagos é parte importante da resposta auto-imune e a regulação deste processo representa papel central no controle deste sistema (NETTLETON, 1995).

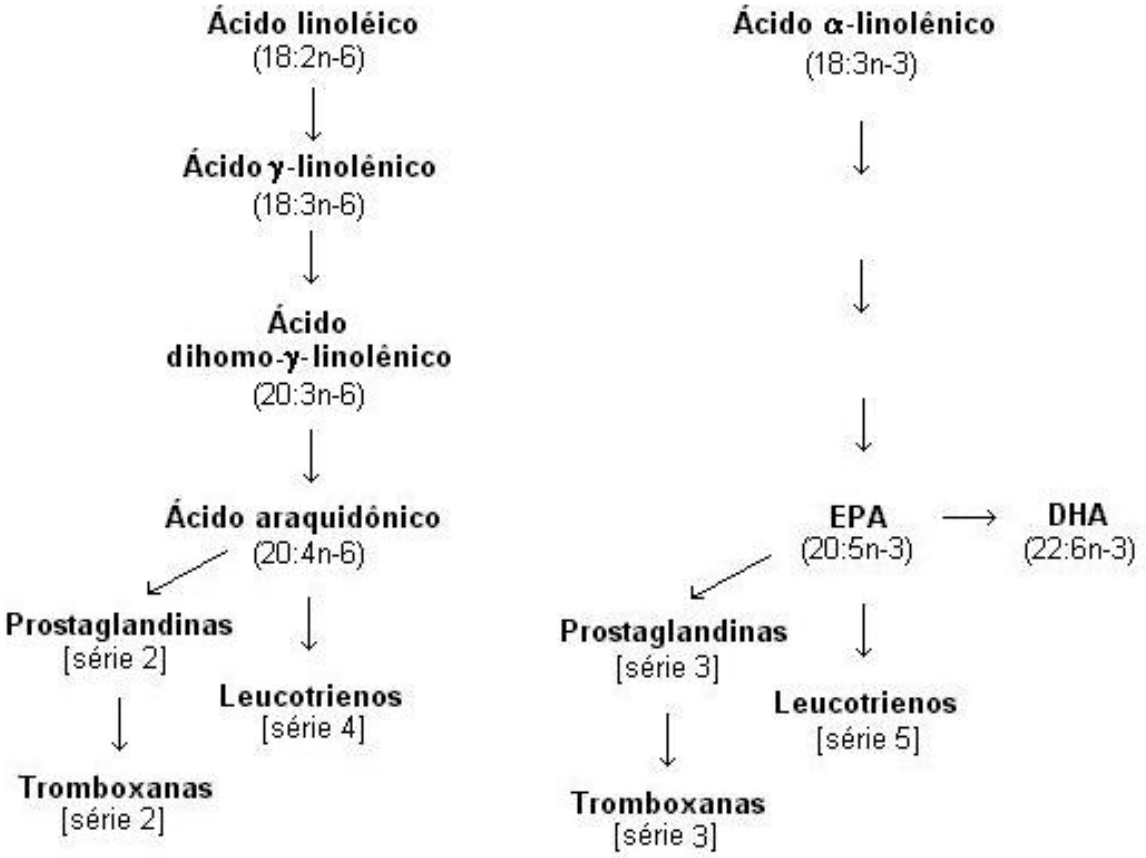


Figura 6: Ácidos graxos poliinsaturados como precursores de eicosanóides – prostaglandinas, tromboxanas e leucotrienos.

1.4.2 Óleo de Fígado de tubarão

O óleo de fígado de tubarão tem sido estudado desde 1950 e dentro de seu conteúdo lipídico, de 30 a 50% é representado pelos alquilgliceróis, os quais são gorduras formadas por uma cadeia hidrocarbônica, saturada ou insaturada, unida por ligação do tipo éter a uma das hidroxilas do glicerol (figura 7) (BROHULT *et al*.,1977). Éteres lipídicos são substâncias químicas com pronunciada atividade biológica. Os alquilgliceróis, um dos representantes desse grupo, encontram-se

presentes na medula óssea humana, no leite materno, no leite de vaca e no óleo de fígado de tubarão.

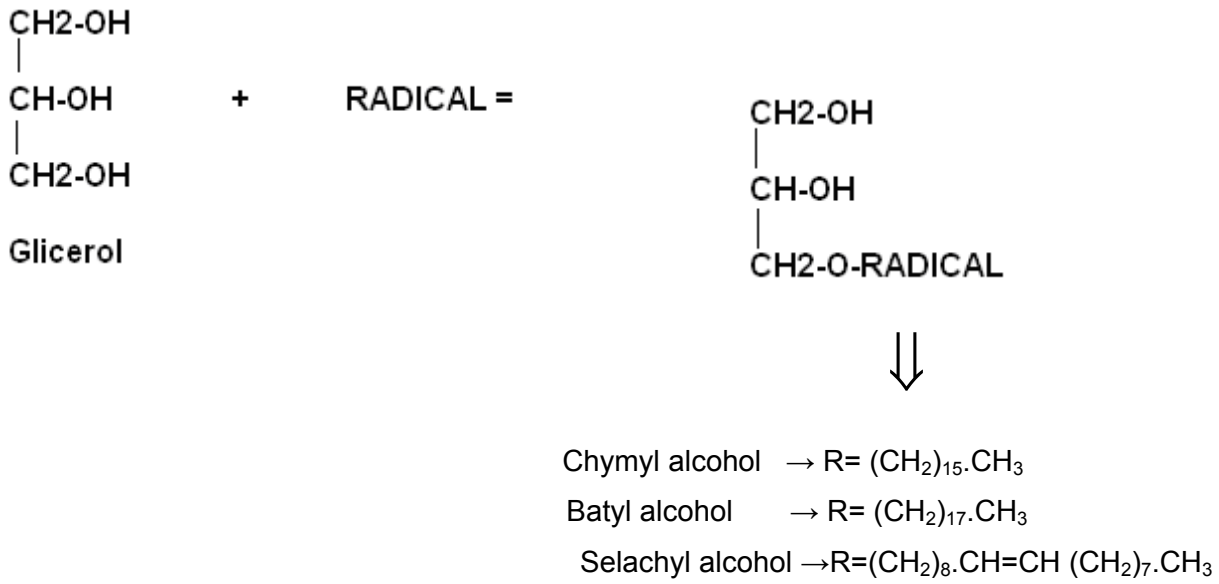


Figura 7: Estrutura química das moléculas de alquilglicerol mais comuns.

A presença de grupo metóxi ($-OCH_3$) no início da cadeia alifática em substituição ao hidrogênio (figura 7), confere estimulação da resposta imunológica e imunomodulação, atividade antifúngica, e em culturas de células demonstraram efeitos citotóxicos sobre células tumorais e redução de metástases (BROHULT, *et al.,* 1986). Em fontes naturais, os alquilgliceróis são encontrados sob a forma esterificada, ou seja, ligada a ácidos graxos principalmente poliinsaturados unidos por ligações éster às duas hidroxilas livres do glicerol sendo assim denominados de alquildiacilgliceróis (BROHULT, 1962). Estudos realizados com o alquilglicerol 1-O-(2-metóxi) hexadecilglicerol revelaram sua capacidade de, em pequenas concentrações (μM), inibir a proliferação de células tumorais humanas de próstata (REYNOLDS *et al,* 2000).

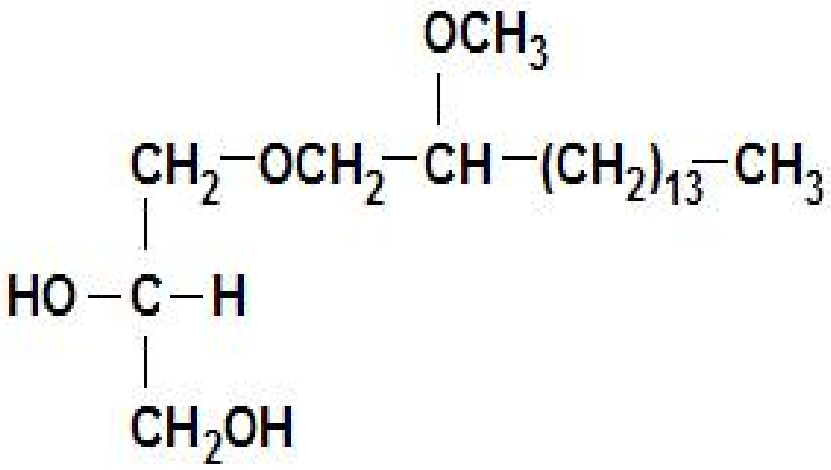


Figura 8: Estrutura química do 1-*O*-(2-metóxi)hexadecilglicerol, um alquilglicerol metóxi substituído encontrado no óleo de fígado de tubarão.

Em estudos que buscaram verificar os efeitos do alquilglicerol sobre a redução da proliferação celular em diferentes linhas de cânceres humanos, houve redução significativa na colônia de células tumorais da próstata, aumento da apoptose tanto na próstata quanto ovário, e predominante necrose em carcinomas mamários (KROTKIEWSKI, *et al.,*2003).

Seus efeitos também estão relacionados a prevenção de leucopenia e trombocitopenia, e a sua administração a pacientes com câncer de colo uterino resulta em taxas de sobrevivência mais altas comparando-se apenas à administração da terapia radioativa. Entretanto, seus efeitos são diferentes de acordo com o tipo de alquilglicerol, ou seja, o álcool saturado *chimyl* com 16 átomos de carbono na cadeia lateral é capaz de proporcionar um crescimento relativamente pequeno em relação ao álcool saturado *batyl* com 18 átomos de carbono (BROHULT, *et al.,* 1970). Em experimentos realizados com suplemento oral de cápsulas (0,1g de alquilglicerol), de duas as três vezes ao dia, totalizando 0,6g ao dia antes da terapia radioativa, percebeu-se regressão do crescimento tumoral. Além disso, os efeitos colaterais decorrentes da terapia por radiação foram marcadamente reduzidos pela administração de alquilgliceróis, bem como os efeitos colaterais mais

complexos decorrentes dos danos provocados pela radiação combinados ao crescimento tumoral foram reduzidos à cerca de 1/3 (BROHULT, *et al.*, 1986).

Em pesquisa desenvolvida com crianças portadoras de leucemia linfoblastica, tratadas pelo Departamento de Pediatria da Universidade de Oulu, Finlândia, e seus familiares, 40% de crianças portadoras dessa patologia se utilizaram de medicina alternativa e 100% consumiam vitaminas como suporte ao tratamento. A composição de muitos medicamentos alternativos utilizados não era clara, mas em sua maioria apresentavam produtos como fígado de tubarão (MOTTONEN; UHARI, 1997).

Esqualeno, precursor esteróide do colesterol, e esqualamina (figura 9), esteróide aminado (PIETRAS *et al*., 2005), são outras moléculas de interesse biológico encontradas no óleo de fígado de tubarão. A esqualamina em particular, apresenta baixo peso molecular e dentre seus efeitos, destaca-se seu caráter como inibidor de angiogênese (TEICHER *et al*., 1998; SILLS JR *et al*., 1998; SCHILLER *et al*., 1999; MARWICK , 2001; WILLIAMS *et al,* 2001).

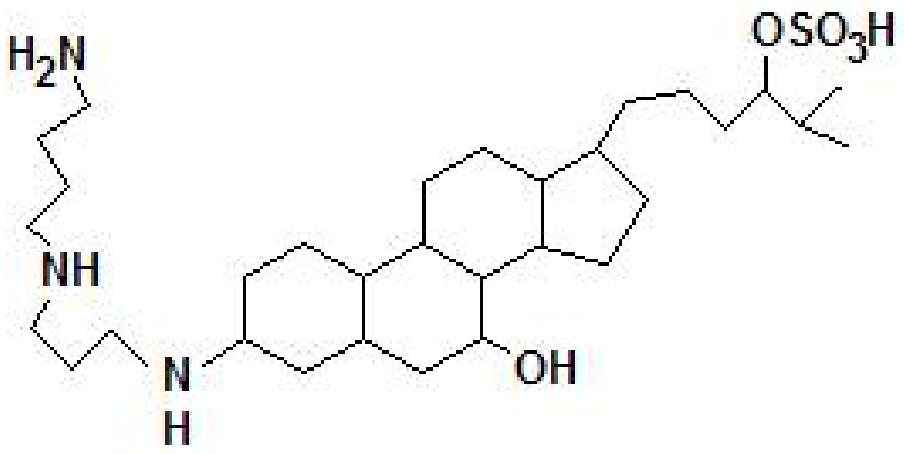


Figura 09: Estrutura química da molécula de esqualamina.

1.4.3. Gordura de coco

A gordura de coco é ácido graxo saturado de cadeia média formado basicamente por láurico e mirístico. É uma fonte de lipídio mais efetiva em relação às outras, pois ácidos graxos de cadeia média são absorvidos mais rapidamente no lúmen intestinal entrando no sangue portal, podendo ser utilizado mais eficientemente que gorduras compostas de ácidos graxos de cadeia longa (MASCARENHAS, *et al.,*1998). Os ácidos graxos de cadeia saturada não são nutrientes essenciais, pois são sintetizados no organismo humano a partir do acetato. As gorduras saturadas são mais abundantes nos animais em geral, exceto nos peixes que são mais ricos em ácidos graxos poliinsaturados como DHA, EPA e linolênico. Os ácidos graxos saturados, como o palmítico, esteárico, mirístico e láurico apresentam efeito hipercolesterolêmico, além de aumentarem as concentrações de lipoproteína LDL que transporta 70% do colesterol para os tecidos. A gordura de cacau, gordura de coco, gema de ovo, gorduras de carnes, certos tipos de margarinas, gorduras hidrogenadas, manteiga, sebo, banha, toicinho favorecem o aumento do colesterol do sangue (ROTMAN; 1999).

Em estudo que buscou comparar os efeitos da gordura de coco e do óleo de peixe sobre a caquexia e crescimento tumoral, foi observado que a suplementação dietética com a gordura de coco não interferiu nos parâmetros de caquexia (TOGNI, *et al.,*2003). Entretanto outros estudos associam o seu consumo a maiores riscos de câncer, maior crescimento tumoral e tumores mais agressivos. A discrepância entre estas informações podem ser atribuídas ao tipo de abordagem experimental utilizada onde *Togni e cols* incrementaram o consumo de gordura na dieta em apenas 0,1% enquanto nos demais trabalhos havia de 2 a 3 vezes maior consumo de gordura saturada (8-12%).

2 JUSTIFICATIVA

Diante das estimativas crescentes de novos casos de câncer na população brasileira, bem como dos gastos hospitalares decorrentes do tratamento das neoplasias, o desenvolvimento de estratégias vislumbrando a possibilidade do

surgimento de novas terapias, é necessário para a obtenção da melhoria na qualidade de vida do paciente. Vários estudos têm demonstrado que a maior ingestão de ω-3 reduz os riscos de doenças crônico-degenerativas, e que os alquilgliceróis presentes no óleo de fígado de tubarão têm elevada atividade biológica, especialmente em processos neoplásicos. Considerando a influência dos lipídios da dieta sobre o comportamento de células tumorais e de defesa, é relevante avaliar a atividade dos macrófagos visto que são células diretamente envolvidas no controle do surgimento de células tumorais (TANG, *et al.,*2000).

