FABÍOLA IAGHER

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO CONJUNTA CRÔNICA COM ÓLEO DE FÍGADO DE TUBARÃO E ÓLEO DE PEIXE SOBRE CRESCIMENTO TUMORAL, CAQUEXIA E ATIVIDADE LINFOCITÁRIA DE RATOS WISTAR PORTADORES DE TUMOR DE WALKER 256

Curitiba
2008

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

FABÍOLA IAGHER

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO CONJUNTA CRÔNICA COM ÓLEO DE FÍGADO DE TUBARÃO E ÓLEO DE PEIXE SOBRE CRESCIMENTO TUMORAL, CAQUEXIA E ATIVIDADE LINFOCITÁRIA DE RATOS WISTAR PORTADORES DE TUMOR DE WALKER 256

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular e Molecular, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes

Curitiba
2008

Este trabalho é dedicado àqueles que mais amo e que sempre estão ao meu lado: meus pais, Antoninho e Adelaide, meus irmãos, Fabrício, João Rodrigo e Rafael Augusto, e meu marido, Marco.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me permitido realizar este doutorado, por me dar coragem e capacidade de vencer os obstáculos, e por sempre me dar sinais da Sua presença.

Aos meus pais, Antoninho e Adelaide, pelo amor que me dedicam e pelo apoio incondicional que sempre me oferecem.

Aos meus irmãos, Fabrício, João Rodrigo e Rafael Augusto, por serem sempre alegria em minha vida.

Ao meu marido, Marco Antonio, pela compreensão e paciência, por enxugar minhas lágrimas tantas vezes, pelas palavras de apoio, por vibrar comigo nas conquistas, por ser a “luuuz” da minha vida!

Ao meu orientador, Luiz Cláudio, pela preciosa oportunidade de desenvolvimento pessoal e profissional neste período de trabalho, por confiar em mim, e compartilhar comigo seu tempo e sua sabedoria.

Aos meus amigos, Loli e Sandro, pela paciência no início do meu aprendizado, pela ajuda nos experimentos, e principalmente pela amizade sincera.

Aos meus amigos Everson, Gleisson, Fernanda, Vanessa, Sergio, Isabela, Carine, Andressa, Ana Lúcia, Diogo, Luciele, Carina, Luciana, Marcelo, Jaisson, Paulo, Pedro, Luis Alexandre, Dalton, Ricardo, Diogo Neto, Gina, Daniele Pequito, enfim a todos os “filhos do Labmetab”. A todos vocês, muito obrigada pela amizade, companhia, ajuda do dia-a-dia, pelo apoio em todas as circunstâncias.

Às minhas estagiárias Wanessa, Juliana Nunes e Juliana Goulart, por terem me ajudado incessantemente na lida com os animais, e por terem compartilhado comigo tantos momentos bons! Agradeço também à Janaína, ao Laércio, à Cíntia, à Flávia, e à Lia, meus estagiários por período curto, mas que nem por isso foram menos importantes!

Aos meus amigos de outros laboratórios, sempre prontos para aquele auxílio fundamental nos dias de experimento, Fernando e Chico. Obrigada por tudo!

À minha amiga Katya, por emprestar seu tempo e seus ouvidos pra me ouvir, pelos momentos divertidos de conversa no corredor, por ser minha companheira assídua e destemida do HPLC, enfim, por dividir comigo tantos momentos felizes!

Ao Prof. Guilherme L. Sassaki e ao doutorando Lauro Souza, pelas discussões e análises no GC-MS.

Às professoras Andrea Moreno e Lúcia de Noronha, e às laboratoristas Marina e Ana Paula do Laboratório de Patologia Básica da PUC-PR, pelo auxílio na realização da imunohistoquímica.

Aos funcionários do biotério, pela paciência e por “quebrarem tantos galhos”.

Aos funcionários da UFPR, Cláudio, Ruth e Marlene, pelo auxílio diário.

À funcionária Maria da Graça, pelo convívio e pelas trocas de experiência no HPLC.

À Direção da Universidade do Oeste de Santa Catarina – UNOESC, Campus de Joaçaba, pelo apoio financeiro, por acreditar no meu trabalho e no meu potencial.

Aos meus colegas de trabalho da UNOESC, Angélica, Dib, Doralysa, Geisson, Maria Ignez, Cláudia, Jovani, Márcia, Osmar, Jussara, Maira, Cláudia Wesoloski, Terezinha, Lorena, Dayse, Liliane, Dagmar, e todos que possibilitaram, direta ou indiretamente, minha permanência em Curitiba para a realização deste trabalho. Muito obrigada pela colaboração e paciência!

“Para tudo há um tempo na vida,
para cada coisa há um
momento debaixo dos céus:
tempo para plantar, e tempo para colher...”
(Eclesiates, 3,1-2)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....ix
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....xii
RESUMO.....xiv
ABSTRACT.....xv
1 **INTRODUÇÃO**.....16
1.1 Câncer.....16
1.2 Sistema Imunitário.....19
1.3 Ácidos graxos poliinsaturados ω-3.....23
1.3.1 Ácidos graxos ω-3 e suas ações.....27
1.4 Óleo de fígado de tubarão.....34
1.4.1 Estudos envolvendo éteres lipídicos.....38
2 **OBJETIVOS**.....42
3 **MATERIAIS E MÉTODOS**.....43
3.1 **Animais**.....43
3.2 **Reagentes**.....43
3.3 **Protocolo Experimental**.....44
3.4 **Massa corpórea**.....45
3.5 **Obtenção de células de tumor de Walker 256**.....45
3.6 **Isolamento de linfócitos do baço, timo e linfonodos mesentéricos**.....45
3.7 **Proliferação linfocitária**.....46
3.8 **Proliferação de células tumorais**.....46
3.9 **Apoptose de células tumorais**.....46
3.10 **Peroxidação lipídica do tecido tumoral**.....47
3.11 **Quantificação protéica para peroxidação lipídica**.....48
3.12 **Determinação de parâmetros de caquexia**.....48
3.12.1 Lactatemia.....48
3.12.2 Conteúdo de glicogênio hepático.....48
3.12.3 Glicemia.....49
3.12.4 Triacilglicerolemia.....49
3.13 **Determinação do perfil de ácidos graxos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High Performance Liquid Chromatography* – HPLC)**.....49
3.13.1 Extração lipídica.....49
3.13.2 Saponificação dos extratos lipídicos.....50
3.13.3 Derivatização dos ácidos graxos.....50

3.13.4 Obtenção dos cromatogramas – HPLC.....51
3.14 **Análise de alquilgliceróis por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (*Gas Chromatography – Mass Spectrometry* – GC-MS).....51**
3.14.1 Metanólise ácida.....51
3.14.2 Acetilação.....51
3.14.3 Obtenção dos cromatogramas – GC-MS.....52
3.15 **Imunohistoquímica de linfócitos infiltrados no tecido tumoral.....52**
3.16 **Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (*Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacrylamide Gel Eletroforesis* - SDS-PAGE)...53**
3.16.1 *Western Blotting*.....54
3.17 **Análise Estatística.....55**
4 **RESULTADOS.....56**
4.1 **Massa tumoral 56**
4.2 **Parâmetros de caquexia.....57**
4.3 **Capacidade proliferativa das células tumorais.....65**
4.4 **Mensuração da produção de hidroperóxidos lipídicos no tecido tumoral..66**
4.5 **Apoptose de células tumorais.....67**
4.6 **Perfil de ácidos graxos dos óleos, ração e tumor.....72**
4.7 **Quantificação de alquilgliceróis presentes na cápsula de óleo de fígado de tubarão e nos tumores.....75**
4.8 **Proliferação de linfócitos.....79**
4.9 **Quantificação de linfócitos CD4+ e CD8+ em linfócitos no infiltrado tumoral.....85**
5 **DISCUSSÃO.....88**
6 **CONCLUSÃO.....122**
7 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....124**

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidônico
AB	Antibiótico
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
AIF	Fator indutor de apoptose
ATP	Trifosfato de adenosina
β-NAD+	Beta nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado
bFGF	Fator básico de crescimento fibroblástico
BHT	Hidroxitolueno butilado
BMMC	4-bromometil-7-metóxi coumarina
BSA	Soroalbumina bovina
CD4	Cluster de diferenciação 4
CD8	Cluster de diferenciação 8
CaCl2	Cloreto de cálcio
ConA	Concanavalina A
COX	Enzima ciclooxigenase
CO2	Gás carbônico
DAB	Cromógeno diaminobenzidina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DHA	Ácido docosahexaenóico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPA	Ácido eicosapentaenóico
ERN	Espécie reativa de nitrogênio
ERO	Espécie reativa de oxigênio
ET-18-OCH3	1-O-octadecil-2-O-metil-glicero-3-fosfocolina
FITC	Fluoresceína isotiocianato
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
HCl	Ácido clorídrico
H2SO4	Ácido sulfúrico
HETE	Ácido hidroxieicosatetraenóico
H2O2	Peróxido de hidrogênio
HPETE	Ácido hidroperoxieicosatetraenóico
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência

IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
IL-2R	Receptor de interleucina 2
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INF-γ	Interferon gama
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase induzível
ITAM	Seqüência imunoreceptora baseada na ativação de tirosina
KOH	Hidróxido de potássio
LA	Ácido linoléico
LAT	Molécula conectora para ativação de linfócitos T
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LMF	Fator mobilizador de lipídeos
LNA	Ácido α-linolênico
LOX	Enzima lipooxigenase
LPL	Lipoproteína lipase
LT	Leucotrieno
LX	Lipoxina
MAP	Proteína ativada por mitógeno
MeOH	Metanol
MgCl2	Cloreto de magnésio
MgSO4	Sulfato de magnésio
MHC I	Complexo de histocompatibilidade principal tipo I
MHC II	Complexo de histocompatibilidade principal tipo II
MyoD	Fator de transcrição muscular
NaCl	Cloreto de sódio
NADP	Nicotinamida adenida dinucleotídeo fosfato
NFκB	Fator de transcrição κB
NK	Linfócitos *natural killer*
NO	Óxido nítrico
PAF	Fator ativador de plaquetas
PBS	Solução tampão fosfato

PG	Prostaglandina
PI	Iodeto de propídeo
PIF	Fator indutor de proteólise
PKC	Proteína quinase C
PLA2	Enzima fosfolipase A2
PPARγ	Receptor ativador de proliferação peroxissomal gama
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Scr	Família de proteínas tirosina-quinases
TAF	Fator de angiogênese tumoral
TAG	Triacilglicerol
TBS	Solução tampão tris
TCA	Ácido tricloroacético
TCR	Receptor de linfócito T
TEA	Trietanolamina
TEMED	Tetrametiletilenodiamino
TGF-β	Fator de crescimento transformante beta
Th1	Linfócitos T helper tipo 1
Th2	Linfócitos T helper tipo 2
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TPP	Trifenilfosfina
TRAIL	Ligante indutor de apoptose
UCP	Proteína desacopladora
VEGF	Fator de crescimento endotelial de vaso

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

Figura 1 Esquema de fatores envolvidos no estabelecimento da caquexia.....18
Figura 2 Metabolismo de ácidos graxos poliinsaturados.....25
Figura 3 Metabolização de ácidos graxos ω-6 e ω-3.....26
Figura 4 Estrutura química das moléculas de alquilglicerol mais comuns.....35
Figura 5 Estrutura química das moléculas que apresentam alquilglicerol em seus esqueletos carbônicos.....35
Figura 6 Estrutura química do 1-*O*-(2-metóxi)hexadecilglicerol, um alquilglicerol metóxi substituído encontrado no óleo de fígado de tubarão.....36
Figura 7 Estrutura química da molécula de esqualamina.....38
Figura 8 Massa do tumor.....56
Figura 9 Concentração plasmática de glicose.....58
Figura 10 Concentração plasmática de triacilgliceróis.....59
Figura 11 Concentração plasmática de lactato.....60
Figura 12 Conteúdo hepático de glicogênio.....62
Figura 13 Proliferação de células tumorais *ex vivo*.....66
Figura 14 Peroxidação lipídica de tecido tumoral.....67
Figura 15 Expressão da proteína pró-apoptótica Bax em tecido tumoral.....69
Figura 16 Expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 em tecido tumoral.....70
Figura 17 Razão entre a expressão da proteína pró-apoptótica Bax e a anti-apoptótica Bcl-2 em tecido tumoral.....71
Figura 18 Cromatograma obtido por GC-MS do óleo de fígado de tubarão.....75
Figura 19 Espectro de massa do composto hexadecilglicerol acetilado (2,3-O-acetil-1-hexadecilglicerol) de óleo de fígado de tubarão.....76
Figura 20 Espectro de massa do composto octadecenilglicerol acetilado (2,3-O-acetil-1- octadecenilglicerol) de óleo de fígado de tubarão.....77
Figura 21 Espectro de massa do composto octadecilglicerol acetilado (2,3-O-acetil- 1- octadecilglicerol) de óleo de fígado de tubarão.....77
Figura 22 Espectro de massa do composto heptadecilglicerol acetilado (2,3-O-acetil-1-heptadecilglicerol) de óleo de fígado de tubarão.....78
Figura 23 Espectro de massa do composto heptadecenilglicerol acetilado

(2,3-O-acetil-1-heptadecenilglicerol) de óleo de fígado de tubarão.....78

Figura 24 Marcação positiva para linfócitos CD4+ no infiltrado tumoral.....86
Figura 25 Marcação positiva para linfócitos CD8+ no tecido tumoral.....87

TABELAS

Tabela 1 Peso corporal, peso tumoral, peso da carcaça e mudança de peso dos animais com e sem tumor, antes e após 15 dias da inoculação das células tumorais.....63
Tabela 2 Percentual de células apoptóticas, necróticas e viáveis dos tumores.....68
Tabela 3 Perfil de ácidos graxos obtido por HPLC das cápsulas de óleo de fígado de tubarão, óleo de peixe, gordura de coco e da ração dos animais.....73
Tabela 4 Perfil de ácidos graxos obtido por HPLC dos extratos lipídicos dos tumores.....74
Tabela 5 Porcentagem de alquilgliceróis encontrados na cápsula de óleo de fígado de tubarão.....76
Tabela 6 Concentração de alquilgliceróis determinada por GC-MS nos extratos lipídicos dos tumores.....79
Tabela 7 Proliferação de linfócitos do timo.....81
Tabela 8 Proliferação de linfócitos do linfonodo mesentérico.....83
Tabela 9 Proliferação de linfócitos do baço.....85
Tabela 10 Relação CD4+/CD8+ de linfócitos infiltrados no tumor.....87

ESQUEMAS

Esquema 1 Resumo dos efeitos das diferentes suplementações sobre os parâmetros de caquexia provocada pelo tumor de Walker 256.....64
Esquema 2 Resumo dos efeitos das diferentes suplementações sobre o crescimento tumoral.....71

RESUMO

Lipídeos ingeridos na dieta afetam diretamente o metabolismo de células tumorais e células de defesa. O óleo de peixe, rico em ácidos graxos poliinsaturados ω-3, especialmente ácido eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), é conhecido por reduzir o crescimento tumoral e a caquexia. O mecanismo de ação pelo qual estes ácidos graxos atuam não está totalmente esclarecido, mas parece envolver ação direta sobre as células tumorais. O óleo de fígado de tubarão, principal fonte natural de éteres lipídicos denominados alquilgliceróis, apresenta importante ação imunoestimulatória. Uma vez que óleo de peixe e óleo de fígado de tubarão atuam de forma diferente, porém positiva contra o desenvolvimento do câncer, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito da associação da suplementação conjunta crônica com óleo de fígado de tubarão (Ecomer®) e óleo de peixe (Herbarium®), sobre a caquexia, crescimento tumoral e resposta linfocitária em ratos com tumor de Walker 256. Os animais, após o desmame (21 dias), foram separados nos seguintes grupos, de acordo como tipo de dieta oferecida: grupo C (sem suplementação), FT (suplementado com óleo de fígado de tubarão), OP (suplementado com óleo de peixe), FT+OP (suplementado com os dois óleos), GC (suplementado com gordura de coco) e FT+GC (suplementado com os dois óleos). Estes grupos receberam suas respectivas suplementações até completarem 70 dias, e então à metade do grupo foi inoculado 1 mL subcutaneamente, no flanco direito, de suspensão de células do tumor de Walker 256, contendo 3×10^7 células/mL, formando assim dois grupos para cada dieta, um sem tumor e outro portador de tumor de Walker (representados pela letra W). Os animais foram ortotanasiados ao 14º dia após a inoculação do tumor, e foram feitas as análises propostas. Foi concluído que óleo de fígado de tubarão e óleo de peixe, quando suplementados isoladamente foram capazes de reduzir o crescimento tumoral e a caquexia. No entanto, quando em associação, não propiciaram efeito aditivo nestes parâmetros, possivelmente por competição entre ácidos graxos ω-3 e alquilgliceróis pela incorporação na membrana celular. Óleo de fígado de tubarão suplementado isoladamente foi capaz de aumentar a capacidade proliferativa *ex vivo* de linfócitos de órgãos linfóides periféricos de animais portadores de tumor e de reduzir a razão $CD4^+/CD8^+$ de linfócitos infiltrados no tumor. A ação estimuladora do óleo de fígado de tubarão sobre os parâmetros linfocitários prevaleceu quando óleo de fígado de tubarão estava associado ao óleo de peixe.

ABSTRACT

Dietary lipids can directly affect tumor cells and leucocytes functions. Fish oil, rich in ω-3 polyunsaturated fatty acids such as eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) it has been shown able to reduce tumor growth and cancer cachexia. The mechanism by which these compounds act is not well determined, but seems to involve a direct action on tumor cell metabolism. Shark liver oil, main source of natural ether lipids named alkylglycerols, shows important stimulatory effect upon immune system. Fish oil and shark liver oil might act by different forms however in a positive way against cancer development. Therefore the aim of this study was to investigate the effect of chronic supplementation of fish oil and shark liver oil in association upon cachexia, tumor growth and lymphocyte response in Walker 256 tumor bearing rats. Weanling male rats were fed for seven weeks with regular chow diet (control group) and other rats were also fed regular chow and supplemented with 1g/kg body weight of shark liver oil (SLO), fish oil (FO), shark liver oil+fish oil (SLO+FO); coconut fat (CF) and shark liver oil+coconut fat (SLO+CF). After seven weeks, half of each group was inoculated in the right flank with a sterile suspension of 3×10^7 Walker 256 tumor cells, giving the tumor bearing groups as follow: fed regular chow (W), supplemented with shark liver oil (WSLO), fish oil (WFO), their association (WSLO+FO), coconut fat (WCF) and shark liver oil +coconut fat (WSLO+CF). Animals were killed at 14th day after tumor inoculation. Shark liver oil or fish oil supplemented in isolated form caused reduction in the tumor growth and cachexia. However, when they were associated there was not additive effect on these parameters, possibly by competition of ω-3 fatty acids and alkylglycerols for cell membrane incorporation. Shark liver oil supplemented in isolated form was able to increase *ex vivo* proliferative capacity of peripheral lymphoid organs lymphocytes in tumor bearing rats and to decreased $CD4^+/CD8^+$ ratio in tumor infiltrating lymphocytes. The stimulatory effect of shark liver oil on lymphocytes parameters prevailed when it was associated with fish oil.

1. INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

No Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), aproximadamente 470 mil novos casos de câncer deverão ocorrer no país entre 2008 e 2009. O tipo mais incidente será o câncer de pele não melanoma, com 115.010 casos a cada ano, seguido pelo câncer de próstata (49.530 novos casos), mama (49.400), pulmão (27.270), cólon e reto (26.990), estômago (21.800) e colo de útero (18.680). Sul e Sudeste apresentam as maiores taxas esperadas de casos novos de câncer, refletindo as heterogeneidades regionais, enquanto a região Centro-Oeste apresenta padrão intermediário. A região Norte apresenta as menores taxas (INCA, 2008). Os casos de câncer no mundo em 2007 ultrapassaram 12 milhões de casos, sendo que uma entre oito mortes foi devida ao câncer. O câncer causa mais mortes do que a AIDS, tuberculose e malária combinadas (Global Cancer Facts & Figures, 2007).

Câncer é um grupo de doenças com mais de 400 diagnósticos histológicos, caracterizado por crescimento descontrolado e espalhamento de células “anormais”. Ele é causado tanto por fatores externos, como o tabaco, produtos químicos, radiação e infecções, quanto por fatores internos tais como mutações gênicas herdadas, hormônios, condições imunitárias e alterações metabólicas. Estes fatores etiológicos podem agir juntos ou em seqüência para iniciar ou promover a carcinogênese (Global Cancer Facts & Figures, 2007). Sabe-se que, enquanto fatores genéticos determinam a suscetibilidade a doenças incluindo o câncer, os fatores ambientais parecem determinar quais indivíduos geneticamente suscetíveis serão afetados. Dentre estes fatores ambientais, a nutrição é o de maior importância (SIMOPOULOS, 2002).

Já está bem estabelecido e aceito que alguns fenômenos determinam a oncogênese. Por exemplo, as células cancerosas caracteristicamente secretam seus próprios fatores de crescimento, ignoram sinais inibidores de crescimento, evitam a morte celular, duplicam-se sem limites, mantêm a angiogênese, e invadem outros tecidos. Além disso, como recentemente proposto, a capacidade das células tumorais em escapar da vigilância imunitária corresponde ao sétimo fenômeno característico na oncogênese (ZITVOGEL et al, 2006).

Apesar da grande diversidade do câncer, há notáveis similaridades nas manifestações clínicas de pacientes com tal doença. Mesmo pacientes sem

metástases experimentam efeitos sistêmicos tais como anorexia e caquexia (DUNLOP & CAMPBELL, 2000).

A palavra caquexia é derivada do grego *kakos hexis* que significa literalmente "condição ruim", e é uma síndrome caracterizada por perda de peso, anorexia, astenia, anemia e alterações profundas no metabolismo de carboidratos, lipídeos e aminoácidos. O estado caquético está invariavelmente associado com a presença e crescimento do tumor, e leva a um estado de desnutrição devido à indução de anorexia (BARBER, 2001; ARGILÉS et al, 2003). Por outro lado, alguns estudos já demonstraram que a caquexia não está simplesmente relacionada ao tamanho do tumor e presença de metástase, pois pode surgir em pacientes com tumor comprometendo menos de 0,01% do seu peso corporal (TISDALE, 2005; PIZATO et al, 2005).

Cerca de 50% dos pacientes com câncer apresentam perda de peso, mas a incidência de caquexia não é distribuída igualmente entre todos os tipos de tumores. Pacientes com câncer gástrico ou pancreático têm a mais alta freqüência de perda de peso (~85%), pacientes com câncer de cólon, próstata e pulmão formam um grupo intermediário (48-60% dos pacientes perdem peso), e pacientes com câncer de mama, leucemia aguda não-linfocítica e sarcomas têm baixa freqüência de perda de peso (30-40%). Isto indica que tumores que induzem caquexia apresentam diferente expressão gênica dos fatores que induzem degradação das reservas de triacilgliceróis e de proteínas de músculo esquelético (TISDALE, 2005).

Embora a anorexia freqüentemente acompanhe a caquexia, a queda na ingestão calórica por si só não contribui isoladamente para as alterações na composição corporal, uma vez que a caquexia pode ocorrer mesmo na ausência da anorexia. A caquexia parece ser mediada por fatores circulantes que exercem papel importante na perda de massa corpórea (Figura 1). Dentre estes fatores destacam-se as citocinas produzidas pelos tecidos do hospedeiro como o *tumor necrosis factor* (TNF-α) e interleucinas (IL-1, IL-6, IFN-γ), e moléculas produzidas pelo próprio tumor como o *lipid mobilizing factor* (LMF) que age sobre o tecido adiposo estimulando a lipólise, e o *proteolysis-inducing factor* (PIF) que age sobre tecido muscular estimulando a proteólise (TISDALE, 2003; MORLEY et al, 2006). TNF-α, em estudos com animais e humanos, apresentou capacidade de elevar a atividade termogênica em tecido adiposo associada com a proteína UCP-1 (*uncoupling protein-1*). Além disso, esta citocina isolada ou em combinação com IL-1 e IFN-γ, foi associada a altas concentrações de

ubiquitina livre ou conjugada em músculo esquelético resultando em aumentada proteólise muscular em animais e humanos (ARGILÉS, 2005). TNF-α e IFN-γ são capazes de ativar o fator de transcrição NFκB que leva à redução de MyoD, um fator de transcrição essencial para o reparo em tecido muscular lesado. IL-1, IL-6 e IFN-γ também estimulam a expressão do hormônio leptina, produzido pelos adipócitos, o qual bloqueia a liberação do neuropeptídeo-Y, importante estimulador da ingestão calórica. LMF, além de estimular lipólise em tecido adiposo, também produz um significativo aumento na expressão de proteínas UCPs em tecido adiposo, muscular esquelético e hepático (MARTIGNONI et al, 2003). Adicionalmente, citocinas estimulam a liberação de cortisol e catecolaminas pela glândula adrenal. Cortisol favorece a atividade do sistema ubiquitina-proteossomo, e catecolaminas levam a um aumento do gasto energético basal (MORLEY et al, 2006).

A grande quantidade de lactato produzida pelas células tumorais que possuem intenso metabolismo glicolítico é convertida pela gliconeogênese hepática em glicose, que é novamente disponibilizada no plasma, constituindo o Ciclo de Cori. Este ciclo fútil colabora para o intenso gasto de energia basal, e contribui para a perda de massa corpórea e a debilidade do indivíduo caquético (ARGILÉS, 2008).

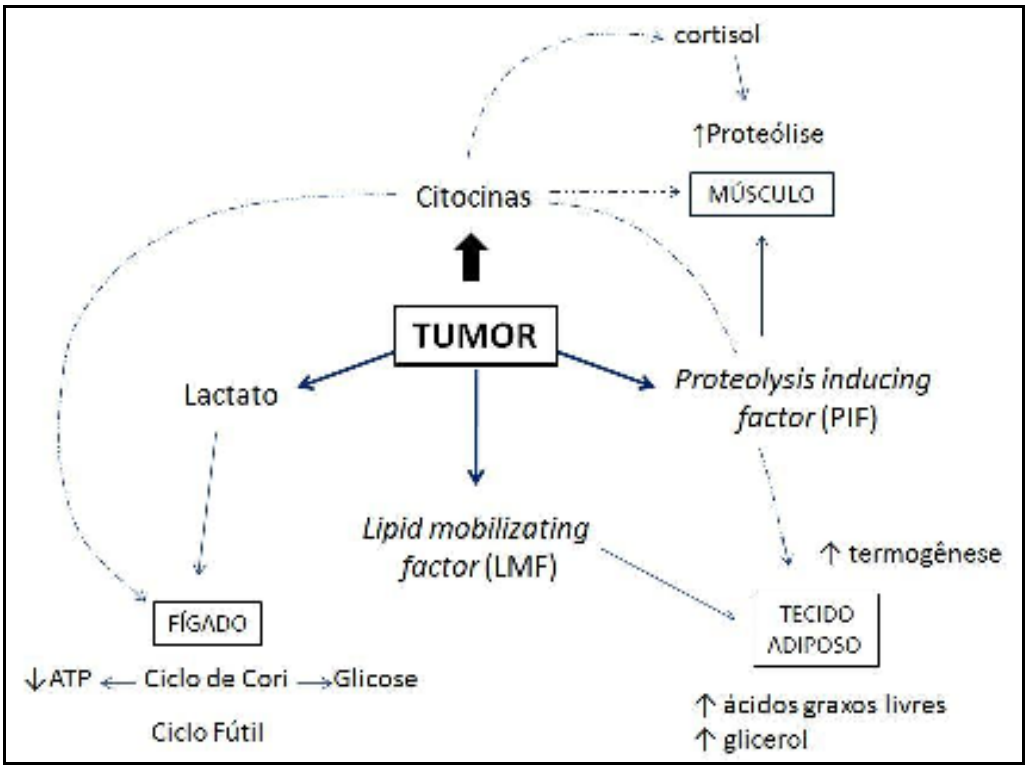

Figura 1: Esquema de fatores envolvidos no estabelecimento da caquexia. FONTE: Morley, 2006 (adaptado).

Indivíduo que sofre de anorexia não relacionada ao câncer apresenta perda de tecido adiposo superior à perda de massa muscular, enquanto que indivíduo com caquexia devido ao câncer apresenta perda de massa tanto adiposa quanto muscular. Ainda, quando a redução da massa magra ocorre em um indivíduo desnutrido sem câncer, há perda de massa protéica visceral mais do que muscular esquelética, enquanto que em um indivíduo com câncer apresenta seletiva perda de tecido muscular esquelético (TISDALE, 2003).

A perda de peso em pacientes caquéticos, portanto, deve-se igualmente à perda de gordura e de massa muscular, e o processo é caracterizado por aumentado catabolismo de proteínas musculares esqueléticas e decréscimo na síntese protéica. Este processo também envolve proteínas cardíacas, resultando em importantes alterações no desempenho do coração (TISDALE, 1996; ARGILÉS *et al*, 2003). A perda de tecido adiposo alcança 85% e a perda de tecido muscular esquelético chega a 75% quando o paciente apresenta perda de 30% do peso corporal. A caquexia tem sido responsável por no mínimo 20% das mortes de pacientes com câncer, e também exerce uma importante participação no comprometimento da imunidade, podendo levar à morte por infecções (TISDALE, 2005).

Apesar do grande desenvolvimento científico e tecnológico na área da saúde nos últimos tempos e dos inúmeros esforços para encontrar tratamento e cura para o câncer, fica cada vez mais evidente que os avanços na pesquisa envolvendo o câncer estarão focados mais na prevenção do que na cura da doença metastática (ROSE & CONOLLY, 1999). Aliada a esta tendência, a nutrição assume papel importante uma vez que pode ser constituída de elementos protetores contra a doença, ou pelo menos auxiliares durante a terapia em casos onde já houve instalação da patologia.

1.2 SISTEMA IMUNITÁRIO

O sistema imunitário dos mamíferos é composto de muitos tipos celulares e mediadores químicos que interagem com células não imunitárias e entre si em redes complexas e dinâmicas para garantir proteção contra agentes infecciosos que existem no ambiente (bactérias, vírus, fungos, parasitas) e de outros agentes nocivos. Ao mesmo tempo, o sistema imunitário mantém tolerância em relação a antígenos próprios e agentes não ameaçadores do ambiente como proteínas obtidas da alimentação e bactérias intestinais. Este sistema está dividido funcionalmente em sistema imunitário inato (ou natural) e adquirido (ou adaptativo). Células imunitárias originam-se na

medula óssea vermelha e são encontradas circulando no plasma, organizadas em órgãos linfóides tais como timo, baço e linfonodos, ou dispersas em outros locais (BERRIDGE, 1997; CALDER, 2001b; CALDER, 2007).

A imunidade inata consiste de barreiras físicas (epitélios), fatores solúveis (complemento) e células tais como células dendríticas, células *natural killer* (NK), macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos e mastócitos, que constituem a primeira linha de defesa contra patógenos. Este sistema inato não apresenta memória e não é influenciado por exposição prévia a um agente infeccioso. As células fagocíticas (células dendríticas, macrófagos e neutrófilos) expressam receptores de membrana específicos para moléculas comuns em grupos de microorganismos. Células dendríticas, macrófagos e mastócitos atuam como sentinelas nos tecidos e continuamente monitoram seu microambiente em busca de sinais de sofrimento celular. Quando a homeostase tecidual é desfeita por um patógeno, macrófagos e mastócitos liberam mediadores solúveis como citocinas, quimiocinas, proteases remodeladoras de matriz extracelular, espécies reativas de oxigênio e histamina, os quais mobilizam a infiltração de outros leucócitos no tecido, em um processo conhecido como inflamação. As células dendríticas, por fagocitarem patógenos invasores nos tecidos e migrarem para órgãos linfóides para apresentar antígeno para linfócitos, são peças importantes na interface entre sistema imunitário inato e adaptativo (VISSER et al, 2006).

O sistema imunitário adaptativo inclui os linfócitos e seus produtos. É altamente específico uma vez que cada linfócito apresenta receptor de membrana específico para um único antígeno. Seguindo a ativação linfocitária, e a remoção do agente patológico, são originadas células de memória as quais serão responsáveis pela resposta imunitária mais forte e efetiva após re-exposição ao mesmo patógeno (CALDER, 2007).

Os linfócitos são classificados em linfócitos T (células maturadas no timo, que agem contra patógenos intracelulares e extracelulares, constituindo a imunidade mediada por células) e linfócitos B (células derivadas da medula óssea que produzem imunoglobulinas, combatem patógenos extracelulares e constituem a imunidade humoral). Linfócitos T apresentam receptores de membrana específicos para antígenos que, ao contrário dos linfócitos B, precisam ser apresentados a eles por outras células, as células apresentadoras de antígeno. A necessidade de apresentação de antígeno aos linfócitos T é uma característica marcante que distingue imunidade humoral e mediada por célula. É a combinação de fragmentos protéicos dos antígenos com proteínas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC, *major histocompatibility*

complex) das células apresentadoras de antígeno que é reconhecida pelos linfócitos T. Patógenos intracelulares estimulam linfócitos T citotóxicos a destruir as células infectadas, e patógenos extracelulares estimulam respostas mediadas por linfócitos T auxiliares ou *helper* (CALDER, 2007).

Linfócitos T *helper*, são distinguidos pela presença da proteína CD4 (CD, *cluster of differentiation*) em sua superfície, enquanto linfócitos T citotóxicos apresentam proteína CD8. Linfócitos T citotóxicos são capazes de matar células infectadas, e linfócitos T *helper* auxiliam células B, macrófagos, células *natural killer* e até mesmo outros linfócitos T, a combater infecções por produzir citocinas específicas (CALDER et al, 2002; CALDER, 2007).

A comunicação dentro do sistema imunitário adaptativo e, entre o inato e adaptativo ocorre por contato direto célula-célula e pela produção de mensageiros químicos. Estes mensageiros químicos são proteínas chamadas interleucinas que agem regulando a atividade de células que produzem outras citocinas, podendo amplificar a produção destas substâncias. Cada citocina pode ter múltiplas atividades sobre diferentes células. As citocinas agem por se ligar a receptores específicos na superfície celular e induzir mudanças no crescimento, desenvolvimento ou atividade da célula alvo. Citocinas pró-inflamatórias são principalmente produtos do sistema imunitário. Entretanto, células endoteliais e fibroblastos também têm capacidade para produzi-las. Biologicamente, a citocina denominada TNF (*tumor necrosis factor*) age como desencadeadora para ativar cascatas de produção de outras citocinas. TNF é liberado rapidamente em resposta a agentes inflamatórios e infecciosos, e induz a produção de grande número de outras citocinas como IL-12, IFN-γ, IL-6, entre outras (CALDER, 2001b; GRIMBLE, 1998). TNF-α, IL-1 e IL-6 são as citocinas mais importantes produzidas por monócitos e macrófagos. Estas citocinas estimulam neutrófilos, monócitos e macrófagos a iniciar a destruição de células bacterianas e tumorais, estimulam a proliferação de linfócitos T e B e iniciam a produção de outras citocinas. A produção de quantidades apropriadas de TNF-α, IL-1 e IL-6, é claramente benéfica em resposta à infecção, mas a produção inapropriada pode ser perigosa e estas citocinas, especialmente TNF-α, são causas de respostas patológicas que ocorrem em condições inflamatórias (CALDER, 2001b).

Linfócitos T *helper* são funcionalmente subdivididos de acordo com as citocinas que produzem. Linfócitos T *helper* tipo 1 (Th1) produzem interleucina 2 (IL-2) e interferon-γ (IFN- γ) que ativam macrófagos, células NK e linfócitos T citotóxicos.

Linfócitos T *helper* tipo 2 (Th2) produzem IL-4, que estimula a produção de imunoglobulinas pelos linfócitos B, IL-5, um fator ativador de eosinófilos, e IL-10, que juntamente com a IL-4 suprime a imunidade mediada por células. A desregulação entre as respostas de Th1 e Th2 é uma característica de muitas doenças humanas (CALDER, 2007).

Numerosas células efetoras e moléculas do sistema imunitário inato e adaptativo participam no reconhecimento e destruição de células cancerosas. Linfócitos T citotóxicos (CD8+) reconhecem e eliminam células tumorais e do estroma tumoral por induzir morte celular de maneira perforina-dependente. Linfócitos T *helper* (CD4+) reconhecem macrófagos infiltrados no tumor através do MHC II, e convertem macrófagos secretores de IL-10 (macrófagos M1) em macrófagos secretores de IFN-γ (macrófagos M2), que inibem a angiogênese. Linfócitos T *helper* tipo 2 (Th2) produzem IL-4 que afeta fibroblastos do estroma tumoral e impede angiogênese. Células dendríticas promovem lise de células tumorais pela produção de perforinas e de ligante indutor de apoptose (TRAIL, *tumour-necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand*), e também apresentam antígeno para linfócitos T CD4+ e CD8+. Células NK reconhecem glicolipídeo na superfície de células apresentadoras de antígeno e desencadeiam morte de células tumorais via perforina e ligante indutor de morte (TRAIL). Linfócitos T CD4+ e CD8+, células dendríticas e células NK podem secretar INF-γ, que inibe a angiogênese. Linfócitos B produzem anticorpos que podem promover efeito antiproliferativo diretamente sobre células tumorais, ou induzir lise destas células via complemento ou ação de células dendríticas e NK que expressem receptores para IgG (ZITVOGEL et al, 2006). Todos estes mecanismos precisam ser superados pelas células tumorais para o câncer se desenvolver.

O escape das células cancerosas tanto das respostas do sistema imunitário inato quanto do adaptativo pode ocorrer pelo fato das células tumorais conseguirem selecionar variantes celulares não-imunogênicas (processo denominado *immunoselection* ou *immunoediting*) ou conseguirem suprimir ativamente a resposta imunitária (processo denominado *immunosubversion*) (ZITVOGEL et al, 2006). De acordo com SWANN & SMYTH (2007), o fenômeno de *cancer immunoediting* leva em conta a observação de que o sistema imunitário protege o hospedeiro do desenvolvimento de tumores e também pode promover o crescimento tumoral. Segundo eles, este fenômeno é composto de três fases: fase de eliminação, quando a vigilância imunitária consegue destruir as células tumorais; fase de equilíbrio, quando

as células tumorais e imunitárias entram em um equilíbrio dinâmico que conserva a expansão tumoral sob controle; e fase de escape, quando as células tumorais desenvolvem-se ou por apresentarem reduzida imunogenicidade, ou por comprometerem grande número de possíveis mecanismos imunosupressores que atenuam as respostas imunitárias, levando ao aparecimento do tumor em crescimento.

As funções do sistema imunitário podem ser influenciadas pelo estado nutricional. Como componentes cruciais nas dietas, os lipídeos são substâncias que exercem profundo efeito na modulação do sistema imunitário e da inflamação, o que não é surpreendente uma vez que grande número de compostos modulatórios são derivados da hidrólise de fosfolipídeos de membrana pela ação de fosfolipases (fosfolipase A_2, que forma prostaglandinas e leucotrienos; fosfolipase C, que forma diacilglicerol; fosfolipase D, que forma ácido fosfatídico) e esfingomielinases (que formam ceramida) (GRIMBLE, 1998; PABLO *et al*, 2000). Além disso, diferentes lipídeos fornecidos pela dieta e que são inseridos nos fosfolipídeos de células de defesa promovem alteração de fluidez na membrana, e, conseqüentemente, alteração da localização e função de proteínas de membrana, o que modifica a habilidade da célula de responder a estímulos (CALDER, 2001a; CALDER, 2007).

1.3 ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS ÔMEGA-3

Ácidos graxos poliinsaturados são aqueles que apresentam duas ou mais duplas ligações em sua cadeia hidrocarbônica, sendo que os ácidos graxos da família ômega-6 (ω-6) apresentam a primeira dupla ligação no sexto átomo de carbono, contando-se a partir do carbono ômega (extremidade metil da molécula). Os ácidos graxos da família ômega-3 (ω-3), por sua vez, apresentam a primeira insaturação no terceiro átomo de carbono. O ácido linoléico (18:2n-6) é um importante ácido graxo da família ω-6 contendo 18 átomos de carbono e 2 duplas ligações; já o ácido α-linolênico (18:3n-3) pertence à família dos ácidos graxos ω-3 e apresenta 18 átomos de carbono e 3 duplas ligações. Estes dois ácidos graxos dão início a duas importantes famílias de ácidos graxos, as quais não podem ser sintetizadas por mamíferos, incluindo os seres humanos, portanto devem ser obtidos da dieta, por este fato são denominados ácidos graxos essenciais (ROSE & CONNOLY, 1999; DOMMELS et al, 2002).

Diferentes ácidos graxos poliinsaturados podem ser formados por mais de uma via biossintética. Nos animais, o ácido linoléico pode ser obtido de plantas pela dieta, e

ser sucessivamente convertido em ácido γ-linolênico e ácido araquidônico, ambos ácidos ω-6. O ácido α-linolênico também pode ser obtido da dieta e pode ser convertido em ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA), ambos da família ω-3 (TAPIERO et al, 2002) (Figura 2).

O ácido araquidônico (AA) e o ácido eicosapentaenóico (EPA) são mobilizados da membrana celular pela ação de enzimas, especialmente pela fosfolipase A_2 (PLA_2), e subseqüentemente metabolizados pelas enzimas ciclooxigenase (COX) ou lipooxigenase (LOX) em eicosanóides. Prostaglandinas e tromboxanas são produzidas pelas enzimas ciclooxigenases (COX-1 e COX-2), enquanto leucotrienos, lipoxinas, ácido hidroxieicosatetraenóico (HETE) e ácido hidroperoxieicosatetraenóico (HPETE) são produzidos pelas enzimas lipoxigenases que podem ser de três tipos (5-, 12- e 15-LOX) (Figura 2).

Os ácidos linoléico e α-linolênico, e os seus derivados de longas cadeias hidrocarbônicas, ácido araquidônico e ácido eicosapentaenóico, respectivamente, são importantes componentes de membranas celulares animais e vegetais. Quando indivíduos ingerem óleo de peixe, peixe, EPA e seu derivado DHA, substituem parcialmente os ácidos graxos ω-6, especialmente o ácido araquidônico, nas membranas de provavelmente todas as células (SIMOPOULOS, 2002, CALDER et al, 2002).

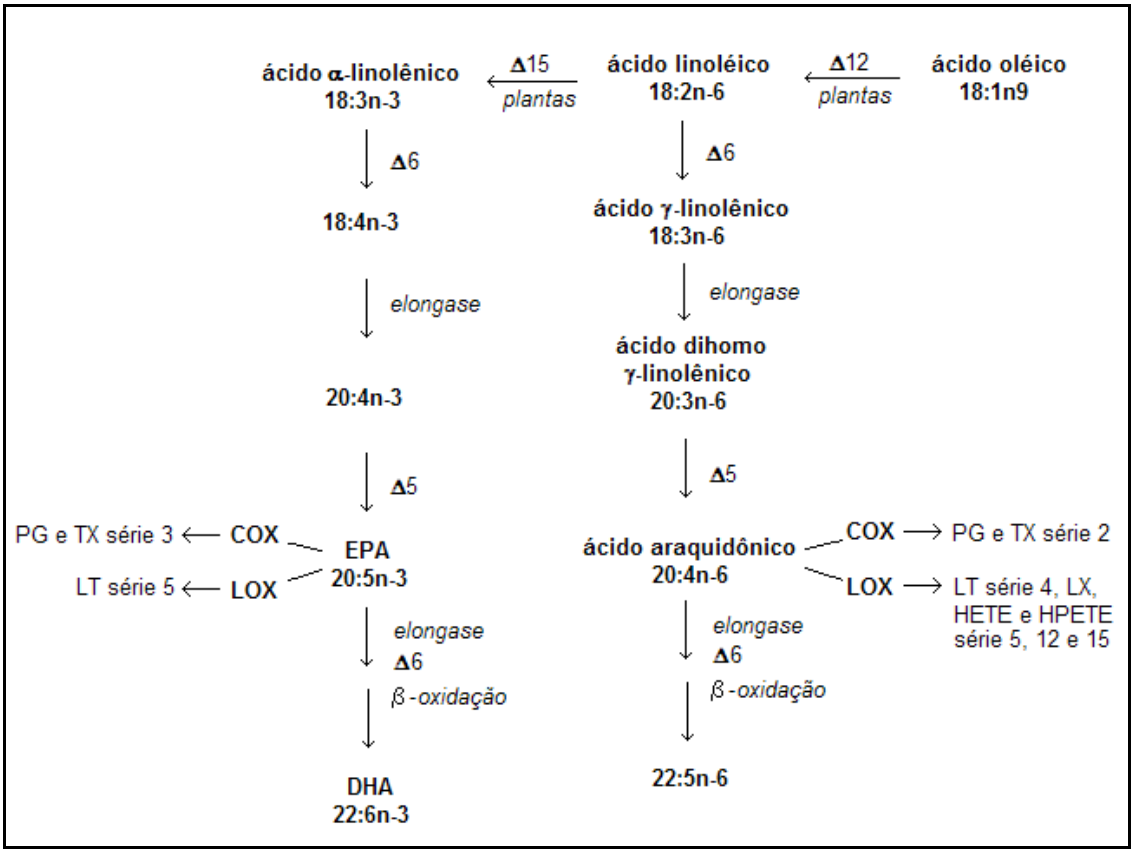

Figura 2: Metabolismo de ácidos graxos poliinsaturados.

