



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO**

Juliana de Aguiar Pastore Silva

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE ÓLEO DE PEIXE EM
MARCADORES DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E DO
ESTADO NUTRICIONAL EM INDIVÍDUOS ADULTOS COM
CÂNCER COLO-RETAL**

Florianópolis

2011

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO**

Juliana de Aguiar Pastore Silva

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE ÓLEO DE PEIXE EM
MARCADORES DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E DO
ESTADO NUTRICIONAL EM INDIVÍDUOS ADULTOS COM
CÂNCER COLO-RETAL**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Nutrição da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de mestre em nutrição.

Orientador: Prof. Dr. Erasmo Benício Santos de Moraes Trindade

Florianópolis

2011

Catlogação na fonte elaborada pela biblioteca da
Universidade Federal de Santa Catarina

A ficha catalográfica é confeccionada pela Biblioteca Central.

Tamanho: 7cm x 12 cm

Fonte: Times New Roman 9,5

Maiores informações em:

<http://www.bu.ufsc.br/design/Catalogacao.html>

*Aos **meus pais**, José Camilo Pastore e Águeda Maria de Aguiar Pastore, a minha **irmã** Cristina Maria de Aguiar Pastore e ao meu **marido** André Pacheco Silva. Por todo o amor, carinho, incentivo e apoio para a realização de mais esta conquista da minha vida, por acreditarem na minha capacidade e apoiarem minhas escolhas profissionais.*

AGRADECIMENTOS

"o mais amplo do mundo, o conhecimento, o reconhecimento, a alegria deixada por um presente, como um suavíssimo cometa, tudo isso e muito mais cabem na extensão de uma palavra. Quando se diz obrigado, se dizem muitas coisas mais, que vêm de muito longe e de muito perto, de tão longe como de origem do indivíduo, de tão perto como o secreto pulsar do coração."

Pablo Neruda

Obrigada Senhor! A cada vitória sinto sua presença. Obrigada por sempre iluminar meu caminho com oportunidades, desafios e amigos preciosos.

Serei eternamente grata aos pacientes que aceitaram participar do estudo, que me permitiram entrar em suas vidas, em seus sofrimentos e alegrias...

Há dois anos, um sonho que parecia distante...
Agora, nós compartilhamos juntos a alegria desta realização!

Agradeço

Ao Professor Erasmo Benício Santos de Moraes Trindade, durante todo este período ele mais que um orientador, foi um MESTRE-AMIGO! Obrigada pelo apoio e carinho durante esta fase de amadurecimento pessoal e profissional. Por confiar em mim, compartilhar seus valiosos conhecimentos e sempre motivar meu desenvolvimento intelectual.

A Maria Emilia Fabre, a quem devo muito do que conquistei. Participou de todas as etapas do mestrado, muitas vezes "colocou a mão na massa" para mostrar como era possível. Admiro-a pelo exemplo de profissional e pessoa, assim como pela forma cativante com que aborda a prática em nutrição. Agradeço imensamente por sua ajuda e pela amizade construída no período.

As nutricionistas do CEPON (Sheila, Telma, Maria Emilia, Claudia) e ao Oncologista Clínico, Dr. Vicente Martorano Menegotto, que desde o início acreditaram e apoiaram a nossa idéia.

Aos professores do PPGN-UFSC. Vocês souberam mostrar a cada dia uma nova chance de aprender mais (até sobre nós mesmos), de se importar mais, de realizar mais do que pensávamos ser possível. Agradeço o inestimável apoio nesta jornada!

Aos funcionários do CEPON, que me acolheram e me ensinaram muito! Obrigada especialmente ao pessoal da QT, do SAME e a Aninha.

A professora Emília Addison Machado Moreira, que sempre me acolheu com muito carinho. Que com suas reflexões curiosas, perguntas difíceis e críticas importante estimulou a “corrida pelo saber”.

A professora Tânia Silvia Fröde pela parceria na realização do trabalho, uma rica convivência cercada de aprendizado. A Ziliane da Silva Buss sempre pronta a ajudar, foi muito importante para concretização deste trabalho. Agradeço pela ajuda na determinação dos valores de interleucinas.

A Professora Lúcia Andréa Zanette Zeni Ramos, “um soldado na busca de patrocínio”. Um amor de pessoa que conseguiu me fazer sorrir em todos os momentos de angústia.

Ao Professor David Gonzáles pelas importantes colaborações na análise estatística.

A todas as amigas integrantes da “melhor turma de mestrado do Brasil”. Nós acreditamos no mesmo sonho e caminhamos de mãos dadas. O caminho foi maravilhoso! Com certeza sorrimos o nosso melhor sorriso!

Ao marido. As minhas vitórias são também suas, André, pois estão marcadas pelo estímulo do seu amor!

A melhor irmã que existe (Cris). A cada reclamaçãozinha sobre o mestrado ela exclamava: Ah Ju nem é tão ruim assim... hehehe

Obrigada por estar SEMPRE disposta a me tirar de casa para desestressar!!

Aos meus pais. Obrigada pelo apoio, incentivo, compreensão, preocupação conjunta em cada desafio e, sobretudo, pelo amor recebido!

As Descontrols, pela forte amizade que TUDO fortalece...

Aos meus sogros, que sempre torceram pelo sucesso, me apoiaram e compreenderam todo o processo. A Edir “a melhor corretora de português” que eu podia encontrar!

Ao Laboratório de Análises Clínicas Santa Luzia, especialmente ao Marcos que nos ajudou muito na concretização do trabalho.

A empresa Phytomare e ao professor César Damian por acreditarem na ciência e se tornarem parceiros de um projeto ainda em fase inicial, sem recursos. Pela forma ética com que fizeram o acordo de parceria e a doação das cápsulas de óleo de peixe.

Ao Programa de Apoio a Planos de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais (Reuni) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas de estudo a mim concedidas durante o período de realização do mestrado, assim como a Fundação de Apoio a Pesquisa da Universidade de Santa Catarina (FUNPESQUISA\UFSC) e a Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de Santa Catarina (FAPESC) pelo financiamento do projeto.

Enfim, a todos que, de alguma forma, permitiram que este sonho se concretizasse.

Muito Obrigada!.

"Grandes realizações não são feitas por impulso,
mas por uma soma de pequenas realizações."

(Vicent Van Gogh)

RESUMO

SILVA, Juliana de Aguiar Pastore. Efeito da suplementação de óleo de peixe em marcadores de resposta inflamatória e do estado nutricional de indivíduos adultos com câncer colo-retal. Florianópolis, 2011. Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Programa de Pós-graduação em Nutrição. Universidade Federal de Santa Catarina. Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

A inflamação é uma característica comum no câncer. A presença e a magnitude da resposta inflamatória sistêmica podem produzir progressivo declínio nutricional em pacientes com câncer colo-retal. As células transformadas estimulam a produção de mediadores inflamatórios, que colaboram para o microambiente inflamatório relacionado ao tumor. A proteína C-reativa (PCR) e a Interleucina-6 elevadas podem prever baixa sobrevivência para pacientes com câncer colo-retal. Estudos pré-clínicos mostram que a intervenção nutricional específica com óleo de peixe rico em ácidos eicosapentaenóico (EPA, 20:5) e docahexaenóico (DHA, 22:6) podem ser uma terapia adjuvante efetiva para câncer colo-retal, com ação antiinflamatória e anti-angiogênica. Assim, o presente estudo visa verificar se existem alterações em marcadores da resposta inflamatória e do estado nutricional de pacientes com câncer colo-retal suplementados com óleo de peixe, comparado com indivíduos não suplementados. Este estudo foi conduzido de forma randomizada com 23 pacientes alocados em dois grupos. Os indivíduos do Grupo Suplementado (GS) consumiram dois gramas por dia de óleo de peixe durante nove semanas. Marcadores do estado nutricional (peso, Índice de Massa Corporal e albumina) e inflamatório (Interleucina 6 e 1β , Fator de Necrose Tumoral- α e PCR) foram avaliados no momento basal (T1), e após nove semanas de quimioterapia (T2) no GS e no Grupo Não Suplementado (GNS). Análises estatísticas foram conduzidas no software STATA 11.0. Teste exato de Fisher foi usado para verificar diferença entre GS e GNS nas variáveis dicotômicas, teste T para as variáveis paramétricas e Mann-Whitney para as não paramétricas. As variações do desfecho entre os tempos (T2-T1) foram verificadas com teste de Wilcoxon. Os valores da relação PCR/Albumina foram classificados de acordo com os escores de risco propostos por Corrêa et al. (2002). A média de idade dos pacientes incluídos no estudo foi 52,3 anos. O GS (n=11) e o GNS (n=12) não

apresentaram diferença estatística em suas características no momento basal. A diferença dos marcadores do estado nutricional entre os momentos (M2 menos M1) foi estatisticamente significativa para peso corporal ($p=0,01$) e índice de massa corporal ($p=0,03$) no GNS, onde ocorreu redução dos valores; no GS não foi verificada diferença. Entre os marcadores de resposta inflamatória, apenas a PCR apresentou valores inferiores no GS em relação ao GNS ($p=0,06$) em T2, nos demais marcadores não foi verificada diferença. A relação PCR/Albumina mostrou diferença estatisticamente significativa e relevância clínica no GS, onde ocorreu diminuição nos marcadores. Todos os pacientes do GS mantiveram ou melhoraram sua classificação de grau de risco. A suplementação de dois gramas por dia de óleo de peixe durante nove semanas em pacientes com câncer colo-retal em tratamento quimioterápico pode modular positivamente o estado nutricional e a relação PCR/Albumina e pode ser utilizado como terapia nutricional adjuvante neste grupo de pacientes.

Palavras-chave: óleo de peixe, câncer colo-retal, quimioterapia, inflamação, estado nutricional.

ABSTRACT

SILVA, Juliana de Aguiar Pastore. Effect of fish oil supplement on markers of inflammatory and nutritional status, of adult individuals with colorectal cancer. Florianopolis, 2011. Dissertation (Master in Nutrition) – Graduation program in Nutrition, Federal University of Santa Catarina, Florianopolis, 2011.

Inflammation is a common feature in cancer. The presence and magnitude of the response may induce progressive nutritional decline in colorectal cancer patients. The transformed cell produces inflammatory mediators, thereby generating an inflammatory microenvironment inside tumors; elevated C-Reactive protein (CRP) and Interleukin-6 can predict poor survival in colorectal cancer patients. Pre-clinical studies show that a specific nutritional intervention using fish oil, rich in eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5) and docosahexaenoic acid (DHA, 22:6), might prove to be an effective adjuvant therapy in colon cancer got a anti-inflammatory and anti-angiogenic properties. This study aims to check whether there is change in inflammation markers and/or in the nutritional status of patients with colorectal-cancer, undergoing chemotherapy, supplemented with fish oil when compared to the non supplemented ones. Clinical trial was conducted with 23 patients equally randomized in two groups, supplemented (SG) and non-supplemented (NSG). The supplemented individuals consumed two grams of fish oil per day during nine weeks. Nutritional (weight, BMI and albumin) and inflammatory (interleukin 6 and 1 β , CRP, Tumour Necrosis Factor- α) status markers were available in baseline (T1) and after nine weeks of chemotherapy (T2). Fisher's exact test was used to test differences in SG and NSG according to dichotomous variables. Test for continuous variables (including outcome analysis) were performed with T-test (parametric variables) or Mann-Whitney test (non-parametric variables). Outcome change between T1 and T2 were also tested with Wilcoxon test. All analysis were performed in the STATA statistic software, version 11.0 (STATA Corporation, College station, EUA). C-RP/Albumin was compared with the score risk. The patients' median age was 52,3 years old. The SG (n=11) and NSG (n=12) characteristics did not differ statistically in baseline. The comparison between groups, according to the difference between the T2 minus the T1 values, showed a reduction in body weight and BMI in

NSG, however in SG these indicators were not different between T1 and T2. Additionally, C-reactive protein was reduced in SG but not in NSG. The C-reactive protein/Albumin relation showed statistically significant difference and clinical relevance in SG because all patients maintained or improved their degrees of risk. Two grams of fish oil supplement per day during nine weeks can positively modulate the nutrition status and the C-RP/Albumin relation in colorectal cancer patients in chemotherapy. Therefore, it may be used as a nutrition adjuvant therapy.

Keywords: fish oil, colorectal cancer, chemotherapy, inflammation, nutritional status.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Relação entre inflamação e câncer.....	38
Figura 2: Via de síntese de Resolvina-E através de EPA.....	50
Figura 3: Delineamento do estudo.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Estimativa de novos casos de câncer de cólon e reto e taxa de incidência por 100.000 habitantes.....	33
Tabela 2- Variáveis, suas características e indicadores utilizados para o modelo de análise.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A: Altura
AA: Ácido araquidônico
ALA: Ácido alfa linolênico
AI: ingestão adequada
CB: Circunferência do braço
CCR: Câncer colo-retal
CEPON: Centro de Pesquisas Oncológicas
COX: Ciclooxigenase
COX2: Ciclooxigenase 2
DCT: Dobra cutânea tricípital
DHA: Ácido docosahexaenóico
DNA: Ácido desoxirribonucleico
DRI's: Dietary References Intakes
EPA: Ácido eicosapentaenóico
HIF1 α : Fator indutor de hipóxia 1 α
IBRANUTRI: Inquérito brasileiro de avaliação nutricional
IL: Interleucina
IL-6: Interleucina 6
IL-8: Interleucina 8
IL-10: Interleucina 10
IL-23: Interleucina 23
IMC: Índice de massa corporal
INCA: Instituto Nacional do Câncer
IPIN: Índice de prognóstico inflamatório e nutricional
QT: Quimioterapia
LOX: Lipoxigenase
LT: Leucotrieno
LTB4: Leucotrieno Bda série 4
LX: Lipoxina
mg: miligramas
NF- κ B: Fator de transcrição nuclear beta
nm: nanômetros
OMS: Organização Mundial da Saúde
OPAS: Organização Pan-Americana de Saúde
P: Peso
PCR: Proteína C reativa
pg/ml: picogramas por mililitros
PUFA: Polyunsaturated fatty acid

RvE1: Resolvina E1

RvE2: Resolvina E2

RDT: Radioterapia

RNA: Ácido ribonucleico

STAT3: Fator de transcrição nuclear STAT-3 Sinal de ativação e transcrição 3

SP: São Paulo

TNF- α : Fator de necrose tumoral – alfa

TX: Tromboxanas

UL: limite máximo

WHO: World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	27
2.	OBJETIVOS.....	31
2.1	OBJETIVO GERAL.....	31
2.1.1	Objetivos Específicos.....	31
3.	REVISÃO DA LITERATURA.....	33
3.1	CÂNCER COLO-RETAL.....	33
3.1.1	Epidemiologia.....	33
3.1.2.	Tratamento do câncer colo-retal.....	34
3.2.3.	A inflamação no câncer.....	35
3.1.4.	Resposta Inflamatória e o Estado Nutricional.....	39
3.1.5.	Marcadores da Resposta Inflamatória.....	40
3.1.5.1	Interleucina-6, Interleucina-1 β , Fator de Necrose Tumoral- α	40
3.1.5.2.	Proteína C-reativa.....	42
3.1.5.3.	Índice de Prognóstico Inflamatório e Nutricional.....	43
3.2.	ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3.....	44
3.2.1	Caracterização Bioquímica.....	45
3.2.2.	Fontes Dietéticas.....	45
3.2.3.	Interconversão e Dose Resposta em Humanos.....	46
3.3.4.	Ingestão Adequada.....	48
3.3.5.	Modulação da Resposta Inflamatória.....	48
3.3.6	Imunomodulação.....	51
3.3.7.	Ácidos Graxos ômega-3 e a Terapia do Câncer.....	52
4.	MÉTODO.....	55
4.1	CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO.....	55
4.2	AMOSTRA DO ESTUDO.....	55
4.3.	GRUPOS DO ESTUDO.....	56
4.4.	CARACTERIZAÇÃO DO SUPLEMENTO NUTRICIONAL DE ÓLEO DE PEIXE.....	56

4.5.	DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	56
4.6.	INSTRUMENTO E TÉCNICAS DE COLETA DE DADOS.....	59
4.6.1	Identificação dos indivíduos.....	59
4.6.2	Avaliação do estado nutricional.....	59
4.6.2.1.	Peso e estatura.....	59
4.6.3.	Avaliação da resposta inflamatória.....	60
4.6.3.1.	Coleta do sangue.....	60
4.6.3.2.	Citocinas.....	60
4.6.3.3.	Proteína C-reativa.....	61
4.6.3.4	Albumina.....	62
4.6.3.5.	Relação Proteína C-reativa/Albumina.....	62
4.7	MODELO DE ANÁLISE.....	62
4.7.1	Definição das variáveis e seus indicadores.....	62
4.8.	TRATAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS.....	64
5.0.	MANUSCRITO 1.....	65
6.0.	MANUSCRITO 2.....	102
7.0	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	123
	REFERÊNCIAS.....	125
	APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido...139	
	APÊNDICE B – Instrumento para coleta de dados (T1- pré-suplementação).....142	
	APÊNDICE C – Instrumento para coleta de dados (Ingestão alimentar).....145	
	APÊNDICE D - Instrumento para coleta de dados (T2- pós-suplementação).....146	
	APÊNDICE E - Guia de solicitação dos exames para pesquisa clínica.....148	

1 INTRODUÇÃO

Câncer é um conjunto de doenças caracterizado pelo progressivo acúmulo de mutações no genoma de uma célula (BRASIL, 2003). O câncer colo-retal (CCR) abrange tumores que atingem o cólon e o reto. Tanto homens como mulheres são igualmente afetados, sendo mais frequente em populações de nível socioeconômico elevado, que vivem em áreas urbanas. (BRASIL, 2009). É uma doença tratável e frequentemente curável quando localizada no intestino e sem extensão para outros órgãos. (BRAUNWALD, et. al., 2002)

Independentemente de sua etiologia, os cânceres colo-retais originam-se, em sua maioria, de pólipos adenomatosos (BRAUNWALD, et. al., 2002), sendo a incidência de câncer de intestino maior em pacientes com doença inflamatória intestinal de longa duração (BURKE, 2002). O chamado grupo de risco para o desenvolvimento de câncer colo-retal inclui: indivíduos com idade superior a 40 anos; com antecedentes pessoais ou familiares de adenoma ou adenocarcinoma colo-retal, câncer no trato digestivo, ginecológico ou na mama; portadores de doenças inflamatórias intestinais, de doenças genéticas ou lesões actínicas colo-retais (BRASIL, 2003).

As neoplasias colo-retais são em sua maioria assintomáticas até atingir o estágio avançado. A perda de sangue gastrointestinal, com sangue oculto nas fezes, é o sinal mais comum. Em estágios avançados predominam a anorexia e o emagrecimento involuntário, que podem evoluir para a caquexia (BURKE, 2002). A Síndrome da Anorexia Caquexia é multifatorial. O aumento do consumo energético pelo tumor, a liberação de fatores que agem no centro da saciedade diminuindo o consumo alimentar e as citocinas produzidas pelo hospedeiro e pelo tumor promovem as anormalidades metabólicas características da síndrome. Esta não pode ser, portanto, identificada apenas pela perda de peso, devendo-se considerar também a redução da ingestão alimentar e a inflamação sistêmica (FEARON; VOSS; HUSTEAD, 2006; FEARON, 2008).

Os eventos iniciais do processo inflamatório são desencadeados por mastócitos principalmente pela liberação de histaminas e macrófagos teciduais, (BALESTIERI, 2006). Os macrófagos teciduais são derivados de monócitos circulantes, liberam citocinas que agem em células alvo e induzem o recrutamento protetor dos leucócitos. Quando a ativação dos monócitos e macrófagos ocorre de maneira descontrolada,

uma resposta inflamatória exagerada pode ocorrer (TSOUKNOS; NASH; RAINGER, 2003).

No câncer, o próprio tumor secreta múltiplas citocinas ou fatores de crescimento que podem alterar o microdesenvolvimento do tumor e promover crescimento e metástase. Muitos desses fatores promovem fenótipo angiogênico em estroma ou células do hospedeiro infiltradas, resultando no desenvolvimento de novos vasos que fornecem nutrientes para o crescimento continuado do tumor (BALKWILL; CHARLES; MANTOVANI, 2005).

O aumento de alguns mediadores inflamatórios e de proteínas marcadoras da resposta inflamatória demonstrou ser fator prognóstico independente da sobrevida em vários tipos de neoplasias malignas, incluindo melanoma, mieloma, carcinoma renal, câncer de ovário e cânceres do trato gastrointestinal (RAMAN; BAUGHER; THU; RICHMOND, 2007). A concentração de Proteína C Reativa (PCR) plasmática é alterada em resposta a infecção, injúria e neoplasia. Esta mudança é regulada positivamente por citocinas, como a Interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8) e fator de necrose tumoral (TNF) (CHUNG; CHANG, 2003). Nikolaos et al. (2005) demonstraram que níveis séricos de IL-6, TNF- α e PCR aumentam definitivamente em pacientes com câncer colo-retal e que, no pré-operatório, a IL-6 e PCR podem ser usadas como preditor de prognóstico. Acredita-se, ainda, que a resposta inflamatória é um fator potencialmente importante na variabilidade inter-individual da quimioterapia quanto à resposta ao câncer e seus efeitos tóxicos (SLAVIEIRO; CLARK; RIVORY, 2003).

Resultados promissores têm sido demonstrados quanto ao uso de ácidos graxos poliinsaturados da família ômega-3 no tratamento adjuvante do câncer (HARDMAN, 2004). Estudos em cultura de células e em cobaias descrevem em suas conclusões que a ingestão dietética de ácidos graxos poliinsaturados da família ômega-3 está relacionada com a supressão de transformação neoplásica, angiogênese e crescimento de células tumorais, uma vez que modifica reações auto-imunes e inflamatórias por meio de uma combinação de mecanismos. A melhoria na eficácia de quimioterápicos contra câncer colo-retal quando ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa da família ômega-3 são incorporados à dieta de roedores ou à meio de cultura de células é observado (WYNTER, et. al, 2004). Em particular, ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa tem ação inibitória de crescimento tumoral *in vitro*, colônia de células de câncer de cólon (SCHONBERG, 2006) e em modelos experimentais de câncer em ratos (RAMOS, 2004). O estudo de Read et al. (2007) mostra resultado promissor no tratamento

de humanos com câncer colo-retal quando o óleo de peixe é associado a suplemento hipercalórico e hiperprotéico.

Não existe uma recomendação estabelecida de consumo de óleo de peixe em tratamento oncológico. O manejo da dose mostra-se como um desafio, uma vez que em estudos com animais são utilizados grandes quantidades de suplemento que não são tolerados por humanos. Foram encontrados estudos com pacientes oncológicos que administraram de 2 a 21 gramas por dia de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, sendo na combinação de ácido eicosapentaenóico (EPA) + ácido docahexaenóico (DHA) ou de EPA isolado (BURNS, 1999; JATOI, 2004).

Considerando as situações apresentadas e com base na indicação de efeito positivo da suplementação, propõe-se a realização de um estudo que avalie a ação da suplementação diária de dois gramas de óleo de peixe em humanos portadores de neoplasia colo-retal durante tratamento quimioterápico. Com a seguinte pergunta de partida:

A ingestão diária de dois gramas de óleo de peixe, por adultos com câncer colo-retal em quimioterapia, é suficiente para alterar marcadores da resposta inflamatória e do estado nutricional?

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar se existe alteração nos marcadores da resposta inflamatória e/ou do estado nutricional de indivíduos adultos com câncer colo-retal em tratamento quimioterápico suplementados diariamente com dois gramas de óleo de peixe durante nove semanas, em relação aos não suplementados

2.1.1 Objetivos Específicos

a) Avaliar o comportamento de marcadores da resposta inflamatória (PCR, IL-6, IL-1 β e TNF- α) de indivíduos adultos com câncer colo-retal em quimioterapia, suplementados com dois gramas de óleo de peixe durante nove semanas, em relação aos não suplementados;

b) Avaliar o comportamento de indicadores do estado nutricional (peso, índice de massa corporal, albumina), em indivíduos adultos com câncer colo-retal em quimioterapia, suplementados com dois gramas de óleo de peixe durante nove semanas, em relação aos não suplementados;

c) Avaliar a ingestão alimentar atual e verificar a frequência de consumo de peixe entre os indivíduos oncológicos com câncer colo-retal.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 CÂNCER COLORRETAL

3.1.1 Epidemiologia

Segundo relatório da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC)/ OMS (*World Cancer Report 2008*), o impacto global do câncer mais que dobrou em 30 anos.

Estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA), válidas para os anos de 2010 e 2011, das taxas brutas de incidência por 100.000 habitantes e número de novos casos de câncer de cólon e reto para a região sul, Santa Catarina e Florianópolis, por região e por sexo, estão apresentadas no quadro que se segue. Para o Brasil, a estimativa é de 28.110 novos casos/ano (BRASIL, 2009).

Tabela 1. Estimativa de novos casos de câncer de cólon e reto e taxa de incidência por 100.000 habitantes.

Localidade	Estimativa			
	Mulheres		Homens	
	Novos casos	Taxa Bruta	Novos casos	Taxa Bruta
Santa Catarina	500	15,66	469	14,72
Florianópolis	60	27,88	40	21,98

Estimativa INCA, 2010/2011

O câncer de cólon e reto em homens é o terceiro mais frequente nas regiões Sul (21/100.000) e Sudeste (19/100.000), sem considerar os tumores de pele não melanoma. Para as mulheres, é o segundo mais frequente nas regiões Sul (22/100.000) e Sudeste (21/100.000) (BRASIL, 2009).

Nos países industrializados, a incidência de câncer colo-retal aumenta proporcionalmente ao envelhecimento da população. A Associação Americana de Câncer (2009) estimou 146.960 novos casos de câncer para o ano de 2009 nos Estados Unidos. O câncer colo-retal foi indicado como o terceiro local de acometimento mais frequente

(10%), em ambos os sexos; assim como o terceiro mais freqüente (9%) em relação ao número de mortes, em ambos os sexos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2009).

3.1.2. Tratamento do câncer colorretal

O tratamento depende principalmente do tamanho, localização e extensão do tumor, assim como da saúde geral do paciente. Variados tipos de tratamentos são utilizados, sendo que algumas vezes há combinação de uma ou mais formas de tratamento (BRASIL, 2003). A taxa de sobrevivência de pacientes com carcinoma colo-retal baseia-se no estágio da doença (BURKE, 2002) e, é considerada boa se a doença for diagnosticada em estágio inicial. A sobrevivência média global em cinco anos se encontra em torno de 55% nos países desenvolvidos e 40% para países em desenvolvimento. Esse relativo bom prognóstico faz com que o câncer de cólon e reto seja o segundo tipo de câncer mais prevalente em todo o mundo, com aproximadamente 2,4 milhões de pessoas vivas diagnosticadas com essa neoplasia, ficando atrás somente do câncer de mama em mulheres (BRASIL, 2009).

A ressecção total do tumor é o tratamento ideal e curativo para os estágios iniciais, sendo que a detecção de metástases não exclui o tratamento cirúrgico em pacientes com sintomas relacionados ao tumor. Observa-se o paciente cuidadosamente durante os 5 anos seguintes a cirurgia. (BRAUNWALD, et. al., 2002).

Recomenda-se radioterapia (RDT) da pelve para pacientes com câncer retal, visto que reduz em 30 a 40% a probabilidade de recidivas regionais após ressecção. A RDT seja no pré ou no pós-operatório parece reduzir o risco de recidivas, mas não aumenta a sobrevivência (BRAUNWALD, et. al., 2002).

A quimioterapia pode ser administrada para destruir qualquer célula cancerosa que possa ter permanecido no organismo após o procedimento cirúrgico, para controlar o crescimento tumoral ou para aliviar os sintomas ocasionados pela doença (BRASIL, 2003). Recomenda-se cirurgia e quimioterapia adjuvante com 5-fluoracil para o câncer de colo-retal em estágio avançado (BURKE, 2002). Esta combinação resulta em uma diminuição de 40% na taxa de recidiva e em uma melhora de 30% na sobrevivência do indivíduo. (BRAUNWALD, et. al., 2002).