3 OBJETIVO

Vários trabalhos tem previamente demonstrado que óleo de peixe e óleo de fígado de tubarão tem ação anti neoplásica, contudo não há relato de estudos da associação destes dois óleos. Assim, o presente estudo objetiva investigar o efeito da associação do óleo de fígado de tubarão (Ecomer®) e óleo de peixe (Herbarium®) sobre a atividade macrofágica de ratos Wistars portadores de tumor de Walker 256. Para alcançar os objetivos, serão mensurados e analisados:

- O peso corpóreo dos animais;
- O peso da massa tumoral;
- A atividade fagocitária;
- O volume lisossomal;
- A produção de ânion superóxido;
- A produção de óxido nítrico;
- Adesão de macrófagos;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Amostra

Para os experimentos, foram utilizados 360 ratos da linhagem Wistar do sexo masculino obtidos pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Todos os animais receberam água e ração à vontade até a inoculação do tumor e foram submetidos a ciclo claro/escuro (22:00/10:00hs) e mantidos em ambiente com temperatura controlada (23°C $\pm$ 2 ^{o}C). Os ratos foram divididos em 12 grupos, sendo estes:

Grupo sem tumor:
C→ Controle (n=25 animais)
T→ Controle suplementado com óleo de fígado de tubarão (n=25)
TP→Controle suplementado com óleo de fígado de tubarão e óleo de peixe (ω-3) (n=25)
S→ Controle suplementado com gordura de coco (saturada) (n=25)
TS→ Controle suplementado com óleo de fígado de tubarão e gordura de coco (saturada) (n=25)
P→ Controle suplementado com óleo de peixe (ω-3) (n=25)

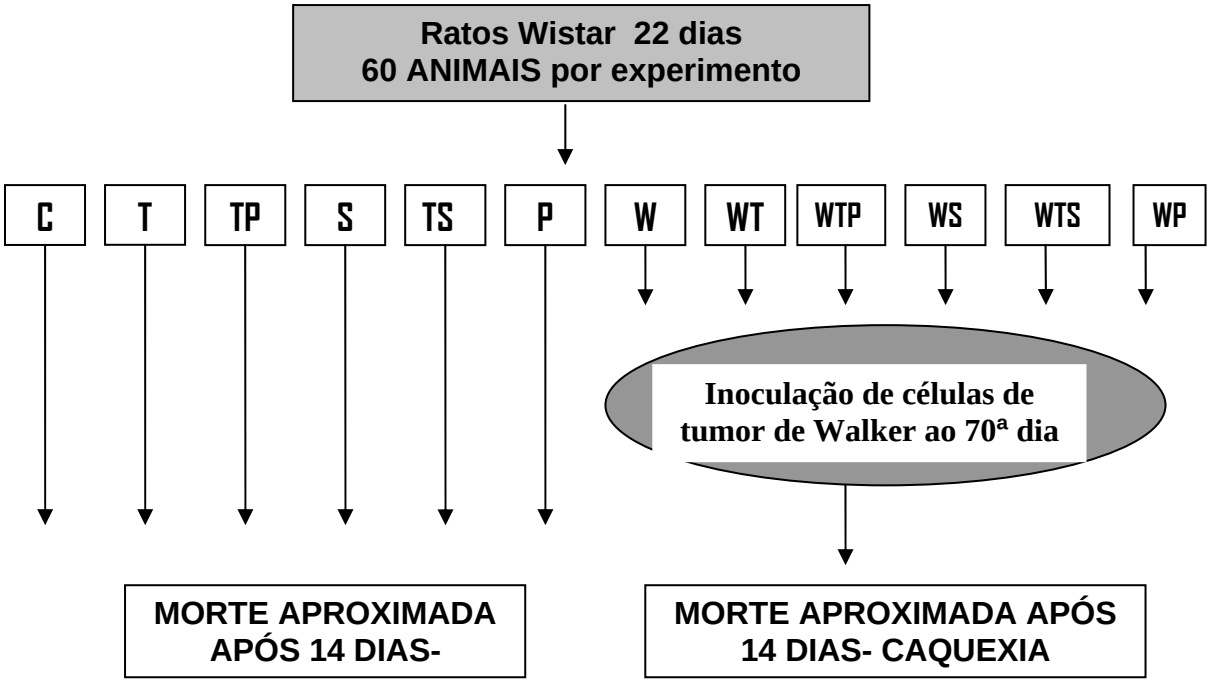
Grupo com tumor:
W→ Walker (n=25)
WT→ Walker suplementado com óleo de fígado de tubarão (n=25)
WTP→Walker suplementado com óleo de fígado de tubarão e óleo de peixe (ω-3) (n=25)
WS→ Walker suplementado com gordura de coco (saturada) (n=25)
WTS→ Walker suplementado com óleo de fígado de tubarão e gordura de coco (saturada) (n=25)
WP→ Walker suplementado com óleo de peixe (ω-3) (n=25)

Protocolo de suplementação:

Os animais foram suplementados desde o desmame aos 22 dias, até a maturidade sexual. Cada grupo recebeu sua/as respectivas suplementações (1g/Kg p.c.) através de micropipeta até completarem 70 dias. Após este período, todos os animais dos grupos com tumor sofreram inoculação subcutânea no flanco direito, de 1 mL de suspensão de células do tumor de Walker 256, contendo 2 x 10^7 células/mL, dando continuidade à suplementação descrita acima.

Após 14 dias da inoculação do tumor os animais foram ortotanasiados por decapitação e analisados parâmetros relacionados à atividade de macrófagos. O experimento foi repetido por pelo menos 05 vezes e as fases do mesmo podem ser visualizadas no diagrama experimental abaixo:

DIAGRAMA DAS FASES DOS EXPERIMENTOS



4.2 Obtenção e inoculação das células do tumor de Walker 256

Após a morte do animal portador de tumor ascítico de Walker 256, foi injetado 10mL de solução salina 0,9% na cavidade abdominal, tomando-se cuidado para não perfurar o intestino. Em seguida, foi massageada a região e aberto o abdômen de forma a favorecer a entrada de uma pipeta tipo Pasteur para a retirada do líquido ascítico, o qual foi armazenado em tubo falcon de 50mL, em gelo, com 1mL de EDTA para evitar a coagulação do sangue. Uma alíquota foi retirada para contagem do número de células utilizando-se a câmara de Neubauer. Após contagem, 1mL da suspensão, contendo $3x10^7$ células, foi injetado subcutaneamente no flanco direito dos animais dos grupos experimentais com tumor (FERNANDES et al., 1991). Após 14 dias, todos os animais foram ortotanasiados e vários parâmetros mensurados, considerando-se indicadores clínicos da síndrome caquética.

As células tumorais, foram cedidas gentilmente pelo Dr. Rui Curi da USP em 1992, e a partir de então, são mantidas no laboratório de metabolismo celular da Universidade Federal do Paraná.

4.3 Metodologia para ensaios com macrófagos

4.3.1. Obtenção de macrófagos

Após a morte dos animais, macrófagos peritoniais foram obtidos após inoculação no peritôneo de 20mL de tampão fosfato-salina (PBS-estéril), pH 7,4 com cuidado para não perfurar órgãos internos. Em seguida, realizou-se massagem no peritôneo do animal por 30 segundos e então abriu-se cuidadosamente um pequeno orifício que permitiu a entrada da pipeta do tipo Pasteur de plástico e estéril para a aspiração do fluído contendo as células. Na seqüência, estas células foram centrifugadas (Eppendorf-Centrifuge 5810 R) duas vezes a 1200 rpm, 4 ^oC, durante 05 minutos.

4.3.2. Soluções

Solução de PBS, pH 7,4, 10 mM foi utilizada como meio de diluição para os corantes. O fixador utilizado foi o de Baker formol-cálcio (formaldeído 4%, cloreto de sódio 2% e acetato de cálcio 1%). A solução de extração consistiu em ácido acético glacial 1% e etanol 50% em água destilada. A solução estoque do corante vermelho neutro foi preparada pela dissolução de 20 mg de corante em 1 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) e a solução para uso de rotina foi preparada pela diluição de 20 ml da solução estoque em 5 ml de PBS. A solução de vermelho fenol para os ensaios de produção de H_2O_2 consistiu de 5,5 mM de dextrose, 0,56 mM de vermelho fenol e 8,5 U/ml peroxidase "horseradish" (Sigma) em PBS, pH 7,4 a 340 mOsm. Previamente, adicionou-se 0,05% de zymosan (2,3 x 10^8 partículas/mL), para os ensaios de fagocitose. A solução foi obtida por diluição de 40 mg de zymosan em 6 ml de PBS e adição de 600 ml de vermelho neutro. Para a mensuração do óxido nítrico, utilizou-se o reagente de Griess, o qual é composto por soluções de estoques de cloreto de naftiletilenodiamina (0,1%) dissolvido em água MiliQ e de sulfanilamida a 1% dissolvida em H_3PO_4 (5%). Para a adesão de macrófagos, utiliza-se Giemsa 0,1%, a qual deve se preparada na hora do uso a partir da solução estoque de giemsa (1% em metanol), na quantidade a ser utilizada.

4.3.3 Fagocitose

Foi utilizado o método descrito por BONATTO *et al.* (2003). Da solução peritoneal foi depositado 100 µL, contendo 10^5 células em placa tipo ELISA de 96 poços. Adicionou-se 20 µL de zimosan corado com vermelho neutro e incubou-se por 30 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e em seguida, adicionado 200 µL de fixador Baker. Após 30 minutos, a placa foi lavada com PBS e centrifugada a 1.500 rpm a 4 °C por 5 minutos. O vermelho neutro que se encontrava dentro dos fagossomos foi solubilizado utilizando-se 200 µL de solução de extração e após 30 minutos, procedeu-se a leitura em leitor de microplacas (Bench Mark – Biorad) a 550 nm.

4.3.4 Produção de óxido Nítrico

Para mensuração da produção de óxido nítrico foi utilizada a metodologia descrita por STUEHER & MARLETTA (1985). Por esse método quantificou-se o NO mensurando-se as concentrações de nitrato e nitrito. O reagente utilizado foi o de Griess que, ao reagir com o nitrito produz cor lilás, com leitura a 550 nm. Para esta mensuração, os macrófagos foram coletados assepticamente, centrifugados e ressuspendidos em meio RPMI-1640, ajustando-se para a concentração adequada de $2x10^5$ células/well para placas de 96 wells. Após plaquear, deixou-se aderindo por duas horas a 37°C numa atmosfera de 5% de CO_2. Após a aderência, lavou-se cada poço 2 vezes com PBS e adicionou-se meio RPMI com soro fetal bovino (10%) e incubou-se por 24 h, nas condições citadas acima. Após a incubação, centrifugou-se a placa a 1500rpm por 5 minutos e do sobrenadante recolheu-se 100μL misturando-se a 100μL de Griess. Este reagente foi preparado pouco antes da mensuração na proporção de 1:1. A mensuração da produção de óxido nítrico foi feita preparando-se uma curva de $NaNO_3$. Estas soluções foram misturadas a 100μL de reagente de Griess. Em seguida, as amostras foram lidas em leitor de microplacas (Bench Mark-Biorad) a 550nm.

4.3.5 Volume lisossomal

Para esta análise utilizou-se o método descrito por PIPE *et al*. (1995), onde em placa do tipo ELISA depositou-se 100μL da solução de macrófagos e adicionou-se 20μL de vermelho neutro a 2%. Após 30 minutos, centrifugou-se a placa por 5 minutos a 1.500rpm. Descartou-se o sobrenadante e individualmente cada poço foi lavado com PBS, a fim de eliminar o vermelho neutro que não foi internalizado pelas células. Adicionou-se então 100μL de solução de extração para solubilizar o vermelho neutro retido dentro dos lisossomos. Isso é possível, visto que o vermelho neutro é um corante catiônico que se difunde através da membrana celular, e uma vez presente no lisossomo, fica retido por mudança de cargas causada pelo pH ácido do sistema lisossomal. Após 30 minutos, a placa foi lida a 550nm (Microplate reader Bio-rad-Benchmark).

4.3.6 Produção de Ânion superóxido

Foi determinada através da redução de “nitroblue tetrazolium” (NBT-Sigma), composto este de coloração amarelada, com características lipossolúveis, o qual se torna insolúvel e de coloração azulada em seu estado reduzido (MADHAVI *et al.*, 1994). Os macrófagos foram incubados por 1 hora com 0,1% de NBT e 30μL de éster de forbol miristato acetato-PMA (80μL) em PBS a 37°. Esta reação foi interrompida pela adição de um volume igual de ácido acético glacial. Esta mistura então foi centrifugada 30 segundos a 10.000rpm e o NBT reduzido, encontrado no sedimento, foi solubilizado em 900μL de ácido acético a 50% e sonicado (1 pulso de 10 segundos). Os restos celulares foram sedimentados e a absorbância do sobrenadante determinada a 550 nm em espectrofotômetro (Ultrospec-2000).

4.3.7 Adesão

Após plaqueamento de uma solução 2.10^6 cel/mL e adição de 100μL de PBS, incubou-se por 1 hora a placa e submeteu-se a mesma a procedimentos de lavagem. O metanol adicionado promoveu a fixação das células e adicionou-se Giemsa (0,1%) esperando que o mesmo agisse por 10 minutos.Em seguida a placa foi lavada com água miliq e o corante foi solubilizado com 200 μL metanol.Realizou-se leitura a 550nm.

4.4 Determinação do peso dos tecidos

Durante o período de suplementação, os animais foram pesados de dois em dois dias em balança Urano® UDI 10.000/1,C.MÁX: 100042g, Div.: 01g, C.Mia.: 25g (eu tiraria isso). A massa tumoral e os demais órgãos como baço, fígado, entre outros foram retirados dos animais e pesados em balança digital Denver Instrument AA-200 ® previamente aferida.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados estão apresentados como média ± erro padrão da média (EPM) dos grupos experimentais e foram submetidos à analise de variância de duas vias Two-way ANOVA com pós teste de Bonferroni, com nível de significância de $p<0,05$. A representação gráfica foi didaticamente separada a fim de facilitar a visualização dos dados pelo número elevado de grupos, especialmente sob a presença de estimulação.

6 RESULTADOS

Na figura 10 está apresentado à evolução da camada corpórea dos animais ao longo do período de suplementação, perfazendo assim aproximadamente 120 dias de vida. A suplementação com os diferentes óleos não promoveu alterações significativas na massa corpórea dos animais entre os diferentes grupos estudados ($p>0,05$). Na figura 11 estão apresentados os dados de peso dos tumores (g) após 14 dias de inoculação. Nos ratos portadores de tumor de Walker 256 sem suplementação (W) o tumor pesou 12,93±1,82g. A suplementação com gordura de coco (WS) elevou a massa tumoral para 19,10±2,66g, o que foi significativamente maior quando comparado à do W ($p<0,05$). Em contrapartida, a suplementação com óleo de fígado de tubarão (WT) fez com que a massa tumoral atingisse 6,36±0,92g, que foi 2 vezes menor que à do W ($p<0,05$) e 4 vezes menos que à do WS ($P<0,05$). O mesmo foi observado para o grupo suplementado com óleo de peixe (WP) ($p<0,05$). Nos animais suplementados com gordura de coco associado ao óleo de fígado de tubarão (WTS) a massa tumoral foi de 11,11±1,07g ($p<0,05$ vs WT). A associação de óleo de fígado de tubarão e óleo de peixe induziu a uma massa de 5,48±1,45g a qual foi similar à dos animais do grupo WT e WP.