18:3n-6 → ácido graxo com 18 átomos de carbono, 3 duplas ligações, sendo que a primeira dupla ligação, começando-se pela extremidade metil do ácido, está entre os carbonos 6 e 7; Δ, desaturase; COX, cicloxigenase; LOX, lipoxigenase; PG, prostaglandina; LT, leucotrieno; TX, tromboxano; LX, lipoxina; HETE, ácido hidroxieicosatetraenóico; HPETE, ácido hidroperoxieicosatetraenóico. FONTE: Calder, 2001a.

Os alimentos de origem marinha apresentam grande quantidade de ácidos graxos ω-3, os quais são encontrados no plâncton e em algas que servem como alimento para os peixes. O ácido linoléico (ω-6) presente na dieta é considerado a principal fonte de ácido araquidônico, embora carnes magras e carnes gordurosas sejam fontes diretas de ácido araquidônico (DOMMELS et al, 2002). Mesmo sabendo-se que peixes e óleos de peixe são fontes importantes de ácidos graxos ω-3, o conteúdo destes ácidos graxos é determinado pelo tipo de alimento disponível para o animal e isto é influenciado fortemente pela região geográfica na qual os peixes vivem, pela estação do ano, e por outros fatores (ROSE & CONNOLLY, 1999).

Nos mamíferos os ácidos graxos ω-3 e ω-6 não são interconversíveis pela falta da enzima ω-3 desaturase, portanto ácidos graxos ω-6 ingeridos em quantidade não

podem ser convertidos em ω-3. Sendo assim, a incorporação de ácidos graxos ômega-3 nas membranas celulares depende de adequadas concentrações destes ácidos graxos na dieta (McENTEE & WHELAN, 2002).

A metabolização dos ácidos graxos ω-6 e ω-3 depende de algumas enzimas em comum. Sabe-se que a enzima desaturase Δ6 apresenta maior afinidade por ácidos graxos poliinsaturados ω-3, tanto que quando há maior ingestão destes ácidos graxos, estes são preferencialmente metabolizados, reduzindo o metabolismo dos ácidos graxos ω-6 (Figura 3).

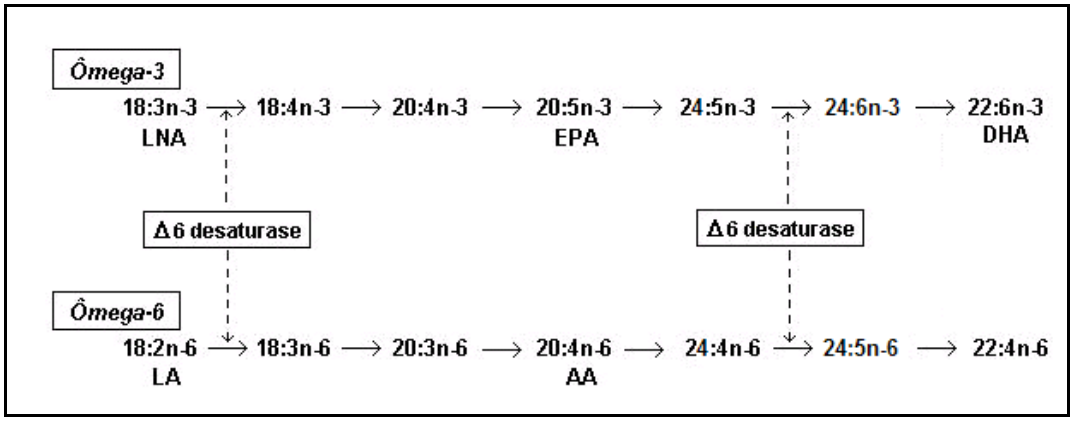

Figura 3: Metabolização de ácidos graxos ω-6 e ω-3.

LA – ácido linoléico; LNA – ácido α- linolênico; AA – ácido araquidônico; EPA – ácidos eicosapentaenóico; DHA – ácido docosahexaenóico. FONTE: Rose & Connoly, 1999.

Em outras palavras, a suplementação alimentar de ácidos graxos ω-3 tais como α-linolênico, ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) reduz a produção de ácido araquidônico (DOMMELS *et al*, 2002). A capacidade de dieta rica em ácidos graxos ω-3 reduzir a conversão de ácido linoléico em ácido araquidônico não depende apenas da quantidade de ácidos graxos ω-3 ingerida, mas também da quantidade de ácidos graxos ω-6 presentes na dieta (ROSE & CONNOLLY, 1999). Sabe-se que a conversão de ácido α-linolênico em EPA e DHA é pouco eficiente, e a enzima desaturase Δ6 parece ser o passo limitante uma vez que é utilizada também para a metabolização de ácidos graxos ω-6. Desta forma, há consenso de que o modo mais efetivo para aumentar no plasma e nos tecidos a concentração de um ácido graxo ω-3 em particular, é administrar na dieta este ácido graxo específico (BERQUIN et al, 2008). Considerando que os ácidos araquidônico e eicosapentaenóico apresentam

efeitos opostos na modulação da inflamação, é importante determinar a razão ω-6/ω-3 ingerida, e não apenas a concentração absoluta de cada família (TAPIERO et al, 2002).

1.3.1 Ácidos graxos ω-3 e suas ações

A nutrição humana, atualmente, é baseada em alta proporção de ácidos graxos ω-6, encontrados principalmente em cereais como milho, trigo e arroz, em detrimento do consumo de ácidos graxos ω-3. A atual dieta ocidental atende a uma razão ω-6/ω-3 de 15-30:1, ao invés de 1-4:1 como presumivelmente foi a alimentação dos nossos ancestrais. SIMOPOULUS (2002) relata que os genes da espécie humana de hoje são similares aos de nossos ancestrais há 40 milhões de anos atrás, mas as pessoas atualmente vivem em ambiente nutricional que difere daquele para o qual nossa constituição genética foi selecionada. A quantidade de ácidos graxos ω-6 ingeridas por nossos ancestrais era muito menor (razão ω-6/ω-3 de 2-4:1) que a quantidade ingerida pela sociedade contemporânea (razão ω-6/ω-3 de 12:1). Estas rápidas mudanças em nossa dieta estão diretamente correlacionadas com o aumento da incidência de doenças crônicas degenerativas tais como a aterosclerose, hipertensão arterial, diabetes e certos tipos de câncer.

Pesquisas pioneiras, a fim de elucidar a influência da alimentação no aparecimento e desenvolvimento de doenças, foram realizadas por cientistas dinamarqueses que relataram que o elevado consumo de peixe, rico em ácidos graxos ω-3, por esquimós da Groenlândia levava à significativa diminuição de colesterol LDL na circulação sangüínea destes indivíduos, quando comparados com esquimós habituados à dieta típica do leste europeu. Estes achados despertaram grande interesse na pesquisa dos efeitos dos ácidos graxos poliinsaturados tipo ω-3 sobre a saúde humana (SIDHU, 2003). É sabido que ácidos graxos poliinsaturados ω-3 são importantes no desenvolvimento normal do cérebro (NEURINGER et al, 1988), como suplemento dietético na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares crônicas (SIMOPOULOS, 1991), no tratamento de artrites (KREMER, 1991), no tratamento de doenças auto-imunes (SIMOPOULUS, 2002b, CALDER et al, 2002) e no tratamento da diabete melito (MALASANOS & STACPOOLE, 1991, EBBESSON et al, 2005). Estudos epidemiológicos investigações em animais e mecanismos experimentais *in vitro* com estes ácidos graxos têm demonstrado que eles apresentam efeitos preventivos contra o câncer, efeitos de supressão de tumores e efeitos coadjuvantes positivos no

tratamento da doença (ROSE & CONNOLY, 1999; PIZATO et al, 2005; MUND et al, 2007). Estudos clínicos indicam que a dose ótima ou razão ω-6:ω-3 a ser ingerida varia entre 1:1 a 4:1, dependendo da doença considerada, uma vez que muitas das doenças crônicas prevalentes nas culturas ocidentais são multifatoriais. Estes estudos também revelaram que é necessário diminuição da ingestão de ácidos graxos ω-6, e concomitante aumento da ingestão de ácidos graxos ω-3 a fim de se encontrar a razão ω-6:ω-3 preconizada (SIMOPOULOS, 2002).

Em modelo animal, a suplementação crônica com óleo de peixe promoveu redução de até 60% no tamanho dos tumores de Walker 256 quando comparada à suplementação crônica com gordura saturada; também aumentou o tempo de sobrevida e impediu o desenvolvimento de caquexia. Ainda, os animais suplementados com óleo de peixe reduziram a concentração de lactato no sangue, preservaram as reservas de glicogênio no fígado e músculos esqueléticos, e a concentração de glicose sangüínea foi próxima dos animais sem tumor (TOGNI et al, 2003; PINTO Jr et al, 2004; PIZATO et al, 2005; FOLADOR et al, 2006). Apesar de todos estes achados até o momento não são conhecidos integralmente os mecanismos pelos quais os ácidos graxos ω-3, presentes no óleo de peixe, provocam estes efeitos.

A atenuada perda de peso e o reduzido crescimento tumoral em animais suplementados com ácidos graxos ômega-3 também foram demonstrados em outros estudos (WHITEHOUSE et al, 2001; YAM et al, 2001; RAMOS et al, 2004; KOBAYASHI et al, 2006).

A administração de óleo de peixe a pacientes com câncer avançado promoveu estabilização ou ganho de peso corpóreo, manutenção da massa magra, redução da produção de citocinas inflamatórias e melhora na qualidade de vida (WIGMORE et al, 1996; BARBER, 2001; GRIMBLE, 2003; BURNS et al, 2004; GIACOSA & RONDANELLI, 2008). READ et al (2007) relataram decréscimo da concentração plasmática da proteína de fase aguda, proteína C-reativa, produzida pela ingestão de EPA como suplemento nutricional.

Pacientes com câncer pancreático que consumiram 2g de EPA por dia durante 3 semanas apresentaram queda na produção de IL-6, aumento na concentração de insulina sérica, diminuição da razão cortisol:insulina, e queda na concentração de fator indutor de proteólise (*proteolisis inducing factor*-PIF). Estes resultados foram observados em associação a ganho de peso, indicando que os ácidos graxos ω-3

exercem papel importante no controle da caquexia (BARBER *et al*, 2001; BARBER, 2001).

Resultados obtidos com a ingestão de ácidos graxos ω-3 indicam que estes compostos reduzem risco de aparecimento de diversos tipos de câncer. A influência dos ácidos graxos ômega-3 sobre o surgimento de câncer oral, faringeano, esofagiano, intestinal, mamário e ovariano foi avaliada em um estudo de 10 anos desenvolvido na Itália e Suíça. Este estudo, baseado em entrevistas com pacientes com diagnóstico histológico de câncer e também com pacientes internados por outros motivos que não oncológicos, sugere que a ingestão de ácidos graxos ω-3 diminui o risco de aparecimento destes tipos de câncer (TAVANI *et al*, 2003). Estudos conduzidos em roedores indicam que a incidência de câncer de cólon induzido quimicamente é significativamente menor nos animais alimentados com dieta enriquecida com óleo de peixe do que nos animais alimentados com alto teor de ácidos graxos saturados e outros óleos vegetais (ROYNETTE et al, 2004). GOODSTINE et al (2003) investigaram a influência dos ácidos graxos ω-3 sobre câncer de mama em 1119 mulheres americanas, das quais metade possuía diagnóstico confirmado da doença. Para estes pesquisadores ficou claro que a baixa razão entre ácidos graxos ω-6:ω-3 ingerida foi significantemente associada com o mais baixo risco de aparecimento deste tipo de câncer, especialmente em mulheres na fase de pré-menopausa.

Vários estudos sugerem que ácidos graxos ω-3 apresentam efeito antiinflamatório. A inflamação é caracterizada pela produção de citocinas inflamatórias e eicosanóides pró-inflamatórios derivados do ácido araquidônico, e os ácidos graxos ω-3 têm a habilidade de diminuirem a produção destes compostos (CALDER, 2004; WU et al, 2004; WHITING et al, 2005; CALDER, 2007).

Animais de laboratório são alimentados com ração comum e humanos nutridos com dieta típica dos países ocidentais apresentam, predominantemente, ácido araquidônico (ω-6) nos fosfolipídeos de células monucleares, os monócitos e os linfócitos. No entanto, a administração oral de óleo de peixe, rico nos ácidos graxos poliinsaturados do tipo ω-3, particularmente eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), eleva de maneira dose-dependente e tempo-dependente a concentração destes ácidos graxos nas membranas de monócitos e linfócitos, indicando que os lipídeos fornecidos na dieta interferem diretamente na composição lipídica de células de defesa. A conseqüência direta deste fato é que, dependendo da

dieta, os lipídeos podem provocar alterações nas propriedades físicas das membranas, afetar as vias de sinalização intracelular, e alterar o padrão de eicosanóides (a partir de EPA) e docosanóides (a partir de DHA) produzidos nas células, interferindo nas respostas imunitárias. EPA, disponível nas membranas lipídicas das células, compete com o ácido araquidônico pela via biossintética de eicosanóides, formando eicosanóides menos pró-inflamatórios (prostaglandinas e tromboxanas da série 3, e leucotrienos da série 5); estes efeitos podem ajudar a explicar, parcialmente, o efeito antiinflamatório dos ácidos graxos ômega-3 (CALDER, 2004; PRESCOTT & STENSON, 2005; SINGER et al, 2008) (Figura 2).

Além disso, recentes estudos apontam outras moléculas derivadas dos ácidos graxos ω-3, as resolvinas, como importantes moléculas efetoras do efeito antiinflamatório. Estas moléculas atenuam a migração de neutrófilos e a injúria tecidual provocada durante a inflamação (PRESCOTT & STENSON, 2005; SINGER et al, 2008).

Aumentada suplementação dietética com ácidos graxos ω-3 induz ao decréscimo nas concentrações de ácido araquidônico em todos os tecidos bem como na massa tumoral, levando a redução na produção de PGE_2 e eicosanóides relacionados, e provocando diminuição da massa tumoral (McENTEE & WHELAN, 2002; TOGNI *et al*., 2003; SIDHU, 2003; MUND et al, 2007). Em células tumorais, prostaglandinas e leucotrienos da série 2, e tromboxanas da série 4, gerados a partir de ácido araquidônico estimulam a proliferação de células tumorais (especialmente a prostaglandina E_2). Em contraste, EPA gera prostaglandinas e tromboxanas da série 3 e leucotrienos da série 5, os quais diminuem o crescimento tumoral e estimulam a apoptose (ROYNETTE *et al*, 2003).

Dietas ricas em gordura resultam em diminuição da atividade linfocitária comparadas a dietas pobres em gordura, mas este efeito depende da quantidade de gordura usada nestas dietas bem como sua fonte. É também sabido que a variação na composição de ácidos graxos da dieta, em diferentes concentrações, pode impactar a função dos linfócitos. Estudos em modelos animais e *in vitro* indicam que ácidos graxos saturados apresentam efeito limitado sobre o sistema imunitário, enquanto que ácidos graxos poliinsaturados têm capacidade de modular as funções linfocitárias. Dentre estes ácidos graxos insaturados, os ácidos γ-linolênico, dihomo-γ-linolênico, araquidônico, EPA e DHA são particularmente potentes, e EPA e DHA são geralmente

considerados como antiinflamatórios por reduzirem a atividade dos linfócitos. No entanto, este efeito antiinflamatório depende da quantidade administrada e do tempo de exposição das células aos ácidos graxos (JEFFERY et al, 1998; CALDER et al, 2002). A imunomodulação provocada pelos ácidos graxos saturados, ainda não é bem entendida (BRASSARD et al 2007).

A administração diária de 1g de óleo de peixe/kg de peso corpóreo por 10 semanas a ratos não portadores e portadores de tumor de Walker 256 provocou redução da proliferação de linfócitos do baço e timo quando comparados com ratos não suplementados. Neste mesmo estudo, dietas ricas em ácidos graxos ω-6 (nas proporções de 30:1 e 60:1, ω-6:ω-3) provocaram aumento da proliferação de linfócitos do baço, timo e linfonodos mesentéricos em relação aos animais não suplementados (PIZATO et al, 2006).

Outros trabalhos mostram o efeito dos ácidos graxos ω-3 sobre os linfócitos, tanto em modelo animal quanto em estudos clínicos. A resposta proliferativa de linfócitos associados ao intestino de ratos (linfonodos mesentéricos) foi avaliada sob a influência de ácidos graxos ω-6 e ω-3 suplementados durante 2 semanas. A dieta rica em ω-3 (19% de óleo de peixe na ração) diminuiu a proliferação linfocitária estimulada por citocinas inflamatórias, ao contrário dos ácidos graxos ω-6 (20% de óleo de milho), os quais contribuíram para o aumento da proliferação (KURAKTO, 2000). A suplementação diária com 10g de EPA/kg de peso corpóreo a camundongos durante 10 e 24 dias também provocou redução da proliferação de linfócitos do baço estimulados com o mitógeno concanavalina A (BARBER et al, 2005). Estudos *in vitro* têm mostrado que ácidos graxos poliinsaturados, especialmente EPA, inibem a proliferação de linfócitos, a produção de citocinas e a degranulação de linfócitos T citotóxicos (CALDER, 2001a). Estes dados explicam os efeitos positivos da administração de ácidos graxos ω-3 no tratamento de doenças que envolvem uma resposta imunitária inapropriadamente ativada e no aumento da sobrevida de transplantes. Os ácidos graxos ω-3 por modularem o sistema imunitário ajudam a entender os seus efeitos benéficos em condições inflamatórias sem perda da vigilância imunológica antígeno-específica (BARBER et al , 2005)

Uma marcada redução na geração dos segundos mensageiros intracelulares diacilglicerol e ceramida foi observada em células linfocitárias cultivadas obtidas de ratos alimentados com EPA e DHA. Este pode ser um mecanismo para a inibição da

proliferação de linfócitos provocada pela dieta enriquecida com óleo de peixe. Também foi observado que células cultivadas na presença de EPA e DHA produziram IL-2 em menores concentrações do que células cultivadas na ausência de ácidos graxos ou na presença de ácidos graxos saturados (CALDER, 1998). A incubação de linfócitos obtidos de sangue humano na presença de EPA ou DHA reduziu a expressão de moléculas de adesão (L-selectinas) na superfície dos linfócitos, enquanto que na presença de ácido araquidônico não houve influencia na expressão destas moléculas. Estas moléculas de adesão parecem estar envolvidas em várias doenças inflamatórias agudas e crônicas (CALDER, 1998).

É bem aceito que quatro possíveis mecanismos possam explicar os efeitos dos ácidos graxos sobre a função de linfócitos: 1) modulação do metabolismo de eicosanóides, os quais podem agir diretamente sobre os linfócitos; 2) modulação da expressão gênica via interação com receptores nucleares tais como PPARγ; 3) interferência nas vias de sinalização intracelular após ativação linfocitária; e 4) modificação da composição da membrana lipídica e da organização dos *lipid rafts* que podem afetar a função dos receptores transmembrana e/ou o esqueleto protéico da membrana (BRASSARD et al, 2007).

Estudos *in vitro* envolvendo linhagens humanas de células de tumores coloretais (Caco-2 e HT-29) cultivadas na presença de óleo de peixe complexado à soroalbumina (200µmol de suplemento/L) mostraram que isto induziu a apoptose destas células, diminuiu significativamente a proliferação destas, estimulou a diferenciação celular e provocou diminuição na expressão de COX-2, bem como na expressão de Bcl-2, gene cuja proteína inibe a apoptose (LLOR et al, 2003). Em situação *ex vivo* também foi demonstrado que a suplementação com óleo de peixe foi capaz de aumentar a apoptose de células de tumor de Walker 256 de animais suplementados cronicamente por 10 semanas com 1g de óleo/kg peso corpóreo (MUND, et al, 2007). Também em estudos *in vitro* onde o óleo de peixe foi complexados com soroalbumina e acrescentados à cultura de células de tumor ascítico de Walker (OLIVEIRA, 2006) foi demonstrado o mesmo fenômeno. Outros estudos *in vitro* investigando o efeito de ácidos graxos ω-3 sobre apoptose de linfócitos B e T de pacientes saudáveis, não registraram influência destes ácidos graxos sobre a população celular em questão (SCHEINICHEN et al, 2003).

Os efeitos preventivos dos ácidos graxos ω-3 contra carcinogênese coloretal foram investigados através da intervenção dietética em pacientes polipectomizados. Através da redução da ingestão de gorduras totais, redução da ingestão de ácidos graxos ω-6 e aumento da ingestão de ácidos graxos ω-3 por um período de 2 anos, foi observada promoção de apoptose no tecido coletado em polipectomia anual de controle, bem como aumento da expressão do gene Bax, cujo produto induz a morte celular programada (CHENG et al, 2003).

Ácidos graxos ω-3 podem prevenir o desenvolvimento e a progressão de tumores malignos primários pela formação de produtos de lipoperoxidação, que são gerados em grandes quantidades em células que contêm estes ácidos graxos. O efeito inibitório dos ácidos graxos ω-3 sobre a proliferação celular pode ser mediado por estes produtos de lipoperoxidação (VAN NOORDEN et al,1998; OLIVEIRA, 2006; MUND et al, 2007).

Mesmo havendo estudos que sugerem que a peroxidação de ácidos graxos ω-3 incorporados nas membranas celulares seja provavelmente um mecanismo para a supressão do crescimento tumoral, em indivíduos suplementados com estes ácidos graxos, há indícios de que enzimas antioxidantes podem estar envolvidas no processo. Glutationa peroxidase tem sido descrita como a mais importante enzima para a estabilização de reações oxidativas nas células. Em células com alta suscetibilidade à lipoperoxidação, como células tumorais de animais alimentados com óleo de peixe, adequada atividade da glutationa peroxidase é requerida para neutralizar os hidroperóxidos formados, interromper a cadeia de reações peroxidativas e reduzir a geração de radicais livres. A suplementação com óleo de peixe parece reduzir a atividade da glutationa peroxidase em tumores, aumentando a sensibilidade das células tumorais a agentes quimioterápicos, sem reduzir a concentração desta enzima em células não-tumorais, indicando que células normais respondem à dieta com óleo de peixe diferentemente do que células tumorais, e que células normais podem manter a atividade antioxidante da glutationa peroxidase (HARDMAN et al, 2002; McENTEE & WHELAN; 2002). No entanto, há resultados contraditórios a este respeito visto que dietas contendo diferentes ácidos graxos com mesmo grau de insaturação, quando administradas a animais tiveram efeitos significativamente diferentes sobre a tumorigênese.

A angiogênese é um processo normal de crescimento de novos vasos sangüíneos a partir de células endoteliais pré-existentes, mas pode ser deletério quando está associado à inflamação, crescimento tumoral e metástase. Tumores com maior densidade de microvasos são mais malignos e invasivos. Recentemente tem sido proposto que a proteção contra câncer de cólon pode ser parcialmente devida à inibição da angiogênese. Ácidos graxos ω-3 diminuem a expressão da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) e conseqüentemente a geração de óxido nítrico, o qual promove a angiogênese (ROYNETTE et al, 2004).

Estes achados resumem parte dos efeitos benéficos dos ácidos graxos ômega-3 presentes em grande quantidade no óleo de peixe, e justificam por que estes compostos continuam sendo estudados. A capacidade destes ácidos graxos em reduzir o crescimento de muitos tumores, de acordo com as investigações descritas na literatura, parece levar a crer que ocorra ações diretas sobre a célula tumoral mais eficientemente do que ações em outras células, como às do sistema imunitário, contudo não se pode descartar a participação deste último no processo.

Outro peixe que tem sido investigado quanto ao benefício de seu consumo para a espécie humano é o tubarão. O fígado de tubarão é rico em lipídeos denominados alquilgliceróis e estes apresentam significativos efeitos sobre a resposta imunitária cuja ação tem sido menos estudada que à do óleo de peixe.

1.4 ÓLEO DE FÍGADO DE TUBARÃO

O conteúdo lipídico das células de fígado de tubarão de diversas espécies tem sido estudado e relatado na literatura desde os meados de 1950. Deste conteúdo lipídico, cerca de 30% a 50% corresponde a moléculas de alquilgliceróis, gorduras constituídas por uma cadeia hidrocarbônica, saturada ou insaturada, unida por ligação do tipo éter a uma das hidroxilas do glicerol (BROHULT et al, 1977; HALLGREN et al, 1978; NAVARRO-GARCIA et al, 2000). Uma das principais fontes de alquilgliceróis é o fígado do tubarão *Somnious microcephalus* (*greenland shark*), seguido pelas espécies *Chimaera monstrosa* (*small shark*) e *Squalus acanthias* (*dog fish*) (PUGLIESE et al, 1998). Alquilgliceróis pertencem a um grupo maior de compostos que apresentam ligação éter em sua estrutura, os éteres lipídicos. Esqualeno, precursor esteróide do colesterol, e esqualamina, esteróide aminado (HAO et al, 2003; PIETRAS et al, 2005), são outras moléculas de interesse biológico encontradas neste óleo.

Os alquilgliceróis mais comuns são denominados de álcoois quimil, batil e selaquil, devido a suas origens das famílias de espécies marinhas *Chimaeroidei*, *Batoidei* e *Selachoidei*, respectivamente (Figura 4). O número de átomos de carbono na cadeia alifática varia de 16 a 18, e o número de átomos de hidrogênio, de 33 a 35.

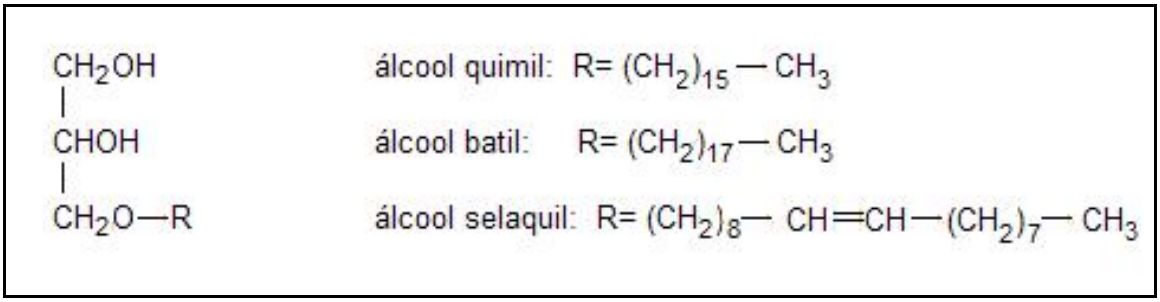

Figura 4: Estrutura química das moléculas de alquilglicerol mais comuns.

Os alquilgliceróis podem ser encontrados em tecidos hematopoiéticos de mamíferos, particularmente na medula óssea vermelha, e também no leite materno humano. Em fontes naturais, os alquilgliceróis são geralmente encontrados na forma esterificada, ou seja, ligados a ácidos graxos, principalmente poliinsaturados, unidos por ligação éster às duas hidroxilas livres do glicerol. Quando esterificadas com ácidos graxos, as moléculas de alquilglicerol são denominadas de alquildiacilgliceróis. Alquilgliceróis também podem fazer parte da estrutura dos fosfolipídeos de membrana (BROHULT, 1962) (Figura 5).

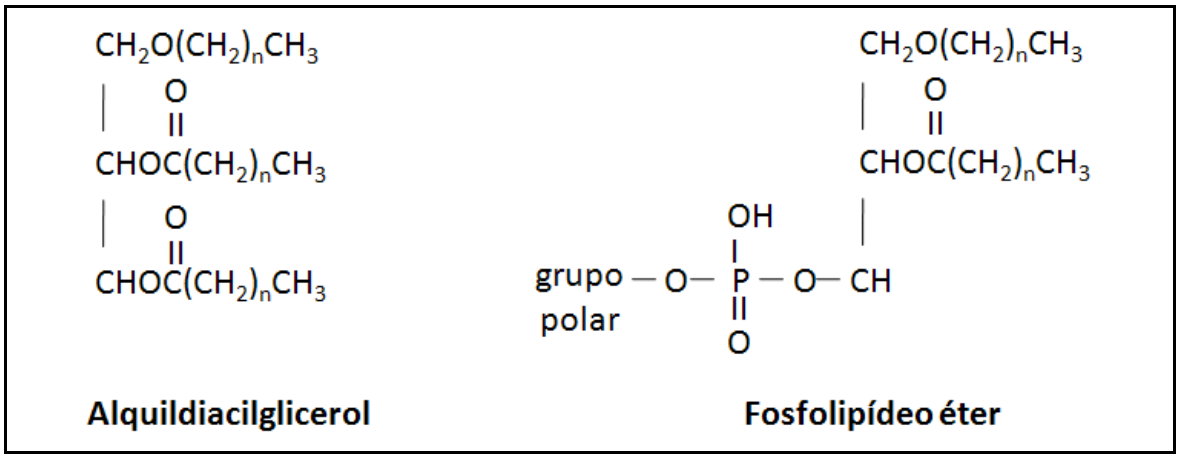

Figura 5: Estrutura química das moléculas que apresentam alquilglicerol em seus esqueletos carbônicos.

Algumas moléculas de alquilglicerol apresentam grupamento metóxi ($-OCH_3$) no início da sua cadeia alifática, substituindo um átomo de hidrogênio. Enquanto os alquilgliceróis em geral apresentam importante atividade biológica, os alquilgliceróis metóxi-substituídos são conhecidos por serem ainda mais potentes. Alguns dos mais antigos lipídeos metoxilados estudados foram alquilgliceróis metoxilados na posição 2 da cadeia alifática (Figura 6), descobertos por Hallgren *et al*, em óleo de fígado de tubarão, onde eles constituíam 4% do total de éteres de glicerol (HALLGREN et al, 1978; CARBALLEIRA, 2002). 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).

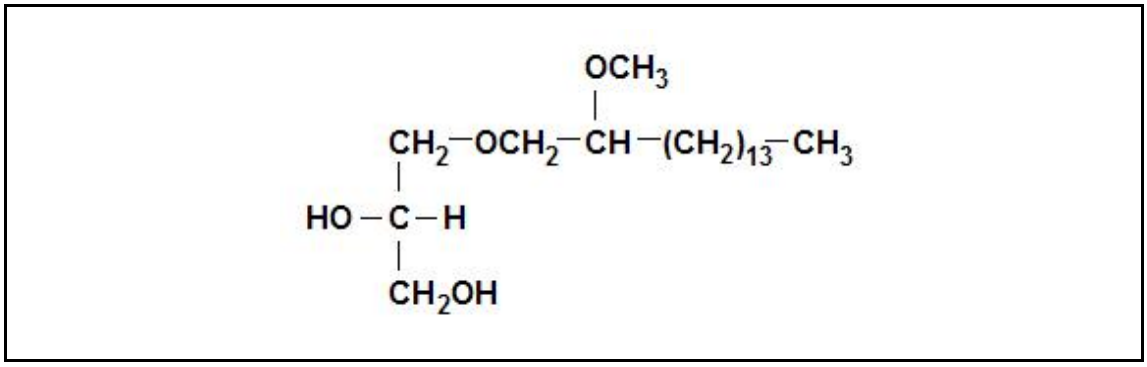

Figura 6: Estrutura química do 1-*O*-(2-metóxi)hexadecilglicerol, um alquilglicerol metóxi substituído encontrado no óleo de fígado de tubarão.

Na Europa, alquilgliceróis têm sido usados desde a década de 30, quando extratos lipídicos de medula óssea foram utilizados para tratar granulocitopenia. Foi mostrado mais tarde que era a fração não-saponificável da medula óssea que apresentava efeito sobre o aumento no número de leucócitos (PUGLIESE et al, 1998).

Os benefícios da ingestão de alquilgliceróis também foram verificados em casos de leucemia infantil, em 1952, em que os pacientes ingeriam gordura não saponificável obtida da medula óssea de gado como auxiliar do tratamento contra o câncer. Posteriormente foi mostrado que a fração da medula óssea vermelha responsável por estes efeitos correspondia aos alquilgliceróis presentes no tecido (BROHULT,1962).

A partir destes dados, estudos com pacientes portadoras de câncer de colo de útero submetidas a tratamento radioterápico e suplementadas com alquilgliceróis começaram a ser realizados. Observou-se que a maioria das pacientes apresentou

significativa redução da leucopenia e da trombocitopenia, efeitos normalmente provocados pela radioterapia (BROHULT,1962; BROHULT et al, 1970; BROHULT et al, 1977; BROHULT et al, 1978; BROHULT et al, 1979; BROHULT et al, 1986; KROTKIEWSKI et al, 2003) .

A administração de alquilgliceróis a pacientes portadoras de câncer de colo de útero antes do tratamento radioterápico resultou em significativa redução do crescimento tumoral, quando comparado à administração de alquilgliceróis após o início do tratamento radioterápico (BROHULT et al, 1978; BROHULT et al, 1986). A atividade antitumoral dos alquilgliceróis também foi relatada por outros autores (UNGER et al, 1987; HERRMANN & NEUMANN, 1986). Segundo pesquisas realizadas na década de 90, os alquilgliceróis estimulam respostas imunitárias tais como a produção de anticorpos (NGWENYA & FOSTER, 1991; MARIGNY et al, 2002). Estes e outros estudos mostraram que há alguma ação destes compostos sobre a resposta imunitária, estimulando-a (LINMAN, 1960; BROHULT,1962; BROHULT et al, 1970; BROHULT et al, 1977; BROHULT et al, 1978; BROHULT et al, 1979; BROHULT et al, 1986; PEDRONO et al, 2004a).

O aminoesterol esqualamina, molécula de pequeno peso molecular presente no óleo de fígado de tubarão, tem sido largamente estudada e tida como interessante inibidor de angiogênese (TEICHER et al, 1998; SILLS JR et al, 1998; SCHILLER et al, 1999; MARWICK , 2001; BHARGAVA et al, 2001; CHO & KIM, 2002; WILLIAMS et al, 2001; HAO et al, 2003; SHU et al, 2002; PIETRAS et al, 2005). Considerando que o crescimento progressivo e o espalhamento de tumores sólidos dependem da formação de adequado suprimento sangüíneo, moléculas com atividade antiangiogênica podem auxiliar no tratamento quimioterápico de tumores malignos, bem como reduzir o crescimento tumoral. Trabalhos sobre a interação da molécula de esqualamina com células endoteliais indicam que ela inibe uma proteína de membrana trocadora de íons H^+/Na^+, afetando o volume, o pH, o crescimento e a motilidade das células endoteliais, promovendo a inibição de sua proliferação (HAO et al, 2003; PIETRAS et al, 2005). A estrutura química da molécula está representada na Figura 7.

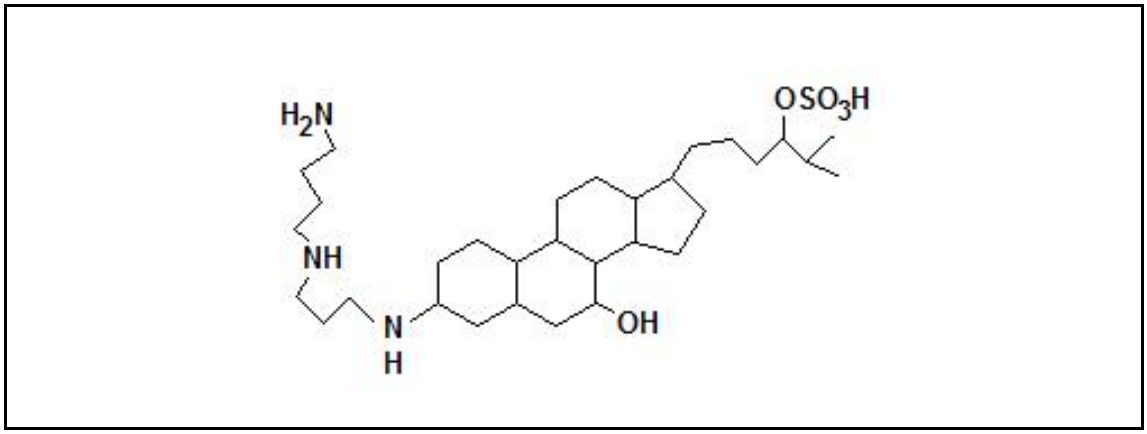

Figura 7: Estrutura química da molécula de esqualamina.

1.4.1 Estudos envolvendo éteres lipídicos

Em mamíferos, os alquilgliceróis vindos da dieta são absorvidos sem a quebra de sua ligação éter, e são usados como precursores de fosfolipídeos de membrana em diferentes tecidos. Os alquilgliceróis da dieta são incorporados preferencialmente nos fosfolipídeos fosfatidilcolina (1-O-alquil-2-acil-*sn*-glicero-3-fosfocolina) e fosfatidiletanolamina (1-O-alquil-2-acil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina). Sendo incorporados na membrana, estes lipídeos tornam-se disponíveis às células para serem usados como precursores de outras moléculas e exercer efeitos biológicos (REICHWALD & MANGOLD 1977; BLANK et al,1991; e MARIGNY *et al*.,2002).

A resposta imunitária provocada por alquilgliceróis tem sido avaliada em diferentes modelos de investigação. No estudo desenvolvido por OH & JADHAV (1994), a suplementação de alquilgliceróis sintéticos 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 (IgG e IgM) no plasma dos filhotes amamentados, sugerindo que os alquilgliceróis exercem função importante no desenvolvimento da resposta imunitária.

Além de estimular a maior produção de imunoglobulinas, a suplementação crônica com óleo de fígado de tubarão também levou à produção de níveis mais elevados de eritrócitos, bem como à maior concentração de hemoglobina no sangue periférico de fêmeas de suíno (MITRE et al, 2005). Este mesmo grupo de pesquisadores (MITRE et al, 2004) observou que a suplementação oral com óleo de

fígado de tubarão por 28 dias melhorou a motilidade e velocidade de espermatozóides *in vitro*, indicando que esta suplementação melhora a capacidade reprodutiva.

A ativação da resposta imunitária por alquilglicerol foi também verificada por YAMAMOTO & NGWENYA (1987) e HOMMA & YAMAMOTO (1990), que realizaram estudos *in vitro* com células peritoneais aderentes (macrófagos) e não-aderentes (linfócitos T e B), obtidas de camundongos, incubadas com dodecilglicerol, um alquilglicerol sintético de 12 carbonos. Nestes estudos, foi observado que o breve tratamento de uma mistura de linfócitos T, linfócitos B e macrófagos com dodecilglicerol, produziu significativa elevação da atividade fagocítica de macrófagos, e que esta atividade macrofágica foi dependente da participação dos linfócitos. Esta observação sugere que ocorre rápida comunicação de linfócitos para macrófagos durante o período de tratamento das células com dodecilglicerol, gerando como resultado, aumentada atividade fagocitária. Como macrófagos são células apresentadoras de antígeno, os alquilgliceróis incorporados na membrana de células tumorais podem ter potencializado a ação imunitária. NGWENYA & FOSTER (1991) observaram os mesmos resultados em estudos *in vitro* com células peritoneais de camundongos deficientes em linfócitos T (BALB/*c-nu/nu*) e de comundongos saudáveis. Os resultados mostraram a necessidade de linfócitos T para a ativação de macrófagos mediada por alquilgliceróis, e também a estimulação da produção de anticorpos induzida por estes compostos.

A administração diária de cápsulas de óleo de fígado de tubarão a humanos por um período de 4 semanas, elevou a resposta de neutrófilos na presença de bactérias, aumentou o nível do componente C4 do complemento no sangue, e promoveu aumento na produção de citocinas do tipo Th1 (IFN-γ, TNF-α e IL-2) por células mononucleares do sangue. Estes resultados, segundo os autores, foram devidos aos alquilgliceróis e esqualeno do óleo de fígado de tubarão, e sugerem que a suplementação diária com este óleo em altas doses é benéfica em infecções bacterianas, virais e fúngicas (LEWKOWICZ et al, 2005). SZOSTAK & SZOSTAK-WEGIEREK (2006) também enfatizam a capacidade de alquilgliceróis e esqualeno encontrados em óleo de fígado de tubarão modular o sistema imune para o combate a infecções e câncer.

PÉDRONO et al, (2004b) avaliaram o efeito de alquilgliceróis extraídos de óleo de fígado de tubarão sobre a sinalização intracelular de linfócitos T humanos (Jurkat *T lymphocytes*). Eles relataram que estes compostos eram capazes de interferirem no

influxo de Ca^{++} nas células. Foi encontrado que os alquilgliceróis estimulam o influxo de Ca^{++} do meio extracelular, parcialmente através de canais de Ca^{++} voltagem-dependentes. Os autores relacionaram este resultado com a capacidade dos alquilgliceróis provocarem despolarização da membrana plasmática. GROSMAN (2001), estudando o efeito de fosfolipídeos éteres em membranas plasmáticas de leucócitos, relatou que estes compostos inibem a enzima Ca^{++} ATPase, responsável pelo restabelecimento das baixas concentrações intracelulares de Ca^{++} após estimulação celular. A autora sugere que este efeito tenha sido devido ao acúmulo de éteres lipídicos nas membranas e conseqüente alteração do meio lipídico envolvendo a enzima, mais do que por ação direta sobre a enzima. A manutenção das concentrações intracelulares de Ca^{++} é fundamental para a função celular e os éteres lipídicos avaliados nestes dois estudos parecem contribuir diretamente para isso. Em 1990, PALMBLAD et al já haviam investigado a capacidade de diferentes éteres lipídicos provocarem aumento na concentração intracelular de Ca^{++} em neutrófilos. Estes autores concluíram que havia estreita relação entre a estrutura do lipídeo e sua capacidade de provocar tal efeito. Os autores relacionaram a habilidade dos éteres lipídicos em iniciar respostas oxidativas em neutrófilos com o influxo de Ca^{++}.

Estudos realizados com plaquetas de coelho e alquilgliceróis *in vitro* mostraram que a incubação de alquilgliceróis com as plaquetas inibiu parcialmente a ativação plaquetária e a liberação de [^{3}H]-serotonina estimulada por PAF (*platelet activating factor*), mas não provocou esta inibição quando a molécula estimuladora foi outra que não PAF. Segundo os autores, isto indicaria que a seletiva inibição dos alquilgliceróis sobre as plaquetas poderia resultar de um efeito antagonista destes compostos sobre o receptor de PAF. A ativação de plaquetas participa de mecanismos envolvidos em várias doenças, e pode exercer importante papel no crescimento metastático de células cancerosas (PEDRONO et al, 2004a). Alquilgliceróis podem também ser precursores de PAF (PUGLIESE et al, 1998).