Uma série de novas estratégias tem sido desenvolvida para terapia de câncer de cólon baseadas na combinação de agentes anticarcinogênicos e ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (DUPERTUIS, et. al., 2007; CALVIELLO, et. al., 2007). Óleo de peixe parece não atrapalhar a ação da quimioterapia e potencializar a ação de alguns agentes; em camundongo o ácido graxo eicosapentaenóico potencializa a inibição de crescimento tumoral de 5-Fluoracil e ciclofosfamida (WYNTER, et. al, 2004).

3.2.3. A inflamação no câncer

A inflamação é um mecanismo normal de defesa do organismo a infecções e outras injúrias. Ao se tornar excessiva, pode gerar danos irreparáveis ao tecido do hospedeiro, doenças agudas e crônicas (CALDER, 2009).

As características do câncer relacionadas à inflamação incluem a presença de células e mediadores inflamatórios no tecido tumoral, remodelação tecidual, e angiogênese (BALKWILL; CHARLES, K; MANTOVANI, 2005).

A conexão entre inflamação e câncer pode ser vista considerando duas vias: extrínseca e intrínseca. A via extrínseca surge de condições infecciosas ou inflamatórias, como a doença inflamatória intestinal, que aumentam o risco de desenvolvimento de câncer. A via intrínseca surge de alterações genéticas que causam inflamação e câncer; estas alterações incluem ativação de vários tipos de oncogenes por mutação, rearranjo ou amplificação cromossomal e por inativação de genes supressores de tumor. As células já transformadas produzem e liberam mediadores inflamatórios formando um microambiente inflamatório onde não havia inflamação prévia (MANTOVANI, et al., 2008).

As duas vias se convergem, resultando em ativação de fatores de transcrição, como fator de transcrição nuclear B (NF- κ B), sinal de tradução e ativação de transcrição 3 (STAT3) e fator indutor de hipóxia 1 α (HIF1 α) em células tumorais. Estes fatores de transcrição coordenam a liberação de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas e quimiocinas, assim como a produção de ciclooxigenase 2 (COX2) que resulta em produção de prostaglandinas. Os mediadores inflamatórios, em conjunto, recrutam e ativam leucócitos, mastócitos, macrófagos e eosinófilos. As citocinas liberadas pelas células tumorais ativam os

mesmos fatores de transcrição ativados em células do tumor, nas células inflamatórias e do estroma. Como resultado tem-se produção de mais mediadores inflamatórios e concretização do microambiente inflamatório relacionado ao câncer (figura 1). Assim, a inflamação relacionada ao câncer tem muitos efeitos promotores de crescimento tumoral (MANTOVANI et al., 2008).

A infiltração de células do tumor por neutrófilos constitui a primeira linha da defesa imune a injúria ou infecção. Quando as reações contra patógenos tornam-se excessivas ou inapropriadas podem contribuir para o crescimento e propagação do câncer e para imunossupressão associada ao desenvolvimento da doença (CHIN; PARKOS, 2007). A resposta imune anti-tumor é ainda regulada por células dendríticas, cuja principal função é a fagocitose e apresentação de antígenos, tendo papel crucial tanto na ativação da imunidade antígeno-específica quanto na manutenção; promovendo uma ponte entre imunidade inata e adaptativa (BALKWILL; MANTOVANI, 2001).

O fator de transcrição nuclear B é a chave que coordena a imunidade inata e a inflamação, e é considerado um importante promotor de tumor endógeno. Em células tumorais e células do epitélio com risco de transformação por carcinógenos (como células inflamatórias) NF- κ B ativa a expressão de genes que codificam citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-23 e TNF- α), moléculas de adesão, enzimas para síntese de prostaglandinas via COX2, óxido nítrico sintase e fatores angiogênicos. Outra importante função de NF- κ B é a promoção de sobrevivência das células por meio da indução de expressão de genes anti-apoptose (KARIN, 2006).

Os mediadores e as células inflamatórias estão envolvidos na migração, invasão e metástase de células malignas, não apenas nos estágios iniciais da oncogênese (MANTOVANI et. al, 2008). A prostaglandina E2, derivada da COX2 promove a iniciação e a progressão do tumor por estimular a proliferação celular, angiogênese, migração celular e invasão, enquanto inibe apoptose (CHAPKIN, et. al., 2007). A capacidade invasiva de células malignas aumenta na presença de citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-1 e IL-6, possivelmente, pela regulação positiva da expressão de receptores de quimiocina estimulada por estas citocinas (BALKWILL; CHARLES, K; MANTOVANI, 2005). Os receptores de quimiocinas e seus ligantes dirigem o movimento de células durante a inflamação, o câncer e a manutenção da homeostase dos tecidos, pois a presença destes receptores afeta a motilidade, o poder de invasão e de sobrevivência das

células. Durante o processo de transformação, muitas células começam a expressar receptores para quimiocinas e utilizam este como apoio à migração e a sobrevivência em locais distantes do tumor original (BALKWILL, 2004).

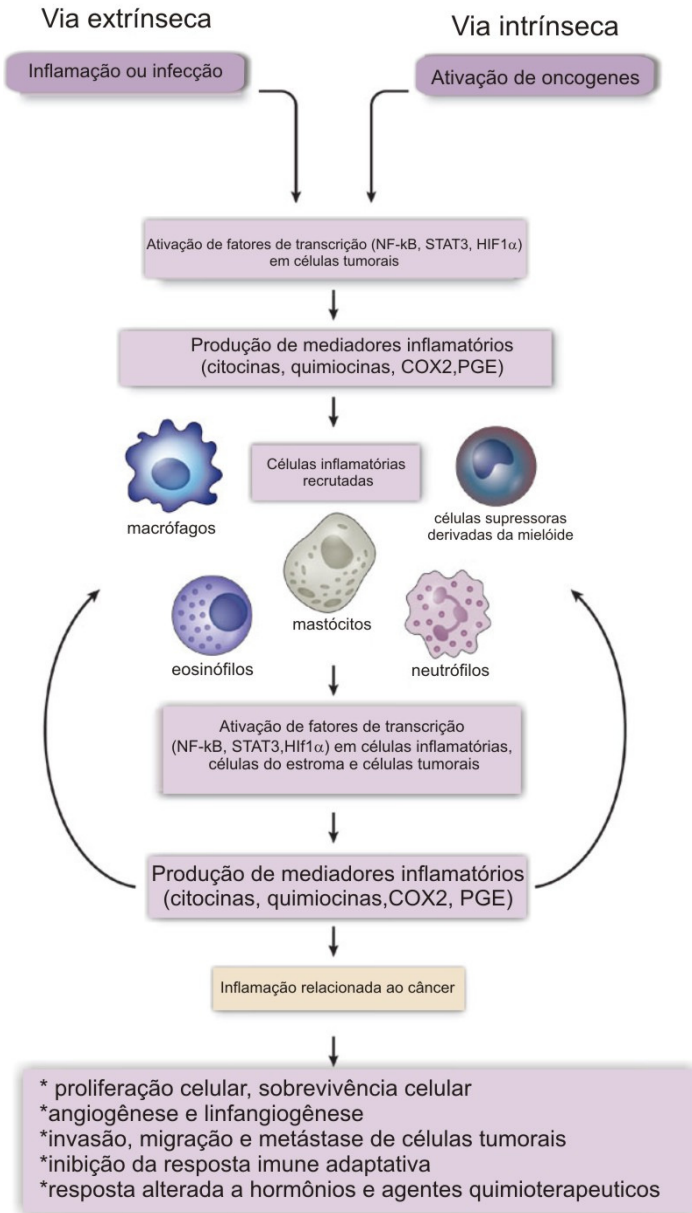


Figura 1. Relação entre inflamação e câncer.

Fonte: Traduzido Mantovani et al., 2008

3.1.4. Resposta Inflamatória e o Estado Nutricional

O processo inflamatório instaurado no câncer, sustentado por mediadores inflamatórios (interleucinas, quimiocinas) promove, frequentemente, desnutrição calórica e protéica (MANTOVANI et al., 2008). Os principais fatores determinantes são a redução na ingestão total dos alimentos, as alterações metabólicas provocadas pelo tumor e o aumento da demanda calórica pelo seu crescimento; sendo que a inflamação relacionada está envolvida na exacerbação destes determinantes (ARGILÉS, 2005).

Pesquisas indicam que pacientes com câncer apresentam taxas de desnutrição superiores aos demais pacientes hospitalizados. O Inquérito Brasileiro de Avaliação Nutricional (IBRANUTRI) (2001) realizado em 25 hospitais de 12 estados brasileiros e no Distrito Federal, com 4.000 doentes hospitalizados na rede pública, identificou que 20,1 % dos pacientes internados eram portadores de câncer. Desses, 66,4 % apresentavam-se com desnutrição, sendo 45,1% com desnutrição de grau moderado e 21,3% de grau grave. Segundo Dias (2006), assim como afirma Cabral (2000), a desnutrição em pacientes com câncer apresenta uma incidência entre 30 e 50 %.

Pacientes podem inicialmente apresentar uma simples perda de peso e progredir para o ponto onde estão imunocomprometidos e com suas reservas corporais completamente depletadas. A caquexia é uma síndrome clínica multidimensional e multifatorial que afeta todos os compartimentos do corpo, não sendo apenas sinônimo de perda de peso. Pacientes com caquexia avançada podem apresentar anorexia, saciedade precoce, fraqueza, perda de peso severa, anemia e edema. Portanto, a inclusão de indicadores de ingestão alimentar e presença de inflamação sistêmica aos marcadores de perda de peso ajudam na identificação e na classificação dos pacientes com caquexia (FEARON; VOSS; HUSTEAD, 2006; FEARON, 2008). Em estudo com pacientes com câncer pancreático, Fearon, Voss e Hustead (2006) definiram a Síndrome da Anorexia Caquexia em estágio avançado como: perda de peso $\geq 10\%$ do peso usual antes da doença, ingestão alimentar ≤ 1500 Kcal/dia e concentração de PCR > 10 mg/L. Os pesquisadores indicam o uso de dois ou mais critérios, como rotina na identificação clínica da síndrome.

Os componentes metabólicos da síndrome que levam ao emagrecimento e caquexia são resultados da interação entre o hospedeiro e o tumor. A presença do tumor maligno frequentemente

resulta em resposta inflamatória do hospedeiro mediada por citocinas pró-inflamatórias, mobilização de proteínas de fase aguda (ARGILÉS; BUSQUETS; LÓPES-SORIANO, 2003) e liberação de fatores que induzem a mobilização protéica (FEARON, 2008). Os mais importantes mediadores pró-inflamatórios são as citocinas TNF- α , IL-1, IL-6 e o Fator Indutor de Proteólise (PIF) (TISDALE, 2001). A IL-1 e o TNF- α estão envolvidos na anorexia, possivelmente pelo aumento dos níveis do hormônio liberador de corticotrofina, o neurotransmissor do sistema nervoso central que suprime a ingestão alimentar, e pela alteração de outros sinais eferentes que regulam a saciedade (ARGILÉS; BUSQUETS; LÓPES-SORIANO, 2003). A IL-1, IL-6 e TNF- α ainda estimulam a resposta metabólica de fase aguda com liberação de proteínas positivas, como PCR, fibrinogênio, α -antitripsina, glicoproteína e redução de proteínas negativas, como albumina, pré-albumina e transferrina. A resposta de fase aguda exacerbada leva ao aumento dos triglicerídeos circulantes, maior utilização de ácidos graxos, intolerância à glicose (que passa a ser utilizada preferencialmente pelo tumor), catabolismo protéico acentuado e aumento na taxa metabólica basal (STRASSER, 2003).

3.1.5. Marcadores da Resposta Inflamatória

Dentre os marcadores de resposta inflamatória serão abordados os que foram incluídos no desenho do estudo.

3.1.5.1 Interleucina-6, Interleucina-1 β , Fator de Necrose Tumoral- α

A Interleucina-6 é produzida prioritariamente por monócitos e macrófagos e em menor porcentagem por fibroblastos, células endometriais, linfócitos T e B, condrócitos e células amnióticas. A produção é estimulada por IL-1, interferon, TNF- α , lipopolissacarídeos, DNA vírus e RNA vírus (LUKASZEWICZ; MROCZKO; SZMITKOWSKI, 2007). Ela desempenha importante papel na resposta imunológica, hematopoiese e inflamação; devido a estas múltiplas atividades foi sugerido que IL-6 é o principal mediador envolvido na resposta do hospedeiro a patógenos (LEE; VILCEK, 1989). Os níveis séricos de IL-6 podem aumentar até 100 vezes na inflamação, por conseguinte, esta citocina tem sido proposta como marcador precoce e

sensível, mas não específico de reação inflamatória (LUKASZEWICZ; MROCZKO; SZMITKOWSKI, 2007). É um grande estímulo para síntese hepática de proteínas de fase aguda, especialmente da PCR (NIKOLAOS, et al., 2005).

A IL-1 β é uma potente citocina pró-inflamatória secretada por uma variedade de células imunes ativadas durante fase aguda e crônica da resposta inflamatória. Induz a liberação de IL-2, IL-6, IL-8 e VEGF. IL-1 promove angiogênese, crescimento tumoral e metástase em modelos experimentais e em humanos (SAIKO, et al., 2003 falta modelo humanos).

Bactérias patogênicas e outros microorganismos nocivos podem induzir TNF- α via receptores Toll-like, sinalização de NF- κ B e aumento de eficiência traducional. Existem evidências substanciais de que o TNF- α está envolvido na promoção e progressão de cânceres, tanto em modelos experimentais como em humanos. Quando produzido no microambiente do tumor, o TNF- α pode agir como promotor de tumor endógeno por duas vias: prevenindo morte de células com potencial malignidade; e pela estimulação de citocinas pró-inflamatórias em células de origem mieloide e linfoide na massa tumoral. TNF- α pode ser detectado em plasma de indivíduos com câncer, especialmente naqueles com doença avançada e prognóstico ruim (PFITZENMAIER, et al., 2003).

A IL-6 e o TNF- α podem iniciar a resposta imunológica inata pela indução da fase aguda da inflamação, estimulam a diferenciação de linfócitos B e induzem a diferenciação permanente deste linfócito em células plasmáticas, que produzem diferentes classes de imunoglobulinas (LEE; VILCEK, 1989). A IL-6 também estimula a produção de IL-2 e a expressão de seus receptores pelos linfócitos T. Juntas, IL-6 e IL-2 ativam linfócitos T, que reconhecem antígenos e então estimulam a produção e a diferenciação de linfócitos citotóxicos (LUKASZEWICZ; MROCZKO; SZMITKOWSKI, 2007).

A IL-6 parece estar envolvida também na transformação maligna, progressão do tumor e caquexia através da inibição da apoptose de células cancerígenas e indução de angiogênese tumoral. O aumento da temperatura corporal pela indução da síntese de PGE é mediado por IL-6, IL-1 β e TNF (CULING, et al., 2005). A IL-6 pode ser um estimulador potente de metástase porque regula a expressão de receptores de adesão em células endoteliais, assim como estimula a produção de fatores de crescimento (BELLUCO; NITTI; FRANTZ, 2000).

Várias investigações têm focado o uso de IL-6, TNF- α e PCR como fator prognóstico do câncer. Nikolaos et al. (2005) encontraram concentração significativamente mais elevada destes marcadores em indivíduos com câncer colo-retal comparados aos controles saudáveis. Concentrações séricas de IL-6 são comumente elevadas em pacientes com câncer endometrial (BELLONE, et. al., 2005), de pulmão (SONGUR, et. al., 2004), colo-retal (BELLUCO; NITTI; FRANTZ, 2000), renal (NEGRIER, et. al., 2004), de mama (SALGADO, et. al., 2003) e de ovário (ZAKRZEWSKA; POZANSKI, 2001).

As concentrações séricas de IL-6, em pacientes com câncer colo-retal, estão associadas com a progressão da doença, grau histológico e invasão da parede intestinal (LUKASZEWICZ; MROCZKO; SZMITKOWSKI, 2007). Brozek, et. al. (2005) concluíram que há duas situações clínicas relevantes em que a Interleucina-6 pode ter relação com desenvolvimento e progressão de tumor de cólon. A primeira acontece se a sinalização para a proliferação celular advinda do receptor de IL-6 (IL-6R) for traduzida no STAT-3, como normal a alta. Esta é a ação mitogênica parácrina de IL-6, que é responsável não apenas pela hiperproliferação de células epiteliais na colite ulcerativa, mas também na progressão do câncer colo-retal. A segunda situação ocorre pela ação efetiva da IL-6 no avanço do carcinoma/adenoma em indivíduos que carregam o gene IL-6 variante com alta sensibilidade a IL-1 β . Belluco, Nitti e Frantz (2000) encontraram concentrações séricas elevadas de IL-6 em pacientes com câncer colo-retal e demonstraram que uma concentração acima de 10 pg/ml, no momento pré-tratamento, pode ser um negativo e independente fator prognóstico no câncer colo-retal. Nikiteas, et al. (2005) verificaram que concentrações séricas de IL-6 correlacionaram-se ao tamanho do tumor e altos níveis de IL-6 a PCR estão associados com maior mortalidade total.

3.1.5.2. Proteína C-reativa

A Proteína C-reativa (PCR) é primariamente sintetizada nos hepatócitos em resposta a IL-6. Entretanto existem várias evidencias de produção extra hepática de PCR, como em macrófagos, tecido adiposo e endotelial ou células da musculatura lisa (OUCHI, et. al., 2003; VENUGOPAL; DEVARAJ; JIALAL, 2005).

A concentração de PCR muda em resposta a infecção, injúria celular e neoplasia. Esta mudança é regulada positivamente por citocinas, como IL-6, IL-8 e TNF- α . A elevação nas concentrações séricas de PCR começa em 8 a 12 horas após o início da inflamação em doenças infecciosas e cânceres, com picos de concentração entre 24 a 48 horas. Eleva-se à medida que o processo inflamatório se intensifica, possui meia-vida plasmática de 19 horas e é responsável por amplificar a resposta imune (MARNELL; MOLD; CLOSS, 2005).

Estudo em pacientes com câncer colo-retal indicou que aqueles com concentrações aumentadas de PCR sérica têm um pior prognóstico comparado com aqueles em que a concentração não se encontra elevado (NIKOLAOS, et.al., 2005). Concentração sérica de PCR aumentada também foi associada aos tumores de grande tamanho, metástases de fígado ou linfonodos e estágios avançados segundo Durke's stage (CHUNG; CHANG, 2003). Otake et. al. (2009) demonstraram que esta associação está presente mesmo quando se controla possíveis fatores de confusão, como hábito tabágico e obesidade. O aumento de PCR associa-se, também, com maior frequência de invasão tumoral local e risco aumentado de recorrência em pacientes com câncer colo-retal (NOZOE, et. al., 1998).

Segundo Shiu et. al. (2008) a PCR de 0.5 mg/dl no pré-operatório é um fator independente de prognóstico favorável, sendo que o aumento dos valores de PCR está associado a baixa sobrevida. A partir do pós operatório os níveis declinam lentamente. Koide et al. (2008) concluíram que PCR pode ser um potente indicador prognóstico e terapêutico que provê valiosas informações para determinar a necessidade de quimioterapia adjuvante no estágio II do câncer colo-retal.

3.1.5.3. Índice de Prognóstico Inflamatório e Nutricional

O Índice de Prognóstico Inflamatório e Nutricional (IPIN) constitui-se na relação entre dois marcadores de desnutrição (albumina e pré-albumina) e dois marcadores de processo inflamatório (alfa-1-glicoproteína ácida e proteína C-reativa), expressa em valores e categorizados em uma escala que avalia a intensidade da inflamação/desnutrição. Foi proposto em 1985 por Ingenbleek e Carpentier.

Inicialmente o IPIN foi usado em pacientes críticos, especificamente em portadores da Síndrome da Anorexia Caquexia, e nestes, o IPIN mostrou ser um sensível e específico marcador para detecção simultânea de mudanças recentes no estado nutricional e inflamatório (NELSON; WALSH, 2002). Ingenbleek e Carpentier (1985) sugeriram que o IPIN poderia ser usado no seguimento de outras situações de doença, tanto em adultos como em idosos (BONNEFOY, et. al., 1998). Já foram conduzidos estudos avaliando indivíduos com câncer avançado (WALSH; MAHMOUD; BARNA, 2003), em hemodiálise (DESSI, et. al., 2009), entre outros. Quando os indivíduos acometidos de câncer avançado apresentaram anorexia e perda de peso, estes foram classificados nos escores aumentados de IPIN; sendo que houve correlação dos escores de IPIN com os níveis séricos de IL-6 e PCR (WALSH; MAHMOUD; BARNA, 2003).

Ingenbleek e Carpentier em 1985 obtiveram escores do IPIN que variaram entre 0,47 em adultos saudáveis e 236 em adultos que tiveram infecção e subsequentemente morreram. O prognóstico é definido pelos valores: >30 = paciente com risco de morte; entre 21 e 30 = paciente com alto risco de complicações; entre 11 e 20 = paciente com risco médio de complicações; 1-10 = paciente com baixo risco de complicações; <1 = paciente sem infecção/inflamação (INGENBLEEK; CARPENTIER, 1985).

Corrêa et. al. (2002) realizou uma comparação entre a relação PCR/albumina e o IPIN proposto por Ingenbleek e Carpentier visando redução de custo. Participaram do estudo 66 indivíduos de ambos os sexos (12 sadios e 54 portadores de diferentes doenças metabólicas) e concluiu que há possibilidade de substituição dos marcadores (α -1-glicoproteína ácida, ceruloplasmina, α -1-antitripsina, proteína ligadora do retinol, transferrina, transtiretina) mantendo-se o mesmo poder e sensibilidade para o prognóstico. A equivalência de valores classificatórios dos graus de risco de complicações do estresse inflamatório quando se utiliza a relação PCR/albumina é apresentada: sem risco= $<0,4$; baixo risco= 0,4-1,2; médio risco= 1,2 -2,0; alto risco = $>2,0$ (CORRÊA et. al., 2002).

3.2. ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3

3.2.1 Caracterização Bioquímica

Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos que podem ser representados pela fórmula R-COOH, onde R significa uma cadeia alquil composta de átomos de carbono e hidrogênio, geralmente não ramificados e com número par de átomos de carbono, e COOH constitui o grupo carboxila terminal (FAHY et al., 2005).

Ômega-3 é o nome dado a uma família de ácidos graxos, na qual a primeira insaturação encontra-se no carbono três. Quando formado por dezoito carbonos é denominado ácido alfa-linolenico (ALA) [18:3(n-3)]; por vinte, eicoisapentaenóico (EPA) [20:5(n-3)]; e por vinte e dois carbonos denomina-se docosahexaenóico (DHA) [22:6(n-3)], sendo o EPA e o DHA classificados como ácidos graxos ômega 3 de cadeia longa (HARDMAN, 2004).

3.2.2. Fontes Dietéticas

Apenas as plantas sintetizam ômega-3 com dezoito carbonos (ALA). Ele está contido em vários tipos de óleos (canola aproximadamente 11%; linhaça 57%; soja 8%) e em vegetais de folha verde escura (CALDER; DECKELBAUM, 2008).

Os ácidos graxos de cadeia longa são produzidos primariamente no ecossistema pelas algas. Os Peixes consomem algas e então são ricos em EPA e em DHA (ARTEMBURN; HALL; OKEN, 2006). A quantidade de ômega 3 contida nos peixes varia de acordo com a espécie diferenciando-os de acordo com a dieta, a temperatura da água e a estação do ano, de forma inter-relacionada. Em geral, os peixes gordos contêm de 1,5 a 3g de ômega 3 por porção média. Assim, o consumo de uma porção de peixe na semana vai equiparar a ingestão de EPA mais DHA de aproximadamente 0,2 - 0,45g por dia. É importante, também, perceber que quantidades diferentes do ácido graxo EPA e do DHA existem em diferentes espécies de peixe. Por exemplo, salmões contem duas vezes mais EPA do que DHA enquanto os atuns contêm o dobro de DHA em relação ao EPA (CALDER; DECKELBAUM, 2008). Os peixes com maior quantidade são: salmão, atum, truta, arenque, cavala, sardinha entre outros (ROYNETTE, et. al., 2004).

Visentainer et al. (2000) avaliou concentrações do ácido graxo EPA e de DHA em espécies de peixes marinhos da costa brasileira

(atum, bonito, olho de boi, cavalinha, sardinha e serra) em amostras de filé e de olho e observaram que os teores de DHA para uma determinada espécie foram sempre superiores no olho em relação ao filé, sendo o mesmo observado para o EPA em quatro das espécies (olho de boi, cavalinha, sardinha e serra). Observou-se que os teores de DHA foram superiores aos teores de EPA, exceto para a sardinha, e que a somatória dos níveis de EPA e DHA em filés foram maiores para as espécies sardinha e bonito, sendo média de 32,45% do total de lipídeo da sardinha e 30,5% do bonito. Estes valores mostram que estes peixes são uma boa fonte alimentar destes ácidos, especialmente a sardinha por ser uma fonte com preço acessível no Brasil. Moreira et al. (2003) avaliou concentrações de EPA e de DHA em cabeça de peixes de outras espécies brasileiras: matrinxã (*B. cephalus*), Piraputanga (*B. microlepis*) e Piracanjuba (*B. orbignyanus*), e encontrou valores de concentração inferiores aos analisados por Visentainer (< 2,5%). Meneses et al., (2008) analisou amostras de filés de peixes in natura de espécies de tainha (*Mugil cephalus*) e camurim (*Centropomus undecimalis*) e verificaram que a somatória do ácido eicosapentaenóico e do ácido docosahexaenóico foi maior na tainha (10,47 %).

3.2.3. Interconversão e Dose Resposta em Humanos

Organismos de mamíferos, diferentemente das plantas, não possuem as enzimas desaturases $\Delta 12$ e $\Delta 15$ necessárias para síntese do ácido graxo alfa-linoléico. ALA. Por essa razão, este ácido graxo poliinsaturado é considerado essencial (ROYNETTE, et. al, 2004). Os humanos têm um mecanismo enzimático que converte o ALA em outros ácidos graxos da família ômega-3 de cadeia alongada. A interconversão ocorre primariamente no fígado, no retículo endoplasmático e envolve uma série de enzimas elongases, que adicionam duas unidades de carbono ao ácido graxo, e enzimas desaturases, que inserem duplas ligações na molécula; a conversão final de ALA à DHA precisa de uma reação de β -oxidação (ARTEMBURN; HALL; OKEN, 2006).

A partir desse processo, os humanos podem obter os ácidos graxos EPA e DHA a partir de ALA. Desta forma, o EPA e o DHA não são ácidos graxos essenciais (ARTEMBURN; HALL; OKEN, 2006). No entanto, a interconversão de ácidos graxos é limitada em humanos e pode variar em subgrupos da população, de modo que a maneira mais

efetiva de aumentar um ácido graxo ômega-3 específico é fornecendo-o ao indivíduo (BURDGE; CALDER, 2005).

Óleo de peixe dietético, rico em EPA e em DHA, é rapidamente incorporado às células, primariamente na membrana fosfolipídica de células sanguíneas na posição sn-2, sugerindo que ele pode ter efeito em vários aspectos da função celular (SIMOPOULOS, 2002). Arterburn, Hall e Oken (2006), realizaram uma revisão sistemática de estudos sobre a suplementação de diferentes quantidades de ômega-3 e sua relação com a resposta plasmática em humanos, concluindo que: a suplementação de DHA triacilglicerol ou DHA etil ester apresenta aumento dose-dependente na concentração plasmática e aparente crescimento linear na concentração de EPA; a suplementação isolada de EPA etil ester ($\approx 4\text{g/dia}$) resulta em aumento significativo das concentrações de EPA no plasma e em fosfolipídeos, mas não mostra aumento significativo na concentrações de DHA - sendo consistente com o conceito de baixa interconversão enzimática de EPA para DHA - ; o óleo de peixe contendo combinação de EPA e DHA apresenta aumento consistente de ambos no plasma sendo que as concentrações aumentam de maneira linear, no entanto, o DHA parece ter uma dose de saturação em aproximadamente $1,2\text{g/dia}$; a suplementação conjunta de EPA + DHA + ALA evidencia que ALA é ineficiente em aumentar qualquer ácido graxo ômega-3 no plasma (ARTERBURN; HALL; OKEN, 2006). Bonatto (2008) encontrou aumento na incorporação plasmática de ácidos graxos de 3,2 vezes para EPA e 2,7 para DHA após suplementação de indivíduos em quimioterapia com dois gramas de óleo de peixe por oito semanas.