Na figura 12 encontra-se representado a adesão de macrófagos nos animais sem tumor, enquanto que a figura 13 expõe os resultados da adesão em animais com tumor. Para efeitos didáticos, os gráficos foram separados buscando-se desta forma facilitar a visualização dos dados obtidos. A adesão dos macrófagos peritoneais, dos ratos suplementados com gordura de coco (S), foi 1,3 vezes menor que à dos animais alimentados com ração controle ($P<0,05$). A suplementação com óleo de fígado de tubarão (T) incrementou a adesão em 1,4 vezes em relação ao grupo controle ($P<0,05$) e em 2,0 vezes em relação ao grupo suplementado com gordura saturada ($P<0,05$). A suplementação com óleo de peixe elevou ainda mais a adesão dos macrófagos sendo de 2,7 vezes em relação à do controle ($P<0,05$), 3,6 vezes à do grupo S e 2 vezes à do grupo T ($P<0,05$). A associação de óleo de fígado de tubarão e gordura saturada (TS) incrementou a adesão de macrófagos em relação ao grupo S em 2,7 vezes ($P<0,05$) e 1,4 vezes ($P<0,05$) em relação ao grupo tubarão (T). Interessantemente a associação com óleo de fígado de tubarão e óleo

de peixe manteve a adesão similar à do grupo T ($p<0,05$ vs P). Os macrófagos peritoneais dos animais portadores de tumor de Walker 256 (W) apresentaram adesão 2,5 vezes maior que à dos animais controle (C), a qual foi significativamente maior ($P<0,05$). A suplementação com gordura de coco (WS) diminui a adesão em 40% em relação à do W, mas não foi significativo ($P>0,05$), contudo foi 2,0 vezes maior que à do sem tumor (S) ($P<0,05$). A suplementação com óleo de fígado de tubarão por sua vez incrementou em 1,4 vezes em relação à do W ($p<0,05$) e em 2,3 vezes em relação à do WS ($p<0,05$). Quando comparada ao grupo sem tumor (T) houve aumento de 2,4 vezes ($P<0,05$). A suplementação com óleo de peixe, por outro lado, reduziu a adesão a valores idênticos aos do grupo suplementado com gordura de coco (WS) e em 2,3 vezes ao do grupo suplementado com óleo de fígado de tubarão ($p<0,05$) e em 1,6 vezes ao grupo sem suplementação (W) e sem tumor com óleo de peixe (P) ($p<0,05$). A associação do óleo de fígado de tubarão com a gordura de coco (WTS) ou óleo de peixe (WTP) não promoveu adesão diferente dàquela da gordura ou de óleo de peixe sozinhos. Quando comparado aos seus grupos sem tumor (TS e TP) a adesão dos macrófagos dos animais com tumor (WTS e WTP) não foi significativamente diferente ($p>0,05$).

A fagocitose dos macrófagos peritoneais, dos animais sem tumor submetidos as diferentes suplementações encontra-se representada na figura 14. A suplementação com óleo de peixe elevou em 1,4 vezes a fagocitose quando comparada à dos grupos sem suplementação (C), suplementados com gordura de coco (S) ou óleo de fígado de tubarão (T), o que foi significativo ($p<0,05$). A associação da gordura de coco e óleo de fígado de tubarão não foi diferente da de seus pares isolados ($p>0,05$). A associação do óleo de fígado de tubarão com o óleo de peixe promoveu evolução da fagocitose quando comparado à do grupo com óleo de peixe isolado ($p<0,05$), sendo similar à do grupo com óleo de fígado de tubarão sozinho ($p>0,05$). Nos animais com tumor o padrão de fagocitose foi similar ao dos animais sem tumor onde apenas no grupo suplementado com óleo de peixe houve aumento ($p>0,05$ vs WT<WS e W), mas foi semelhante ao seu par sem tumor ($p>0,05$ vs P). A associação da dieta com gordura saturada e óleo de fígado de tubarão não promoveu alterações na fagocitose ($p>0,05$vs W, WT e WS). Na associação da suplementação com óleo de peixe e óleo de fígado de tubarão houve

redução da fagocitose em relação ao grupo WP ($p<0,05$), mas não foi diferente daquela do animal sem tumor ($P>0,05$ vs TP).

O volume lisossomal dos macrófagos peritoneais estão apresentados na figura 16. A suplementação com gordura de coco elevou em duas vezes o volume lisossomal dos macrófagos quando comparado ao do controle ($p<0,05$). A suplementação com óleo de fígado de tubarão também promoveu aumento, mas não foi diferente do controle ($p>0,05$), mas foi menor ($p<0,05$) que o do grupo com gordura saturada (S). A suplementação com óleo de peixe promoveu aumento similar à do grupo suplementado com gordura de coco ($p>0,05$) e significativamente maior quando comparado ao C e T ($p<0,05$). A associação de óleo de fígado de tubarão com a gordura saturada não promoveu incremento adicional ao já observado com a gordura de coco ($p>0,05$) mas foi significativamente maior que a do óleo de fígado de tubarão isolada ($p<0,05$). A administração de óleo de peixe associada ao de fígado de tubarão reduziu o volume significativamente quando comparado à suplementação com óleo de peixe isolado ($p<0,05$), mas foi similar à do óleo de fígado de tubarão ($p>0,05$).

A presença do tumor (W) praticamente elevou o volume lisossomal 1,7 vezes quando comparado aos animais sem tumor (C) ($p<0,05$). A suplementação com gordura de coco, ao contrário do observado nos animais sem tumor, promoveu redução do volume lisossomal , contudo não alcançou significância estatística ($p>0,05$ vs W), mas foi 1,5 vezes menor que o do grupo sem tumor com gordura de coco ($p<0,05$). A suplementação com óleo de fígado de tubarão (WT) reduziu ainda mais o volume lisossomal quando comparado ao do W e WS ($p<0,05$) e também foi menor quando comparado ao seu par sem tumor (T) ($p<0,05$). A suplementação com óleo de peixe por sua vez foi similar à dos animais sem suplementação (W) e maior que à dos grupos WS e WT ($p<0,05$. Comparado ao seu par sem tumor (P), o volume lisossomal foi similar ($p>0,05$). A associação do óleo de fígado de tubarão com a gordura de coco foi similar à do W, WS e WT ($p>0,05$) e à do seu par sem tumor (TS) ($p>0,05$). A associação de óleo de fígado de tubarão com óleo de peixe foi similar ao observado nos animais sem tumor ($p>0,05$) e significativamente menor quando comparado ao dos animais suplementados apenas com óleo de peixe (WP) ($P<0,05$).

Nas figuras 18 e 19 estão apresentados os dados da produção de ânion superóxido dos animais sem e com tumor. Nos animais sem tumor e suplementados com gordura saturada (S) ou óleo de fígado de tubarão (T), a produção de ânion superóxido não foi diferente dàquela do grupo sem suplementação e sem tumor (C) ($p>0.05$). Em contrapartida, o grupo suplementado com óleo de peixe (P) mostrou-se 4 vezes menor quando comparado ao grupo controle ($p<0,05$), e 4,1 vezes menor quando comparado ao mesmo grupo com tumor ($p<0,05$). A associação de óleo de fígado de tubarão com a gordura saturada (TS) não promoveu incremento adicional quando comparado ao grupo suplementado com óleo de fígado de tubarão (T) ($p>0,05$). Em contrapartida, a associação entre óleo de fígado de tubarão e óleo de peixe (TP) foi 3,4 vezes maior quando comparado ao grupo suplementado com óleo de peixe (P), porém não significativo ($p>0,05$).

A presença do tumor (W) praticamente elevou a produção de ânion superóxido em 1,2 vezes quando comparado aos animais sem tumor (C), porém não diferente do ponto de vista estatístico ($p>0,05$). A associação entre óleo de fígado de tubarão e gordura saturada (WTS) foi 2,6 vezes menor ($p<0,05$), e a associação de óleo de fígado de tubarão e óleo de peixe 2 vezes menor quando comparados ao grupo com tumor e sem suplementação (W). WT mostrou-se cerca de 1,5 vezes maior quando comparado ao mesmo grupo sem tumor e sem diferença estatística ($p>0,05$), porém quando comparado a WTS, mostrou-se 2,5 vezes maior ($p<0,05$). A resposta ao PMA do grupo T+PMA foi significativamente maior ($p<0,05$) quando comparanda à dos grupos sem tumor e foi 1,8 vezes maior ($p<0,05$) à do mesmo grupo com tumor (WT+PMA). Interessantemente, nos grupo com tumor, a maior resposta frente ao PMA foi observada no grupo WP+PMA, o qual foi diferente estatisticamente ($p<0,05$) quando comparada à dos outros grupos estimulados e foi 4,9 vezes maior quando comparada ao mesmo grupo sem tumor ($p<0,05$).

Nas figuras 20 e 21, encontram-se representado os dados de produção de óxido Nítrico dos animais sem tumor e com tumor. O perfil dos grupos mostrou-se semelhante na produção de óxido nítrico tanto nos grupos sem tumor quanto nos grupos com tumor. O grupo suplementado com óleo de fígado de tubarão mostrou-se 2 vezes maior quando comparado ao grupo controle (C) ($p<0,05$); 1,5 vezes menor quando comparado ao grupo suplementado com óleo de peixe (P) ($p<0,05$) e 2,4 ‘x

vezes menor quando comparado ao mesmo grupo estimulado com a presença do tumor (WT)($p<0.001$). Em contrapartida, o grupo suplementado com óleo de peixe 2,9 vezes maior que o grupo controle (C) ($p<0,05$) e 1,7 vezes menor quando comparado ao mesmo grupo com tumor (WP) ($p < 0.01$). A presença do tumor (W) elevou praticamente a produção de óxido nítrico em 1,4 vezes, porém sem significância estatística ($p>0,05$). Em relação ao grupo sem suplementação e com tumor (W), WT foi 3,3 vezes maior ($p<0,05$) e WP mostrou-se 3,5 vezes maior ($p<0,05$). WT ainda mostrou se 1,8 vezes maior ($p<0,05$) quando comparado a WTS, enquanto WTP apresentou-se 1,5 vezes menor quando comparado a P ($p<0,05$).

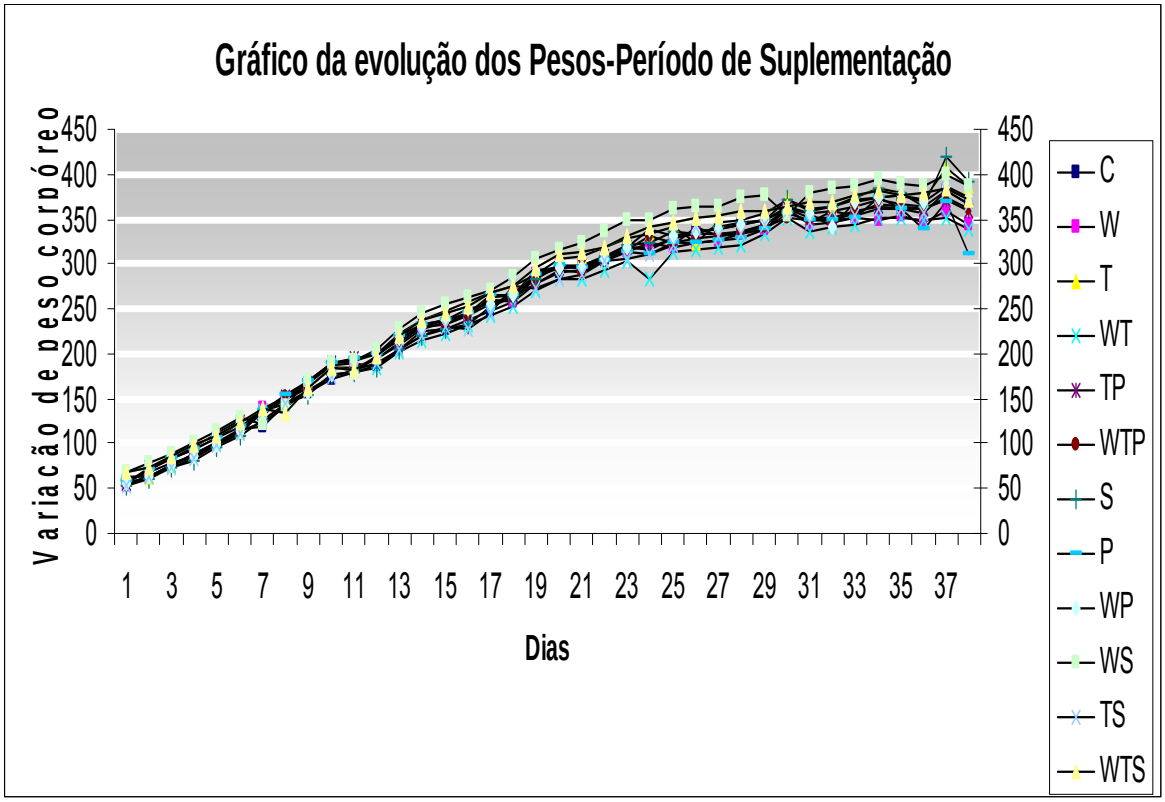


Figura 10: Evolução do peso corpóreo dos animais sem e com tumor de Walker 256 sem suplementação (C e W), suplementado com óleo de tubarão (T e WT), com gordura saturada (S e WS), com óleo de peixe (P e WP), gordura saturada associada a óleo de tubarão (TS e WST) e óleo de peixe associado com de tubarão (TP e WTP). Os dados estão apresentados como média de 05 indivíduos por grupo. O erro padrão da média não foi maior que 15%.

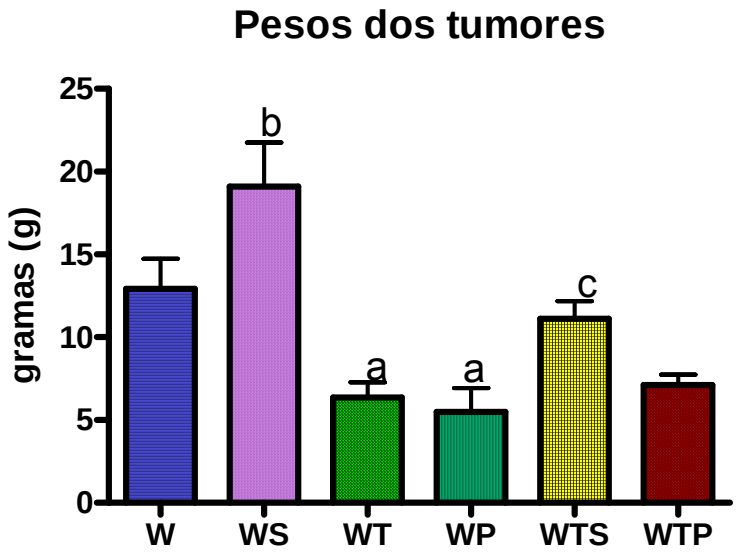


Figura 11: Pesos dos tumores (g) dos animais com tumor sem suplementação (W), suplementados com gordura saturada (WS), óleo de fígado de tubarão (WT), óleo de peixe (WP), óleo de fígado de tubarão associado a gordura saturada (WTS) e com Óleo de fígado de tubarão associado ao óleo de Peixe (WTP). Os dados representam a média ± EPM de 20 animais por grupo.

a - $p<0,05$ vs W
b - $p<0,05$ vs WT e WP
c - $p<0,05$ vs WT e WS

GRUPO	W	WT	WTP	WS	WTS	WP
PESO (g)	12,93±1,82	6,36±0,92	7,12±0,61	19,10±2,66	11,11±1,07	5,48±1,45

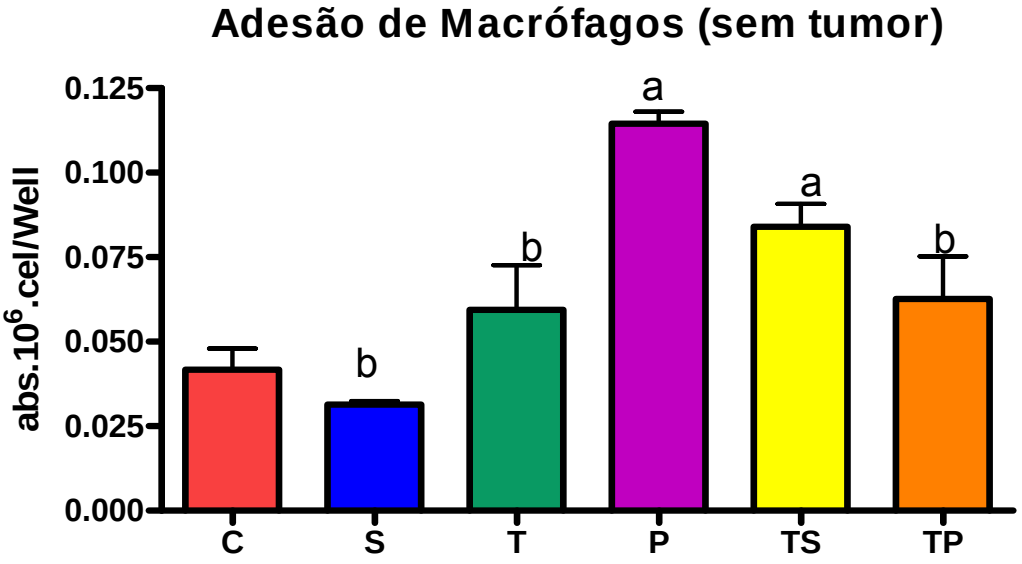


Figura 12: Adesão de macrófagos dos animais sem tumor sem suplementação(C), suplementados gordura saturada (S), óleo de fígado de tubarão (T), óleo de peixe (P), óleo de fígado de tubarão associado a gordura saturada (TS) e com óleo de fígado de tubarão associado ao óleo de peixe (TP). Os dados representam a média ± EPM de 6 experimentos.