KROTKIEWSKI et al (2003), ao incubar células tumorais humanas de ovário, próstata e mama com óleo de fígado de tubarão (ECOMER®), observaram aumento na porcentagem de células apoptóticas de ovário e próstata, enquanto que as células tumorais mamárias aumentaram seu grau de necrose. Os autores concluíram com o estudo que os alquilgliceróis e seus metóxi-derivados presentes no óleo de fígado de tubarão exerceram claro efeito apoptótico/necrótico sobre células tumorais *in vitro*. Recentemente estudos envolvendo éteres lipídicos e sua capacidade de incorporação

em modelos de bicamadas lipídicas foram realizados e relacionados com a sua atividade pró-apoptótica. HECZKOVÁ & SLOTTE (2006) demonstraram que éteres lipídicos estabilizam domínios de membrana ricos em esfingomielina e esteróis em altas temperaturas, sugerindo que a associação de éteres lipídicos com *rafts* de membrana é possível e que as propriedades destes rafts são drasticamente alteradas por estes éteres. Estes estudos sustentam a idéia de que éteres lipídicos, ao estabilizarem rafts, possibilitam a translocação de receptores Fas para estes domínios, possibilitando o desencadeamento de apoptose.

Os efeitos de éteres lipídicos sobre células tumorais pressupõem a incorporação destas moléculas nas células. Tumores de animais e de humanos contêm maior quantidade de éteres lipídicos que tecidos normais segundo PINCHUK et al (2006), e baseados em estudos desenvolvidos na década de 1960, estes pesquisadores avaliaram a influência do comprimento da cadeia carbônica dos éteres lipídicos sobre a sua capacidade de incorporação em membranas de células tumorais, utilizando éteres lipídicos sintéticos marcados com iodo radioativo. Cadeias com 7 a 12 átomos de carbono foram rapidamente eliminadas e não retidas pelo tecido tumoral, enquanto que cadeias com 15 a 18 átomos de carbonos foram mais facilmente retidas. Considerando a capacidade de captação de éteres lipídicos por células tumorais, estes autores avaliaram neste estudo a utilização de éteres lipídicos marcados radioativamente como instrumento diagnóstico para visualização de tumores em exames laboratoriais.

Como mencionado em alguns estudos citados acima, alquilgliceróis sintéticos têm sido estudados em diversos modelos. Estes produtos sintéticos são cogitados como adjuvantes em formulações de vacinas pela sua propriedade de estimular respostas imunitárias incluindo o aumento da produção de anticorpos (ACEVEDO et al, 2006).

Nos dados encontrados na literatura, é visível que a estimulação da resposta imunitária tem sido o alvo principal de investigação envolvendo óleo de fígado de tubarão, principal fonte natural de alquilgliceróis. Porém não é conhecido o efeito do uso crônico deste óleo, ofertado desde a infância até a vida adulta, sobre a resposta imunitária em situação patológica de surgimento e crescimento tumoral. Da mesma forma, são desconhecidos os efeitos do óleo de fígado de tubarão sobre caquexia provocada por tumor. Estas investigações podem contribuir para o melhor entendimento da ação dos éteres lipídicos e permitir futuras aplicações considerando o potencial benefício propiciado por eles.

2. OBJETIVOS

Estudos em diversos modelos sugerem que a suplementação com óleo de peixe reduz o crescimento tumoral por uma possível atuação direta sobre as células tumorais, e que é marcante a ação do óleo de fígado de tubarão na capacidade de melhorar a atividade imunitária. Considerando que óleo de peixe e óleo de fígado de tubarão atuam de forma diferente, porém positiva contra o desenvolvimento do câncer, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito da associação da suplementação crônica com óleo de fígado de tubarão (Ecomer®) e óleo de peixe (Herbarium®), sobre a caquexia, crescimento tumoral e resposta linfocitária em ratos com tumor de Walker 256. Para alcançar estes objetivos os seguintes parâmetros foram avaliados:

*** PARÂMETROS DE CAQUEXIA**

- determinação da glicemia, triacilglicerolemia, lactatemia e concentração de glicogênio hepático;
- determinação da massa corpórea dos animais e do peso tumoral;

*** PARÂMETROS TUMORAIS**

- Proliferação das células tumorais pela incorporação da (2- ^{14}C)-timidina em DNA.;
- peroxidação lipídica em tecido tumoral por método colorimétrico;
- porcentual de apoptose/necrose de células tumorais por citometria de fluxo;
- expressão de proteínas pró e anti-apoptóticas em tecido tumoral por Western Bloting;
- quantificação de ácidos graxos em tecido tumoral por HPLC;
- quantificação de alquilgliceróis em tecido tumoral por GC-MS.

*** PARÂMETROS IMUNITÁRIOS**

- proliferação de linfócitos T obtidos de baço, timo e linfonodo mesentérico pela incorporação da (2- ^{14}C)-timidina em DNA.;
- quantificação das populações de linfócitos T CD4+ e CD8+ infiltrados em tecido tumoral por imunohistoquímica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, var. albinus), obtidos do biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram submetidos a ciclo invertido claro/escuro (12/12 horas), com temperatura controlada de 22 ± 1ºC, com água e alimentação (Nuvilab AR- Nuvital Nutrientes Ltda., Curitiba, PR, BRA, composta por 66% de carboidratos, 23% de proteínas, 4% de lipídios, 6% de fibras e 1% de vitaminas e minerais (PIZATO et al, 2005)) à vontade. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Metabolismo Celular no Departamento de Fisiologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Todos os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPR (certificado número 147).

3.2 SUPLEMENTOS E REAGENTES

O óleo de peixe utilizado como suplemento foi gentilmente doado pela Fundação Herbarium (Colombo, PR, BRA), e o óleo de fígado de tubarão, pela Naturalis Alimentos Naturais Ltda (São Paulo, SP, BRA). A gordura de coco utilizada foi adquirida da empresa Triângulo Alimentos (Itápolis, SP, BRA). Os sais utilizados para preparo de tampões foram obtidos da Reagen Quimibrás Indústria Brasileira S/A (Rio de Janeiro, RJ, BRA), Vetec Química Fina Ltda (Rio de Janeiro, RJ, BRA) ou Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda (Diadema, SP, BRA). Meio de cultura (RPMI 1640), antibióticos (penicilina G e estreptomicina) e soro fetal bovino foram obtidos da Gibco (Grand Island, NY, USA). Enzimas utilizadas nas dosagens de glicogênio, lactato sérico, iodeto de propídeo, concanavalina A, ácidos graxos para HPLC, azul de tripan, xilenol laranja, trifenilfosfina e organosilano foram obtidos da Sigma Chemical Co (St Louis, MO, USA). Kits comerciais para dosagem de glicemia e triacilglicerolemia foram adquiridos da Bioliquid (Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda, Pinhais, PR, BRA). Os anticorpos monoclonais utilizados para citometria de fluxo foram obtidos da Caltag (California, USA), e anexina V foi adquirida do Laboratório de Biologia Celular e Molecular/ICB/USP. (2-^{14}C)-timidina foi fornecida por New England Nuclear Research Products (DuPont Company, Biotecnology Systems, USA). Anticorpos monoclonais e kits utilizados para imunohistoquímica foram obtidos da Dako (USA).

3.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os animais após desmame (21 dias) foram separados em 12 grupos (5 animais por grupo), de acordo com o tipo de suplementação e de acordo com a presença ou não de tumor Walker 256, conforme descrito abaixo:

Grupos sem tumor:

- C- não suplementado (controle);
- FT- suplementado com óleo de fígado de tubarão;
- OP- suplementado com óleo de peixe;
- FT+OP- suplementado com óleo de fígado de tubarão e óleo de peixe;
- GC- suplementado com gordura de coco (gordura saturada);
- FT+GC suplementado com óleo de fígado de tubarão e gordura de coco.

Grupos com tumor:

- W- não suplementado;
- WFT- suplementado com óleo de fígado de tubarão;
- WOP- suplementado com óleo de peixe;
- WFT+OP- suplementado com óleo de fígado de tubarão e óleo de peixe;
- WGC- suplementado com gordura de coco;
- WFT+GC suplementado com óleo de fígado de tubarão e gordura de coco.

Todos os animais receberam diariamente as respectivas suplementações por via oral, na dose de 1g/kg de peso corpóreo utilizando-se micropipetas, até completarem 70 dias. Animais dos grupos com duas suplementações (óleo de fígado de tubarão+óleo de peixe e óleo de fígado de tubarão+gordura de coco) receberam 1g/kg de peso corpóreo de cada suplemento. Após 50 dias de suplementação, os animais dos grupos a serem nominados com tumor sofreram inoculação subcutânea no flanco direito de 1mL de suspensão de células do tumor de Walker 256, contendo 3×10^7 células, e todos os animais continuaram a receber a suplementação descrita acima por mais 15 -20 dias, até ser verificada visualmente a instalação de caquexia nos animais portadores de tumor do grupo controle (W). Os animais então foram mortos por

ortotanasia cervical, e os tumores removidos e pesados antes de serem destinados para outras experimentações. O sangue foi coletado para determinações bioquímicas, o fígado separado para dosagem de glicogênio, e os órgãos linfóides processados para cultivo celular. Esta seqüência de suplementação e obtenção de tecidos dos 12 grupos de animais foi repetida 6 vezes.

3.4 MASSA CORPÓREA

O peso dos animais foi monitorado a cada dois dias em balança digital URANO.

3.5 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS DE TUMOR DE WALKER 256

Uma suspensão de 2 x 10^7 células de tumor de Walker 256, 1 mL, foi injetada intraperitonialmente em rato macho da linhagem Wistar. Após um período de aproximadamente 5 dias, quando constatada ascite, o animal foi ortotanasiado por deslocamento cervical e 10mL de solução salina 0,9% foram injetados em sua cavidade abdominal. Seu abdômen foi massageado e, por meio de laparotomia mediana foi retirado da cavidade abdominal o fluido contendo as células tumorais, com auxílio de pipeta de plástico tipo Pasteur. As células tumorais obtidas foram contadas em câmara de Neubauer na presença de azul de trypan, 10g/L em solução salina 0,9% (NaCl 154mM).

3.6 ISOLAMENTO DE LINFÓCITOS DO BAÇO, TIMO E LINFONODOS MESENTÉRICOS

Os órgãos linfóides (baço, timo e linfonodos mesentéricos) foram mantidos em PBS com antibióticos (penicilina 10.000U e estreptomicina 10mg/L) (PBS+AB), e macerados com auxílio de êmbolo de seringa e peneira de malha fina, em placa de petri. Para cada grupo de animais foi obtido *pool* de linfócitos de cada órgão. O conteúdo macerado de linfonodos mesentéricos e timos foi filtrado em papel filtro apropriado e centrifugado a 290 x *g*, durante 7 minutos, a 4ºC. Os precipitados foram lavados com PBS+AB por 2 vezes, e o último sedimentado foi resuspenso em meio de cultura RPMI1640 contendo 10% de soro fetal bovino e antibióticos (penicilina 10.000U e estreptomicina 10mg/L). Para o isolamento de linfócitos do baço, logo após a maceração, o sobrenadante foi desprezado, e o sedimentado foi ressuspenso em solução contendo cloreto de amônio para lise de hemáceas. Em seguida, os

procedimentos de lavagem dos linfócitos com PBS+AB e ressuspensão em meio de cultura foram efetuados.

3.7 PROLIFERAÇÃO LINFOCITÁRIA

Os linfócitos dos diferentes grupos foram cultivados em placas de 96 escavações, 180µL de solução de células contendo $2x10^5$ células/escavação, a 37ºC em atmosfera de 95% ar/ 0,5% CO_2, por 48h, estimuladas ou não com 20µL/escavação do mitógeno concanavalina A (Con A-5µg/mL). Vinte microlitros/escavação de solução contendo (2-^{14}C)-timidina em meio de cultura (50mCi/mmol) foram adicionados por um período adicional de 18h, sob as mesmas condições descritas anteriormente. Após este período as células foram coletadas automaticamente em coletor múltiplo (*Skatron Combi Multiple Cell Harvester*, UK) em papéis de filtro específicos para coleta (COX Scientific - England). Os discos de papel contendo a radioatividade incorporada no DNA foram levados para contagem em cintilador Beckman LS 6500.

3.8 PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS

A proliferação de células tumorais também foi avaliada utilizando-se o mesmo método empregado no cultivo dos linfócitos, sendo diferente apenas a obtenção das células. Esta obtenção foi feita por fragmentação do tecido com tesoura em PBS + AB, filtração, e após centrifugação a 290 x *g*, durante 7 minutos, a 4ºC, foi procedida contagem das células para posterior cultivo (HUANG *et al*, 2000). As células, 10^4 células/escavação, foram cultivadas por um período de 24h na presença de 20µL/escavação de solução contendo (2-^{14}C)-timidina. A coleta das células e obtenção dos resultados foram feitas da mesma forma descrita para linfócitos.

3.9 APOPTOSE DE CÉLULAS TUMORAIS

Depois de isoladas as células tumorais foram ressuspensas em tampão de ligação (10mM Hepes pH 7,4, 150mM NaCl, 5mM KCl, 1mM $MgCl_2$ e 1,8mM $CaCl_2$) contendo anexina V (diluída 1:500, vol:vol, conforme instrução do fabricante) marcada com o fluorocromo fluoresceína isotiocianato (FITC), e com iodeto de propídeo (PI). A molécula de anexina V liga-se especificamente na fosfatidilserina, fosfolipídeo presente na monocamada interna da membrana plasmática celular, que é translocado para a monocamada externa da membrana plasmática de células sofrendo apoptose. A

fluorescência celular foi avaliada por citometria de fluxo (FACS – *fluorescence activated cell sorter*) em equipamento FACSCalibur Becton Dickinson, sendo que a marcação com FITC foi visualizada no canal FL1 do citômetro, e a marcação com PI, no canal FL2. Os dados foram expressos em porcentagem de eventos. O software utilizado para a aquisição dos dados foi o Cell Quest™, e para a análise de dados, o programa Win Midi.

3.10 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA DO TECIDO TUMORAL

A peroxidação lipídica foi avaliada pelo método descrito por Nourooz-Zadeh et al (1994), quantificada pela formação de hidroperóxidos lipídicos/mg de proteínas. Para isso, amostras de tecido tumoral (200mg) foram homogeneizadas em 5 volumes de metanol (Homogeneizador Politron - 25.000rpm), e centrifugadas a 5.000 x *g*/5'/4ºC. O sobrenadante (90µL) foi aliquotado em tubos de reação contendo 10µL de metanol ou 10µL de solução metanólica de trifenilfosfina (TPP, Sigma®) a 10mM. Todos os tubos foram agitados vigorosamente e então incubados em temperatura ambiente por 30 minutos.

Após este período foram adicionados 900 µL de solução de trabalho (reativo de FOX2), contendo MeOH 90%, xilenol laranja 100µM (Sigma®), H_2SO_4 25mM, hidroxitolueno butilado (BHT) 4mM, e sulfato ferroso de amônio 250µM, em metanol 90% (v:v, em água). Após agitação, as amostras foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente. Nesta etapa, os cátions ferrosos (Fe^{2+}) do reativo de FOX2 são oxidados pelos hidroperóxidos presentes na amostra (tanto pelos hidroperóxidos lipídicos quanto por outros tipos de hidroperóxidos presentes na amostra). Como todos os hidroperóxidos lipídicos das amostras tratadas com TPP foram reduzidos, a produção de Fe^{3+} será menor nestas do que nas amostras não tratadas com TPP. O Fe^{3+} formado é então quelado pelo xilenol laranja, o que faz a cor deste indicador passar de laranja a azul-púrpura (passa a absorver luz em 560nm). Ao final do tempo da incubação, a absorbância foi mensurada a 560 nm. Subtraiu-se então o valor da absorbância das amostras tratadas com TPP (sem hidroperóxidos lipídicos) do valor da absorbância das amostras sem TPP. A quantidade de lipoperóxidos foi calculada utilizando-se curva padrão de peróxido de hidrogênio, obtida com soluções padrão de diferentes concentrações (100; 50; 25; 12,5; 6,2; 3,1 e 1,6 µM) submetidas aos mesmos procedimentos descritos acima para a dosagem de hidroperóxidos (com

exceção ao tratamento com TPP). Os resultados foram expressos em nmol de hidroperóxidos/mg de proteína.

3.11 QUANTIFICAÇÃO PROTÉICA PARA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

A quantificação de proteína das amostras foi feita pelo método de BRADFORD (1976). A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm.

3.12 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS DE CAQUEXIA

3.12.1 Lactatemia

As dosagens bioquímicas de lactato sérico foram realizadas segundo método de ENGLE & JONES (1978). Inicialmente foi realizada desproteinização de 500µL de soro pela adição de 50µL de ácido tricloroacético (TCA 25% p/v). A mistura foi agitada em vórtex e em seguida centrifugada por 2 minutos a 13000rpm. O sobrenadante foi neutralizado pela adição de Tris/KOH (0,5M/2M) com auxílio de indicador universal, e 100µL deste sobrenadante neutralizado foi pipetado em tubo de ensaio contendo 1 mL do tampão de ensaio, com pH ajustado para 8,85 (EDTA 9,58 mM, glicina 0,37 mM, hidrato de hidrazina 0,3M lactato desidrogenase - EC 1.1.1.27 - 4 unidades internacionais (UI)/mL, β-NAD^+ 0,9 mM). Após 45 minutos de incubação em temperatura ambiente, foi efetuada leitura em espectrofotômetro a 340 nm.

3.12.2 Conteúdo de glicogênio hepático

Este foi determinado segundo o método descrito por LEIGHTON & COOPER (1989) adaptado. Cerca de 90mg de tecido foi pesado e adicionado a tubo de ensaio contendo 500µL de KOH 1M, que foi mantido em banho-maria a 60°C durante cerca de 30 minutos para digestão do tecido. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas em vórtex e 100µL do tecido dissolvido foram adicionados em tubo de ensaio contendo 500µL de tampão acetato pH 4,8 (ácido acético glacial 0,48%, acetato de sódio 12mM, amiloglucosidase 0,1%, água ultrapura q.s.p.), e 17,5µL de ácido acético glacial. Após agitação em vórtex, as amostras foram mantidas em estufa a 37°C por 2 horas, e em seguida centrifugadas a 15000 x *g*, durante 5 minutos. Do sobrenadante foram pipetados 100µL em outro tubo contendo 1 mL de tampão trietanolamina (TEA) pH 7,5 (TEA 37mM, MgSO4 0,6mM, sal dissódico de ATP 0,96mM, sal sódico de NADP 0,07mM, hexoquinase/glicose-6-fosfato desidrogenase, água ultrapura q.s.p.). Após

agitação em vórtex, as amostras repousaram 40 minutos em temperatura ambiente, e em seguida a leitura em espectrofotômetro a 340 nm foi efetuada.

3.12.3 Glicemia

A concentração plasmática de glicose foi determinada pelo método enzimático colorimétrico glicose oxidase, utilizando kit de glicose da Bioliquid, seguindo as especificações do fabricante. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 505 nm e os resultados foram expressos em mg/dL.

3.12.4 Triacilglicerolemia

A concentração plasmática de TAG foi determinada por método enzimático colorimétrico, utilizando os kits triglicérides GPO-Bioliquid conforme especificações do fabricante. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm e os resultados foram expressos em mg/dL.

3.13 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (*High Performance Liquid Chromatography* – HPLC)

3.13.1 Extração lipídica

Foi realizada de acordo com o método descrito por Folch *et al* (1956). Setenta miligramas de cada amostra de tecido tumoral foram utilizados para a extração. Após a pesagem, foi acrescentado ao tecido contido em tubo de vidro, 1,33 mL do solvente extrator (composto por metanol:clorofórmio, 1:2, vol:vol). O material foi homogeneizado com o auxílio de um homogeneizador (Bosch® GGS 27). Em seguida, foram adicionados 480 µL de metanol ao homogenato, e o material foi então centrifugado a 5000 *g*, por 10 minutos a 4ºC. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de vidro e foram adicionados 960µL de clorofórmio (para manter a proporção metanol:clorofórmio em 1:2 v:v). Na seqüência, foram adicionados 550 µL de água ultrapura, e o sistema bifásico formado foi então submetido a uma intensa agitação, até não serem mais distinguíveis as suas duas fases. Cerca de 10 minutos depois, após a reconstituição espontânea do sistema bifásico, o sobrenadante (aquoso) foi removido com o auxílio de uma micropipeta. Foi então adicionado 1 mL de Solução de Folch (metanol 48,98%; água 47,96%; clorofórmio 3,06%; MgCl2 0,017%; CaCl2 0,02%; NaCl 0,37%), lentamente (para evitar a formação de emulsão) e de maneira que as paredes do tubo

fossem lavadas com esta solução. Após a remoção do sobrenadante, este procedimento foi repetido mais duas vezes, e o infranadante submetido à secagem em nitrogênio gasoso.

3.13.2 Saponificação dos extratos lipídicos

Os extratos lipídicos obtidos dos tumores, bem como alíquotas de óleo de fígado de tubarão, óleo de peixe e gordura de coco, foram ressuspensos em 100µL de metanol e saponificados com 2,0mL de uma solução alcalina em metanol (hidróxido de sódio 1M em metanol a 90%), a 37°C por 2 horas, em banho-maria com agitação (BEYER & JENSEN, 1989; NISHIYAMA-NARUKE et al, 1998). A solução alcalina foi então acidificada até aproximadamente pH 3,0, com 1,5 mL de ácido clorídrico 1M. Os ácidos graxos em solução foram extraídos 3 vezes com 2,0 mL de hexano. O solvente foi evaporado em nitrogênio gasoso e as amostras então guardadas protegidas da luz, a -20°C, até a derivatização com BMMC.

3.13.3 Derivatização dos ácidos graxos

A reação de derivatização foi baseada no método descrito por ABUSHUFA *et al.* (1994). O reagente 1 foi preparado adicionando-se 10mg de 4-bromometil-7-metóxi coumarina (BMMC) em 10mL de acetonitrila. O reagente 2 foi preparado adicionando-se 26,5mg de 18-crown-6 e 100mg de carbonato de potássio em 5mL de acetonitrila. O reagente 2 foi sonicado por 30 minutos e outros 5mL de acetonitrila foram adicionados. O sobrenadante foi separado do precipitado e a solução foi estocada a 4-8°C. As amostras contendo ácidos graxos a serem derivatizados foram reconstituídas em 100µL de acetonitrila e homogeneizadas em vórtex por 30 segundos. Após este período foram adicionados 100µL do reagente 1, e 100µL do reagente 2. As amostras foram novamente homogeneizadas, mantidas a 60°C por 15 minutos em placa aquecedora, e em seguida transferidos para frascos apropriados para injeção em HPLC.

Para a análise dos ácidos graxos derivatizados através do detector de fluorescência, foram realizadas injeções de 50µL dos derivados diluídos. O fluxo foi de 1,0mL/minuto, à temperatura ambiente controlada de 23°C. Os compostos foram detectados fluorimetricamente com excitação a 325nm e emissão a 398nm. Quanto à fase móvel, foi realizado gradiente binário com acetonitrila e água, iniciando com a

proporção de 77 : 23% (acetonitrila:água) e finalizando com 90 : 10%, em um total de 55 minutos.

3.13.4 Obtenção dos cromatogramas - HPLC

Após extração lipídica, saponificação dos extratos e derivatização dos ácidos graxos obtidos, as amostras foram injetadas em um sistema HPLC – Varian com uma bomba (modelo ProStar 230), autoinjetor (mod ProStar 410) e detector de fluorescência (mod ProStar 363). A coluna analítica para a separação dos ácidos graxos derivatizados utilizada foi da marca Varian, Microsorb-MV C-8 de fase reversa, com 250 mm de comprimento x 4,6 mm de diâmetro, contendo partículas de 5µm. O software para integração e registro de dados foi o Star 6.2 Chromatography Wokstation.

Os seguintes ácidos graxos foram utilizados como padrões: ácido láurico (C12:0), ácido mirístico (C14:0), ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoléico (C16:1n-7), ácido esteárico (C18:0), ácido oléico (C18:1n-9), ácido linoéico (C18:2n-6), ácido α-linolênico (C18:3n-3), ácido araquidônico (C20:4n-6), ácido eicosapentaenóico (C20:5n-3) e ácido docosahexaenóico (C22:6n-3).

3.14 ANÁLISE DE ALQUILGLICERÓIS POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA (*Gas Chromatography - Mass Spectrometry* – GC-MS)

3.14.1 Metanólise ácida

Os extratos lipídicos (obtidos pelo método de Folch) foram solubilizados em metanol-HCl (HCl 3% em metanol PA) e agitados em vórtex. Os conteúdos foram transferidos para tubos de hidrólise com tampa e mantidos em estufa a 100°C por 2 horas. Este procedimento hidrolisa ácidos graxos esterificados à estrutura do glicerol de fosfolipídeos e triacilgliceróis presentes nas amostras, restando apenas cadeia lipídica unida por ligação éter ao glicerol (alquilglicerol). Os ácidos graxos são convertidos em ácidos graxos livres metilados (metil ésteres) por este procedimento (SOUZA et al, 2007; SASSAKI et al, 1999).

3.14.2 Acetilação

Os conteúdos dos tubos de hidrólise foram secos em nitrogênio gasoso e em seguida a eles foram adicionados 200µL de anidrido acético + 200µL de piridina para

ligação de grupamentos acetil nas extremidades livres do glicerol. Os tubos de hidrólise foram agitados em vórtex e mantidos em estufa a 100°C por 30 minutos para conclusão do procedimento (SASSAKI et al, 2008). Após este período, os tubos foram mantidos em geladeira até a leitura ser efetuada em cromatógrafo gasoso.

3.14.3 Obtenção dos cromatogramas – GC-MS

As amostras foram injetadas em cromatógrafo gasoso Saturn 2000R equipado com coluna capilar CP-Sil-5 CB Chrompack®, 30m x 0,25 mm, de baixo sangramento.

Os padrões utilizados foram obtidos do próprio óleo de fígado de tubarão ECOMER® submetido aos mesmos procedimentos de metanólise ácida e acetilação, e injetados na mesma coluna capilar das amostras. Dez microlitros de galactitol (1mg/mL), utilizado como padrão externo para quantificação dos alquilgliceróis das amostras, foram adicionados ao volume de amostra acetilada (200µL), totalizando 210µL. Deste volume, 0,5µL foram injetados, contendo 23,8ng de galactitol por injeção. A área correspondente ao pico de galactitol de cada amostra foi utilizada para a quantificação dos alquilgliceróis.

3.15 IMUNOHISTOQUÍMICA DE LINFÓCITOS INFILTRADOS NO TECIDO TUMORAL

As lâminas utilizadas para a imunohistoquímica foram primeiramente lavadas em detergente Extran diluído em água destilada (0,003%, v/v), e enxaguadas em água destilada mantendo-as imersas durante 15 minutos, 3 vezes sucessivas. Em seguida foram passadas em acetona P.A. por 20 segundos, e secas em temperatura ambiente. As lâminas foram submetidas à imersão rápida em organosilano 2% diluído em acetona P.A. (v/v) quatro vezes sucessivas, imediatamente depois em acetona P.A. também por quatro vezes, e em água destilada por duas vezes. A secagem foi realizada em temperatura ambiente.

Fragmentos de tumor logo após serem retirados de 3 animais por grupo foram imersos em formalina, e ali mantidos até a parafinização. Para a desparafinização dos cortes obtidos dos tumores, foi realizada imersão em xilol a temperatura ambiente por 2 vezes de 10 minutos, em álcool etílico absoluto por 3 vezes de 1 minuto, e finalmente em álcool etílico 80%, 1 vez de 1 minuto. O bloqueio da peroxidase endógena foi efetuado com solução de peróxido de hidrogênio 5% em metanol P.A. (v/v). Para a recuperação antigênica as lâminas foram mergulhadas em recuperador Imuno Retriver

(Dako®) em cuba aquecida por banho-maria a 99°C por 40 min, e em seguida resfriadas à temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em água destilada e a área do corte foi delimitada com caneta hidrofóbica Dako pen (Dako®). Até o momento de gotejar as alíquotas de anticorpo, as lâminas foram mantidas em tampão TBS tris pH 7.3 para evitar a secagem do corte. Depois que os anticorpos foram gotejados sobre os cortes, as lâminas foram mantidas em câmara úmida, em geladeira *overnight*. As lâminas foram lavadas em tampão TBS tris pH 7.3, e neste tampão mantidas por 15 minutos. Após secagem em temperatura ambiente, Envision/Advanced Link (Dako®) foi gotejado e mantido sobre as lâminas por 30 minutos.

Para a revelação foi utilizado Kit Advanced (Dako®). Após lavagem em tampão TBS tris pH 7.3, foi gotejado Advanced Enzyme (Dako®) e mantido 30 minutos sobre as lâminas. Em seguida, e após nova lavagem em tampão TBS tris pH 7.3, o cromógeno DAB (1:1) foi gotejado, e quando a visualização da cor castanha foi possível, as lâminas foram rapidamente lavadas em água destilada. As lâminas foram contracoradas com Hematoxilina de Harris por 5 minutos, e em seguida lavadas em água de torneira por 5 minutos. Após desidratação com álcool ético absoluto por 3 vezes de 1 minuto, e diafanização com xilol por 3 vezes de 5 minutos, as lâminas foram montadas.

Como controle positivo foi utilizado corte de amígdala de rato, e como controle negativo, corte de rim. Os cortes foram observados em microscópio óptico, e as imagens obtidas foram processadas com auxílio do software Image Pro Plus.

3.16 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM DODECIL SULFATO DE SÓDIO (Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacrylamide Gel Eletroforesis - SDS-PAGE)

Os tumores foram homogeneizados em tampão de lise pH 7,5 (Trisma base 100 mM, EDTA 10 mM, SDS 1%, fluoreto de sódio 100 mM, pirofosfato de sódio 10 mM, ortovanadato de sódio 10 mM) na proporção 1:7 (100 mg de tecido:700µL de tampão de lise) com o auxílio de um homogeneizador tipo Politron (25.000/min). Em seguida os homogenatos foram centrifugados por 5 minutos a 13000 rpm e o sobrenadante coletado. A quantificação protéica foi feita pelo método de Bradford. A concentração de proteína nas amostras foi calculada com base em curva padrão de soroalbumina bovina.

Após a quantificação protéica das amostras, estas foram diluídas com tampão Laemmli 2 vezes concentrado (Tris HCl 0,5M, SDS 10% (p/v) bromofenol blue 0,5% (p/v), glicerol 26%, água ultrapura q.s.p., β-mercaptoetanol 1:20 (v/v)) de forma que a concentração final de proteína das amostras alcançasse 3 µg/µL. SDS (dodecil sulfato de sódio) é um poderoso detergente carregado negativamente que se liga a regiões hidrofóbicas das proteínas. O complexo formado SDS-proteína distribui carga negativa semelhante entre todas as proteínas, que migrarão para o pólo positivo do campo elétrico. Portanto, a migração das proteínas no método "SDS-PAGE" depende principalmente dos seus pesos moleculares. O glicerol foi utilizado para dar à amostra densidade maior do que o tampão de corrida e β-mercaptoetanol (agente redutor) para desfazer pontes dissulfeto da estrutura protéica, possibilitando a separação da amostra em subunidades.

O gel de empilhamento foi preparado a 4% e permite que todas as proteínas migrem com a mesma velocidade no início da corrida. Chegando ao gel de separação, que foi preparado a 15%, as proteínas começam a migrar de acordo com seus tamanhos. Os géis foram preparados a partir de uma solução de acrilamida:bisacrilamida (30:1), sendo que a polimerização química da acrilamida com a bisacrialamida foi , então, iniciada com a adição do persulfato de amônio e TEMED. Persulfato de amônio gera radicais livres que levam à polimerização, enquanto o TEMED catalisa a formação destes radicais.

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida em "SDS-PAGE" por cerca de 2 horas (200 V, 400 mA). Esta separação das proteínas é importante para a posterior identificação das proteínas de interesse por Western Blotting.

3.16.1 WESTERN BLOTTING

O método de *Western blotting* surgiu em 1979, descrito por TOWBIN e colaboradores. Baseia-se na identificação de proteínas específicas pelo uso de anticorpos mono e policlonais, incluindo a detecção, quantidade relativa e o peso molecular das proteínas em uma mistura complexa. Após a separação das proteínas em SDS-PAGE, elas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, onde se procedeu ao método. Esta membrana foi submetida à incubação com tampão de bloqueio, contendo 1,5% de BSA, para bloqueio de ligação inespecífica do anticorpo, durante duas horas. Após este período, a membrana foi incubada em tampão de

incubação contendo 1,5% de BSA e o anticorpo primário contra a proteína alvo (Bax e Bcl-2). Para visualização da interação proteína-anticorpo foi então utilizado anticorpo secundário contra o anticorpo primário, sendo este complexado com enzima HRP (horseradish peroxidase). Pela adição de substrato quimioluminescente pode-se observar as bandas das proteínas Bax e Bcl2 em filme Kodak para radiografia. O software utilizado para a mensuração da intensidade das bandas foi o Image J.

3.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média e submetidos à análise de variância de duas vias, tendo como fatores o tumor e a suplementação, com pós teste de Bonferroni, com significância estatística para $P < 0,05$. GraphPad Prism 4 foi o software utilizado.

4. RESULTADOS

4.1 Massa tumoral

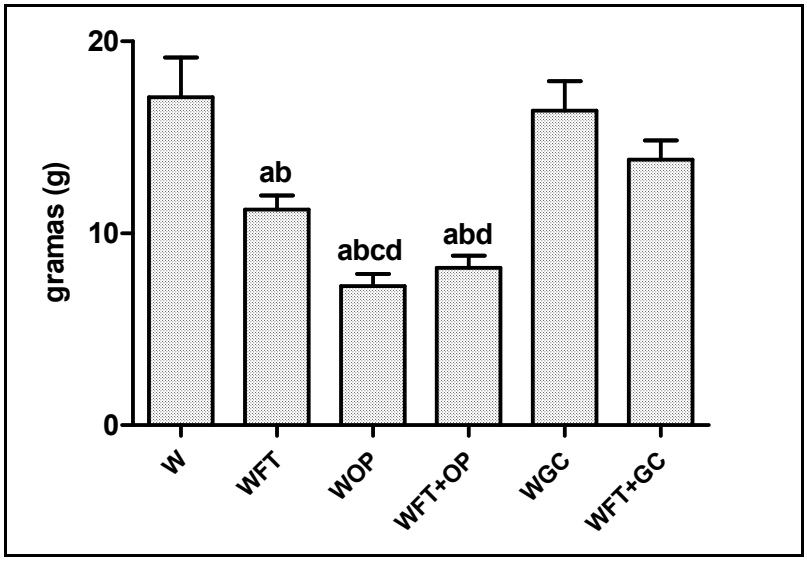

Figura 8: Massa do tumor (g) dos animais alimentados com dieta padrão (W), suplementados com óleo de fígado de tubarão (WFT), óleo de peixe (WOP), óleo de fígado de tubarão + óleo de peixe (WFT+OP), gordura de coco (WGC) e óleo de fígado de tubarão + gordura de coco (WFT+GC). Os dados estão apresentados como média ± erro padrão da média de 10 animais por grupo. [a]p<0,05 *vs.* W, [b] p<0,05 *vs.* WGC, [c] p<0,01 *vs.* WFT, [d] p<0,01 *vs.* WFT+GC.

A massa do tumor (g) dos animais portadores de tumor (Figura 8) alimentados com dieta padrão (W) foi de 17,1g ± 2,1. A suplementação com óleo de fígado de tubarão (WFT) induziu a uma massa tumoral de 11,2g ± 0,7, indicando que a velocidade de crescimento do tumor foi 34% menor quando comparada à do grupo W (p<0,05). A suplementação com óleo de peixe (WOP) por sua vez, provocou redução ainda maior da massa tumoral para 7,3g ± 0,6, a qual foi 57% menor quando comparada à do W (p<0,05), e 35% menor quando comparada à do suplementado com óleo de fígado de tubarão (p<0,01). A associação da suplementação com óleo de peixe e fígado de tubarão (WFT+OP) não promoveu efeito adicional na redução da massa tumoral ao já induzido pela suplementação isolada com óleo de peixe (p>0,05). Animais suplementados com gordura saturada (WGC) apresentaram massa tumoral de 16,4g ± 1,5, semelhante à do grupo W (p>0,05), mas significativamente maior (p<0,05) que à dos grupos suplementados com óleo de fígado de tubarão (WFT), óleo de peixe (WOP) e sua associação (WFT+OP). Quando a gordura saturada foi administrada em conjunto com óleo de fígado de tubarão (WFT+GC), a massa tumoral foi de 13,8g ± 1,

a qual não foi diferente quando comparada à dos grupos WGC e WFT ($p>0,05$), mas significativamente maior que à dos grupos WOP e WFT+OP ($p<0,01$).

4.2 Parâmetros de caquexia

Os dados referentes às concentrações plasmáticas, em jejum, de glicose e de triacilgliceróis dos animais sem tumor e portadores de tumor estão apresentadas nas Figuras 9 e 10. Animais sem tumor alimentados com dieta padrão (C) e os submetidos às diferentes suplementações com óleo de peixe (OP), óleo de fígado de tubarão (FT), gordura de coco (GC) e suas associações (FT+OP, FT+GC), não tiveram alteração da glicemia a qual ficou em torno de 97 mg/dL. Os animais portadores de tumor alimentados com dieta padrão (W) apresentaram redução de aproximadamente 25% na concentração de glicose plasmática quando comparados aos animais controle ($p<0,001$). As suplementações com óleo de fígado de tubarão (WFT), óleo de peixe (WOP) e associação de ambas (WFT+OP) impediram queda da glicemia quando comparada à dos animais do grupo W ($p<0,01$), sendo similar à dos animais sem tumor ($p>0,05$). Animais com tumor suplementados com gordura saturada (WGC) apresentaram glicemia semelhante à dos animais do grupo W ($p>0,05$) e significativamente menor que à dos animais sem tumor com a mesma suplementação (GC) ($p<0,001$). Quando a suplementação com gordura saturada foi associada à de fígado de tubarão (WFT+GC) observou-se menor queda da glicemia quando comparada à do grupo WGC ($p<0,01$), contudo não atingiu os valores de concentração normais ficando menor quando comparada à do grupo sem tumor com a mesma suplementação (FT+GC, $p<0,001$).

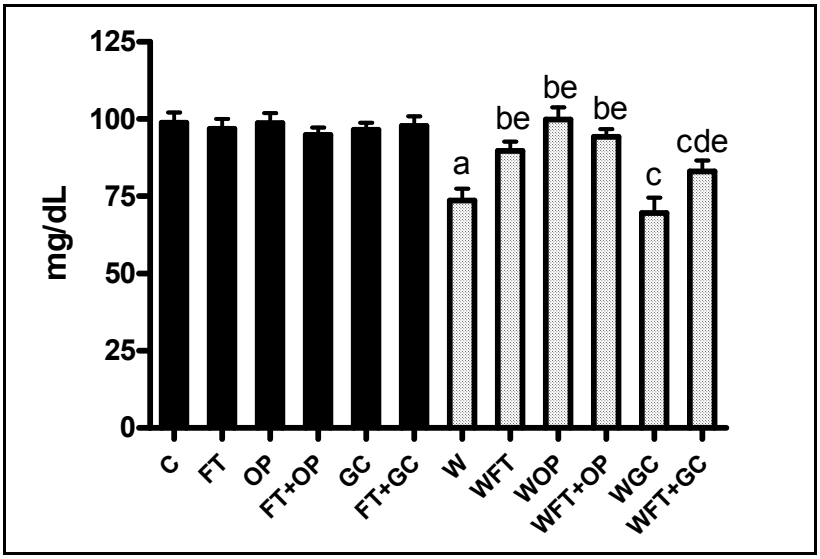

Figura 9: Concentração plasmática de glicose (mg/dL) dos animais sem tumor alimentados com dieta padrão (C), suplementados com óleo de fígado de tubarão (FT), óleo de peixe (OP), óleo de fígado de tubarão + óleo de peixe (FT+OP), gordura de coco (GC) e óleo de fígado de tubarão + gordura de coco (FT+GC), e dos animais portadores de tumor alimentados com dieta padrão (W), suplementados com óleo de fígado de tubarão (WFT), óleo de peixe (WOP), óleo de fígado de tubarão + óleo de peixe (WFT+OP), gordura de coco (WGC) e óleo de fígado de tubarão + gordura de coco (WFT+GC). Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média de 20 animais por grupo. [a]p<0,001 *vs.* C, [b]p<0,01 *vs.* W, [c]p<0,001 *vs.* respectivo controle sem tumor, [d]p<0,05 *vs.* WFT+OP, [e]p<0,01 *vs.* WGC.

Os animais sem tumor alimentados com dieta padrão (C) e submetidos às diferentes suplementações e suas associações, como citado acima, não apresentaram diferença significativa quanto à triacilglicerolemia (p>0,05), a qual foi em média 68,1mg/dL. Com a presença de tumor, os animais alimentados com dieta padrão (W) apresentaram concentração de triacilgliceróis de 117,2mg/dL ±11,3, a qual foi 88% maior que à encontrada nos animais controle (C) (p<0,001). As suplementações com óleo de fígado de tubarão (WFT), óleo de peixe (WOP) e associação de óleo de fígado de tubarão + óleo de peixe (WFT+OP) apresentaram capacidade de se contrapor ao efeito da presença do tumor, impedindo o aumento da concentração de triacilgliceróis plasmáticos (p<0,01 *vs.* W), ficando esta ao redor de 84mg/dL. A suplementação com gordura de coco (WGC) não conteve o efeito da presença do tumor (101,7mg/dL±7,7) e a associação da suplementação com óleo de fígado de tubarão (WFT+GC, 102,5mg/dL±5,9) também não teve efeito (p>0,05 *vs.* W), ficando maiores que suas contrapartes sem tumor (p<0,01).

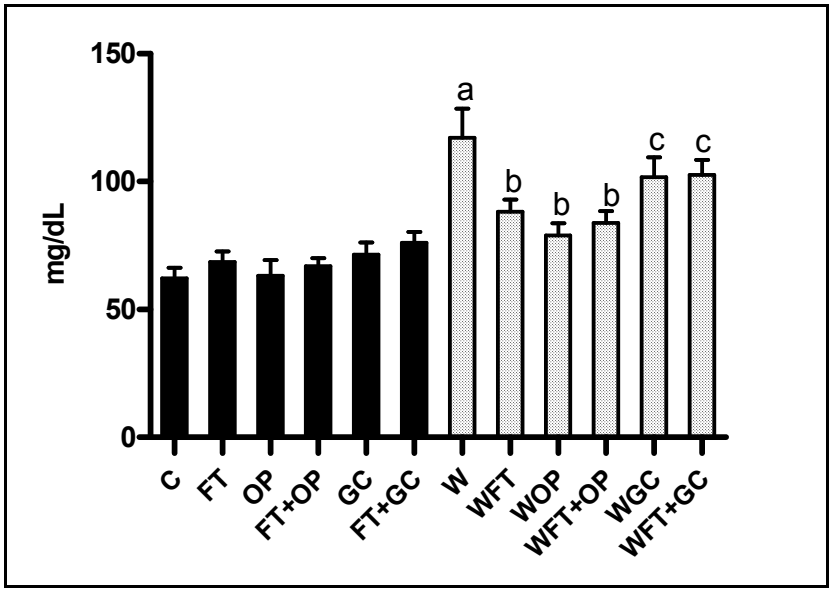

Figura 10: Concentração plasmática de triacilgliceróis (mg/dL) dos animais sem tumor alimentados com dieta padrão (C), suplementados com óleo de fígado de tubarão (FT), óleo de peixe (OP), óleo de fígado de tubarão + óleo de peixe (FT+OP), gordura de coco (GC) e óleo de fígado de tubarão + gordura de coco (FT+GC), e dos animais portadores de tumor alimentados com dieta padrão (W), suplementados com óleo de fígado de tubarão (WFT), óleo de peixe (WOP), óleo de fígado de tubarão + óleo de peixe (WFT+OP), gordura de coco (WGC) e óleo de fígado de tubarão + gordura de coco (WFT+GC). Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média de 20 animais por grupo. [a]p<0,001 *vs.* C, [b]p<0,01 *vs.* W, [c]p<0,01 *vs.* respectivo controle sem tumor.