Estudos em cultura de células identificaram que a suplementação dietética de EPA e DHA podem também elevar as concentrações teciduais destes ácidos graxos. (ARTERBURN; HALL; OKEN, 2006). Em células imunes, Rees et. al. (2006) demonstraram que o aumento da ingestão de EPA e de DHA resultou em elevação dos respectivos ácidos graxos de maneira dose dependente nas membranas celulares. Yaqoob et. al. (2000) encontraram, após suplementação durante 12 semanas de $2,1\text{g}$ de EPA mais $1,1\text{g}$ de DHA em indivíduos saudáveis, picos de incorporação destes ácidos graxos em células imunes após quatro semanas; sendo que esta se mostrou ascendente durante todo o período de suplementação. Bonatto (2008) após suplementação com 2 gramas por dia de óleo de peixe durante oito semanas em indivíduos com doenças oncológicas verificou aumento de $1,6$ vezes na quantidade de EPA em neutrófilos e de $1,9$ de DHA, em

contraste com uma redução de 1,25 vezes na concentração de ácido araquidônico (AA).

3.3.4. Ingestão Adequada

A Ingestão Adequada (AI) estabelecida nas Dietary References Intakes (DRI's) para o ácido graxo alfa linolênico varia de 1,1g/dia para mulheres a 1,6g/dia para homens. Não existe limite máximo (UL) estabelecido (INSTITUTE OF MEDICINE, 2002), assim como não há valores recomendados pelas DRI's para EPA e DHA, apenas a indicação de que podem compor até 10% da quantidade estabelecida para o ácido graxo alfa linolênico. Isto porque, segundo o Comitê Técnico em Lipídeos, em 2002, não havia ainda evidências científicas que embasassem a recomendação. Entretanto, o mesmo Comitê realizou um workshop em junho de 2008 para analisar as novas evidências em doenças coronarianas, câncer e demências e concluiu que a recomendação deve ser de ingestão diária entre 250 e 500mg de EPA+DHA para prevenção de doença coronariana (HARRIS, et. al., 2009).

3.3.5. Modulação da Resposta Inflamatória

Ácidos graxos poliinsaturados têm inúmeras funções vitais no corpo humano. Como fosfolipídio estrutural de membranas celulares, eles modulam a fluidez da membrana, sinalização celular e interações celulares (ROYNETTE, et. al., 2004). DHA é o mais insaturado ácido graxo de membrana, sendo altamente flexível dentro desta e particularmente efetivo em acomodar mudanças transitórias associadas à ativação de proteínas de membrana (GAWRISH; ELDHO; HOLTE, 2003).

Os ácidos graxos poliinsaturados são responsáveis pela formação de eicosanóides: prostaglandinas (PGs), tromboxanos e leucotrienos (LTs), que são mediadores e reguladores da intensidade e duração da resposta inflamatória (TILLEI; COFFMAN; KOLLER, 2001). Assim, uma das formas de regulação da resposta inflamatória é através da regulação negativa da síntese de eicosanóides pró-

inflamatórios. Os ácidos graxos ômega-3 DHA, EPA, ALA e o ácido graxo AA (pertencente à família ômega-6) competem por incorporação em fosfolipídios de membrana. A proporção relativa destes ácidos graxos determina, após clivagem pela fosfolipase, a disponibilidade dele como substrato para a ciclooxigenase (COX) e a lipooxigenase (LOX) e, conseqüentemente, determina o equilíbrio entre eicosanóides. A membrana fosfolipídica normalmente contém níveis muito mais altos de AA que de EPA e DHA. Os ácidos graxos de 20 carbonos são mobilizados da membrana celular pela ação das fosfolipases A2 e C, e subseqüentemente metabolizado pela COX ou LOX. O AA é metabolizado em série 2 de prostaglandinas (PGE2) e tromboxanos, e série 4 de leucotrienos (LTB4). A metabolização de EPA gera eicosanóides derivados da COX que recebem o sufixo “3” e os da LOX o sufixo “5” (DUPERTUIS; MEGUID; PICHARD, 2007).

As séries pares geradas tendem a ser pró-inflamatórias e proliferativas em muitos tecidos. As séries ímpares produzidas pela mobilização de EPA e DHA – que são preferencialmente utilizados pelas enzimas COX e LOX - tendem a promover menor inflamação e proliferação, sendo menos favoráveis ao desenvolvimento e crescimento de células cancerígenas (SIMOPOULOS, 2002; HARDMAN, 2004). Dentre as ações pró-inflamatórias de LTB4 está o aumento de produção de IL-6, IL-1 e TNF- α , assim como o aumento de IL-6 está entre as ações pró-inflamatórias da PGE2(TILLEI; COFFMAN; KOLLER, 2001).

Recentemente a PGE2 tem sido apresentada como inibidor de duas clássicas citocinas pró-inflamatórias, a IL-1 e TNF- α . Assim, este eicosanóide parece ser responsável por ações pró e antiinflamatórias, e conseqüentemente alguns eicosanóides derivados de AA podem ser importantes para a resolução da inflamação (CALDER, 2009). Miles, Allen e Calder (2002) demonstraram que PGE2 e PGE3 têm efeito inibitório equivalente sobre a produção de IL-1 por células mononucleares humanas, sugerindo que EPA e AA não possuem sempre diferentes propriedades.

Estudos têm descrito novos grupos de mediadores lipídicos: as resolvinas, protectinas e as lipoxinas. Estas são consideradas moléculas endógenas pró-resolução, pois promovem absorção e eliminação de microorganismos e células apoptóticas pelos macrófagos nos locais de inflamação. Resolvinas e protectinas são biossintetizadas a partir dos ácidos graxos ômega-3 de cadeia longa (EPA e DHA), e lipoxina a partir de AA (SERHAN; CHIANG; VAN DIKE, 2008). Os neutrófilos dentro do exudato podem mudar seu fenótipo para gerar mediadores de

proteção derivados de ácidos graxos a fim de promover resolução e retorno da homeostase (SERHAN, 2009).

Os mediadores formados a partir de EPA são gerados por uma série de reações envolvendo COX2 e LOX5 e são denominados Resolvinas-E. Estes mediadores parecem exercer potente ação antiinflamatória em: neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e células T (figura 2) (CALDER, 2009; SEKI, TANI, ARITA, 2009).

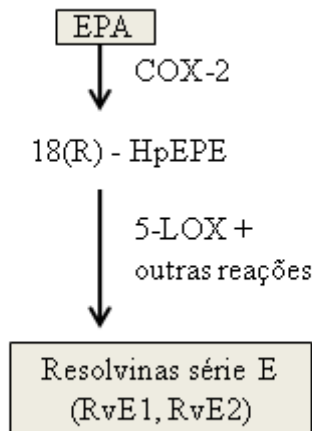


Figura 2. Via de síntese de Resolvinas-E através de EPA.

Fonte: Adaptado CALDER, 2009.

Os mediadores derivados de DHA são denominados Resolvinas D e são produzidos por vias similares. Apresentam potente ação na inibição da infiltração por neutrófilos (SHERHAN; CHIANG; VAN DIKE, 2008). Estes achados tornam DHA tão importante quanto EPA na modulação da resposta inflamatória (CALDER, 2009). O DHA é ainda convertido em outra molécula chamada protectina. Estas são distinguidas pela presença de três duplas ligações conjugadas. Possuem potente bioatividade no bloqueio da ativação de neutrófilos e na redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias (SHERHAN; CHIANG;

VAN DIKE, 2008; SHERAN, 2009). A combinação de moléculas pró-resolução e antagonistas das vias COX e LOX parece ser uma boa estratégia para recuperação e restauração do controle da inflamação (SHERHAN; CHIANG; VAN DIKE, 2008).

Mediadores da resposta inflamatória também podem interferir na apoptose celular via NF- κ B. Quando ativado, o fator de transcrição nuclear B, bloqueia a morte celular e apoptose, sendo frequentemente super regulado em células cancerígenas, resultando em células que são resistentes aos fármacos quimioterápicos ou à radiação e não morrem em resposta ao dano genético que tenha ocorrido (KARIN, 2006). Estudos sugerem efeitos diretos do ácido graxo ômega-3 e seus mediadores inflamatórios sobre a expressão genética através da inibição da ativação de NF- κ B; EPA e DHA, enquanto mediadores da expressão gênica, são responsáveis por regulação negativa destes (NOVAK, 2003).

3.3.6 Imunomodulação

O sistema imune tem duas divisões funcionais: imunidade inata ou natural e a adquirida ou adaptativa. A resposta inata é a primeira linha de defesa contra agentes infecciosos; ela consiste em barreira física (pele), fatores solúveis e células fagocíticas. Não possui memória, sendo ativada pela exposição a agentes infecciosos. A resposta imune adquirida envolve linfócitos e é altamente específica. (CALDER, 2007). Os fosfolipídios de células imunes (neutrófilos, linfócitos, monócitos) de humanos que consomem uma típica dieta ocidental contêm aproximadamente 20% dos ácidos graxos na forma de AA e aproximadamente 1% como EPA e 2,5% como DHA (REES, et. al., 2006).

Os ácidos graxos realizam uma variedade de papéis nas células imunes. Eles agem como: combustíveis para geração de energia; componentes da membrana fosfolipídica contribuindo para atividades físicas e funcionais da membrana; modificações covalentes na estrutura de proteínas influenciando a localização celular e função das proteínas; regulação da expressão genética e de seus efeitos na atividade de receptor, no processo de sinalização intracelular e na ativação do fator de transcrição; precursores para síntese de lipídios bioativos como prostaglandinas (PGs), leucotrienos (LTs), lipoxinas e resolvinas. Mudança na composição dos fosfolipídeos da membrana pode alterar as

funções citadas. Como resultado destes efeitos, ativação do fator de transcrição pode ser alterada e a expressão de genes modificada (CALDER, 2007; CALDER, 2008).

Além das vias de modulação já descritas e comuns às demais células envolvidas na inflamação, a incorporação dos ácidos graxos ômega-3 nos fosfolípidos de células imunes está envolvida em outras vias de resposta. Estudos *in vitro* têm demonstrado que alterações nos fosfolípidos de membrana de fagócitos modificam sua capacidade fagocítica. A ingestão diária de 1,5g de EPA mais DHA por seis meses por humanos voluntários saudáveis aumentou a atividade fagocitária de neutrófilos em 40% e de monócitos em 200% (KEW et. al., 2003). Bonatto (2008) avaliou o efeito da suplementação de 2g/dia de óleo de peixe durante oito semanas por indivíduos em quimioterapia, e verificou aumento da incorporação de EPA e DHA nos neutrófilos e no plasma e aumento de 1,87 vezes na atividade fagocitária de neutrófilos quando comparada ao grupo controle.

Outra função das células imunes que pode ser modulada pela incorporação de ácidos graxos w-3 de cadeia longa é a apresentação de antígenos. Sanderson, et. al. (1997) mostraram que ratos alimentados com ração rica em óleo de peixe apresentavam diminuição de expressão de MHC classe II em células dendríticas o que foi associado a diminuição na capacidade de apresentar antígenos a células do timo sensibilizadas. Recentemente, tem-se evidenciado efeito de ácidos graxos polinsaturados na expressão de MHC classe I (CALDER, 2008).

3.3.7. Ácidos Graxos ômega-3 e a Terapia do Câncer

Estudos com ácido eicoisapentaenóico têm evidenciado a inibição do processo inflamatório *in vivo*, assim como tem evidenciado associação com ganho de peso, melhor resposta à terapêutica, menores complicações e frequente aumento da sobrevida em pacientes com câncer (ELIA, et.al., 2006; JHO, et. al., 2004). Ingestão dietética de ácidos graxos ômega-3 tem sido co-relacionada com supressão de transformação neoplásica, angiogênese e crescimento de células tumorais (SIMOPOULOS, 2002). Estudos com culturas de células e em animais têm relatado a habilidade dos ácidos graxos ômega-3 de diminuir a citotoxicidade de algumas drogas anti câncer. Na terapêutica do câncer de cólon, combinação de emulsão de ômega-3 com 5-Fluoracil resultou em efeito inibitório aditivo na linhagem de células

Caco-2, sendo este achado reproduzido em diferentes linhagens de células de câncer de cólon (LS174T, Colo 320, HT-29, Colo 205) (JORDAN, STEIN, 2003).

Em estudo conduzido por Burns, et al. (2004), pacientes com câncer avançado, perda de peso $\geq 2\%$ no último mês e que estavam em tratamento quimioterápico ou radioterápico (n= 43) foram suplementados com altas doses de ômega-3 (8,5 g EPA e DHA, divididos em 11 cápsulas, para indivíduo com 70 kg). A média de tempo de tratamento foi 1,2 meses embora o planejamento fosse de dois meses. A interrupção ocorreu devido intolerância individual a dose. A média de perda de peso foi de 0,8 kg, sendo que 24 pacientes apresentaram estabilização (BURNS, et. al., 2004).

Courtnei, et al. (2007) usaram suplementação encapsulada de EPA na quantidade total de dois gramas por dia por três meses, em 14 pacientes com adenoma colo-retal. Doze indivíduos relataram não apresentar nenhum efeito colateral e dois relataram diarreia, sendo que o quadro melhorou com redução da dose para 1g e 1,5g. Ocorreu aumento significativo de ácido graxo EPA na mucosa colônica dos pacientes suplementados e esta elevação foi associada com redução significativa da proliferação e aumento da apoptose na mucosa comparado ao grupo controle (COURTNEI, et. al., 2007).

Foram identificados dois estudos visando terapia nutricional com óleo de peixe em pacientes com câncer colo-retal durante quimioterapia:

Read et. al. (2007) avaliaram o impacto de um suplemento hipercalórico, hiperproteico e rico em EPA durante 12 semanas (três semanas antes de iniciar a quimioterapia e nove semanas durante a QT), em 23 pacientes com câncer colo-retal avançado. Eles foram orientados a consumir duas unidades/dia do suplemento, que fornecia 2.18g de EPA e 0,92g de DHA. Quinze pacientes concluíram os três ciclos de QT tomando o suplemento. O reflexo sobre a massa corporal foi de aumento de 2,5 kg no período pré-quimioterapia e estabilização durante a quimioterapia. A PCR aumentou significativamente entre o início e a terceira semana de suplementação, com posterior diminuição significativa durante a quimioterapia. Apenas três das 16 citocinas avaliadas foram alteradas significativamente durante a suplementação, com correlação entre sobrevida e valores médios de IL-10 e IL-6 e entre toxicidade e IL-12. Foi encontrado correlação entre níveis basais de IL-6 e PCR (READ, et. al., 2007).

Bonatto (2008) avaliou também o estado nutricional dos indivíduos em tratamento oncológico. Dos 19 pacientes que foram

suplementados com dois gramas de óleo de peixe encapsulado por oito semanas, dez tinham doença localizada em colo e ou reto. Não houve diferença estatística no peso dos pacientes com e sem suplemento; no entanto, dos 19 indivíduos suplementados, 12 apresentaram ganho de peso e dois mantiveram; dentre os não suplementados treze apresentaram redução de peso e seis ganharam peso.

4. MÉTODO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

Estudo clínico, controlado, randomizado.

4.2 AMOSTRA DO ESTUDO

A amostra foi de conveniência, determinada por saturação temporal (novembro, 2009 a junho, 2010), foi constituída por indivíduos com idade acima de 18 anos, de ambos os sexos, com diagnóstico de câncer colo-retal, atendidos no ambulatório do Centro de Pesquisas Oncológicas de Florianópolis (CEPON) e que estivesse data de início do tratamento quimioterápico dentro do período estipulado.

Critérios de inclusão: Idade superior a dezoito anos; possuir diagnóstico de neoplasia colo-retal; estar apto a iniciar tratamento quimioterápico no CEPON; aceitar participar das avaliações antropométrica, dietética e bioquímica assinando o termo de consentimento livre e esclarecido.

Critérios de exclusão: ter idade inferior a dezoito, estar em tratamento paliativo, estar com prescrição de dieta parenteral, possuir diagnóstico de doença infecto-contagiosa, ser alérgico a peixe e derivados.

A triagem de indivíduos aptos a participar do estudo foi realizada pelo médico, durante atendimento ambulatorial, com encaminhamento ao setor de nutrição, ou no setor de quimioterapia através de consulta nas guias de solicitação de liberação. No setor de nutrição os indivíduos tiveram conhecimento do estudo, receberam informações quanto ao delineamento e foram convidados a participar dele. A assinatura do termo de consentimento livre esclarecido (apêndice A) pelos indivíduos que aceitaram participar da pesquisa aconteceu no primeiro dia, sendo precedida pela leitura conjunta (nutricionista e paciente).

4.3. GRUPOS DO ESTUDO

Os indivíduos foram alocados, de forma randomizada, em dois grupos: Grupo suplementado (GS) e grupo não suplementado (GNS). O GS foi composto por pacientes que receberam suplemento nutricional de óleo de peixe. A quantidade diária estabelecida foi de dois gramas de óleo de peixe, sendo 609 miligramas (mg) de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa da família ômega-3 [366,66 mg de ácido eicosapentaenóico (EPA) e 242,66 mg de ácido docosahexaenóico (DHA)], durante nove semanas.

A alocação no grupo suplementado ou não, foi realizada de acordo com o dia do mês em que o indivíduo foi encaminhado ao setor de nutrição ou foi identificado pela nutricionista no serviço de quimioterapia: se dias pares foram alocados no GS, se dias ímpares no GNS.

4.4. CARACTERIZAÇÃO DO SUPLEMENTO NUTRICIONAL DE ÓLEO DE PEIXE

A suplementação do óleo de peixe foi realizada através do consumo de 4 cápsulas de 500 mg por dia. Cada capsula fornece aproximadamente 4,3 quilocalorias, são compostas por gelatina e glicerina e contem 160 mg de gordura saturada, 130 mg de gordura monoinsaturada, 200mg de poliinsaturada, além dos 150mg de EPA + DHA e 3mg de colesterol. As cápsulas contêm vitamina E (α -tocoferol), como antioxidante. O produto é registrado no Ministério da Saúde na categoria de alimento com o número: 6.2358.0006.001-4 (Ômega-3, 2009).

4.5. DELINEAMENTO DO ESTUDO

O presente estudo foi dividido em dois momentos assim delineados: (figura 3).

Pré-suplementação (T1): Caracterizado pela identificação de todos os indivíduos, assim como avaliações antropométricas e da resposta inflamatória. Os indivíduos receberam as guias de solicitação de exames (anexo A) e foram orientados a comparecer ao Laboratório Médico Santa Luzia® para coletas de sangue e realização das análises clínicas. Os pacientes do GS receberam as cápsulas de óleo de peixe e as orientações de consumo, tanto verbalmente como impressas.

Pós-suplementação (T2): Localização temporal em nove semanas após T1. Caracterizado pela repetição das avaliações antropométricas e da resposta inflamatória. Todos os indivíduos receberam as guias de solicitação de exames (anexo A) e foram orientados a comparecer ao laboratório de análises clínicas já citado para realização da coletas de sangue.

O recordatório de frequência de consumo de peixes foi realizado no T1. Também foi aplicado um recordatório alimentar de 24h em T1, outros dois foram realizados dentro de um período de 30 dias.

O pesquisador e colaboradores mantiveram contato com os sujeitos durante o estudo. O contato foi realizado na instituição onde eles realizam o tratamento quimioterápico (CEPON) a cada sessão de quimioterapia – normalmente semanal - e via ligação telefônica, uma vez por semana.

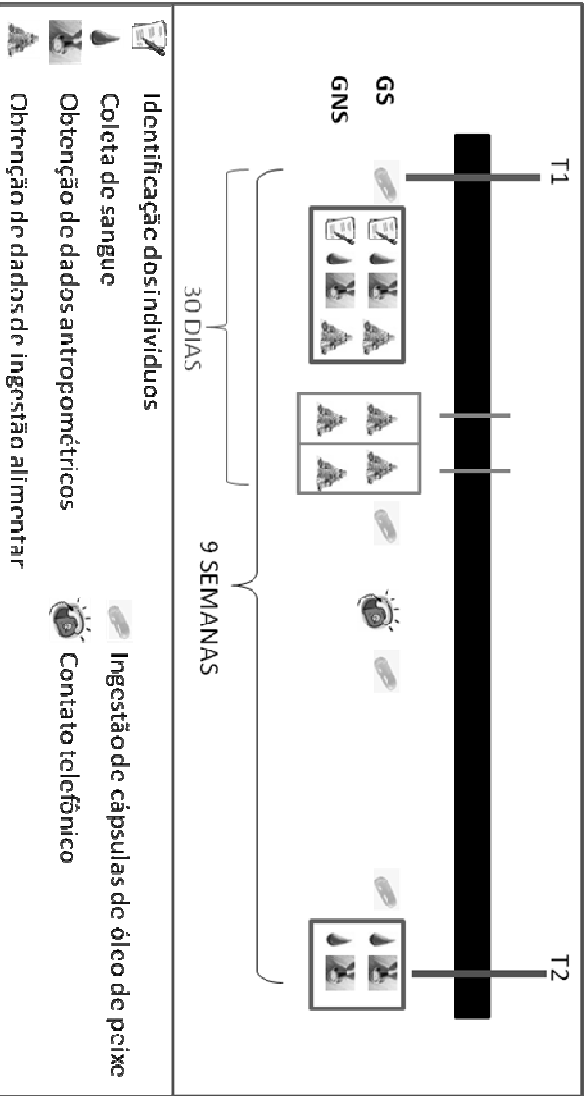


Figura 3. Delimitação do estudo. Florianópolis – SC, 2011

4.6. INSTRUMENTO E TÉCNICAS DE COLETA DE DADOS

4.6.1 Identificação dos indivíduos

Os indivíduos da amostra foram identificados por meio de anotações, no instrumento de coleta de dados da pesquisa (apêndice B), dos seguintes dados pessoais: nome completo, sexo, data de nascimento, procedência, endereço residencial, telefone e e-mail, número de prontuário no CEPON; assim como, os seguintes dados clínicos: localização do tumor, estadiamento, fármacos utilizados, protocolo quimioterápico, comorbidades.

4.6.2 Avaliação do estado nutricional

Para a avaliação do Estado Nutricional foram realizadas aferições antropométricas de peso e estatura

4.6.2.1. Peso e estatura

O peso e a estatura foram aferidos com o avaliado descalço, com vestes leves utilizando-se balança eletrônica da marca Toledo, com plataforma e capacidade máxima de 150 quilogramas (kg) em escala de 100 gramas (g) e régua antropométrica acoplada de 2,0 metros (m) (Toledo Brasil em São Bernardo do Campo, SP). O indivíduo avaliado posicionou-se em pé na posição ereta, pés afastados à largura do quadril com o peso dividido em ambos os pés, com a cabeça posicionada de forma que a linha de visão seja perpendicular ao corpo (WHO, 1995).

O Índice de Massa Corporal (IMC) foi calculado por meio da fórmula $IMC = P/(A)^2$, sendo P = peso (em quilogramas) e A = altura² (metros)/ kg/m². Para a classificação do estado nutricional segundo o IMC foram utilizados os pontos de corte recomendados para população adulta (WHO, 1998): $IMC < 18,5$ = baixo peso; $18,5 \geq IMC < 25$ = eutrofia; $25 \geq IMC < 30$ = sobrepeso; $IMC \geq 30$ = obesidade e para população idosa utilizou-se os seguintes pontos de corte: baixo peso ($IMC < 23$ kg/m²), peso normal ($23 < IMC < 28$ kg/m²), pré-obesidade

($28 < \text{IMC} < 30 \text{ kg/m}^2$) e obesidade ($\text{IMC} > 30 \text{ kg/m}^2$), de acordo com a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS, 2001).

4.6.3. Avaliação da resposta inflamatória

4.6.3.1. Coleta do sangue

Segundo o protocolo do laboratório de análises clínicas, os indivíduos foram orientados a realizar oito horas de jejum antes da coleta do sangue. As amostras dos pacientes foram obtidas por punção venosa na região cubital do antebraço utilizando tubos a vácuo. Em seguida o sangue total foi centrifugado, separado, e uma alíquota de soro foi armazenada em freezer -200C para as dosagens das citocinas.

4.6.3.2. Citocinas

No dia do ensaio, as amostras foram descongeladas em geladeira e imediatamente realizou-se a técnica de Enzimaímuoensaio (ELISA) fase sólida, método sanduíche. Para cada citocina, utilizaram-se anticorpos monoclonais específicos, anti- TNF- α , anti- IL- 1 β e anti-IL-6 (BD Biosciences, SanJose, CA).

As sensibilidades identificadas nos kits foram: TNF- α = 2,0 pg/mL, IL- 1 β = 0,8 pg/mL e IL-6 = 2,2 pg/mL. Os coeficientes de variação (CV) intra e interensaios descritos pelo fabricante dos kits foram: intra CV: TNF- α = $4,90 \pm 3,67\%$, IL-1 β = $2,01 \pm 2,80\%$ e IL-6 = $7,27 \pm 6,70\%$; inter CV: TNF- α = $8,83 \pm 6,13\%$, IL-1 β = $4,00 \pm 4,51\%$ e IL-6 = $7,70 \pm 9,37\%$. Curvas-padrão com concentrações conhecidas de cada citocina, TNF- α (0 - 500 pg/mL) (Cat. N0. 550610), IL-1 β (0 - 125 pg/mL) (Cat. N0. 557966)e IL-6 (0 - 300 pg/mL) (Cat. N0. 550799) também tiveram suas densidades óticas determinadas, permitindo a quantificação dos valores desconhecidos com o auxílio da equação da reta. As leituras de todas citocinas e suas respectivas curvas-padrão foram realizadas em leitor de ELISA (TP-Reader, Thermo Plate, China). Os valores foram expressos em pg/mL.

4.6.3.3. Proteína C-reativa

Para análise foram utilizadas amostras de soro humano completamente coagulado e sem vestígios de fibrina ou partículas após a centrifugação. O reagente utilizado foi o CardioPhase® hsCRP.

Os valores de proteína C-reativa foram expressos no intervalo de medição altamente sensível (hsPCR) e mensurados pelo método ultra sensível de imunonefelometria de partículas reforçadas pelo sistema BN (marca comercial da Siemens Healthcare Diagnostics/ Malburg, Germany).

A quantificação de PCR pelo método de nefelometria fundamenta-se na determinação do movimento das partículas numa solução (turbidez), formadas pelos complexos antígeno-anticorpo (PCR ligada ao anticorpo monoclonal anti-PCR). Nesta técnica, partículas de poliestireno revestidas com anticorpo monoclonal de camundongo contra a PCR humana, formam aglutinados quando colocadas frente a uma amostra que contenha PCR. Um feixe de luz incidente passa pela cuveta onde está ocorrendo a reação antígeno-anticorpo com conseqüente formação de aglutinados, e sofre então uma dispersão proporcional à concentração dos aglutinados no tubo. O feixe de luz que sofre a dispersão é detectado por sensores que o transformam em um sinal. Este sinal, plotado na curva de calibração, determinará a concentração de PCR da amostra na unidade desejada. A concentração de PCR na amostra é diretamente proporcional ao feixe de luz disperso e conseqüentemente ao sinal detectado pelos sensores (LUHR e MODI, 2003).

Foram seguidas todas as recomendações solicitadas pelo fabricante referentes ao preparo das amostras de soro e dos reagentes antes do processo analítico. Os protocolos do ensaio estão contidos no manual de utilização e no software do respectivo instrumento.

Foram considerados como valores normais os níveis inferiores a 3 mg/dl e como valores aumentados, os níveis acima de 3 mg/dl. O cálculo dos resultados da análise foi efetuado automaticamente em mg/L.