a - p<0,05 vs C
b - p<0,05 vs P

GRUPO	C	S	T	P	TS	TP
	0,04175± 0,006247	0,03138± 0,001101	0,05938± 0,01324	0,1145± 0,003561	0,08400± 0,006748	0,06263± 0,01262

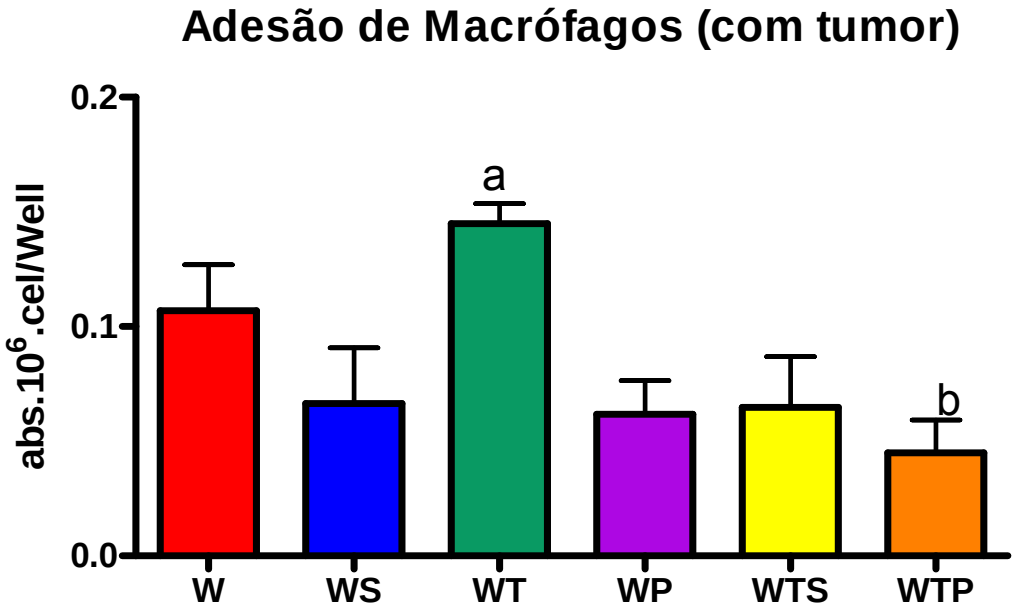


Figura 13: Adesão de macrófagos dos animais com tumor sem suplementação (W), suplementados com gordura saturada (WS), óleo de fígado de tubarão (WT), óleo de peixe (WP), óleo de fígado de tubarão associado a gordura saturada (WTS), e óleo de fígado de tubarão associado ao óleo de peixe (WTP). Os dados representam a média± EPM de 6 experimentos.

a - ($p<0,05$) vs WP
b -($p<0,05$ vs WT

GRUPO	W	WS	WT	WP	WTS	WTP
	0,10±0,02	0,06±0,02	0,14±0,008	0,06±0,01	0,06±0,02	0,04±0,01

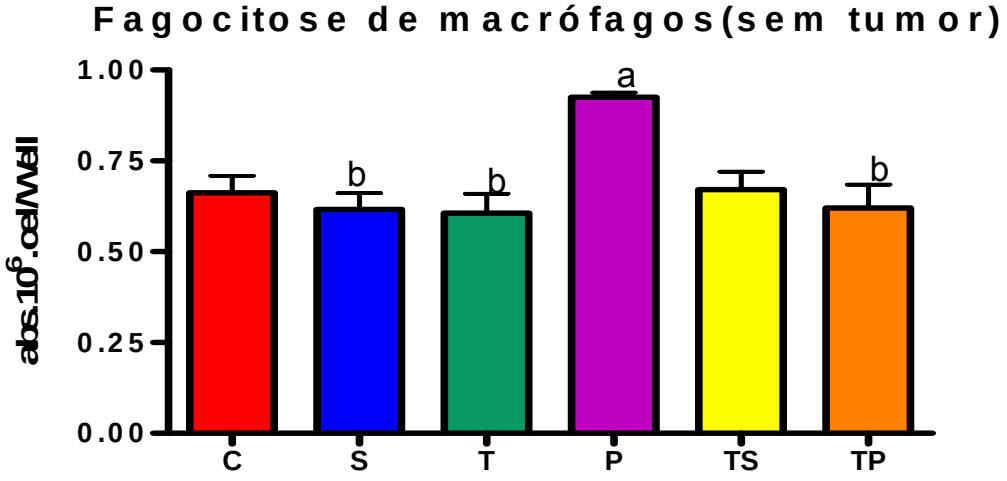


Figura 14: Fagocitose dos macrófagos peritoneiais dos animais sem tumor e sem suplementação (C), suplementados com gordura saturada (S), óleo de fígado de tubarão (T), óleo de peixe (P), óleo de fígado de tubarão associado a gordura saturada (TS) e óleo de fígado de tubarão associado ao óleo de peixe (TP). Os dados representam a média ± EPM de 6 experimentos.

a - ($p<0,05$) vs C
b - ($p<0,05$) vs P

GRUPO	C	S	T	P	TS	TP
	0,662± 0,046	0,616± 0,044	0,606± 0,053	0,925± 0,013	0,671± 0,049	0,620± 0,064

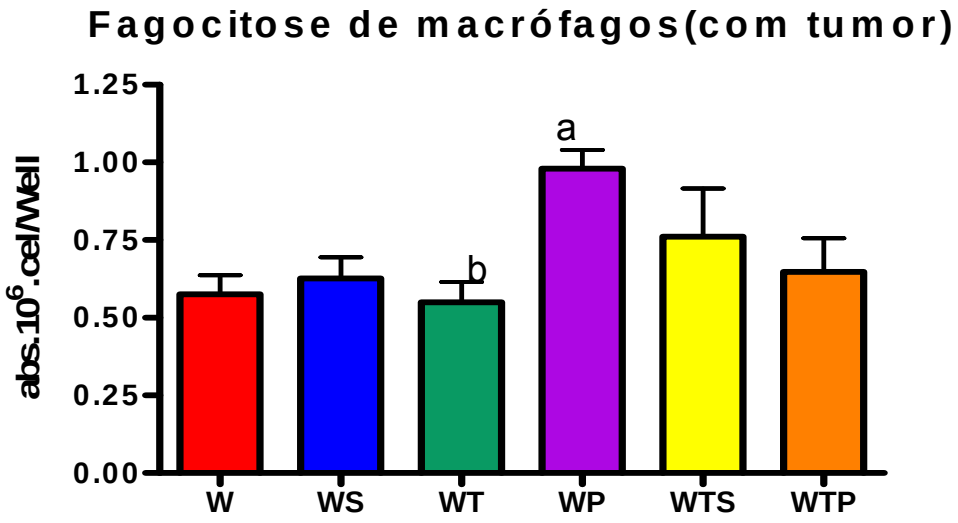


Figura 15: Fagocitose de macrófagos dos animais com tumor sem suplementação (W), suplementados com gordura saturada (WS), óleo de fígado de tubarão (WT), óleo de peixe(WP), óleo de fígado de tubarão associado a gordura saturada (WTS), e óleo de fígado de tubarão associado ao óleo de peixe (WTP). Os dados representam a média± EPM de 6 experimentos.

a - ($p<0,05$) vs W
b - ($p<0,05$) vs WP

GRUPO	W	WS	WT	WP	WTS	WTP
	0,575± 0,061	0,626± 0,068	0,549± 0,066	0,979± 0,060	0,760± 0,155	0,647± 0,107

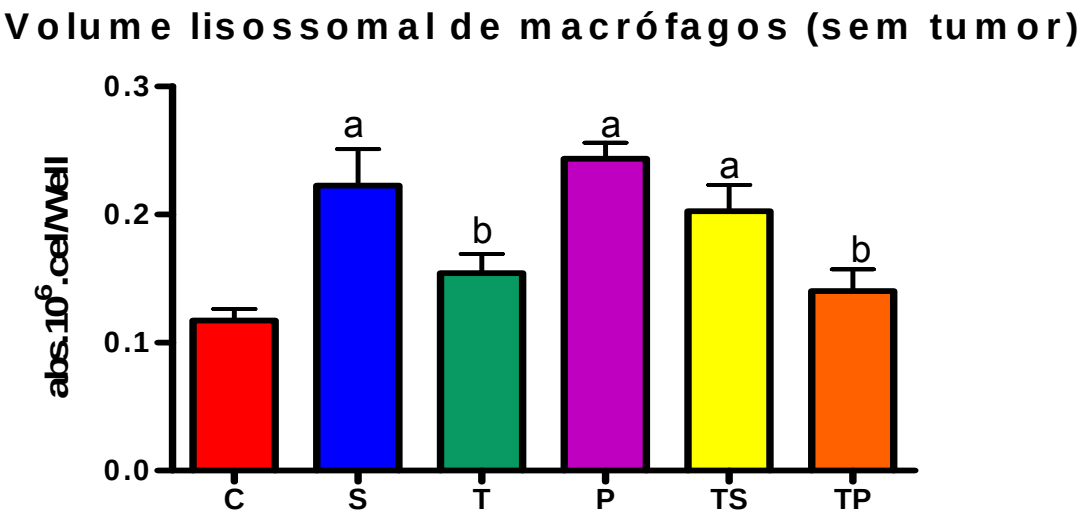


Figura 16: Volume lisossomal dos macrófagos dos animais sem tumor e sem suplementação (C), suplementados com gordura saturada (S), óleo de fígado de tubarão (T), óleo de peixe (P), óleo de fígado de tubarão associado a gordura saturada (TS) e óleo de fígado de tubarão associado ao óleo de peixe (TP). Os dados representam a média± EPM de 6 experimentos.

a - ($p<0,05$) vs C
b - ($p<0,05$) vs P

GRUPO	C	S	T	P	TS	TP
	0,117± 0,008	0,222± 0,028	0,154± 0,014	0,243± 0,0126	0,202± 0,020	0,140± 0,017

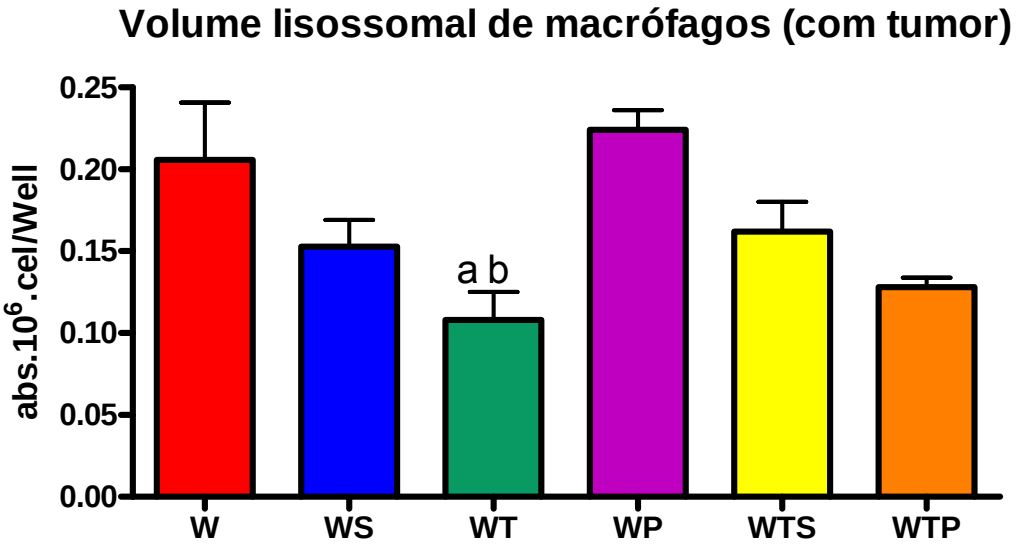


Figura 17: Volume lisossomal de macrófagos dos animais com tumor sem suplementação (W), suplementados com gordura saturada (WS), óleo de fígado de tubarão (WT), óleo de peixe (WP), óleo de fígado de tubarão associado a gordura saturada (WTS), e óleo de fígado de tubarão associado ao óleo de peixe (WTP). Os dados representam a média± EPM de 6 experimentos.

a - ($p<0,05$) vs W
b - ($p<0,05$) vs WP

GRUPO	W	WS	WT	WP	WTS	WTP
	0,205± 0,034	0,152± 0,016	0,108± 0,016	0,224± 0,012	0,162± 0,018	0,128± 0,005

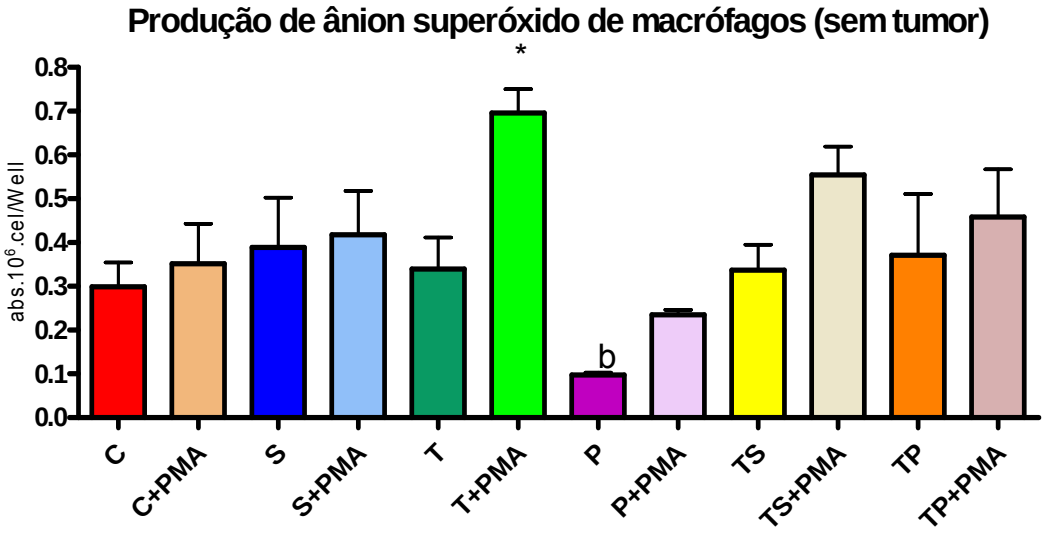


Figura 18: Produção de ânion superóxido pelos macrófagos peritoneais estimulados ou não com PMA, de ratos sem tumor sem suplementação (C), suplementados com gordura de coco (S), óleo de fígado de tubarão (T), óleo de peixe (P), óleo de fígado de tubarão associado a gordura saturada (TS), óleo de fígado de tubarão associado ao óleo de peixe (TP).Os dados representam a média± EPM de 6 experimentos.