O intenso metabolismo glicolítico das células tumorais leva os indivíduos portadores de tumor a apresentarem concentração plasmática elevada de lactato, o que é mais um indicativo de instalação do quadro de caquexia. Na Figura 11 estão apresentados os dados referentes à concentração plasmática de lactato dos animais com e sem tumor, suplementados e não suplementados. Os animais portadores de tumor alimentados com dieta normal (W) apresentaram maior concentração plasmática de lactato, 2,2mmol/L±0,09, a qual foi 65% maior quando comparada à dos animais sem tumor com a mesma dieta (C, 1,3mmol/L±0,1) (p<0,001). A suplementação dos animais portadores de tumor com óleo de fígado de tubarão (WFT, 1,6mmol/L±0,07), óleo de peixe (WOP, 1,5mmol/L±0,08), e óleo de fígado de tubarão + óleo de peixe (WFT+OP, 1,4mmol/L±0,07), impediu significativamente a elevação da concentração de lactato quando comparada com à dos animais do grupo W (p<0,001). A suplementação apenas com gordura saturada (WGC), por outro lado, não teve este

efeito, onde foi observada manutenção da concentração elevada de lactato (2,0mmol/L±0,09), em valor próximo à do grupo W (p>0,05), e significativamente mais alta que à do grupo controle sem tumor que recebeu a mesma suplementação (GC, 1,5mmol/L±0,06) (p<0,01). Quando da associação da suplementação de gordura de coco com óleo de fígado de tubarão (WFT+GC) observou-se novamente efeito protetor quanto à elevação da lactatemia (1,6mmol/L±0,06), ficando esta similar à dos animais sem tumor e dos com tumor com as diferentes suplementações (WFT, WOP e WFT+OP, p>0,05). A suplementação com óleo de fígado de tubarão nos animais com tumor (WFT, 1,6mmol/L±0,07) impediu a elevação da concentração plasmática de lactato em relação à do grupo W (p<0,001), mas foi ainda significativamente maior que à encontrada no grupo sem tumor (FT, 1,3mmol/L±0,07, p<0,01).

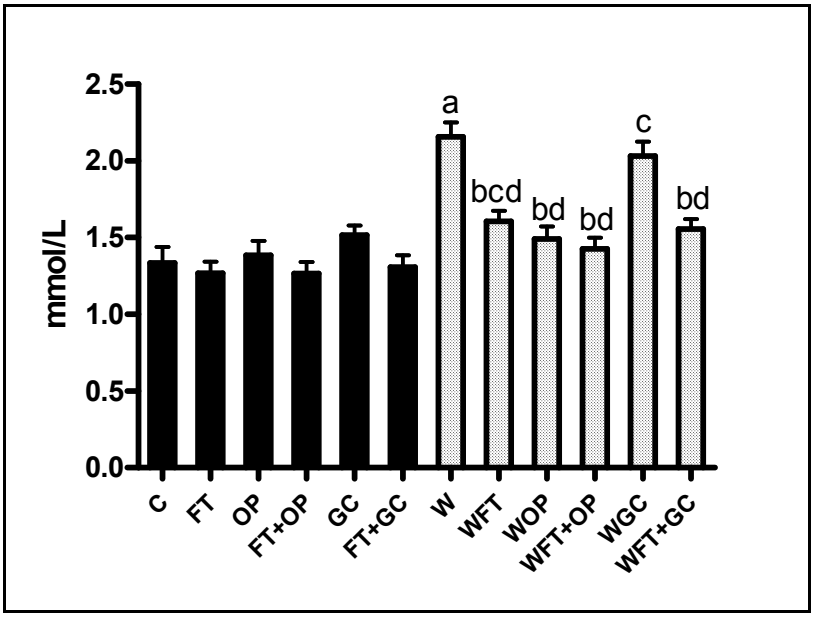

Figura 11: Concentração plasmática de lactato (mmol/L) dos animais sem tumor alimentados com dieta padrão (C), suplementados com óleo de fígado de tubarão (FT), óleo de peixe (OP), óleo de fígado de tubarão + óleo de peixe (FT+OP), gordura de coco (GC) e óleo de fígado de tubarão + gordura de coco (FT+GC), e dos animais portadores de tumor alimentados com dieta padrão (W), suplementados com óleo de fígado de tubarão (WFT), óleo de peixe (WOP), óleo de fígado de tubarão + óleo de peixe (WFT+OP), gordura de coco (WGC) e óleo de fígado de tubarão + gordura de coco (WFT+GC). Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média de 15 animais por grupo. [a]p<0,001 *vs.* C, [b]p<0,001 *vs.* W, [c]p<0,01 *vs.* respectivo controle sem tumor, [d]p<0,05 *vs.* WGC.

Outro importante parâmetro bioquímico indicativo de caquexia no modelo de tumor de Walker 256 é o conteúdo de glicogênio hepático (Figura 12). Os animais sem tumor alimentados com dieta padrão (C) e submetidos às diferentes suplementações (FT, OP, GC) e suas associações (FT+OP, FT+GC), não apresentaram diferença significativa quanto ao conteúdo de glicogênio hepático ($p>0,05$), o qual foi em média 150,4 µmol/g de tecido. A presença de tumor provocou intensa mobilização do conteúdo de glicogênio para a manutenção da glicemia, levando à redução dos estoques como observado nos animais do grupo W, que apresentaram redução acentuada de glicogênio hepático (101,0µmol/g de tecido ± 7,2), a qual foi de 31,2% quando comparado ao conteúdo dos animais do grupo sem tumor (C, $p<0,001$). As suplementações com óleo de fígado de tubarão (WFT, 124,7µmol/g de tecido ± 2,3), óleo de peixe (WOP, 125,2µmol/g de tecido ± 5,6), óleo de fígado de tubarão + óleo de peixe (WFT+OP, 125,4µmol/g de tecido ± 3,5), e óleo de fígado de tubarão + gordura de coco (WFT+GC, 124,4µmol/g de tecido ± 4,7) propiciaram conservação significativa de glicogênio hepático, cerca de 80% quando comparados com seus respectivos controles sem tumor (FT, OP, FT+OP, FT+GC). Os grupos WFT, WOP e WFT+OP apresentaram conservação de glicogênio hepático de aproximadamente 23%, 24% e 24%, respectivamente, em relação ao do grupo W ($p<0,05$). Já o grupo suplementado apenas com gordura de coco (WGC, 110,2µmol/g de tecido ± 3,8) apresentou redução do conteúdo de glicogênio em 30% em relação ao grupo sem tumor (GC) e a associação com óleo de fígado de tubarão (WFT+GC), promoveu elevação do conteúdo em 23% quando comparado ao do grupo W ($p<0,05$).

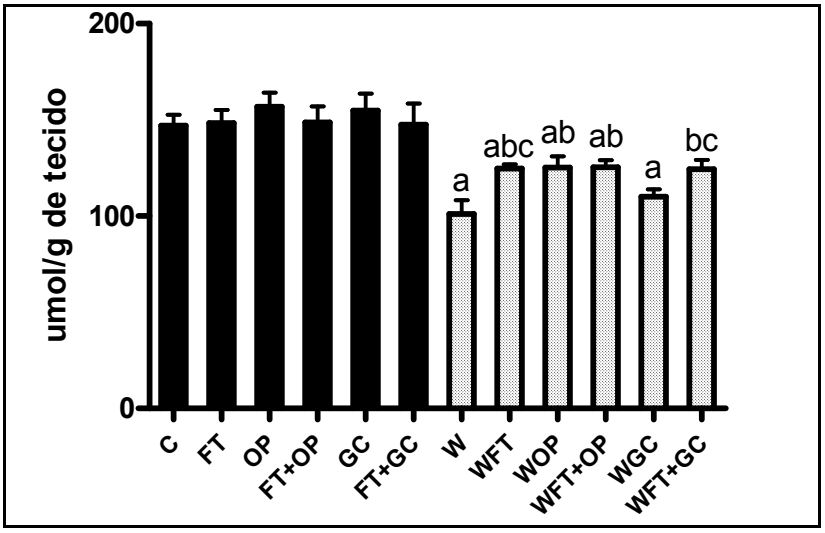

Figura 12: Conteúdo hepático de glicogênio (µmol/g de tecido) dos animais sem tumor alimentados com dieta padrão (C), suplementados com óleo de fígado de tubarão (FT), óleo de peixe (OP), óleo de fígado de tubarão + óleo de peixe (FT+OP), gordura de coco (GC) e óleo de fígado de tubarão + gordura de coco (FT+GC), e dos animais portadores de tumor alimentados com dieta padrão (W), suplementados com óleo de fígado de tubarão (WFT), óleo de peixe (WOP), óleo de fígado de tubarão + óleo de peixe (WFT+OP), gordura de coco (WGC) e óleo de fígado de tubarão + gordura de coco (WFT+GC). Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média de 15 animais por grupo. [a]$p<0,001$ *vs.* respectivo controle sem tumor, [b]$p<0,05$ *vs.* W, [c]$p<0,01$ *vs.* WGC.

Perda da massa corpórea é outro indicativo de instalação do quadro caquético. O peso dos animais (g) sem tumor e dos com tumor, no dia da inoculação dos tumores e 15 dias depois está apresentado na Tabela 1.

Tabela 1: Peso corporal (g), peso tumoral (g), peso da carcaça (g) e mudança de peso (g) dos animais sem tumor alimentados com dieta padrão (C), suplementados com óleo de fígado de tubarão (FT), óleo de peixe (OP), óleo de fígado de tubarão + óleo de peixe (FT+OP), gordura de coco (GC) e óleo de fígado de tubarão + gordura de coco (FT+GC), e dos portadores de tumor antes e após 15 dias da inoculação das células tumorais, alimentados com dieta padrão (W), suplementados com óleo de fígado de tubarão (WFT), óleo de peixe (WOP), óleo de fígado de tubarão + óleo de peixe (WFT+OP), gordura de coco (WGC) e óleo de fígado de tubarão + gordura de coco (WFT+GC). Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média de 15 animais por grupo.

Grupo	Peso do animal no dia da inoculação do tumor (g)	Peso do animal 15 dias após inoculação do tumor (g)	Peso do tumor (g)	Peso da carcaça (g)	Mudança de peso (g)
C	324,6±15,5	341,8±15,9	-	341,8±15,9	+17,2±2,1
FT	316,2±14,7	334,3±14,1	-	334,3±14,1	+18,1±2,5
OP	316,8±7,8	334,4±7,2	-	334,4±7,2	+17,7±2,1
FT+OP	331,5±7,0	351,1±7,7	-	351,1±7,7	+19,6±2,3
GC	318,3±13,4	339,4±13,9	-	339,4±13,9	+21,1±2,8
FT+GC	316,4±9,2	339,1±9,9	-	339,1±9,9	+22,7±2,4
W	320,2±18,4	318,6±12,7	17,1±2,3	300,3±13,9	-17,0±2,0 [c]
WFT	316,9±7,2	346,7±8,3	11,2±0,7 [ab]	336,0±9,0	+14,5±1,4 [ab]
WOP	317,3±11,6	338,3±8,8	7,3±0,6 [abde]	331,1±8,7	+15,5±0,9 [ab]
WFT+OP	327,0±9,6	349,4±12,6	8,2±0,6 [abe]	340,9±13,2 [a]	+18,5±1,9 [ab]
WGC	345,3±13,1	342,9±12,8	16,4±1,5	324,9±11,4	-22,1±0,4 [c]
WFT+GC	335,5±9,6	359,63±9,5	13,8±1,0	344,8±10,4 [a]	+8,8±2,2 [abc]

[a] $p<0,05$ *vs.* W; [b] $p<0,001$ *vs.* WGC; [c] $p<0,01$ *vs.* respectivo grupo sem tumor; [d] $p<0,01$ *vs.* WFT, [e] $p<0,01$ *vs.* WFT+GC.

Nos animais sem tumor, ao final de 15 dias, foi observado ganho de peso ao redor de 20 g, independentemente do tipo de dieta fornecido ($p>0,05$). Nos animais com tumor, para averiguação da massa corpórea final, faz-se necessário subtrair o peso do tumor da massa corpórea do animal ao final de 15 dias após inoculação das células tumorais (peso da carcaça). Este procedimento permitiu observar que nos animais alimentados com dieta padrão (W) houve perda de massa corpórea de 17 g, a qual foi significativamente diferente quando comparada à dos animais sem tumor ($p<0,01$). A suplementação com óleo de fígado de tubarão (WFT) impediu a perda

significativa de massa corpórea observada nos portadores de tumor sem suplementação ($p<0,05$ *vs* W) e de fato promoveu ganho de 14 g ao final de 15 dias, sendo o mesmo observado com a suplementação com óleo de peixe (WOP). A associação de ambas as suplementações (WFT+OP) incrementou o ganho de peso para 18,5 g. Já a suplementação com gordura de coco induziu à perda de massa corpórea ainda maior (22 g) quando comparada à dos animais alimentados com dieta padrão sem suplementação (W). A associação da suplementação com gordura de coco com óleo de fígado de tubarão (WFT+GC) permite concluir que óleo de fígado de tubarão foi hábil em reverter os efeitos da gordura de coco promovendo ganho de peso de quase 9 g ($p<0,05$ *vs.* W e WGC). Os resultados referentes à massa tumoral foram relatados na Figura 8.

De forma concisa, os efeitos das diferentes suplementações sobre os parâmetros de caquexia analisados são apresentados no Esquema 1.

Esquema 1: Resumo dos efeitos das diferentes suplementações sobre os parâmetros de caquexia provocada pelo tumor de Walker 256, em relação aos animais alimentados com dieta padrão (W).

Suplemento	**Caquexia**				
	Glicemia	**Triacilglice-rolemia**	**Lactatemia**	**Glicogênio**	**Massa corpórea**
AUSÊNCIA (grupo W)	**BAIXA**	**ALTA**	**ALTA**	**BAIXO**	**REDUZIDA**
Óleo de fígado de tubarão (WFT)	Eleva	Reduz	Reduz	Eleva	Eleva
Óleo de peixe (WOP)	Eleva	Reduz	Reduz	Eleva	Eleva
Óleo de fígado de tubarão + óleo de peixe (WFT+OP)	Eleva	Reduz	Reduz	Eleva	Eleva
Gordura de coco (WGC)	Não altera	Não altera	Não altera	Não altera	Não altera
Óleo de fígado de tubarão + gordura de coco (WFT+GC)	Não altera	Não altera	Reduz	Eleva	Eleva

4.3 Capacidade proliferativa das células tumorais

A capacidade proliferativa, *ex vivo,* das células do tumor de Walker 256 está apresentada na Figura 13. Após 24 horas de cultivo, a proliferação das células obtidas dos animais com tumor alimentados com dieta padrão (W) foi de ~ 600 cpm. Já a das células obtidas dos animais suplementados com óleo de fígado de tubarão (WFT) foi de ~ 400 cpm, a qual foi significativamente menor (1,5 vezes) quando comparada à dos animais sem suplementação ($p<0,001$ *vs.* W). As células obtidas dos animais suplementados com óleo de peixe na dieta (grupo WOP) tiveram capacidade proliferativa ainda menor (~250 cpm), sendo 2,4 vezes menor ($p<0,001$) quando comparada à dos animais sem suplementação (W) e 1,6 vezes ($p<0,05$) em relação à dos animais suplementados com óleo de fígado de tubarão (WFT). A associação de ambas as suplementações (WFT+OP), não promoveu efeito diferente daquele já observado pela suplementação com óleo de peixe isoladamente (~230 cpm). A suplementação com gordura de coco promoveu efeito potencializador para a capacidade proliferativa *ex vivo* das células tumorais, a qual foi ~ 800 cpm, sendo significativamente maior quando comparada à de todos os grupos experimentais ($p<0,001$). A associação com óleo de fígado de tubarão (WFT+GC), por sua vez, levou a capacidade proliferativa aos valores da suplementação isolada com óleo de fígado de tubarão (~ 400 cpm), sendo assim diferente significativamente da do grupo WGC ($p<0,001$), e inferior à do W ($p<0,001$).

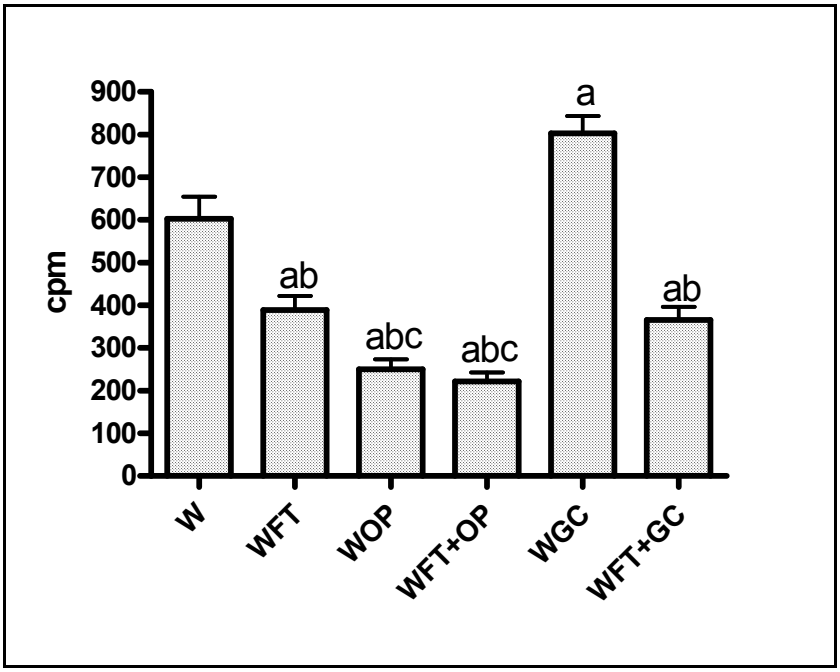

Figura 13: Proliferação de células tumorais (cpm) *ex vivo,* obtidas dos animais alimentados com dieta padrão (W), suplementados com óleo de fígado de tubarão (WFT), óleo de peixe (WOP), óleo de fígado de tubarão + óleo de peixe (WFT+OP), gordura de coco (WGC) e óleo de fígado de tubarão + gordura de coco (WFT+GC). Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média de 20 animais por grupo. [a]p<0,001 *vs.* W, [b]p<0,001 *vs.* WGC, [c]p<0,05 *vs.* WFT.

4.4 Mensuração da produção de hidroperóxidos lipídicos no tecido tumoral

A concentração de lipoperóxidos (nmol/mg de proteína) está apresentada na Figura 14. No tecido tumoral dos animais alimentados com dieta padrão (W), a concentração de lipoperóxidos foi de 39,2 nmol/mg de proteína ± 3,6. A suplementação com óleo de fígado de tubarão (WFT) elevou esta concentração para 63 nmol/mg de proteína ± 2,4, a qual foi 1,6 vezes maior quando comparada à obtida do tumor dos animais do grupo W (p<0,05). A suplementação com óleo de peixe (WOP), por sua vez, induziu à elevada concentração de lipoperóxidos na massa tumoral (129,6 nmol/mg de proteína ± 12,9), a qual foi 3,3 vezes maior quando comparada à do grupo W (p<0,001), e 2 vezes em relação à do grupo WFT (p<0,01). A associação de ambas as suplementações (WFT+OP) não promoveu efeito adicional, sendo similar ao já observado com óleo de peixe isoladamente (p>0,05 *vs.* WOP). No grupo suplementado com gordura de coco, a lipoperoxidação foi de 52,3 nmol/mg de proteína ± 7, a qual não foi significativamente diferente da observada no tumor dos animais sem

suplementação (W, p>0,05). A associação com suplementação com óleo de fígado de tubarão (WFT+GC), por sua vez, elevou a peroxidação lipídica da massa tumoral para 72,1 nmol/mg de proteína ± 5,3, a qual foi 1,8 vezes maior que à encontrada no tumor dos animais sem suplementação (p<0,05).

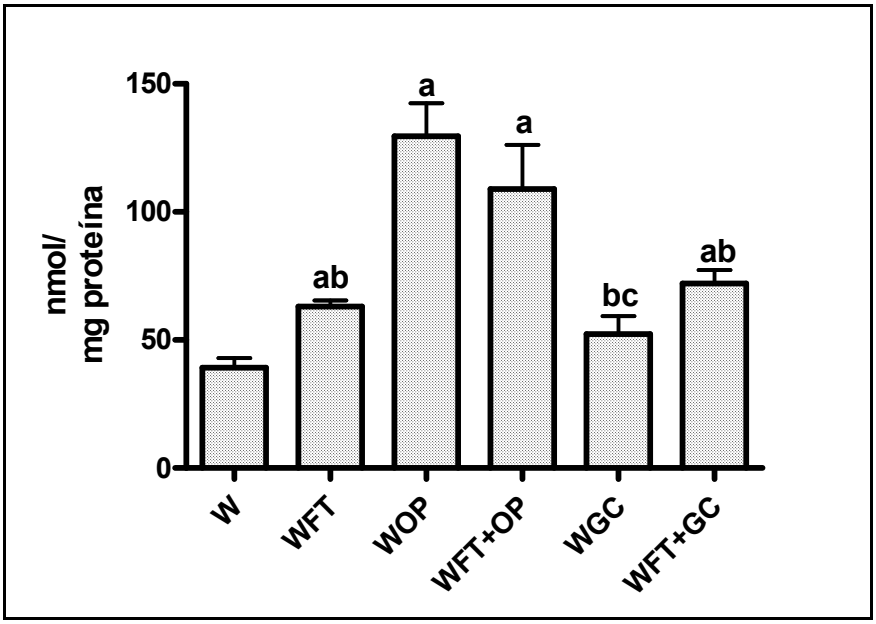

Figura 14: Peroxidação lipídica de tecido tumoral (nmol/mg de proteína) obtido dos animais alimentados com dieta padrão (W), suplementados com óleo de fígado de tubarão (WFT), óleo de peixe (WOP), óleo de fígado de tubarão + óleo de peixe (WFT+OP), gordura de coco (WGC) e, óleo de fígado de tubarão + gordura de coco (WFT+GC). Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão da média de 8 animais por grupo. [a] p<0,05 *vs.* W, [b] p<0,01 *vs.* WOP, [c] p<0,05 *vs.* WFT+OP.

4.5 Apoptose de células tumorais

O número de células tumorais viáveis, apoptóticas e necróticas, expresso em percentagem (%), está apresentado na Tabela 2. Nos tumores dos animais alimentados com dieta padrão (W), o número de células vivas foi de aproximadamente 50%, as células em apoptose atingiram 20%, e em necrose, 30%. A suplementação com óleo de fígado de tubarão (WFT) reduziu em praticamente 2 vezes o número de células viáves, ficando apenas 29% (p<0,05 *vs.* W). Observou-se uma mudança no número de células apoptóticas para 57%, uma elevação perto de 3 vezes em comparação ao tumor dos animais alimentados com dieta padrão, e as células em

necrose constituíram 13%, representando redução de 2 vezes (p<0,05). Em outras palavras, a presença de óleo de fígado de tubarão induziu a morte das células por processo apoptótico. A suplementação com óleo de peixe (WOP) induziu a efeito similar ao do óleo de fígado de tubarão, contudo foi mais vigoroso. No grupo WOP foram encontrados 24% de células viáveis (p<0,05 *vs.* W), elevação da apoptose para 69% (p<0,05 *vs.* WFT), e 8% de necrose (p<0,05 *vs.* W). A associação de ambas as suplementações (WFT+OP) não provocou efeito diferente do já observado com as suplementações individualmente (p<0,05 *vs.* W). A suplementação com gordura de coco (WGC) não provocou efeito distinto daquele observado no grupo alimentado com dieta padrão (W, p>0,05). A inclusão de suplementação de óleo de fígado de tubarão com gordura de coco (WFT+GC) promoveu o mesmo fenômeno observado com a suplementação com óleo de fígado de tubarão isoladamente (p<0,05 *vs.* W).

Tabela 2: Percentual de células apoptóticas, necróticas e viáveis, determinado por citometria de fluxo, dos tumores dos animais alimentados com dieta padrão (W), suplementados com óleo de fígado de tubarão (WFT), óleo de peixe (WOP), óleo de fígado de tubarão + óleo de peixe (WFT+OP), gordura de coco (WGC) e óleo de fígado de tubarão + gordura de coco (WFT+GC). Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média de 5 animais por grupo.

Grupos	Células apoptóticas (%)	Células necróticas (%)	Células viáveis (%)
W	19,8±2,3	30,6±1,1	49,6±2,7
WFT	56,9±1,0 [ab]	12,8±1,2 [ab]	28,9±1,5 [ab]
WOP	68,5±2,9 [abc]	7,5±0,9 [abc]	23,7±1,0 [abc]
WFT+OP	64,8±0,6 [ab]	13,5±0,5 [ab]	21,6±0,7 [ab]
WGC	28,9±6,1	27,6±7,3	46,9±2,5
WFT+GC	62,1±1,3 [ab]	11,8±1,5 [ab]	26,2±0,9 [ab]

[a] p<0,05 *vs.* W; [b] p<0,001 *vs.* WGC; [c] p<0,05 *vs.* WFT

A expressão de proteínas envolvidas no processo de apoptose, nas células de tumor de Walker 256, está apresentada nas Figuras 15, 16 e 17. A expressão da proteína pró-apoptótica Bax (Figura 15) foi significativamente elevada (3,7 vezes) nas células tumorais do grupo suplementado com óleo de fígado de tubarão (p<0,01 WFT *vs.* W). A suplementação com óleo de peixe induziu a efeito similar (p<0,01 WOP *vs.*

W). A associação de ambas as suplementações não promoveu efeito diferente do já induzido individualmente (p<0,01 *vs.* W). A suplementação com gordura de coco (WGC) não alterou o padrão de expressão da proteína Bax, sendo igual à do grupo W (p>0,05), e significativamente diferente (2,5 vezes) quando comparada às demais suplementações (p<0,05 vs. WFT, WOP, WFT+OP). A adição da suplementação com óleo de fígado de tubarão à gordura de coco (WFT+GC) provocou aumento da expressão de Bax similar à do grupo suplementado isoladamente com óleo de fígado de tubarão.

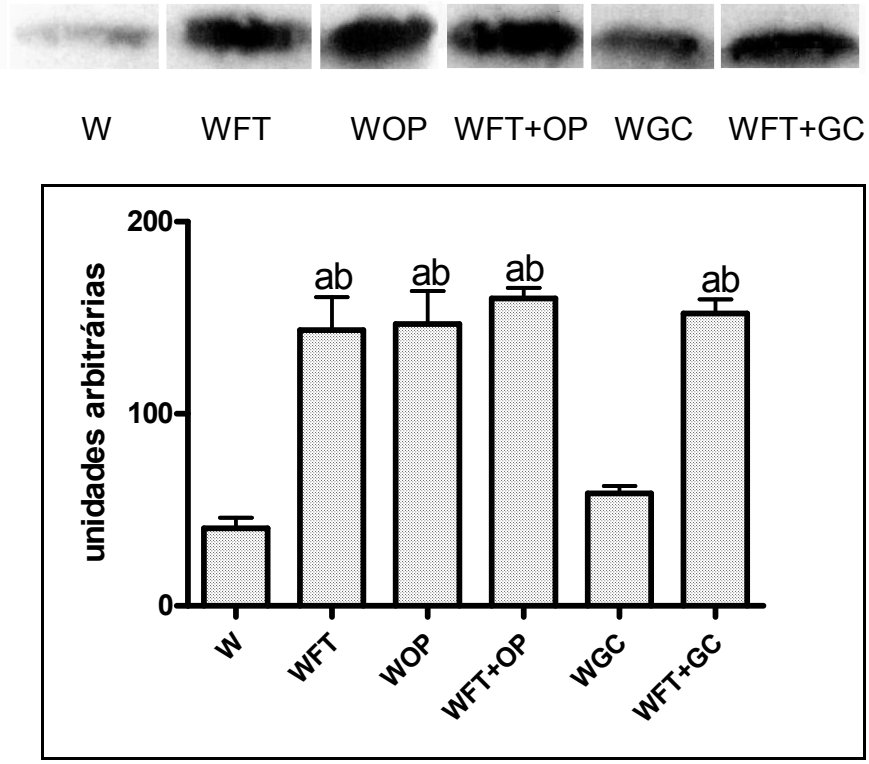

Figura 15: Expressão da proteína pró-apoptótica Bax (unidades arbitrárias) em tecido tumoral dos animais alimentados com dieta padrão (W), suplementados com óleo de fígado de tubarão (WFT), óleo de peixe (WOP), óleo de fígado de tubarão + óleo de peixe (WFT+OP), gordura de coco (WGC) e, óleo de fígado de tubarão + gordura de coco (WFT+GC). Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão da média de 3 tumores por grupo. [a] p<0,01 *vs.* W, [b] p<0,05 *vs.* WGC.

A expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 (Figura 16) não foi diferente entre os grupos estudados (p>0,05).

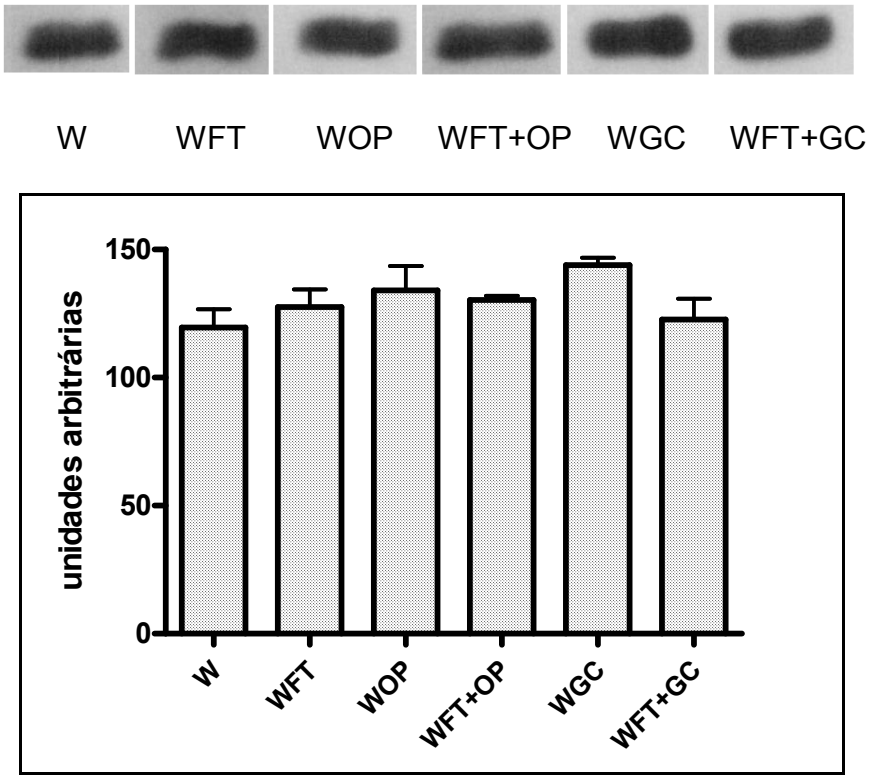

Figura 16: Expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 (unidades arbitrárias) em tecido tumoral dos animais alimentados com dieta padrão (W), suplementados com óleo de fígado de tubarão (WFT), óleo de peixe (WOP), óleo de fígado de tubarão + óleo de peixe (WFT+OP), gordura de coco (WGC) e óleo de fígado de tubarão + gordura de coco (WFT+GC). Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média de 3 animais por grupo.

A razão entre a expressão da proteína Bax e Bcl-2 está apresentada na Figura 17. Esta razão indica a resultante entre duas "forças intracelulares", pró e anti-apoptótica. Os grupos suplementados com óleo de fígado de tubarão (WFT), óleo de peixe (WOP), óleo de fígado de tubarão+óleo de peixe (WFT+OP) e óleo de fígado de tubarão+gordura de coco (WFT+GC) apresentaram maior relação Bax/Bcl-2 que a observada para o grupo suplementado apenas com gordura de coco (WGC) (cerca de 2,7 vezes), e para o grupo não-suplementado (W) (cerca de 3,8 vezes). A suplementação isolada com gordura de coco (WGC) promoveu leve aumento na relação Bax/Bcl-2 em relação à ausência de suplementação (W), mas esta não foi diferente estatisticamente do grupo W.

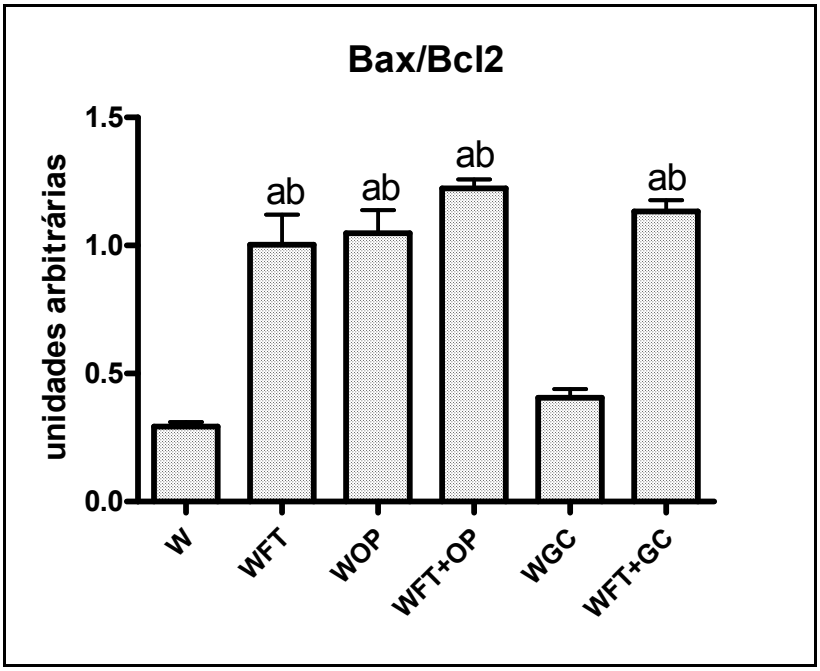

Figura 17: Razão entre a expressão da proteína pró-apoptótica Bax e a anti-apoptótica Bcl-2 em tecido tumoral dos animais alimentados com dieta padrão (W), suplementados com óleo de fígado de tubarão (WFT), óleo de peixe (WOP), óleo de fígado de tubarão + óleo de peixe (WFT+OP), gordura de coco (WGC) e óleo de fígado de tubarão + gordura de coco (WFT+GC). Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão da média de 3 animais por grupo. [a] $p<0,001$ *vs.* W, [b] $p<0,01$ *vs.* WGC.

Esquema 2: Resumo dos efeitos das diferentes suplementações sobre o crescimento tumoral em relação ao grupo alimentado com dieta padrão (W).

Suplementações	**Crescimento tumoral**			
	Massa tumoral	**Proliferação de células tumorais**	**Lipoperoxidação em tecido tumoral**	**Apoptose de células tumorais**
Óleo de fígado de tubarão (WFT)	Reduz	Reduz	Eleva	Eleva
Óleo de peixe (WOP)	Reduz	Reduz	Eleva	Eleva
Óleo de fígado de tubarão + óleo de peixe (WFT+OP)	Reduz	Reduz	Eleva	Eleva
Gordura de coco (WGC)	Não altera	Eleva	Não altera	Não altera
Óleo de fígado de tubarão +gordura de coco (WFT+GC)	Não altera	Reduz	Eleva	Eleva

4.6 Perfil de ácidos graxos dos óleos, ração e tumor

O perfil de ácidos graxos da ração utilizada na alimentação dos animais, do óleo de fígado de tubarão, óleo de peixe e gordura de coco, está apresentado na Tabela 3. A ração padrão é rica em ácido graxo da família ômega-6, no caso o ácido linoléico, encontrado em 51%, seguido de maior concentração de ácido oléico e palmítico (ambos em 20%). A cápsula de óleo de fígado de tubarão fornecida na suplementação apresentou 40% de gordura saturada, 6,5% de ácido palmitoléico, 2,8% de ácido graxo da família ômega-6, 28% de ácido oléico representante da família ômega-9, e 18% de ácidos da família ômega-3. O óleo de peixe é rica fonte de ácidos graxos da família ômega-3, o que pôde ser confirmado na cápsula oferecida na suplementação, a qual continha praticamente 40% destes ácidos, especialmente EPA e DHA. A gordura de coco é fonte de gordura saturada de origem vegetal, e isto pôde ser confirmado pela presença de 88% de ácidos graxos saturados. Em resumo, observa-se que a dieta padrão é rica em ácidos graxos ômega-6, a gordura de coco rica em ácidos graxos saturados, óleo de peixe rico em ácidos graxos de cadeia longa da família ômega-3, e no óleo de fígado de tubarão há presença de ácidos graxos ômega-3 de cadeia longa, contudo em concentração 2,3 vezes menor que no óleo de peixe, sendo mais rica em gordura saturada na forma de ácido palmítico e gordura poliinsaturada na forma de ácido oléico (ômega-9).

Tabela 3: Perfil de ácidos graxos (g/100g de ácidos graxos totais), obtido por HPLC, das cápsulas de óleo de fígado de tubarão, óleo de peixe, gordura de coco e da ração administrada aos animais. Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão da média de 3 mensurações independentes.

Ácidos graxos (g/100g de ácidos graxos totais)	**Óleo de fígado de tubarão**	**Óleo de peixe**	**Gordura de coco**	**Ração Nuvital®** (AR-1)
Láurico (12:0)	1,0±0,05	3,4±0,7	45,3±3,1	-
Mirístico (14:0)	4,8±0,2	9,8±0,4	17,0±0,9	-
Palmítico (16:0)	32,6±2,0	25,3±3,0	23,6±4,8	20,7±3,8
Palmitoléico (16:1n-7)	6,5±0,5	6,5±0,1	-	-
Esteárico (18:0)	1,6±0,07	2,1±0,1	1,9±0,1	2,3±0,04
Oléico (18:1n-9)	28,2±1,6	10,2±0,9	8,0±0,7	19,5±1,5
Linoléico (18:2n-6)	1,9±0,4	2,0±0,7	2,8±0,2	51,3±4,2
Linolênico (18:3n-3)	0,6±0,08	0,7±0,2	-	5,0±0,2
Araquidônico (20:4n-6)	0,9±0,1	0,9±0,2	-	0,1±0,07
EPA (20:5n-3)	4,5±0,3	20,2±1,3	1,8±0,2	-
DHA (22:6n-3)	12,6±1,0	18,8±1,2	-	-

O perfil de ácidos graxos obtidos dos tumores está apresentado na Tabela 4. Os tumores dos animais alimentados com dieta padrão (W) apresentaram maior percentagem de ácidos graxos saturados e poliinsaturados ômega-6 e ômega-9. Pela maior presença de ácido graxo linoléico na ração, temos como resultado maior percentagem também de ácido araquidônico na massa tumoral. A suplementação com óleo de fígado de tubarão, rico em ácido palmítico e ácido oléico, fez com que houvesse também maior presença destes ácidos graxos na massa tumoral, entretanto a suplementação foi hábil em diminuir em 2 vezes o perfil de ácido araquidônico ($p<0,05$ vs. W). Por também apresentar na sua constituição, ácidos graxos de cadeia longa da família ômega-3, estes também estavam mais elevados quando comparados ao grupo W. A suplementação com óleo de peixe, rico em ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa da família ômega-3, elevou o conteúdo de EPA nos tumores em mais de 2 vezes em relação à WFT, e em 6 vezes em relação ao grupo alimentado com dieta padrão ($p<0,05$), reduzindo significativamente o conteúdo de ácido araquidônico em 2 vezes quando comparado ao do grupo WFT, e em 5 vezes em relação ao do grupo W ($p<0,05$). A associação de óleo de fígado de tubarão + óleo de

peixe (WFT+OP) provocou efeito similar ao do grupo suplementado com óleo de peixe isoladamente. A suplementação com gordura de coco (WGC) não induziu a perfil lipídico diferente daquele já observado com a dieta padrão, exceto pelo aumento do total de ácidos graxos saturados na massa tumoral ($p<0,05$ *vs.* W). A inclusão da suplementação com óleo de fígado de tubarão à gordura de coco (WFT+GC) alterou o perfil para aquele observado com a suplementação com óleo de fígado de tubarão oferecido isoladamente, ou seja, óleo de fígado de tubarão se contrapôs aos efeitos isolados da gordura de coco.

Tabela 4: Perfil de ácidos graxos (g/100g de ácidos graxos totais) determinado por HPLC dos extratos lipídicos dos tumores dos animais alimentados com dieta padrão (W), suplementados com óleo de fígado de tubarão (WFT), óleo de peixe (WOP), óleo de fígado de tubarão + óleo de peixe (WFT+OP), gordura de coco (WGC) e óleo de fígado de tubarão + gordura de coco (WFT+GC). Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média de 7 animais por grupo.

Ácidos graxos (g/100g de ácidos graxos totais)	**Grupos**					
	W	**WFT**	**WOP**	**WFT+OP**	**WGC**	**WFT+GC**
Láurico (12:0)	0,4±0,2	0,3±0,09 [b]	0,4±0,1 [b]	0,4±0,06 [b]	1,8±0,3[a]	1,4±0,5
Mirístico (14:0)	0,8±0,2	0,8±0,2 [b]	1,0±0,2 [b]	1,0±0,2 [b]	2,4±0,4 [a]	1,7±0,05
Palmítico (16:0)	23,4±1,0	26,1±1,7	22,8±1,5 [b]	26,5±1,5	31,1±2,0[a]	21,9±0,5[b]
Palmitoléico(16:1n-7)	1,3±0,1	1,2±0,2	1,7±0,1	1,6±0,2	1,6±0,2	1,4±0,1
Esteárico (18:0)	14,3±1,5	14,1±1,6	8,0±0,9	9,1±1,4	12,2±2,4	15,7±1,9
Oléico (18:1n-9)	23,6±0,3	23,4±0,7	24,8±0,9	25,7±0,9	24,4±1,2	23,3±0,9
Linoléico (18:2n-6)	20,3±2,8	24,2±1,1	21,8±2,3	22,6±2,5	24,4±2,0	23,0±2,5
Linolênico (18:3n-3)	0,4±0,1	0,7±0,2	1,0±0,07 [a]	0,9±0,2	0,6±0,07	0,2±0,05[c]
Araquidônico(20:4n-6)	17,2±2,2	8,0±1,5 [a]	3,5±0,8 [ab]	3,9±1,4 [ab]	15,5±2,6	10,0±0,1[a]
EPA (20:5n-3)	0,2±0,08	0,5±0,1	1,2±0,2 [ab]	0,8±0,2 [ab]	0,1±0,08	0,7±0,3
DHA (22:6n-3)	1,2±0,1	2,2±0,3 [c]	4,2±0,7 [ab]	4,2±0,5 [ab]	1,4±0,2	2,8±0,2

[a] $p<0,05$ *vs.* W; [b] $p<0,05$ *vs.* WGC; [c] $p<0,05$ *vs.* WOP e WFT+OP

4.7 Quantificação de alquilgliceróis presentes na cápsula de óleo de fígado de tubarão e nos tumores

A determinação por GC-MS do perfil de alquilgliceróis presentes na cápsula de óleo de fígado de tubarão está representada no cromatograma apresentado na Figura 18. Os alquilgliceróis mais abundantes foram o octadecenilglicerol (52,4%), seguido pelo hexadecilglicerol (17%) e octadecilglicerol (8,4%) (Tabela 5). Os compostos heptadecenilglicerol (1,3%), heptadecilglicerol (1%) e os outros alquilgliceróis assinalados no cromatograma (*) foram encontrados em menor concentração que os três anteriores. A identificação dos alquilgliceróis foi realizada pelos seguintes fragmentos: 43, referente ao grupamento acetil; 177, referente ao glicerol; e 159, referente ao glicerol acetilado, conforme destacado nos espectros de massa das Figuras 19-23. Todos os alquilgliceróis em conjunto constituem 20% dos lipídeos presentes no óleo de fígado de tubarão ECOMER®.