4.6.3.4 Albumina

A concentração de albumina sérica foi determinada quantitativamente pelo método colorimétrico de verde de bromocresol (DOUMAS, WATSON E BIGGS, 1971). O procedimento consistiu em adicional 25µL do soro em 5 mL do reagente de cor, contendo solução de verde de bromocresol (Merck), tampão succinato 0,1M (Merck) e surfactante não iônico 35% em pH 4,0. O complexo albumina-bromocresol foi medido como uma reação de ponto final a 596/694 nm (ADVIA Chemistry system, Siemens Diagnostics). Valor de referência adotado de 3,2 a 4,8 g/dL.

4.6.3.5. Relação Proteína C-reativa/Albumina

O Prognóstico Inflamatório e Nutricional foi avaliado pela interpretação dos valores obtidos da relação PCR/Albumina segundo a equivalência de valores classificatórios dos graus de risco de complicações: sem risco= <0,4; baixo risco= 0,4-1,2; médio risco= 1,2 - 2,0; alto risco = >2,0 (CORRÊA et. al., 2002).

4.7 MODELO DE ANÁLISE

4.7.1 Definição das variáveis e seus indicadores

Tabela 2 – Variáveis, suas características e indicadores utilizados para o modelo de análise.

Variáveis	Classificação	Indicadores
Consumo de óleo de peixe	Dependente Dicotômica, nominal	Sim Não
Sexo	Independente Dicotômica, Nominal	Feminino Masculino

Idade	Independente Contínua	anos
Estágio da doença	Independente Dicotômica	2 = (T3-4, N0, M0) ou 3 = (qualquer T, N1-2, M0) 4 = (qualquer T, qualquer N, M1)
Localização primária do tumor	Independente Dicotômica, Nominal	<u>Colo</u> Reto
Frequencia de consumo de peixe	Independente Dicotômica, Nominal	<u>Frequente= mais de uma vez na semana</u> Baixo= menos de uma vez na semana.
Peso	Independente Contínua	kg
IMC	Independente Contínua	kg/m ²
Albumina sérica	Independente contínua	g/dL
Proteína C Reativa	Independente contínua	mg/L
IL-6	Independente contínua	pg/mL
IL-1 β	Independente Contínua	pg/mL
TNF- α	Independente contínua	pg/mL
Relação PCR/Albumina	Dependente Quantitativa, Intervalar	<u>sem risco= <0,4;</u> <u>baixo risco= 0,4-1,2;</u> <u>médio risco= 1,2 -2,0;</u> alto risco = >2,0
Relação PCR/Albumina	Independente Contínua	-

4.8. TRATAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Os dados foram organizados e registrados em banco de dados no programa Excel[®] 2007. A análise estatística dos dados foi realizada no programa estatístico *STATA 11.0* (STATA Corporation, College station, EUA).

O teste Exato de Fisher foi usado para verificar diferença entre as variáveis dicotômicas no momento inicial entre os dois grupos independentes (GS e GNS).

As variáveis paramétricas foram descritas e apresentadas em média e desvio padrão da média, as diferenças foram testadas pelo teste T as variáveis não paramétricas foram apresentadas em mediana e intervalo interquartil e as diferenças testadas pelo teste Mann-Whitney. Para verificar a diferença entre a relação PCR/albumina entre os momentos foi utilizado o teste pareado de Wilcoxon.

Para todos os testes, foi adotado o nível de significância de 95% ($P < 0,05$).

A relação PCR/Albumina foi comparada com escores de risco propostos por Corrêa et al. (2002): sem risco = $< 0,4$; baixo risco = $0,4-1,2$; médio risco = $1,2-2,0$; alto risco = $> 2,0$.

4.9. PROCEDIMENTOS ÉTICOS DA PESQUISA

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do Centro de Pesquisa Oncológicas de Florianópolis, na data de vinte e quatro de agosto de dois mil e nove. O registro tem o número de protocolo: 0005/2009. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido encontra-se no apêndice A.

5.0. MANUSCRITO 1

Será submetido ao periódico Nutrition and Câncer (A2), FI=2,06.

Title: Fish oil supplement alters markers of inflammatory and nutritional status in colorectal cancer patients

Pastore-Silva, Juliana de Aguiar¹, Trindade, Erasmo Benício santos de Moraes¹, Fabre, Maria Emilia de Souza², Menegotto, Vicente Martorano², Gevaerd, Sheila², Buss, Ziliane da Silva³, Frode, Tânia Silvia³

¹Departament of Nutrition – Federal University of Santa Catarina, Brazil.

²Center of Oncology Research – Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

³ Department of Pharmacology – Federal University of Santa Catarina, Brazil.

Abstract

Inflammation is a common feature in cancer. The presence and magnitude of the chronic systemic inflammatory responses may produce progressive nutritional decline. This study aims investigate whether there are changes in inflammation markers and/or in nutritional status of patients with colorectal-cancer undergoing chemotherapy who were supplemented with fish oil. The clinical trial was conducted with an equally randomized, 23 patients parallel-group. The supplemented group (SG) consumed 2 grams of fish oil during nine weeks. Nutritional and inflammatory markers status were available both in a baseline (M0), and after nine weeks of chemotherapy (M9) in the SG and in the non supplemented group (NSG). Statistical analysis was conducted in the STATA 11.0 software. Fisher's exact-test was used with categorical variables, T-test for parametric variables, and Mann-Whitney for non parametric variables. C-RP/Albumin was compared with the score risk. SG and NSG presented the same baseline characteristics ($p>0,05$). Body mass index and body weight, nutritional status indicators, suffered modifications only in the group NSG when comparing M1 and M2, $p=0.03$ and $p=0.01$ respectively, while in SG these indicators did not varied. Patients supplemented with fish oil (SG) showed a clinically relevant decrease in the C-reactive protein/albumin relation. Low doses of fish oil supplement can positively modulate the nutrition status and the C-RP/Albumin relation.

Key-words: fish oil, colorectal cancer, inflammation, nutritional status

Introduction

In 1863, Rudolf Virchow created a hypothesis that cancer originated at sites of chronic inflammation, after observing leukocytes in neoplastic tissues.

The connection between cancer and inflammation was made in the nineteenth century, on the basis of observations that inflammatory cells were present in biopsy samples from tumors, and that tumors often arose at sites of chronic inflammation (1).

The molecular pathways of this cancer-related inflammation are being unraveled, resulting in the identification of new targets of new molecules that could lead to improved diagnosis and treatment. In some types of cancer, inflammatory conditions are present before the malignant kind. In all of them, there is the activation of various types of oncogenes by mutation, chromosomal rearrangement or amplification, and the inactivation of tumour-suppressor genes. The transformed cell produces inflammatory mediators, thereby generating an inflammatory microenvironment in the tumors. Regardless its origin, cancer-related inflammation results in the activation of transcription factors, mainly nuclear factor- κ B (NF- κ B), hypoxia-inducible factor 1 α (HIF1 α), signal transducer and activator of transducer (STAT3). These transcription factors coordinate the production of inflammatory mediators, including cytokines that activate the same key transcription factors in inflammatory, stromal and tumour cells, resulting in more inflammatory mediators being produced (2). This pro-inflammatory microenvironment has many tumor-promoting effects: it promotes angiogenesis and metastasis, inhibits adaptative immune responses, and alters responses to hormones and chemotherapeutic agents. Chemokine receptors and their ligands direct the movement of the cells during inflammation by affecting cell motility, invasiveness and survival (3).

A pro-inflammatory state is readily identified by elevations in acute phase proteins such as C-reactive protein (C-RP) and α -1 acid glycoprotein (α -1AGP). Furthermore, elevated C-RP can predict poorer survival for colorectal cancer patients, as a prognostic and therapeutic marker (4-7). The ratio of C-RP/albumin was proposed by Corrêa et al (2002) in order to evaluate the extension of malnutrition/inflammation, and the ratio was based on the Prognostic Inflammatory Nutritional Index (PINI) of 1985 (8).

The consumption of dietary fish oil rich in long-chain n-3 PUFAs, eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5) and docosahexaenoic acid

(DHA, 22:6) might be an effective adjuvant therapy in colon cancer. Preliminary results (in cell culture and tumor-bearing animals) indicate that the pleiotropic effects on n-3 PUFAS may act synergically with radio/chemotherapy to kill tumor cells and reduce angiogenesis and metastasis (9-10). Apparently their action involve different mechanisms: alteration of membrane phospholipid composition and functionality of lipid microdomains, metabolic interconversion into bioactive eicosanoids, and modulation of nuclear receptor activation (10). EPA and DHA have also got a potential anti-inflammatory and anti-angiogenic effect through inhibition of important mediators: vascular endothelial growth factor (VGEF), platelet-derived growth factor (PDGF), cyclo-oxygenase 2 (COX-2), prostaglandin-E2 (PGE-2), nitric oxide, NF- κ B (11). Bouwens et al. (2009) have recently shown that the intake of EPA+DHA for 26 weeks can alter gene expression profiles of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) to a more anti-inflammatory and anti-atherogenic status, promoting beneficial effects on human immune cells (12). Several trials have been investigating the possibility that nutritional supplements containing EPA + DHA are beneficial to reduce cancer-associated weight loss in patients with advanced malignances. However, the results have been contradictory and literature failed to find sufficient evidence of dose and time of administration (13).

A new strategy for colon cancer has been developed based on the combination of anticancer agents and dietary long chain fatty acids. In mice, fish oil does not interfere with the action of chemotherapy, and EPA enhanced the tumor growth inhibition carried by 5-fluoracil (14).

The aim of the current study was to check whether there is a change in the markers of inflammation and/or nutritional status of patients with colorectal cancer undergoing chemotherapy that were supplemented with 2 grams of fish oil, compared with the non supplemented ones.

Subjects and Methods

Study Participants

Were conduct a clinical trial with parallel-group equally randomized (1:1 for two groups).Subjects were recruited from the Oncology Research Center in Florianopolis, Santa Catarina, Brazil. Patients were eligible for the study if they had been diagnosed with

colorectal cancer, and if they would begin chemotherapy. Inclusion criteria included being over eighteen years old, taking part in the anthropometrics, dietary and biochemical assessment, and signing an informed consent form. Exclusion criteria included subjects under eighteen years old; subjects included in palliative care or in parenteral nutrition; subjects who were allergic to fish and fish products; and the ones who presented autoimmune diseases.

The sample size was defined by saturation time, in the period between November of 2009 and July of 2010. If patients agreed to be involved in the study, they would be included randomly (according to the day of the month they were referred to the nutrition sector - if it was in an even day, they would be allocated in the "supplemented group" (SG), if it was in an odd day, they would be allocated in the "non supplemented group" (NSG)) in each experimental group.

The protocol of this study was approved by the Oncology Research Center Ethics Committee and it agrees with the *World Medical Association-Helsinki Declaration* (15). All participants were informed about the study and provided with written informed consents before they began.

Dietary supplement

The fish oil supplement is offered in a unit with 500 mg per capsule. Each provides approximately 4.3 kilocalories. The capsules are composed of gelatin and glycerin and contain 160 milligrams of saturated fatty acids, 130 mg of monounsaturated fatty acids, 200 mg of polyunsaturated fatty acids of which 150 mg are of EPA + DHA, and 3 mg of cholesterol. Capsules also contain vitamin E (α -tocopherol) as an antioxidant. The product is registered in the Ministry of Health - Brazil, in the food category, with the following numbers: 6.2358.0006.001-4 (16).

Intervention

All participants of the SG were instructed to consume, in addition to their regular diet, four capsules of fish oil supplement per day – totaling 600 mg of EPA + DHA-, during nine weeks. Patients received counseling on how to consume the capsules, verbally and written, and were instructed to record supplement intake in a diary. The beginning of the supplementation is the first day of chemotherapy. To

ensure the compliance to the study, researchers contacted the patients weekly via phone and inside the institution, in the chemotherapy days.

Measurements

All the patients were included in the measurements. Data for the assessment of inflammatory processes and nutritional status were collected in two moments: before chemotherapy (baseline = M0) and after nine weeks (9Wks = M9).

The blood was collect in clinical analyses laboratory, in M9 was collected one or two days after the last chemotherapy session.

To assay cytokines, the blood was centrifuged, separated, and an aliquot of serum was stored in a -20° C freezer. On the testing day, samples were thawed in the refrigerator and the immunoassay technique (ELISA) solid phase - sandwich method - was immediately initiated. For each cytokine, specific monoclonal antibodies, anti-TNF- α , anti-IL-1 β and anti-IL-6 (BD Biosciences, San Jose, CA) were used. The readings of all cytokines and their respective standard curves were performed in the ELISA reader (TP-Reader, Thermo Plate, China). Values are expressed in pg / mL.

The C-reactive protein was measured using Regent CardioPhase hsC-RP[®] and the immunonephelometry ultra sensitive particle method enhanced by the BN (trademark of Siemens Healthcare Diagnostics / Malburg, Germany), expressed values in highly sensitive measurement range. Albumin was determined by the Doumas, Watson and Biggs method, using a solution of green bromocresol as a dye binding, the albumin-bromocresol complex was measured as a reaction end point at 596/694 nm (ADVIA Chemistry System, Siemens Diagnostics).

Weight and height were measured according to the methodology of WHO (1995) (17) using the electronic balance brand Toledo, with a platform of 150 kilograms (kg) maximum capacity in the scale of 100 grams (g), and a anthropometric attached ruler with 2 meters (m) (Toledo Brazil, São Bernardo do Campo, SP). Values were available according change in body mass and Body Mass Index (WHO, 2008).

The dates to characterize individuals and the questionnaires to record the consumption of fish and weight history were obtained in M1.

Data Analysis

Fisher's exact test was used to test differences in SG and NSG according to dichotomous variables (sex, stage of disease, primary site and frequent consumption of fish). Test for continuous variables (including outcome analysis) were performed with T-test (parametric variables) or Mann-Whitney test (non-parametric variables). Outcome change between M0 and M9 were also tested with Wilcoxon test. All analysis was performed in the STATA statistic software, version 11.0 (STATA Corporation, College station, EUA). $P < 0.05$ was considered significant.

The difference in C-RP/Albumin levels between SG and NSG was also compared with score values proposed by Corrêa et al. (2002): no risk = $< 0,4$; low risk = $0,4-1,2$; medium risk = $1,2-2,0$; high risk = $> 2,0$ (8).

Results

Forty nine patients started chemotherapy treatment between 11/2009 and 07/2010; from these, 37 met the study inclusion criteria and were invited to take part in the study. Twenty-three patients agreed to be involved, these were counseled regarding healthy eating and included in the experimental groups: 11 individuals were included in the "supplemented group" (SG) who received the dietary fish supplement and advises on how to consume it; and 12 into the "non supplemented group" (NSG) that didn't receive dietary supplements. Five patients (SG=1 and NSG=4) did not complete the intervention period of the study or didn't consume more than 80 percent of the recommended quantity of fish oil capsules and were excluded from the analysis (Figure 1). The median age of the five individuals that did not completed the study was 55.7y (SD= 7.3); three of them were males and the primary localization of the cancer was rectum (n= 2) or colon (n=3).

Median age of the included patients was 52.3years old (range=40-70). All patients related lost weight after diagnosis: 52.2 % lost more than 5% and 26.1 % more than 10%. The SG and NSG did not differ statistically according to baseline characteristics in M1 (table 1).

When comparing the values in M9 (Table 2) the only marker that showed lower levels in the SG when compared to the NSG was the C-reactive protein, with a borderline statistical association ($P=0.09$).

The comparison between groups according to the difference between the M9 minus the M0 values (table 3) showed a reduction in body weight and BMI in NSG, while in SG these indicators did not varied between M0 and M9. Otherwise C-reactive protein was reduced in SG but not in NSG, with a borderline difference ($P= 0.06$).

In this study, malnutrition in patients at baseline was not found (mean BMI= 26.1kg/m^2 , ranging from 19.6 Kg/m^2 to 35.5 Kg/m^2), not even after nine weeks of chemotherapy treatment (mean BMI= 25.58 kg/m^2 , ranging from 19.6 Kg/m^2 to 35.4 Kg/m^2). There was not identified hypoalbuminemia in M1 (mean 4.2 g/dL ; SD = 0.4) or in M2 (mean 4.2 g/dL ; SD = 0.3).

Evaluating median values and interquartile ranges for C-RP/albumin ratio between SG and NSG, at baseline and after nine weeks of treatment (Figure 2), it is possible to infer that fish oil positively interfered in this relation. The difference between the values of the ratio C-RP/albumin between SG and NSG in M9 showed a borderline association ($p = 0.09$). The change amid the moments in SG (median - 0.4 ; interquartile range -0.9 ; -0.15) was statistically significant ($p=0.05$), though in NSG there were no changes between M0 and M9 (median $+0.1$; interquartile range -1.2 ; 2.3 ; $p=0.58$). Clinically, this result is considered beneficial, as in the SG an improvement in the degree of risk was found: increase from 10% to 20% in the number of patients with no risk, and reduction from 27.4% to 10% in the higher risk group. In the NSG individuals without risk there was a decreased from 25% to 12.5% , while higher risk of complication increased from 41.7% to 62% .

Discussion

To our knowledge, this is the first randomized study conducted with only colorectal cancer patients who consumed 2g of fish oil during nine weeks parallel to chemotherapy, and who were evaluated for inflammatory and nutritional status markers.

The trial shows the fish oil supplement beneficial effects on a nutritional status ($p= 0.01$ to weight and $p = 0.03$ to BMI). All patients had lost weight before the study, but during chemotherapy body weight loss occurred only in patients that did not consume fish oil supplement.

Individually, the oral consumption of nutritional supplement of fish oil resulted in the maintenance of body weight or in body weight gain during chemotherapy. This effect was related to studies in patients that suffered from cachexia and received high doses of fish oil (7.5g and 3.16g of EPA + DHA) (18, 19). We were able to notice that for individuals with a prior weight loss conditional, but yet presenting a normal weight or overweight, according to BMI, this effect can be achieved with lower doses (600 mg) of EPA + DHA.

All patients showed high C-RP at baseline, Read et al (2006) when evaluating advanced colorectal cancer patients' nutritional and inflammatory status found the same outline (20). Regarding the effect of fish oil supplement on inflammatory markers, C-RP was identified as a borderline value in comparative analyzes between groups in M2 and between the difference within M2 and M1 values, C-RP presents lower values in M2 for SG. In further markers, it was not possible to verify this effect; there was no difference in cytokines values between groups.

The C-RP/albumin relation, which evaluates inflammation and nutritional status, showed statistically significant difference and clinical relevance in the group of individuals that consumed fish oil. This score was not used previously for comparing intervention effects in colorectal cancer. PINI was used by Walsh et al. (2003) to assess nutritional status and prognosis in advanced cancer. They found an elevated PINI correlated with high IL-6 and C-RP values, and concluded that PINI should be considered for future research regarding nutritional status and prediction of prognosis in advanced cancer (21).

A study was conducted by Read et al. in 2007, where patients with stage 4 colorectal cancer were instructed to consume, in addition to their regular diet, 2 doses/day (480 ml each), which provided a total of 600 kcal, 32grams of protein, 2.18 grams of EPA and 0.92 grams of DHA for nine weeks (3 prior chemotherapy and 6 during chemotherapy). Twenty-three patients were enrolled in the study. Twenty completed 3 weeks of treatment and 15 continued to take the supplement until the end of the study. Mean weight increased 2.5 Kg from baseline to the end of week 3 and remained stable during the chemotherapy study phase. C-RP increased significantly between baseline and week 3, however it decreased significantly to baseline levels during chemotherapy phase. Of the 11 cytokines analyzed - interleukins 1 β , 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, eotaxin, granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) and RANTES (beta-chemokine) - only 3 changed in a statistically significant manner during the trial. Eotaxin and RANTES increased in

week 3, but there was no further increase in week 9; GM-CSF decreased significantly in week 3 and then increased in week 9 (22).

Previous studies in health subjects have found an association between polyunsaturated long chain n-3 fatty acids and lower levels of pro-inflammatory markers (IL-6, TNF- α , IL-1 and C-RP), supporting the notion that n-3 fatty acids may be beneficial in patients affected by diseases characterized by active inflammation (23). In our study, we were able to observe this outcome regarding C-RP, however, no significant results were observed for interleukins, possibly due to the number of patients within the trial or due to the quantity of EPA + DHA.

Inflammation is a common characteristic of cancer. The presence and magnitude of a chronic systemic inflammatory response may produce progressive nutritional decline. A specific nutritional intervention, leading to reduce the inflammatory state, to improve immune responsiveness and consequently, to improve nutritional status should be a successful strategy. Changing the nature of fatty acid nutrition can be an alternative by which we can modify immune cell behavior and the immune response - including its inflammatory component - as it was reflected in the nutritional status of colorectal cancer patients (24).

Conclusion

To follow up nutritional and biological parameters during chemotherapy treatment has interesting practical implications. We have been able to show that low doses of fish oil supplement can positively modulate the nutrition status and the C-RP/Albumin relation. It is a specific nutritional intervention that might stop or reverse nutritional decline in order to improve clinical outcome.

Moreover, these results must be confirmed in larger studies, so that the C-RP/albumin assessment and the fish oil nutritional intervention may be allowed to become standard practices in colorectal cancer patients in chemotherapy treatment.

Acknowledgments and Notes

This research was produced at the Florianopolis Oncology Research Center, Santa Catarina, Brazil. Fish oil was a gift from Phytomare SA, Governador Celso Ramos, Santa Catarina, Brazil. This research is supported by FAPESC, FUNPESQUISA-UFSC, CAPES, and REUNI. Address correspondences to Erasmo Benício S. M. Trindade, Universidade Federal de Santa Catarina. Campus Universitário, Trindade. Centro de Ciências da Saúde – Departamento de Nutrição – CEP 88040-970. Phone number: + 55 48 37219784. E-mail: erasmotrindade@ccs.ufsc.br.

References:

1. Balkwill F, Mantovani A: Inflammation and cancer: back to Virchow?. *Lancet* **357**, 539-545, 2001.
2. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F: Cancer-related inflammation. *Nature* **454**, 436-444, 2008.
3. Balkwill, F: Cancer and chemokine network. *Nature Rev. Cancer* **4**, 540-550, 2004.
4. Crozier JE, McKee RF, McArdle CS, Angerson WJ, Anderson JH, et al.: The presence of a systemic inflammatory response predicts poorer survival in patients receiving adjuvant 5-FU chemotherapy following potentially curative resection for colorectal cancer. *Br J Cancer* **94**, 1833–1836, 2006.
5. Koide Y, Miki C, Okugawa Y, Yokoe T, Toyama Y et al.: Preoperative C-reactive Protein as a prognostic and therapeutic marker for colorectal cancer. *Journal of Surgical Oncology* **98**, 540-544, 2008.
6. Shiu YC, Lin JK, Huang CJ, Jiang JK, Wang LW, et al.: Is C-Reactive Protein a Prognostic Factor of Colorectal Cancer?. *Disease of the Colon e Rectum* **51**, 443-449, 2008.

7. Ishizuka M, Kita J, Rokkaku K, Kato M, Sawada T, Kubota K: Systemic inflammatory response predicts postoperative in patients with liver metastases from colorectal cancer. *J Surg Oncol* **100**, 38-42, 2009.
8. Corrêa RC, Angeleli AYO, Camargo NR, Barbosa L, Burini RC: Comparação entre a relação PCR/albumina e o índice de prognóstico inflamatório nutricional (IPIN). *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* **38**, 183-190, 2002.
9. Dupertuis Y, Meguid M, Pichard C: Colon cancer therapy: new perspectives of nutritional manipulation using polyunsaturated fatty acids. *Clinical Nutrition and Metabolic Care* **10**, 427-432, 2007.
10. Chapkin RS, MC Murray DN, Lupton RJ: Colon cancer, fatty acids and anti-inflammatory compounds. *Cur Opin Gastroenterol* **23**, 48-54, 2007.
11. Spenser L, Mann C, Metcalfe M, Webb M, Pollard C et al.: The effects of omega-3 FAs on tumor angiogenesis and therapeutic potential. *European Journal of Cancer* **45**, 2077-2086, 2009.
12. Bouwens M, Rest O, Dellschaft N, Bromhaar MG, Groot LCPGM, et al.: Fish-oil supplementation induces antiinflammatory gene expression profiles in human blood mononuclear cells. *Am J Clin Nutr* **90**, 1-10, 2009.
13. Berquin IM, Edward IJ, Chen YQ: Multi-targed therapy of cancer by omega-3 fatty acids. *Cancer Letters* **269**, 363-377, 2008.
14. Wynter MP, Russell ST, Tisdale MJ: Effect of n-3 fatty acids on the antitumour effects of cytotoxic drugs. *In Vivo* **18**, 543-547, 2004.
15. World Medical Association. 2008. **Declaration of Helsinki**, Seoul, 59nd General Assembly-WMA. 2008. Disponível em: <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>. Acesso em: 12 Set. 2009.
16. Ômega 3: óleo de peixe em cápsula. Governador Celso Ramos: Phytomare, [2009]. Bula de remédio.
17. World health organization. Technical Report, n° 854. **Physical**

Status: The use and interpretation of antropometry. Geneva, Switzerland: WHO; 1995.

18. Burns CP, Halabi S, Clamon G, Kaplan E, Hohl RJ, et al.: Phase II study of High-Dose fish oil capsules for patients with cancer-related cachexia. *Cancer* **101**, 370-378, 2004.

19. Moses AW, Slater C, Preston T, Barber MD, Fearon KC: Reduced total energy expenditure and physical activity in cachexia patients with pancreatic cancer can be modulated by an energy and protein dense oral supplement enriched with n-3 fatty acids. *Br J Cancer* **90**, 996-1002, 2004.

20. Read JA, Choy STB, Beale PJ, Clarke SJ: Evaluation of nutritional and inflammatory status of advanced colorectal cancer patients and its correlation with survival. *Nutrition and Cancer* **55**, 78-85, 2006.

21. Walsh D, Mahmoud F, Barna B: Assessment of nutritional status and prognosis in advanced cancer: Interleukin-6, C-reactive protein, and prognostic and inflammatory nutritional index. *Supportive Care in Cancer* **11**, 60-62, 2003.

22. Read JA, Beale PJ, Volker DH, Smith N, Childs A, et al.: Nutritional intervention using an eicosapentaenoic acid (EPA)-containing supplement in patients with advanced colorectal cancer. Effects on nutritional and inflammatory status: a phase II trial. *Support Care Cancer* **15**, 301-307, 2007.

23. Ferruci L, Cherubini A, Bandinelli S, Bartali B, Corsi A, et AL: Relationship of plasma polyunsaturated fatty acids to circulating inflammatory markers. *J Clin Endocrinol Metab* **91**, 439-446, 2006.

24. Van Bokhorst-de, Van der Schueren MA: Nutritional support strategies for malnourished cancer patients. *Eur J Oncol Nurs* **9**, S74-S83, 2005.

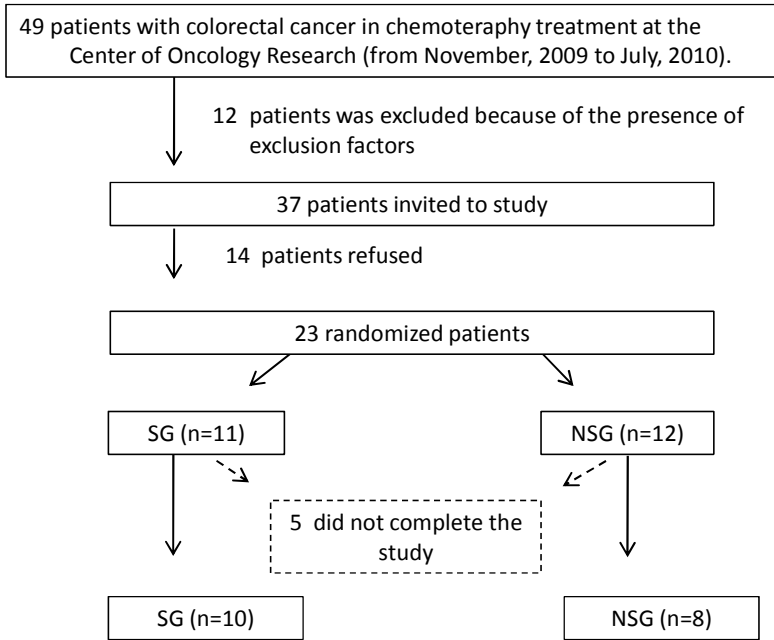


Figure 1 - Flowchart of the patients during the study. Florianopolis, 2010.

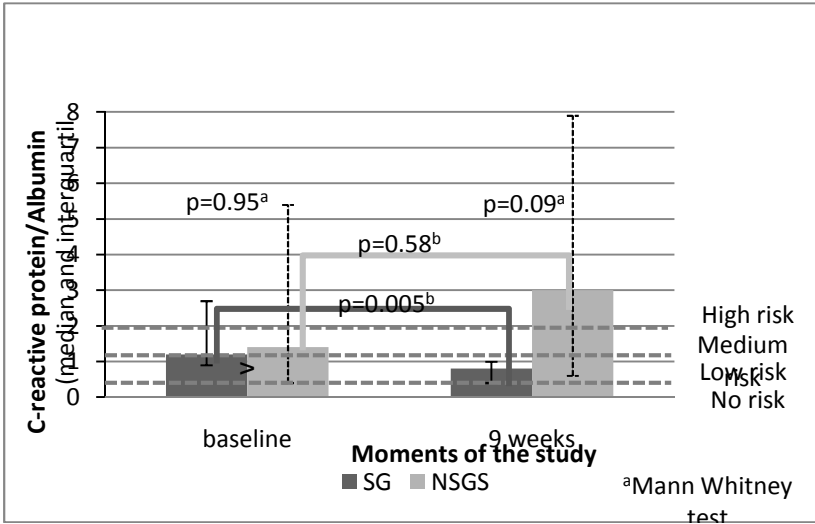


Figure 2 – Comparison of C-reactive protein/albumin median ratio, of colorectal cancer patients, between SG (2grams of fish oil/day) and NSG in baseline and after nine weeks of treatment. Florianopolis, SC, 2010.

Table 1- Characteristics of patients at baseline, Florianopolis, SC, 2010.

Characteristics	Not supplemented group (n = 12)	Supplemented Group (n = 11)	p
Sex (F/M) (n)	3/9	3/8	1.00 ^a
Stage of disease (1-2-3 / 4) (n)	8/4	6/5	0.68 ^a
Primary location (colon / rectum) (n)	6/6	4/7	0.68 ^a
Fish frequency (yes / not) (n)	3	3	1.00 ^a
Body weight¹ (Kg)	66-8 (11.6)	73 (16.8)	0.31 ^b
BMI¹ (Kg / m²)	25.0 (3.4)	27.3 (6.1)	0.28 ^b
Age¹ (years)	54.3 (9.3)	50.1 (8.2)	0.26 ^b
C-reactive protein² (mg / L)	6.4 (1.6-23.7)	5.1 (4.1-12.3)	0.95 ^c
Albumin¹ (g / dL)	4.2 (0.4)	4.2 (0.4)	0.75 ^b

¹ Values are mean (Standard Deviation); ² Values are median (interquartile range).

^a Fisher's exact test, ^b T-test, ^c Mann-Whitney test.

BMI= Body Mass Index.

Stage of disease: 1= (T1-2, N0, M0); 2 = (T3-4, N0, M0); 3 = (any T, N1-2, M0); 4 = (any T, any N, M1).

Fish frequency= frequency of fish ingestion that was considered more than once a week.

Table 2- Endpoints comparison between groups GS (2 grams of fish oil/day) and GNS, of colorectal individuals undergoing chemotherapy, after nine weeks of treatment.

	Not supplemented group (n = 8)	Supplemented group (n = 10)	p
C-reactive protein² (mg / L)	13.0 (2.6-32.7)	3.4 (1.6-4.0)	0.09 ^b
Albumin¹ (g / dL)	4.2 (0.3)	4.2 (0.3)	0.99 ^a
IL-6² (pg / mL)	69.8 (61.9-144.3)	81.2 (68.5-104.1) ^c	1.00 ^b
IL-1β² (pg / mL)	1.2 (1.0-1.2)	3.6 (1.2-4.2) ^c	0.19 ^b
TNF-α² (pg / mL)	60.7 (52.8-71.7)	61.1 (56.0-64.8) ^c	0.74 ^b
Body weight¹ (Kg)	65.2 (10.5)	71.9 (16.8)	0.34 ^a
BMI¹ (Kg / m²)	24.6 (2.8)	26.7 (5.8)	0.36 ^a

¹ Values are mean (Standard Deviation); ² Values are median (interquartile range).

^a T-test, ^b Mann Whitney test. * *c* = 9 because one sample was hemolyzed.

Abbreviations are as follows: BMI= Body Mass Index; IL-6 = interleukin 6; IL-1 β = interleukin 1 beta; TNF- α = Tumor necrosis factor alfa.

Table 3- Comparison between the not supplemented and supplemented group (2 grams of fish oil/day), of colorectal cancer patients, according to the difference between the 9 weeks and baseline values of inflammation and nutritional status markers. Florianopolis, SC, 2010.

Markers	Not supplemented group (n = 8)	Supplemented group (n = 10)	p
C-reactive protein²(mg / L)	1.0 (-1.8;10.3)	-1.4 (-4.0;-0.7)	0.06 ^b
Albumin¹ (g / dL)	0.1 (0.2)	0.1 (0.5)	0.87 ^a
IL-6² (pg / mL)	-1.9 (-138.9;4.8) ^c	1,3 (-50.7;31.1) ^c	0.64 ^b
IL-1β¹ (pg / mL)	-1.2 (7.0) ^c	2,3 (8.0) ^c	0.37 ^a
TNF-α² (pg / mL)	10.5 (-11.2;18.5) ^c	-2.2 (2.0;24.6) ^c	0.49 ^b
Body weight²(Kg)	-1.6 (-2.4;-0.3)	0.5 (-0.3;1.0)	0.01 ^b
BMI² (Kg / m²)	-0.6 (-0.9;-0.1)	0.2 (-0.1;0.4)	0.03 ^b

¹ Values are mean (Standard Deviation); ² Values are median (interquartile range).

^a T-test, ^b Mann Whitney test. * SG n = 7; NSG n=8 because samples was hemolyzed.

Abbreviations are as follows: BMI= Body Mass Index; IL-6 = interleukin 6; IL-1β = interleukin 1 beta; TNF-α = Tumor necrosis factor alfa.

5.1 MANUSCRITO 1 – TRADUÇÃO

Título: Suplemento de óleo de peixe altera marcadores inflamatórios e do estado nutricional em pacientes com câncer colorretal.

Pastore-Silva, Juliana de Aguiar¹, Trindade, Erasmo Benício Santos de Moraes¹, Fabre, Maria Emilia de Souza², Menegotto, Vicente Martorano², Gevaerd, Sheila², Buss, Ziliane da Silva³, Fröde, Tânia Silvia³

¹Departamento de Nutrição – Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil. ²Centro de Pesquisas Oncológicas – Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. ³Departamento de Farmacologia – Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil.

Resumo

A inflamação é uma característica comum em câncer. A presença e a magnitude da resposta inflamatória sistêmica crônica pode produzir progressivo declínio nutricional. Este estudo visou investigar se há alterações nos marcadores de inflamação e / ou no estado nutricional de pacientes com câncer colorretal em tratamento quimioterápico, que foram suplementados com óleo de peixe. O ensaio clínico foi conduzido de forma randomizada com 23 pacientes distribuídos em dois grupos. O grupo suplementado (GS) consumiu 2 gramas de óleo de peixe durante nove semanas. Marcadores do estado nutricional e inflamatórios foram avaliados no momento basal (M0) e após nove semanas de quimioterapia (M9) no GS e no grupo não suplementado (GNS). A análise estatística foi realizada no STATA 11,0 software. GS e GNS apresentaram as mesmas características no momento basal ($p > 0,05$). Os indicadores do estado nutricional, índice de massa corporal e peso, sofreram modificações apenas no GNS comparando os momentos M0 e M9, $p = 0,03$ e $p = 0,01$ respectivamente, enquanto que no GS estes indicadores não variaram. Pacientes suplementados com óleo de peixe (GS) apresentaram uma diminuição clinicamente relevante na relação proteína C-reativa / albumina ($p = 0,005$). Baixas doses de suplemento de óleo de peixe pode modular positivamente o estado nutricional e a relação C-RP/Albumina.

Palavras-chave: óleo de peixe, câncer colorretal, inflamação, estado nutricional

Introdução

Em 1863, Rudolf Virchow criou a hipótese de que o câncer origina-se em locais de inflamação crônica, após observar leucócitos em tecidos neoplásicos. A conexão entre câncer e inflamação foi verificada no século dezenove, com base em observações de que células inflamatórias estavam presentes em biopsia de tumores e que estes sempre estavam fixados em locais de inflamação crônica (1).

As vias moleculares da inflamação relacionada ao câncer estão sendo desvendadas, resultando na identificação de novos alvos e moléculas que possam levar à melhores diagnósticos e tratamento. Em alguns tipos de câncer doenças inflamatórias estão presentes antes da doença maligna. Em todas elas há ativação de vários tipos de oncogênes por mutação, rearranjo cromossomal ou amplificação, e inativação de genes supressores de tumor. As células transformadas produzem mediadores inflamatórios, gerando assim um microambiente inflamatório nos tumores. Independente da sua origem a inflamação relacionada ao câncer resulta em ativação de fatores de transcrição, como fator de transcrição nuclear- κ B (NF- κ B), fator indutor de hipoxia 1 α (HIF1 α), sinal de ativação e transcrição (STAT3). Estes fatores de transcrição coordenam a produção de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas que ativam os mesmos fatores de transcrição em células inflamatórias, do estroma e do tumor, resultando em mais mediadores inflamatórios sendo produzidos (2). Este microambiente pró-inflamatório tem vários efeitos pró-crescimento do tumor: promove angiogênese e metástase, inibe resposta imune adaptativa e altera resposta a hormônios e agentes quimioterápicos. Receptores de quimiocinas e seus ligantes direcionam o movimento das células durante a inflamação por afetar a mobilidade celular, poder de invasão e sobrevivência (3).

O estado pró-inflamatório é identificado por elevação em proteínas de fase aguda como Proteína C-reativa (PCR) e alfa-1-glicoproteína ácida (α -1AGP). Além disso, PCR elevada pode predizer pior sobrevida para pacientes com câncer colo-retal, como marcador de prognóstico e a terapêutica (4-7). A relação PCR/Albumina foi proposta por Corrêa et al. (2002) com objetivo de avaliar a extensão da desnutrição e inflamação, a relação foi baseada no Índice de Prognóstico Inflamatório e Nutricional (IPIN) de 1985(8).

O consumo de óleo de peixe dietético rico em ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa do tipo ômega-3, ácido

eicosapentaenóico (EPA, 20:5) e ácido docosaexaenóico (DHA, 22:6) parece ser um efetivo adjuvante na terapia do câncer de cólon. Resultados preliminares (em cultura de células e animais portadores de tumor) indicaram que o efeito pleiotrópico dos ácidos graxos ômega-3 podem atuar sinergicamente com radio/quimioterapia a fim de matar as células tumorais e reduzir angiogênese e metástases (9-10). Aparentemente sua ação envolve diferentes mecanismos: alteração de composição de fosfolipídios de membrana e funcionalidade de microdomínios lipídicos, interconversão metabólica em eicosanóides bioativos, e modulação da ativação do receptor nuclear (10). EPA e DHA têm também um potencial antiinflamatório e antiangiogênico através da inibição de importantes mediadores: fator de crescimento vascular endotelial (VGEF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), ciclo-oxigenase 2 (COX-2), prostaglandinas-E2 (PGE-2), óxido nítrico, NF- κ B (11). Bouwens et al. (2009) mostrou recentemente que ingestão de EPA+DHA por 26 semanas pode alterar os perfis de expressão gênica de células do sangue periférico (PBMC) para um perfil mais anti-inflamatório e anti-aterogênico, promovendo efeitos benéficos em células imunes (12). Vários estudos têm investigado a possibilidade de que suplementos nutricionais contendo EPA+DHA são benéficos para redução da perda de peso associada ao câncer em pacientes em estágios avançados. Entretanto, os resultados tem sido contraditórios e a literatura falha em encontrar evidencia científica que afirme dose e tempo de administração (13).

A nova estratégia para o tratamento de câncer de cólon tem sido desenvolvida com base na combinação de agentes anti-câncer e de ácidos graxos dietéticos de cadeia longa. Em animais o óleo de peixe, rico em EPA e DHA, tem aumentado a citotoxicidade de uma série de drogas anti-câncer (9). Em câncer de cólon verificou-se resultado de aumento da inibição de crescimento tumoral quando associados a 5-fluoracil em diferentes linhagens de células (14).

O objetivo deste estudo foi checar se existe alteração em marcadores de estado nutricional ou inflamatório de pacientes com câncer colorretal submetidos à quimioterapia que foram suplementados diariamente com dois gramas de óleo de peixe, comparados com os marcadores de indivíduos não suplementados.

Sujeitos e Métodos

Participantes do estudo

Este foi um estudo clínico randomizado onde os indivíduos foram distribuídos em dois grupos. Os sujeitos foram recrutados no Centro de pesquisas Oncológicas, em Florianópolis, Santa Catarina, Brasil e foram incluídos no estudo quando possuíam o diagnóstico de câncer colorretal e estivessem aptos a iniciar tratamento quimioterápico ambulatorial. Os fatores de inclusão foram: ser maior de dezoito anos, aceitar participar das avaliações antropométricas, dietéticas e bioquímicas e assinar o termo de consentimento livre e esclarecido. Os fatores de exclusão: ter menos de dezoito anos, estar em tratamento paliativo, fazer uso de nutrição parenteral, ser alérgico a peixe e derivados e apresentar diagnóstico de doença auto-imune.

A amostra foi definida por saturação temporal, no período entre Novembro de 2009 e Julho de 2010. Os pacientes que aceitaram ser incluídos no estudo foram distribuídos de forma randomiza; de acordo com o dia do mês em que foram identificados no setor de nutrição – se em dia identificado por numero par eles foram alocados no grupo suplementado (GS), se em dia ímpar foram incluídos no grupo não suplementado (GNS) -.

O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de ética do Centro de Pesquisas Oncológicas e está em concordância com a *Declaração médica mundial de Helsinki* (15). Todos os participantes foram informados sobre o estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido antes do inicio do estudo.

Suplemento dietético

O suplemento nutricional de óleo de peixe foi oferecido em capsulas de 500mg por unidade. Cada capsula oferece aproximadamente 4,3 kilocalorias, são compostas de gelatina e glicerina e contem 160 miligramas (mg) de gordura saturada, 130 mg de gordura monoinsaturada, 200mg de gordura poliinsaturada - das quais 150mg são dos ácidos graxos EPA+DHA, e 3 miligramas de colesterol. As capsulas contêm, ainda, vitamina E (α -tocoferol) como antioxidante. O produto é registrado no Ministério da saúde – Brasil, na categoria de alimentos, com o número: 6.2358.0006.001-4 (16).

Intervenção

Todos os participantes do GS foram instruídos a consumir, em adição a sua dieta regular, quatro capsulas de suplemento nutricional de óleo de peixe por dia – totalizando 600mg de EPA+DHA -, durante nove semanas. Os pacientes receberam conselhos sobre como consumir as capsulas, verbalmente e por escrito, e foram instruídos a registrar o consumo do suplemento diariamente. O inicio da suplementação foi no mesmo dia de inicio da quimioterapia. Para garantir a adesão ao estudo, pesquisadores entraram em contato com os pacientes semanalmente por telefone e na instituição nos dias de quimioterapia.

Avaliações

Todos os pacientes foram submetidos às avaliações em dois momentos. Dados para avaliação do processo inflamatório e estado nutricional foram coletados em dois momentos: antes da primeira quimioterapia (basal=M0) e após nove semanas (M=9).

Amostra de sangue foi coletada no laboratório de análises clínicas no momento basal e no M9, dando-se prazo de um ou dois dias após a última sessão de quimioterapia.

Para analisar as citocinas, o sangue foi centrifugado, separado, e uma alíquota do sangue foi armazenada em freezer a -20° C. No dia do teste as amostras foram descongeladas em geladeira e o teste de imunoenensaio (ELISA) fase sólida – método sanduiche – foi iniciada imediatamente. Para cada uma das citocina, anticorpos monoclonais específicos, anti-TNF- α , anti- IL- 1β e anti-IL-6 (BD Biosciences, San Jose, CA) foram utilizados.

As leituras de todas as citocinas e suas respectivas curvas foram realizadas em leitor Micro Plate (TP-Reader, Thermo Plate, China). Resultados foram expressos em pg / mL.

A proteína C-reativa foi medida usando reagente CardioPhase hsC-RP[®] e método de imunonefelometria de partículas reforçadas pelo sistema BN (trademark of Siemens Healthcare Diagnostics / Malburg, Germany), que expressa valores em intervalo de medição ultra-sensível. Albumina foi determinada pelo método Doumas, Watson and Biggs, usando solução verde de bromocresol como ligante, o complexo albumina-bromocresol foi medido como reação de ponto final em 596/694nm (ADVIA Chemistry System, Siemens Diagnostics). Resultados foram expressos em mg / L.

Peso e altura foram medidos de acordo com metodologias da OMS (1995) (17) usando balança eletrônica da marca Toledo, com

plataforma de 150 Kilogramas (kg) de capacidade máxima, em escala de 100 gramas (g), e régua antropométrica acoplada de 2 (m) (Toledo Brasil, São Bernardo do Campo, SP). Valores foram avaliados de acordo com mudanças no peso corporal e na classificação do Índice de Massa Corporal (WHO, 2008).

Dados de caracterização individual e questionário sobre ingestão de peixe e o recordatório de peso corporal foram obtidos no M0 antes da primeira avaliação bioquímica.

Análise dos dados

Teste exato de Fisher foi usado para testar as diferenças entre os grupos (GS e GNS) de acordo com as variáveis dicotômicas (sexo, estágio da doença, localização primária e frequência de consumo de peixe). As variáveis contínuas (incluindo os desfechos) foram realizadas com teste T (variáveis paramétricas) ou teste de Mann-Whitney (variáveis não paramétricas). Resultados de variação de valores entre M0 e M9 foram testados, também, com o teste de Wilcoxon. Todas as análises foram conduzidas com software estatístico STATA, versão 11.0 (STATA Corporation, College station, EUA). $P < 0.05$ foi considerado significativo.

A diferença nos valores da relação PCR/Albumina entre o GS e o GNS foi também comparado com os valores de escores de risco propostos por Corrêa et al. (2002): sem risco= $< 0,4$; baixo risco= $0,4-1,2$; médio risco= $1,2-2,0$; alto risco = $> 2,0$ (8).

Resultados

Quarta e nove pacientes começaram tratamento quimioterápico entre 11/2009 e 07/2010; destes 37 estavam incluídos nos critérios de inclusão e foram convidados a participar do estudo. Vinte e três pacientes aceitaram participar, estes foram aconselhados sobre hábitos alimentares saudáveis e incluídos nos grupos: 11 indivíduos foram incluídos no grupo suplementados (SG) e receberam o suplemento nutricional de óleo de peixe e conselhos sobre como consumi-lo; e 12 indivíduos foram incluídos no grupo não suplementado (GNS) que não receberam suplemento nutricional. Cinco pacientes (GS=1 e GNS=4) não completaram o período completo de intervenção ou não

consumiram mais de 80 por cento da quantidade recomendada de óleo de peixe encapsulado e foram excluídos das análises (figura 1). A média de idade dos cinco indivíduos que não completaram o estudo foi 55,7anos (DP= 7,3); três deles eram homens e a localização primária do câncer em dois era reto e em três cólon.

A idade média dos pacientes incluídos no estudo foi de 52,3 anos (variando entre 40 e 70 anos). Todos os pacientes perderam peso antes do diagnóstico: 52.2 % perderam mais de 5% do peso corporal e 26.1% perderam mais de 10%.

O GS e o GNS não apresentaram diferença estatística de acordo com suas características no M0 ($p>0.05$) (Tabela 1). Quando comparamos os valores no M9 (tabela 2) não verificamos diferença estatística, mas chama-se atenção aos valores da PCR, com uma associação *borderline* ($p=0.09$).

A comparação entre os grupos considerando-se a diferença entre os valores dos grupos: valores encontrados em M9 subtraídos os valores encontrados em M0 (tabela 3) mostra redução no peso corporal e IMC no GNS ($p=0.01$ e $p=0.03$, respectivamente), enquanto no GS estes indicadores não variam entre M0 e M9 ($p>0,05$). Entretanto valores de PCR reduziram no GS apresentando associação *borderline* ($p= 0.06$).

Neste estudo não foi identificado desnutrição, segundo IMC, entre os pacientes no momento basal (IMC médio = $26,1\text{Kg/m}^2$, variando entre $19,6\text{ Kg/m}^2$ e $35,5\text{ Kg/m}^2$), nem após as nove semanas de tratamento quimioterápico (IMC médio = $2,58\text{ Kg/m}^2$, variando de $19,6\text{ Kg/m}^2$ a $35,4\text{ Kg/m}^2$). Não foi identificado hipalbuminemia no M0 (media $4,2\text{ g/dL}$; DP = 0,4) ou em M9 (media $4,2\text{ g/dL}$; DP = 0,3).

Avaliando os valores médios e intervalo interquartil para relação PCR/Albumina entre o GS e o GNS, no momento basal e após nove semanas de tratamento (Figura 2) é possível inferir que o óleo de peixe infere positivamente nesta relação. A diferença entre os valores da relação PCR/Albumina no M9 mostra associação *borderline* ($p=0,009$). A diferença entre os valores da relação no GS (mediana -0,4; intervalo interquartil -0,9;-0,15) foi estatisticamente significativa ($p=0,005$), embora no GNS não houve mudança entre os momento M0 e M9 (mediana +0,1; intervalo interquartil -1,2; 2,3; $p=0,58$). Clinicamente, este resultado é considerado benéfico. No GS houve melhora no grau de risco: verificou-se aumento de 10% para 20% no numero de pacientes classificados como “sem risco”, também houve redução de 27,4% para 10% nos indivíduos classificados como “alto risco”. No GNS ocorreu diminuição do percentual de indivíduos classificados como “sem risco”

de 25% para 12,5%, enquanto aumentou o percentual de 41,7% para 62% dos indivíduos em “alto risco”.

Discussão

Sob nosso conhecimento, este é o primeiro estudo randomizado conduzido apenas com indivíduos com diagnóstico de câncer colorretal consumindo dois gramas de óleo de peixe durante nove semanas concomitante a quimioterapia, e onde foram avaliados marcadores de resposta inflamatória e estado nutricional.

O estudo mostrou benefício da suplementação de óleo de peixe no estado nutricional ($p = 0,01$ para peso e $p = 0,03$ para IMC). Todos os pacientes haviam perdido peso antes do estudo, mas durante a quimioterapia a perda de peso ocorreu apenas nos pacientes que não consumiram o suplemento de óleo de peixe. Individualmente, o consumo oral de suplemento de óleo de peixe resultou em manutenção do peso corporal ou em ganho de peso corporal durante a quimioterapia. Este efeito foi relatado previamente em estudos com pacientes acometidos por caquexia e recebendo altas doses de óleo de peixe (7.5g e 3.16g de EPA + DHA) (18, 19). Nosso estudo permite inferir que para indivíduos com perda de peso prévia, mas ainda apresentando eutrofia ou sobrepeso, segundo IMC, este efeito pode ser alcançado com baixas doses de suplementação (600mg/dia) de EPA+DHA.

Todos os pacientes apresentaram altos valores de PCR no momento basal, Read et al (2006) quando avaliou o estado nutricional e inflamatório de pacientes com câncer colorretal avançado observou a mesma situação clínica (20). Quanto o efeito do suplemento de óleo de peixe em marcadores inflamatórios, a PCR foi identificada como tendo uma associação *borderline* na análise comparativa entre os grupos no M9, assim como na comparação da diferença dos valores de M9 e M0, sendo que PCR apresenta menores valores no GS. Nos demais marcadores não é possível verificar este efeito; não há diferença nos valores de citocinas entre os grupos.

A relação PCR/Albumina, que avalia o estado nutricional e inflamatório, mostra diferença estatística e relevância clínica no grupo que consumiu óleo de peixe. Este escore não foi usado previamente para comparar os efeitos de alguma intervenção em pacientes com câncer colorretal. IPIN foi usado por Walsh et al. (2003) para avaliar o estado nutricional e prognóstico em indivíduos com

câncer avançado. Eles encontraram que elevado IPIN correlaciona-se positivamente com altos valores de IL-6 e PCR, e concluem que o IPIN deve ser considerado para futuras investigações de avaliação nutricional e podem predizer prognóstico em câncer avançado (21).

O estudo conduzido por Read et al. em 2007, onde pacientes com câncer colorretal em estagio quatro foram instruídos a consumir, em adição a sua dieta regular, duas doses/dia (480ml cada dose) de suplemento hipercalórico e hiperproteico que forneceu um total diário de 600kcal, 32 gramas de proteína, 2,18 gramas de EPA e 0,92 gramas de DHA por nove semanas (3 semanas antes da quimioterapia e 6 semanas durante a quimioterapia). Vinte e três pacientes foram envolvidos no estudo, quinze continuaram usando o suplemento até o final do estudo. O peso médio dos indivíduos aumentou 2,5Kg do momento basal até a terceira semana, entretanto ocorreu diminuição significativa de peso durante as seis semanas de quimioterapia. Foram avaliadas 11 citocinas: IL- 1 β , 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, eotaxin, granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) e RANTES (beta-chemokine) – apenas três sofrem alteração estatisticamente significativa durante o estudo. Eotaxin e RANTES aumentaram na terceira semana, mas não continuaram aumentando na semana nove; GM-CSF diminuiu significativamente na terceira semana e depois aumentou na semana nove (22).

Estudos prévios com indivíduos saudáveis encontraram associação entre o consumo de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa da família Omega-3 e baixos níveis de marcadores pró-inflamatórios (IL-6, TNF- α , IL-1 e C-RP), suportando a teoria de que o consumo de ômega-3 deve ser benéfico em pacientes acometidos por doenças caracterizadas por inflamação crônica (23). Em nosso estudo, foi possível observar este desfecho para PCR, entretanto o resultado não foi observado para interleucinas, possivelmente devido ao número de pacientes incluídos no estudo ou devido a quantidade fornecida de EPA+DHA.

Inflamação é uma característica comum no câncer. A presença e a magnitude da resposta inflamatória crônica podem produzir um progressivo declínio nutricional. Uma intervenção nutricional específica, levando a redução do estado inflamatório, para melhorar a resposta imune e conseqüentemente melhorar o estado nutricional pode ser uma estratégia de sucesso. Alteração na natureza dos ácidos graxos ingeridos parece ser uma alternativa de tratamento através da qual podemos modular o comportamento e a resposta de células imunes – incluindo

seus componentes inflamatórios – e verificar reflexo no estado nutricional de indivíduos oncológicos (24).

Conclusão

Acompanhamento de parâmetros nutricionais e biológicos durante o tratamento quimioterápico tem implicações práticas interessantes. Nós verificamos que baixas doses de suplemento encapsulado de óleo de peixe pode modular positivamente o estado nutricional e a relação PCR/Albumina. Esta é uma intervenção dietética específica que pode parar ou reverter o declínio do estado nutricional de indivíduos com câncer colorretal a fim de melhorar o desfecho clínico.

Além disso, estes resultados devem ser confirmados em estudo maiores de modo que a avaliação da relação PCR/Albumina e a intervenção nutricional com suplemento de óleo de peixe tornem-se práticas comuns em tratamento quimioterápico de pacientes com câncer colorretal.

Agradecimentos e Notas

Esta pesquisa foi produzida em Florianópolis, no Centro de Pesquisas Oncológicas, Santa Catarina, Brasil. Óleo de peixe foi doado pela empresa Phytomare SA, Governador Celso Ramos, Santa Catarina, Brasil. A pesquisa e a pesquisadora principal foram financiados por FAPESC, FUNPESQUISA-UFSC, CAPES, e REUNI.

Endereço para correspondência para Erasmo Benício S. M. Trindade, Universidade Federal de Santa Catarina. Campus Universitário, Trindade. Centro de Ciências da Saúde – Departamento de Nutrição – CEP 88040-970. Telefone: + 55 48 37219784. E-mail: erasmotrindade@ccs.ufsc.br.

Referencias:

1. Balkwill F, Mantovani A: Inflammation and cancer: back to Virchow?. *Lancet* **357**, 539-545, 2001.
2. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F: Cancer-related inflammation. *Nature* **454**, 436-444, 2008.
3. Balkwill, F: Cancer and chemokine network. *Nature Rev. Cancer* **4**, 540-550, 2004.
4. Crozier JE, McKee RF, McArdle CS, Angerson WJ, Anderson JH, et al.: The presence of a systemic inflammatory response predicts poorer survival in patients receiving adjuvant 5-FU chemotherapy following potentially curative resection for colorectal cancer. *Br J Cancer* **94**, 1833–1836, 2006.
5. Koide Y, Miki C, Okugawa Y, Yokoe T, Toyama Y et al.: Preoperative C-reactive Protein as a prognostic and therapeutic marker for colorectal cancer. *Journal of Surgical Oncology* **98**, 540-544, 2008.
6. Shiu YC, Lin JK, Huang CJ, Jiang JK, Wang LW, et al.: Is C-Reactive Protein a Prognostic Factor of Colorectal Cancer?. *Disease of the Colon e Rectum* **51**, 443-449, 2008.
7. Ishizuka M, Kita J, Rokkaku K, Kato M, Sawada T, Kubota K: Systemic inflammatory response predicts postoperative in patients with liver metastases from colorectal cancer. *J Surg Oncol* **100**, 38-42, 2009.
8. Corrêa RC, Angeleli AYO, Camargo NR, Barbosa L, Burini RC: Comparação entre a relação PCR/albumina e o índice de prognóstico inflamatório nutricional (IPIN). *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* **38**, 183-190, 2002.
9. Dupertuis Y, Meguid M, Pichard C: Colon cancer therapy: new perspectives of nutritional manipulation using polyunsaturated fatty acids. *Clinical Nutrition and Metabolic Care* **10**, 427-432, 2007.
10. Chapkin RS, MC Murray DN, Lupton RJ: Colon cancer, fatty acids and anti-inflammatory compounds. *Cur Opin Gastroenterol* **23**, 48-54, 2007.

11. Spenser L, Mann C, Metcalfe M, Webb M, Pollard C et al.: The effects of omega-3 FAs on tumor angiogenesis and therapeutic potential. *European Journal of Cancer* **45**, 2077-2086, 2009.
12. Bouwens M, Rest O, Dellschaft N, Bromhaar MG, Groot LCPGM, et al.: Fish-oil supplementation induces antiinflammatory gene expression profiles in human blood mononuclear cells. *Am J Clin Nutr* **90**, 1–10, 2009.
13. Berquin IM, Edward IJ, Chen YQ: Multi-targed therapy of cancer by omega-3 fatty acids. *Cancer Letters* **269**, 363-377, 2008.
14. Wynter MP, Russell ST, Tisdale MJ: Effect of n-3 fatty acids on the antitumour effects of cytotoxic drugs. *In Vivo* **18**, 543–547, 2004.
15. World Medical Association. 2008. **Declaration of Helsinki**, Seoul, 59nd General Assembly-WMA. 2008. Disponível em: <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>. Acesso em: 12 Set. 2009.
16. Ômega 3: óleo de peixe em cápsula. Governador Celso Ramos: Phytomare, [2009]. Bula de remédio.
17. World health organization. Technical Report, n^o.854. **Physical Status: The use and interpretation of antropometry**. Geneva, Switzerland: WHO; 1995.
18. Burns CP, Halabi S, Clamon G, Kaplan E, Hohl RJ, et al.: Phase II study of Hight-Dose fish oil capsules for patients with cancer-related cachexia. *Cancer* **101**, 370-378, 2004.
19. Moses AW, Slater C, Preston T, Barber MD, Fearon KC: Reduced total energy expenditure and physical activity in cachexia patients with pancreatic cancer can be modulated by an energy and protein dense oral supplement enriched with n-3 fatty acids. *Br J Cancer* **90**, 996-1002, 2004.
20. Read JA, Choy STB, Beale PJ, Clarke SJ: Evaluation of nutritional and inflammatory status of advanced colorectal cancer patients and its correlation with survival. *Nutrition and Cancer* **55**, 78-85, 2006.

21. Walsh D, Mahmoud F, Barna B: Assessment of nutritional status and prognosis in advanced cancer: Interleukin-6, C-reactive protein, and prognostic and inflammatory nutritional index. *Supportive Care in Cancer* **11**, 60-62, 2003.
22. Read JA, Beale PJ, Volker DH, Smith N, Childs A, et al.: Nutritional intervention using an eicosapentaenoic acid (EPA)-containing supplement in patients with advanced colorectal cancer. Effects on nutritional and inflammatory status: a phase II trial. *Support Care Cancer* **15**, 301-307, 2007.
23. Ferruci L, Cherubini A, Bandinelli S, Bartali B, Corsi A, et AL: Relationship of plasma polyunsaturated fatty acids to circulating inflammatory markers. *J Clin Endocrinol Metab* **91**, 439-446, 2006.
24. Van Bokhorst-de, Van der Schueren MA: Nutritional support strategies for malnourished cancer patients. *Eur J Oncol Nurs* **9**, S74-S83, 2005.

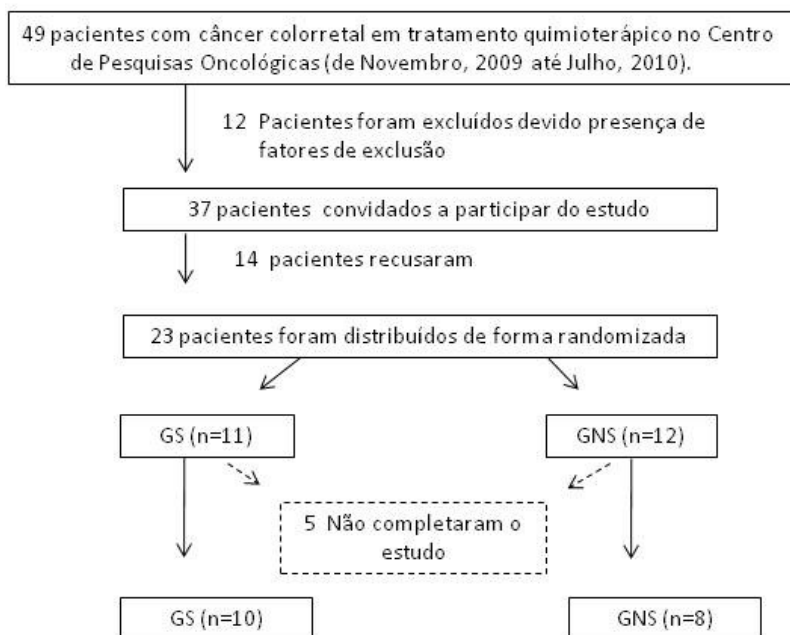


Figura 1. Fluxograma dos pacientes durante o estudo, Florianópolis, 2011.

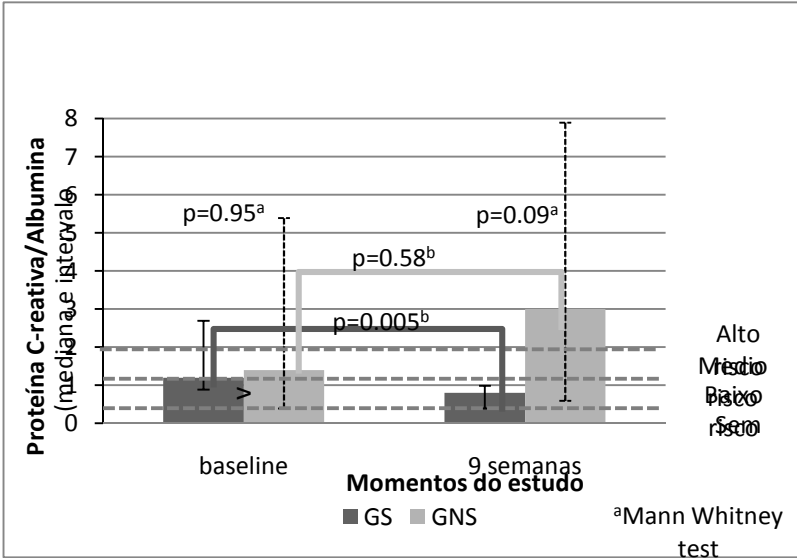


Figura 2. Comparação entre as medianas da relação PCR/Albumina de pacientes com câncer colorretal, entre os grupos: suplementado (GS) (consumo diário de dois gramas de óleo de peixe encapsulado) e grupo não suplementado (GNS) no momento basal e após nove semanas de tratamento, Florianópolis, 2011.

Tabela 1- Características dos pacientes no momento basal, Florianópolis, SC, 2010.

Characteristics	Grupo não suplementado (n = 12)	Grupo suplementado (n = 11)	p
Sexo (F/M) (n)	3/9	3/8	1.00 ^a
Estágio da doença (1-2-3 / 4) (n)	8/4	6/5	0.68 ^a
Localização primaria (colon / reto) (n)	6/6	4/7	0.68 ^a
Peixe frequente (sim / não) (n)	3	3	1.00 ^a
Peso corporal¹ (Kg)	66.8 (11.6)	73 (16.8)	0.31 ^b
IMC¹ (Kg / m²)	25.0 (3.4)	27.3 (6.1)	0.28 ^b
Idade¹ (anos)	54.3 (9.3)	50.1 (8.2)	0.26 ^b
Proteína C-reativa² (mg / L)	6.4 (1.6-23.7)	5.1 (4.1-12.3)	0.95 ^c
Albumina¹(g / dL)	4.2 (0.4)	4.2 (0.4)	0.75 ^b

¹ Valores são média (Desvio Padrão); ² Valores são mediana (Intervalo Interquartil).

^a Teste exato de Fisher, ^b T-test, ^c Mann-Whitney teste.

IMC= Índice de Massa Corporal.

Estágio da doença: 1= (T1-2, N0, M0); 2 = (T3-4, N0, M0); 3 = (qualquer T, N1-2, M0); 4 = (qualquer T, qualquer N, M1).

Peixe frequente= consumo frequente “sim” foi considerado mais de uma vez na semana.

Tabela 2- Comparação entre os grupos GS (dois gramas de óleo de peixe/dia) e GNS de indivíduos com câncer colorretal em tratamento quimioterápico, após nove semanas de tratamento.

	Grupo não suplementado (n = 8)	Grupo Suplementado (n = 10)	<i>p</i>
Proteína C-reativa² (mg / L)	13.0 (2.6-32.7)	3.4 (1.6-4.0)	0.09 ^b
Albumina¹ (g / dL)	4.2 (0.3)	4.2 (0.3)	0.99 ^a
IL-6² (pg / mL)	69.8 (61.9-144.3)	81.2 (68.5-104.1) ^c	1.00 ^b
IL-1β² (pg / mL)	1.2 (1.0-1.2)	3.6 (1.2-4.2) ^c	0.19 ^b
TNF-α² (pg / mL)	60.7 (52.8-71.7)	61.1 (56.0-64.8) ^c	0.74 ^b
Peso Corporal¹(Kg)	65.2 (10.5)	71.9 (16.8)	0.34 ^a
IMC¹ (Kg / m²)	24.6 (2.8)	26.7 (5.8)	0.36 ^a

¹ Valores são media (Desvio Padrão); ² Valores são mediana (intervalo interquartil).

^a Teste-T, ^b Teste Mann Whitney . * *c* = 9 porque uma amostra hemolizou.

Abreviações são:IMC= Índice de Massa Corporal; IL-6 = interleucina 6; IL-1β = interleucina 1 beta; TNF-α = Fator de Necrose tumoral alfa.

Tabela 3- Comparação entre grupo não suplementado e grupo suplementado (2 gramas de óleo de peixe/dia), de pacientes com câncer colorretal, de acordo com a diferença entre os valores encontrados na semana 9 e os do momento basal para marcadores do estado nutricional e inflamatório. Florianópolis, SC, 2010.

Marcadores	Grupo não suplementado (n = 8)	Grupo suplementado (n = 10)	<i>p</i>
Proteína C-reativa²(mg / L)	1.0 (-1.8;10.3)	-1.4 (-4.0;-0.7)	0.06 ^b
Albumina¹(g / dL)	0.1 (0.2)	0.1 (0.5)	0.87 ^a
IL-6²(pg / mL)	-1.9 (-138.9;4.8) ^c	1,3 (-50.7;31.1) ^c	0.64 ^b
IL-1β¹(pg / mL)	-1.2 (7.0) ^c	2,3 (8.0) ^c	0.37 ^a
TNF-α²(pg / mL)	10.5 (-11.2;18.5) ^c	-2.2 (2.0;24.6) ^c	0.49 ^b
Peso corporal²(Kg)	-1.6 (-2.4;-0.3)	0.5 (-0.3;1.0)	0.01 ^b
IMC²(Kg / m²)	-0.6 (-0.9;-0.1)	0.2 (-0.1;0.4)	0.03 ^b

¹ Valores são media (Desvio Padrão); ² Valores são mediana (intervalo interquartil).

^a Teste -T, ^b Teste Mann Whitney. * GS *n* = 7; GNS *n*=8 porque amostras hemolizaram.

Abreviações são: IMC= Índice de Massa Corporal; IL-6 = interleucina 6; IL-1β = interleucina 1 beta; TNF-α = Fator de Necrose Tumoral- alfa.

6.0. MANUSCRITO 2

Encaminhado ao periódico *Nutrición Hospitalária*.

Manipulação dietética com ácidos graxos ômega-3 de cadeia longa na modulação da resposta inflamatória gerada pelo câncer colo-retal

Dietary manipulation with fatty acids omega-3 long-chain in modulating the inflammatory response generated by colorectal cancer

La manipulación de la dieta con omega-3 de cadena larga en la modulación de la respuesta inflamatoria generada por el cáncer pego-retal

Juliana de Aguiar Pastore¹

Nutricionista, aluna do Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

¹End. para correspondência: Rua Capitão Romualdo de Barros, 861. Bl 04 apto 102. Bairro Carvoeira, Florianópolis, SC. CEP: 88040-600.

Fone: (48) 84020889

e-mail: jupastore@gmail.com

Ricardo Fernandes

Residente em Nutrição Clínica do Hospital Universitário da UFSC.

Erasmu Benício Santos de Moraes Trindade, Dr.

Nutricionista. Professor Doutor do Departamento e do Programa de Pós-Graduação em Nutrição da UFSC

Resumo:

O processo inflamatório é sustentado no câncer colo-retal pelo próprio tumor que junto com células imunes e do estroma secretam mediadores pró-inflamatórios e fatores de crescimento, especialmente citocinas. Estes estão envolvidos na migração, invasão e metástase de células malignas, não apenas nos estágios iniciais da oncogênese. O aumento de alguns mediadores inflamatórios e de proteínas marcadoras da resposta inflamatória demonstrou ser fator prognóstico independente da sobrevida em vários tipos de neoplasias malignas, incluindo colo-retal. A ingestão dietética de ácidos graxos poliinsaturados da família ômega-3 de cadeia longa, presentes no óleo de peixe, tem sido relacionada com a supressão da transformação neoplásica, angiogênese e crescimento de células tumorais, uma vez que modifica reações auto-imunes e inflamatórias. EPA e DHA são rapidamente incorporados a fosfolípídeos de membranas celulares, primariamente de células imunes, e modulam uma série de funções destas. Agem na regulação do sistema imunológico através da síntese de eicosanóides com ação menos pró-inflamatória, atuam na inibição do fator de transcrição nuclear beta aumentado apoptose de células transformadas, aumentam atividade fagocítica dos fagócitos, ativam o receptor peroxissomo proliferador ativado, afetam a proliferação e apoptose de células T CD4 mitógenas e antigênica-induzida. Embora várias vias e mecanismo de modulação da resposta inflamatória já tenham sido apresentados há carência de estudos clínicos experimentais em humanos para nortear intervenções terapêuticas dietéticas adjuvantes.

Unitermos: ômega-3, inflamação, estado nutricional, câncer colo-retal

Abstract:

The inflammatory process is sustained in colorectal cancer by the tumor along with immune cells and stroma secretes pro-inflammatory mediators and growth factors, especially cytokines. These are involved in migration, invasion and metastasis of malignant cells, not only in the early stages of cancer process. The increase of some inflammatory mediators and protein marker of the inflammatory response has proven to be an independent prognostic factor of survival in various types of malignancies, including colorectal. Dietary intake of polyunsaturated fatty acids omega-3 long-chain, present in fish oil, has been associated with the suppression of cancer transformation, angiogenesis and growth of tumor cells, since changes autoimmune reactions and inflammatory diseases. EPA and DHA are rapidly incorporated into phospholipids of cell membranes, primarily in immune cells, and modulate a number of these functions. They act in regulating the immune system through the synthesis of eicosanoids action with less pro-inflammatory act in the inhibition of the transcription factor nuclear beta increased apoptosis of transformed cells, increased phagocytic activity of phagocytes, activates the peroxisome proliferator-activated receptor, affect the proliferation and apoptosis of CD4 antigen and mitogen-induced. Although several pathways and mechanism of modulation of the inflammatory response have already been presented there is a lack of experimental clinical studies in humans to guide dietary adjuvants therapeutic interventions.

Key word: omega-3 fatty acids, inflammation, nutritional status, colorectal cancer

Resumen

El proceso inflamatorio es sostenido en el cáncer pego-retal por el propio tumor que junto con células inmunes y del estroma secretan mediadores pro-inflamatorios y factores de crecimiento, especialmente citocinas. Estos están envueltos en la migración, invasión y metástasis de células malignas, no sólo en las prácticas iniciales de la oncogénesis. El aumento de algunos mediadores inflamatorios y de proteínas marcadoras de la respuesta inflamatoria demostró ser factor pronóstico independiente de la sobrevenida en varios tipos de neoplasias malignas, incluyendo pego-retal. La ingestión dietética de ácidos grasos poli insaturados de la familia ω -3 de cadena larga, presentes en el óleo de pez, ha sido relacionada con la supresión de la transformación neoplásica, angiogénesis y crecimiento de células do tumor, una vez que modifica reacciones auto-inmunes y inflamatorias. EPA y DHA son rápidamente incorporados la fosfolípedes de membranas celulares, primariamente de células inmunes, y modulan una serie de funciones de estas. Actúan en la regulación del sistema inmunológico a través de la síntesis de eicosanóides con acción menos pro-inflamatoria, actúan en la inhibición del factor de transcripción nuclear beta aumentado apoptose de células transformadas, aumentan actividad fagocítica de los fagócitos, activan el receptor peroxissomo proliferador activado, afectan la proliferación y apoptosis de células T CD4 mitogenas y antigênica-inducida. Aunque varias vías y mecanismo de modulación de la respuesta inflamatoria ya hayan sido presentados hace carencia de estudios clínicos experimentales en humanos para nortear intervenciones terapéuticas dietéticas adyuvantes.

Unitérminos: ω -3, inflamación, estado nutricional, cáncer pego-retal

INTRODUÇÃO

O câncer colo-retal (CCR) abrange tumores que atingem o cólon e o reto. Tanto homens como mulheres são igualmente afetados, maior frequência é observada em populações de nível socioeconômico mais alto, que vivem em áreas urbanas e que possuem doença inflamatória intestinal de longa duração. É uma doença tratável e freqüentemente curável quando localizada no intestino e sem extensão para outros órgãos¹.

A etiologia do câncer de cólon é complexa e envolve fatores genéticos e ambientais. O acúmulo de alterações genéticas é fundamental para o desenvolvimento do CCR, e mutações em pelo menos quatro ou cinco genes são necessárias para a formação de um tumor maligno. Estes se originam, em sua maioria, de pólipos adenomatosos¹.

Apesar de a inflamação constituir um evento normal da resposta imune, diferentes condições podem induzir a ativação excessiva do processo inflamatório que, se persistir, provoca danos a tecidos e órgãos. No câncer, o próprio tumor secreta múltiplas citocinas ou fatores de crescimento que podem alterar o microdesenvolvimento do tumor e promover crescimento e metástase. Muitos destes fatores promovem fenótipo angiogênico em estroma ou células do hospedeiro infiltradas, resultando no desenvolvimento de novos vasos que fornecem nutrientes para o crescimento continuado do tumor e facilitam o processo de metastização².

O aumento de alguns mediadores inflamatórios e de proteínas marcadoras da resposta inflamatória demonstrou ser fator prognóstico independente da sobrevida em vários tipos de neoplasias malignas, incluindo melanoma, mieloma, carcinoma renal, câncer de ovário e cânceres do trato gastrintestinal³. Acredita-se, ainda, que a resposta inflamatória é um fator potencialmente importante na variabilidade inter-individual da quimioterapia quanto à resposta ao câncer e seus efeitos tóxicos⁴. Os mediadores inflamatórios estão envolvidos na migração, invasão e metástase de células malignas, não apenas nos estágios iniciais da oncogênese⁵.

Tem-se investigado o uso de lípidos em terapia nutricional. A abordagem molecular tem possibilitado desvendar a interação destes componentes com a membrana celular e a regulação de genes envolvidos em quadros clínicos específicos. No contexto da oncologia, a ingestão dietética de ácidos graxos poliinsaturados da família ômega-3

(ω -3) tem sido relacionada com supressão de transformação neoplásica, angiogênese e crescimento de células tumorais, uma vez que modifica reações auto-imunes e inflamatórias⁶. Alguns estudos têm mostrado melhora na eficácia de quimioterápicos quando associados a ácidos graxos ω -3 de cadeia longa⁶.

Realizou-se uma revisão bibliográfica a partir de exploração de artigos indexados a base de dados Pubmed via National Library of Medicine e Web of Science usando descritores relacionados à temática: câncer colo-retal, inflamação, resposta imune, óleo de peixe e ácidos graxos ω -3 - em idioma português e inglês, combinados de diversas formas. O objetivo traçado foi de descrever e interrelacionar os mecanismos de ação moduladora do óleo de peixe sobre a resposta inflamatória no câncer colo-retal, assim como reunir as recomendações dietéticas.

Ácidos graxos

Os ácidos graxos das famílias ω -3 e ω -6 são obtidos por meio da dieta ou produzidos pelo organismo a partir do ácido linoléico (AL) C18:2 (ω -6) e do ácido α -linolênico (AAL) C18:3 (ω -3), pela ação das enzimas elongase e dessaturase⁷. AL é convertido em ácido araquidônico (AA) C20:4 (ω -6), enquanto AAL é convertido em ácido eicosapentaenóico (EPA) C20:5 (ω -3) e ácido docosahexaenóico (DHA) C22:6 (ω -3)⁸. Os ácidos di-homo- γ -linoléico (ADGL) C20:3 (ω -6), AA e EPA são precursores dos prostanóides das séries 1, 2 e 3 e dos leucotrienos de série 3, 4 e 5, respectivamente (Figura 1)⁷.

Os ácidos graxos ω -3 estão presentes predominantemente em vários tipos de óleos vegetais, nos peixes e algas. O óleo de peixe, assim como as algas são as principais fontes de ácidos graxos de cadeia longa (EPA e DHA), enquanto que os óleos vegetais são a principal fonte de AAL, outras fontes são os vegetais de folha verde, nozes, sementes, frutas, alguns cereais e leguminosas, aves e carnes⁶. Humanos têm um mecanismo enzimático (figura 1) que converte AAL em ácidos graxos da família ω -3 de cadeia alongada (EPA e DHA). No entanto esta interconversão de ácidos graxos é limitada e pode variar em subgrupos da população⁹. Portanto, o modo mais efetivo de aumentar a concentração sérica ou em fosfolípidos de um ácido graxo ω -3 específico é fornecendo-o ao indivíduo. Em uma meta análise, Arterburn, Hall e Oken⁹ concluíram que a partir da ingestão de óleo de peixe a concentração em fosfolípidos e plasmática de EPA e DHA

umentam de maneira linear, entretanto a ingestão de DHA tem uma saturação dose-dependente em torno de dois gramas por dia.

Relação entre a inflamação e resposta imune no câncer

A conexão entre inflamação e câncer pode ser vista considerando duas vias: extrínseca e intrínseca. A via extrínseca surge de condições infecciosas ou inflamatórias, como a doença inflamatória intestinal, que aumentam o risco de desenvolvimento de câncer. A via intrínseca surge de alterações genéticas que causam inflamação e câncer; estas alterações incluem ativação de vários tipos de oncogenes por mutação, rearranjo ou amplificação cromossomal e por inativação de genes supressores de tumor. As células já transformadas produzem mediadores inflamatórios formando um microambiente inflamatório onde não havia inflamação prévia⁵.

As duas vias se convergem, resultando em ativação de fatores de transcrição, como fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B), sinal de tradução e ativação de transcrição 3 (STAT3) e fator indutor de hipóxia 1 α (HIF1 α) em células tumorais. Estes fatores de transcrição coordenam a produção de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas e quimiocinas, assim como a produção de ciclooxigenase 2 (COX2) que resulta em produção de prostaglandinas. Os mediadores inflamatórios, em conjunto, recrutam e ativam leucócitos, mastócitos, macrófagos e eosinófilos. As citocinas produzidas pelas células tumorais ativam os mesmos fatores de transcrição ativados já ativados em células do tumor, nas células inflamatórias e do estroma. Como resultado tem-se produção de mais mediadores inflamatórios e concretização do microambiente inflamatório relacionado ao câncer (figura 2). Assim, a inflamação relacionada ao câncer tem muitos efeitos promotores de crescimento tumoral⁵.

A infiltração de células do tumor por neutrófilos constitui a primeira linha da defesa imune à injúria ou infecção. Quando as reações contra patógenos tornam-se excessivas ou inapropriadas podem contribuir para o crescimento e propagação do câncer e para imunossupressão associada ao desenvolvimento da doença¹⁰. A resposta imune anti-tumor é ainda regulada por células dendríticas, cuja principal função é a fagocitose e apresentação de antígenos, tendo papel crucial tanto na ativação da imunidade antígeno-específica quanto na manutenção; promovendo uma ponte entre imunidade inata e adaptativa¹⁰.

Ácidos graxos e suas relações com a resposta inflamatória e imune

Ácidos graxos poliinsaturados têm um número de funções vitais no corpo humano⁷, inseridos em fosfolipídios da membrana celular são componentes estruturais desta e modulam a fluidez, sinalização e interações celulares⁸. Participam da manutenção em estado de normalidade das funções cerebrais e transmissão de impulsos nervosos, da transferência do oxigênio atmosférico para o plasma sanguíneo, da síntese da hemoglobina e da divisão celular. Desempenham papel importante na regulação do sistema imunológico, agindo como precursores para a síntese de eicosanóides, que incluem prostaglandinas (PG), tromboxanos (TX), leucotrienos (LT) e outros derivados oxidados¹¹. Estão, portanto, envolvidos na modulação da intensidade e da duração da resposta inflamatória¹¹. Como os fosfolipídeos da membrana celular normalmente contêm níveis mais elevados de AA do que de EPA¹², AA é o precursor mais comum de eicosanóides e dá origem a PG, TX e LT de séries pares.

Os eicosanóides agem de forma autócrina e parácrina, influenciando inúmeras funções celulares que controlam mecanismos fisiológicos e patológicos no organismo. Contudo, considera-se que os eicosanóides produzidos a partir de EPA são menos pró-inflamatórios em sua ação biológica do que os mediadores derivados do AA. Existe concorrência entre os ácidos graxos ω -6 e ω -3 para a sua conversão metabólica através das enzimas dessaturase e elongase, que são comuns a ambas as vias¹¹. Entretanto, estas enzimas têm maior afinidade para os ácidos graxos ω -3 de cadeia longa, tal que, quando a ingestão dietética destes ácidos graxos está elevada, eles são preferencialmente metabolizados⁹. Isto leva a uma inibição competitiva do metabolismo do ácido graxo ω -6, onde a dessaturação do AL e concentrações de AA são diminuídas consideravelmente após suplementação de EPA e DHA¹². Uma vez que os ácidos graxos ω -3 são preferencialmente utilizados, qualquer suplementação com ω -3 (exemplo, óleo de peixe) terá um impacto considerável na classe de eicosanóides produzidos. Assim, a suplementação da dieta de seres humanos com óleo de peixe resulta na diminuição da produção de uma série de eicosanóides derivados do AA, incluindo a PGE₂, TXB₂, LTB₄, ácido 5-hidroxi-eicosatetraenóico e LTE₄ por células inflamatórias^{13,14}.

No entanto, alguns estudos têm mostrado que PGE₂ é um potente inibidor da produção de duas citocinas pró-inflamatórias - fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-1 (IL-1) - por monócitos

e macrófagos¹⁵ e que ele inibe a 5-lipoxigenase e assim diminui a produção de LT de série 4 e induz a 15-lipoxigenase promovendo a formação de lipoxinas que são conhecidas por terem efeitos anti-inflamatórios¹⁶. Estes resultados mostram que a PGE₂ possui atividade pró e anti-inflamatória. Assim, alguns derivados de AA exercem papéis pró e anti-inflamatórios e podem ser importantes na resolução da inflamação.

Além disso, muitos dos efeitos de ácidos graxos ω -3 na produção de mediadores inflamatórios parecem estar relacionados com alterações na expressão dos genes que codificam os mediadores, ao invés de mudanças na produção de eicosanóides. Uma via de supressão ocorre através da possibilidade de interferência na apoptose. Quando ativado, o NF- κ b programa morte celular e apoptose. EPA e DHA podem restaurar a função de apoptose pela regulação negativa de NF- κ b¹⁷ que por sua vez regula negativamente a expressão de COX2¹⁸ e de genes da família Bcl-2^{19,20}.

A ativação do receptor peroxissomo proliferador ativado (PPAR) pelos ácidos graxos é uma das vias importantes para o controle do crescimento tumoral²². Através da transcrição de genes específicos pode ocorrer interferência na homeostase lipídica otimizando o fornecimento de energia para as células funcionalmente mais importantes do organismo - incluindo células imunes - e desacelerando a expressão de genes envolvidos na lipogênese²¹. Ativação de PPAR por ω -3 mostra potencial efeito antineoplásico através da detenção de indução de ciclo celular e apoptose, reprogramando diferenciação celular e inibindo angiogênese²². Ácidos graxos como DHA e EPA são ligantes naturais mais fortes para os PPAR que os ácidos graxos saturados e monoinsaturados²³. Além disso, ácidos graxos ω -3 poderiam atenuar processo inflamatório via atividade de PPAR- γ (uma isoforma), talvez envolvendo interferência na ativação de NF- κ b²².

Ácidos graxos ω -3 de cadeia longa também podem ter efeitos benéficos em células imunes humanas, como as células mononucleares do sangue periférico (PBMC), que exercem um papel vital na inflamação. Estudo realizado examinou os efeitos da suplementação de EPA+DHA em todo o perfil de expressão genética do genoma das PBMC. A suplementação resultou em diminuição da atividade anti-inflamatória e anti-aterogênica, caracterizada pela diminuição da expressão de genes de fatores envolvidos em atividades pró-inflamatórias como NF- κ b, citocinas pró-inflamatórias e eicosanóides²⁴.

Uma descoberta recente identificou um novo grupo de mediadores lipídicos que tem papel fundamental na resolução da

inflamação. Dois componentes desse grupo, as resolvinas e protectinas, são biossintetizadas a partir de ácidos graxos ω -3 de cadeia longa, como EPA e DHA. Estes mediadores parecem exercer potente ação anti-inflamatória nos neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e células T. Autores afirmam que provavelmente esses mediadores explicarão muitas das ações anti-inflamatórias dos ácidos graxos ω -3 de cadeia longa que foram previamente descritas na literatura²⁵. Quanto às propriedades imunomoduladoras dos ácidos graxos ω -3 tem-se que EPA e DHA dietéticos alteram composição dos fosfolipídios e de proteínas de sinalização²⁶, são importantes para a manutenção e a amplificação dos receptores de células T sinalizando vias em parte por agir como facilitadores para interações proteína-proteína²⁷.

Existem ainda outras vias pelas quais a suplementação de ácidos graxos ω -3 de cadeia longa parecem interferir negativamente na iniciação e progressão do tumor, são elas: pela diminuição da ação pró-oncogênese da ornitina descarboxilase no lúmen intestinal⁴¹, pela regulação negativa da proteína quinase C beta II (PKC β II) que regula proliferação celular e apoptose na cripta²⁸, pela diminuição dos níveis da isoforma induzível do óxido nítrico sintase (iNOS) diminuindo a estimulação de COX2^{29,20} e redução da atividade de fator de crescimento semelhante à insulina-II (IGF-II) permitindo apoptose de células alteradas³⁰.

Resultado de estudos experimentais com humanos

O câncer colo-retal evolui a partir de um processo de várias etapas e é uma doença fortemente influenciada pela dieta. Consistente com ensaios clínicos em humanos³¹⁻³⁶ estudos experimentais têm demonstrado que o equilíbrio entre a proliferação das células epiteliais do cólon e apoptose pode ser modulada favoravelmente por ácidos graxos ω -3 na dieta, conferindo resistência a agentes cancerígenos tóxicos³⁷. EPA tem mostrado inibir inflamação in vivo e tem sido associado com ganho de peso, melhor resposta a terapia, menores complicações e freqüente aumento da sobrevida em vários pacientes com câncer^{38,39}. Ingestão dietética de ácidos graxos ω -3 tem sido correlacionada com supressão de transformação neoplásica, angiogênese e crescimento de células tumorais⁴⁰ inclusive durante a quimioterapia⁶.

São escassos, ainda, os estudos experimentais em humanos que investigam o efeito de dietas ricas em ω -3 de cadeia longa no estado nutricional, resposta imunológica e condições inflamatórias de

indivíduos com desordens colo-retal. O quadro 1 apresenta estes estudos e seus principais achados em ordem cronológica.

Podemos observar a evolução dos achados clínicos e a concordância destes com os publicados a nível celular e já descritos. Os estudos comprovam que os ácidos graxos ômega-3 de cadeia longa são incorporados e influenciam o sistema imune dos seres humanos com câncer colo-retal em quimioterapia de maneira dose-dependente. No entanto, há ainda muitas dúvidas e incertezas rondando a temática, como a dose de ácidos graxos que deve ser consumida, o período de tempo e o momento de iniciar a suplementação.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Um grande número de estudos publicados defende a idéia de que ácidos graxos ω -3 modulam componentes importantes relacionados à imunossupressão gerada pela inflamação exacerbada, agindo como terapia adjuvante ao desenvolvimento de câncer colo-retal e a sua progressão. Entretanto, é essencial entender precisamente como os ácidos graxos ω -3 modulam a função imunológica para que as recomendações dietéticas possam ser embasadas cientificamente. A partir desta revisão fica evidente a carência de estudos clínicos.

Dentre os desafios futuros estão a determinação exata dos mecanismos pelos quais dietas com ácidos graxos ω -3 influenciam a manutenção do equilíbrio de subconjunto de células T gerando um sistema imunológico saudável, a alteração na estrutura de microdomínios e a função da membrana, o metabolismo de eicosanóides e a ativação de receptores nucleares, assim como a tradução destes achados para a prática clínica com a determinação de quantidade de ácidos graxos ω -3 de cadeia longa, proporção, tempo de administração e momento ótimo para uso.

As publicações discutidas neste artigo relacionam-se a achados clínicos em humanos com doença localizada em cólon e reto. Devido a particularidades quanto à fisiopatologia e evolução clínica da doença com outra localização não se pode generalizar os resultados de suplementação aqui apresentados.

Quadro 1 – Resumo de alguns estudos em seres humanos, investigando o efeito de ácidos graxos ω -3 de cadeia longa no câncer de cólon.

Resultados	Dieta experimental	Métodos	Ano da publicação	Autores
Diminuição das células em fase “S” na parte superior das criptas do cólon. Diminuição dos níveis de AA na mucosa retal. Aumento dos níveis de EPA e DHA na mucosa retal.	Suplementação de óleo de peixe contendo 4,1g/dia EPA e 3,6g/dia DHA.	Suplementação com ácidos graxos ω -3 de cadeia longa durante 12 semanas em um ensaio duplo-cego em pacientes com pólipos colo-rectais adenomatosos esporádicos.	1992	Anti M et al. ³¹
Diminuição da média do índice proliferativo da mucosa. Diminuição dos níveis de AA na mucosa retal. Aumento dos níveis de EPA e DHA na mucosa retal.	Suplementação com 2,1g ou 5,1g ou 7,7g/dia de óleo de peixe.	Suplementação com óleo de peixe durante 30 dias em um ensaio duplo-cego em pacientes com adenomas colônicos esporádicos.	1994	Anti M et al. ³²
Aumento do índice de apoptose e de células positivas para Bax (pró-apoptóticas).	-	Diminuição da ingestão de lipídios de 30% para 20% do total da dieta; diminuição do consumo de alimentos contendo ácidos graxos ω -6 e aumento da ingestão de alimentos contendo ácidos graxos ω -3, durante 2 anos em pacientes polipeptonizados.	2003	Cheng J et al. ³³

<p>Aumento significativo de EPA na mucosa do cólon. Aumento da apoptose e diminuição da proliferação das células da cripta colônica.</p>	<p>Aumento do peso corporal em 2,5 kg no período pré-quimioterapia e estabilização durante a QT. Aumento significativo da PCR entre o início e a terceira semana de suplementação, com diminuição posterior.</p>	<p>Aumento na incorporação plasmática de EPA e DHA após suplementação. Aumento na atividade fagocítica de neutrófilos. Não houve diferença estatística no peso dos pacientes com e sem suplemento; no entanto, dos 19 indivíduos, 12 apresentaram ganho</p>
<p>Suplementação com 2g/dia de EPA.</p>	<p>Suplementação com 2.18g/dia de EPA e 0,92g/dia de DHA.</p>	<p>Suplementação com 2g/dia de óleo de peixe encapsulado.</p>
<p>Suplementação de EPA encapsulada de EPA durante três meses em pacientes com adenoma colo-retal.</p>	<p>Suplementação de um composto hipercalórico, hiperoletico e rico em EPA durante 12 semanas (três semanas antes de iniciar a QT e nove semanas durante a QT) em pacientes com câncer colo-retal avançado.</p>	<p>Investigação da ação do ômega-3 durante 8 semanas sobre o sistema imunitário inato e massa corporal de pacientes oncológicos submetidos à quimioterapia. Dos 19 pacientes suplementados dez tinham doença localizada em cólon e/ou reto.</p>
<p>2007</p>	<p>2007</p>	<p>2008</p>
<p>Courtney ED, et al.³⁴</p>	<p>Red JA, et al.³⁵</p>	<p>Bonato³⁶</p>

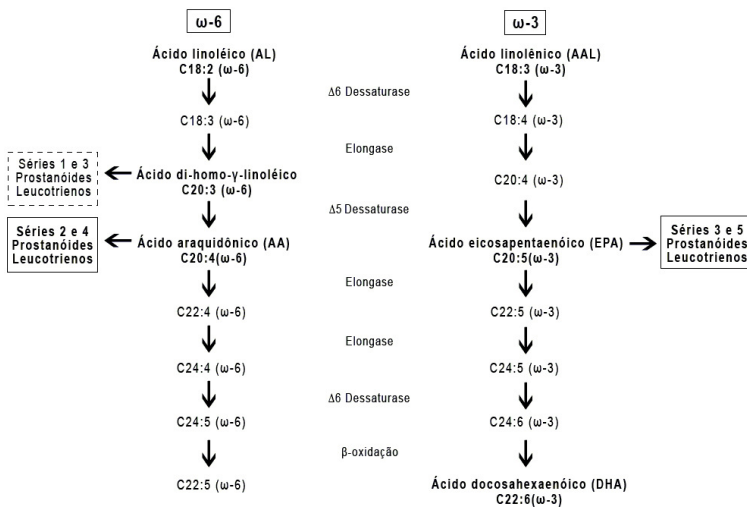


Figura 1 – Metabolismo dos ácidos graxos ω-6 e ω-3.

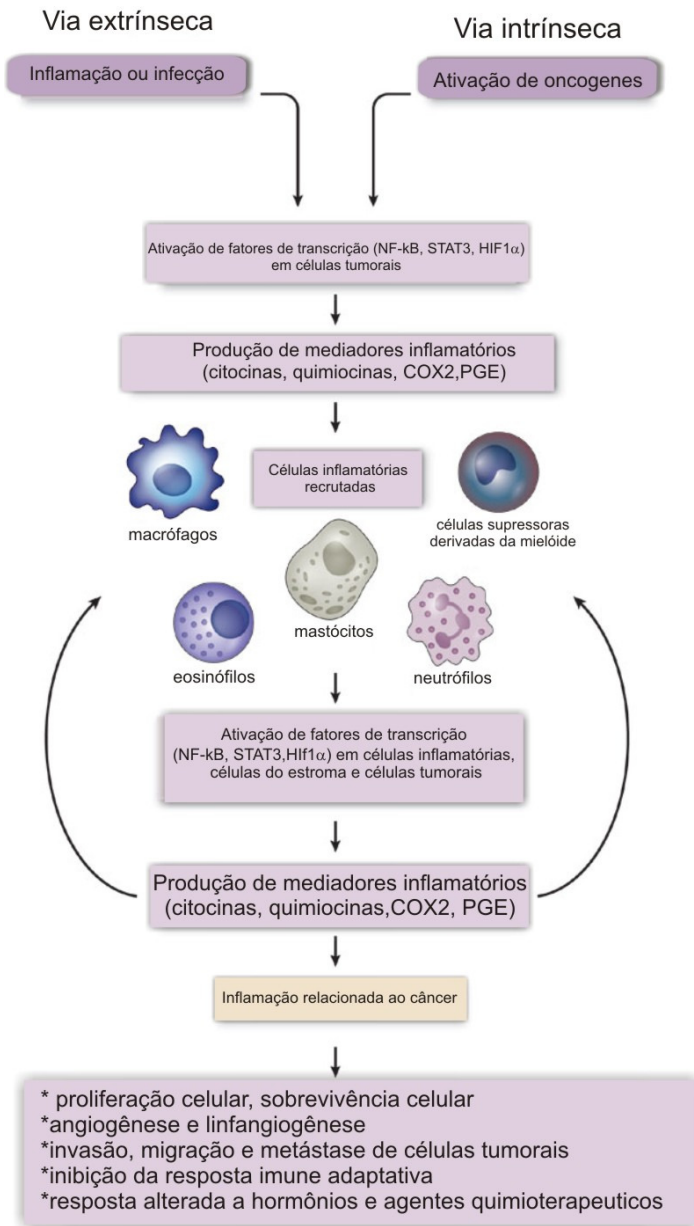


Figura 2 - Relação entre inflamação e câncer.

Fonte: Traduzido de Mantovani et al⁵.

- 1** – Ministério da Saúde (Brasil), Instituto Nacional de Câncer. Câncer colo-retal. Rio de Janeiro: INCA, 2009.
- 2-** Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell*. 2005 Mar;7(3):211-7.
- 3** - Raman D, Baugher PJ, Thu YM, Richmond A. Role of chemokines in tumor growth. *Cancer Lett*. 2007 Oct 28;256(2):137-65.
- 4-** Slaviero KA, Clarke SJ, Rivory LP. Inflammatory response: an unrecognized source of variability in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of cancer chemotherapy. *Lancet Oncol*. 2003 Apr;4(4):224-32.
- 5-** Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008 Jul 24;454(7203):436-44.
- 6** - Hardman WE. International Research Conference on Food, Nutrition and Cancer - (n-3) fatty acids and cancer therapy. *J Nutr*. 2004;134:3427S–3430S.
- 7** – Martin CA, de Almeida VV, Ruiz MR, Visentainer JEL, Matshushita M, de Souza NE, et al. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. *Rev Nutr*. 2006 Nov/Dec; 19(6):761-70.
- 8–** Roynette CE, Calder PC, Dupertuis YM, Pichard C. n-3 polyunsaturated fatty acids and colon cancer prevention. *Clin Nutr*. 2004 Apr;23(2):139-51.
- 9-** Arterburn LM, Hall EB, Oken H. Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans. *Am J Clin Nutr*. 2006 Jun;83(6 Suppl):1467S-1476S.

- 10-** Balkwill F, Mantovani, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 2001 Feb 17;357(9255):539-45.
- 11-** Calder PC. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: new twists in an old tale. *Biochimie*. 2009 Jun;91(6):781-5.
- 12-** Yaqoob O, Pala HS, Cortina-Borja M, Newsholme EA, Calder P. Encapsulated fish oil enriched in alpha-tocopherol alters plasma phospholipid and mononuclear cell fatty acid compositions but not mononuclear functions. *Eur J Clin Invest* 2000 Mar;30(3):260-74.
- 13-** Rees D, Miles EA, Banerjee T, Wells SJ, Roynette CE, Wahle KW, et al. Dose-related effects of eicosapentaenoic acid on innate immune function in healthy humans: a comparison of young and older men. *Am J Clin Nutr*. 2006 Feb;83(2):331-42.
- 14-** Trebble TM, Wootton SA, Miles EA, Mullee M, Arden NK, Ballinger AB, et al. Prostaglandins E₂ production and T-cell function after fish oil supplementation: response to antioxidant co-supplementation. *Am J Clin Nutr*. 2003 Sep;78(3):376-82.
- 15-** Miles EA, Allen E, Calder PC. In vitro effects of eicosanoids derived from different 20-carbon fatty acids on production of monocyte-derived cytokines in human whole blood cultures. *Cytokine*. 2002 Dec;20(5):215-23.
- 16-** Levy BD, Clish CB, Schmidt B, Gronert K, Serhan CN. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nat Immunol*. 2001 Jul;2(7):612-9.
- 17-** Karin M. Nuclear factor- κ B in cancer development and progression. *Nature*. 2006 May 25;441(7092):431-6.

18- Tsujii M, DuBois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell*. 1995 Nov 3;83(3):493-501.

19- Chiu LC, Wan JM. Induction of apoptosis in HL-60 cells by eicosapentaenoic acid (EPA) is associated with downregulation of bcl-2 expression. *Cancer Lett*. 1999 Oct 18;145(1-2):17-27.

20- Narayanan B, Narayanan N, Simi B, Reddy B. Modulation of inducible nitric oxide synthase and related proinflammatory genes by the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid in human colon cancer cells. *Cancer Res*. 2003 Mar 1;63(5):972-9.

21- Grimm H, Mayer K, Mayser P, Eigenbrodt E. Regulatory potential of n-3 fatty acids in immunological and inflammatory processes. *Br J Nutr*. 2002; 87 (suppl 1) S59-S67.

22 - Han S, Roman J. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma: a novel target for cancer therapeutics? *Anticancer Drugs*. 2007 Mar;18(3):237-44.

23- Sanderson LM, de Groot PJ, Hooiveld GJ, Koppen A, Kalkhoven E, Müller M, et al. Effect of synthetic dietary triglycerides: a novel research paradigm for nutrigenomics. *PLoS One*. 2008 Feb 27;3(2):e1681.

24- Bouwens M, van de Rest O, Dellschaft N, Bromhaar MG, de Groot LC, Geleijnse JM, et al. Fish-oil supplementation induces antiinflammatory gene expression profiles in human blood mononuclear cells. *Am J Clin Nutr*. 2009 Aug;90(2):415-24.

25- Serhan CN, Chiang N, van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol*. 2008 May;8(5):349-61.

- 26** - Fan YY, McMurray DN, Ly LH, Chapkin RS. Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids remodel mouse T-cell lipid rafts. *J Nutr.* 2003 Jun;133(6):1913–20.
- 27**- Harder T, Engelhardt KR. Membrane domains in lymphocytes— from lipid rafts to protein scaffolds. *Traffic.* 2004 Apr;5(4):265–75.
- 28**– Davidson LA, Brown RE, Chang WC, Morris JS, Wang N, Carroll RJ, et al. Morphodensitometric analysis of protein kinase C beta (II) expression in rat colon: modulation by diet and relation to in situ cell proliferation and apoptosis. *Carcinogenesis.* 2000 Aug;21(8):1513-9.
- 29**– Lagares-Garcia J, Moore R, Collier B, Heggere M, Diaz F, Qian F. Nitric oxide synthase as a marker in colorectal carcinoma. *Am Surg.* 2001 Jul;67(7):709-13.
- 30**– Kim EJ, Kim WY, Kang YH, Ha YL, Bach LA, Park JHY. Inhibition of caco-2 cell proliferation by (n-3) fatty acids: possible mediation by increased secretion of insulin-like growth factor binding protein-6. *Nutr Res.* 2000;20(10):1409-21.
- 31**– Anti M, Giancarlo M, Armelao F, Maria Bartoli G, Ficarelli R, Percesepe A, et al. Effect of ω -3 fatty acids on rectal mucosal cell proliferation in subjects at risk for colon cancer. *Gastroenterology.* 1992;103(3):883-91.
- 32** – Anti M, Armelao F, Marra G, Percesepe A, Bartoli GM, Palozza P, et al. Effects of different doses of fish oil on rectal cell proliferation in patients with sporadic colonic adenomas. *Gastroenterology.* 1994 Dec;107(6):1709-18.
- 33**– Cheng J, Ogawa K, Kuriki K, Yokoyama Y, Kamiya T, Seno K, et al. 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 Lett.* 2003 Apr 10;193(1):17-24.

34- Courtney ED, Matthews S, Finlayson C, Di Pierro D, Belluzzi A, Roda E, et al. Eicosapentaenoic acid (EPA) reduces crypt cell proliferation and increases apoptosis in normal colonic mucosa in subjects with a history of colorectal adenomas. *Int J Colorectal Dis.* 2007 Jul;22(7):765-76.

35- Read JA, Beale PJ, Volker DH, Smith N, Childs A, Clarke SJ. Nutritional intervention using an eicosapentaenoic acid (EPA) containing supplement in patients with advanced colorectal cancer. Effects on nutritional and inflammatory status: a phase II trial. *Support Care Cancer.* 2007 Mar;15(3):301-7.

36- Bonatto SJR. Efeito da suplementação com óleo de peixe, durante oito semanas, sobre o sistema imunitário inato de pacientes, pós-remoção tumoral e efeito *in vitro* do óleo de peixe sobre as células tumorais [Tese]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2008. 115 p.

37- Davidson LA, Nguyen DV, Hokanson RM, Callaway ES, Isett RB, Turner ND, et al. Chemopreventive n-3 polyunsaturated fatty acids reprogram genetic signatures during colon cancer initiation and progression in the rat. *Cancer Res* 2004 Sep 15;64(18):6797-804.

38- Jho DH, Cole SM, Lee EM, Espat NJ. Role of omega-3 fatty acid supplementation in inflammation and malignancy. *Integr Cancer Ther.* 2004 Jun;3(2):98-111.

39- Elia M, Van Bokhorst-de van der Schueren MA, Garvey J, Goedhart A, Lundholm K, Nitenberg G, et al. Enteral (oral or tube administration) nutritional support and eicosapentaenoic acid in patients with cancer: a systematic review. *Int J Oncol.* 2006 Jan;28(1):5-23.

40- Simopoulos AP. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother.* 2002 Oct;56(8):365-79.

7.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

a) Verificou-se alteração significativa nos marcadores de estado nutricional e na relação PCR/albumina entre os grupos. Os indivíduos do grupo suplementado com óleo de peixe por nove semanas apresentaram ao final do período melhor estado nutricional e menor risco na avaliação pela relação PCR/Albumina. Não se verificou diferença estatística dos valores de interleucinas entre os grupos. Um marcador de inflamação, a proteína C-reativa, apresentou-se como um valor borderline.

b) Não houve abandono do estudo devido queixa de dificuldade do consumo da quantidade estabelecida de óleo de peixe.

c) Não se identificou, em nenhum dos momentos do estudo, indivíduos classificados como caquéticos, segundo padrões diagnósticos de FEARON et al. (2006).

d) Este estudo foi importante, pois mostrou o efeito do suplemento isolado de óleo de peixe sobre marcadores do estado nutricional. Outros autores haviam elucidado o efeito de um suplemento com maior quantidade de ácidos graxos EPA e DHA combinados com alta densidade calórica e protéica.

e) O estudo permite inferir que o consumo de suplemento encapsulado de óleo de peixe por indivíduos com câncer colo-retal em quimioterapia pode ser benéfico para o curso do tratamento, devendo ser estimulado pelos profissionais.

f) A aderência do paciente é um fator limitante em estudos de intervenção nutricional. Neste estudo a aderência foi monitorada por um diário de registro de consumo de cápsulas e contatos telefônicos com os pacientes. O fato de ter sido solicitado a devolução do registro de consumo e dos frascos de suplemento, após as nove semanas de tratamento, permitiram aos pesquisadores obter uma estimativa de consumo que se acredita ser muito próxima da real. A exclusão, no momento das análises, de indivíduos com ingestão abaixo de 80% do recomendado de óleo de peixe aumenta a fidelidade dos resultados.

g) Pacientes com doença avançada e em tratamento apresentam múltiplos sintomas que se confundem entre si e dificultam a condução de intervenção clínica com estes pacientes, assim como a interpretação de resultados. Os indivíduos apresentam-se, ainda, afetados emocionalmente, em dúvidas sobre seu futuro e com dificuldades para lidar com a doença. Este foi um estudo inovador, que superou alguns obstáculos para sua realização, foi conduzido de forma cautelosa com apoio de diversos colaboradores e respeitando cada sujeito e suas particularidades. Os resultados são novos e otimistas em termo de tratamento dietoterápico adjuvante. Os autores acreditam na necessidade de continuidade do estudo, com aumento do número de indivíduos em cada grupo e na hipótese de testar o efeito da suplementação sob diferentes protocolos quimioterápicos.

h) O fato de indivíduos do GNS não ingerirem nenhum tipo de cápsula pode levar a questionamento sobre atribuição dos resultados ao “efeito placebo”. Esta dúvida pode persistir por certo tempo, pois ainda não é possível mascarar o efeito do consumo de óleo de peixe, sabe-se que há estudos para desenvolvimento de cápsulas de óleo vegetal desodorizadas. Os estudos atuais que realizam suplementação de óleo de peixe em indivíduos com diferentes patologias utilizam grupo controle sem tratamento ou vários grupos tratamento onde suplementam diferentes doses de óleo de peixe.

i) A ingestão alimentar atual dos indivíduos, analisadas através de três recordatórios de 24 horas, aplicados durante o curso da intervenção, mostra que: a ingestão calórica média do grupo está abaixo da sua necessidade; a ingestão média de fibra e cálcio está abaixo das necessidades estabelecidas pela Adequate Intake (AI), das recomendações estabelecidas pelas Dietary References Intakes (DRI's), segundo sexo e idade; a distribuição dos macronutrientes encontra-se dentro da faixa estabelecida pela Acceptable Macronutrient Distribution Range (AMDR) das DRI's. Sobre a frequência de consumo de peixe, 52,2% relataram não possuir esta habito e 26,1% relataram consumir peixe uma vez na semana; em relação ao consumo de carne vermelha, 100% relataram ter este habito mais de uma vez na semana, destes, 91,3% mais de três vezes na semana.

REFERÊNCIAS

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer Facts e Figures 2009**. Atlanta: American Cancer Society, 2009.

ARGILÉS, J.M.; BUSQUETS, S.; LÓPES-SORIANO, F.J. Cytokines in the pathogenesis of câncer cachexia. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**. v. 6, p. 401-406, 2003.

ARGILÉS, J.M. Cancer associated malnutrition. **European Journal of Oncology Nursing**, v. 9, p. 39-50, 2005.

ARTEMBURN, L.M.; HALL, E.B.; OKEN, H. Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 83, p.1467S-76S, 2006.

BALESTIERI, F.M.P. **Imunologia**. Barueri: Manole, 2006. p. 45-61.

TSOUKNOS, A.; NASH, G.B.; RAINGER, G.E. Monocytes initiate a cycle of leukocyte recruitment when cocultured with endothelial cells. **Atherosclerosis**. v. 170, p. 49-58, 2003.

BALKWILL, F. Cancer and chemokine network. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, p. 540-550, 2004.

BALKWILL, F.; CHARLES, K.A.; MANTOVANI, A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. **Cancer Cell**, v. 7, p. 211-217, 2005.

BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow?. **Lancet**, v. 357, p. 539-545, 2001.

BELLONE, S. et al. High serum levels of interleukin-6 in endometrial carcinoma are associated with uterine serous papillary histology, a highly aggressive and chemotherapy-resistant variant of endometrial cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 98, p. 92-98, 2005.

BELLUCO, C.; NITTI, D.; FRANTZ, M.; et al. Interleukin-6 blood level is associated with circulating carcinoembryonic antigen and prognosis in patients with colorectal cancer. **Annals of Surgical Oncology**, v. 7, p. 133-138, 2000.

BLACKBURN, G.L.; THORTON, P.A. Nutrition assessment of the hospitalized patients. **Medical Clinics of North America**, v. 63, p. 113-15, 1979.

BONNEFOY, M. et al. Usefulness of the prognostic inflammatory and nutritional index (PINI) in hospitalized elderly patients. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 68, p. 189-195, 1998.

BONATTO, Sandro José Ribeiro. **Efeito da suplementação com óleo de peixe, durante oito semanas, sobre o sistema imunitário inato de pacientes, pós-remoção tumoral e efeito *in vitro* do óleo de peixe sobre as células tumorais.** Curitiba, 2008. 115f. Tese. Doutorado em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Paraná.

BRAUNWALD, E; FAUCI, A.S.; KASPER, D.L.; LONGO, D.L.; JAMESON, J.L. **Harrison - Medicina Interna.** McGraw Hill, 2002. 15. ed. p. 617-622.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Falando sobre câncer do intestino.** Rio de Janeiro: INCA, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Câncer colo-retal**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=325>. Acesso em: 3 mar 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa 2010: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2009. 98 p.

BROZEK, W. et al. Differentiation-dependent expression and mitogenic action of interleukin-6 in human colon carcinoma cells: relevance for tumor progression. **European Journal of Cancer**, v. 41, p. 2347-2354, 2005.

BURDGE, G.C.; CALDER, P.C. Conversion of alfa-linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults. **Reproduction Nutrition Development**, v. 45, p. 581-597, 2005.

BURKE, A.C. Neoplasia do Trato Gastrointestinal. In: CARPENTER, C.C.J.; GRIGGS, R.C.; LOSCALZO, J. **Medicina Interna Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2002. 5. ed. p. 313-317.

BURNS, P.C. et al Phase I clinical study of fish oil fatty acid capsules for patients with cancer cachexia: cancer e leukemia group B study 9473. **Clinical Cancer Research**, v.5, p.3842-3947, 1999.

BURNS, P.C. et al. Phase II Study of high-dose fish oil capsules for patients with cancer-related cachexia. **Cancer**, v. 101, p. 370-378.

CABRAL, E.L.B.; CORREIA, M.I.T.D. Princípios nutricionais na abordagem do câncer avançado. In: WAITZBERG, D.L. **Dieta, Nutrição e Câncer**. São Paulo: Atheneu, p. 329-33, 2004.

CALDER, P.C.; DECKELBAUM, R.J. Omega-3 fatty acids: time to get the messages right!. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 11, p. 91–93, 2008.

CALDER, P. C. Immunomodulation by omega-3 fatty acids. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 77, p. 327-35, 2007.

CALDER, P.C. The relationship between the fatty acid composition of immune cells and their function. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 79, p. 101-108, 2008.

CALVIELLO, G.; SERINI, S.; PICCIONI, E. n-3 polyunsaturated fatty acids and the prevention of colorectal cancer: molecular mechanisms involved. **Current Medical Chemistry**, v. 14, p.3059–3069, 2007.

CHAPKIN, R.S.; MC MURRAY, D.N.; LUPTON, R.J. Colon cancer, fatty acids and anti-inflammatory compounds. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 23, p. 48-54, 2007.

CHIN, A.C.; PARKOS, C.A. Pathobiology of neutrophil transepithelial migration: implications in mediating epithelial injury. **Annals of Pathology**, v. 2, p. 111-143, 2007.

CHUNG, Y.C.; CHANG, Y.F. Serum C-reactive protein correlates with survival in colorectal cancer patients but is not an independent prognostic indicator. **European Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 15, p. 369–373, 2003.

CORRÊA, C.R. et al. Comparação entre a relação PCR/albumina e o índice de prognóstico inflamatório nutricional (IPIN). **Journal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 38, p.183-190, 2002.

CULING, Z. et al. Interleukin-6 regulation of prostate cancer cell growth. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 95, p. 497-505, 2005.

DESSI, M. et al. The usefulness of the prognostic inflammatory and nutritional index (PINI) in a haemodialysis population. **Nutrition Metabolic Cardiovascular Disease**, doi:10.1016/j.numecd.2009.01.009 (in print), 2009.

DIAS, M.C.G. Câncer. In: CUPPARI, L. **Nutrição: nutrição clínica no adulto**. São Paulo: Manole; 2 ed. rev. amp. 2006. p. 243-56.

DOUMAS, B.T.; WATSON, W.A; BIGGS, H.G. Albumin standards and measurements of serum albumin with bromocresol green. **Clinica Chemica Acta**, v.32, p.87-96, 1971.

DUPERTUIS, Y.M.; MEGUID, M.; PICHARD, C. Colon cancer therapy: new perspectives of nutritional manipulations using polyunsaturated fatty acids. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 10, p. 427–432, 2007.

ELIA, M. et al. Enteral (oral or tube administration) nutritional support and eicodapentaenoic acid in patient with cancer: a systematic review. **International Journal of Oncology**, v. 28, p. 5-23, 2006.

FAHY, E. et al. A comprehensive classification system for lipids. **Journal of Lipid Research**, v. 46, p. 839-861, 2005.

FEARON, K.C.; VOSS, A.C.; HUSTEAD, D.S. Definition of cancer cachexia: effect of weight loss, reduce food intake, and systematic inflammation on functional status and prognosis. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 83, p. 1345-1350, 2006.

FEARON, K.C.H. Câncer cachexia: Developing a multimodal therapy for a multimodal problem. **European Journal of Cancer**, v. 44, p. 1124-1132, 2008.

FRISANCHO, A.R. **Antropometric standards for the assessment of growth and nutritional status**. Ann Arbor, University of Michigan Press, 1990.

GAWRISH, K.; ELDHO, N.V.; HOLTE, L.L. the structure of DHA in phospholipid membranes. **Lipids**, v. 38, p. 445-452, 2003.

HARDMAN, W.E. International Research Conference on Food, Nutrition, and Câncer - (n-3) fatty acids and cancer therapy. **Journal of Nutrition**, v. 134, p. 3427-3430, 2004.

HARRIS, et al. Towards Establishing dietary Reference Intakes for Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acids. **Journal of Nutrition**, v. 139, p. 804S-819S, 2009.

INGENBLEEK, Y.; CARPENTIER, Y.A.; A prognostic inflammatory and nutritional index scoring critically ill patients. **International Journal of Vitamin and Nutrition Research**, v. 55, p. 91-110, 1985.

INSTITUTE OF MEDICINE, food and nutrition board. **Dietary References Intake (DRI's): Recommended Itake for Individuals, Macronutrientes**. 2002.

JATOI, A. et al. An eicosapentaenoic acid supplement verses magesrol verses both for patients with cancer-associated wasting: a North Central Cancer Treatment Group and National Cancer Institute of Canada collaborative effort. **Journal Clinical Oncology**, v.22, p. 2469-2476, 2004.

JHO, D.H. et al. Role of omega-3 fatty acid supplementation in inflammation and malignancy. **Integrative Cancer Therapies**, v. 3, p. 98–111, 2004.

JORDAN, A.; STEIN, J. Effect of an omega-3 fatty acid containing lipid emulsion alone and in combination with 5-fluoracil (5-FU) on growth of colon cancer cell line Caco-2. **European Journal of Nutrition**, v. 42, p. 324-331, 2003.

KARIN, M. Nuclear factor- κ B in cancer development and progression. **Nature**, v. 441, p. 431-436, 2006.

KOIDE, Y. et al. Preoperative C-reactive as a prognostic and therapeutic marker for colorectal cancer. **Journal of Surgical Oncology**, v. 98, p. 540-544, 2008.

LEE, J.M.; VILCEK, J. Interleukin-6: a multifunctional cytokine regulating immune reactions and the acute phase protein response. **Laboratory Investigation**, v. 61, p. 1588-1600, 1989.

LUKASZEWICZ, M.; MROCZKO, B.; SZMITKOWSKI, M. Clinical significance of interleukin-6 (IL-6) as a prognostic factor of cancer disease. **Pol Arch Med Wewn**, v. 117, p. 247-251, 2007.

LUHR, T.; MODI, J. **Development of a high-sensitivity C-reactive protein assay.**

Disponível em: <http://www.devicelink.com/ivdt/archive/00/03/003/html>.
Acesso em: 03 jun. 2010.

MANTOVANI, A. et al. Cancer-related inflammation. **Nature**, v. 454, p. 436-444, 2008.

MARNELL, L.; MOLD, C.; CLOS, T.W.D. C-reactive protein: Ligands, receptors and role in inflammation. **Clinical Immunology**, v. 117, p. 104-111, 2005.

MENESES, M.E.S.; LIRA, G.M.; OMENA, C.M.B.; FREITAS, J.D.; SANT'ANA, A.E.G. Composição centesimal, colesterol e perfil de ácidos graxos dos peixes tainha (*Mugil cephalus*) e camurim (*Centropomus undecimalis*) da Lagoa Mundaú, AL/Brasil. **Revista Instituto Adolfo Lutz (Impr.)**, v.67, n.2, pp. 89-95, 2008.

MILES, E.A.; ALLEN, E.; CALDER P.C. In vitro effects of eicosanoids derived from different 20-carbon Fatty acids on production of monocyte-derived cytokines in human whole blood cultures. **Cytokine**, v. 20, p. 215-223, 2002.

MOREIRA, A.B.; SOUZA, N.E.; VISENTAINER, J.V.; MATSUSHITA, M. Composição de ácidos graxos e teor de lipídios em cabeças de peixes: matrinxã (*B. cephalus*), Piraputanga (*B. microlepis*) e Piracanjuba (*B. orbignyana*), criados em diferentes ambientes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, p.179-183, 2003.

NEGRIER, S. et al. Interleukin-6, Interleukin-10, and Vascular Endothelial Growth Factor in Metastatic Renal Cell Carcinoma: Prognostic Value of Interleukin-6. **Journal of Clinical Oncology**. v. 22, p. 2371-2378, 2004.

NELSON, K.A.; WALSH, D. The cancer anorexia-cachexia syndrome: a survey of the Prognostic Inflammatory and Nutritional Index (PINI) in advanced disease. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 24, p. 424-428, 2002.

NIKITEAS, N.I.; TZANAKIS, N.; GAZOULI, M. Serum IL-6, TNF-alpha and CRP levels in Greek colorectal cancer patients: prognostic implications. **World Journal of Gastroenterology**, v. 11, p. 1639-1643, 2005.

NOVAK, T.E. et al. NF-kappa B inhibition by omega-3 fatty acids modulates LPS-stimulated macrophage TNF-alpha transcription. **American Journal of Physiology**, v. 284, p. 84-89, 2003.

NOZOE, T. et al. Significance of preoperative elevation of serum C-reactive protein as an indicator for prognosis in colorectal cancer. **American Journal of Surgery**, v. 176, p. 335-338, 1998.

ÔMEGA 3: óleo de peixe em cápsula. Governador Celso Ramos: Phytomare, [2009]. Bula de remédio.

OPAS,WHO. XXXVI Reunión del Comité Asesor de Investigaciones en Salud. Encuesta Multicentrica: Salud, bien estar y envejecimiento (SABE) en América Latina y el Caribe. Washington, mayo 2001.

OTAKE, T. et al. C-reactive protein and colorectal adenomas: self defense forces health study. **Cancer Science**, v. 100, p. 709-714, 2009.

OUCHI, N. et al. Reciprocal association of C-reactive protein with adiponectin in blood stream and adipose tissue. **Circulation**, v. 107, p. 671- 674, 2003.

PFITZENMAIER, J. et al. Elevation of cytokines levels in cachectic patients with prostate carcinoma. **Cancer**, v.97, p.1211-1216, 2003.

KEW, S. et al. Lack of effect of foods enriched with plant or marine derived n-3 fatty acids on human immune function. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.77, p. 1287-1295, 2003.

RAMAN, D. et al. Role of chemokines in tumor growth. **Cancer Letter**, v. 256, p. 137-165, 2007.

RAMOS, E.J. et al. Effects of omega-3 fatty acid supplementation on tumour-bearing rats. **Journal of American College of Surgery**, v.199, p.716-723, 2004.

READ, J.A. et al. Nutritional intervention using an eicosapentainoic acid (EPA)-containing supplement in patients with advanced colorectal cancer. Effects on nutritional and inflammatory status: a phase II trial. **Supportive Care Cancer**, v. 15, p. 301-307, 2007.

REES, D. et al. Dose related effects of eicosapentaenoic acid on innate immune function in healthy humans: a comparison of young and older men. **American Journal of Clinical Nutrition**, n.83, p. 331-342, 2006.

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

SAIKO, Y. et al. Proinflammatory cytokine IL-1 β promotes tumour growth of Lewis lung carcinoma by induction of angiogenic factors: in vivo analysis of tumor-stroma interaction. **Journal of Immunology**, v.169, p.469-475, 2002.

SALGADO, R. et al. Circulating interleukin-6 predicts survival in patients with metastatic breast cancer. **International Journal of Cancer**, v. 103, p.642-646, 2003.

SCHONBERG, S. A. et al. Closely related colon cancer cell lines display different sensitivity to polyunsaturated fatty acids, accumulate different lipid classes and downregulate sterol regulator element-binding protein 1. **FEBS**, v. 273, p. 2749-2765, 2006.

SEKI, H.; TANI, Y.; ARITA, M. Omega-3 PUFA derived anti-inflammatory lipid mediator resolvin E1. **Prostaglandins e other Lipid Mediators**, v. 89, p. 126-130, 2009.

SERHAN, C.N. Systems approach to inflammation resolution: identification of novel anti-inflammatory and pro-resolving mediators. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 7, p. 44-48, 2009.

SERHAN, C.N.; CHIANG, N.; VAN DIKE, T.E. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. **Nature**, v. 8, p. 349-361, 2008.

SHIU, Y.C. et al. Is C-Reactive Protein a Prognostic Factor of Colorectal Cancer?. **Desease of the Colon and Rectum**, v. 51, p. 443-449, 2008.

SIMOPOULOS, A.P. Omega-3 Fatty Acids in Inflammation and Autoimmune Diseases. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 21, p. 495-505, 2002.

SLAVIEIRO, K.A.; CLARKE, S.J.; RIVORY, L.P. Inflammatory response: an unrecognized source of variability in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of cancer chemotherapy. **Lancet Oncology**, v. 4, p. 224-232, 2003.

SONGUR, N. et al. Serum interleukin-6 levels correlate with malnutrition and survival in patients with advanced non-small cell lung cancer. **Tumor**, v. 90, p. 196-200, 2004.

STRASSER, F. Eating-related disorders in patients with advanced cancer. **Supportive Care Cancer**, v. 11, p. 11-20, 2003.

TILLEI, S.L.; COFFMAN, T.M.; KOLLER, B.H. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 1008, p. 15-23, 2001.

TISDALE, M.J. Cancer anorexia and cachexia. **Nutrition**, v. 17, p. 438-442, 2001.

VENUGOPAL, S.K.; DEVARAJ, S.; JIALAL, I. Macrophage conditioned medium induces the expression of C-reactive protein in human aortic endothelial cells: potential for paracrine/autocrine effects. **American Journal of Pathology**, v. 166, p. 1265–1271, 2005.

VISENTAINER, J.V.; CARVALHO, P.O.; IKEGAKI, M.; PARK, Y. Concentração de ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) em peixes marinhos da costa brasileira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.20, p.90-93, 2000.

WALSH, D.; MAHMOUD, F.; BARNA, B. Assessment of nutritional status and prognosis in advanced cancer: interleukin-6, C-reactive protein, and the prognostic and inflammatory nutritional index. **Support Care Cancer**, v. 11, p. 60-62, 2003.

WYNTER, M.P., RUSSELL, S.T., TISDALE, M.J. Effect of n-3 fatty acids on the antitumour effects of cytotoxic drugs. **In Vivo**, v.18, p. 543–547, 2004

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Cancer Report, 2008**. International Agency for Research on Cancer, Lyon. 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Technical Report, n^o.916. **Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Disease**. Geneva, Switzerland: WHO; 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Technical Report. **Obesity: Preventing and managing the global epidemic**. Geneva, Switzerland: WHO; 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Technical Report, n° .854. **Physical Status: The use and interpretation of antropometry**. Geneva, Switzerland: WHO; 1995.

YAQOOB, P. et al. Encapsulated fish oil enriched in α -tocoferol alters plasma phospholipid and mononuclear cell functions. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 30, p. 260-274, 2000.

ZAKRZEWSKA, I.; POZAŃSKI, J. Changes of serum IL-6 and CRP after chemotherapy in patients with ovarian carcinoma. **Pol Merk Lek**, v. 11, p. 210-213, 2001.

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Relação entre a Suplementação de óleo de peixe com o Estado Nutricional e a Resposta Inflamatória em Pacientes com Câncer colo-retal

O(a) Senhor(a) está sendo convidado a participar de uma pesquisa. Antes de decidir se deseja participar, é importante que o(a) senhor(a) entenda porque esta pesquisa esta sendo feita, como suas informações serão usadas, o que o estudo envolve e os possíveis benefícios, riscos e desconfortos envolvidos. Por favor, leia com atenção e cuidado as informações a seguir e se desejar, discuta com sua família e com seu médico, para que a sua participação possa ser uma decisão bem informada.

Este estudo esta sendo realizado no Centro de Pesquisas Oncológicas (CEPON) localizado na Rodovia Admar Gonzaga SC 404, situado no bairro Itacorubi, município de Florianópolis, SC. O pesquisador principal é nutricionista, doutor e professor titular do Curso de Nutrição da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). O objetivo do presente estudo é: Avaliar o efeito da suplementação de óleo de peixe na resposta inflamatória e no estado nutricional de pacientes com câncer colo-retal.

Cabe ao senhor(a) decidir se irá ou não participar. Mesmo que o(a) senhor(a) não queira participar do estudo, o(a) senhor(a) não terá nenhuma desvantagem, inclusive em relação ao tratamento médico e aos cuidados que o(a) senhor(a) tenha direito a receber. Se decidir participar, o(a) senhor(a) irá assinar este termo de consentimento, mas mesmo depois de assinado estará livre para sair do estudo a qualquer momento, basta para isso informar a sua desistência. Isso não atrapalhará de maneira nenhuma os cuidados que receberá.

Caso aceite participar, o(a) senhor (a) será avaliado no início e nove semanas após a assinatura. Na avaliação que acontecerá no CEPON o(a) senhor (a) será pesado e será medida a sua altura, circunferência da cintura e dobras cutâneas; no Laboratório de Análises Clínicas será retirado uma amostra de sangue para avaliação bioquímica laboratorial. Alguns indivíduos irão consumir óleo de peixe em cápsulas durante as nove semanas, estes deverão ingeri-las junto com as principais refeições (café-da-manhã, almoço e jantar). Após inicio, nas três próximas vezes que comparecer a unidade de tratamento ambulatorial do CEPON, o (a) senhor(a) será convidado a responder perguntas sobre o que costuma comer.

Durante as avaliações o(a) senhor (a) poderá sentir-se cansado ou chateado com as perguntas e avaliações, porém se necessitar de uma pausa ou interrupção o(a) senhor(a) tem toda a liberdade para fazê-la. A ingestão das cápsulas pode gerar algum desconforto extra relacionado à digestão do alimento, porém o pesquisador e a equipe estarão aptos a lhe dar assistência.

O (a) senhor(a) não terá nenhum gasto com a pesquisa. As cápsulas (para quem fizer uso) serão doadas pelo pesquisador, ele também pagará os exames. O (a) senhor (a) não receberá nada financeiramente por estar fazendo parte da pesquisa.

Espera-se que o consumo das cápsulas de óleo de peixe, na quantidade indicada, ajude no tratamento do câncer colo-retal, diminuindo o processo inflamatório gerado e diminuindo a perda de peso.

Se o(a) senhor(a) estiver de acordo em participar do estudo, garantimos que as informações fornecidas serão confidenciais e só serão utilizadas neste trabalho com a finalidade de gerar conhecimento em saúde. Apenas o pesquisador e colaboradores (medico e nutricionistas vinculados ao CEPON) terão acesso aos dados. Não serão tiradas fotos, nem realizadas filmagens ou qualquer tipo de gravação das avaliações. Nenhum dos dados será publicado referindo-se a um indivíduo específico, sempre ao comportamento do grupo.

Para facilitar o contato e para retirar qualquer duvida que possa surgir durante o período, o pesquisador entrará em contato com o(a) senhor(a) uma vez por semana via telefone. Mas em caso de alguma dúvida ou dificuldade em relação ao estudo, o(a) senhor(a) pode entrar em contato com o pesquisador responsável: Erasmo Benício Santos de Moraes Trindade pelo telefone: (48) 96156587 ou (48) 84020889 ou e-mail: erasmotrindade@ccs.ufsc.br.

Se tiver dúvidas sobre seus direitos, o(a) senhor(a) pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, coordenador Crystian W. C. Saraiva pelo telefone (48)33311502.

Eu,
portador do RG:
Fone(s) para contato:() ().....

fui esclarecido sobre a pesquisa: **Relação entre a Suplementação de óleo de peixe com o Estado Nutricional e a Resposta Inflamatória em Pacientes com Câncer colo-retal**, além de ter lido e entendido

todas as informações fornecidas sobre minha participação na pesquisa, tive oportunidade de discuti-las e fazer perguntas. Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas satisfatoriamente.

Eu, voluntariamente, concordo em participar deste estudo.

Ao assinar este termo de consentimento, estou de pleno acordo com os dados a serem coletados, podendo os mesmos ser utilizados conforme descrito neste termo de consentimento. Entendo que receberei uma cópia assinada deste termo de consentimento.

Assinatura do paciente

Nome da pessoa que aplicou o termo

Assinatura da pessoa que aplicou o termo

Florianópolis ___/___/____

APÊNDICE B – Instrumento para coleta de dados (T1- pré-suplementação)

I – IDENTIFICAÇÃO:

Nº prontuário CEPON: _____

Nº identificação na pesquisa: _____

Suplementação: Sim ___ Não__

Nome:	
Sexo:	Idade:
Telefones:	
E-mail:	
Procedência/Endereço	

Diagnóstico/Localização: _____

Estadiamento: _____

Comorbidades: _____

Farmaco QT: _____

Farmacos utilizados: _____

II – AVALIAÇÃO SUBJETIVA:

De 0 a 10 como se ente em relação a:

<input type="checkbox"/> Disfagia/Odinofagia	<input type="checkbox"/> Perda apetite/anorexia	<input type="checkbox"/> Edema
<input type="checkbox"/> Boca seca	<input type="checkbox"/> Aumento apetite	<input type="checkbox"/> Distensão abdominal
<input type="checkbox"/> Dific. mastigação	<input type="checkbox"/> Náuseas	<input type="checkbox"/> Dor abdominal
<input type="checkbox"/> Mucosite	<input type="checkbox"/> Vômito	<input type="checkbox"/> Diarréia
<input type="checkbox"/> Pirose (queimação)	<input type="checkbox"/> Alteração paladar	<input type="checkbox"/> Constipação
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Capacidade funcional física (+ de duas semanas):

<input type="checkbox"/> Normal	<input type="checkbox"/> Abaixo do normal	<input type="checkbox"/> Acamado
---------------------------------	---	----------------------------------

Tem hábito de comer Peixe: _____

Quantas vezes na semana: _____

VI - AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA:

Marcador	Valor (IPIN escore)	Dentro/acima/abaixo da referência (IPIN risco)
IL-6		
PCR		
Albumina		
IPIN		

Complemento: preencher após conclusão dos três instrumentos.

➔ Ingestão alimentar:

Média Kcal total e macronutrientes:

Média de consumo de ômega-3 (g e % Kcal da dieta)

Média de consumo de ômega-6 (g e % Kcal da dieta)

Relação ômega-3/ ômega 6 (g):

➔ Caquexia (segundo Fearon, Voss e Hustead, 2006) no T1:

S___ N___

➔ Caquexia (segundo Fearon, Voss e Hustead, 2006) no T2:

S___ N___

Perda de peso $\geq 10\%$ do peso usual antes da doença e ingestão alimentar ≤ 1500 Kcal/dia e concentração de PCR $> 10\text{mg/L}$

APENDICE D - Instrumento para coleta de dados (T2- pós-suplementação)

I – IDENTIFICAÇÃO:

Nome: _____

Nº prontuário CEPON: _____

Nº identificação na pesquisa: _____

Suplementação: Sim ___ Não ___

Diagnóstico/Localização: _____

Estadiamento: _____

Comorbidades: _____

Farmaco QT: _____

Farmacos utilizados: _____

II – AVALIAÇÃO SUBJETIVA:

De 0 a 10 como se ente em relação a:

<input type="checkbox"/> Disfagia/Odinofagia	<input type="checkbox"/> Perda apetite/anorexia	<input type="checkbox"/> Edema
<input type="checkbox"/> Boca seca	<input type="checkbox"/> Aumento apetite	<input type="checkbox"/> Distensão abdominal
<input type="checkbox"/> Dific. mastigação	<input type="checkbox"/> Náuseas	<input type="checkbox"/> Dor abdominal
<input type="checkbox"/> Mucosite	<input type="checkbox"/> Vômito	<input type="checkbox"/> Diarréia
<input type="checkbox"/> Pirose (queimação)	<input type="checkbox"/> Alteração paladar	<input type="checkbox"/> Constipação
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Capacidade funcional física (+ de duas semanas):

<input type="checkbox"/> Normal	<input type="checkbox"/> Abaixo do normal	<input type="checkbox"/> Acamado
---------------------------------	---	----------------------------------

III – AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA:

Altura:	P. atual:	IMC:
Classificação IMC:		
P. usual:	%PP:	Tempo PP:
Classificação perda de peso:		
DCT:	DCT%:	
Classificação DCT%:		
CB:	CB%:	
Classificação CB%:		

IV - AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA:

Marcador	Valor (IPIN score)	Dentro/acima/abaixo da referência (IPIN risco)
IL-6		
PCR		
Albumina		
IPIN		

**APENDICE E - Guia de solicitação dos exames para pesquisa
clínica
SOLICITAÇÃO DE EXAMES – PESQUISA CLÍNICA**

Identificação do Cliente:

Nome: _____

Convênio:

1702 - FUNPESQUISA-ERASMO B S M TRINDADE

Exames Solicitados:

Material: SANGUE

06086 – Proteína C Reativa

01124 – Proteínas Totais e Frações

14983 – Coleta de Material Solicitado

Orientações ao Cliente :

- **Necessário jejum de 8 horas para a coleta dos exames**
- **Atendimento realizado somente na Unidade Matriz do Lab. Santa Luzia, sito na Rua Dom Joaquim, 660 (próximo a praça do Corpo de Bombeiros – Centro).**
- **Comparecer para o atendimento munido da requisição devidamente preenchida e carteira de identidade – Informar os medicamentos em uso.**

Solicitante:

Carimbo e Assinatura

Data: ____/____/____