* ($p < 0,05$) vs seu par sem estímulo
b- ($p<0,05$) vs C

GRUPO	C	C+PMA	S	S+PMA	T	T+PMA
	0,4378± 0,09751	0,8495± 0,02747	0,3889± 0,1136	0,4179± 0,09987	0,3363± 0,07260	0,6920± 0,05539

GRUPO	P	P+PMA	TS	TS+PMA	CTP	CTP+PMA
	0,1076± 0,01083	0,2353± 0,01118	0,3369± 0,05826	0,5540± 0,06522	0,3712± 0,1399	0,4583± 0,1089

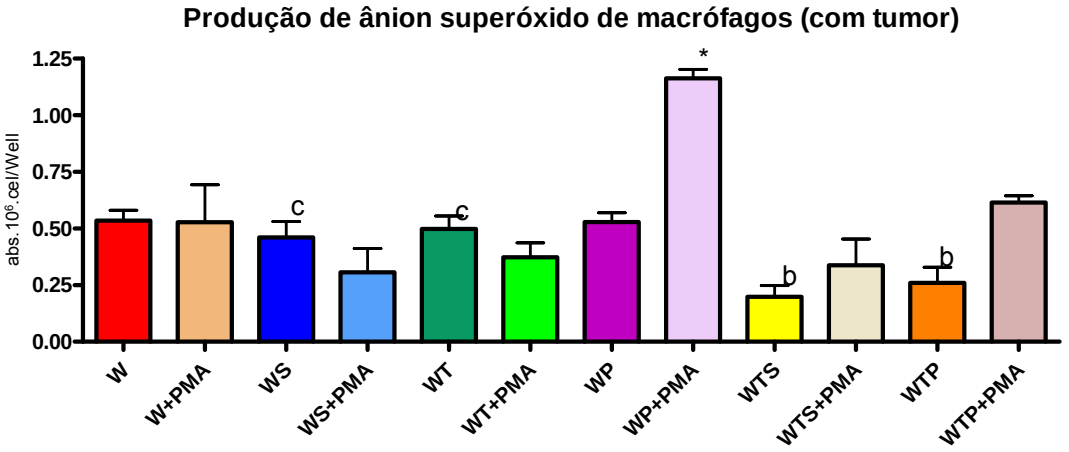


Figura 19: Produção de ânion superóxido de macrófagos peritoneais estimulados ou não com PMA, de ratos com tumor sem suplementação (W), suplementados com gordura saturada (WS), óleo de fígado de tubarão(T), óleo de peixe (P), óleo de fígado de tubarão associado a gordura saturada (WTS) e óleo de fígado de tubarão associado ao óleo de peixe (WTP). Os dados representam a média± EPM de 6 experimentos.

* (p< 0,05) vs seu par sem estímulo
b- (p<0,05) vs W
c- (p<0,05 vs WTS

GRUPO	W	W+PMA	WS	WS+PMA	WT	WT+PMA
	0,5345± 0,04581	0,5274± 0,1662	0,4605± 0,06984	0,3071± 0,1053	0,4980± 0,05800	0,3730± 0,06433

GRUPO	WP	WP+PMA	WTS	WTS+PMA	WTP	WTP+PMA
	0,5291± 0,03991	1,163± 0,03960	0,1983± 0,05044	0,3381± 0,1152	0,2601± 0,06932	0,6152± 0,02871

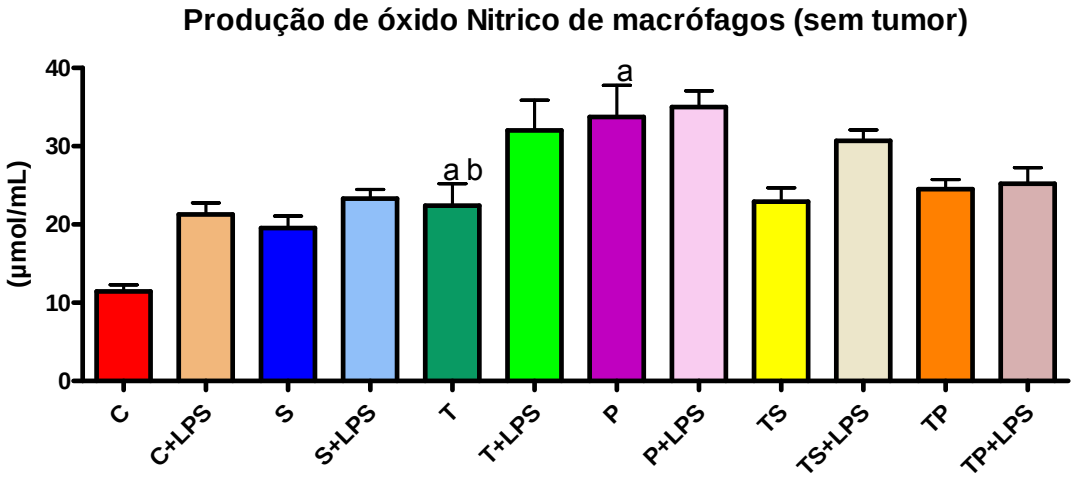


Figura 20: Produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais estimulados ou não com LPS, de ratos sem tumor sem suplementação (C), suplementados com gordura de coco (S), óleo de fígado de tubarão (T), óleo de peixe (P), óleo de fígado de tubarão associado a gordura saturada (TS), óleo de fígado de tubarão associado ao óleo de peixe (TP).Os dados representam a média± EPM de 6 experimentos.

a- (p<0,05) vs C
b- (p<0,05) vs P

GRUPO	C	C+LPS	S	S+LPS	T	T+LPS
	11,45± 0,8208	21,27± 1,458	19,55± 1,536	23,30± 1,179	22,42± 2,777	32,01± 3,884

GRUPO	P	P+LPS	TS	TS+LPS	CTP	CTP+LPS
	33,75± 4,029	35,00± 2,082	22,93± 1,770	30,68± 1,403	24,50± 1,258	25,22± 2,032

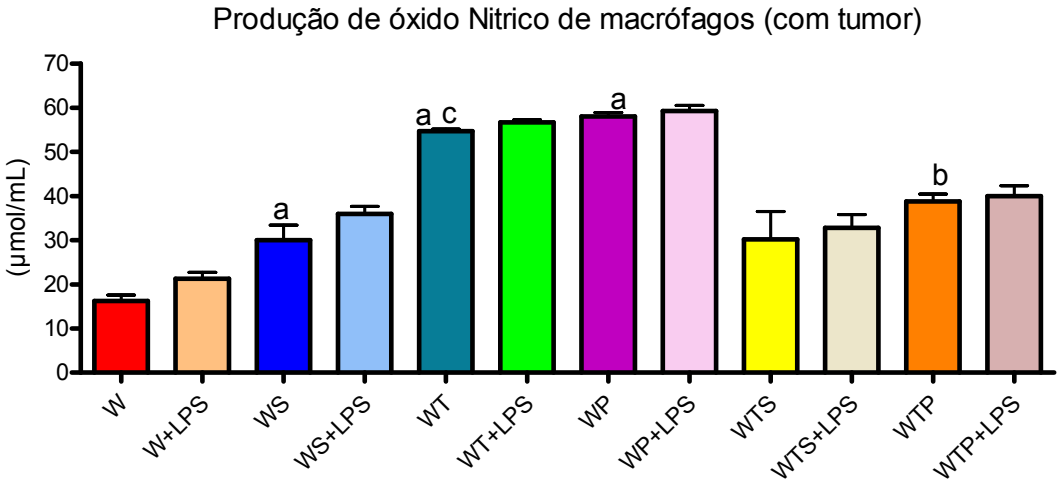


Figura 21: Produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais estimulados ou não com LPS, de ratos com tumor sem suplementação (W), suplementados com gordura saturada (WS), óleo de fígado de tubarão (T), óleo de peixe (P), óleo de fígado de tubarão associado a gordura saturada (WTS) e com óleo de fígado de tubarão associado ao óleo de peixe (WTP). Os dados representam a média ± EPM de 6 experimentos.

a- ($p<0,05$) vs W
b- ($p<0,05$) vs WP
c- ($p<0,05$ vs WTS

GRUPO	W	W+LPS	WS	WS+LPS	WT	WT+LPS
	16,25± 1,315	21,25± 1,493	30,03± 3,352	35,97± 1,662	54,71± 0,4702	56,67± 0,6021

GRUPO	WP	WP+LPS	WTS	WTS+LPS	WTP	WTP+LPS
	58,00± 0,9129	59,25± 1,250	30,21± 6,262	32,81± 2,955	38,75± 1,702	40,00± 2,345

7 DISCUSSÃO

Anualmente o câncer contribui com 7,1 milhões de mortes no mundo e estima-se que 30% de todos os casos de câncer ligados à dieta tem relação direta com o consumo excessivo de PUFAs n-6 e gordura saturada e da baixa ingestão de PUFAS n-3 (McENTEE; WHELAN, 2002). PUFA n-3 são utilizados usualmente sob a forma de óleo de peixe e em vários modelos animais foi demonstrado serem capazes de reduzirem o crescimento tumoral (TAPIERO, 2002; BOUDREAU, *et al*.,2001; ROBINSON, *et al*., 2001; PETRIK *et al*., 2000).

Nos anos 60 foi relatado que os esquimós apresentavam baixos índices de doenças cardiovasculares e de câncer (ROYNETTE *et al*. 2004). Em estudo elegante de epidemiologia e arqueológicos, Simopoulos (2002) relatou que nossos ancestrais alimentavam-se basicamente de folhas, grãos e animais marinhos, ricos em PUFAs n-3, e que os mesmos apresentavam baixa incidência de câncer. Como os ácidos graxos n-3 são hábeis em modificar a produção de eicosanóides, alterar a expressão gênica, metabolismo energético, função imunitária, fluidez de membranas, entre outras, talvez este seja o mecanismo envolvido neste fenômeno (CURI *et al*., 2002).

Nos últimos 20 anos grande interesse começou a ser despertado para os óleos vindos de diferentes animais marinhos. Dentre os óleos obtidos de pescados, o óleo de fígado de tubarão tem sido mostrado ter várias funções biológicas entre estas a antifúngica, tumoricida, inibição da neovascularização patogênica e estimulação da resposta imunológica e imunomodulação (BROHULT, *et al.,* 1986; REYNOLDS *et al,* 2000).

Diferentes estímulos promovem alterações no sistema imunológico, especialmente na quantidade e na função das células de defesa. O status nutricional e metabólico também altera este quadro em que os ácidos graxos modificam sua dinâmica e funcionalidade (CALDER, et al., 2002).

Vários trabalhos têm mostrado que óleo de peixe e óleo de tubarão tem propriedades imunomoduladoras e antitumorais, contudo não há relato de associação destes óleos em indivíduos com tumor. Portanto, este estudo objetivou investigar o efeito da associação destes dois óleos no cenário de ausência e presença de tumor.

Ao adicionarmos estes óleos na dieta dos animais poderia haver a possibilidade de ganho de peso, o qual tem sido associado ao desenvolvimento de várias doenças. Pode-se observar na figura 10 que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na evolução da massa corporal entre os grupos estudados. CLARKE (2000) em outro estudo demonstrou que animais suplementados com óleo de peixe tinham menor ganho de peso. Isto foi explicado pela ação dos ácidos graxos poliinsaturados, especialmente os da família n-3, sobre o metabolismo energético. Nossos dados diferem dos de Clarke pois este em seu modelo experimental, ofereceu um acréscimo de 8% de gordura, enquanto que a nossa suplementação representou um acréscimo de apenas 0,1% na dieta. Nossos dados corroboram dados obtidos por outros pesquisadores (BONATTO *et al*., 2004; TOGNI *et al*., 2003).

A suplementação com óleo de peixe desde o desmame até a fase adulta provocou (Figura 11) um crescimento 2,3 vezes menor quando comparado ao do grupo sem suplementação (W). Corroboramos aqui que pequeno acréscimo de óleo de Peixe na dieta, foi capaz de promover redução significativa da massa tumoral (TOGNI et al., 2003; BONATTO, 2003). A taxa de crescimento tumoral reduzida, observada nos grupos suplementados com óleo de peixe dá suporte e corrobora as observações de menor incidência de câncer em populações de japoneses, esquimós e canadenses, povos que consomem grande quantidade de gorduras de animais marinhos, ricos em PUFA n-3 (TAPIERO, H. *et al*, 2002; ROYNETTE *et al*, 2004).

A suplementação com óleo de fígado de tubarão (WT) promoveu efeito semelhante quando comparado ao dos indivíduos suplementados com óleo de peixe (WP). Isto corrobora e talvez seja resultado dos efeitos citotóxicos sobre as células tumorais como apontados por BROHULT *et al* (1986), que suplementaram pacientes, de duas as três vezes ao dia, onde cada cápsula continha 0,1g de alquilgliceróis, totalizando 0,6g ao dia antes da terapia radioativa. Eles demonstraram que houve regressão do crescimento tumoral, demonstrada por alteração no quociente entre estágios iniciais e avançados do tumor. A redução da massa tumoral, verificada no grupo portador de tumor suplementado com óleo de tubarão (WT), pode também ser sido provocada pela atividade inibidora de angiogênese do esqualeno e esqualamina, outras substancias de elevado interesse biológico encontradas no óleo

de fígado de Tubarão (TEICHER *et al*., 1998; SILLS JR *et al*., 1998; SCHILLER *et al*., 1999; MARWICK, 2001; WILLIAMS *et al,* 2001). É sabido que o crescimento progressivo e a disseminação de tumores sólidos dependem da formação de adequado suprimento sangüíneo (PIETRAS *et al.*, 2005). Ainda, o efeito tumoricida pode ter relação direta com a porção de PUFA n-3 encontrada no óleo de fígado de tubarão. PUFA n-3 aumentam o índice de apoptose em células tumorais (HENGARTNER, 2000). Quando óleo de fígado de tubarão foi associado com gordura de coco (WTS), o padrão de crescimento tumoral foi semelhante ao do grupo sem suplementação (W), onde sugerimos que a gordura saturada (WS) foi capaz de neutralizar o efeito antitumoral contido no óleo de fígado de tubarão. De fato no grupo WTS o tumor foi 1,7 vezes maior ($p<0,05$) quando comparado ao grupo WT e, 1,7 vezes menor que o do WS ($p<0,05$). Portanto, a pergunta que deve ser formulada é: qual será o mecanismo pelo qual o óleo de fígado de tubarão e óleo de peixe atuam para exercerem ação antitumoral? Uma hipótese possível seria pela ação direta sobre o tecido tumoral; a outra pela otimização do sistema imunológico; e a terceira por uma combinação de ambas. Neste estudo investigamos a segunda hipótese.

O produto capaz de exercer efeito biológico no organismo sem e com tumor acreditamos que deva ser os alquilgliceróis encontrados no óleo de fígado de tubarão. A análise da composição do óleo feita por GC-MS –Cromatografia Gasosa associada a Espectrometria de Massa e RMN ^{13}C-Ressonância Magnética Nuclear, mostrou que o alquilglicerol encontra-se presente mas ainda não fomos capazes de quantificar suas concentrações. Segundo os dados do fabricante, 30 a 50% da cápsula são representadas pelos alquilgliceróis.

Para prevenir a proliferação de células tumorais, o sistema imunitário deve reconhecer e destruir essas células. Contrariamente, o sistema imunitário não deve destruir células dos próprios tecidos corporais, o que desencadearia doença autoimune. Assim a regulação do reconhecimento pelas células do sistema imunitário tem papel importante nessas doenças e no câncer (DAS, 1994). Dentre estas células, os macrófagos participam de múltiplos eventos regulatórios em nosso organismo destacando-se a promoção do processo inflamatório, reparo e renovação de tecidos, ação tumoricida e microbicida e importante mediador da interação entre a imunidade inata e específica (WOODS, *et al*., 2000).