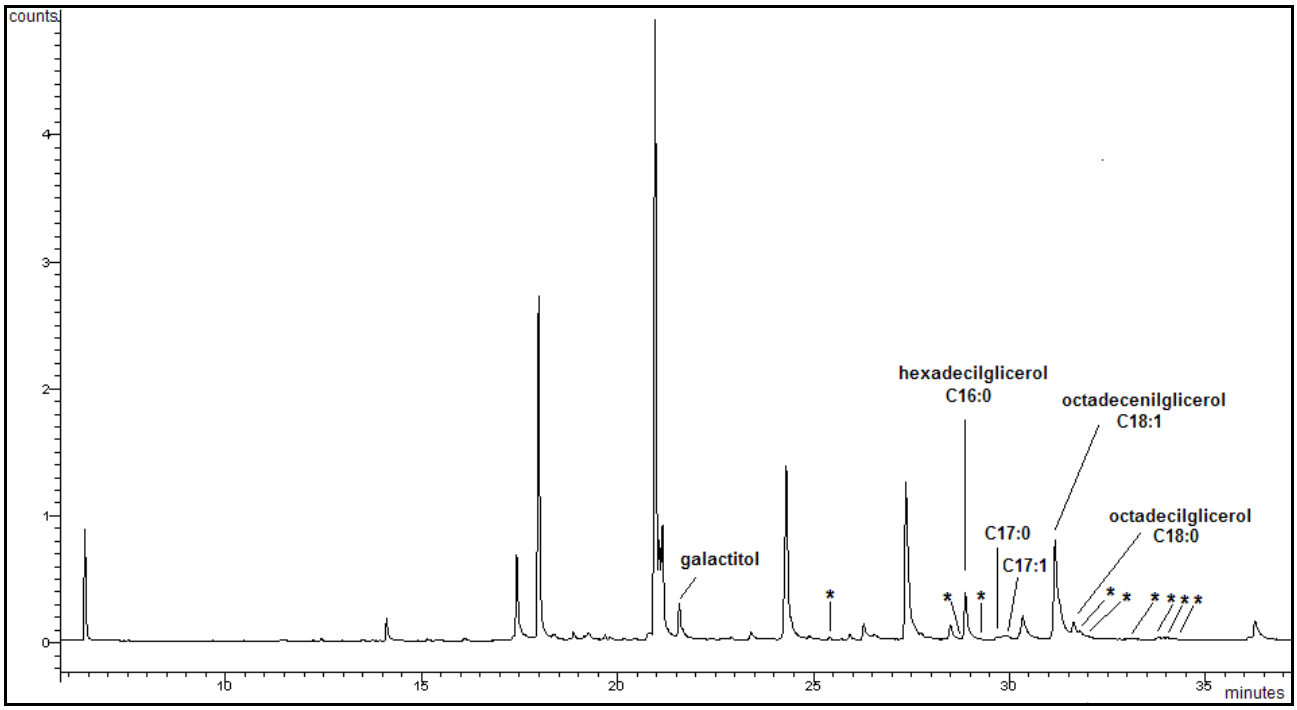

Figura 18: Cromatograma obtido por GC-MS do óleo de fígado de tubarão submetido às etapas de metanólise e acetilação. Galactitol, padrão externo acetilado; hexadecilglicerol, alquilglicerol com 16 carbonos e cadeia saturada; octadecenilglicerol, alquilglicerol com 18 carbonos e uma insaturação; octadecilglicerol, alquilglicerol com 18 carbonos e cadeia saturada; C17:0, heptadecilglicerol, alquilglicerol com 17 carbonos e cadeia saturada; C17:1, heptadecenilglicerol, alquilglicerol com 17 carbonos e uma insaturação; * outros alquilgliceróis identificados.

Tabela 5: Porcentagem do total de alquilgliceróis (%) encontrados na cápsula de óleo de fígado de tubarão fornecida aos animais, obtida a partir da área de pico de cada composto.

Alquilgliceróis	% do total de alquilgliceróis
Octadecenilglicerol (C18:1)	52,4
Hexadecilglicerol (C16:0)	17,0
Octadecilglicerol (C18:0)	8,4
Heptadecenilglicerol (C17:1)	1,3
Heptadecilglicerol (C17:0)	1,0
Outros alquilgliceróis	19,9

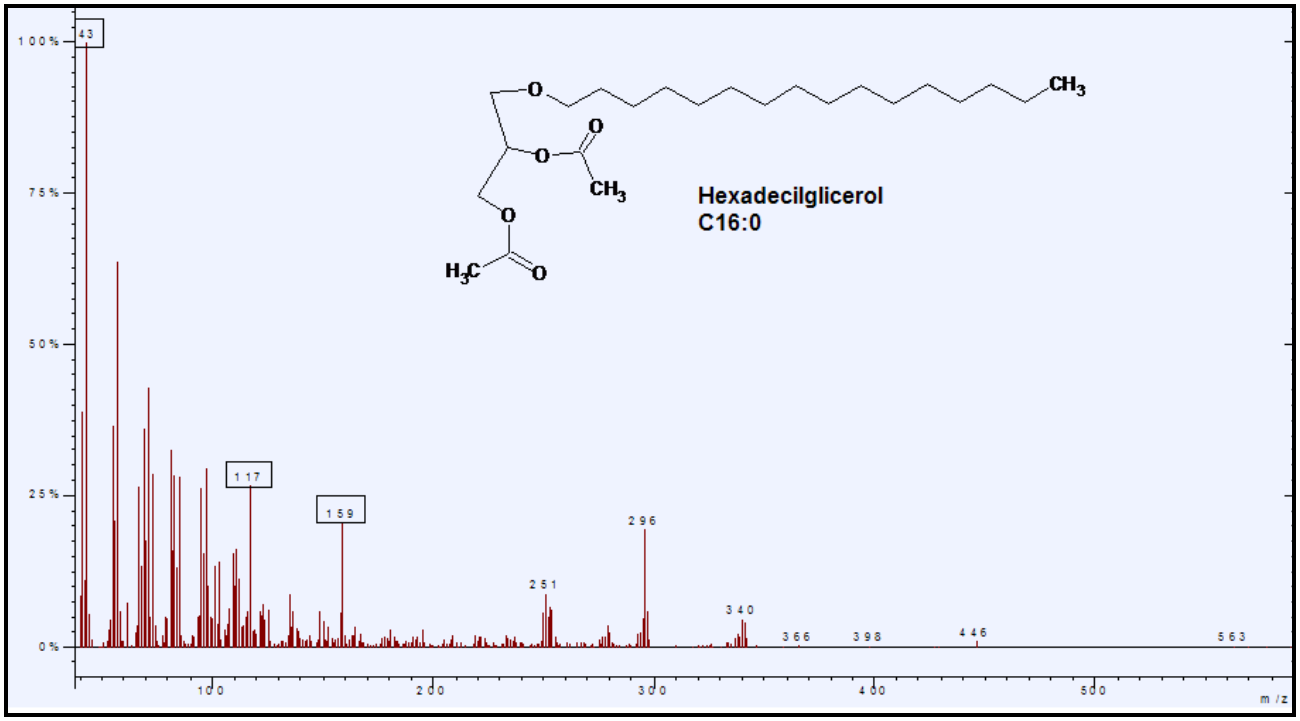

Figura 19: Espectro de massa do composto hexadecilglicerol acetilado (2,3-O-acetil-1-hexadecilglicerol) de óleo de fígado de tubarão. Os fragmentos de massa destacados correspondem a: fragmento 43, grupamento acetil; fragmento 117, glicerol; fragmento 159, glicerol acetilado.

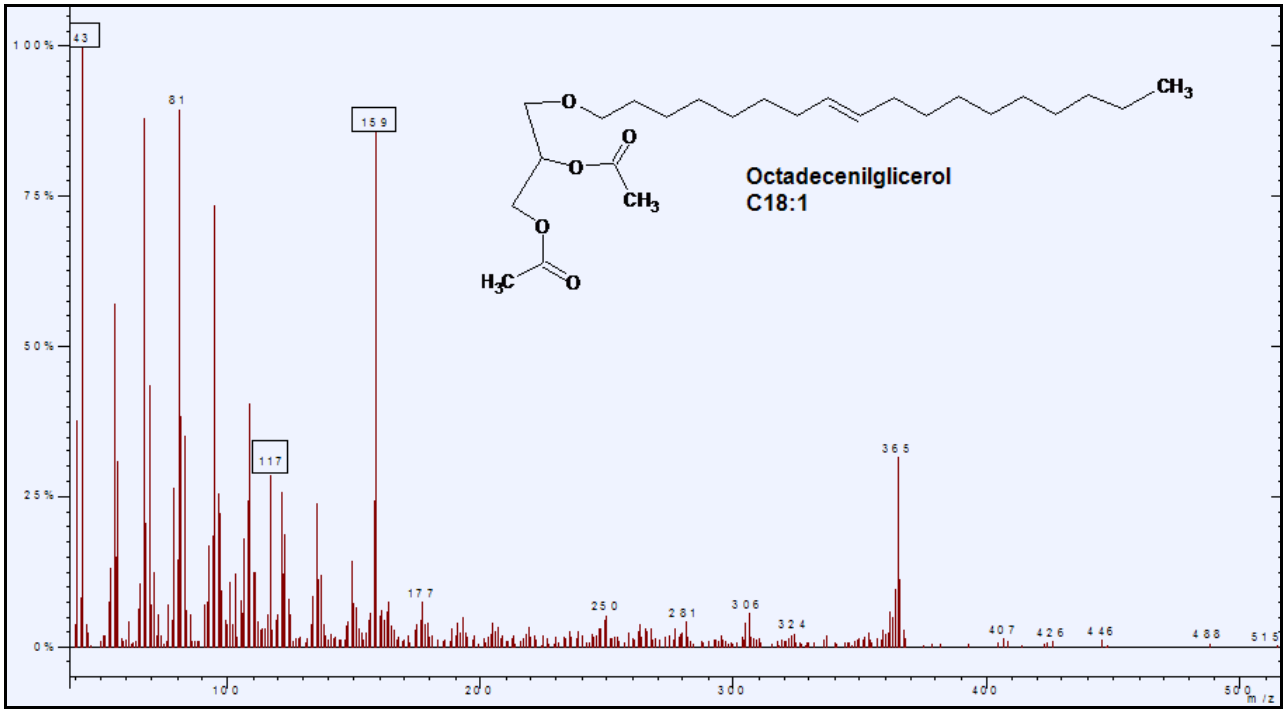

Figura 20: Espectro de massa do composto octadecenilglicerol acetilado (2,3-O-acetil-1-octadecenilglicerol) de óleo de fígado de tubarão. Os fragmentos de massa destacados correspondem a: fragmento 43, grupamento acetil; fragmento 117, glicerol; fragmento 159, glicerol acetilado.

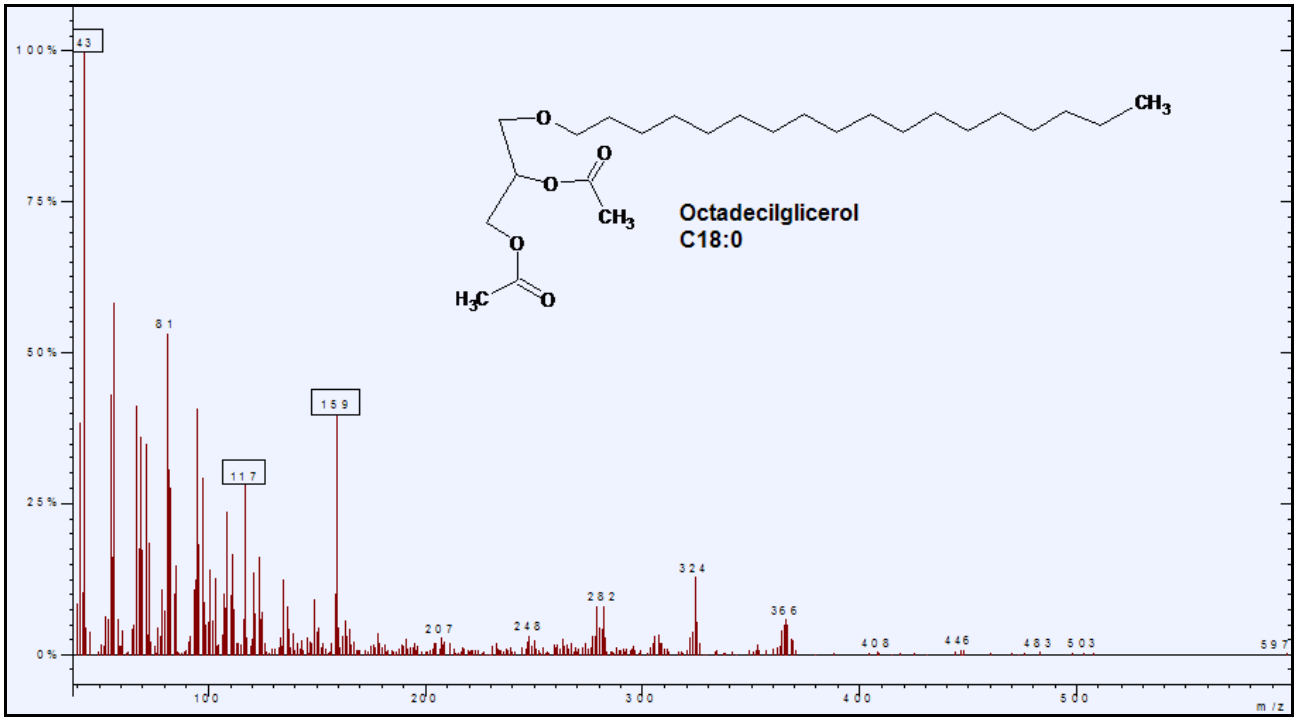

Figura 21: Espectro de massa do composto octadecilglicerol acetilado (2,3-O-acetil-1-octadecilglicerol) de óleo de fígado de tubarão. Os fragmentos de massa destacados correspondem a: fragmento 43, grupamento acetil; fragmento 117, glicerol; fragmento 159, glicerol acetilado.

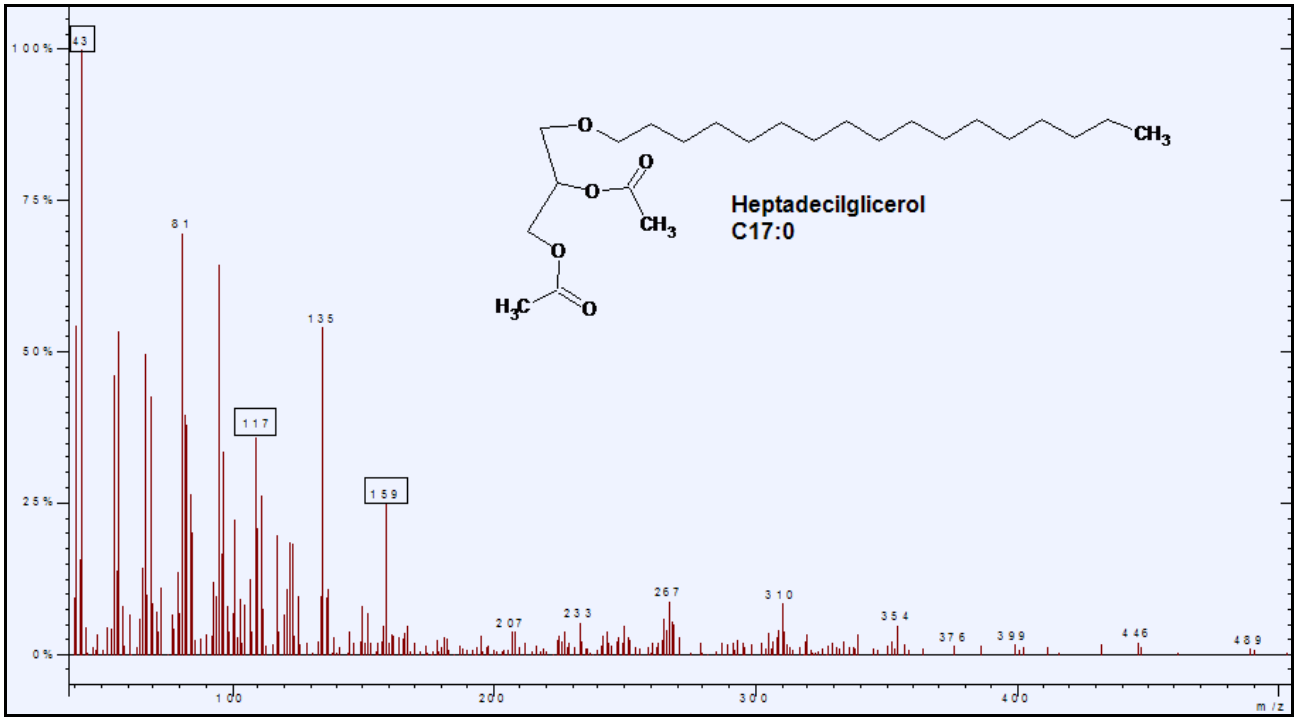

Figura 22: Espectro de massa do composto heptadecilglicerol acetilado (2,3-O-acetil-1-heptadecilglicerol) de óleo de fígado de tubarão. Os fragmentos de massa destacados correspondem a: fragmento 43, grupamento acetil; fragmento 117, glicerol; fragmento 159, glicerol acetilado.

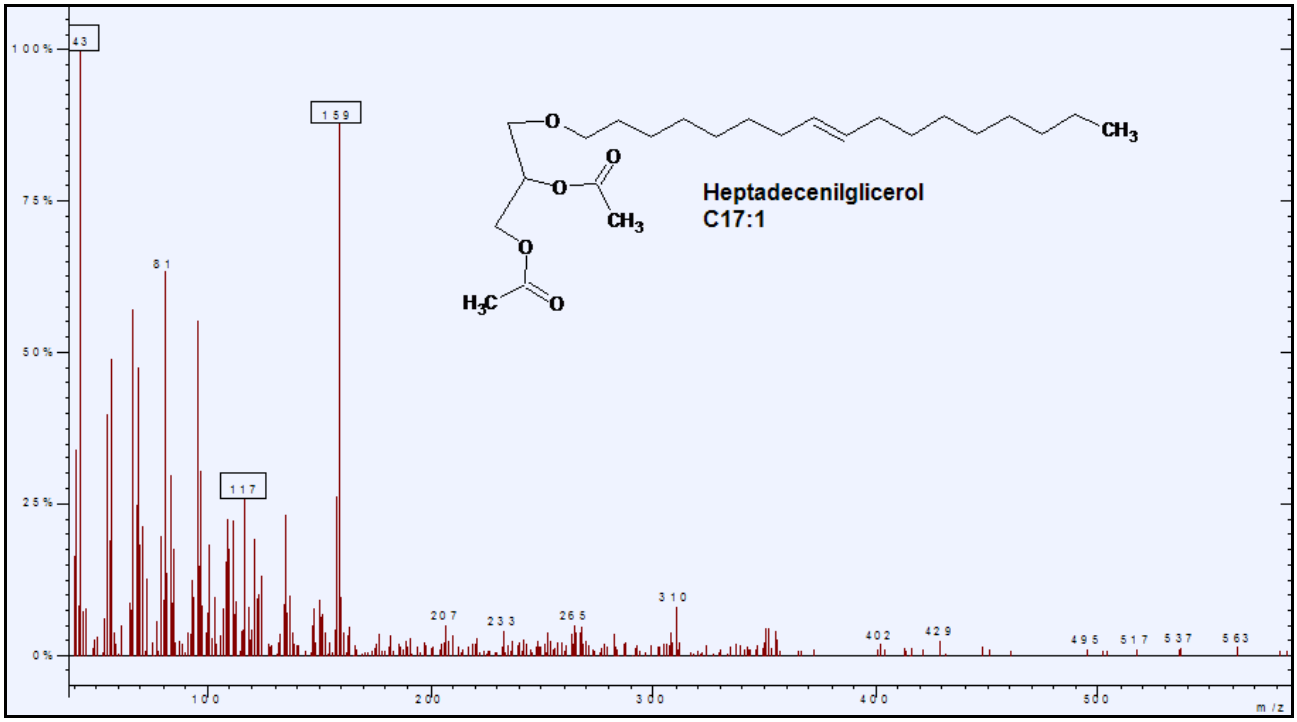

Figura 23: Espectro de massa do composto heptadecenilglicerol acetilado (2,3-O-acetil-1-heptadecenilglicerol) de óleo de fígado de tubarão. Os fragmentos de massa destacados correspondem a: fragmento 43, grupamento acetil; fragmento 117, glicerol; fragmento 159, glicerol acetilado.

A concentração de alquilgliceróis presentes nos extratos lipídicos dos tumores, expressa em ng/µL e obtida por GC-MS, está apresentada na Tabela 6. O tumor do grupo suplementado com óleo de fígado de tubarão (WFT) apresentou concentração de alquilgliceróis significativamente maior que a dos demais grupos ($p<0,05$). Este grupo apresentou 1,6 vezes mais alquilgliceróis ($p<0,05$) que o grupo alimentado com dieta padrão (W), e cerca de 3 vezes maior ($p<0,001$) que a dos grupos suplementados com óleo de peixe (WOP), associação de ambas suplementações (WFT+OP) e gordura de coco (WGC). O grupo WFT+GC apresentou 2 vezes menos alquilgliceróis que o grupo WFT.

Tabela 6: Concentração de alquilgliceróis (ng/µL), determinada por GC-MS, nos extratos lipídicos obtidos dos tumores dos animais alimentados com dieta padrão (W), suplementados com óleo de fígado de tubarão (WFT), óleo de peixe (WOP), óleo de fígado de tubarão + óleo de peixe (WFT+OP), gordura de coco (WGC) e óleo de fígado de tubarão + gordura de coco (WFT+GC). Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média de 3 tumores por grupo.

Alquilgliceróis (ng/µL)	**Grupos**					
	W	**WFT**	**WOP**	**WFT+OP**	**WGC**	**WFT+GC**
Hexadecilglicerol + Octadecilglicerol + Octadecenilglicerol	1,6±0,2	2,6±0,09[a]	0,9±0,07	0,7±0,09	0,7±0,1	1,1±0,4

Padrão externo de galactitol, 48 ng/µL por injeção. Hexadecilglicerol, 16 carbonos, cauda saturada; Octadecilglicerol, 18C, cauda saturada; Octadecenilglicerol, 18C, cauda insaturada.
[a] $p<0,05$ *vs.* demais grupos.

4.8 Proliferação de linfócitos

A determinação da proliferação de linfócitos de três órgãos linfóides, timo, linfonodo mesentérico e baço, está apresentada nas Tabelas 7, 8 e 9, respectivamente.

A proliferação de linfócitos obtidos do timo na ausência e presença do mitógeno concanavalina A dos animais sem e com tumor, submetidos às diferentes suplementações, está apresentada na Tabela 7. Na ausência de estímulo, em animais não portadores de tumor, a proliferação basal dos linfócitos do timo não foi alterada

pela suplementação com óleo de fígado de tubarão (p>0,05). Já a suplementação com óleo de peixe induziu a uma proliferação significativamente menor (p<0,05 *vs.* C e FT). Interessantemente, a associação de óleo de peixe com óleo de fígado de tubarão (FT+OP) provocou redução ainda maior (p<0,05). A suplementação com gordura de coco (GC) também provocou redução da proliferação basal, similar a observada no grupo OP (p<0,05 vs. C e FT), e a associação com óleo de fígado de tubarão reverteu esta inibição (p>0,05 *vs.* C e FT). Na presença do mitógeno, houve aumento significativo da proliferação em todos os grupos, sendo de 8 vezes no controle (C). A suplementação com óleo de fígado de tubarão (FT) e óleo de peixe (OP) elevou a proliferação em aproximadamente 11 vezes. A associação de ambas as suplementações (FT+OP) teve efeito potencializador em que provocou elevação de 21 vezes. A suplementação com gordura de coco elevou a proliferação em 11 vezes e sua associação com óleo de fígado de tubarão (FT+GC) manteve a proliferação em 11 vezes. Todos estes incrementos foram significantemente maiores quando comparados aos seus respectivos pares na ausência de estímulo (p<0,05). Na presença de tumor e ausência de estímulo, a suplementação com óleo de fígado de tubarão (WFT), ao contrário do observado nos animais sem tumor, reduziu a proliferação basal (p<0,05 *vs.* W). A suplementação com óleo de peixe (WOP) induziu a uma redução ainda maior, sendo estatisticamente diferente da encontrada nos animais com tumor alimentados com ração padrão (W, p<0,05), e com óleo de fígado de tubarão (WFT, p<0,05). A associação de ambas as suplementações não induziu a efeito diferente ao já observado pelas duas suplementações isoladas (p<0,05 *vs.* W). A gordura de coco também foi hábil em induzir a redução da proliferação basal linfocitária (p<0,05 vs. W e WFT), mas a associação com óleo de fígado de tubarão elevou a proliferação, contudo esta não atingiu os valores promovidos pelo óleo de fígado de tubarão isoladamente (p<0,05 *vs.* WFT). Na presença do mitógeno, os linfócitos dos animais portadores de tumor do grupo alimentado com dieta padrão (W) tiveram elevação da proliferação em 2,1 vezes (p<0,05 vs. pareado sem mitógeno). A suplementação com óleo de fígado de tubarão provocou elevação de 8,3 vezes, o óleo de peixe em 3 vezes, e a associação de ambas, elevação em 11 vezes (p<0,05 vs. pareado sem mitógeno). A gordura de coco promoveu aumento da proliferação em 15 vezes e sua associação com óleo de fígado de tubarão em 9 vezes (p<0,05 vs. pareado sem mitógeno). Todos os grupos apresentaram redução na proliferação quando comparados a seus pares sem tumor com mitógeno (p<0,05).

Tabela 7: Proliferação de linfócitos do timo, em contagem por minuto (cpm), obtidos de animais sem e com tumor, na ausência e presença de concanavalina A, alimentados com dieta padrão (C e W), suplementados com óleo de fígado de tubarão (FT e WFT), óleo de peixe (OP e WOP), óleo de fígado de tubarão + óleo de peixe (FT+OP e WFT+OP), gordura de coco (GC e WGC) e óleo de fígado de tubarão + gordura de coco (FT+GC e WFT+GC).

	Não portadores de tumor			**Portadores de tumor**	
Grupos	**Sem mitógeno**	**Com mitógeno**	**Grupos**	**Sem mitógeno**	**Com mitógeno**
C	301,8±18,3	2434±148,6 [a]	**W**	332,5±25,6	705,9±84,4 [ae]
FT	318,8±20,3	3348±375,7 [a]	**WFT**	244,3±13,3 [c]	2025±102,5 [aef]
OP	221,8±3,9 [b]	2587±373,7 [a]	**WOP**	116,5±5,9 [cd]	335,9±47,7 [aef]
FT+OP	159,3±14 [b]	3289±369,6[a]	**WFT+OP**	185,9±17,5 [cd]	2079±89,5 [aef]
GC	210,0±12,3 [b]	2273±85,5 [a]	**WGC**	127,5±14 [cd]	1898±90 [aef]
FT+GC	286,3±38,2	3088±165 [a]	**WFT+GC**	144,9±11,4 [cd]	1354±103,5[aef]

[a] p<0,05 *vs.* pareado sem mitogeno; [b] p<0,05 *vs.* C e FT sem mitógeno; [c] p<0,05 *vs.* W sem mitógeno; [d] p<0,05 *vs.*WFT sem mitógeno; [e] p<0,05 *vs.* sem tumor com mitógeno; [f] p<0,05 vs. W com mitógeno.

A proliferação de linfócitos do linfonodo mesentérico, na ausência e presença do mitógeno concanavalina A, obtidos dos animais sem e com tumor, submetidos às diferentes suplementações, está apresentada na Tabela 8. Na ausência de estímulo, em animais sem tumor, apenas a suplementação com gordura de coco (GC) induziu à redução da proliferação basal (p<0,05 *vs.* todos os grupos). A associação com óleo de fígado de tubarão (FT+GC) aboliu este efeito (p>0,05). A estimulação com mitógeno elevou a proliferação dos linfócitos do linfonodo mesentérico em 1,6 vezes nos animais alimentados com dieta padrão (C). A suplementação com óleo de fígado de tubarão (FT) elevou a proliferação em 6,3 vezes, e não houve efeito da suplementação com óleo de peixe (OP), ficando similar à ausência de mitógeno. A associação de óleo de fígado de tubarão e óleo de peixe (FT+OP) promoveu aumento da proliferação similar à observada para o grupo FT. A suplementação com gordura de coco (GC) elevou a proliferação em duas vezes, e a associação com óleo de fígado de tubarão (FT+GC), em 4 vezes. Todas estas elevações foram significativamente diferentes quando comparadas aos seus pares sem estímulo (p<0,01). Na presença de tumor, no grupo suplementado com dieta padrão (W), a proliferação basal foi 2 vezes menor quando

comparada à dos animais sem tumor ($p<0,05$ *vs.* C). A suplementação com óleo de fígado de tubarão (WFT) elevou a proliferação basal em 1,3 vezes ($p<0,05$ *vs.* W). Contudo foi 1,6 vezes menor ($p<0,05$) quando comparada à do animal sem tumor submetido à mesma dieta (FT). A suplementação com óleo de peixe (WOP) reduziu a proliferação basal em 1,4 vezes ($p<0,05$ *vs.* W) e em 1,8 vezes quando comparada à suplementação com óleo de fígado de tubarão. Quando comparada à proliferação basal do seu contraposto sem tumor (OP), a proliferação basal foi 3 vezes menor ($p<0,05$). A associação de óleo de fígado de tubarão e óleo de peixe (WFT+OP) elevou a proliferação em relação ao óleo de peixe suplementado isoladamente, mas não foi diferente da dos grupos W e WFT ($p>0,05$). Tanto a suplementação com gordura de coco (WGC) quanto sua associação com óleo de fígado de tubarão (WFT+GC) não modificaram a proliferação basal, sendo similar à do grupo W ($p>0,05$). O estímulo com concanavalina A elevou a proliferação dos linfócitos mesentéricos obtidos dos animais alimentados com ração padrão (W) em 3,6 vezes. A suplementação com óleo de fígado de tubarão (WFT) em 6 vezes, e com óleo de peixe (WOP) em 4 vezes. A associação de ambas as suplementações elevou a proliferação em 8 vezes. A suplementação com gordura de coco (WGC) foi a que induziu a menor taxa de proliferação (1,5 vezes), e sua associação com óleo de fígado de tubarão (WFT+GC) promoveu elevação de 2 vezes. Todas estas elevações foram significativamente diferentes quando comparadas aos seus contrapostos na ausência de estímulo ($p<0,05$).

Tabela 8: Proliferação de linfócitos do linfonodo mesentérico, em contagem por minuto (cpm), obtidos de animais sem e com tumor, na ausência e presença de concanavalina A, alimentados com dieta padrão (C e W), suplementados com óleo de fígado de tubarão (FT e WFT), óleo de peixe (OP e WOP), óleo de fígado de tubarão + óleo de peixe (FT+OP e WFT+OP), gordura de coco (GC e WGC) e óleo de fígado de tubarão + gordura de coco (FT+GC e WFT+GC).

	Não portadores de tumor			**Portadores de tumor (W)**	
Grupos	**Sem mitógeno**	**Com mitógeno**	**Grupos**	**Sem mitógeno**	**Com mitógeno**
C	469,2±109,9	756,3±57,6 [a]	**W**	234,5±31,1 [b]	838,3±120,5 [a]
FT	507±29,1	3225±419,3 [a]	**WFT**	304,8±3,8 [bc]	1838±136,2 [ade]
OP	503,3±36,3	582,3±26,9	**WOP**	168,3±11,9 [bc]	660,6±241,7 [a]
FT+OP	446±19,1	3651±216,7 [a]	**WFT+OP**	258,9±27,3 [b]	2074±229,0 [ade]
GC	282±31,5 [*]	562,9±40,1 [a]	**WGC**	208,3±5,7 [b]	321,4±24,8 [ade]
FT+GC	403±106	1595±74,7 [a]	**WFT+GC**	248,8±8 [b]	512±37,4 [ade]

[a] p<0,01 *vs.* pareado sem mitógeno. * p<0,05 *vs.* todos grupos sem tumor; [b] p<0,05 *vs.* pareado sem mitógeno sem tumor; [c] p<0,05 *vs.*W; [d] p<0,05 *vs.* sem tumor com mitógeno; [e] p<0,05 vs. W com mitógeno

A proliferação de linfócitos do baço, na ausência e presença do mitógeno concanavalina A, obtidos dos animais sem e com tumor, submetidos às diferentes suplementações está apresentada na Tabela 9. A proliferação basal dos linfócitos do baço dos animais sem tumor suplementados com óleo de fígado de tubarão (FT) foi 1,8 vezes maior quando comparada à dos linfócitos dos animais alimentados com dieta padrão (p<0,05 vs. C). A suplementação com óleo de peixe (OP) por sua vez não alterou a taxa de proliferação basal (p>0,05 *vs.* C), mas foi menor em relação à do FT, e na associação de ambas as suplementações prevaleceu o efeito da suplementação com óleo de peixe (p>0,05 *vs.* C). A suplementação com gordura de coco elevou significativamente a proliferação basal em 1,6 vezes quando comparada à do controle (p<0,05), mas não foi diferente quando comparada às outras duas suplementações isoladamente (p>0,05 *vs.* FT e OP). A associação com a suplementação com óleo de fígado de tubarão (FT+GC) manteve a proliferação semelhante à do grupo GC e FT (p>0,05). A adição de concanavalina A ao meio de incubação elevou significativamente a proliferação em todos os grupos (p<0,05 vs. pareado sem mitógeno), sendo de 18,6 vezes no controle, 7 vezes no FT, 11,5 vezes no OP, 16,4 vezes no FT+OP, 9,1 vezes no GC e de 8 vezes no FT+GC. A presença de tumor fez com que a proliferação basal dos linfócitos obtidos dos animais alimentados com ração padrão (W) reduzisse em 1,5

vezes ($p<0,05$ *vs.* C sem mitógeno). A suplementação com óleo de fígado de tubarão (WFT) elevou a proliferação em 1,5 vezes ($p<0,05$ vs. W), mas esta foi 1,8 vezes menor quando comparada à de seu contraposto sem tumor ($p<0,05$ vs. sem tumor sem mitógeno). A suplementação com óleo de peixe, por sua vez, elevou a proliferação basal em 6 vezes ($p<0,01$) quando comparada à dos animais alimentados com ração padrão (W), e em 4 vezes ($p<0,05$) em relação à dos suplementados com óleo de fígado de tubarão (WFT), sendo ainda 3,2 vezes maior que à de seu contraposto sem tumor ($p<0,05$). A associação de ambas as suplementações (WFT+OP) promoveu um efeito proliferativo entre o que ocorreu com WFT e WOP, ou seja, elevação de 2,1 vezes quando comparada à do W ($p<0,05$) e 1,6 vezes maior quando comparado à do grupo sem tumor ($p<0,05$ vs. FT+OP). A suplementação com gordura de coco (WGC) elevou a proliferação em 1,5 vezes quando comparada à do W ($p<0,05$) e foi 1,5 vezes menor quando comparada à do grupo sem tumor (GC). A associação com a suplementação com óleo de fígado de tubarão não alterou este cenário, ficando igual ao de gordura de coco isolada. Com estímulo de mitógeno, houve aumento da capacidade proliferativa dos linfócitos de todos os grupos (~ 8 vezes) em relação à dos linfócitos sem estímulo ($p<0,05$), exceto no grupo WOP onde a proliferação sob estímulo foi maior em apenas 1,2 vezes. Quando comparados aos seus contrapostos sem tumor, todos os grupos apresentaram redução da proliferação ($p<0,05$).

Tabela 9: Proliferação de linfócitos do baço, em contagem por minuto (cpm), obtidos de animais sem e com tumor, na ausência e presença de concanavalina A, alimentados com dieta padrão (C e W), suplementados com óleo de fígado de tubarão (FT e WFT), óleo de peixe (OP e WOP), óleo de fígado de tubarão + óleo de peixe (FT+OP e WFT+OP), gordura de coco (GC e WGC) e óleo de fígado de tubarão + gordura de coco (FT+GC e WFT+GC).

	Não portadores de tumor			**Portadores de tumor**	
Grupos	**Sem mitógeno**	**Com mitógeno**	**Grupos**	**Sem mitógeno**	**Com mitógeno**
C	170,2±22,5	3167±178,8 [a]	**W**	112,8±7,8 [*]	751,1±63,5[ab]
FT	303,1±33,1[#]	2164±273,5 [ac]	**WFT**	165,2±19,2 [*e]	1014±35,8 [abd]
OP	206,4±13,5	2374±113,5 [ac]	**WOP**	672,3±18,4[*ef]	781,2±46,6 [ab]
FT+OP	146,9±9,9	2372±228,9 [ac]	**WFT+OP**	240,6±18,4[*e]	1205±178,9[abd]
GC	267,1±40,8[#]	2452±192,8 [ac]	**WGC**	169,5±21,8[*e]	1611±134,1 [abd]
FT+GC	287,6±17,1[#]	2289±105,8 [ac]	**WFT+GC**	160,7±17,2[*e]	1893±90,1 [abd]

[a] p<0,05 *vs.* pareado sem mitógeno; [#] p<0,05 *vs.* C sem mitógeno; * p<0,05 *vs.* sem tumor sem mitógeno; [b] p<0,05 *vs.* pareado sem tumor; [c] p<0,05 *vs.* C com mitógeno; [d] p<0,05 *vs.* W e WOP; [e] p<0,05 *vs.* W sem mitógeno; [f]p<0,05 *vs.* WFT.

4.9 Quantificação de linfócitos $CD4^+$ e $CD8^+$ no infiltrado tumoral

A quantificação de linfócitos $CD4^+$ e $CD8^+$ infiltrados no tecido tumoral está apresentada nas Figuras 23 e 24. Os resultados obtidos por imunohistoquímica revelam que as diferentes suplementações administradas (grupos WFT, WOP, WFT+OP, WGC e WFT+GC) não alteraram significativamente o número de marcadores $CD4^+$ no infiltrado tumoral em comparação com a ausência de suplementação (p>0,05 *vs.* W).

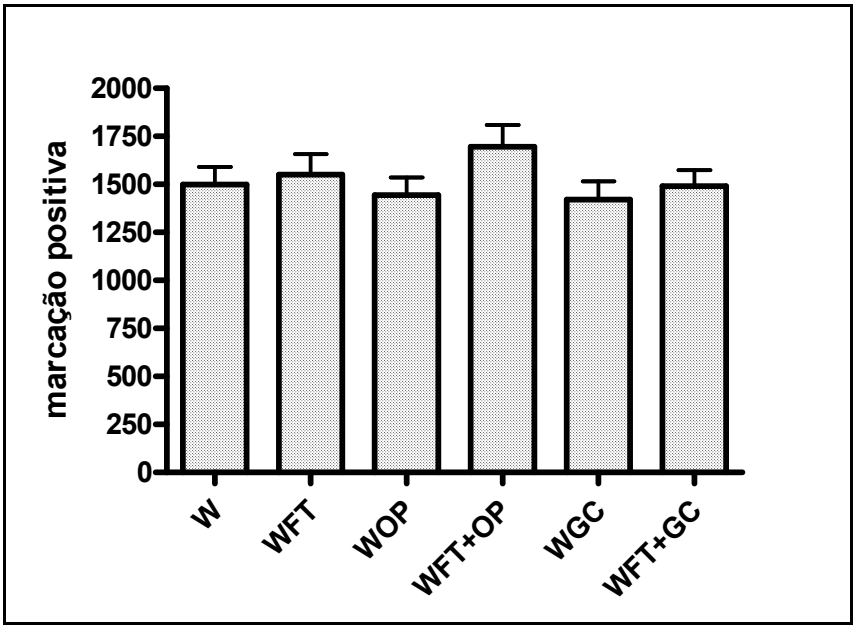

Figura 24: Marcação positiva para **CD4$^+$** no infiltrado tumoral, obtida de animais com tumor, alimentados com dieta padrão (C e W), suplementados com óleo de fígado de tubarão (FT e WFT), óleo de peixe (OP e WOP), óleo de fígado de tubarão + óleo de peixe (FT+OP e WFT+OP), gordura de coco (GC e WGC) e óleo de fígado de tubarão + gordura de coco (FT+GC e WFT+GC). Os resultados representam a média ± erro padrão da média de 3 animais por grupo.

Ja a população de linfócitos CD8$^+$ foi modificada pela suplementação com óleo de fígado de tubarão (WFT) havendo aumento de 1,5 vezes em relação ao grupo não-suplementado ($p<0,05$ *vs.* W). A suplementação com óleo de peixe, por sua vez, não alterou significativamente a população de linfócitos CD8$^+$, nem sua associação com óleo de fígado de tubarão ($p>0,05$ vs. W). A suplementação com gordura de coco (WGC) provocou redução de 3,5 vezes ($p<0,05$) na quantidade de linfócitos CD8$^+$ no infiltrado tumoral em comparação com o grupo alimentado com ração padrão (W), bem como com as duas suplementações isoladas e suas associações ($p<0,05$ *vs.* WFT, WOP e WFT+OP). A associação da suplementação de gordura de coco com óleo de fígado de tubarão (WFT+GC) reverteu a supressão da quantidade de linfócitos CD8$^+$ observada no grupo WGC ($p<0,05$ *vs.* WGC).

A relação entre linfócitos CD4$^+$/CD8$^+$ (Tabela 10) foi significativamente reduzida nos grupos suplementados com óleo de fígado de tubarão, WFT, WFT+OP e WFT+GC, em relação ao grupo W ($p<0,05$). A suplementação isolada com gordura de coco

provocou aumento significativo nesta relação quando comparada com os demais grupos (p<0,001).

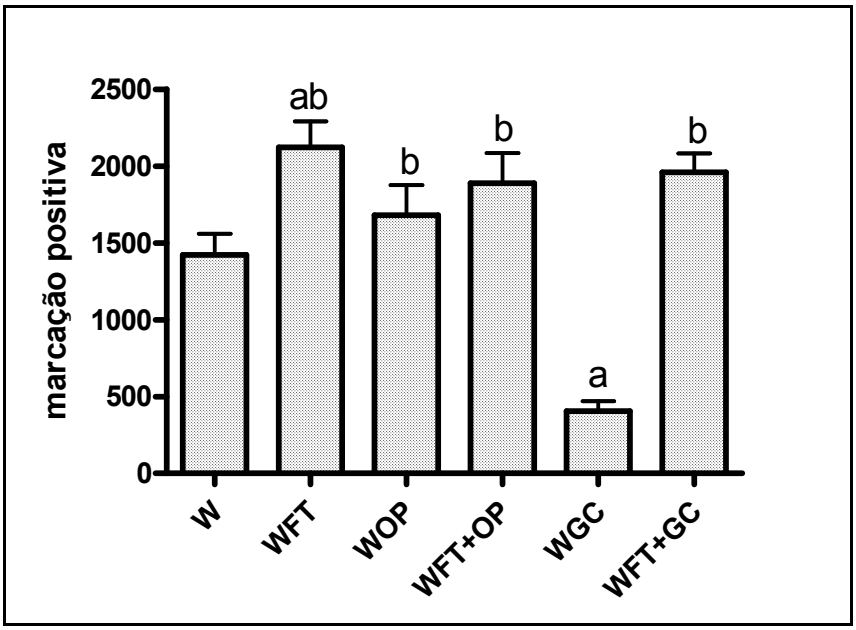

Figura 25: Marcação positiva para linfócitos $CD8^+$ (unidades arbitrárias) no infiltrado tumoral, obtida de animais com tumor, alimentados com dieta padrão (C e W), suplementados com óleo de fígado de tubarão (FT e WFT), óleo de peixe (OP e WOP), óleo de fígado de tubarão + óleo de peixe (FT+OP e WFT+OP), gordura de coco (GC e WGC) e óleo de fígado de tubarão + gordura de coco (FT+GC e WFT+GC). Os resultados representam a média ± erro padrão da média de 3 animais por grupo. [a] p<0,05 *vs.* W, [b] p<0,05 *vs.* WGC.

Tabela 10: Relação CD4+/CD8+ de linfócitos infiltrados no tumor dos animais portadores de tumor alimentados com dieta padrão (W), suplementados com óleo de fígado de tubarão (WFT), óleo de peixe (OP), óleo de fígado de tubarão + óleo de peixe (WFT+OP), gordura de coco (WGC) e óleo de fígado de tubarão + gordura de coco (WFT+GC).

	W	**WFT**	**WOP**	**WFT+OP**	**WGC**	**WFT+GC**
Relação CD4+/CD8+	1,10±0,07	0,78±0,06 [ab]	0,92±0,09[b]	0,83±0,06 [ab]	2,7±0,22 [a]	0,78±0,04 [ab]

[a] p<0,05 vs. W; [b] p<0,001 vs. WGC.

5 DISCUSSÃO

O papel da dieta no desencadeamento e desenvolvimento do câncer tem sido há muito correlacionado. Em adição, tem sido reportado que ao redor de 30 a 40% de todos os tipos de câncer podem ser prevenidos por dietas apropriadas, atividade física e manutenção de peso corporal adequado. Diferente de outros nutrientes como as proteínas, a quantidade e o tipo de gordura na dieta humana variam tremendamente dependendo da região e da cultura, e ao longo do tempo esta tem mudado significativamente nos países ocidentais. Nestes países tem havido predomínio de gordura saturada na dieta, com desbalanço entre o consumo de ácidos graxos ω-6 e ω-3 (DONALDSON, 2004).

A suplementação crônica com diferentes tipos de gordura realizada neste trabalho teve como objetivo mimetizar a situação de consumo continuado destes lipídeos por um indivíduo, da infância até a vida adulta, e verificar o impacto desta suplementação sobre o crescimento de tumor surgido na maturidade e suas conseqüências, bem como sobre a atividade linfocitária nesta situação. Para isso, foi utilizado modelo animal com tumor de Walker 256, cujas células quando inoculadas subcutaneamente formam massa tumoral sólida de crescimento rápido com geração de caquexia em duas semanas.

Foi observado que o crescimento tumoral nos animais suplementados com óleo de fígado de tubarão (WFT), óleo de peixe (WOP), e óleo de fígado de tubarão + óleo de peixe (WFT+OP) foi reduzido significativamente quando comparado ao dos não suplementados (W), e que a gordura saturada quando administrada isoladamente (WGC) e mesmo em conjunto com óleo de fígado de tubarão (WFT+GC) manteve o crescimento tumoral semelhante ao observado para o grupo W (Figura 8). A redução de aproximadamente 60% no peso dos tumores de animais suplementados com óleo de peixe (WOP), assim como o efeito da gordura saturada de promover o crescimento tumoral têm sido verificados em outros trabalhos que utilizaram este mesmo modelo experimental (TOGNI et al, 2003; PIZATO et al, 2005; MUND et al, 2007). A suplementação crônica com óleo de fígado de tubarão e seu efeito sobre o crescimento de tumor de Walker, no entanto, foram avaliados aqui pela primeira vez, e este óleo administrado cronicamente na dose de 1g/kg de peso corpóreo mostrou ser hábil em reduzir o tamanho dos tumores. Apesar de menos pronunciada que a redução provocada pelo óleo de peixe (WOP), a redução do peso dos tumores promovida pelo

óleo de fígado de tubarão (WFT) foi de aproximadamente 30% em relação à dos tumores de animais não suplementados (W). Quando óleo de fígado de tubarão foi associado ao óleo de peixe (WFT+OP), não houve efeito aditivo sobre a redução do crescimento tumoral, e os tumores cresceram de forma semelhante àqueles encontrados no grupo WOP, indicando que a presença de óleo de peixe na dieta, isoladamente ou em associação com outro suplemento, é bastante efetiva na redução do tamanho dos tumores, e parece se sobrepor ao efeito produzido pelo óleo de fígado de tubarão. Quando óleo de fígado de tubarão foi associado à gordura de coco (WFT+GC), o efeito da gordura saturada prevaleceu sobre o efeito do óleo de fígado de tubarão, e o crescimento tumoral permaneceu semelhante ao encontrado para o grupo controle (W). Os mecanismos pelos quais óleo de peixe e óleo de fígado de tubarão reduzem a massa tumoral não são totalmente sabidos. Possivelmente, os principais constituintes do óleo de peixe, EPA e DHA, e do óleo de fígado de tubarão, alquilgliceróis, que são estruturas predominantemente hidrofóbicas com capacidade de se inserirem nas membranas celulares, são assim disponibilizadas para as células como substrato para a formação de inúmeras moléculas bioativas (MA et al, 2004; KOBAYASHI et al, 2006; RAKOTOMANGA et al, 2004; HECZKOVÁ & SLOTTE, 2006).

Vários mecanismos têm sido aventados para o efeito do óleo de peixe em reduzir o crescimento tumoral, entre eles, ser capaz de diminuir a capacidade proliferativa das células tumorais (KOBAYASHI et al, 2006; HERING et al, 2007), elevar a taxa de peroxidação lipídica nestas células (HARDMAN et al, 2002; MUND et al, 2007), diminuir a produção de eicosanóides dentro do tumor (TAPIERO et al, 2002; McENTEE & WHELAN, 2002) e alterar a sinalização intracelular nas células tumorais (LIM et al, 2008). Além disso, EPA e DHA, em estudos *in vitro* e *in vivo,* foram capazes de se inserir em microdomínios de membrana (*lipid rafts* e cavéolas) e alterar a transdução de sinal de diferentes células por provocar o desordenamento dos microdomínios com suas caudas longas e flexíveis, e perturbar o arranjo de proteínas de membrana nestas regiões. A incorporação de ácidos graxos ω-3 em microdomínios de membrana induz deslocamento de proteínas aciladas encontradas normalmente na monocamada citosólica da membrana plasmática e/ou inibem a palmitoilação e subseqüente localização de proteínas nos microdomínios (MA et al, 2004). Mudanças na fluidez da membrana interferem no modo como fatores de crescimento, citocinas e hormônios interagem com seus receptores e nos resultantes sinais de transdução através de segundos mensageiros (BERQUIN et al, 2008). Portanto, uma vez que EPA

e DHA sejam fornecidos ao indivíduo em dose suficiente para sua incorporação na membrana de células tumorais, haverá interferência destes ácidos graxos no comportamento celular e, conseqüentemente, no seu crescimento.

Os alquilgliceróis, por sua vez, inseridos nas membranas celulares na forma de fosfolipídeos éteres, servem como substrato para a formação de segundos mensageiros com ligação éter na estrutura química, os quais são capazes de interferir na atividade de enzimas envolvidas no controle da proliferação e diferenciação celular, como a proteína quinase C (PKC) (HEYMANS et al, 1987; PUGLIESE et al, 1998; MARIGNY et al, 2002; CONESA-ZAMORA et al, 2005). De acordo com estes autores, segundos mensageiros derivados de fosfolipídeos éteres são capazes de inibir a atividade de algumas isoenzimas da PKC.

A influência de alquilgliceróis sobre a atividade da proteína quinase C foi investigada por HEYMANS *et al* (1987) e ROBINSON *et al* (1995). Segundo HEYMANS *et al*, moléculas análogas ao diacilglicerol, possuindo ligação éter na posição 1 do glicerol, apresentam perda da capacidade de ativar proteína quinase C, enquanto que moléculas análogas ao diacilglicerol, com ligação éter na posição 2 do glicerol e ligação éster na posição 1, permitem a ativação da proteína quinase C, no entanto de forma menos eficiente que a ativação mediada por diacilglicerol. ROBINSON *et al* examinaram os efeitos de alquilgliceróis sintéticos sobre a liberação de ácido araquidônico e seus metabólitos em células renais obtidas de cães em resposta a estímulo do éster de forbol, 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato, a fim de caracterizar seus efeitos sobre esta via de sinalização celular. De acordo com os autores, o tratamento das células com alquilgliceróis com ligação éter nas posições 1 e 3 do glicerol provocou potente inibição da liberação de ácido araquidônico, e segundo eles, estes resultados seriam devido à capacidade dos alquilgliceróis testados inibirem a atividade da proteína quinase C. Estes estudos mostraram o envolvimento dos alquilgliceróis em vias de sinalização intracelular, e considerando que eles ocorram naturalmente nas células, os resultados sugerem uma potencial função bioregulatória destes compostos.

O efeito *in vitro* de alquilgliceróis sobre a permeabilidade de células endoteliais de aorta suína à albumina corada foi avaliado por MARIGNY et al (2002). Este estudo demonstrou que a incorporação de [^{3}H]-1-O-alquilgliceróis na membrana das células endoteliais altera a permeabilidade destas células, e sugere que este efeito poderia ser mediado por alteração da sinalização intracelular envolvendo segundos mensageiros

lipídicos. Neste estudo, após incubação das células com [^{3}H]-1-O-alquilgliceróis, foi detectada produção do análogo da molécula de diacilglicerol, [^{3}H]-1-O-alquil-2-acil-glicerol, que segundo o estudo mostrou ser um inibidor da proteína quinase C.

O éter lipídico sintético denominado edelfosine (ET-18-OCH_3, 1-O-octadecil-2-O-metil-glicero-3-fosfocolina) apresenta efeito anti-tumoral como tem sido demonstrado em estudos com células de murinos e de humanos. No entanto, a relação da proteína quinase C com estes efeitos não é clara. Segundo CONESA-ZAMORA et al (2005), este éter lipídico apresenta capacidade de ativar ou inibir a proteína quinase C α (PKCα) e a proteína quinase C ε (PKCε), dependendo da concentração em que é disponibilizado às células. Neste estudo, ET-18-OCH_3 foi capaz de ativar a PKCε em baixas concentrações e inibir PKCα nas mesmas concentrações. Também foi observado que alteração no tipo de ligação na posição 1 do glicerol (éter ou éster) não produziu significativas modificações sobre a atividade da PKCα, mas produziu sobre a atividade de PKCε.

Os trabalhos envolvendo éteres lipídicos e atividade de proteína quinase C sugerem que, no mínimo, algumas das propriedades bioativas dos alquilgliceróis e/ou lipídeos complexos que possuem ligação éter são devidas aos seus efeitos sobre este importante sistema enzimático. As isoenzimas da PKC têm importantes funções na regulação do ciclo celular, sobrevivência celular e apoptose. No entanto, como estas isoenzimas regulam estes diversos processos celulares permanece apenas parcialmente entendido. Estas isoenzimas foram relacionadas com o surgimento e progressão de tumores desde que foi identificada sua alta afinidade por ésteres de forbol indutores de tumor. Apesar de anos de intensiva investigação sobre a relação das isoenzimas de PKC e o câncer, o entendimento do alto nível de complexidade desta família de enzimas ainda é um desafio, enquanto que, paradoxalmente, há apenas limitado conhecimento sobre os substratos de cada isoenzima específica e sua relação com a carcinogênese (GRINER & KAZANIETZ, 2007). Além do envolvimento de alquilgliceróis com a regulação de PKC descrito em alguns modelos experimentais, recentes estudos com células em cultura sugerem que fosfolipídeos éteres, da mesma forma que ácidos graxos ω-3, podem ser acumulados em *lipid rafts* e agir sobre a sinalização celular por afetar a composição de proteínas destes microdomínios (HECZKOVÁ & SLOTTE, 2006).

Os principais estudos *in vivo* com alquilgliceróis obtidos de óleo de fígado de tubarão foram realizados por BROHULT et al, que demonstraram a capacidade deste

óleo em reduzir o crescimento de tumores. A administração profilática de 0,6g/dia de alquilgliceróis (preparação obtida do óleo de fígado de tubarão produzida por AB Astra®, contendo 85% de alquilgliceróis) durante uma semana antes da radioterapia a pacientes portadoras de câncer de colo de útero, durante o tratamento radioterápico e ainda durante 1-3 meses após a radioterapia, promoveu redução significativa do crescimento tumoral, em comparação com pacientes não suplementadas. Foi observada também redução da injúria tecidual em intestino, reto, ureter e bexiga normalmente provocada pela radiação externa e intracavitária (BROHULT et al, 1978). Este mesmo protocolo de suplementação promoveu redução no número de metástases e na mortalidade de pacientes (BROHULT et al, 1986).

O óleo de fígado de tubarão apresenta maior concentração de alquilgliceróis que à de ácidos graxos poliinsaturados ω-3 (LEWKOWICZ et al, 2006; SZOSTAK & SZOSTAK-WEGIEREK, 2006). O efeito sobre crescimento tumoral do óleo de fígado de tubarão e de alquilgliceróis isolados deste óleo foram avaliados por PÉDRONO et al (2004c). Neste estudo foi verificado que os alquilgliceróis isolados do óleo apresentaram a mesma capacidade de redução do crescimento de carcinoma de pulmão de Lewis em camundongos que o próprio óleo suplementado por via oral. Este resultado sugere que a atividade antitumoral do óleo de fígado de tubarão é provavelmente mediada pela presença de alquilgliceróis.

O óleo de fígado de tubarão apresenta efeito anti-angiogênico, segundo estudos recentes, o que pode contribuir com a redução do crescimento tumoral. A angiogênese é essencial para o crescimento tumoral, invasão e formação de metástases, e corresponde à formação de novos vasos sangüíneos a partir de leito vascular existente. As próprias células tumorais secretam fatores que estimulam a angiogênese, tais como *Tumor Angiogenesis Factor* (TAF), e *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF). Para iniciar a neovascularização, um tumor precisa adquirir fenótipo denominado angiogênico. Este fenótipo pode ser resultado de alteração genética ou ainda resposta a estresse local incluindo hipóxia. Oncogenes e genes supressores de tumor que estão associados com a transformação celular, também participam do surgimento do fenótipo angiogênico. Evidências surgidas de modelos transgênicos sugerem que a aquisição deste fenótipo ocorre nas primeiras fases do desenvolvimento tumoral, e que é um passo limitante para a progressão do tumor. Sabe-se que novos vasos surgidos como resultado destas mudanças fenotípicas são anormais, com extremidades cegas, gerando fluxo reverso e intermitente, com pobre entrega de oxigênio para as células

tumorais, e induzindo a predominância de metabolismo anaeróbico nestas células (FOX et al, 2001).

O efeito do óleo de fígado de tubarão sobre a angiogênese cutânea induzida por inoculação intradérmica de células tumorais foi avaliado por SKOPINSKA-ROZEWSKA et al, em 1999. Os pesquisadores mostraram que o óleo de fígado de tubarão (Ecomer®) suprimiu a resposta neovascular em ratos inoculados com células tumorais humanas de rim e bexiga, além de estimular fortemente o número de granulócitos e sua atividade metabólica. PÉDRONO et al (2007) demonstraram que alquilgliceróis do óleo de fígado de tubarão radiomarcados com trício na posição 3 do glicerol, quando incubados com células endoteliais de aorta de bezerro (*Calf Aortic Thoracic Endothelial Cells*) suprimiram a proliferação endotelial provocada pelo fator de crescimento fibroblástico (*basic Fibroblast Growth Factor* – bFGF) de forma dose e tempo-dependente. Esta supressão poderia ser explicada pela interferência dos éteres lipídicos incorporados na membrana endotelial sobre a sinalização mediada pela enzima fosfolipase D. Sob estímulo de bFGF, houve aumento na produção de 1-O-alquil-2-O-acil-glicerofosfato (molécula análoga ao ácido fosfatídico gerado pela ação da enzima fosfolipase D), e redução considerável de alquil-acil-glicerol (análogo ao diacilglicerol gerada pela fosfolipase C), sugerindo que a ativação da enzima fosfolipase D por bFGF, e não da fosfolipase C, afeta o metabolismo de fosfolipídeos éteres.

Esqualamina, um aminoesterol presente no óleo de fígado de tubarão, tem demonstrado atividade antiangiogênica em vários modelos experimentais. TEICHER et al (1998) demonstraram que esqualamina administrada a ratos Wistar portadores de tumor mamário, na dose diária de 40mg/kg peso corpóreo, potencializou o efeito de drogas quimioterápicas, contribuindo para a redução do crescimento tumoral. Estudos *in vitro* utilizando células endoteliais de veia umbilical humana e esqualamina mostraram a capacidade deste composto de desorganizar a formação de fibras de estresse de actina, e reduzir a concentração de moléculas de caderina na membrana plasmática endotelial, dois eventos importantes para a angiogênese (WILLIAMS et al, 2001). Trabalhos sobre as interações da esqualamina com células endoteliais indicam que esta molécula se liga à proteína de membrana trocadora de íons Na^+/H^+, alterando subseqüentemente os processos de polimerização da actina, adesão célula-célula e migração das células endoteliais por bloquear a ativação de MAP quinases nestas células (PIETRAS & WEINBERG, 2005). Em virtude das evidências de sinergia entre

esqualamina e agentes quimioterápicos em modelo animal, estudos clínicos envolvendo pacientes com câncer avançado e diferentes doses de esqualamina, têm sido realizados a fim de se determinar a dose máxima tolerada e caracterizar possíveis efeitos colaterais da sua utilização. Esqualamina foi bem tolerada, podendo ser administrada em doses tão elevadas quanto às necessárias para se atingir concentrações plasmáticas eficazes, conforme descrito em trabalhos com animais (BHARGAVA et al, 2001; HAO, et al, 2003). LEWKOWICZ et al (2006) enfatizam que, além da esqualamina, esqualeno e os próprios alquilgliceróis apresentam atividade antiangiogênica, limitando assim o crescimento tumoral. PÉDRONO et al (2004c) demonstraram que o efeito antiangiogênico produzido pela suplementação com óleo de fígado de tubarão também é verificado pela suplementação de alquilgliceróis isolados do óleo. Embora as concentrações de esqualamina e esqualeno presentes no óleo de fígado de tubarão utilizado neste estudo não tenham sido avaliadas, não se pode descartar a participação destes compostos na redução do crescimento tumoral observada nos animais suplementados com este óleo (grupo WFT).

Juntamente com o crescimento tumoral se desenvolve a caquexia, síndrome que envolve o metabolismo de vários órgãos e é caracterizada pela perda de peso corporal, especialmente de tecido muscular e adiposo (ARGILÉS et al, 2008). Em adição a estas alterações metabólicas, a caquexia freqüentemente está associada à anorexia, que contribui significativamente para a perda de massa corpórea. No entanto, em testes clínicos o estímulo à ingestão de alimentos por orexígenos ou dieta supervisionada não foram efetivos para o ganho de peso (MARTIGNONI et al, 2003). Estes achados sugerem que evitar a perda de peso provocada pelo câncer pode ser mais significativo do que procurar formas para ganho de peso depois do tumor instalado.

O tumor de Walker permite averiguação do estabelecimento do estado caquético pelo acompanhamento de parâmetros bioquímicos como glicemia, triacilglicerolemia, lactatemia, concentração de glicogênio hepático, bem como a determinação da massa corpórea dos animais (Togni et al, 2003). Quando comparados aos animais controle (C), os animais portadores de tumor alimentados com dieta padrão (W) apresentaram redução da glicemia (25%) e da concentração de glicogênio hepático (30%), aumento da triacilglicerolemia (88%) e lactatemia (65%), e significativa perda de massa corpórea (~17g) após a instalação do tumor (Figuras 9, 10, 11 e 12; Tabela 1). Nossos achados corroboram os de Togni et al (2003).

A redução da glicemia em animais com tumor é devida à grande avidez do tumor de Walker pela glicose. Isto causa intensa mobilização das reservas de glicogênio e também intensa gliconeogênese hepática, ambas as vias com intuito de suprir o elevado consumo de glicose pelas células tumorais. Devido ao elevado consumo de glicose e ao insuficiente aporte de oxigênio capaz de manter a fosforilação oxidativa mitocondrial, as células tumorais produzem elevadas concentrações de lactato. O lactato produzido circulante é captado pelas células hepáticas que o convertem em glicose pela gliconeogênese, processo este conhecido como ciclo de Cori (TISDALE, 2005). Em relação às variações na concentração de triacilgliceróis plasmáticos, sabe-se que citocinas pró-inflamatórias produzidas no indivíduo portador de tumor reduzem a atividade da enzima lipoproteína lipase (LPL) nos vasos do tecido adiposo e hepático, resultando em hipertriacilglicerolemia (MORLEY et al, 2006). Em adição, Fernandes et al (1991) relataram que ratos portadores de tumor de Walker 256 apresentam hipoinsulinemia, que também contribui para a não ativação da LPL.

Neste trabalho, as suplementações com óleo de fígado de tubarão (WFT), óleo de peixe (WOP) e óleo de fígado de tubarão+óleo de peixe (WFT+OP) foram capazes de evitar a queda da glicemia e o aumento da triacilglicerolemia, e de manter os seus valores próximos àqueles encontrados para os respectivos grupos sem tumor (FT, OP e FT+OP). A lactatemia dos grupos WFT, WOP e WFT+OP foi reduzida (cerca de 30%) em relação ao grupo com tumor não suplementado (W), e aproximadamente 80% da concentração de glicogênio hepático nestes grupos foi mantida quando comparada à dos respectivos animais sem tumor (FT, OP e FT+OP). O grupo suplementado com gordura de coco (WGC) manteve as concentrações de glicemia, triacilglicerolemia, lactatemia e a concentração de glicogênio hepático semelhantes às do grupo não suplementado (W), indicando que a gordura saturada na dieta favorece o estado caquético. A suplementação com óleo de fígado de tubarão associada à gordura de coco para animais portadores de tumor (WFT+GC), apesar de não impedir o crescimento tumoral (Figura 1), foi capaz de promover a manutenção das reservas de glicogênio hepático e de reduzir a concentração de lactato no plasma, assim como o efeito da suplementação isolada com óleo de fígado de tubarão (WFT). No entanto, o efeito do óleo de fígado de tubarão não foi capaz de se sobrepor ao da gordura de coco na glicemia e triacilglicerolemia.

Estudos anteriores demonstraram o efeito da suplementação com óleo de peixe sobre a redução da caquexia. A suplementação com óleo de peixe na dose de 1g/kg de

peso corpóreo a ratos Wistar durante duas gerações impediu a perda de peso corpóreo e a redução da ingestão de alimento, reduziu a lactatemia e a triacilglicerolemia, elevou a glicemia, bem como elevou o tempo de sobrevivência dos animais (FOLADOR et al, 2006). A suplementação de ratas fêmeas Wistar durante a lactação, e dos filhotes até a vida adulta com óleo de peixe na dose de 1g/kg de peso corpóreo, promoveu parcial recuperação do conteúdo de glicogênio hepático, e completa reversão das concentrações de glicose, lactato e triacilgliceróis plasmáticos, em comparação com animais portadores de tumor não suplementados (PINTO Jr et al, 2004). Óleo de peixe suplementado a apenas uma geração de ratos Wistar, do desmame até a vida adulta, também na dose de 1g/kg de peso corpóreo, provocou os mesmos efeitos anti-caquéticos sobre conteúdo de glicogênio hepático, glicemia, triacilglicerolemia e lactatemia (TOGNI et al, 2003). Quando ácidos graxos ω-3 foram oferecidos na dieta juntamente com ácidos graxos ω-6, na proporção de ω-6:ω-3 de 6:1, não foi verificada redução do crescimento tumoral em relação ao grupo de animais não suplementados, contudo os ácidos graxos ω-3 promoveram redução dos efeitos metabólicos devidos à presença do tumor de forma semelhante à observada quando óleo de peixe foi suplementado na dose de 1g/kg de peso corpóreo (PIZATO et al, 2005). Em pacientes com câncer avançado, o consumo diário de 7,5g de EPA+DHA/dia para 70kg de peso corpóreo durante 1 a 2 meses, produziu estabilização ou ganho de peso, e melhora da qualidade de vida (BURNS et al, 2004). Foi relatado que EPA presente no óleo de peixe promoveu a redução da expressão tumoral de PIF (*proteolysis-inducing factor*), composto capaz de induzir proteólise muscular através da estimulação da via ubiquitina-proteossomo, e reduzir a taxa de síntese protéica nos músculos esqueléticos (WHITEHOUSE et al, 2001; ARGILÉS et al, 2005). Apesar de não ter sido realizada a dosagem de PIF neste trabalho, o efeito de EPA sobre a expressão deste fator tumoral certamente contribuiu para a manutenção do peso corporal dos animais portadores de tumor suplementados com óleo de peixe (WOP e WFT+OP).

A suplementação de animais com gordura saturada, ao contrário do consumo de ácidos graxos ω-3 presentes no óleo de peixe, promove o agravamento do estado caquético, o que já foi verificado em modelo experimental utilizando ratos Wistar e tumor de Walker 256 (TOGNI et al, 2003; MUND et al, 2007). Deste modo, a suplementação com gordura de coco a animais portadores de tumor neste trabalho (grupo WGC) foi efetuada com o objetivo de servir como controle positivo para crescimento tumoral e caquexia, e um parâmetro de comparação com as demais

suplementações. O grupo WFT+GC foi formado para avaliar a capacidade do óleo de fígado de tubarão de se contrapor aos conhecidos efeitos da gordura saturada. Como mencionado anteriormente, a suplementação com óleo de fígado de tubarão não foi capaz de sobrepor ao efeito pró-caquético da gordura de coco em todos os parâmetros de caquexia analisados.

A redução de cerca de 17g da massa corpórea nos animais portadores de tumor não suplementados (W) demonstrou o efeito do hipercatabolismo provocado pela presença do tumor. Enquanto o ciclo de Cori é normalmente responsável por 20% do *turnover* de glicose, este ciclo passa a ser responsável por 50% do *turnover* em um indivíduo caquético. A gliconeogênese necessária para converter duas moléculas de lactato em uma de glicose induz ao gasto de 6 moléculas de ATP, o que contribui para o elevado gasto energético basal de indivíduos caquéticos. Outro mecanismo que eleva o gasto energético e influencia na perda de peso envolve a elevada expressão e atividade das proteínas desacopladoras mitocondriais (*mitochondrial uncoupling proteins* – UCPs), que translocam prótons através da membrana mitocondrial interna em um processo desacoplado da produção de ATP, e como conseqüência a energia é perdida na forma de calor (TISDALE, 2005). Além disso, a redução na síntese de proteínas e o aumento de degradação protéica nas células musculares esqueléticas contribuem de forma marcante para a redução de massa corpórea. A síntese protéica nos músculos requer correto balanço de aminoácidos, e o aumento na síntese de proteínas de fase aguda no fígado altera este balanço disponibilizando menos aminoácidos para os músculos. Ao mesmo tempo, há aumentada atividade e expressão da via proteolítica ubiquitina-proteossomo nos músculos esqueléticos de indivíduos com acentuada perda de peso (MARTIGNONI et al, 2003; MORLEY et al, 2006).

A suplementação de animais portadores de tumor com óleo de fígado de tubarão (WFT), óleo de peixe (WOP) e óleo de fígado de tubarão + óleo de peixe (WFT+OP) permitiu que, na presença de tumor, os animais não sofressem perda de massa corpórea, mas sim adquirissem peso (~14,5g, 15,5g e 18,5g, respectivamente) (Tabela 1). Em contraste, animais portadores de tumor suplementados com gordura de coco (WGC) apresentaram perda de aproximadamente 22g de massa corpórea. A associação de óleo de fígado de tubarão à gordura de coco (WFT+GC) possibilitou ganho de peso de carcaça (~9g) mesmo com crescimento tumoral semelhante ao observado para os animais não suplementados (W) (Figura 1).

Estes dados que mostram melhoria nos parâmetros sangüíneos, na estocagem de glicogênio e na conservação de massa corpórea indicam que óleo de fígado de tubarão e óleo de peixe, suplementados isoladamente (grupos WFT e WOP) e em associação (grupo WFT+OP), apresentam marcado efeito anti-caquético. Este efeito pode ser atribuído, parcialmente, ao menor tamanho dos tumores encontrados nos grupos WFT, WOP e WFT+OP (~11,2g, 7,3g e 8,2g, respectivamente), o que geraria por conseqüência, menor concentração circulante de fatores produzidos pelo tumor como, por exemplo, PIF e LMF, moléculas indutoras de proteólise e lipólise, respectivamente. Mas, além disso, é sabido que EPA contribui significativamente para a redução na expressão de PIF por tumores (MARTIGNONI et al, 2003; TISDALE, 2005; ARGILÉS et al, 2005) e para o decréscimo na produção de citocinas pró-inflamatórias indutoras de caquexia (WU et al, 2004; WHITING et al, 2005; MORLEY et al, 2006). De fato, ácidos graxos ω-3 oferecidos na dieta contribuem significativamente para a manutenção da massa corpórea, como demonstrado em estudos com animais (TOGNI et al, 2003; PIZATO et al, 2005) e humanos (BARBER, 2001; BURNS et al, 2004). Por outro lado, atribuir somente à redução da massa tumoral o efeito anticaquético não é inteiramente verdadeiro. Pizato et al (2005) demonstraram que ratos suplementados com diferentes razões de ácidos graxos ω-6:ω-3 mostraram que a razão 6:1 foi ineficaz em reduzir a massa tumoral mas foi significativa para reverter os sintomas de caquexia, similar ao encontrado neste estudo. Assim, esta observação tem que ser considerada com precaução.

No caso do óleo de fígado de tubarão a redução da caquexia também parece ser devida a outros fatores além da redução do tumor em si. O grupo WFT apresentou crescimento tumoral cerca de 30% maior que o promovido nos grupos que receberam óleo de peixe (WOP e WFT+OP). No entanto, as concentrações de glicemia, triacilglicerolemia, lactatemia, glicogênio hepático e peso de carcaça foram semelhantes para estes três grupos (WFT, WOP e WFT+OP). Este fato sugere fortemente que os componentes do óleo de fígado de tubarão atuam direta ou indiretamente sobre tecido hepático, muscular e/ou adiposo. Considerando que o óleo de fígado de tubarão utilizado neste estudo apresenta 20% de alquilgliceróis em sua composição lipídica, é possível que o efeito anti caquético observado seja devido a estes lipídeos. Porém, não se pode descartar que este efeito seja devido também à presença de ácidos graxos ω-3 EPA e DHA presentes neste óleo (0,6%±0,08 de EPA e 12,6%±1,0 de DHA), mesmo que em menores concentrações que no óleo de peixe

(Tabela 3). Enquanto os ácidos graxos EPA e DHA constituem cerca de 40% do óleo de peixe, sendo aproximadamente 20,2% EPA e 18,8% DHA (Tabela 3), no óleo de fígado de tubarão foi observada concentração 78% menor de EPA e 33% menor de DHA que no óleo de peixe.

Com relação à composição lipídica do óleo de fígado de tubarão ECOMER®, no presente trabalho a concentração de ácidos graxos saturados encontrados por HPLC correspondeu a 40%, monoinsaturados 35% e poliinsaturados 21% (Tabela 3). Estes resultados estão de acordo com os obtidos por GARCIA et al (2006), que avaliaram a composição de ácidos graxos do óleo de fígado de tubarão (produzido a partir de tubarões da costa de Cuba) por cromatografia gasosa, encontrando 41% dos ácidos graxos saturados, 33% monoinsaturados e 26% poliinsaturados. Apesar de o conteúdo lipídico e o perfil de ácidos graxos de espécies marinhas variarem dependendo da estação do ano, temperatura da água, composição alimentar, estágio de desenvolvimento e gênero do animal (WETHERBEE & NICHOLS, 2000; DAVIDSON & CLIFF, 2002; SAIFY et al, 2003; JAYASINGHE et al, 2003; GARCÍA et al, 2006), estes dados indicam que a composição do óleo de fígado de tubarão ECOMER® utilizado neste estudo apresenta composição de ácidos graxos compatível com a encontrada em estudos anteriores. Vários autores encontraram pequenas quantidades de ácidos graxos ω-3 na porção lipídica do fígado de tubarões de diferentes espécies, com valores em torno de 0,4% a 5,3% de EPA e de 6,5% a 17,5% de DHA (DAVIDSON & CLIFF, 2002; SAIFY et al, 2003). Estes dados estão de acordo com o resultado obtido neste trabalho, em que a concentração de EPA encontrada no óleo de fígado de tubarão ECOMER® foi 4,5% e de DHA, 12,6%. Porém, há relato de ausência destes ácidos graxos ω-3 no óleo de fígado de tubarão (PËDRONO et al, 2004c).

A porcentagem de alquilgliceróis encontrada neste trabalho para o óleo de fígado de tubarão ECOMER® (20% dos lipídeos totais) é consistente com dados apresentados por PUGLIESE et al (1998), que afirma que usualmente cápsulas com 250 a 500 mg de óleo de fígado de tubarão contêm 20% de alquilgliceróis, o que significa que há de 50 a 100mg de alquilgliceróis disponíveis em cada cápsula. Outros autores encontraram em análise por cromatografia gasosa ou cromatografia líquido-gasosa, porcentagem semelhante de alquilgliceróis no óleo de fígado de tubarão estudado (PÉDRONO et al, 2004c; MITRE et al, 2005), embora haja registro de porcentagem menor, cerca de 10% de alquilgliceróis no óleo de fígado de tubarão avaliado por BORDIER et al (1996). Do total de alquilgliceróis presentes no óleo de

fígado de tubarão, 50 a 60% corresponde ao octadecenilglicerol, alquilglicerol com 18 carbonos e cadeia insaturada (HALLGREN & LARSSON, 1962; BROHULT et al, 1977; PUGLIESE et al, 1998; PÉDRONO et al, 2004c), dado este que está de acordo com o obtido neste trabalho (Tabela 5).

A redução do crescimento tumoral em um indivíduo pode ser resultado de vários fatores, como aumento da taxa de morte celular, aumento da peroxidação lipídica em tecido tumoral e também redução da capacidade de divisão de células tumorais, entre outras. Com o objetivo de elucidar quais mecanismos participariam no processo de redução da massa tumoral, procedemos à identificação dos processos acima apontados.

Apoptose pode ser definido como um processo de morte celular mediado por caspases, que apresenta alterações morfológicas características como condensação citoplasmática e nuclear, clivagem de cromatina, formação de corpos apoptóticos, manutenção da membrana plasmática intacta, e exposição de moléculas de superfície que atuam como alvo para células fagocitárias. A exposição de moléculas de fosfatidilserina na monocamada externa da membrana plasmática de células em apoptose funciona como marcador molecular para a identificação experimental destas células (FINK et al, 2005).

Além dos resultados obtidos neste trabalho por citometria de fluxo, onde moléculas de fosfatidilserina das células tumorais foram marcadas com anexina-V, a avaliação da expressão de proteínas da família Bcl-2 no tecido tumoral foi efetuada. Em humanos, 20 membros da família de genes Bcl-2 já foram descritos. Estes genes codificam proteínas anti-apoptóticas tais como Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, Bfl-1 Bcl-W e Boo, bem como proteínas pró-apoptóticas tais como Bax, Bak, Bok, Bad, Bid, Bim, Bik, Hrk, Bcl-Xs, APR, p193, Blc-G, Nip3 e Nix. A família de proteínas Bcl-2 regula a liberação da proteína citocromo c do interior das mitocôndrias, sendo que as pró-apoptóticas induzem ou facilitam a liberação desta proteína ativadora de caspase (citocromo c), e os membros com atividade anti-apoptótica suprimem a sua liberação. O desencadeamento de apoptose via proteínas da família Bcl-2 é conhecido como mecanismo intrínseco de morte celular programada. Além disso, a família de proteínas Bcl-2 parece controlar a liberação de outras proteínas mitocondriais além do citocromo c, como caspases 2, 3 e 9, e *apoptosis inducing factor* (AIF) (REED, 2000).

Apoptose é regulada por uma complicada série de interações entre proteínas da família Bcl-2. Estas interações podem ocorrer entre proteínas do mesmo tipo

(homotípicas) e entre proteínas diferentes (heterotípicas). Segundo TAN et al (2006), as interações dominantes entre proteínas da família Bcl-2 após ativação inicial de monômeros Bax por algum fator indutor de apoptose, são interações homotípicas Bax/Bax e interações heterotípicas Bax/Bcl-2. Número suficiente de oligômeros Bax/Bax na membrana mitocondrial externa promove permeabilização desta membrana e liberação de citocromo c, e talvez de outras proteínas pró-apoptóticas da mitocôndria. Quando a razão de Bcl-2/Bax é alta na membrana mitocondrial externa, Bcl-2 liga-se à Bax impedindo a formação de oligômeros Bax. Quando esta razão é baixa, a associação homotípica de proteínas Bax predomina na membrana mitocondrial externa, elevando o grau de permeabilização. Portanto, variações na expressão de proteínas Bcl-2 e Bax interferem diretamente no desencadeamento do processo apoptótico.

Os grupos portadores de tumor suplementados (WFT, WOP, WFT+OP, WGC e WFT+GC) apresentaram expressão semelhante da proteína anti-apoptótica Bcl-2 no tecido tumoral (Figura 16), no entanto a expressão da proteína pró-apoptótica Bax variou (Figura 15) dependendo da suplementação, estabelecendo diferentes razões entre a concentração de Bax e Bcl-2 nas células (Figura 17). Os grupos suplementados com óleo de fígado de tubarão (WFT), óleo de peixe (WOP), óleo de fígado de tubarão + óleo de peixe (WFT+OP) e óleo de fígado de tubarão + gordura de coco (WFT+GC) apresentaram aumento de aproximadamente 3,7 vezes na expressão de Bax, em comparação com o grupo não suplementado. A suplementação isolada com gordura de coco (grupo WGC) produziu expressão de Bax semelhante à do grupo W. O aumento da expressão de Bax no grupo WFT+GC revela que a inclusão de óleo de fígado de tubarão na dieta, mesmo com mesma dose de gordura saturada sendo administrada, foi capaz de elevar a expressão de Bax, e produzir efeito pró-apoptótico nas células tumorais.

Os resultados referentes à expressão das proteínas Bax e Bcl-2 corroboram os obtidos por citometria de fluxo (Tabela 2). Os grupos WFT, WOP, WFT+OP e WFT+GC apresentaram maior percentual de células marcadas com anexina V que o grupo não suplementado W (em torno de 3 vezes). O grupo WGC apresentou percentual de células apoptóticas, células necróticas e células viáveis semelhante ao observado para o grupo controle (W). Portanto, nos grupos W e WGC mais células tumorais permaneceram vivas, em comparação com os demais grupos, o que contribuiu para o maior tamanho dos tumores (Figura 1). Estes resultados obtidos por citometria de fluxo

e por *Western Blotting* sugerem que a principal via desencadeadora de apoptose das células tumorais promovida por óleo de peixe e óleo de fígado de tubarão é intrínseca. Para confirmar este hipótese devemos investigar a extrínseca.

Vários estudos já demonstraram que o aumento de ácidos graxos ω-3 na dieta eleva a taxa de apoptose de células tumorais. KOBAYASHI et al (2006) observaram incremento da taxa de apoptose de células tumorais de próstata de camundongos suplementados com dieta contendo proporção entre ácidos graxos ω-6 e ω-3 de 1:1, durante 8 semanas. LLOR et al (2003) observaram o mesmo comportamento em células tumorais de cólon (Caco-2 e HT-29) cultivadas com óleo de peixe emulsionado em etanol 95%. Células tumorais de cólon (HT-29) também foram estudadas por CHEN & ISTFAN (2000), que incubaram tais células com DHA, e observaram potente ação pró-apoptótica deste ácido graxo. Estes pesquisadores relacionaram a elevada capacidade do DHA de promover apoptose com o aumento da peroxidação lipídica observada nas células tratadas. COLQUHOUN & SCHUMACHER (2001), investigando o efeito do cultivo de células de tumor de Walker 256 na presença de EPA complexado com soroalbumina bovina (na proporção 0,7:1) por até 72 horas, verificaram aumento do número de células tumorais apoptóticas por citometria de fluxo. Em células tumorais, DHA promove decréscimo da expressão de iNOS (*inducible nitric oxide synthase*), enzima responsável pela produção de NO. Além de estimular a expressão de COX-2, NO prejudica a atividade de caspases e da proteína p53, proteínas estas envolvidas na efetuação de apoptose (ROYNETTE et al, 2004). Ácidos graxos ω-3 também podem alterar a sinalização celular por agir diretamente como ligantes de receptores nucleares, incluindo PPARs (*peroxisome proliferator-activated receptors*). Estes fatores de transcrição nuclear unem-se a ligantes lipídicos para regular a expressão gênica, e em conseqüência mediar funções biológicas tais como diferenciação e morte celular. DHA presente no óleo de peixe apresentou capacidade de induzir apoptose celular através da ativação do receptor PPARγ (BERQUIN et al, 2008). É sabido também que EPA e DHA induzem o aumento da expressão de Bax (MANNA et al, 2008) e a redução da expressão de Bcl-2 (CHEN & ISTFAN, 2000; LLOR et al, 2003). No presente trabalho a suplementação isolada com óleo de peixe (grupo WOP) não reduziu a expressão de Bcl-2, mas foi capaz de elevar a relação Bax/Bcl-2 nas células tumorais.

O grupo suplementado com óleo de fígado de tubarão (WFT) apresentou maior percentual de apoptose de células tumorais que o grupo W, como mencionado

anteriormente, porém ligeiramente menor que o percentual de apoptose encontrado para o grupo suplementado apenas com óleo de peixe (WOP) (Tabela 2). O efeito da suplementação crônica com óleo de fígado de tubarão sobre a morte de células do tumor de Walker 256 não tem sido relatado na literatura. Porém, há evidências em estudos com outras células tumorais, que éteres lipídicos estimulam a morte celular. Em 2004, DUIJSINGS et al demonstraram o efeito citotóxico do fosfolipídeo éter, hexadecilfosfocolina, sobre células tumorais de mama de cão, que propiciou rápida exposição de fosfatidilserina na monocamada externa da membrana celular, caracterizando morte por apoptose. SANDEN et al (2004) também verificaram o aumento de células tumorais apoptóticas provocado pela incubação com hexadecilfosfocolina em cultura de células de ovário de hamster (K1 e MT58). O tratamento de células leucêmicas humanas com o alquil-lisofosfolipídeo, 1-octadecil-2-metil-*rac*-glicero-3-fosfocolina, resultou em translocação do receptor Fas para dentro de *rafts* de membrana, o que aparentemente desencadeou a apoptose observada nestas células (HECZKOVÁ & SLOTTE, 2006). O mecanismo pelo qual a apoptose é desencadeada por éteres lipídicos não é claro, mas pode envolver alterações na estrutura da membrana plasmática e de organelas como mitocôndrias, bem como interferir na ativação e/ou inativação de enzimas envolvidas em cascatas de transdução de sinal (SANDEN et al, 2004).

Quando óleo de fígado de tubarão e óleo de peixe foram associados na suplementação (grupo WFT+OP), o percentual de apoptose de células tumorais foi semelhante ao encontrado para o grupo WOP. Este fato sugere que a incorporação similar de EPA e DHA no tecido tumoral observada nos grupos WOP e WFT+OP (Tabela 4) e, conseqüentemente, a mesma disponibilização destes ácidos graxos nas células, contribuiu para o semelhante percentual de apoptose encontrado nestes grupos por citometria de fluxo. A relação Bax/Bcl-2 também foi similar para os dois grupos (Figura 17).

A gordura saturada oferecida na dieta gerou, por citometria de fluxo, percentuais de células apoptóticas, necróticas e viáveis muito parecidos com os obtidos para o grupo não suplementado (W). Este resultado está de acordo com os dados publicados por MUND et al (2007) que encontraram nos tumores de ratos suplementados cronicamente com gordura de coco, também por citometria de fluxo, percentual estatisticamente igual de células apoptóticas em relação ao grupo sem suplementação. Quando óleo de fígado de tubarão foi associado à gordura de coco (grupo WFT+GC),

prevaleceu o efeito promovido pelo óleo de fígado de tubarão, ou seja, houve aumento de apoptose em relação aos animais controle (W). A relação Bax/Bcl-2 para o grupo WGC foi semelhante à do grupo W, e a relação Bax/Bcl-2 para o grupo WFT+GC foi semelhante à observada para os grupos WFT, WOP e WFT+OP, resultados estes que condizem com os dados de citometria.

A capacidade proliferativa *ex vivo* de células tumorais foi significativamente reduzida pela suplementação com óleo de fígado de tubarão (grupo WFT), óleo de peixe (WOP), óleo de fígado de tubarão + óleo de peixe (WFT+OP) e óleo de fígado de tubarão + gordura de coco (WFT+GC) em relação ao grupo W (Figura 13). Nos grupos que receberam óleo de peixe (WOP e WFT+OP), a proliferação tumoral foi cerca de 2,5 vezes menor em relação à do grupo W, e em torno de 1,5 vezes menor que a proliferação observada no grupo WFT. A redução da capacidade proliferativa de células tumorais provocada pelo óleo de peixe e/ou EPA e DHA isolados é conhecida na literatura. Uma vez que EPA é capaz de substituir ácido araquidônico nas membranas celulares, EPA atua como substrato para as enzimas COX e LOX gerando eicosanóides tais como prostaglandinas da série 3 e leucotrienos da série 5, diferentes das prostaglandinas da série 2 e leucotrienos da série 4 produzidos a partir de ácido araquidônico, as quais contribuem para a proliferação das células tumorais e formação de metástases (ROYNETTE et al, 2004). No presente trabalho, a concentração de EPA e DHA encontrada nos tumores dos grupos WOP e WFT+OP (Tabela 4), foi aproximadamente 4 vezes maior que a encontrada para o grupo não suplementado (W), enquanto que a concentração de ácido araquidônico nos tumores dos grupos WOP e WFT+OP foi reduzida em aproximadamente 5 vezes quando comparada àquela do grupo W. *In vitro*, óleo de peixe foi capaz de reduzir a proliferação de células tumorais humanas de cólon (LLOR et al, 2003), e *in vivo*, células de tumor de Walker 256 também proliferaram menos quando óleo de peixe foi suplementado cronicamente (MUND et al, 2007).

Assim como discutido anteriormente em relação à apoptose, o grupo que recebeu óleo de fígado de tubarão + óleo de peixe (WFT+OP) apresentou redução na proliferação similar àquela observada para o grupo WOP. Novamente este fato sugere que, uma vez que EPA e DHA foram incorporados em concentrações similares no tecido tumoral nos dois grupos ((WOP e WFT+OP), eles são ofertados também em concentrações similares para as enzimas intracelulares, provocando o mesmo efeito sobre a capacidade proliferativa tumoral (Tabela 4).

O óleo de fígado de tubarão suplementado isoladamente (grupo WFT) promoveu redução da proliferação das células de tumor de Walker, ainda que de forma menos pronunciada que o óleo de peixe. Estudos *in vitro* com diferentes linhagens de células tumorais demonstraram a capacidade de éteres lipídicos limitarem a proliferação de células tumorais. UNGER et al (1987) investigaram o efeito citotóxico do alquil-lisofosfolipídeo (1-octadecil-2-metil-*rac*-glicero-3-fosfocolina) sobre linhagens humanas de células leucêmicas (K562, Hl60 e Raji) e linhagem de camundongo (L1210), e observaram significativa redução da proliferação celular em pequenas doses. WANG et al (1999) observaram que o alquilglicerol metoxilado de 16 carbonos (1-O-2-metóxi-hexadecilglicerol) encontrado em óleo de fígado de tubarão promoveu aparecimento de fenótipo mais benigno ou diferenciado em linhagens de células tumorais humanas de cólon (Moser, HT29 e HCT116), e redução da capacidade proliferativa destas células. Este mesmo alquilglicerol (1-O-2-metóxi-hexadecilglicerol) foi estudado por REYNOLDS et al (2000), em células cancerosas humanas de próstata (linhagens LnCap e DU145). Foi observada pronunciada capacidade deste composto de reduzir o crescimento dependente de ancoragem das células.

As células tumorais proliferaram mais sob estímulo dos ácidos graxos saturados presentes na gordura de coco (grupo WGC). Neste grupo, a proliferação foi em torno de 1,3 vezes maior que no grupo controle (W) (Figura 13). De fato, a fase de promoção tumoral, caracterizada por elevada proliferação de células transformadas, é estimulada por dietas ricas em ácidos graxos saturados (WELSCH, 1992), assim como o risco de surgimento de células tumorais é aumentado por estas dietas (RAO et al, 2001; THEODORATOU et al, 2007). Por outro lado, há evidências de que dieta rica em gordura de coco mantém a proliferação tumoral semelhante à de animais não suplementados com esta gordura (MUND et al, 2007). Quando óleo de fígado de tubarão foi associado à gordura de coco (grupo WFT+GC), a proliferação das células tumorais decresceu significativamente em relação ao grupo WGC, e alcançou valor (em cpm) semelhante àquele encontrado para o grupo WFT. Este dado indica que, assim como no resultado obtido para percentual de apoptose, quando há inclusão de óleo de fígado de tubarão na suplementação em mesma dose que a gordura de coco (WFT+GC), prevalece o efeito do óleo de fígado de tubarão.

A peroxidação lipídica no tecido tumoral foi elevada pela suplementação isolada com óleo de peixe (grupo WOP) e pela suplementação conjunta com óleo de fígado de tubarão + óleo de peixe (grupo WFT+OP) em torno de 3 vezes em relação ao grupo

não suplementado (W) (Figura 14). Os resultados encontrados para os grupos suplementados com óleo de peixe (WOP e WFT+OP) estão em concordância com os dados encontrados na literatura. Ácidos graxos ω-3, presentes nos extratos lipídicos tumorais destes dois grupos na mesma proporção (Tabela 4) são mais propensos à peroxidação lipídica do que ácidos graxos saturados, monoinsaturados ou ácidos graxos ω-6, por apresentarem várias ligações duplas carbono-carbono, e uma ligação dupla adicional em relação aos ácidos graxos ω-6. É sabido que peróxidos lipídicos inibem o crescimento tumoral por elevar a apoptose, contribuindo para o efeito antiproliferativo destes compostos (YIN et al, 2007). Ácidos graxos ω-3 incorporados em tecido tumoral têm sido relacionados com o aumento na produção de lipoperóxidos em vários estudos (YAM et al, 2001; PIZATO et al, 2005; MUND et al, 2007). Segundo HARDMAN et al (2002), a suplementação com óleo de peixe também foi capaz de reduzir a atividade da enzima glutationa peroxidase em tumor de mama humano inoculado em camundongo. Como esta enzima apresenta função de proteger as células de danos oxidativos, reduzindo hidroperóxidos lipídicos a alcoóis pela simultânea oxidação de glutationa, os ácidos graxos ω-3 da dieta, ao reduzirem a atividade da enzima, tornam as células tumorais mais suscetíveis a estresse oxidativo.

Os animais suplementados apenas com óleo de fígado de tubarão (grupo WFT) apresentaram maior produção de hidroperóxidos lipídicos que o grupo não suplementado (W, 1,6 vezes), porém menor que a produção nos grupos suplementados com óleo de peixe (WOP e WFT+OP, aproximadamente 2 vezes). Este resultado justifica-se pelo fato de que o óleo de fígado de tubarão apresenta menor concentração de ácidos graxos ω-3 que o óleo de peixe. De acordo com os dados apresentados na Tabela 3, óleo de fígado de tubarão apresenta a metade de ácidos graxos poliinsaturados ω-3 que o óleo de peixe (18% e 40%, respectivamente). Nos extratos lipídicos tumorais (Tabela 4), os grupos WOP e WFT+OP apresentaram aproximadamente o dobro destes ácidos graxos que o grupo WFT. Deste modo, no grupo WFT houve menor concentração de hidroperóxidos lipídicos formados possivelmente pela menor oferta de substrato para peroxidação.

Quando os animais foram suplementados com gordura saturada (grupo WGC), a concentração de hidroperóxidos lipídicos produzidos no tumor foi semelhante à encontrada no grupo não suplementado (W), e significativamente menor que os outros grupos suplementados que receberam na dieta de ácidos graxos poliinsaturados ω-3. A suplementação conjunta com óleo de fígado de tubarão + gordura de coco (WFT+GC),

reverteu este cenário levando à produção de hidroperóxidos lipídicos na mesma concentração observada no grupo WFT.

De acordo com o exposto, a capacidade proliferativa das células do tumor de Walker no grupo WOP foi 2,4 vezes menor que à do grupo sem suplementação (W), a concentração de lipoperóxidos foi 3,3 vezes maior que a concentração encontrada para os tumores do grupo W, e a apoptose foi 3,5 vezes maior que para W. O grupo com tumor suplementado unicamente com óleo de fígado de tubarão (WFT) também apresentou redução da proliferação de células tumorais (1,5 vezes), aumento da peroxidação lipídica no tecido tumoral (1,6 vezes) e aumento de apoptose (2,9 vezes) em relação ao grupo não suplementado (W) ($p<0,05$). Seguramente estes efeitos provocados pelo óleo de fígado de tubarão contribuíram para a redução do peso tumoral encontrado neste grupo (redução de 35% em relação ao grupo W), uma vez que as células tumorais multiplicaram-se menos e simultaneamente morreram mais, permanecendo menor número de células viáveis na massa tumoral. Em comparação com o grupo WOP, porém, a redução da proliferação, e o aumento da peroxidação e de apoptose observados no grupo WFT foram menos pronunciados, e nestes três parâmetros os valores encontrados para o grupo WOP foram significativamente diferentes dos valores obtidos para WFT. Estes dados condizem com a redução no peso tumoral encontrada para os dois grupos (WOP, redução de 60% em relação a W; WFT, redução de 35% em relação a W). A capacidade da suplementação com óleo de fígado de tubarão de reduzir o crescimento tumoral já foi observada em estudo *in vivo*. PÉDRONO et al (2004c) suplementou camundongos portadores de tumor (*Lewis lung carcinoma*) com óleo de fígado de tubarão, porém iniciou a suplementação 8 dias após a inoculação das células tumorais, e manteve a suplementação por apenas 10 dias. A suplementação crônica de animais com óleo de fígado de tubarão antes da implantação do tumor (durante 50 dias), e durante o crescimento tumoral (15 dias), bem como a avaliação dos efeitos provocados sobre o crescimento do tumor de Walker 256 nunca tinham sido antes realizadas. Da mesma forma, suplementação com dose de 1g de óleo/kg de peso corpóreo, que representa aproximadamente 0,1% do total de gordura ingerida pelo animal, também não havia sido testada.

Apesar de vários estudos indicarem a capacidade do óleo de fígado de tubarão e/ou seus componentes de reduzir o crescimento de tumores, o mecanismo pelo qual este efeito é alcançado ainda não é entendido. Mesmo não sendo o objetivo deste trabalho elucidar o mecanismo de ação deste óleo e seus componentes, os resultados

obtidos neste trabalho apontam fatores que contribuem para o efeito anti-tumoral em tumor de Walker 256: aumento da lipoperoxidação lipídica, aumento da apoptose, e redução da capacidade de proliferação das células tumorais.

Quando a suplementação com óleo de fígado de tubarão foi associada com óleo de peixe (WFT+OP), a peroxidação lipídica no tecido tumoral, a capacidade proliferativa e a porcentagem de apoptose de células tumorais assumiram valores similares aos obtidos para o grupo suplementado apenas com óleo de peixe (WOP). A similaridade entre estes grupos também foi observada nos valores obtidos para peso de tumor e nos parâmetros de caquexia analisados, sem haver efeito aditivo das duas suplementações. Uma vez que ácidos graxos e alquilgliceróis são capazes de se inserir nas bicamadas lipídicas das células (MA et al, 2004; KOBAYASHI et al, 2006; RAKOTOMANGA et al, 2004; HECZKOVÁ & SLOTTE, 2006), a ausência de efeito aditivo pode ser devida à competição entre estes dois lipídeos pela inserção na membrana plasmática das células tumorais, e subseqüentemente pelas mesmas vias de sinalização.

De acordo com recentes trabalhos, a atividade de enzimas da família proteína quinase C pode ser regulada por ácidos graxos ω-3 (ROYNETTE et al, 2004; BERQUIN, 2008) e por alquilgliceróis (MARIGNY et al, 2002; CONESA-ZAMORA et al, 2005). Porém, além deste fato, as concentrações de EPA e DHA, bem como as de alquilgliceróis, encontradas no tecido tumoral dos diferentes grupos portadores de tumor sugerem que ácidos graxos ω-3 e alquilgliceróis competem pela incorporação na membrana das células tumorais, como discutido a seguir.

Os animais suplementados isoladamente com óleo de peixe (WOP), e conjuntamente com óleo de fígado de tubarão + óleo de peixe (WFT+OP), apresentaram maior incorporação de EPA e DHA nos tumores do que o grupo não suplementado (W). Este fato indica que o efeito sobre a redução do crescimento tumoral nos grupos WOP e WFT+OP realmente pode ser atribuído à presença e disponibilidade destes ácidos graxos ω-3 nas células tumorais. As concentrações de EPA e DHA nos tumores dos grupos WOP e WFT+OP foram similares, o que sugere que a suplementação com óleo de fígado de tubarão no grupo WFT+OP não interferiu na incorporação de ácidos graxos ω-3 presentes em grande quantidade no óleo de peixe. A semelhante incorporação de EPA e DHA nos grupos WOP e WFT+OP pode explicar parcialmente o resultado similar sobre crescimento tumoral e caquexia observada nestes grupos. O grupo suplementado apenas com óleo de fígado de

tubarão (WFT) apresentou menor incorporação de EPA nos tumores que o grupo WOP (2,4 vezes), e menor concentração de DHA (2 vezes) que a encontrada para os grupos WOP e WFT+OP (Tabela 4). No entanto, a redução no peso dos tumores e na caquexia encontradas para os grupos WFT, WOP e WFT+OP foram semelhantes, sugerindo que os efeitos observados no grupo WFT podem ser atribuídos aos alquilgliceróis, detectados em concentração cerca de 3 vezes maior nos tumores do grupo WFT do que nos tumores dos grupos WOP e WFT+OP (Tabela 5). Pelo fato de o óleo de fígado de tubarão apresentar em sua composição ácidos graxos poliinsaturados ω-3, PEDRONO et al (2004c) avaliaram se os efeitos do óleo de fígado de tubarão de reduzir crescimento tumoral em camundongos era devido a estes ácidos graxos ou aos alquilgliceróis presentes no óleo. Os resultados obtidos revelaram que animais suplementados com o óleo e animais suplementados com alquilgliceróis isolados do óleo de fígado de tubarão apresentaram a mesma redução tumoral, sendo portanto, esta redução atribuída aos alquilgliceróis.

A incorporação de ácidos graxos ω-3 (Tabela 4) e de alquilgliceróis (Tabela 5) nas células tumorais pode explicar parcialmente o porquê a suplementação conjunta com óleo de fígado de tubarão e óleo de peixe não exerceu efeito aditivo sobre a redução do crescimento tumoral e sobre a redução da caquexia. No grupo WFT+OP a incorporação nos tumores de EPA e DHA foi similar àquela do grupo WOP, mas a incorporação de alquilgliceróis foi menor que àquela do grupo WFT. Os resultados mostrados na Tabela 5 sugerem que a incorporação de alquilgliceróis nas células tumorais é sobrepujada quando há fornecimento de outra gordura na dieta. A concentração de alquilgliceróis observada nos tumores dos grupos WOP, WFT+OP, WGC e WFT+GC é menor (em torno de 3 vezes) que a concentração observada no grupo suplementado isoladamente com óleo de fígado de tubarão (WFT). Ou seja, parece que quando óleo de peixe rico em ácidos graxos ω-3 e óleo de fígado de tubarão rico em alquilgliceróis são suplementados em conjunto, os ácidos graxos ω-3 são preferencialmente incorporados no tecido tumoral, e a incorporação de alquilgliceróis são significativas apenas quando óleo de fígado de tubarão é ofertado isoladamente na dieta. Esta competição pela incorporação na bicamada lipídica poderia explicar por que os efeitos sobre crescimento tumoral observados no grupo WOP e no grupo WFT+OP são semelhantes.

WOP e WFT+OP também apresentaram maior incorporação de EPA e DHA do que o grupo suplementado apenas com gordura de coco (WGC) ($p<0,05$). Este grupo

(WGC), ao contrário, apresentou grande incorporação de ácidos graxos saturados no tecido tumoral, o que era esperado uma vez que a gordura de coco oferecida como suplemento é composta por aproximadamente 88% destes ácidos graxos (Tabela 3). Em relação ao grupo controle (W), os tumores dos animais WGC apresentaram 4,5 vezes mais ácido láurico, 3 vezes mais ácido mirístico e 1,3 vezes mais ácido palmítico (Tabela 4). Tumores do grupo WGC incorporaram mais ácidos graxos saturados no tecido tumoral que o grupo W, e apresentaram crescimento tumoral similar ao do grupo W. Porém já foi demonstrada a capacidade da gordura saturada da dieta de elevar o crescimento tumoral em comparação com dieta contendo menor concentração de gordura saturada (MUND et al, 2007).

Quando óleo de fígado de tubarão foi associado à suplementação com gordura de coco (grupo WFT+GC), foi observada menor incorporação de alquilgliceróis no tecido quando comparada à incorporação ocorrida nos tumores do grupo suplementado isoladamente com óleo de fígado de tubarão (WFT) (Tabela 5). Em contrapartida, o percentual de ácidos graxos saturados encontrados nos tumores do grupo WFT+GC foi semelhante ao encontrado para o grupo suplementado isoladamente com gordura de coco (WGC) (Tabela 4). Este resultado novamente demonstra a incorporação preferencial de ácidos graxos nas membranas celulares do que a incorporação de alquilgliceróis, o que parcialmente justifica por que o crescimento tumoral (Figura 8) ocorrido no grupo WFT+GC foi semelhante ao encontrado para o grupo WGC. Apesar de ter havido menor incorporação de alquilgliceróis nos tumores do grupo WFT+GC que nos tumores do grupo WFT, foram observados efeitos sobre a apoptose, peroxidação lipídica e proliferação tumoral no grupo WFT+GC semelhantes aos encontrados no grupo WFT. Porém, pelos resultados encontrados, parece que a presença da gordura de coco na dieta (grupo WFT+GC) atua em outros parâmetros que levaram ao crescimento tumoral elevado.

Além das alterações metabólicas que a dieta pode provocar em células tumorais, células do sistema imunitário podem apresentar diferente comportamento funcional em virtude de alterações no tipo e quantidade de lipídeos fornecidos pela dieta. O indicador mais utilizado de função linfocitária é a proliferação, ou seja, a habilidade das células de se dividirem quando estimuladas (CALDER, 2002).

Timo, linfonodos mesentéricos e baço são órgãos linfóides com diferentes populações de linfócitos, e que respondem de forma particular a variações nos componentes lipídicos da dieta. Os resultados que serão discutidos a seguir revelam

estas particularidades, e reforçam a idéia de que o comportamento funcional de linfócitos obtidos de um órgão linfóide em particular não pode ser tomado como padrão para todas as diferentes populações linfocitárias.

O timo é um órgão onde ocorre a diferenciação e a seleção de linfócitos T. O desenvolvimento tímico de linfócitos T requer a comunicação constante entre linfócitos em amadurecimento e células estromais do timo, e uma dinâmica movimentação dos linfócitos em desenvolvimento por entre os diversos microambientes do órgão. Este desenvolvimento inclui a entrada de células linfóides progenitoras no timo, a geração de linfócitos duplo-positivos ($CD4^+CD8^+$) no córtex do órgão, seleção positiva e negativa dos linfócitos $CD4^+CD8^+$ também no córtex, interação dos linfócitos positivamente selecionados com células epiteliais da medula tímica para completar o desenvolvimento linfocitário e garantir tolerância ao que é próprio ao organismo, e por fim, a exportação de linfócitos T maduros do timo (TAKAHAMA, 2006). Linfonodos apresentam várias importantes funções no sistema imunológico. Recrutam grande número de linfócitos não-ativados do sangue, coletam antígenos e células dendríticas de tecidos periféricos, fornecem o microambiente para a tolerância específica a antígenos ou para a expansão clonal necessária para respostas efetoras, modulam as características moleculares dos linfócitos permitindo que sejam direcionados para os tecidos-alvo contendo o antígeno específico, e finalmente, fornecem o microambiente necessário para o “alerta” de linfócitos de memória. Portanto, linfonodos constituem uma interface de importância crucial entre componentes celulares do sistema imune inato e adaptativo (ANDRIAN & MEMPEL, 2003). O baço é um órgão que executa a eficiente fagocitose de eritrócitos e reciclagem de ferro, a captura e destruição de patógenos e a indução de respostas imunes adaptativas. Todas estas funções são combinadas no baço através de sua compartimentalização em diferentes regiões que não são observadas em outros órgãos linfóides (MEBIUS & KRAAL, 2005). Neste trabalho, a capacidade proliferativa *ex vivo* desta rica população linfocitária foi avaliada, após a suplementação crônica com as diferentes gorduras.

Em um cenário sem presença de tumor, e sob estímulo de concanavalina A, um potente mitógeno ativador de linfócitos T, a suplementação isolada com óleo de fígado de tubarão (grupo FT) e a suplementação conjunta com óleo de fígado de tubarão+óleo de peixe (grupo FT+OP) promoveram aumento da proliferação linfocitária no timo em relação ao respectivo grupo sem mitógeno, e em relação ao grupo controle (C, 1,4 vezes). O grupo suplementado apenas com óleo de peixe (OP) apresentou proliferação

similar à do controle (C). Nos linfonodos mesentéricos, a suplementação com óleo de fígado de tubarão (grupo FT) promoveu aumento ainda mais significativo na proliferação linfocitária em relação ao grupo não suplementado (C), cerca de 4 vezes, e o grupo suplementado com óleo de fígado de tubarão +óleo de peixe (grupo FT+OP) também provocou este comportamento, elevando a proliferação em 5 vezes. Ambos os grupos (FT e FT+OP) apresentaram elevação da proliferação em relação aos grupos contrapostos sem mitógeno de forma semelhante (~6 vezes), enquanto óleo de peixe (grupo OP) promoveu proliferação semelhante em relação ao contraposto sem mitógeno. A suplementação isolada com óleo de peixe (grupo OP), assim como no timo, não induziu aumento na capacidade proliferativa, mantendo-a similar à do grupo controle (C). No baço o comportamento linfocitário frente às suplementações foi diferente do observado em timo e linfonodos mesentéricos. Todas as suplementações (grupos FT, OP, FT+OP, GC e FT+GC) reduziram a capacidade proliferativa dos linfócitos em comparação com a ausência de suplementação (grupo C).

O estímulo à proliferação linfocitária provocada pela suplementação crônica com óleo de fígado de tubarão observado em timo e linfonodos mesentéricos, mesmo sem presença de tumor, nunca tinha sido demonstrado anteriormente. No entanto, esta ação do óleo de fígado de tubarão sobre linfócitos era esperada, uma vez que a literatura é generosa em demonstrar sua capacidade imunoestimulatória. BOERYD et al (1978) demonstraram a capacidade de éteres de glicerol oferecidos na dieta de estimular a atividade de linfócitos contra células de ovelha inoculadas em camundongo. Há relatos sobre a capacidade de alquilgliceróis, que são encontrados em significativa concentração em óleo de fígado de tubarão, de elevar os níveis plasmáticos de IgG e IgM em filhotes de ratos amamentados por mãe suplementada com alquilgliceróis sintéticos (OH et al, 1994). MITRE et al (2004), ao suplementar fêmeas de suíno durante a gestação e lactação com óleo de fígado de tubarão observaram aumento na concentração de IgG nas secreções mamárias (colostro e leite), bem como aumento no número de leucócitos e IgG no sangue periférico dos filhotes, indicando que neles houve melhora da imunidade passiva e ativa. PÉDRONO et al (2004b) demonstraram a capacidade de uma mistura de alquilgliceróis extraídos de óleo de fígado de tubarão modular a permeabilidade de canais de Ca^{++} na membrana de linfócitos humanos *in vitro*, elevando o influxo de Ca^{++}. O aumento nas concentrações de Ca^{++} citosólico está envolvido com o desencadeamento de sinal necessário para a ativação linfocitária. Também pesquisando o efeito sobre concentração de Ca^{++} intracelular, GROSMAN

(2001) observou que quando incubados com membranas de leucócitos coletados das cavidades abdominal e torácica de ratos Wistar, dos quais 80% eram linfócitos, éteres fosfolipídicos foram capazes de inibir a atividade da enzima Ca^{++}-ATPase e com isso elevar a concentração de Ca^{++} intracelular. Em estudo clássico desenvolvido por BROHULT (1962) com pacientes sofrendo de leucopenia causada por irradiação, a administração de óleo de fígado de tubarão na dose de 1 a 2g/dia durante o tratamento radioterápico, promoveu aumento da contagem de leucócitos plasmáticos em 75% dos pacientes envolvidos no estudo. YAMAMOTO & NGWENYA (1987) demonstraram a capacidade de éteres lipídicos estimularem macrófagos *in vitro*, e em 1990, HOMMA & YAMAMOTO também verificaram a ativação macrofágica mediada por alquilglicerol sintético. Segundo LEWKOWICZ et al (2006), óleo de fígado de tubarão é capaz de elevar a apresentação de antígeno e induzir resposta inflamatória. Apesar de vários estudos indicarem a capacidade imunoestimulatória de éteres lipídicos, não há definição sobre o mecanismo envolvido neste processo. No entanto, é sabido que a ativação de linfócitos T depende da fosforilação de resíduos de tirosina localizados em seqüências especiais de aminoácidos denominadas ITAMs (*immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*). Os ITAMs, em linfócitos T, são encontrados no complexo protéico de membrana CD3, e nas cadeias de proteínas ζ do TCR (*T-cell receptor*), também de membrana (WEISS & CAMBIER, 2004). Algumas proteínas chave para a ativação linfocitária, tais como tirosina quinase lck e a molécula sinalizadora LAT (*linker of activated T cells*) ficam retidas em *lipid rafts*, enquanto outras incluindo ZAP70 e fosfolipase C-γ1 são translocadas para *rafts* após estimulação do receptor de linfócito T (CALDER, 2007). Apesar da concentração de alquilgliceróis presentes na membrana de linfócitos dos diferentes órgãos linfóides não terem sido quantificados neste trabalho, sabe-se que éteres lipídicos fornecidos na dieta são capazes de se inserir nas membranas celulares e alterar a composição e disposição dos *rafts* lipídicos (HECZKOVÁ & SLOTTE, 2006). Assim, alquilgliceróis presentes no óleo de fígado de tubarão poderiam interferir positivamente na atividade destas proteínas de membrana importantes para a ativação dos linfócitos.

O fato de linfócitos do baço de animais sem tumor estimulados com ConA não terem apresentado elevação da capacidade proliferativa pela suplementação crônica com óleo de fígado de tubarão em relação ao controle (C) pode ser devido ao fato de que o baço é um órgão linfóide muito mais rico em linfócitos B que em linfócitos T, e a

estimulação no ensaio *ex vivo* deste trabalho foi promovida por concanavalina A, lectina capaz de se ligar especificamente em linfócitos T.

A manutenção ou mesmo redução da capacidade proliferativa dos linfócitos de timo e linfonodos mesentéricos induzida pela suplementação com óleo de peixe (grupo OP), em relação à ausência de suplementação (grupo C), também foi demonstrada por PIZATO et al (2006). De fato, óleo de peixe oferecido como suplemento eleva a concentração de ácidos graxos ω-3 nos fosfolipídeos de membrana de células de defesa, e proporcionalmente reduz a concentração de ácido araquidônico normalmente abundante nestas células em indivíduos com alimentação típica do Ocidente. Esta mudança na composição de ácidos graxos altera propriedades físicas da membrana (fluidez e estrutura dos *rafts*), afeta vias de sinalização celular por modificar a expressão ou atividade de receptores de membrana ou modificar sinais de transdução intracelulares, e ainda altera o tipo de eicosanóides produzidos. Todos estes mecanismos de ação dos ácidos graxos ω-3 influenciam na função imunitária e, conseqüentemente, modificam a resposta do sistema imunitário (CALDER, 2007). *Lipid rafts* são encontrados em grandes quantidades em linfócitos T, e muitas proteínas envolvidas na sinalização destas células, tais como proteínas tirosina-quinases da família Src e LAT (*linker for activation of T-cells*) citadas anteriormente, estão aciladas e concentradas em *rafts*. Ë sabido que proteínas aciladas que estão ancoradas à monocamada interna da membrana plasmática são deslocadas dos *rafts* quando linfócitos T são tratados com ácidos graxos ω-3. Já foi observado que estes ácidos graxos decrescem o conteúdo de esfingolipídeos nos *rafts* e alteram sua composição de ácidos graxos prejudicando a resposta imunitária, uma vez que há fortes evidências de que a integridade dos *lipid rafts* é um pré-requisito para a ativação dos linfócitos T via TCR (*T cell receptor)*. Além disso, DHA e EPA pioram a atividade da via de sinalização estimulada por IL-2, por deslocar o receptor para esta interleucina (IL-2R) dos *rafts* lipídicos. Isto pode explicar, parcialmente, o efeito supressivo dos ácidos graxos ω-3 sobre a função linfocitária, uma vez que IL-2 é estimulante da proliferação de linfócitos T (MARTINS DE LIMA et al, 2007). Também há indícios de que a suplementação com óleo de peixe resulta em decréscimo na expressão de MHCII por células dendríticas, o que foi associado com a diminuída capacidade de apresentação de antígeno para linfócitos T (CALDER, 2007). Outro possível mecanismo pelo qual ácidos graxos ω-3 alteram a proliferação de linfócitos T envolve a produção de eicosanóides. Eicosanóides regulam a proliferação linfocitária, por isso o aumento na

produção de eicosanóides derivados do EPA poderia afetar esta proliferação. Eicosanóides produzidos a partir de EPA são considerados biologicamente menos potentes que os análogos produzidos a partir de ácido araquidônico (CALDER 2002).

Tanto no timo como nos linfonodos mesentéricos, a suplementação com gordura de coco (grupo GC) provocou decréscimo da capacidade proliferativa de linfócitos estimulados com ConA em relação aos grupos suplementados com óleo de fígado de tubarão, FT e FT+OP. No timo, o grupo GC apresentou proliferação semelhante à do grupo controle (C), e nos linfonodos mesentéricos apresentou redução da proliferação. De fato, estudos *in vitro* e *in vivo* com animais alimentados com gordura saturada sugerem que ácidos graxos saturados apresentam limitado impacto sobre a proliferação linfocitária (CALDER, 2002).

Quando óleo de fígado de tubarão foi adicionado à suplementação com gordura de coco (grupo FT+GC), os linfócitos obtidos dos linfonodos mesentéricos e do timo recuperaram sua capacidade proliferativa estimulada por mitógeno em comparação com o grupo suplementado isoladamente com gordura de coco (GC), indicando que o efeito do óleo de fígado de tubarão é capaz de se sobrepor ao da gordura saturada em linfócitos destes órgãos.

Em animais portadores de tumor, linfócitos estimulados com mitógeno oriundos dos linfonodos mesentéricos do grupo suplementado com óleo de fígado de tubarão (WFT) proliferaram 2 vezes mais que os linfócitos de animais não suplementados (grupo W), e 6 vezes mais que o respectivo grupo sem mitógeno. No timo, o aumento na capacidade proliferativa foi de quase 3 vezes no grupo WFT em relação ao grupo W, de 8 vezes em relação ao respectivo grupo sem mitógeno. O grupo suplementado com óleo de fígado de tubarão+óleo de peixe (WFT+OP), apresentou elevação da capacidade proliferativa de linfócitos dos linfonodos mesentéricos em relação ao grupo não suplementado (W) de 2,5 vezes, e elevação também na proliferação de linfócitos do timo (3 vezes). No baço os grupos WFT e WFT+OP apresentaram elevação na proliferação linfocitária de aproximadamente 1,5 vezes em relação ao grupo W. Portanto, havendo ou não desafio tumoral, a suplementação com óleo de fígado de tubarão, isolada (grupos FT e WFT) ou em associação com óleo de peixe (grupos FT+OP e WFT+OP), promoveu elevação da proliferação de linfócitos de linfonodos e timo em relação à ausência de suplementação (grupos C e W, respectivamente).

A suplementação isolada com óleo de peixe em animais com tumor (grupo WOP), sob estímulo de mitógeno, promoveu o mesmo efeito visto em animais sem

tumor (OP). Linfócitos de linfonodos mesentéricos e de timo proliferaram de forma semelhante à observada para o grupo não suplementado (W), e em menor intensidade que nos grupos WFT e WFT+OP. Novamente, a influência dos ácidos graxos ω-3 sobre a estrutura de *rafts lipídicos*, sobre a sinalização intracelular e sobre os tipos de eicosanóides produzidos nos linfócitos pode explicar esta redução da capacidade proliferativa.

A gordura de coco ofertada a animais com tumor (grupo WGC) provocou estimulação dos linfócitos de linfonodo mesentérico de forma menos intensa que a ausência de suplementação (grupo W), da mesma forma que, na ausência de tumor, o grupo GC apresentou proliferação inferior àquela do grupo sem suplementação (C). No timo e com presença de tumor, ao contrário, a suplementação com gordura de coco (grupo WGC) provocou estímulo à proliferação linfocitária em relação ao grupo não suplementado (W). No baço, a proliferação também foi maior em linfócitos de animais portadores de tumor suplementados com gordura de coco (grupo WGC) estimulados com mitógeno quando comparada à proliferação de animais dos grupos W, WOP e WFT. O diferente comportamento de linfócitos de linfonodo mesentérico, timo e baço frente à suplementação com gordura saturada revela claramente como distintas populações linfocitárias podem responder de forma particular a um estímulo. WANG et al (2000) avaliou a capacidade proliferativa de linfócitos T de baço de aves suplementadas cronicamente com gordura saturada e encontrou aumento da capacidade proliferativa nestes linfócitos em relação aos animais não suplementados.

Tanto em timo quanto em linfonodos mesentéricos e em baço, a associação de óleo de fígado de tubarão com gordura de coco (grupo WFT+GC) não provocou considerável alteração no padrão de proliferação linfocitária em relação ao grupo suplementado exclusivamente com gordura de coco (grupo WGC). Este comportamento linfocitário foi diferente do observado em animais sem tumor, em timo e linfonodos mesentéricos, onde a gordura saturada provocou redução da proliferação, e a associação com óleo de fígado de tubarão foi capaz de reverter o quadro. Isto significa que a presença de tumor, além das alterações na dieta, interfere significativamente na função linfocitária.

Linfócitos de timo e linfonodos mesentéricos cultivados sem estímulo de mitógeno, tanto em animais sem tumor quanto em animais com tumor, não proliferaram mais em animais suplementados com óleo de fígado de tubarão (grupos FT, FT+OP, WFT e WFT+OP) em relação ao controle (grupo C e W), como visto em linfócitos

estimulados com mitógeno. Isto indica que a ligação de um estimulador (neste caso, concanavalina A) no receptor do linfócito T (SITKOVSKY et al, 1984) é importante para que o efeito da suplementação com óleo de fígado de tubarão seja verificado, ou seja, os éteres lipídicos podem estar influenciando a conformação da membrana plasmática e a transmissão do sinal de ativação linfocitária. A suplementação isolada com óleo de peixe (grupos OP e WOP), em linfócitos de linfonodos mesentéricos provocou manutenção da capacidade proliferativa em relação à ausência de suplementação, e em linfócitos de timo provocou redução da proliferação. A suplementação isolada com gordura de coco (grupos GC e WGC) promoveu redução da capacidade proliferativa em timo e linfonodos mesentéricos, e a adição de óleo de fígado de tubarão (grupos FT+GC e WFT+GC) não provocou elevação da capacidade proliferativa.

No baço, a resposta dos linfócitos sem estímulo de mitógeno foi diferente da encontrada em timo e linfonodos. Sem mitógeno, linfócitos de animais sem tumor suplementados com óleo de fígado de tubarão (grupos FT) apresentaram proliferação maior que o grupo C, enquanto em animais com tumor, linfócitos de animais suplementados com óleo de peixe (grupo WOP) foram os que mais proliferaram. Estas diferenças encontradas na proliferação de linfócitos do baço em relação a linfócitos dos outros dois órgãos linfóides podem ser devidas às diferenças no microambiente celular encontrado neste órgão (MEBIUS & KRAAL, 2005).

Comparando-se a capacidade proliferativa de linfócitos, estimulados ou não com mitógeno, de animais com tumor e a de animais sem tumor, nos três órgãos linfóides estudados, é possível observar que, de forma geral, houve redução nos valores numéricos de proliferação nos animais portadores de tumor em relação aos não portadores de tumor. Esta redução pode ser explicada pelo fato de que o tumor secreta fatores solúveis capazes de influenciar a resposta imunitária. TGFβ e IL-10 são mediadores secretados tanto por células de defesa infiltradas no tumor quanto pelas próprias células tumorais, e fazem parte da resposta imunitária do tipo Th2, ou seja, promovem redução da intensidade da resposta imunitária. Estes mediadores e suas funções inibitórias de crescimento possivelmente agem em fases iniciais da tumorigênese a fim de limitar o crescimento tumoral. Entretanto, as células tumorais tornam-se resistentes às atividades destes mediadores e o processo de crescimento tumoral progride, enquanto as células de defesa infiltradas no tumor não deflagram resposta aguda do tipo Th1, capaz de eliminar células tumorais (MALMBERG, 2004; BEN-BARUCH, 2006; TAN & COUSSENS, 2007). Da mesma forma, espécies reativas

de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs), que são produzidas por células fagocíticas e também por linfócitos, apresentam atividade antitumoral provocando citólise e interrupção do ciclo celular de células tumorais, no entanto, NO e H_2O_2 por exemplo, promovem imunosupressão. NO inibe proliferação de linfócitos T e B, diminui expressão de moléculas de adesão por estas células e diminui a expressão de moléculas de MHCII em células apresentadoras de antígeno. H_2O_2 prejudica a ativação de linfócitos T e de células NK, e promove redução da produção de citocinas Th1 (BEN-BARUCH, 2006). Estes efeitos inibitórios poderiam afetar a capacidade proliferativa de linfócitos de órgãos linfóides periféricos.

Neste sentido, estudo desenvolvido por LEWKOWICZ et al (2005 e 2006), em humanos, demonstrou que a suplementação com óleo de fígado de tubarão por quatro semanas foi capaz de aumentar a produção de citocinas do tipo Th1 tais como IFN-γ, TNF-α e IL-2 por células mononucleares do sangue. Este dado indica outro efeito positivo do óleo de fígado de tubarão, uma vez que a resposta imunitária do tipo Th1 é requerida para a eliminação de células tumorais. Apesar de este estudo ter mensurado citocinas produzidas por células de defesa circulantes, é possível que a suplementação com óleo de fígado de tubarão também promova este efeito em células de defesa de órgãos linfóides periféricos e infiltradas no tumor.

Enquanto o comportamento linfocitário de órgãos periféricos mediante as diferentes suplementações e à presença ou não de tumor foi avaliado de acordo com sua capacidade de proliferação, linfócitos infiltrados no tecido tumoral foram avaliados quanto à expressão de marcadores de superfície, $CD4^+$ e $CD8^+$. Os resultados obtidos por imunohistoquímica de linfócitos infiltrados no tecido tumoral, apresentados nas Figuras 23 e 24, mostram variações entre os grupos apenas para a marcação de linfócitos $CD8^+$.

A marcação positiva para linfócitos $CD4^+$ foi similar entre os diferentes grupos de animais portadores de tumor. No entanto, a marcação positiva para linfócitos $CD8^+$ foi mais intensa nos tumores do grupo suplementado com óleo de fígado de tubarão (WFT) em relação ao grupo não suplementado (W), em torno de 1,5 vezes. O grupo suplementado com óleo de peixe (WOP), óleo de fígado de tubarão+óleo de peixe (WFT+OP) e óleo de fígado de tubarão+gordura de coco (WFT+GC) apresentaram marcação positiva para $CD8^+$ semelhante à encontrada para o grupo W. E o grupo suplementado apenas com gordura de coco (WGC) apresentou marcação positiva

$CD8^+$ inferior à de todos os demais grupos, sendo 5 vezes menor que a marcação encontrada para o grupo WFT, e 3,5 vezes menor que a observada para o grupo W.

Não há relatos na literatura que mostrem a quantificação de marcadores $CD4^+$ e $CD8^+$ em linfócitos infiltrados em tumor de Walker 256. Entretanto, em linfócitos de órgãos linfóides periféricos (timo e linfonodos mesentéricos) de animais suplementados com óleo de peixe, a quantificação destes marcadores foi realizada por citometria de fluxo (PIZATO et al 2006). Neste estudo, a suplementação crônica com 1g/kg de peso corpóreo de óleo de peixe resultou em aumento na proporção de células $CD4^+$ no timo e nos linfonodos mesentéricos de animais portadores de tumor, bem como em aumento na proporção de células $CD8^+$ no timo de animais portadores de tumor em relação a animais não suplementados. Entretanto, a relação $CD4^+/CD8^+$ manteve-se igual à relação encontrada para linfócitos de timo e linfonodos mesentéricos de animais sem tumor. Linfócitos infiltrados no tumor de animais suplementados com óleo de peixe no presente trabalho (grupo WOP) apresentaram marcação positiva para $CD4^+$ e $CD8^+$ semelhante à encontrada para o grupo W, bem como a relação $CD4^+/CD8^+$ foi igual à do grupo W. Esta diferença no efeito da suplementação com óleo de peixe sobre linfócitos de órgãos linfóides periféricos e linfócitos infiltrados no tumor pode ser explicada pelo fato de que, no tumor, as células tumorais secretam inúmeros mediadores químicos que interferem na diferenciação e função de linfócitos infiltrados (BEN-BARUCH, 2006; TAN & COUSSENS, 2007).

Nos grupos onde houve óleo de fígado de tubarão na suplementação (WFT, WFT+OP e WFT+GC), a relação $CD4^+/CD8^+$ foi significativamente menor que a encontrada para o grupo sem suplementação (W), indicando elevação da marcação $CD8^+$ em relação à marcação $CD4^+$. LEWKOWICZ et al (2005) avaliou as subpopulações $CD4^+$ e $CD8^+$ em linfócitos sangüíneos de voluntários suplementados com altas doses de óleo de fígado de tubarão (correspondendo a 3,6 g de alquilgliceróis/dia), durante 4 semanas. Os pesquisadores não verificaram diferenças entre a relação $CD4^+/CD8^+$ antes e depois da suplementação. Novamente o que poderia explicar parcialmente esta diferença entre linfócitos infiltrados no tumor e periféricos seria o ambiente tumoral e os produtos de secreção das células tumorais.

A gordura saturada, interessantemente, quando suplementada de forma isolada (grupo WGC) provocou grande elevação na relação $CD4^+/CD8^+$. Considerando que este grupo apresentou elevado crescimento tumoral (Figura 8), é possível que isto seja em parte devido ao reduzido número de linfócitos $CD8^+$, e, portanto, reduzida atividade

citotóxica contra as células tumorais. Entretanto, como discutido a seguir, linfócitos das duas subpopulações ($CD4^+$ e $CD8^+$) podem assumir característica regulatória e suprimir a resposta imunitária, favorecendo o crescimento tumoral.

A função da resposta imunitária adaptativa em controlar o crescimento de tumores tem sido controversa. Embora haja estudos indicando que a presença de linfócitos $CD8^+$ infiltrados em tecido tumoral constitui bom prognóstico devido a sua capacidade de reconhecer antígenos tumorais apresentados pelas moléculas MHC classe I e promover a morte de células tumorais, outros estudos mostram o inverso e enfatizam a ação imunossupressora destes linfócitos. SHARMA et al (2007) estudaram o infiltrado linfocitário de carcinoma urotelial humano, mais especificamente a presença de linfócitos $CD8^+$, e correlacionaram os achados com dados clínicos. Os resultados mostraram que pacientes com maior número de linfócitos $CD8^+$ infiltrados no tumor apresentaram maior tempo de sobrevida que pacientes em mesmo estágio de desenvolvimento tumoral com menor número de linfócitos $CD8^+$. Da mesma forma, SATO et al (2005), avaliou que quanto maior a relação linfócito $CD8^+$/linfócito $CD4^+CD25^+$ (linfócito T reg) em infiltrado tumoral, melhor foi o prognóstico e maior foi a sobrevida do paciente. Por outro lado, HERNBERG et al (2004) relataram que o aumento da razão entre linfócitos $CD4^+/CD8^+$ no infiltrado tumoral de melanomas humanos foi relacionado com aumento de sobrevida dos pacientes submetidos à radioterapia, sugerindo que linfócitos $CD8^+$ atuam como importantes agentes imunossupressores e promotores de crescimento tumoral. De fato, a relação entre o sistema imune e as células tumorais é dinâmica. A vigilância imunitária pode controlar ou eliminar algumas lesões pré-malignas e tumores em suas fases iniciais. No entanto, com o tempo, células tumorais sob pressão seletiva do sistema imunológico podem sofrer um processo referido como *immune editing*, tornam-se resistentes às primeiras linhas de defesa e desenvolvem um fenótipo capaz de manipular células imunitárias através da secreção de citocinas e quimiocinas. Células tumorais são capazes de produzir IL-10 e TGF-β, moléculas que induzem tolerância imunitária, por estimular a proliferação de linfócitos T regulatórios (MANTOVANI et al, 2008). Linfócitos T regulatórios podem ser das subpopulações $CD4^+$ e $CD8^+$ e até mesmo células NK, e são importantes para evitar resposta demasiadamente forte do sistema imunitário contra um antígeno, a ponto de provocar injúrias em células normais, e para impedir o desenvolvimento de doenças auto-imunes (JIANG & CHESS, 2004). No entanto,

células regulatórias infiltradas em tecido tumoral impedem a formação de resposta imune aguda capaz de debelar o tumor.

Segundo MANTOVANI et al (2008), ao contrário de uma infecção aguda viral, na qual linfócitos $CD8^+$ são ativados por estimulação antigênica e inflamação aguda se forma, tumores podem não fornecer suficiente co-estimulação para a ativação linfocitária. Isso explicaria por que linfócitos T específicos para antígeno tumoral co-existem com células tumorais, sem promover resposta aguda.

Diante destes fatos, a presença de maior proporção de linfócitos $CD8^+$ em tumores de animais suplementados com óleo de fígado de tubarão, de forma isolada ou em conjunto com outra gordura (grupos WFT, WFT+OP e WFT+GC), pode ter contribuído para supressão de resposta imunitária aguda, e com isso, impedido redução ainda maior no crescimento dos tumores destes grupos.

6. CONCLUSÃO

Neste estudo concluímos que:

Quanto ao crescimento tumoral e caquexia:

- a suplementação conjunta crônica com óleo de fígado de tubarão e óleo de peixe não propiciou efeito aditivo na redução do crescimento tumoral e da caquexia, possivelmente pela competição entre ácidos graxos ω-3 e alquilgliceróis pela incorporação nas membranas celulares;
- óleo de fígado de tubarão suplementado isoladamente apresentou ação protetora para crescimento tumoral, porém inferior à do óleo de peixe.
- óleo de fígado de tubarão suplementado isoladamente apresentou ação protetora para caquexia, assim como o óleo de peixe.

Quanto aos parâmetros imunitários:

- as diferentes suplementações exerceram diferentes efeitos sobre a proliferação linfocitária dos três órgãos linfóides analisados;
- óleo de fígado de tubarão suplementado isoladamente foi capaz de aumentar a capacidade proliferativa *ex vivo* de linfócitos de órgãos linfóides periféricos de animais portadores de tumor, e de reduzir a razão $CD4^+/CD8^+$ de linfócitos infiltrados no tumor;
- a ação do óleo de fígado de tubarão sobre proliferação linfocitária e sobre a razão entre linfócitos $CD4^+/CD8^+$ de animais com tumor prevaleceu quando óleo de fígado de tubarão e óleo de peixe foram associados.

O esquema abaixo resume as conclusões obtidas: (comparação com o grupo portador de tumor alimentado com dieta padrão – W)

SUPLEMENTAÇÕES	CAQUEXIA	CRESCIMENTO TUMORAL	PROLIFERAÇÃO LINFOCITÁRIA (órgãos linfóides) E LINFÓCITOS CD8+ (infiltrados no tumor)
Óleo de fígado de tubarão	↓	↓	↑↑
Óleo de peixe	↓	↓↓	Menor ou igual
Óleo de fígado de tubarão + óleo de peixe	↓	↓↓	↑↑

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUSHUFA, R.; REED, P.; WEINKOVE, C.; Fatty acids erythrocytes measured by isocratic HPLC. **Clin Chem**, v. 40, n. 9, p. 1707-1712, 1994.

ACEVEDO, R.; GIL, D.; CAMPO, J.; BRACHO, G.; VALDÉS, Y.; PÉREZ, O. The adjuvant potential of synthetic alkylglycerols. **Vaccine**, v. 24S2, p. S2/32-S2/33, 2006.

ANDRIAN, U.H.; MEMPEL, T.R. Homing and cellular traffic in lymph nodes. **Nature Reviews**, v. 3, p. 867-878, 2003.

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

ARGILÉS, J.M.; BUSQUETS, S.; GARCÍA-MARTINEZ, C.; LÓPEZ-SORIANO, F.J. Mediators involved in the câncer anorexia-cachexia syndrome: past, present and future. **Nutrition**, v. 21, p. 977-985, 2005.

ARGILÉS, J.M.; LÓPEZ-SORIANO, F.J.; BUSQUETS, S. Novel approaches to the treatment of cachexia. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 1/2, p. 73-78, 2008.

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

BARBER, M.D.; FEARON, K.C.; TISDALE, M.J.; McMILLAN, D.C.; ROSS, J.A . Effect of a fish oil-enriched nutritional supplement on metabolic mediators in patients with pancreatic cancer cachexia. **Nutr. Cancer**, v. 40, n. 2, p. 118-124, 2001.

BARBER, M.D.; FEARON, K.C.; ROSS, J.A. Eicosapentaenoic acid modulates the immune response but has no effect on a mimic of antigen-specific responses. **Nutrition**, v. 21, n. 5, p. 588-593, 2005.

BEN-BARUCH, A. Inflammation-associated immune suppression in cancer: The roles played by cytokines, chemokines and additional mediators. **Seminars in Cancer Biology**, v. 16, p. 38-52, 2006.

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

BERRIDGE, M.J. Lymphocyte activation in health and disease. **Critical Reviews in Immunology**, v. 17, p. 155-178, 1997.

BEYER, R.S.; JENSEN, L.S. Overestimation of the cholesterol content of eggs. **J Agric Food Chem**, v. 39, p. 917-920, 1989.

BHARGAVA, P.; MARSHALL, J.L.; DAHUT, W.; RIZVI, N.; TROCKY, N.; WILLIAMS, J.I.; HAIT, H.; SONG, S.; HOLROYD, K.J.; HAWKINS, M.J. A phase I and pharmacokinetic study of squalamine, a novel antiangiogenic agent, in patients with advanced cancers. **Clinical Cancer Research**, v. 7, p. 3912-3919, 2001.

BLANK, M.L.; CRESS, E.A.; SMITH, Z.L.; SNYDER, F. Dietary supplementation with ether-linked lipids and tissue lipid composition. **Lipids**, v. 26, p. 166-169, 1991.

BOERYD, B.; NILSSON, T.; LINDHOLM, L.; LANGE, S.; HALLGREN, B.; STÄLLBERG, G. Stimulation of immune reactivity by methoxy-substituted glycerol ethers incorporated into the feed. **Eur J Immunol**, v. 8, p. 678-680, 1978.

BORDIER, C.G.; SELLIER, N.; FOUCAULT, A.P.; GOFFIC, F.L. Purification and characterization of deep sea shark Centrophorus squamosus liver oil 1-O-alkylglycerol ether lipids. **Lipids**, v. 31, n. 5, p. 521-528, 1996.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities utilizing the principle of protein dye binding. **Anal Biochem**. n.142, p.79 – 83, 1976.

BRASSARD, P.; LARBI, A.; GRENIER, A.; FRISCH, F.; FORTIN, C.; CARPENTIER, A.C.; FÜLÖP, T. Modulation of T-cell signaling by non-esterified fatty acids. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essencial Fatty Acids**, v. 77, p. 337-343, 2007.

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

BROHULT, A.; BROHULT, J.; BROHULT, S. Biochemical effects of alcoxyglycerols and their use in cancer terapy. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 24, p. 730-732, 1970.

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.

BROHULT, A.; BROHULT, J.; BROHULT, S. Regression of tumour growth after administration of alkoxyglycerols. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v.57, p. 79-83, 1978.

BROHULT, A.; BROHULT, J.; BROHULT, S. JOELSSON, I. Alkoxyglycerols in cell membranes stop tumor growth? **3rd International Conference on Surface and Colloid Science**, Stockholm, August, 1979.

BROHULT, A.; BROHULT, J.; BROHULT, S. JOELSSON, I. Reduced mortality in cancer patients after administration of alcoxyglycerols. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 65, p. 779-785, 1986.

BURNS, C.P.; HALABI, S.; CLAMON, G.; KAPLAN, E.; HOHL, R.J.; ATKINS, J.N.; SCHWARTZ, M.A.; WAGNER, B.A.; PASKETT, E. Phase II study of high-dose fish oil capsules for patients with cancer-related cachexia. **Cancer**, v. 101, n. 2, p. 370-378, 2004.

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

CALDER, P.C. The effect of dietary fatty acids on the immune response and susceptibility to infection. In: SUSKIND, R.M.; TONTISIRIN, K. (editors). **Nutrition, Immunity and Infection in Infants and Children**. Philadelphia, 2001a, p.137-162.

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

CALDER, P.C.; YAQOOB, P.; THIES, F.; WALLACE, F.A.; MILES, E.A. Fatty acids and lymphocyte functions. **British Journal of Nutrition**, v. 87, p. S31-S48, 2002.

CALDER, P.C. N-3 fatty acids, inflammation, and immunity – relevance to postsurgical and critically ill patients. **Lipids**, v. 39, n. 12, p. 1147-1161, 2004.

CALDER, P.C. Immunomodulation by omega-3 fatty acids. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essencial Fatty Acids**, v. 77, p. 327-335, 2007.

CARBALLEIRA, N.M. New advances in the chemistry of methoxylated lipids. **Progress in Lipid Research**, v. 41, p. 437-456, 2002.

CHEN, Z.Y.; ISTFAN, N.W. Docosahexaenoic acid is a potent inducer of apoptosis in HT-29 colon cancer cells. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 63, n. 5, p. 301-308, 2000.

CHENG, J.; OGAWA, K.; KURIKI, K.; YOKOYAMA, Y.; KAMYIA, T.; SENO, K.; OKUYAMA, H.; WANG, J.; LUO, C.; FUJII, T.; ICHIKAWA, H. SHIRAI, T.; TOKUDOME, S. Increased intake of n-3 polyunsaturated fatty acids elevates the level of apoptosis in the normal sigmoid colon of patients polypectomized for adenomas/tumors. **Cancer Letters**, v. 193, p. 17-24, 2003.

CHO J.; KIM Y. Sharks: a potential source of antiangiogenic factors and tumor treatments. **Mar Biotechnol (NY)**. v. 4, n. 6, p. 521-5, 2002.

COLQUHOUN, A.; SCHUMACHER, R.I. γ-linolenic acid and eicosapentaenoic acid induce modifications in mitochondrial metabolism, reactive oxygen species generation, lipidperoxidation and apoptosis in Walker 256 rat carcinosarcoma cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1533, p. 207-219, 2001.

CONESA-ZAMORA, P.; MOLLINEDO, F.; CORBALÁN-GARCÍA, S.; GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J.C. A comparative study of the effect of the antineoplastic ether lipid 1-O-octadecyl-2-Omethyl-glycero-3-phosphocholine and some homologous compounds on PKCα and PKCε. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1686, p.110-119, 2005.

DAVIDSON, B.; CLIFF, G. The liver lipid fatty acid profiles of seven Indian Ocean shark species. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 26, p. 171-175, 2002.

DONALDSON, M.S. Nutrition and cancer: a review of the evidence for an anti-cancer diet. **Nutrition Journal**, v. 3, n. 19, 2004.

DOMMELS, Y.E.M.; ALINK, G.M.; BLADEREN, P.J.; OMMEN, B. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids and colorectal carcinogenesis: results from cultured colon cells, animal models and human studies. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 12, p. 233-244, 2002.

DUIJSINGS, D.; HOUWELING, M.; VAANDRAGER, A.B.; MOL. J.A.; TEERDS, K.J. Hexadecylphosphocoline causes rapid cell death in canine mammary tumour cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 502, p. 185-193, 2004.

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

EBBESSON, S.O.E.; RISICA, P.M.; EBBESSON, L.O.E.; KENNISH, J.M.; TEJERO, M.E. Omega-3 fatty acids improve glucose tolerance and components of the metabolic syndrome in Alaskan Eskimos: The Alaska Siberia Project. **International Journal of Circumpolar Health**, v. 64, n. 4, p.396-408, 2005.

ENGLE, P.C.; JONES, J.B. **Analytical Biochemistry**, v. 88, p. 475-484, 1978.

FINK S.L.; COOKSON, B.T. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 4, p. 1907-1916, 2005.

FOLADOR, A.; HIRABARA, S.M.; BONATTO, S.J.R.; AIKAWA, J.; YAMAZAKI, R.K.; CURI, R.; FERNANDES, L.C. Effect of fish oil supplementation for 2 generations on changes in macrophage function induced by Walker 256 cancer cachexia in rats. **Int J. Cancer**, v. 120, p. 344-350, 2006.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for isolation

and purification of total lipid from animal tissue. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, p. 497-509, 1957.

FOX, S.B.; GASPARINI, G.; HARRIS, A.L. Angiogenesis: pathological, prognostic, and growth-factor pathways and their link to Trial design and anticancer drugs. **The Lancet Oncolology**, v. 2, p. 278-289, 2001.

GARCÍA, E.; GUTIÉRREZ, S.; NOLASCO, H.; CARREÓN, L.; ARJONA, O. Lipid composition of shark liver oil: effects of emulsifying and microencapsulation processes. **Eur Food Res Technol**, v. 222, p. 697-701, 2006.

GIACOSA, A.; RONDANELLI, M. Fish oil and treatment of cancer caquexia. **Genes Nutr**, v. 3, p. 25-28, 2008

Global cancer facts & figures 2007. American Cancer Society, Atlanta, Georgia.

GOODSTINE, S.L.; ZHENG, T.; HOLFORD, T.R.; WARD, B.A.; CARTER, D.; OWENS, P.H.; MAYNE, S.T. Dietary (n-3)/(n-6) fatty acid ratio: possible relationship to premenopausal but not postmenopausal breast cancer risk in U.S. women. **J Nutr**., v. 133, n. 5, p. 1409-1414, 2003.

GRIMBLE, R.F. Dietary lipids and the inflammatory response. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 57, p. 535-542, 1998.

GRIMBLE, R.F. Nutritional therapy for cancer cachexia. **Gut**, v. 52, p. 1391-1392, 2003.

GRINER, E.M.; KAZANIETZ, M.G. Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, p. 281-294, 2007.

GROSMAN, N. Similar effects of ether phospholipids, PAF and lyso-PAF on the Ca+2-ATPase activity of rat brain synaptosomes and leucocyte membranes. **International Immunopharmacology**, v. 1, p. 1321-1329, 2001.

HALLGREN, B.; LARSSON, S. The glyceryl ethers in the liver oils of elasmobranch fish. **Journal of Lipid Research**, v. 3, n. 1, p. 31-38, 1962.

HALLGREN, B.; STÄLLBERG, G.; BOERYD, B. Occurrence synthesis and biological effects of substituted glycerol ethers. **Prog Chem Fats Other Lipids**, v. 16, p. 45-58, 1978.

HAO, D.; HAMMOND, L.A.; ECKHARDT, S.G.; PATNAIK, A.; TAKIMOTO, C.H.; SCHWARTZ, G.H.; GOETZ, A.D.; TOLCHER, A.W.; McCREERY, H.A.; MAMUN, K.; WILLIAMS, J.I.; HOLROYD, K.J.; ROWINSKY, E.K. A phase I and pharmacokinetics

study of squalamine, an aminosterol angiogenesis inhibitor. **Clinical Cancer Research**, v. 9, p. 2465-2471, 2003.

HARDMAN, W.E.; MUNOZ JR, J.; CAMERON, I.L. Role of lipid peroxidation and antioxidant enzymes in omega 3 fatty acids induced suppression of breast cancer xenograft growth in mice. **Cancer Cell International**, v. 2, n. 10, 2002.

HECZKOVÁ, B.; SLOTTE, J.P. Effect of anti-tumor ether lipids on ordered domains in model membranes. **FEBS Letters**, v. 580, p. 2471-2476, 2006.

HERING, J.; GARREAN, S.; DEKOJ, T.R.; RAZZAK, A.; SAIED, A.; TREVINO, J.; BABCOCK, T.A.; ESPAT, N.J. Inhibition of proliferation by omega-3 fatty acids in chemoresistent pancreatic cells. **Annals of Surgical Oncology**, v. 14, n. 12, p. 3620-3628, 2007.

HERNBERG, M.M.; HAHKA-KEMPPINEN, M.H.; PYRHONEN, S.O. The prognostic role of CD4+ and CD8+ lymphocytes during chemoimmunotherapy in metastatic melanoma. Melanoma Research, v. 14, n. 6, p. 493-500, 2004.

HERRMANN, D.B.L.; NEUMANN, H.A. Cytotoxic ether phospholipids. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 17, p. 7742-7747, 1986.

HERNBERG, M.M.; HAHKA-KEMPPINEN, M.H.; PYRHONEN, S.O.; SEPPO, O.B. The prognostic role of CD4+ and CD8+ lymphocytes during chemoimmunotherapy in metastatic melanoma. **Melanoma Research**, v. 14, n. 6, p.493-500, 2004.

HEYMANS, F.; DA SILVA, C.; MARREC, N.; GODFROID, J.J.; CASTAGNA, M. Alkyl analogs of diacylglycerol as activators of protein kinase C. **FEBS Letters**, v. 218, n. 1, p. 35-40, 1987.

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.

INCA – Instituto Nacional do Câncer

JAYASINGHE, C.; GOTOH, N.; WADA, S. Variation in lipid classes and fatty acid composition of salmon shark (Lamna ditropis) liver with season and gender. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 134, p. 287-295, 2003.

JEFFERY, N.M.; SANDERSON, P.; NEWSHOLME, E.A.; CALDER, P.C. Characteristics of lipid and lymphocytes collected from lymph of rats fed a low fat diet or high fat diets rich in n-6 or n-3 polyunsaturated fatty acids. **Nutrition Research**, v.18, n.2, p.299-308, 1998.

KOBAYASHI, N.; BARNARD, R.J.; HENNING, S.M.; ELASHOFF, D.; REDDY, S.T.; COHEN, P.; LEUNG, P.; HONG-GONZALEZ, J.; FREEDLAND, S.J.; SAID, J.; GUI, D.; SEERAM, N.P.; POPOVICIU, L.M.; BAGGA, D.; HEBER, D.; GLASPY, J.A.; ARONSON, W.J. Effect of altering dietary ω-6/ω-3 fatty acid ratios on prostate cancer membrane composition, cyclooxygenase-2, and prostaglandin E2. **Clin Cancer Res**, v. 12, n. 15, p. 4662-4670, 2006.

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

KROTKIEWSKI, M.; PRZYBYSZEWSKA, M. JANIK, P. Cytostatic and cytotoxic effects of alkylglycerols (Ecomer). **Med Sci Monit**, v. 9, n. 11, p. 131-135, 2003.

KURAKTO, C.N. Proliferation of colonic lymphocytes in response to inflammatory cytokines is lower in mice fed fish oil than in mice fed corn oil. **Cancer Letters**, v. 148, p. 27-32, 2000.

LEWKOWICZ, P.; BANASIK, M.; GLOWACKA, E.; LEWKOWICZ, N.; TCHORZEWSKI, H. Effect of high doses of shark liver oil supplementation on T cell polarization and peripheral blood polymorphonuclear cell function. **Pol Merkuriusz Lek**, v. 18, n. 108, 686-692, 2005.

LEIGHTON, B.; COOPER, G.L.S. **Nature**, v. 335, p. 632-635, 1989.

LEWKOWICZ, N.; LEWKOWICZ, P.; KURNATOWSKA, A.; TCHORZEWSKI, H. Biological action and clinical application of shark liver oil. **Pol Merkuriusz Lek**, v. 20, n. 119, p. 598-601, 2006.

LIM, K.; HAN, C.; XU, L.; ISSE, K.; DEMETRIS, A.J.; WU, T. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E2 activates β-catenin in human cholangiocarcinoma cells: evidence for inhibition of these signalling pathways by ω3 polyunsaturated fatty acids. **Cancer Research**, v. 68, p. 553-560, 2008.

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

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

MA, D.W.L.; SEO, J.; SWITZER, K.C.; FAN, Y.; McMURRAY, D.; LUPTON, J.; CHAPKIN, R.S. n-3 PUFA and membrane microdomains: a new frontier in bioactive lipid research. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 15, p. 700-706, 2004.

MALASANOS, T.H.; STACPOOLE, P.W. Biological effects of Omega-3 fatty acids in diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 14, p.1160-1179, 1991.

MALMBERG, K.J. Effective immunotherapy against cancer – a question of overcoming immune suppression and immune escape? **Cancer Immunol Immunother**, v. 53, p. 879-892, 2004.

MANNA, S.; CHAKRABORTY, T.; GHOSH, B.; CHATTERJEE, M.; PANDA, A.; SRIVASTAVA, S.; RANA, A.; CHATTERJEE, M. Dietary fish oil associated with increased apoptosis and modulated expression of Bax and Bcl-2 during 7,12-dimethylbenz(α)anthracene-induced mammary carcinogenesis in rats. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 79, n. 1-2, p. 5-14, 2008.

MANTOVANI, A.; ROMERO, P.; PALUCKA, A.K.; MARINCOLA, F.M. Tumour immunity: effector response to tumour and role of the microenvironment. **The Lancet**, v. 371, p. 771-783, 2008.

MARIGNY, K.; PEDRONO, F.; MARTIN-CHOULY, C.A.E.; YOUMINE, H.; SAIAG, B.; LEGRAND, A.B. Modulation of endothelial permeability by 1-O-alkylglycerols. **Acta Phsiologica Scandinavica**, v. 176, n. 4, p. 263, 2002.

MARTIGNONI, M.E.; KUNZE, P.; FRIESS, H. Cancer cachexia. **Molecular Cancer**, v. 2, n. 36, 2003.

MARTINS DE LIMA, T.; GORJÃO, R.; HATANAKA, E.; CURY-BOAVENTURA, M.F.; PORTIOLI SILVA, E.P.; PROCÓPIO, J.; CURI, R. Mechanisms by which fatty acids regulate leucocyte function. **Clinical Science**, v. 133, p. 65-77, 2007.

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

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

MEBIUS, R.E.; KRAAL, G. Structure and function of the spleen. **Nature Reviews**, v. 5, p. 606-616, 2005.

MITRE, R.; CHEMINADE, C.; ALLAUME, P.; LEGRAND, P.;LEGRAND, A.B. Oral intake of shark liver oil modifies lipid composition and improves motility and velocity of boar sperm. **Theriogenology**, v. 62, p. 1557-1566, 2004.

MITRE, R.; ETIENNE, M.; MARTINAIS, S.; SALMOS, H.; ALLAUME, P.; LEGRAND, P.; LEGRAND, A.B. Humoral defence improvement and haematopoiesis stimulation in

sows and offspring by oral supply of shark liver oil to mothers during gestation and lactation. **British Journal of Nutrition**, v. 94, p. 753-762, 2005.

MORLEY, J.E.; THOMAS, D.R.;WILSON, M.M.G. Cachexia: pathophysiology and clinical relevance. **Am J Clin Nutr**, v. 83, p. 735-743, 2006.

MUND, R.C.; PIZATO, N.; BONATTO, S.; NUNES, E.A.; VICENZI, T.; TANHOFFER, R.; OLIVEIRA, H.H.P.; CURI, R.; CALDER, P.C.; FERNANDES, L.C. Decreased tumor growth in Walker 256 tumor-bearing rats chronically supplemented with fish oil involves COX-2 and PGE2 reduction associated with apoptosis and increased peroxidation. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 76, p. 113-120, 2007.

NAVARRO-GARCIA, G.; PACHECO-AGUILAR, R.; VALLEJO-CORDOVA, B.; RAMIREZ-SUAREZ J. C.; BOLAÑOS A. Lipid composition of the liver oil of shark species from the Caribbean and Gulf of California waters. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 13, n. 5, p. 791-798, 2000.

NEURINGER, M.; ANDERSON, G.J.; CONNOR, W.E. The essentiality of n-3 fatty acids for the development and function of the retina and brain. **Annu Rev Nutr**, v. 8, p. 517-541, 1988.

NGWENYA, B.Z.; FOSTER, D.M. Enhancement of antibody production by lysophosphatidylcholine and alkylglycerol. Lipid **Metabolites and Antibody Enhancement**, v. 196, p. 69-75, 1991.

NISHIYAMA-NARUKE, A.; SOUZA, J.A.; CARNEL, M.; CURI, R. HPLC determination of underivatized fatty acids saponified at 37°C –analysis of fatty acids in oils and tissues. **Analytical Letters**, v. 31, n. 14, p. 2565-2576, 1998.

NOUROOZ-ZADEH, J.; TAJADDINI-SARMADI, J.; WOLFF, S.P. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine. **Anal Biochem**. n.220, p.403–09, 1994.

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, H.H.P. Cultivo de células ascíticas do tumor de Walker 256 na presença de óleo de peixe-BSA complexado : efeitos sobre proliferação e morte celular e seus mecanismos de ação. Tese de Mestrado , 2006.

PABLO, M.A.; PUERTOLLANO, M.A.; CIENFUEGOS, G.A. Immune cell function, lipids and host natural resistance. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 29, p. 323-328, 2000.

PALMBLAD, J.; SAMUELSSON, J.; BROHULT, J. Interactions between alkylglycerols and human neutrophil granulocytes. **Scand J Clin Lab Invest**, v. 50, p. 363-370, 1990.

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

PÉDRONO, F.; KHAN, N.A.; LEGRAND, A.B. Regulation of calcium signalling by 1-O-alkylglycerols in human Jurkat T lymphocytes. **Life Sciences**, v. 74, p. 2793-2801, 2004b.

PEDRONO, F.; MARTIN, B.; LEDUC, C.; LE LAN, J.; SAIAG, B.; LEGRAND, P.; MOULINOUX, J.P.; LEGRAND, A.B. Natural alkylglycerols restrain growth and metastasis of grafted tumors in mice. **Nutrition and Cancer**, v. 48, n. 1, p. 64-69, 2004c.

PÉDRONO, F.; SAÏAG, B.; MOULINOUX, J.P.; LEGRAND, A.B. 1-O-alkylglycerols reduce the stimulating effects of bFGF on endothelial cell proliferation in vitro. **Cancer letters**, v. 251, n. 2, p. 317-322, 2007.

PIETRAS, R.J.; WEINBERG, O.K. Antiangiogenic steroids in human cancer therapy. **eCAM**, v. 2, n. 1, p. 49-57, 2005.

PINCHUK, A.N.; RAMPY, M.A.; LONGINO, M.A.; SKINNER, R.W.S.; GROSS, M.D.; WEICHERT, J.P.; COUNSELL, R.E. Synthesis and structure-activity relationship effects on the tumor avidity of radioiodinated phosphopilid ether analogues. **J Med Chem**, v. 49, p. 2155-2165, 2006.

PINTO Jr, J.A.; FOLADOR, A.; BONATTO, S.J.; AIKAWA, J.; YAMAZAKI, R.K.; PIZATO, N.; FACIN, M.; GROHS, H.; OLIVEIRA, H.H.P.; NALIWAIKO, K.; FERRAZ, A.C.; NISHIYAMA, A.; FERNANDEZ, R.; CURI, R.; FERNANDES, L.C. Fish oil supplementation in F1 generation associated with naproxen, clenbuterol, and insulin administration reduce tumor growth and cachexia in Walker 256 tumor-bearing rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 15, p. 358-365, 2004.

PIZATO, N.; BONATTO, S.; YAMAZAKI, R.K.; AIKAWA, J.; NOGATA, C.; MUND, R.C.; NUNES, E.A.; PICONCELLI, M.; NALIWAIKO, K.; CURI, R.; CALDER, P.C.; FERNANDES, L.C. Ratio of n-6 to n-3 fatty acids in the diet affects tumor growth and cachexia in Walker 256 tumor-bearing rats. **Nutrition and Cancer**, v. 53, n. 2, p. 194-201, 2005.

PIZATO, N.; BONATTO, S.; PICONCELLI, M.; SOUZA, L.M.; SASSAKI, G.L.; NALIWAIKO, K.; NUNES, E.A.; CURI, R.; CALDER, P.C.; FERNANDES, L.C. Fish oil

alters T-lymphocyte proliferation and macrophage responses in Walker 256 tumor-bearing rats. **Nutrition**, v. 22, p. 425-432, 2006.

PRESCOTT, S.M.; STENSON, W.F. Fish oil fix. **Nature Medicine**, v. 11, n. 6, p. 596-598, 2005.

PUGLIESE, P.T.; JORDAN, K.; CEDERBERG, H.; BROHULT, J. Some biological actions of alkylglycerols from shark liver oil. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 4, n. 1, p. 87-99, 1998.

RAKOTOMANGA, M.; LOISEAU, P.M.; SAINT-PIERRE-CHAZALET, M. Hexadecylphosphocholine interaction with lipid monolayers. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1661, p. 212-218, 2004.

RAO C.V.; HIROSE, Y.; INDRANIE, C.; REDDY, B.S. Modulation of experimental colon tumorigenesis by types and amounts of dietary fatty acids. **Cancer Research**, v. 61, p. 1927-1933, 2001.

RAMOS, E.J.; MIDDLETON, F.A.; LAVIANO, A.; SATO, T.; ROMANOV, I.; DAS, U.N.; CHEN, C.; QI, Y.; MEGUID, M.M. Effects of Omega-3 fatty acid suplementation on tumor-bearing rats. **J Am Coll Surg**, v. 199, n. 5, p. 716-723, 2004.

READ, J.A.; BEALE, P.J.; VOLKER, D.H.; SMITH, N.; CHILDS, A.; CLARKE, S.J. Nutrition intervention using an eicosapentaenoic acid (EPA)-containing supplement in patients with advanced colorectal cancer. Effects on nutrition and inflammatory status: a phase II trial. **Supportive Care in Cancer**, v. 15, n. 3, p. 301-307, 2007.

REED, J.C. Mechanisms of apoptosis. **American Journal of Pathology**, v. 157, n. 5, p. 1415-1430, 2000.

REICHWALD, I,; MANGOLD, H.K. Assessment of the specificity of enzymatic reactions using mixed substrates: incorporation of alkylglycerols in the ionic alkoxylipids of rat intestinal mucosa. **Nutr. Metab.**, v. 21, p. 198-201, 1977.

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.

ROBINSON, M.; BURDINE, R.; WARNE, T.R. Inhibition of phorbol ester-stimulating arachidonic acid release by alkylglycerols. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1254, p. 361-367, 1995.

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

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

SAIFY, Z.S.; AKHTAR, S.; KHAN, K.M.; PERVEEN, S.; AYATTOLLAHI, S.A.M.; HASSAN, S.; ARIF, M.; HAIDER, S.M.; AHMAD, F.; SIDDIQUI, S.; KHAN, M.Z. A study on the fatty acid composition os fish liver oil from two marine fish, *Eusphyra blochii* and *Carcharhinus bleekeri*. **Turk J Chem**, v. 27, p. 251-258, 2003.

SANDEN, M.H.M.; HOUWELING, M.; DUIJSINGS, D.; VAANDRAGER, A.B.; GOLDE, L.M.G. Inhibition of phosphatidylcholine synthesis is not the primary pathway in hexadecylphosphocoline-induced apoptosis. **Biochimica & Biophysica Acta**, v. 1636, p. 99-107, 2004.

SASSAKI, G.L.; SOUZA, L.M.; SERRATO, R.V.; CIPRIANI, T.R.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Application of acetate derivatives for gas chromatography-mass spectrometry: Novel approaches on carbohydrates, lipids and amino acids analysis. **Journal of Chromatography**, v. 1208, p. 215-222, 2008.

SASSAKI, G.L.; MACHADO, M.J.; TISCHER, C.A.; GORIN P.A.J.; IACOMINI. M. Glycosyldiacylglycerolipids from the Lichen Dictyonema glabratum **J. Nat. Prod.**, v. 62, n. 6, p. 844-847, 1999.

SATO, E.; OLSON, S.H.; AHN, J.; BUNDY,B.; NISHIKAWA, H.; QIAN, F.; JUNGBLUTH, A.A.; FROSINA, D.; GNJATIC, S.; AMBROSONE, C.; KEPNER, J.; ODUNSI, T.; RITTER, G.; LELE, S.; CHEN, Y.T.; OHTANI, H.; OLD, L.J.; ODUNSI, K. Intraepithelial $CD8^+$ tumor-infiltrating lymphocytes and a high $CD8^+$/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. **PNAS** v. 102, n. 51, p. 18538-18543., 2005.

SCHEINICHEN, D. JANKOWSKI, M.; RUSCHULTE, H.; JÜTTNER, B.; KLEINE, H.D.; MEYER ZU VILSENDORF, A. PIEPENBROCK, S.; HEINE, J. Lack of influence of ω-3 fatty acid-enriched lipids on apoptosis and secondary necrosis of cultured human lymphocytes. **Nutrition**, v. 19, p. 441-445, 2003.

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.

SHARMA, P.; SHEN, Y.; WEN, S.; YAMADA, S.; JUNGBLUTH, A.A.; GNJATIC, S.; BAJORIN, D.F.; REUTER, V.E.; HERR, H.; OLD, L.J.; SATO, E.CD8 tumor-infiltrating lymphocytes are predictive of survival in muscle-invasive urothelial carcinoma. **PNAS**, v. 104, n. 10, p. 3967–3972, 2007.

SHU, Y.; JONES, S.R.; KINNEY, W.A.; SELINSKY, B.S. The syntesis of spermine analogs of the shark aminosterol squalamine. **Steroids**, v. 67, p. 291-304, 2002.

SIDHU, K. S. Health benefits and potencial risks related to comsunption of fish or fish oil. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.38, p.336-344, 2003.

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.

SIMOPOULOS, A.P. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. **Am J Clin Nutr**, v. 54, p. 438-463, 1991.

SIMOPOULOS, A.P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. **Biomed Pharmacother**, v. 56, p. 365-379, 2002.

SIMOPOULUS, A.P. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 21, n. 6, p. 495-505, 2002b.

SINGER, P.; SHAPIRO, H.; THEILLA, M. ANBAR, R.; SINGER, J.; COHEN, J. Anti-inflammatory properties of omega-3 fatty acids in critical illness: novel mechanisms and an integrative perspective. **Intensive Care Med.**, v. 34, n. 9, p. 1580-1592, 2008.

SITKOVSKY, M.V.; PASTERNACK, M.S.; LUGO, J.P.; KLEIN, J.R.; EISEN, H.N. Isolation and partial characterization of concanavalin A receptors on cloned cytotoxic T lymphocytes. **PNAS**, v. 81, n. 5, p. 1519-1523, 1984.

SKOPINSKA-ROZEWSKA E.; KROTKIEWSKI M.; SOMMER E.; ROGALA E.; FILEWSKA M.; BIALAS-CHROMIEC B.; PASTEWKA K.; SKURZAK H. Inhibitory effect of shark liver oil on cutaneous angiogenesis induced in Balb/c mice by syngeneic sarcoma L-1, human urinary bladder and human kidney tumour cells. **Oncol Rep**. v. 6, n. 6, p. 1341-1344, 1999.

SOUZA, L.M.; IACOMINI, M.; GORIN, P.A.J.; SARI, R.S.; HADDAD, M.A.; SASSAKI, G.L. Glyco- and sphingophosphonolipids from the medusa *Phyllorhiza punctata*: NMR and ESI-MS/MS fingerprints. **Chem and Phys of Lipids**, v. 145, n. 2, p. 85-96, 2007.

SZOSTAK, W.B.; SZOSTAK-WEGIEREK, D. Health properties of shark oil. **Przegl Lek**, v. 63, n. 4, p. 223-226, 2006.

SWANN, J.B.; SMYTH, M.J. Immune surveillance of tumors. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 5, p. 1137-1146, 2007.
TAKAHAMA, Y. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. **Nature Reviews**, v. 6, p. 127-135, 2006.

TAN, C.; DLUGOSZ, P.J.; PENG, J.; ZHANG, Z.; LAPOLLA, S.M.; PLAFKER, S.M.; ANDREWS, D.W.; LIN, J. Auto-activation of the apoptosis protein Bax increases mitochondrial membrane permeability and is inhibited by Bcl-2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 21, p. 14764-14775, 2006.

TAN, T.T.; COUSSENS, L.M. Humoral immunity, inflammation and cancer. **Current Opinion in Immunology**, v. 19, p. 209-216, 2007.

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

TAVANI, A.; PELUCCHI, C.; PARPINEL, M.; NEGRI, E.; FRANCESCHI, S.; LEVI, F.; LA VECCHIA, C. n-3 polyunsaturated fatty acid intake and cancer risk in Italy and Switzerland. **Int. J. Cancer**, v. 105, p. 113-116, 2003.

TEICHER, B.A.; WILLIAMS, J.I.; TAKEUCHI, H.; ARA, G.; HERBST, R.S.; BUXTON, D. Potential of the aminosterol, squalamine in combination therapy in the rat 13762 mammary carcinoma and the murine Lewis lung carcinoma. **Anticancer Res**, v. 18, n. 4A, p. 2567-2573, 1998.

THEODORATOU, E.; McNEILL, G.; CETNARSKYJ, R.; FARRINGTON, S.M.; TENESA, A.; BARNETSON, R.; PORTEOUS,M.; DUNLOP, M.; CAMPBELL, H. Dietary fatty acids and colorectal cancer: a case-control study. **American Journal of Epidemiology**, v. 166, n. 2, p. 181-195, 2007.

TISDALE, M.J. Inhibition of lipolysis and muscle protein degradation by EPA in cancer cachexia. Supplement to **Nutrition**, v. 12, n. 1, p. S31-S33, 1996.

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

TISDALE, M.J. Pathogenesis of cancer cachexia. **J Support Oncol**, v. 1, n. 3, p. 159-168, 2003.

TISDALE, M.J. Molecular pathways leading to cancer cachexia. **Physiology**, v. 20, p. 340-348, 2005.

TOGNI, V.; OTA, C.C.C.; FOLADOR, A.; TCHAIKOVSKI JÚNIOR, O.; AIKAWA, J.; YAMAZAKI, R.K.; FREITAS, F.A; LONGO, R.; MARTINS, E.F.; CALDER, P.C.; CURI, R.; FERNANDES, L.C. Cancer caquexia and tumor growth reduction in walker 256 tumor-bearing rats supplemented with n-3 polyunsaturated fatty acids for one generation. **Nutrition and Cancer**, v. 46, n. 1, p. 52-58, 2003.

TOWBIN, H.; STAEHELIN, J.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets – procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

UNGER, C.; EIBL, H.; KIM, D.J.; FLEER, E.A.; KÖTTING, J.; BARTSCH, H.H.; NAGEL, G.A.; PFIZENMAIER, K. Sensitivity of leukemia cell lines to cytotoxic alkyl-lysophospholipids in relation to O-alkyl cleavage enzyme activities. **JNCI**, v. 78, n. 2, p.219-222, 1987.

VAN NOORDEN, C.J.F.; MEADE-TOLLIN, L.C.; BOSMAN, F.T. Metastasis. **American Scientist**, v. 86, p. 130-141, 1998.

VISSER, K.E.; EICHTEN, A.; COUSSENS, L.M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. **Nature**, v. 6, p. 24-37, 2006.

YAM, D.; PELED, A.; SHINITZKY, M. Suppression of tumor growth and metastasis by dietary fish oil combined with vitamins E and C and cisplatin. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 47, n. 1, p. 34-40, 2001.

YAMAMOTO, N.; NGWENYA, B.Z. Activation of mouse peritoneal macrophages by lisophospholipids and ether derivatives of neutral lipids and phospholipids. **Cancer Research**, v. 47, n. 15, p. 2008-2013, 1987.

YIN, H.; BROOKS, J.D.; GAO, L.; PORTER, N.A.; MORROW, J.D. Identification of novel autoxidation products of the ω-3 fatty acid eicosapentaenoic acid in vitro and in vivo. **J Biol Chem**, v. 282, n. 41, p. 29890-29901, 2007.

ZITVOGEL, L.; TESNIERE, A.; KROEMER, G. Cancer despite immunosuveillance: immunoselection and immunosubversion. **Nature Reviews**, v. 6, p. 715-727, 2006.

WANG, H.; RAJAGOPAL, S.; REYNOLDS, S.; CEDERBERG, H.; CHAKRABARTY, S. Differentiation-promoting effect of 1-O (2 methoxy) hexadecyl glycerol in human colon cancer cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 178, p. 173-178, 1999.

WANG, Y.W.; FIELD, C.J.; SIM, J.S. Dietary polyunsaturated fatty acids alter lymphocyte subset proportion and proliferation, serum immunoglobulin G concentration, and immune tissue development in chicks. **Poultry Science**, v. 79, p. 1741-1748, 2000.

WEISS, A.; CAMBIER, J.C. Lymphocyte activation. **Current Opinion in Immunology**, v. 16, p. 285-287, 2004.

WELSCH, C.W. Relationship between dietary fat and experimental mammary tumorigenesis: a review an critique. **Cancer Research**, v. 52, p. 2040s-2048s, 1992.

WETHERBEE, B.M.; NICHOLS, P.D. Lipid composition of the liver oil of deep-sea sharks from Chatam Rise, New Zealand. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 125, p. 511-521, 2000.

WHITEHOUSE, A.S.; SMITH, H.J.; DRAKE, J.L.; TISDALE, M.J. Mechanism of attenuation of skeletal muscle protein catabolism in cancer cachexia by eicosapentaenoic acid. **Cancer Res**., v. 61, n. 9. may 1, p. 3604-3609, 2001.

WHITING, C.V.; BLAND, P.W.; TARLTON, J.F. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids reduce disease and colonic proinflammatory cytokines in a mouse model of colitis. **Inflamm Bowel Dis**, v. 11, n.4, p. 340-349, 2005.

WIGMORE, S.; ROSS, J.; STUART FALCONER, J.; PLESTER, C.; TISDALE, M; CARTER, D.; FEARON, K. The effect of polyunsaturated fatty acids on the progress of cachexia in patients with pancreatic cancer. **Nutrition**, v. 12, n. 1, p. S27-S30, 1996.

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/nu mice enhances platinium-based chemotherapies. **Clinical Cancer Research**, v. 7, p. 724-733, 2001.

WU, D.; HAN, S.N.; MEYDANI, M.; MEYDANI, S.N. Effect of concomitant consumption of fish oil and vitamin E on production of inflammatory cytokines in healthy elderly humans. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1031, p. 422-424, 2004.

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