O crescimento tumoral mais pronunciado no grupo suplementado com gordura saturada (WS) corrobora os achados em que dietas ricas em gorduras saturadas tem significados clínicos elevados na promoção do desenvolvimento e crescimento de tumores (SAXE, *et al.,* 2001). As estimativas mostram que 30% a 60% de todos os cânceres em homens e mulheres, apresentam relação com a dieta, e alimentos ricos em gordura saturada foram associados maior incidência de câncer de cólon, próstata e mama (OTTO, 2002). O padrão lipídico da dieta pode levar a diversas alterações no organismo, como a modulação do tipo e quantidades de eicosanóides produzidos, modificações da expressão gênica, alterações do metabolismo energético, fluidez de membranas, produção de hormônios e particularmente ao presente projeto, a função imunológica (CURI *et al.* 2002). Para testar nossa hipótese de participação do sistema imunológico, via macrófago, na redução do crescimento tumoral, investigamos alguns parâmetros imunitários dessas células que participam no processo citocida, tais como a produção do ânion superóxido e do óxido nítrico, adesão, fagocitose, volume lisossomal em macrófagos peritoneais. Macrófagos desempenham papel relevante tanto na imunidade natural quanto na imunidade adaptativa e fazem parte da primeira linha de defesa do sistema imunológico (COUTINHO, 2004). Seu papel é relevante no processo inflamatório bem como no controle do surgimento de células tumorais (TANG*, et al.,* 2000). O índice fagocítico (Figura 14) no cenário de ausência de tumor foi mais pronunciado nos grupos suplementados com óleo de peixe (T), o qual foi 1,4 vezes maior quando comparado ao do grupo sem suplementação (C). Portanto, nossos dados *ex vivo* corroboram outros achados (CALDER *et al.,* 1990; BONATTO *et., al.,* 2004; PIZATO *et al*., 2005) onde macrófagos de ratos sem tumor, do grupo suplementado com óleo de peixe tem maior índice fagocítico quando comparados aos grupos suplementados com gordura de coco (saturada) e controle. Em contrapartida o óleo de fígado de tubarão não promoveu mudanças neste perfil. Este dado é diferente daqueles encontrados por outros pesquisadores (LINMAN, 1960; PEDRONO *et al*, 2004; BROHULT,1962; BROHULT *et al*, 1970; BROHULT *et al*, 1977; BROHULT *et al*, 1978; BROHULT *et al*, 1979; BROHULT *et al*, 1986) que demonstraram estimulação da fagocitose. Nos estudos desenvolvidos por OH & JADHAV (1994), a suplementação de alquilgliceróis na dieta de ratas fêmeas lactantes aumentou significativamente a concentração de éteres lipídicos no leite de forma dose-dependente. A concentração aumentada de

alquilgliceróis no leite induziu ao aumento de granulócitos no sangue periférico e de imunoglobulinas no plasma dos filhotes amamentados, sugerindo que os alquilgliceróis exercem função importante no desenvolvimento da resposta imunológica. A ativação da resposta imunológica por alquilgliceróis também foi verificada por HOMMA & YAMAMOTO (1990), que realizaram estudos *in vivo* administrando pequenas doses de alquilgliceróis a ratos e também em estudos *in vitro* com macrófagos peritoneais, obtidos de ratos, incubados com alquilgliceróis. Nestes estudos, foi observada significativa elevação da atividade fagocítica de macrófagos e esta atividade macrofágica estimulada era dependente da participação de células peritoneais não aderentes, ou seja, de linfócitos, sugerindo rápida comunicação de linfócitos e macrófagos durante o período de tratamento das células com alquilgliceróis. Explicamos esta diferença de nossos dados com os da literatura da resposta limitada do índice fagocítico verificada no grupo suplementado com óleo de fígado de tubarão, talvez pela concentração de alquilglicerois na emulsão lipídica, a presença ou não dos metoxilados, a dose utilizada nos experimentos ou a resposta da célula estudada em relação à suplementação e ao câncer. A associação da gordura saturada e óleo de fígado de tubarão não foi diferente da de seus pares isolados ($p>0,05$). Já a associação do óleo de fígado de tubarão com o óleo de peixe promoveu redução da fagocitose quando comparado à com óleo de peixe isolado ($p<0,05$), sendo similar a do óleo de fígado de tubarão sozinho ($p>0,05$). Sob a presença do tumor, o mesmo perfil de índice fagocitico encontrado nos animais suplementados com óleo de peixe se repetiu. A associação da dieta com óleo de fígado de tubarão e gordura saturada não promoveu alterações na fagocitose ($p>0,05$vs W, WT e WS). Em contrapartida a associação de óleo de peixe e óleo de fígado de tubarão levou a redução da fagocitose em relação ao grupo WP ($p<0,05$), mas não foi diferente daquela do animal sem tumor ($P>0,05$ vs TP).

Os resultados de WIESENFELD *et al.*, (2001) sugerem que a adição de ácidos graxos saturados aumentam a adesão de macrófagos e, com isso tem-se um índice de fagocitose menor, efeito oposto observado com a adição de ácidos graxos poliinsaturados. Entretanto nossos dados mostram que a suplementação com óleo de fígado de tubarão (T) incrementou a adesão em 1,4 vezes em relação ao grupo controle ($P<0,05$) e 2 vezes em relação a suplementação com gordura saturada ($P<0,05$), enquanto que a suplementação com óleo de peixe elevou em ainda mais a

adesão dos macrófagos sendo de 2,7 vezes em relação à do controle (P<0,05), 3,6 vezes à do grupo S e 2 vezes à do grupo T (P<0,05). A associação de óleo de fígado de tubarão e gordura saturada (TS) incrementou a adesão de macrófagos em relação ao grupo S em 2,7 vezes (P<0,05) e 1,4 vezes (P<0,05) em relação ao grupo tubarão (T). Interessantemente a associação com óleo de fígado de tubarão e óleo de peixe manteve a adesão similar à do grupo T (p<0,05 vs P).

Já na presença do câncer, apenas o óleo de fígado de tubarão favoreceu a maior adesão macrofágica, o que pode explicar o menor índice fagocitico no grupo WT verificado nos dados apresentados. A

adesão de macrófagos, é mediada principalmente pelas selectinas, proteínas transmembranas que desempenham um importante papel na ligação dos leucócitos ao endotélio vascular, permitindo que o leucócito migre da circulação para o tecido, participando também deste processo as integrinas que além de atuarem como moléculas de adesão, ativam vias de sinalização intracelular que comunicam para a célula as características da matriz extracelular a qual ela está ligada (ALBERTS, 2002). Os resultados acima, sugerem que houve maior expressão dessas moléculas de adesão quando se consideram os grupos com óleo de peixe, tubarão e associações.

Nos animais sem tumor, o volume lisossomal aumentou nos animais suplementados com óleo de peixe em relação ao grupo controle, porém não foi diferente do grupo suplementado com gordura saturada. Já o grupo suplementado com óleo de fígado de tubarão não apresentou diferença no volume lisossomal em relação ao do grupo controle, porém foi inferior ao do grupo suplementado com óleo de peixe. E quando se associa o óleo de tubarão com o óleo de peixe (TP), o óleo de tubarão parece inibir o efeito do óleo de peixe acarretando assim diminuição do volume lisossomal. Entretanto, quando se desafia o sistema imunológico com a presença do câncer, verifica-se que o volume lisossomal do grupo suplementado com o óleo de tubarão (WT) permaneceu reduzido em relação ao grupo Walker (W), e em relação ao grupo suplementado com óleo de peixe (WP) que ainda assim mantém padrão elevado. Uma possível explicação para o fato do óleo de peixe levar ao aumento deste parâmetro, pode ser pela habilidade das dietas ricas em n-3 podem atuarem diminuindo a produção do fator ativador de plaquetas (PAF), e a síntese de leucotrienos da série B4 (LTB4), os quais são considerados agentes

desgranuladores, podendo assim levar a maior retenção de lisossomos (CURI, *et al*., 2002).

Os alquilgliceróis podem se incorporar na membrana de vários tipos de células, e também em plaquetas. Estudos realizados com plaquetas de coelho e alquilgliceróis *in vitro* mostraram que estas moléculas inibiram parcialmente a liberação de PAF (fator ativador de plaquetas) e a estimulação das plaquetas (PEDRONO *et al.*, 2004), o que poderia explicar os resultados verificados no grupo tubarão. Não processamos as amostras há tempo para corroborar ou não estes achados.

Analisando a relação adesão, fagocitose e volume lisossomal, os dados nos sugerem que na ausência de tumor, o óleo de peixe é mais efetivo na imunoestimulação enquanto que as associações nos mostraram semelhante padrão de estimulação. O óleo de fígado de tubarão, por sua vez, quando isolado não foi capaz de levar a imunodepressão. Outro aspecto relevante é que a gordura saturada associada ao óleo de fígado de tubarão pareceu reprimir a atividade do mesmo, ao passo que o óleo de fígado de tubarão quando associado com ó óleo de peixe pareceu inibir o efeito desse último sobre maior estimulação da atividade imunológica nos parâmetros analisados.

A inibição provocada pelo óleo de fígado de tubarão sobre a atividade do óleo de peixe, quando associadas, nos sugere que existe interação entre os componentes químicos presentes nas emulsões lipídicas em estudo, havendo assim necessidade de maiores estudos a fim de se investigar de que forma isto ocorre e qual é sua repercussão. Em contrapartida, quando desafiamos o sistema imunitário com a presença do tumor, trazendo assim um cenário de estimulação para os macrófagos obtidos dos diversos grupos, o óleo de fígado de tubarão isoladamente elevou a adesão e reduziu o volume lisossomal. Isto pode ser um indicativo favorável em situações em que o sistema imunitário ativo leva a uma amplificação exacerbada da resposta imunológica comprometendo ainda mais o estado do indivíduo. Ainda, frente ao tumor, as associações não levaram a mudanças significativas.

Outro parâmetro analisado foi à produção de óxido nítrico pela sua relação direta e os seus efeitos sobre o desenvolvimento do câncer. Esta pequena molécula, talvez a menor produzida pelos mamíferos, é produzida por muitos tipos celulares e apresenta várias funções como a imunomodulação, ação antimicrobiana, antiparasitária e antitumoral (VALENTINE *et al*., 1998; SCHINI-KERTH, 1999; FLORA FILHO & ZILBERSTAIN, 2000; ABEYWARDENA & HEAD, 2001; PAVLICK *et al*., 2002). Sua formação ocorre através da reação identificada abaixo em que a L-arginina é transformada em um intermediário, a N - hidroxi-L-arginina com a presença de Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-hidrogênio (NADPH) e Ca^{+2} sendo necessário mais NADPH e O_2 para a formação de L-citrulina e NO (FLORA FILHO & ZILBERSTEIN, 2000).

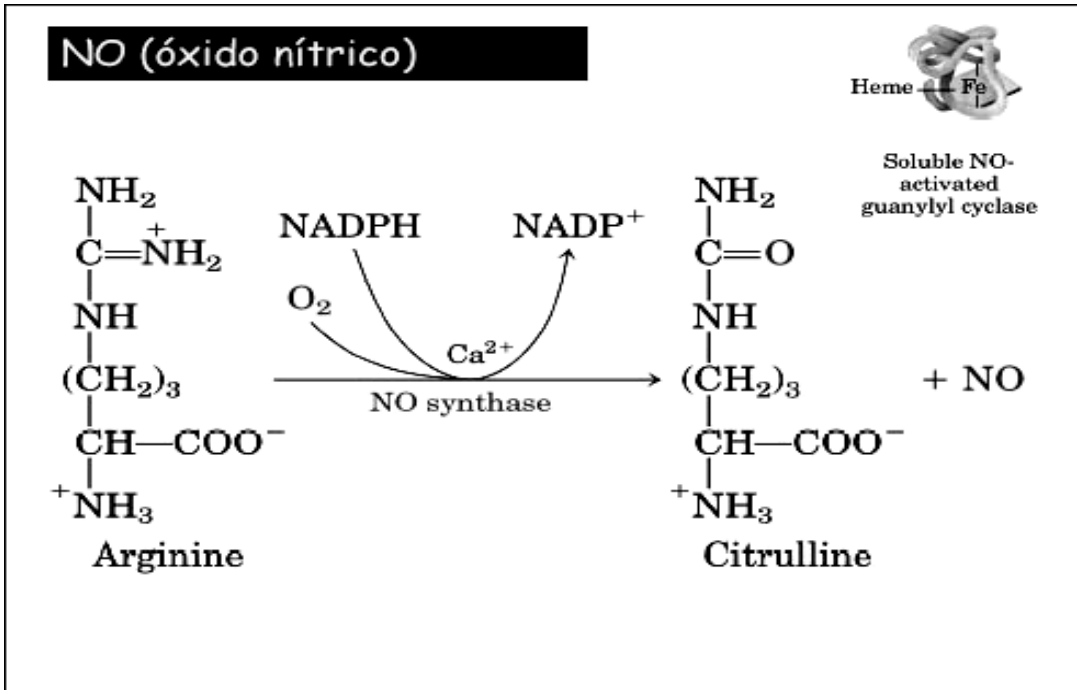


Figura 22: Produção de Óxido Nítrico a partir da Arginina.

A resposta frente ao tumor levou a maior produção de óxido nítrico em relação aos animais sem tumor, na maioria dos grupos. Quando comparado ao grupo

controle, o óleo de fígado de tubarão (T) e o óleo de peixe (P) apresentaram-se significativamente maiores (P<0,05), e T quando comparado a P, mostrou-se inferior (p<0,05). Já na presença do tumor, WS, WT e WP foram significativamente maiores (P<0,05) que o grupo controle, sendo que WT ainda mostrou-se significativamente maior que WTS. WTP foi significativamente menor (p<0,05) que WP. A taxa aumentada de óxido nítrico nos grupos suplementados com óleo de tubarão e óleo de peixe tem efeito sobre o menor crescimento da massa tumoral pelo possível efeito modulador da angiogênese e nos mecanismos de defesas contra microorganismos e tumores (COSTA, *et al.,* 2003), e a ação anti-tumoral depende das quantidades geradas e da interação das células do hospedeiro com o tumor. Uma explicação para que o NO esteja aumentado nos grupos suplementados com óleo de peixe e de tubarão é de que as enzimas que resultam na síntese de ânions superóxido, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico são reguladas por eicosanóides, citocinas e proteína quinase C. É sabido que os PUFA n-3 afetam a produção de eicosanóides e citocinas, as quais podem afetar a produção das espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico por macrófagos, estes compostos (ROS e NO) portanto, são capazes de regular as atividades citotóxicas dos macrófagos (CALDER, 1996; MILES *et al*., 1998; CALDER, 2002). Vale ressaltar que a proteína quinase C é um segmento de pesquisa que deve ser averiguado, isto porque mudanças na atividade dessa enzima acarretam em fosforilação inapropriada de resíduos de tirosina, o que contribui para o desenvolvimento de várias patologias como neoplasias, diabetes e doenças resultantes de defeitos imunológicos. Como exemplo, em uma transformação oncogênica ou estimulação de fatores de crescimento, a concentração de proteínas fosforiladas em resíduos de tirosina aumentam de 1-2% na célula, podendo levar a graves doenças como o câncer (AOYAMA,*et al*., 2003). Os metabólitos reativos de oxigênio, tais como o superóxido (O_2^-), o radical hidroxil (OH^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), são importantes mediadores de danos em diversos tecidos e órgãos, e os mesmos podem ser gerados no citoplasma, na mitocôndria ou no núcleo das células (ANTUNES & BIANCHI,2004). Entretanto, cabe salientar que o aumento da produção de radicais livres deve ser acompanhado de uma eficiência na maquinaria química e enzimática disponibilizada pelo organismo. Já que a concentrações em excesso atuam diretamente sobre células da periferia podendo levar a alterações nas biomoléculas celulares, gerando assim neoplasias. Nesse

sentido, a dieta enquanto adequada no que diz respeito ao consumo de α-tocoferol (vitamina E), β-caroteno, selênio, acido ascórbico (vitamina C), glutationa reduzida (GSH) diminuem a ação tóxicas das EROs. Quando expostos, os organismos sintetizam enzimas antioxidantes como as superoxido dismutase (CuZn-SOD - citosólica e extracelular; Mn-SOD - mitocondrial), catalase (hemeenzima) e glutationa peroxidase (GPX - dependentes e não-dependentes de selênio) para decomporem O_2^-, H_2O_2 e lipoperóxidos (YU, 1994).

Nossos resultados indicam que a produção de ânion superóxido nos animais sem tumor do grupo (C) foi reduzida quando comparada à de outros grupos, ocorrendo ainda destaque da resposta do grupo (T) frente a estimulação com PMA. Outro fato marcante, foi a produção significativamente maior ($P < 0.01$) de ânion superóxido do grupo T+PMA em relação ao C+PMA. Já nos grupos com tumor, a resposta dos macrófagos do grupo (P) estimulado com o PMA foi exacerbada.

De fato, as investigações sobre a influência de dietas ricas em óleo de peixe sobre a produção de ânion superóxido e óxido nítrico apresentam resultados contraditórios, e a possível divergência encontra-se nos diferentes protocolos utilizados. Estes, variam quanto às espécies utilizadas ou a origem das células estudadas, local de onde é extraída a célula, o estado de diferenciação e ativação celular, o estímulo usado para excitar a produção da substância desejada, o meio de cultura e as condições usadas no cultivo, a duração do tempo de suplementação, e as quantidades de antioxidantes presentes na dieta. Interessantemente, na ausência de tumor a produção de óxido nítrico foi mais elevada nos grupos suplementados com óleo de peixe (P) e óleo de peixe e óleo de fígado de tubarão estimulados com LPS (P+LPS e T +LPS). Já a produção de ânion superóxido foi marcadamente maior no grupo suplementado com óleo de fígado de tubarão estimulado com PMA (T+PMA).

Portanto, tanto a produção de óxido nítrico, quanto a produção de ânion superóxido a suplementação com óleo de fígado de tubarão e estimulado causou efeito direto sobre o aumento desses parâmetros, enquanto que as associações não promoveram mudanças significativas.Sob o cenário do tumor, o padrão aumentado de produção de ânion superóxido é encontrado no grupo suplementado com óleo de peixe e estimulado com PMA (P+PMA), enquanto que repetidamente a produção de

óxido nítrico nos grupos WT, WT+LPS , WP e WP+LPS encontra-se aumentada, portanto semelhante aos animais sem tumor.

8 CONCLUSÃO

As suplementações com óleo de peixe (WP) e óleo de fígado de tubarão (WT) reduziram a taxa de crescimento tumoral e a associação de ambas suplementações não teve efeito aditivo.

Quanto à função macrofágica, o efeito das diferentes suplementações e suas associações no cenário de ausência e presença de tumor promoveu diferentes efeitos. Na ausência de tumor a suplementação com óleo de peixe incrementou a adesão, fagocitose e volume lisossomal. O óleo de fígado de tubarão incrementou apenas a adesão. Na presença de tumor, os macrófagos dos animais com óleo de peixe tiveram redução da adesão, mas elevou-se a fagocitose e volume lisossomal, significando não alteração da maquinaria fagocítica. Já nos animais com óleo de tubarão, apenas a adesão elevou-se. A associação de ambas as dietas não causou efeito aditivo na maquinaria fagocítica. A produção de ânion superóxido pelos macrófagos dos animais sem tumor foi maior nos suplementados com óleo de fígado de tubarão e na presença de tumor os suplementados com óleo de peixe foram os que mais aumentaram. A associação de ambos óleos não promoveu maior incremento. Finalmente, a produção de óxido nítrico foi maior tanto com óleo de peixe e óleo de tubarão e novamente a associação de ambas não causou efeito aditivo.

Em suma, nossos dados sugerem que óleo de fígado de tubarão e óleo de peixe tem efeito anti-tumoral contudo sua associação não incrementou a redução da massa tumoral. No cenário de ausência ou presença de tumor ambos tem ação imunomoduladora, contudo comparativamente o óleo de peixe foi mais efetivo. A participação do sistema imunitário via macrófago no combate ao desenvolvimento tumoral não pode ser descartado por estes dados, contudo acreditamos que o macrófago deva ter papel coadjuvante.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Imunologia Celular e Molecular**, 4ªed., Editora Revinter, Rio de Janeiro, 2005.

ABEYWARDENA, M.Y.; HEAD, R.J. Longchain n-3 polyunsaturated fatty acids and blood vessel function. **Cardiovascular Res**. 52: 361-371, 2001.

ADAMS, D.O.; HAMILTON, T.A. Molecular basis of macrophage activation: diversity and its origins. In: The natural immune system: The macrophage. **Eds CE Lewia & JOD McGee, IRL Press, Oxford, New York, Tokyo**, pp 75-105, 1992.

AHMED, A.A.; HOLUB,B.J. A alteração e a recuperação do tempo de sangramento, da aglutinação plaquetária e da composição dos ácidos graxos de fosfolípides individuais nas plaquetas de seres humanos recebendo suplemento de óleo de fígado de bacalhau. **Lipids**, v. 19, p 617-624, 1984.

ALBERTS, B. **Biologia celular da célula**.Artmed, Porto Alegre, 2004.

ALMEIDA, E. T. ; MAURO, A.E. ; SANTANA, A.M. ; NETTO, A.V.G. ; CARLOS, I.Z. : Emprego de compostos organometalicos mononucleares de Paládio (II) na ativação de macrófagos peritoneais de camundongos. **Quim. Nova***,* Vol. 28, No. 3, 405-408, 2005

ANDRADE, J.N.; NETO, E.M.C. Primeiro registro de utilização medicinal de recursos pesqueiros na cidade de São Félix, Estado da Bahia, Brasil. **Acta Sci.Biol, Sci**, v.2, n 27, p. 177-83, 2005.

ANTUNES, L.M.G.; BIANCHI, M. L. P. Antioxidantes da dieta como inibidores da nefrotoxicidade induzida pelo antitumoral cisplatina. **Revista de Nutrição**, 17(1):89-96, jan./mar., 2004

AOYAMA,H.;SILVA, T.M.A.; MIRANDAM.A.; FERREIRA, C.V. Proteínas tirosina fosfatases: propriedades e funções biológicas. **Quim.Nova**, v.26, n.6, p.896-900, 2003.

ARDAWI, M.S.M.& NEWSHOLME, E. A. Glutamine metabolism in lymphocytes of the rat. **Biochem. J**., 212: 835-42, 1993.

ARONSON, W.J.; TYMCHUK, C.N.; ELASHOFF, R.M.; McBRIDE, W.H., McLEAN, C.; WANG, H.; HEBER, D.: Decreased growth of human prostate LNCaP tumors in SCID mice fed a lowfat, soy protein diet with isoflavones. **Nutr Cancer** 1999; 35(2): 130-6

AUGER, M. J.; ROSS, J.A. The biology of the macrophage. In: Lewis, C.E.; McGee, J. O.D. (Eds). The natural immune system: The macrophage. **Oxford**: IRL Press, 1992.p. 1-74.

BABIOR, B.M. The respiratory burst of phagocytes. **J. Ciln Inverst** 73:599-601, 1984.

BAGGETTO, L.C. Biochemical genetic and metabolic adaptation of tumor cells that express the typical multidrug resistance phenotype. Reversion by new therapies. **J Bioenerg Biomembr** 29:401-13, 1997.

BECKNER, M.; STRACKE, M.L.; LIOTTA, L.A. SCHIFFMANN, E. Glycolysis as primary energy source in tumor cell chemotaxis. **J Natl Cancer** Inst 82:1836-40, 1990.

BENZI,G.Aerobic performance and oxygen free radicals. The **J.Sports Med.Physical Fitness.** 33: 205-222, 1993.

BONATTO, S.J.R. Avaliação da Resposta Imunitária em macrófagos de ratos F1, portadores de tumor de Walker 256, suplementados cronicamente com óleo de peixe. Tese de Mestrado, UFPR, Curitiba, 2003.

BOONEY, R.J.;DAVES, P. Possible autorregulatory functions of the secretory products of mononuclear phagocytes. **Contemp Top Immunobio** 14: 199-233, 1984.

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

BRADE, V.B.C. Synthesis and release of complement components by macrophages. In: Mononuclear phagocytes: Funcional Aspectos. Ed R Van Furth **Martinus Nijhoff Boston**, 1980.

BRANDT,C.T.;LEITE,C.R.C.;MANHÃESDECASTRO,R.;FILHO,C.B.;CASTRO,C.M.M.B. Aderência e atividade microbicida de monócitos em portadores de esquistossomose mansônica na forma hepatoesplênica cirúrgica. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 2, n. 18, p. 243, 2003.

BROHULT, A.; BROHULT, J.; BROHULT, S. Bioquemical effects of alkoxyglycerois and their use in cancer therapy. **Acta Chem Scand** 1970:24, 730.

BROHULT, A.; BROHULT, J.; BROHULT, S.; JOELSSON, I. Reduced mortality in cancer patients after administration of alkoxyglycerols. **Acta Obste Gynecol Scand** 65: 779-785, 1986.

BROHULT, A. Alkoxyglycerol-esters in irradiation treatment. **Nature**, v. 193, n. 4822, 1962.

BROHULT, A.; BROHULT, J.; BROHULT, S. JOELSSON, I. Effect of alkoxyglycerols on the frequency of injuries following radiation therapy for carcinoma of the uterine cervix. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 56, p. 441-448, 1977.

CALDER, P.C. Effects os fatty acids and dietary lipids on cells of the immune system. **Proc Nutr** Soc. 55: 127-150, 1996.

CALDER, P.C. N-3 Polyunsaturated fatty acids and mononuclear phagocyte function. Medicinal Fatty Acids in Inflammation. **Edites by J.Kremer**, 1998.

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

CALDER, P.C.; BOND, J.A.; HARVEY, D.J.; GORDON, S.; NEWSHOLME, E.A. Uptake and incorporation of saturated and unsaturated fatty acids into macrophage lipids and their effects upon macrophage adhesion and phagocytosis. **Biochem J**. 296: 807-14, 1990.

CALDER , P.C.; YAQOOB, P.; THIES, F.; WALLACE, F.A.; MILES, E.A. Fatty acids and lymphocyte functions. **British Journal of Nutrition**, S31-S48, 2002.

CERAMI, A.B. The role of cachetin/ TNF in autoimmunity. **Clin Exp Immunol** 86: 01-17, 1988.

CIBEIRA, G.H.; GUARAGNA, R.M. Lipídio, fator de risco e prevenção do câncer de mama. Ver. **Nutr**.,v.1, n.19, p. 65-75, 2006.

CLARKE, S.D. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a mechanism to improve energy balance and insulin resistance. **Br J Nutr**., 83: S 59-66, 2000.

COOPER, A.L.; GIBBONS, L.; HORAN, M.A.; LITTLE, R.A.; ROTHWELL, N.J. Effect of dietary fish oil supplementation on fever and cytokine production in human volunteers. **Clin Nutrition**, 12: 321-328, 1993.

COSTA, M.T.; FABENI, R.C.; APTEKMANN, K.P.; MACHADO, R.R. Diferentes papéis do óxido nítrico com ênfase nas neoplasias.**Ciências Rurais**. 33: 967-974, 2003.

COUTINHO,M.M. Efeito do treinamento moderado sobre o metabolismo de macrófagos de ratos envelhecidos. Tese de Doutorado, USP, São Paulo, 2004.

CURI, R. **Glutamina, metabolismo e aplicações clínicas.** Editora Sprint, Rio de Janeiro, 2000.

CURI, R.; POMPÉIA,C.; MIYASAKA,C.K.; PROCÓPIO, J. **ENTENDENDO A GORDURA.** Editora Manole, São Paulo, 2002.

DAEMEN, T. A potencial role of macrophage activation in the treatment of cancer. **Oncol. Hematol**, 44: 143-161, 2002.

DANG, C.V.;LEWIS, B.C.; DOLDE, C.; DANG, G.; SHIM, H. Oncogenes in tumor metabolism, tumorigenesis and apoptosis. **J Bioenerg biomembr** 29: 345-354, 1997.

DAS,U.N. Beneficial effect of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in the management of systemic lupus erythematosus and its relationship to the cytokine netwoek. **Prostagl, Leukot and Essential Fatty Acids**, 51: 207-2013, 1994.

DINARELLO, C.A. Na update on human interleukin-1: from molecular biology to clinical relevance. **J Clin Immunol** 5: 287-97, 1985.

DUNN, T.B.Morphology and histogenesis of mammary tumors. A. **A.S. Publication**, v. 22, p. 13-38, 1945.

DUSSE, L.M.S.;VIEIRA,L.M.;CARVALHO,M.G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.** 39: 343-350, 2003.

EARLE, W.R. A study of the Walker rat mammary carcinoma 2567 in vivo and in vitro. Am. **J. Cancer,** v.24,p. 566-612,1935.

ERWIG, L.P.; KLUTH, D.C.; REES, A.J. Initial cytokine exposure determines function of macrophages and renders them unresponsive to other cytokines. **J. Immunol.,** v. 161, n.4, p.1983-1998, 1998.

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

FERNANDES, L.C. Alterações metabólicas causadas pelo tumor de Walker 256 no músculo esquelético, linfócitos e macrófagos de ratos. Tese de Doutirado, USP, São Paulo, 1995.

FETT, C.A.; PETRICIO, A.; MAESTÁ, N.; CORREA, C.; CROCCI, A. J.; BURINI, R.C. Suplementação de Ácidos Graxos Ômega-3 ou Triglicerídios de Cadeia Média para Indivíduos em Treinamento de Força. **Motriz,** v. 7, n. 2, p. 83-9, 2001.

FLORA FILHO, R. & ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e função. **Rev Ass Méd Brasil**, v.3, n 46, p. 265-271, 2000.

FONSECA, S.M.; MACHADO, R.C.L.; PAIVA, D.R.S.; ALMEIDA E.P.M.; MASSUNAGA, V.M.; JUNIOR, W.R.; KOIKE, C.T.; TADOKORO, H. **Manual de quimioterapia Antineoplásica.** São Paulo, 2000.

GORDON, S.; TODD, C.Z. In vitro synthesis and secretion of lysozymes by mononuclear phagocytes. **J Exp Med** 139: 1228-48, 1974.

GARÓCOLO, A.; AVESANI, C.M.; CAMARGO, K.G.; BARROS, M.E.; SILVA, S.R.J.; TADDEI, J.A.A.C.; SIGULEM, D.M.Dieta e câncer: um enfoque epidemiológico. **Revista de nutrição**, v.4, n 17, p 419-505,2004.

GUAITANI, A., et al. Two lines of Walker carcinoma 256: their peculiarities and different interactions with the host. **Tumor**i, v. 69, p.1-9, 1983.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M.C. Free Radical in Biology and Medicine. 2º ed. **Oxford, University Press**. 1989. 543pp.

HANASH, K. A.; AL-OTHAIMEEN, A.; KATTAN, S.; LINDSTEDT, E.; AL-ZAHRANI, H.; MERDAD, T.; PERACHA, A.; KARDAR, A.H.; ASLAM, M.; AL-AKKAD, A.: Prostatic carcinoma: a nutritional disease? Conflicting data from the kingdom of Saudi Arabia**. J Urol** 2000; 164 (5): 1570-2.

HE, K.; RIMM, E.B.; MERCHANT, A.; ROSNER, B.A.; STAMPFER, M.J.; WILLETT, W.C.; ASCHERIO, A. Fish consumption and risk of stroke in men. **JAMA,** 288: 3130-3136, 2002.

HENGARTNER, M. The biochemistry of apoptosis. Insight review articles. **Nature**. 407: 769-816,2000.

HILDEBRAND, R.; JANSEN, C.; WOLF, G. Transforming growth factor b stimulates urokinases expression in tumor-associated macrophages of the breast. **Lab Invest**. 78: 59, 1998.

HOMMA, S.; YAMAMOTO, N. Activation process of macrophages after in vitro treatment of mouse lymphocytes with dodecylglycerol. **Clin. Exp. Immunol**., v. 79, p. 307-313, 1990

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

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica.** Guanabara Koogan, Rio de. Janeiro, 1999.

KLIMP, A.H.; VRIES, E.G.E.; SCHERPHOF, G.L.; DAEMEN, T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. **Oncol. Hematol**., 44: 143-161, 2002.

KROTKIEWSKI, M.; PRZYBYSZEWSKA,M., JANIK, P. Cytostatic and cytotoxic effects of alkylglycerols (Ecomer). **Med Sci Monit**. 2003 Nov;9(11):PI131-5

KUNKEL, S.L.; STRIETES, R.M. CHENSUE, S.W. BASHA, M.; STANDFORD, T.; HAM, J.; REMICK, D.G. Tumor necrosis factor a, interleukin-8 and chemotactic cytokines. **Prog Clin Biol Res** 349: 433-44, 1990.

LARSER, C.G., ANDERSON, A.O.; APPELA, E.; OPPENCHEIN, J.J.; MATSUSHIMA, K. The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotatic for T-lymphocytes. **Science** 243: -1464-6, 1989.

LEEK, R.D.; LEWIS, C.E.; WHITEHOUSE, R.; GREENALL, M.; CLARKE, J.; HARRIS, A.L. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. **Cancer Res**. 56: 4525, 1996

LEHNINGER, A.NELSON, D.L., COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. Sarvier, São Paulo, 2000.

LEWIS, C.E.; McCRACKEN, D.; LING, R.; RICHARDS, P.S.; McCARTHY, S.P.; McGee, J.O. Analyses of cytokine release at the single cell level: use of the reverse haemolytic plaque assay**. Immunol Rev** 119: 23-39, 1991.

LIKELY, G.D.; SANFORD, K.K.; EARLE, W.R. Further studies on de proliferation in vitro of single isolated tissue cells. **J. Nat. Cancer Inst**. , v. 13, p. 177-184, 1952.

LINMAN, J.W. Hemopoietic effects of glyceryl ethers. III. Inactivity of selachyl alcohol. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med**. v. 104, p. 703-706, 1960.

MADHAVI,N.;DAS, U.N.;PRABHA,P.S.;KUMAR,G.S.;KORATKAR,R.;SAGAR,P.S. Suppression of human T-cell growth in vitro by cis-unsaturated fatty acids: relationship to free radicals and lipid peroxidation. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.** 1994 Jul;51(1):33-40

MANTOVANI, A.;SOZZANI, S.; LOCATI, M.; PAOLA, A.; SICA, A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Istituto di Ricerche Farmacologiche**, n.23,p.549-555, 2002.

MARWICK, C. Natural compounds show antiangiogenic activity. **Journal of the National Cancer Institute**, v.. 93, n.. 22, p. 1685, November 21, 2001.

MASCARENHAS, A.G.M.; DONZELE, J.L.; OLIVEIRA, R.F.M.; FEREIRA, A.S.; TAVARES, S.L.; KILL, J.L. Influência da fonte de lipídeo e do nível de energia digestível sobre níveis plasmáticos de colesterol e lipoproteínas em suínos machos inteiros. **Fapemig**, 32: 27-33, 1998.

McCOY, T. A. & NEUMAN, R.E. The cultivation of Walker carcinoma 256 in vitro from cell suspensions. J. Nat. **Cancer Inst**., v. 16, p. 1221-1229, 1956.

McENTEE,M.F.; WHELAN, J. Dietary polyunsaturated fatty acids and colorectal neoplasia. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 56:8, 380-387,2002.

MIDER, G.B.; TESLUK, H.; MORTON, J.J. Effects of Walker carcinoma 256 on food intake, body weight and nitrogen metabolism of growing rats. **Acta Unio Internat. Cancr. Louvain**, v. 6,p. 409-420, 1948.

MILES, E.A.; CALDER, P.C. Modulation of immune function by dietary fatty acids. Proc. **Nutrition Society**, 57: 277-292

MONDINI, L.; MONTEIRO, C.A.:Mudanças no padrão de alimentação da população urbana brasileira. **Saúde Pública**, 28(6): 433-9, 1994.

MOTTONEN,M.;UHARI,M.Use of micronutrients and alternative drugs by children with acute lymphoblastic leukemia. **Med Pediatr Oncol.** 1997;28: 205-208.

NATHAN, C.F.; MURRAY,H.W.; COHN, Z.A. The macrophage na effector cell. N Engl. **J Med** 303:622-6, 1980.

NATHAN, C.F. Secretory products of macrophages. **J Clin Invest** 79: 319-320, 1987.

NELSON, P.S., MICHAEL, K. B.: Chemoprevention of Prostate Carcinoma. **Urology International**. 4 (4): 7-9, 1985.

NETTLETON, J.A. Omega-3 fatty acids and health. **Chapman & Hall. New York**, 1995.

OH, S.Y.; JADHAV, L.S. Effects of dietary alkylglycerols in lactating rats on immune responses in pups. **Pedriatic Research**, v. 36, n. 3, p. 300-305, 1994

OLIVEIRA, A.; SILVA, C. Fator Inibitório de Migração de Macrófagos (MIF)-Um regulador da Imunidade Inata. Licenciatura em Biologia, Universidade de Évora, Évora, 2004.

OTTO,I. **Aspectos genéticos do câncer.**Popular,São Paulo, 2002.

PAVLICK,K.P.; LAROUX,F.S; FUSELER,J.; WOLF,R.E.; GRAY,L.; HOFFMAN,J.; GRISHAM,M.B.Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease. **Free Radic Biol Med.** 2002 Aug 1;33(3):311-22.

PEDRONO, F.; CHEMINADE, C.; LEGRAND, A.B. Natural 1-O-alkylglycerols reduced platelet-activating factor-induced released of [3H]-serotonin in rabbit platelets. **Prostaglandins, Leucotrienes and Essential Fatty Acids,** v. 71, p. 19-23, 2004.

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

PEREIRA, B. Exercicio fisico como pró-oxidante. **Rev. Paul**. Ed. Fis. 8:77-89, 1994.

PEREIRA , B. Radicais livres de oxigênio e sua importância para funcionalidade imunológica**. Motrix**, v.2, p 71-89, 1996.

PICK, E. ;MIZEL, M. Rapid micro assay for the measurement of super oxide and hydrogen peroxide production by macrophages using an automatic enzyme immunoassay reader. **Journal of Immunological Methods,** v. 46, p.211-26, 1981.

PIETRAS, R.J.;WEINBERG,O.K. Antiangiogenic Steroids in Human Cancer Therapy. **David Geffen School of Medicine at UCLA**, v.2, p.49-57,2005.

PIPE, R.K.; COLES, J.A.; FARLEY, S.R. Assays for measuring immune response in the mussel *Mytilus edulis*. Tech. **Fish Immunol**., 4: 93-100, 1995.

PIZATO, N.M.P. Efeito da dieta com diferentes proporçõesde ácidos graxos n-6:n-3 sobre o crescimento tumoral, caquexia e sistema imunitário em ratos portadores de tumor de Walker 256. UFPR, 2005.

PRIDZ, H.A.A. Tissue thromboplastin activity of isolated human monocytes. **Thromb Haemostas** 39:582-91, 1978.

QUEIROZ, C.E.S.; SOARES,J.A.;LEONARDO,R.T; QUEIROZ, J.A.M. Indução da produção de óxido nítrico em cultura de macrófagos peritoneais de Camundongos pelos cimentos endodônticos sealapex e Topseal. **Sitientibu**s, v.34, p.145-156, 2006.

RAPOLEE, D.W.Z. Secretory products of phagocytes. **Curr Opinion Immunol** 1:47-55, 1988.

REITER, R.E.; DEKARNION, J.B.: Epidemiology, etiology, and prevention of prostate cancer. In: Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ (eds). Campbell`s Urology (CDRom), 8 edition. **Elsevier Science**, USA; 2003

REYNOLDS, S.; CEDERBERG, H.; CHAKRABARTY, S. Inhibitory effect of 1-O(2 methoxy) hexadecyl glycerol and phenylbutyrate on the malignant properties of human prostate cancer cells. **Clinical & Experimental Metastasis,** v. 18, p. 309-312, 2000.

ROBBINS. **Patologia estrutural e funcional**. 2ª ed., Editora Guanabara Koogan,Rio de Janeiro, 1996.

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 Nutr. Jul**; 131 (7): 2021-7, 2001.

ROITT, I.M. ; BROSTOFF, J. ; MALE, D. **Imunology.** 5 ª ed., Editora Manole Ltda, São Paulo, 1999.

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

ROTMAN, F. **Gravidez sem Risco**. Rio de Janeiro: Record, 1999.

SAMMUELSON, B.; GOLDYNE, M.; GRANSTROM, E., HAMBERG, M.; HAMARSTROM, S. M.C. Prostaglandinas and thromboxanes. Ann Ver **Bioch** 47: 977-1029, 1978.

SAXE, G.A; HEBERT, J.R, CARMODY, J.F., KABAT-ZINN, ROSENZWEIG, P.H., JARZOBSKI, D., REED, G.W., BLUTE, R.D.: Can diet in conjunction with stress reduction affect the rate of increase in prostate specif antigen after biochemical recurrence of prostate cancer? **J Urol** 2001; 166 (6): 2202-7

SCHILLER, J.H.; BITTNER, G. Potentiation of platinum antitumor effects in human lung tumor xenografts by the angiogenesis inhibitor squalamine: effects on tumor neovascularization. **Clinical Cancer Research**, v. 5, p. 4287-4294, 1999.

SHINI-KERTH, V.B. Vascular biosynthesis of nitric oxide: effects on homeostasis and fibrinolysis. **Transfus Clin Biol**., 6: 355-363, 1999.

SHUURMAN, A.G.; VAN DER BRANDT, P.A.; DORANT, E.; BRANTS, H.; GOLBOHM, R.P.: Association of energy and fat intake with prostate carcinoma risk. Results from The Netherlands Cohort Study. **Cancer** 1999; 86 (6): 1019-27

SILLS JR, A.K.; WILLIAMS, J.I.; TYLER, B.M.; EPSTEIN, D.S.; SIPOS, E.P.; DAVIS, J.D.; MCLANE, M.P.; PITCHFORD, S.; CHESHIRE, K.; GANNON, F.H.; KINNEY, W.A.; CHAO, T.L.; DONOWITZ, M.; LATERRA, J.; ZASLOFF, M.; BREM, H. Squalamine inhibits angiogenesis and solid tumor growth in vivo and perturbs embryonic vasculature. **Cancer Research**, v. 58, p. 2784-2792, 1998.

SILVERSTEIN, E.; FRIEDLAND, j.s.c. Angiotensin converting enzyme: induction in rabbit alveolar macrophages and human monocytes in culture. Adv. Exp. **Med. Biol**. 121: 149-156, 1979.

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

SOUZA,N.E.;MATSUSHITA,M.;FRANCO,M.R.B.;PRADO,I.N.; VISENTAINER,J.V. Composição química, perfil de ácidos graxos e quantificação dos ácidos α-linolénico, eicosapentaenóico e docosahexaenóico em vísceras de tilápias (Oreochromis niloticus). **Acta Sci. Technol**., v. 27, n.1, p.73-76, 2005.

SOEIRO, M.N.C.; SILVA-FILHO, F.C.; MEIRELLES, M.N.L. The nature of anionic sites and endocytic pathway in heart muscle cells. **J. Submicrosc. Cytol Pathol.,** v.26, n. 1, p.121-130, 1994.

STITES, D.P. ; TERR, A.I. ; PARSLOW, T.G. : Medical Immunology. 9 th edition. Stamford, Connecticut: APPLETON & LANGE, 1997.

STUEHR,P.J.; MARLETTA, M.A. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysacchaide**. Proc. Natl. Acad. Sci**., 82:7738-7742, 1985.

SUNDERKOTTER, C.; STEINBRINK, K.; GOEBELER, M.; BHARDWAJ, R.; SORG, C. Macrophages and angiogenesis. **J Leukoc Biol**. 55: 410-420, 1994.

TANG, Y.; PIETRO, L.;FENG, Y.;WANG, X.: Increased TNF-α and PGI_2, but not NO release from macrophages in 18 – month-old rats. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 114, p. 79-88, 2000.

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

TEICHER, B.A.; WILLIAMS, J.I.; TAKEUCHI, H.; ARA, G.; HERBST, R.S.; BUXTON, M.A. Potencial of aminosterol, squalamine in combnation therapy in the rat 13,762 mammary carcinoma and the murine Lewis lung carcinoma. **Anticancer Research,** v. 18, p. 2567-2573, 1998.

TOGNI, V.; OTA, C.C.C.; FOLADOR, JUNIOR, O. T., AIKAWA, J.; YAMAZAKI, R.K.; FREITAS, F.A.; LONGO, R.; MARTINS, E.F.; CALDER, P. Câncer Cachexia and

Tumor Growth Reduction in Walker 256 Tumor-Bearing Rats Supplemented With N-3 Polyunsaturated Fatty Acids for One Generation. **Nutrition and Cancer**, v. 46 (1), p. 52-58 2003.

UNANUE, E.R. ;ALLEN, P.M. : The basis for the immuno-regulatory role of macrophages and other accessory cells. **Science**, v. 236, p.551-557, 1987

VALENTINE, J.S.; WERTZ, D.L; LYONS, T.J.; LIOU, L.L.; GOTO, J.J.; GRALLA, E.B. The dark side of dioxygen biochemistry. **Chemical Biology,** 2: 253-262, 1998.

VAN DER BERG, T.K.;DOPP, E.A.; DIJKSTRA, C.D.: Rat macrophages : membrane glycoproteins in differentiation and function. **Imumunological Reviews**, v. 184, p. 45-47, 2001.

VISENTAINER,J.V.; CARVALHO,P.O.;IKEGAKI,M.;PARK, Y.K. Concentração de ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) em peixes marinhos da costa brasileira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.20, n.1, p...,2000.

WALEY, K.;LAPPIN,D.B.T.C2 Synthesis by human monocytes is modulated by a nicotinic cholinergic receptor. **Nature** 293:580-3, 1981.

WIESENFELD, P.W.; BABU, U.S.; O' DONNELL, M.W.; Effect of long-chain fatty acids in the culture médium on fatty acid composition of Wehi-3 and J774A. 1 cells. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 128: 123-134, 2001.

WHO STUDY GROUP ON DIET, NUTRITION AND PREVENTION OF CHRONIC DISEASES. Geneva, 1989. Report. Geneva, Word Health Organization, 1990. Who-**Techical Report Series**, 797

WILLIAMS, J.I.; WEITMAN, S.; GONZALEZ, C.M.; JUNDT, C.H.; MARTY, J.; STRINGER, S.D.; HOLROYD, K.J.; MCLANE, M.P.; CHEN, Q.; ZASLOFF, M.; VON

HOFF, D.D. Squalamine treatment of human tumors in nu/ni mice enhances platinum-based chemotherapies. **Clinical Cancer Research**, v. 7, p. 724-733, 2001.

WOODS, J.A.;LU,Q.;CEDDIA, M.A.;LOWDER, T. Exercise-induced modulationof macrophage function. **Immunology and Cell Biology**, v. 78, p.545-553, 2000.

YIP, I.; HEBER, D.; ARONSO, W.: Nutrition and prostate cancer. **Urol Clin North** Am 1999; 26 (2): 403-11

YOUNES, R.N.; NOGUCHI, Y. Pathophysiology of cancer cachexia.Rev. **Hosp. Clin.** 55: 181-193, 2000.

YOUNG, C.; GEAN, P.W.; WU, S.P.; LIN, C.H.; SHEN, Y.Z. Cancellation of low frequency stimulation-induced long-term depression by docosahexaenic acid in rat hippocampus. **Neuroscience Letters**, 247: 198-200, 1998.

YU, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiol. Rev**.74:139-161, 1994.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo