



Universidade De Brasília

Faculdade de Ciências da Saúde

Departamento de Nutrição

Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana

**Avaliação da ácido graxo sintase no sangue periférico de pacientes portadoras de câncer de mama suplementadas com óleo de peixe rico em ácido graxo n-3**

ANA CAROLINA DE MORAIS OLIVEIRA

BRASÍLIA

2013

Universidade De Brasília  
Faculdade de Ciências da Saúde  
Departamento de Nutrição  
Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana

**Avaliação da ácido graxo sintase no sangue periférico de pacientes portadoras de câncer de mama suplementadas com óleo de peixe rico em ácido graxo n-3**

ANA CAROLINA DE MORAIS OLIVEIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição Humana.

Área de concentração: Nutrição e Doenças Crônicas Não Transmissíveis.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Marina Kiyomi Ito

BRASÍLIA

2013

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por cada dia de minha vida.

A minha família pelo amor incondicional, por acreditarem em mim e pelo apoio em cada passo que dei em minha vida, pela nossa união que sempre foi minha fortaleza nos momentos mais difíceis.

A Professora Dr<sup>a</sup>. Marina Kiyomi Ito, por ter me proporcionado a oportunidade de grande aprendizado, que foi muito além do aprendizado acadêmico, e que me fez crescer como pessoa.

Ao Luiz Rodrigo, por todo carinho, respeito, amizade, companheirismo e compreensão durante todos os dias de nossa convivência.

A todas que foram parte da equipe ONCONUT, Meg, Clarissa, Janine, Elemárcia, Juliana, Babiana, Bruna, Ivana, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Kênia, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nathália, por estarem sempre prontas a ajudar umas as outras em nome de um mesmo objetivo.

As Professoras Sandra Arruda e Maria Imaculada Muniz Junqueira, por terem aberto as portas de seus laboratórios, viabilizando a realização de grande parte das análises realizadas.

A Mariangela Souza e ao Nelson, pelo grande apoio no nosso dia-a-dia no laboratório.

Ao Luiz Henrique Sakamoto, que me “apresentou” a metodologia do PCR, com paciência e dedicação.

As amigas Baiana e Camilinha, por estarmos sempre juntas, mesmo que a correria da vida não permita que a gente se encontre com a frequência que gostaríamos, e que mesmo assim isso não faz abalar nossa amizade. Por me compreenderem, por me apoiarem, por estarem ao meu lado em minhas grandes conquistas, pelo quase 9 anos de amizade, e que esses anos se multipliquem!

As amigas que ganhei Marcela e Lorena, pelo aprendizado que tive com elas, e pelas conversas divertidas, e também muitas vezes reconfortantes.

As equipes de Mastologia do Hospital Universitário de Brasília e do Hospital de Base do Distrito Federal, por nos receberem em seus ambulatórios e por acreditarem em nosso trabalho.

As professoras Dras. Sandra Arruda, Andrea Motoyama, e Eliane Dutra, por terem aceitado participar da banca de defesa, contribuindo para este trabalho.

A todos que contribuíram para que esse projeto acontecesse, muito obrigada.

O valor de uma coisa depende da maneira como abordamos mentalmente e não da coisa em si.

Jigoro Kano

## RESUMO

**Objetivo:** Dentre os inúmeros distúrbios metabólicos que acompanham a carcinogênese, a hiper ativação da enzima ácido graxo sintase (FASN), responsável pela síntese de novo de ácidos endógenos tem sido relatado em certos tipos de cânceres, incluindo câncer de mama. Sua atividade poderia favorecer a oferta de fosfolípidios estruturais para as membranas celulares e conseqüentemente a multiplicação das células cancerígenas. Tem sido demonstrado que a ingestão de ácidos graxos poli-insaturado diminui a expressão de genes do metabolismo lipídicos, incluindo a transcrição da FASN. Assim, este estudo teve por objetivo avaliar a influência do consumo de óleo de peixe rico em ácido graxo n-3 na enzima ácido graxo sintase (FASN) do soro e no nível de seu transcrito nas células mononucleadas do sangue periférico, em mulheres com diagnóstico recente de câncer de mama, correlacionando os resultados encontrados com variáveis clínicas e nutricionais das pacientes.

**Metodologia:** Estudo de intervenção, randomizado, placebo controlado, duplo-cego, conduzido com 38 voluntárias distribuídas em dois grupos (grupo óleo de peixe – GO e grupo placebo – GP). As pacientes do GO receberam 2 g de concentrado de óleo de peixe contendo 1,8g dos ácidos graxos poliinsaturados n-3 eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA). O grupo placebo recebeu 2 cápsulas de 1g cada de óleo mineral com igual aparência do óleo de peixe. Todas as pacientes foram suplementadas por 4 semanas durante o período anterior ao tratamento cirúrgico. Antes e ao final da suplementação, foram coletados dados de consumo, antropometria e amostras sanguíneas para análise do perfil de ácidos graxos do fosfolípido e da enzima FASN do soro. Analisou-se também o transcrito (mRNA) do gene da FASN das células mononucleadas do sangue periférico. A análise estatística foi realizada utilizando testes paramétricos e não paramétricos para comparar os resultados dos dois grupos e foi gerado um modelo de análise de covariância (ANCOVA) para avaliar a interação de algumas variáveis selecionadas com a FASN (variável dependente).

**Resultados:** O GO foi constituído de 18 pacientes e o GP 20. Não foram observadas diferenças significativas na idade, anos de estudos, renda, estado civil, consumo de tabaco, presença de outras doenças, estado de menopausa e prática de atividade física entre os grupos. A maioria das pacientes apresentou carcinoma ductal infiltrante e 33,3% e 50% do grupo óleo de peixe e placebo, respectivamente, apresentaram tumor HER2 negativo. A maioria apresentou excesso de peso e não houve diferença entre os grupos quanto ao consumo dietético. No momento basal, se observou diferença na composição de ácidos graxos séricos, sendo 16:0 e 18:0/18:1 significativamente maiores e total de poli-insaturados, n-6 e n-6/n-3 menores no grupo óleo de peixe em relação ao placebo. Após a intervenção, houve aumento significativo na quantidade de 22:6 n-3, 20:5 n-3, total de n-3, e redução da razão n-6/n-3, no GO. No início do estudo, a proteína da FASN no soro das pacientes foi de 118,79±76,71ng/ml, sem diferença significativa entre os grupos. Também não foi observada diferença nos níveis de mRNA da FASN entre os

grupos. Com a intervenção não foi observada diferença significativa intra e entre grupos nos valores de mRNA e proteína da FASN. De acordo com análise de covariância, o IMC apresentou interação, negativa, com o transcrito da *FASN*. Os grupos de estudo, estado de menopausa e expressão de HER2 não apresentaram interação com a *FASN*. Não foi observada interação das covariáveis com os resultados da FASN no soro.

**Conclusão:** No presente estudo, a intervenção realizada com o suplemento de óleo de peixe rico em ácido graxo n-3 não resultou em mudança da FASN, em seu transcrito e respectiva proteína. Entretanto, foi observada interação negativa entre o IMC e a resposta de mRNA da *FASN*.

**Palavras-chave:** ácido graxo sintase, ácido graxo n-3, câncer de mama, humanos.

## ABSTRACT

**Objectives:** Among the numerous metabolic disturbances that accompany carcinogenesis, hyper activation of the enzyme fatty acid synthase (FASN), responsible for de novo synthesis of endogenous acids has been reported in certain types of cancers, including breast cancer. Its activity could promote the availability of structural phospholipids for cell membranes and consequently the multiplication of cancer cells. The ingestion of polyunsaturated fatty acids has shown to reduce the expression of lipid metabolism genes, including the transcription of FASN. Thus, this study aimed to evaluate the intake of fish oil rich in n-3 fatty acid in the fatty acid synthase (FASN) and serum level of its transcript in peripheral blood mononuclear cells in women diagnosed with breast cancer, correlating the results with clinical and nutritional variables of patients.

**Methods:** A randomized, placebo-controlled, double-blind clinical intervention study was conducted with 38 volunteers divided into two groups (group of fish oil - GO and placebo group - GP). The GO patients received 2 g of fish oil concentrate containing 1.8 g of polyunsaturated fatty acids n-3 eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA). The PG received 2 capsules of 1g mineral oil each with the similar appearance to fish oil. All patients were supplemented for 4 weeks during the pre-surgical period. Before and at the end of supplementation, consumption data, anthropometry and blood samples were collected for analysis of the serum phospholipid fatty acid profile and FASN. The *FASN* gene transcript (mRNA) from the peripheral blood mononuclear cells were also analyzed. Statistical analysis was performed using parametric and non-parametric tests to compare the results of the two groups and an analysis of covariance (ANCOVA) model was built to analyze the interaction of selected variables with the FASN as dependent variable.

**Results.** There were 18 participants in the fish oil group and 20 in the placebo group. No significant differences were observed in age, years of education, income, marital status, smoking, presence of other diseases, menopausal status and physical activity between groups. Most patients had infiltrating ductal carcinoma and 33.3% and 50% of the fish oil and placebo group, respectively, had HER2 negative tumor. The majority were overweight and no difference in the dietary intake between groups was seen. At baseline, serum fatty acids were different between groups, with 16:0 and 18:0 / 18:1 being significantly higher, and total polyunsaturated n-6 and n-6/n-3 lower in the fish oil group compared to placebo. After the intervention, there was a significant increase in the amount of 22:6 n-3, 20:5 n-3, total n-3, and reduction of the ratio n-6/n-3 in GO. At baseline, the FASN protein in serum of patients was  $118.79 \pm 76.71$  ng / ml, with no significant difference between groups. No difference was observed in mRNA levels of *FASN* between groups. After de intervention, no intra or inter group difference were observed in mRNA or serum protein levels of FASN. According to covariance analysis, BMI showed a negative interaction with the response of *FASN* mRNA. Study groups, menopausal status and HER2 expression showed no interaction with the FASN. No interaction of covariates with the results of FASN in serum was observed.

**Conclusion:** In this study, the intervention performed with the supplement of fish oil rich in n3 fatty acid resulted in no change of *FASN* transcript and corresponding protein. However, negative interaction between BMI and *FASN* mRNA response was observed.

**Keywords:** fatty acid synthase, fatty acid n-3, breast cancer, human.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Síntese de ácido graxo de novo em células eucarióticas. Depois de captada pela célula, a glicose é convertida a acetil-CoA pela glicólise e em citrato na mitocôndria. O citrato é transportado para o citoplasma onde é reconvertido a acetil-CoA pela citrato.....25

Figura 2 - Via de regulação da FASN associada ao tumor. Em tecidos sensíveis a hormônios e tecidos lipogênicos, a expressão do gene da *FASN* é regulada por hormônios, carboidratos, ácidos graxos e jejum. Esta regulação hormonal e nutricional converge, à fosfatidilinositol - 3 - quinase (PI3K) e Akt - quinases reguladas por sinais extracelulares (ERK1 e ERK2) cascatas de transdução de sinal que modificam a expressão de SREBP1c. Em células tumorais, a expressão de SREBP1c é impulsionada pela hiper ativação destas vias, incluindo superprodução de fatores de crescimento (GF , hiper ativação dos receptores de de fatores de crescimento (GFRs). O precursor inativo SREBP1c (pSREBP1c) está ancorado na membrana do retículo endoplasmático (ER) .O lançamento do SREBP1c ativo requer a ativação da proteína de clivagem de SREBP (SCAP), que forma um complexo com pSREBP1c .Quando a demanda celular para ácidos graxos endógenos aumenta , o complexo pSREBP1c - SCAP sai do ER para o aparelho de Golgi para encontrar o sítio ativo de protease 1 (S1) , que cliva pSREBP1c em duas metades que permanecem ligados na membrana . O sítio ativo de protease 2 (S2P) , em seguida, cliva o N -terminal de pSREBP1c, liberando a porção citoplasmática (SREBP1c) para que ele possa viajar para o núcleo e transcrever o gene da *FASN* . A, andrógenos ; AR, receptores de andrógenos ; E2, estradiol ; ER, receptor de

estrógeno ; P, progesterona ; PR, receptores de progesterona; PRO, prolactina ; PROR , receptores de prolactina. (MENENDEZ; LUPU, 2007).....	30
Figura 3 - Biossíntese de ácidos graxos de cadeia longa por alongação e desaturação de ácido graxo linolênico e $\alpha$ -linoleico (CHRISTIE, 2003). .....	33
Figura 4 - Fluxograma do recrutamento e randomização de pacientes envolvidas no estudo .....	52
Figura 5 - Concentração da FASN no soro das pacientes incluídas no estudo, antes e após a suplementação. Dados apresentados como média $\pm$ desvio-padrão. Grupo óleo de peixe: inicial 128,94 $\pm$ 72,86ng/ml e final 120,78 $\pm$ 51ng/ml; Grupo placebo: inicial 109,66 $\pm$ 80,77ng/ml e final 104,89 $\pm$ 44,28ng/ml. Não foram observadas diferenças significativas intra e entre grupos.....	60
Figura 6 - Quantificação de níveis de mRNA da <i>FASN</i> nas células mononucleadas do sangue periférico das pacientes incluídas no estudo, antes e após a suplementação. Dados apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Grupo óleo de peixe: inicial 1,002 $\pm$ 0,003 e final 1,26 $\pm$ 0,52; Grupo placebo: inicial 1,00 $\pm$ 0,05 e final 1,09 $\pm$ 0,51. Não foram observadas diferenças significativas intra e entre grupos.....	61

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Classificação BIRADS.....	22
Tabela 2 - Sequência dos iniciadores utilizados para ensaio qPCR para os genes <i>FASN</i> e <i>Actb</i> .....	46
Tabela 3 - Perfil sócio-demográfico das pacientes portadoras de câncer de mama incluídas no estudo, randomizadas para os grupos óleo de peixe e placebo.....	54
Tabela 4 - Características clínicas das pacientes incluídas no estudo, randomizadas para os grupos óleo de peixe e placebo.....	55
Tabela 5 - Estado nutricional e consumo dietético das pacientes incluídas no estudo, randomizadas para os grupos óleo de peixe e placebo. ....	56
Tabela 6 - Composição de ácidos graxos dos fosfolipídios plasmáticos, em percentual, das pacientes randomizadas de acordo com os grupos de estudo. ....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acetil-CoA – acetil coenzima A

ACP – *acyl carrier protein* – proteína carreadora de acil

AG – ácido graxo

AMPC – *adenosine monophosphate cyclic* - monofosfato de adenosina cíclico

ATP – *adenosine triphosphate* – adenosina trifosfato

BIA – *Bioelectrical impedance analysis* – Análise da impedância bioelétrica

BI-RADS – *Breast Imaging Reporting and Data System*

CEP – comitê de ética em pesquisa

CCD – cromatografia de camada delgada

CDIS – Carcinoma ductal *in situ*

CDI - Carcinoma ductal infiltrante

CoA – coenzima A

cDNA – *complementary DNA* – DNA complementar

DH –  $\beta$ -hidroxiacetil-desidratase

DHA – *docosahexaenoic acid* – ácido docosahexaenóico

EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid*- ácido etilenodiamino tetracético

ELISA - *Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay* – Teste Imunoabsorvente Ligado à Enzima

EPA – *eicosapentaenoic acid* – ácido eicosapentaenoico

ER – enoil redutase

FASN – *Fatty Acid Synthase* - ácido graxo sintase ou sintetase

GF – *growth factor* – fator de crescimento

GF – *growth factor receptor* – receptor de fator de crescimento

EGF – *epidermal growth factor* – fator de crescimento epidérmico

EGF – *epidermal growth factor receptor* – receptor de fator de crescimento epidérmico

HER2 - *Human Epidermal growth factor Receptor 2* – Receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2

HUB – Hospital Universitário de Brasília

HBDF – Hospital de Base de Brasília DF

IMC – Índice de Massa Corporal

Ki-67- *Antigen KI-67* – antígeno KI-67

KS –  $\beta$ -cetoacil-sintase

KR -  $\beta$ -cetoacil-redutase

Malonil-CoA – malonil coenzima A

MAT - malonil/acetil-CoA-tranferase

n-3 – ômega 3

NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

PAAF – punção aspirativa por agulha fina

PAG - punção aspirativa por agulha grossa

PCR - polymerase chain reaction – reação em cadeia da polimerase

PBS - *phosphate buffered saline solutions* – solução fosfato-salina

PI3K/AKT - fosfatidilinositol-3 quinase/proteína quinase B

qPCR - *quantitative polymerase chain reaction* - reação em cadeia da polimerase em tempo real

OA – *oncogenic antigen* – antígeno oncogênico

RP- receptor de progesterona

RE–receptor de estrógeno

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	20
2.1	Epidemiologia do câncer de mama .....	20
2.2	Ácido Graxo Sintase (FASN – <i>fatty acid synthase</i> ) .....	23
2.3	Ácidos graxos n-3 e câncer de mama .....	31
3	OBJETIVOS.....	37
3.1	Objetivos específicos .....	37
4	METODOLOGIA.....	38
4.1	Tipo de estudo .....	38
4.2	Aspectos éticos .....	38
4.3	Amostra.....	38
4.4	Randomização .....	40
4.5	Suplementação .....	40
4.6	Coleta de dados.....	41
4.7	Separação de células mononucleadas do sangue periférico .....	42
4.8	Determinação dos níveis de transcrito do gene da <i>FASN</i> (ácido graxo sintase).....	43
4.8.1	Extração de RNA Total e Síntese de cDNA .....	44
4.8.2	Determinação dos Níveis de mRNA do Gene <i>FASN</i> .....	45

4.9	Determinação dos níveis séricos de FASN por ensaio imunoenzimático (ELISA) .....	47
4.10	Análise de ácidos graxos de fosfolípido sérico .....	48
4.11	Análise dos dados.....	50
5	RESULTADOS .....	52
6	DISCUSSÃO.....	62
7	CONCLUSÃO .....	68
	REFERÊNCIAS .....	69
	ANEXOS.....	74

## 1 INTRODUÇÃO

Em todos os organismos, os ácidos graxos de cadeia longa são construídos por uma sequência de reações catalisadas por um sistema conhecido como ácido graxo sintase (FASN – fatty acid synthase) (NELSON; COX, 2011). A FASN é um complexo multienzimático citosólico que catalisa a síntese de ácido graxo de novo utilizando acetil-CoA como iniciador, malonil-CoA como doador de carbonos e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) como agente redutor, dando origem ao palmitato (MENENDEZ; LUPU, 2007).

Na maioria dos tecidos humanos normais a FASN apresenta baixos níveis de expressão, tanto de seu gene como de sua proteína, pois as células usam preferencialmente os ácidos graxos exógenos em detrimento dos sintetizados endogenamente para a síntese de novos lipídios estruturais (KUHAJDA, 2000).

Entretanto, diversos tumores e suas lesões precursoras sofrem exacerbada biossíntese endógena de ácidos graxos, independentemente dos níveis de lipídeos extracelulares. A maior parte dos ácidos graxos produzidos endogenamente em células cancerígenas é esterificada predominantemente a fosfolipídios e, portanto, incorporados a lipídeos de membrana durante a proliferação das células tumorais (MENENDEZ; LUPU, 2007). No câncer, a alta expressão da FASN tem sido observada tanto em nível de proteína, como de mRNA, sendo considerada um alvo promissor para o tratamento de câncer, sendo a sua inibição sugerida como uma forma de terapia anticâncer (VAZQUEZ-MARTIN et al., 2009; WANG et al., 2008)

Tem sido observado que no câncer de mama, o tipo mais incidente entre as mulheres, a FASN também está super expressa, sendo encontrado altos níveis de sua proteína no soro de portadoras do câncer (VAZQUEZ-MARTIN et al., 2009).

Em estudo utilizando linhagem de células de câncer de mama, Menendez et. al. (2004) avaliou o papel dos ácidos graxos n3 e n6 na atividade enzimática e expressão de proteína da FASN. Entre os ácidos graxos testados o 18:3n3 e o 22:6n3 reduziram a atividade da FASN de forma significativa, tanto a expressão da proteína do complexo enzimático, como de sua atividade.

Outro estudo, realizado por Ravacci et. al. (2013), utilizou linhagem de células de epitélio mamário, para verificar os efeitos da transformação oncogênica que ocorre no câncer de mama devido à expressão de HER2 (*Human Epidermal growth factor Receptor 2* – Receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2). Foi encontrado que nestas células a expressão da proteína da FASN era maior, e ao tratar as células com ácido graxo 22:6n-3 ocorreu redução da expressão da FASN. A inibição da FASN ocasionou em inibição de HER2 e induziu a apoptose celular.

Dados de estudos experimentais realizados com animais mostram que o 20:5 n3 e o 22:6 n3 também podem inibir o crescimento tumoral em modelos de tumor mamário induzido, e ainda possuem o potencial para sensibilizar diferencialmente tecidos de câncer à quimioterapia. Estes ácidos graxos aumentam a citotoxicidade de medicamentos anticancerígenos para uma variedade de linhas de células cancerígenas e de tumores em animais, usados como modelos para o câncer da mama, da próstata, do cólon, pulmão, colo do útero, câncer de ovário, neuroblastomas, leucemia ou linfomas. (BOUGNOUX et al., 2006).

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo, sendo o câncer de mama a principal causa de morte por câncer as mulheres, e diversos estudos tem sido realizados no sentido de contribuir para um tratamento mais eficaz da doença. Considerando o papel da FASN e o potencial efeito dos ácidos graxos n-3 no câncer, o presente trabalho avaliou a influência do consumo de óleo de peixe

rico em ácido graxo n-3 na FASN do soro e no nível de seu transcrito nas células mononucleadas do sangue periférico, em mulheres com diagnóstico recente de câncer de mama.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Epidemiologia do câncer de mama

O câncer foi uma das principais causas de morte no mundo no ano de 2008, ocasionando 7,6 milhões de mortes (aproximadamente 13% de todas as causas de morte), sendo cerca de 70% das mortes ocorridas em países de médio e baixo desenvolvimento econômico. Cerca de 30% das mortes por câncer estão relacionadas a fatores de risco comportamentais e dietéticos, como índice de massa corporal elevado, baixa ingestão de frutas e hortaliças, falta de atividade física, tabagismo, e uso de álcool. É estimado que as mortes por câncer continuem crescendo em todo o mundo, sendo esperado 13,1 milhões de mortes para o ano de 2030 (WHO, 2013).

Os principais tipos de câncer com maior incidência de morte em 2008 foram o de pulmão (1,37 milhões), de estômago (736 mil), de fígado (695 mil), de cólon (608 mil), de mama (458 mil) e colo de útero (273 mil) (WHO, 2013).

O câncer de mama é o tipo diagnosticado com maior frequência e a principal causa de morte por câncer em mulheres em todo o mundo, representando 23% (aproximadamente 1,38 milhões) do total de novos casos de câncer e 14% (aproximadamente 458 mil) do total de mortes por câncer no ano de 2008. Aproximadamente metade dos casos de câncer de mama e 60% das mortes foram estimadas para ocorrer em países em desenvolvimento (JEMAL, 2011).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2014 apontam a ocorrência de aproximadamente 576 mil novos casos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma. Sem os casos de câncer de pele não melanoma, estima-se um total de

394.450 casos novos. Os tipos mais incidentes serão e o câncer de pele não melanoma, de mama, de colo do útero, de cólon e reto e de glândula tireoide para o sexo feminino (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013b).

Para o ano de 2014 espera-se, para o Brasil, 57.120 casos novos de câncer da mama. Sem considerar os tumores da pele não melanoma, esse tipo de câncer também é o mais frequente nas mulheres das regiões Sudeste com 30.740 novos casos (71/100 mil), Sul com 10370 novos casos (70/100 mil), Centro-Oeste com 3.800 novos casos (51/100 mil) e Nordeste com 10490 novos casos (36/100 mil). Na região Norte é o segundo tumor mais incidente com a estimativa de 1720 novos casos (21/100 mil) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013b).

Entre os fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de mama está a história familiar, especialmente se um ou mais parentes de primeiro grau (mãe ou irmã) foram acometidas antes dos 50 anos de idade; a idade, havendo um aumento rápido da incidência com o aumento da idade; a menarca precoce; a menopausa tardia, instalada após os 50 anos de idade; a ocorrência da primeira gravidez após os 30 anos; a nuliparidade (MENKE et al., 2007).

Apesar de ser considerado um câncer de relativo bom prognóstico se diagnosticado e tratado oportunamente, as taxas de mortalidade por câncer da mama continuam elevadas no Brasil, muito provavelmente pelo fato de a doença ainda ser diagnosticada em estádios avançados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013a).

Para a detecção do câncer de mama recomenda-se: rastreamento por meio do exame clínico da mama, utilização de exames de imagem, como mamografia e ultrassonografia para confirmar ou não a suspeita de câncer a partir dos sinais detectados no exame clínico e dos sintomas referidos pela paciente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013a).

Os resultados do exame mamográfico são classificados de acordo com o *Breast Imaging Reporting and Data System* (BIRADS), publicado pelo Colégio Americano de Radiologia (ACR) e traduzido pelo Colégio Brasileiro de Radiologia. O objetivo do BIRADS consiste na padronização dos laudos mamográficos levando em consideração a evolução diagnóstica e a recomendação da conduta, não devendo se esquecer da história clínica e do exame físico da mulher (MENKE et al. 2007).

Tabela 1 - Classificação BIRADS

<b>BIRADS</b>	<b>Achado mamográfico</b>	<b>Risco de malignidade</b>
BIRADS 0	Necessidade de complementação	–
BIRADS 1	Mamografia normal	–
BIRADS 2	Achados benignos	–
BIRADS 3	Achados provavelmente benignos	3%
	Achados suspeitos para malignidade	
BIRADS 4	A – Baixa suspeita	5%
(A, B, C)	B – Intermediária suspeita	25%
	C – Moderada suspeita	70%
BIRADS 5	Achados altamente suspeitos para malignidade	85%
BIRADS 6	Malignidade já comprovada	

Fonte: Menke et al., 2007.

Se forem detectadas lesões durante o rastreamento deve-se buscar a confirmação do diagnóstico que pode ser citológico, por meio de punção aspirativa por agulha fina (PAAF), ou histológica, quando o material for obtido por punção, utilizando-se agulha grossa (PAG) ou biópsia cirúrgica convencional, que permite inclusive a dosagem de receptores hormonais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

## 2.2 Ácido Graxo Sintase (FASN – *fatty acid synthase*)

Os ácidos graxos cumprem um papel crucial em todos os seres vivos. Nos animais, eles representam o principal estoque de energia, são componentes essenciais da estrutura das membranas, e como componentes de determinadas moléculas de sinalização lipídicas, desempenham papéis importantes na regulação metabólica (VANCE; VANCE, 2004).

Atualmente, é conhecido que em todos os organismos, os ácidos graxos de cadeia longa são construídos por uma sequência de reações catalisadas por um sistema conhecido como ácido graxo sintase (FASN – *fatty acid synthase*). (NELSON; COX, 2011). Grande parte do progresso inicial para identificar as enzimas envolvidas na via de biossíntese de ácidos graxos foi realizada utilizando *Escherichia coli*. Todos os átomos de carbono dos ácidos graxos eram considerados derivados do acetil CoA, um precursor de dois carbonos, até ter sido demonstrado que CO<sub>2</sub> era necessário para a biossíntese de ácidos graxos de novo, acreditava-se que esta via utilizava enzimas da β-oxidação operando no sentido contrário (VANCE; VANCE, 2004).

Existem duas variantes da FASN: a FASN I, encontrada em eucariotos, e a FASN II, encontrada em procaríotos. A FASN I consiste de uma cadeia polipeptídica multifuncional, com sete sítios ativos para reações distintas presentes em domínios separados, que funciona como um homodímero. Ao contrário, a FASN II consiste em um sistema dissociado, em que cada etapa da síntese é catalisada por uma enzima distinta, gerando intermediários que podem ser desviados para outras vias (NELSON; COX, 2011).

Recentemente, dois tipos de FASN foram reconhecidos em células eucarióticas de mamíferos. A FASN tipo I já extensamente descrita, que está

presente no citoplasma, responsável pela biossíntese de ácidos graxos *de novo* e a FASN tipo II presente na mitocôndria, responsável por fornecer o precursor necessário para a via da lipogênese (OLIVERAS-FERRAROS et al., 2009). Estudo experimental *in vitro* de Zhang, Joshi e Smith (2003) identificou que a mitocôndria contém um sistema malonil-CoA dependente para a via de novo de síntese de ácidos graxos e que essas enzimas, distinto da tipo I encontrada no citoplasma, e que se assemelha a FASN II presente em procariotos. Os seus produtos finais ainda não foram identificados, mas podem desempenhar um papel importante na função mitocondrial.

No sistema FASN I, a síntese de ácidos graxos leva a um único produto, e não são liberados intermediários. Quando o comprimento da cadeia atinge 16 carbonos, este produto (palmitato, 16:0) deixa o ciclo (NELSON; COX, 2011).

A FASN I encontrada em células eucarióticas é um complexo multienzimático citosólico que catalisa a síntese de ácido graxo *de novo* utilizando acetil-CoA como iniciador, malonil-CoA como doador de carbonos e nicotinamida adenida dinucleotídeo fosfato (NADPH) como agente redutor, dando origem ao palmitato (Figura 1) (MENENDEZ; LUPU, 2007).

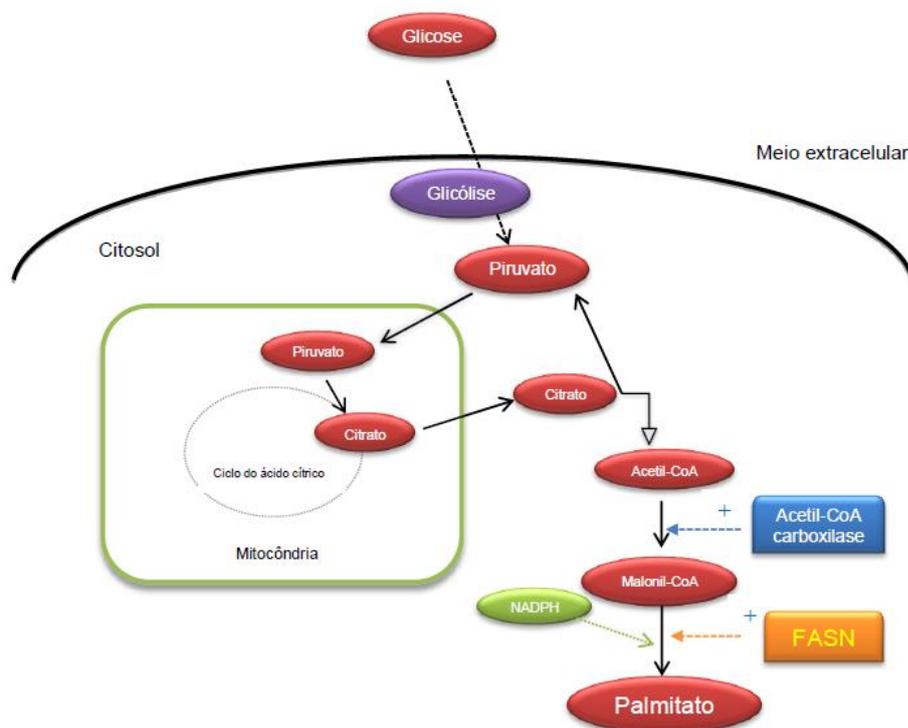


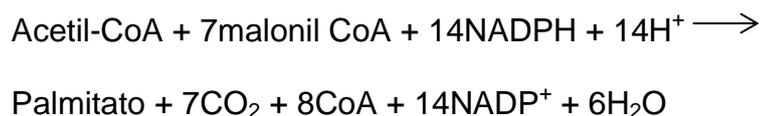
Figura 1 - Síntese de ácido graxo de novo em células eucarióticas. Depois de captada pela célula, a glicose é convertida a acetil-CoA pela glicólise e em citrato na mitocôndria. O citrato é transportado para o citoplasma onde é reconvertido a acetil-CoA pela citrato

A cadeia polipeptídica multifuncional da FASN é composta por sete sítios catalíticos:  $\beta$ -cetoacil-sintase (KS); malonil/acetil-CoA-tranferase (MAT);  $\beta$ -hidroxiacil-desidratase (DH); enoil redutase (ER);  $\beta$ -cetoacil-redutase (KR); proteína transportadora de grupos acila (ACP); tioesterase (TE), organizados em dois homodímeros (NELSON; COX, 2011).

A síntese de ácido graxo catalisada pela FASN envolve os seguintes passos: iniciação, com a condensação de acetil-coA e malonil-coA catalisada pelo domínio MAT; alongação, que consiste na repetição do ciclo de redução e desidratação adicionando dois carbonos a cada ciclo, catalisada pela pelos domínios KS, KR, DH e ER; terminação, com a liberação de palmitato, catalisada pelo domínio TE (LIU et. al, 2010 ). São necessários sete ciclos de condensação e redução para a produção

do palmitato (NELSON; COX, 2011), e utilização de uma molécula de acetil-coA, sete de malonil-coA, sete de ATP e quatorze de NADPH (LIU et. al, 2010).

A reação global catalisada pela FASN é representada pela seguinte equação:



Em adultos saudáveis, a FASN é expressa principalmente em tecidos lipogênicos, como fígado e tecido adiposo, sendo sua expressão regulada principalmente por sinais nutricionais. Mudanças na ingestão de nutrientes ocasionam em mudanças nos níveis circulantes de glicose, que por sua vez sinalizam a secreção de hormônios. É conhecido que a quantidade de insulina circulante é elevada quando há ingestão de uma dieta rica em carboidratos e induz a transcrição de enzimas envolvidas na síntese de ácidos graxos. O glucagon, ao contrário, é elevado durante o jejum e suprime a transcrição das enzimas envolvidas na biossíntese de ácidos graxos pelo aumento do nível de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) (SUL; WANG, 1998).

Além das mudanças nos níveis circulantes de insulina e glucagon, o nível de hormônio tireoidiano também fica elevado em indivíduos bem alimentados. O hormônio tireoidiano estimula a transcrição da FASN e provavelmente utiliza um mecanismo independente do utilizado pela insulina, já que seu efeito é sinérgico quando há a ingestão de uma dieta rica em carboidratos (SUL; WANG, 1998).

A ingestão de ácidos graxos poli-insaturado diminui a expressão de diversos genes envolvidos no metabolismo hepático de lipídios, incluindo a transcrição da

FASN, embora no tecido adiposo, estes tipos de ácidos graxos apresentam apenas um pequeno efeito supressor na transcrição da FASN. Os glicocorticoides também regulam a expressão da FASN, reduzindo a sua transcrição (SUL; WANG, 1998).

No ciclo menstrual, a expressão da enzima é elevada na fase de proliferação do endométrio e diminui na fase secretória. Glândulas proliferativas e células do estroma tem um nível elevado de FASN, bem como um elevado nível de receptores de estrogênio de progesterona, indicando que a expressão de FASN pode ser controlada por hormônios e está associada com proliferação celular (PIZER et. al., 1998).

Em glândulas mamárias sadias, a estimulação da expressão e atividade da FASN durante a gravidez e lactação envolve uma complexa interação entre diversos hormônios, incluindo prolactina, cortisol, insulina e progesterona (LIU et. al, 2010).

Como descrito acima, a expressão da FASN é regulada principalmente pelo controle da taxa de transcrição (SUL, 1998). De forma resumida, a expressão da FASN é mediada por diferentes vias de sinalização, como a da fosfatidilinositol-3 quinase/proteína quinase B (PI3K/AKT) e proteína quinase ativada por mitógeno/sinalização extracelular regulada por quinase (MAPK/ERK1/2), vias que modulam a expressão do fator transcricional elemento de ligação de proteínas esterol responsivo (SREBP-1) para produzir SREBP-1c, que modula a expressão do gene da FASN (OLIVERAS et. al., 2010).

No câncer é notável que as células tumorais catabolizam glicose a uma taxa que excede a necessidade bioenergética. A este respeito, a glicólise exacerbada não é somente uma importante fonte de energia para o tumor, mas também proporciona importantes precursores para a síntese de ácido graxo, através da via das pentose fosfato, como o NADPH, que é utilizado como agente redutor na via de

síntese. Neste cenário, a célula tumoral pode redirecionar o excesso de piruvato, produto final da glicólise, para a síntese de ácido graxo *de novo*, que é necessária para manter um constante suprimento de lipídios e precursores lipídicos para a produção de membrana e modificação pós traducional de proteínas, baseada em lipídeos, em uma população de células altamente proliferativas (MENENDEZ et. al., 2009).

Diversos tumores e suas lesões precursoras sofrem exacerbada biossíntese endógena de ácidos graxos, independentemente dos níveis de lipídeos extracelulares. Em meados dos anos 1950, utilizando glicose marcada com carbono 14 (C<sup>14</sup>), foi determinado que praticamente todos os ácidos graxos esterificados em modelos de tumor foram derivados a partir de síntese *de novo* (MEDES; THOMAS; WEINHOUSE, 1953). Em contraste com células normais, esta síntese de ácido graxo *de novo* pode ser responsável por mais de 93% dos ácidos graxos triacilgliceróis nas células tumorais. Entretanto o aumento da lipogênese para a biologia celular do câncer não era o foco de interesse até o início dos anos 1990. Em 1994, Kuhajda e colaboradores identificaram o OA (*oncogenic antigen – antígeno oncogênico*) -519, uma molécula encontrada nas células de câncer de mama de pacientes com prognóstico ruim, que se verificou ser a FASN (KUHAJDA et. al., 1994).

Os fatores de crescimento (GF – *growth factor*) e receptores de fatores de crescimento (GFR - *growth factor receptors*) apresentam a maior contribuição, em nível transcricional, para a super expressão de FASN na célula tumoral. Tem sido demonstrado que a expressão da enzima é estimulada pelo fator de crescimento epidérmico (EGF – *epidermal growth factor*), e por receptores de fator de crescimento epidérmico (EGFR - *epidermal growth factor receptor*, também

conhecido como ERBB1) e ERBB2 (também conhecido como HER2), que podem levar a ativação da via de sinalização de PI3K– Akt (MENENDEZ; LUPU, 2007).

Os GF e GFR também podem afetar a expressão da FASN por meio da cascata de sinalização da MAPK/ERK1/2. Hormônios esteroides, incluindo estrogênio, progesterona e androgênios também têm papel importante na regulação da expressão gênica da FASN e na via biossintética da enzima, como parte da resposta celular induzida por hormônios levando a proliferação em tumores responsivos a hormônios. Os efeitos regulatórios dos hormônios esteroides na expressão do gene da FASN, no sentido dos receptores de hormônio esteroide, receptores de estrogênios, receptores de progesterona e receptores de androgênio também envolve a ativação da via de sinalização PI3K-Akt e ERK1/2 (Figura 2) (MENENDEZ; LUPU, 2007).

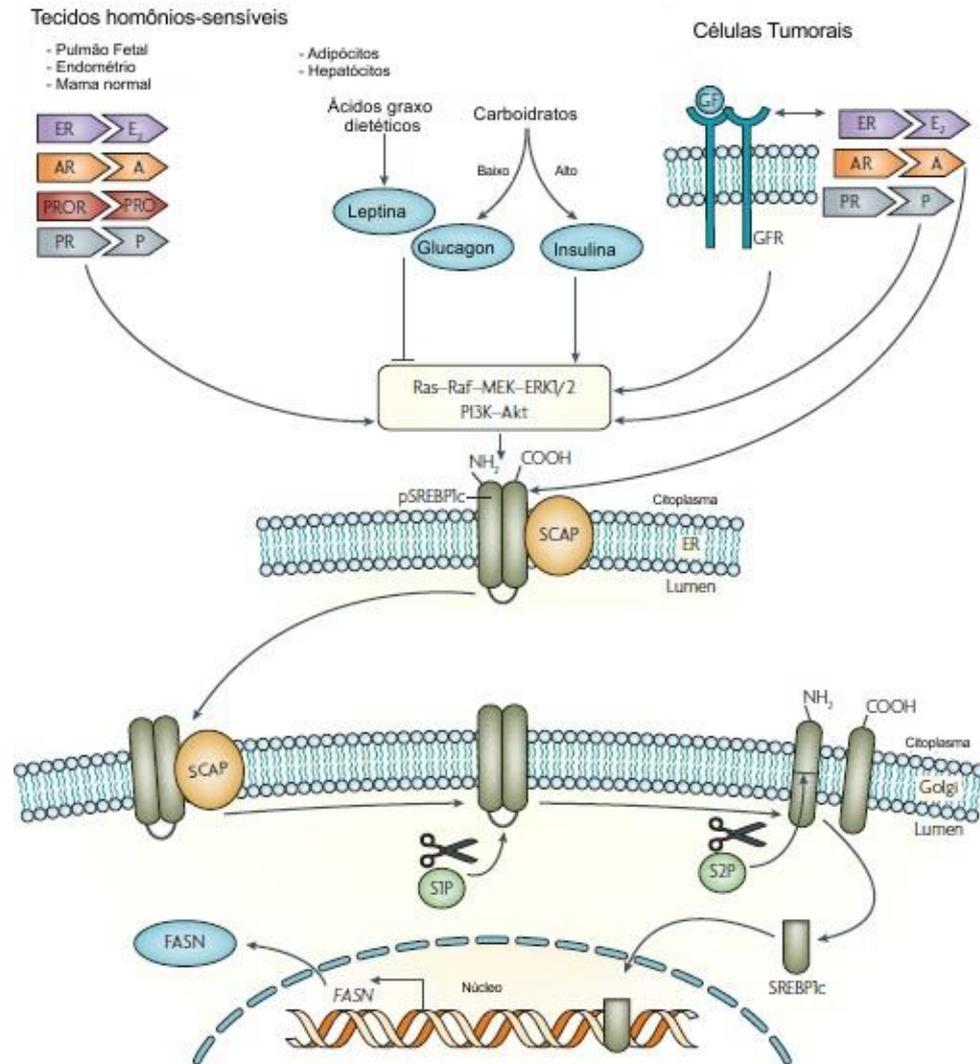


Figura 2 - Via de regulação da FASN associada ao tumor. Em tecidos sensíveis a hormônios e tecidos lipogênicos, a expressão do gene da *FASN* é regulada por hormônios, carboidratos, ácidos graxos e jejum. Esta regulação hormonal e nutricional converge, à fosfatidilinositol - 3 - quinase (PI3K) e Akt - quinases reguladas por sinais extracelulares (ERK1 e ERK2) cascatas de transdução de sinal que modificam a expressão de SREBP1c. Em células tumorais, a expressão de SREBP1c é impulsionada pela hiper ativação destas vias, incluindo superprodução de fatores de crescimento (GF), hiper ativação dos receptores de fatores de crescimento (GFRs). O precursor inativo SREBP1c (pSREBP1c) está ancorado na membrana do retículo endoplasmático (ER). O lançamento do SREBP1c ativo requer a ativação da proteína de clivagem de SREBP (SCAP), que forma um complexo com pSREBP1c. Quando a demanda celular para ácidos graxos endógenos aumenta, o complexo pSREBP1c - SCAP sai do ER para o aparelho de Golgi para encontrar o sítio ativo de protease 1 (S1), que cliva pSREBP1c em duas metades que permanecem ligados na membrana. O sítio ativo de protease 2 (S2P), em seguida, cliva o N-terminal de pSREBP1c, liberando a porção citoplasmática (SREBP1c) para que ele possa viajar para o núcleo e transcrever o gene da *FASN*. A, andrógenos; AR, receptores de andrógenos; E<sub>2</sub>, estradiol; ER, receptor de estrógeno; P, progesterona; PR, receptores de progesterona; PRO, prolactina; PROR, receptores de prolactina. (MENENDEZ; LUPU, 2007)

Uma semelhança entre a lipogênese neoplásica e o controle nutricional da síntese endógena de ácido graxo no fígado e tecido adiposo é que a super expressão da FASN associada ao tumor ocorre preferencialmente por meio da modulação da expressão do fator de transcrição elemento de ligação de proteínas esterol responsivo-1c (SREBP-1c), um intermediário crucial das ações pró e anti-lipogênicas dos nutrientes e hormônios que estimulam a transcrição da FASN quando interage com o complexo SREBP no sítio de ligação do promotor da FASN. (MENENDEZ; LUPU, 2007).

A FASN tem sua expressão aumentada na situação de câncer e em trabalho realizado por nosso grupo de estudo foi observado que em mulheres portadoras de câncer de mama a concentração da proteína da FASN no soro foi significativamente maior ( $132,51 \pm 95,05$  ng/mL) do que em mulheres saudáveis ( $36,88 \pm 20,87$  ng/ml) (HOFFMANN, 2011).

Outro estudo realizado em humanos avaliou a concentração da proteína da FASN no soro de pacientes portadores de câncer colorretal em diferentes estágios da doença, a fim de avaliar se a concentração de FASN no soro poderia ser um marcador tumoral de câncer. Os resultados mostraram que os níveis de proteína da FASN no soro eram maiores nos estágios mais avançados da doença, e estavam associados com a presença de metástase ( NOTARNICOLA et al., 2012).

### **2.3 Ácidos graxos n-3 e câncer de mama**

Diversos ácidos carboxílicos foram inicialmente isolados de fontes naturais, principalmente de gorduras, e por este motivo foram denominados ácidos graxos. Estes, geralmente monocarboxílicos, podem ser representados pela forma RCO<sub>2</sub>H.

Em sua maioria, o grupamento R é uma cadeia carbônica longa, não ramificada, com número par de átomos de carbono, podendo ser saturada ou conter uma ou mais insaturações (CURI et al., 2002).

Os ácidos graxos podem ser classificados de acordo com o tamanho de sua cadeia carbônica e pela presença de insaturações. De acordo com o tamanho da cadeia hidrocarbônica podem ser denominados ácidos graxos de cadeia curta, para aqueles que possuem de dois a quatro átomos de carbono; cadeia média, para aqueles que possuem de seis a dez átomos de carbono; ou cadeia longa, para os que possuem acima de doze átomos de carbono. Segundo o número de insaturações da cadeia, podem ser denominados ácidos graxos saturados quando não há insaturações, ou insaturados, quando possuem uma (monoinsaturados) ou mais (poli-insaturados) insaturações na molécula (CURI et al., 2002).

O homem é capaz de sintetizar os ácidos graxos que necessita a partir de palmitato, com exceção dos ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6. Estes são precursores de importantes moléculas sinalizadoras (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos), além de serem necessários para a síntese de lipídeos complexos, particularmente no sistema nervoso (DEVLIN, 2007).

Em mamíferos, duplas ligações podem ser adicionadas apenas na metade proximal dos acil graxo-CoAs, não podendo ser adicionadas depois do nono carbono a partir do terminal metil. Em consequência, os ácidos graxos linoleico (18:2 n-6) e  $\alpha$ -linolênico (18:3 n-3) são considerados essenciais e necessitam ser obtidos através da dieta. No ácido graxo linoleico, a dupla ligação distal está a seis carbonos do grupo metil, e é referido como n-6, já o ácido graxo  $\alpha$ -linolênico, possui dupla ligação distal a três carbonos do grupo metil, sendo denominado n-3 (DEVLIN, 2007).

Ambos ácidos graxos essenciais podem ser metabolizados para ácidos graxos de cadeia mais longa com 20 e 22 átomos de carbono (Figura 1). O ácido linoleico é metabolizado a ácido araquidônico e o ácido  $\alpha$ -linolênico, a ácido eicosapentanoico (20:5 n-3) e ácido docosahexanoico (22:6 n-3), aumentando o comprimento da cadeia e o grau de instauração por adição de duplas ligações extras no grupo carboxil (SIMOPOULOS, 1991)

Estes ácidos graxos constituem um importante componente de todas as membranas celulares e influencia sua fluidez e o comportamento de suas ligações com enzimas e receptores (WALL et al., 2010).

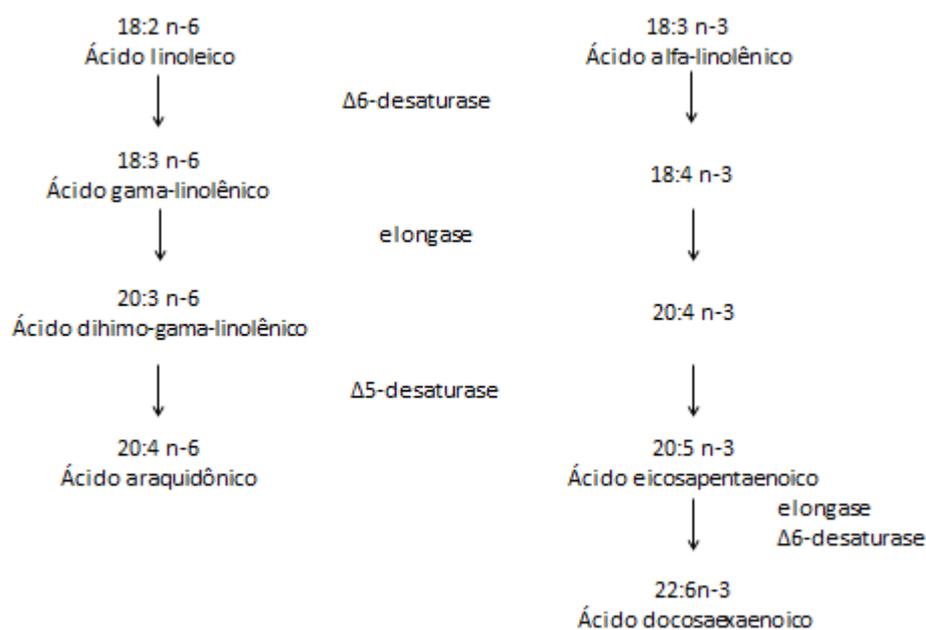


Figura 3 - Biossíntese de ácidos graxos de cadeia longa por elongação e desaturação de ácido graxo linolênico e  $\alpha$ -linoleico (CHRISTIE, 2003).

Os ácidos graxos 20:5 n-3 e 22:6 n-3 entram na cadeia alimentar através de fitoplânctons marinhos, que por sua vez são consumidos por peixes e mamíferos

marinhos (CATERINA, 2011). O conteúdo de ácidos graxos em animais marinhos varia de acordo com a espécie e seu conteúdo total de gordura, bem como a localização geográfica das águas que habitam. No entanto, como regra geral, peixes de água fria como atum, salmão, cavala, arenque e sardinha (peixes gordurosos) contém maior conteúdo de 20:5 n-3 e 22:6 n-3 já que estocam lipídios na carne, enquanto que peixes magros, como o bacalhau, estocam lipídios no fígado e contém menor quantidade de 20:5 n-3 e 22:6 n-3 (WALL et al., 2010).

Apesar dos efeitos dos lipídios dietéticos no desenvolvimento do câncer de mama, os ácidos graxos n-3 não apresentam efeitos promotores de tumor (WYNDER; ROSE; COHEN, 1986). No final da década de 1970, observou-se que as mulheres japonesas tiveram menor risco de desenvolver câncer de mama do que as mulheres em outros países industrializados, sendo esta observação atribuída ao alto consumo de peixe por essa população (BUELL, 1973). Metanálise recente concluiu que o consumo de ácidos graxos n-3 na dieta pode reduzir o risco de desenvolvimento de câncer de mama (ZHENG et al., 2013).

Estudos *in vitro* já observaram que os ácidos graxos 20:5 n-3 e 22:6 n-3 também podem ter um papel quando o câncer já está instalado, podendo reduzir a viabilidade de células de câncer por meio dos produtos da peroxidação lipídica. Trabalho realizado por Chajès et al. (1995) com o objetivo de investigar possíveis mecanismos envolvidos com a redução da morbidade e mortalidade por câncer de mama associados a presença de ácidos graxos poli-insaturados na dieta, tratou linhagens de células de câncer de mama com ácidos graxos n-3 e n-6 para observar seus efeitos na proliferação celular. Foi observado que os ácidos graxos 20:5 n-3 e 22:6 n-3 foram os mais efetivos em reduzir o crescimento celular. Outro estudo com resultado semelhante, foi o realizado por Germain et al. (1998) que tratou linhagem

de células de câncer de mama com ácidos graxos poli-insaturados durante 6 dias. Foi observado que dentre os ácidos graxos utilizados, o 22:6 n3 foi o mais efetivo em aumentar a citotoxicidade da droga doxorubicina por meio da formação de hidroperóxidos lipídicos, reduzindo assim a viabilidade celular.

Com o objetivo de avaliar a hipótese levantada por estudos experimentais, de que os ácidos graxos poli-insaturados podem aumentar a sensibilidade dos tumores às drogas utilizadas no tratamento do câncer, Bougnoux et al. (1999) realizaram estudo prospectivo que avaliou a associação entre a concentração de ácidos graxos no tecido adiposo mamário e a resposta do tumor a quimioterapia, em 56 pacientes com câncer de mama. Foi observado que os níveis de ácidos graxos n-3 no tecido adiposo mamário foi maior no grupo de paciente que apresentou resposta parcial ou completa ao tratamento quimioterápico, do que nas pacientes que não apresentaram resposta ao tratamento ou apresentaram progressão do tumor. Dentre os ácidos graxos n-3 avaliados, somente o 22:6 n-3 foi significativamente associado com a resposta do tumor ao tratamento, aumentando a resposta do tumor à citotoxicidade dos agentes utilizados durante o tratamento.

Além do efeito dos ácidos graxos n-3 na prevenção do câncer, e no tumor, estudo *in vitro* mostram que estes ácidos graxos também podem estar relacionados com a expressão da FASN. Em trabalho realizado por Menendez et. al. (2004), foi avaliado o papel dos ácidos graxos n-3 e n-6 na atividade enzimática e expressão de proteína da FASN em linhagem de células de câncer de mama. Entre os ácidos graxos testados o 18:3 n-3 e o 22:6 n-3 reduziram a atividade da FASN de forma significativa em 61% e 37%, respectivamente, sendo o 18:3 n-6 foi o mais efetivo, reduzindo em 75% a atividade da enzima. Já o 20:5 n-3, 18:2 n-6 e 20:4 n-6, não apresentaram efeito. Os pesquisadores também avaliaram se os ácidos graxos

poderiam influir na expressão da proteína da enzima, e foi verificado que os ácidos graxos que reduziram a atividade da FASN, também reduziram a expressão da proteína.

Outro estudo, *in vitro*, realizado por Ravacci et. al. (2013), também observou resultado semelhante do ácido graxo 22:6 n-3 na expressão da FASN. Linhagem de células de epitélio mamário, e uma linhagem de células epitélio mamário modificada para super expressar HER2 (receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2), foram tratadas com ácido graxo 22:6 n-3 e foi observado redução da expressão da proteína da FASN.

### 3 OBJETIVOS

Avaliar a influência do consumo de óleo de peixe rico em ácido graxo n-3 na enzima ácido graxo sintase (FASN) do soro e no nível de seu transcrito nas células mononucleadas do sangue periférico, em mulheres com diagnóstico recente de câncer de mama.

#### 3.1 Objetivos específicos

- Quantificar a enzima FASN no soro do sangue periférico de mulheres portadoras de câncer de mama recém diagnosticadas;
- Quantificar os níveis de transcrito (mRNA) da *FASN* por reação da polimerase em cadeia em tempo real (qPCR) nas células mononucleadas do sangue periférico de mulheres portadoras de câncer de mama;
- Avaliar o efeito da suplementação do óleo de peixe rico em n-3 na FASN e no seu transcrito, em mulheres com diagnóstico recente de câncer de mama.

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 Tipo de estudo**

Trata-se de um estudo de intervenção, randomizado, placebo controlado, duplo-cego.

### **4.2 Aspectos éticos**

O presente estudo faz parte do projeto intitulado “Efeito da suplementação com ácido graxo n-3 no estado nutricional, qualidade de vida, resposta imunitária e atividade da enzima ácido graxo sintase de pacientes portadoras de tumores de mama em tratamento quimioterápico” aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Saúde da Universidade de Brasília (CEP 072/09) e Comitê de Ética da Secretaria de Saúde (protocolo nº 383/2011).

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi assinado por todas as pacientes antes destas iniciarem os procedimentos do estudo.

### **4.3 Amostra**

As pacientes convidadas a participar do estudo foram captadas no serviço de mastologia do Hospital Universitário de Brasília (HUB) e do Hospital de Base do Distrito Federal (HBDF) no período de fevereiro de 2012 à maio de 2013.

Foram selecionadas mulheres com idade entre 18 e 65 anos, com diagnóstico de câncer de mama confirmado por biopsia realizada por meio de

punção por agulha grossa, ou que apresentavam imagem mamográfica com classificação igual ou superior a BIRADS 4C (mamografia com 70% ou mais de suspeita para malignidade) associado a exame clínico alterado, virgens de tratamento e com indicação de cirurgia como tratamento inicial. Como critérios de exclusão foram considerados presença de metástase, doença recidiva, com indicação de tratamento de quimioterapia neoadjuvante, portadoras de marcapasso, portadoras de doenças hematológicas ou outras alterações que comprometessem as análises laboratoriais, pacientes com impossibilidade de comunicação, de realização da avaliação de composição corporal, para aferir peso ou que apresentassem edema de extremidade importante, e que apresentasse doença concomitante que contraindicasse o uso do suplemento.

Durante o atendimento ambulatorial realizado pelo mastologista, as pacientes que apresentassem os critérios de inclusão eram encaminhadas pelos médicos às pesquisadoras para identificação de possível critério de exclusão e realização do convite para participação do projeto.

Após aceitarem participar do estudo, as pacientes assinavam o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), e, quando necessário, era solicitado a documentação necessária para abertura de prontuário da paciente no HuB, onde foram realizadas as coletas de dados e de amostras sanguíneas em datas previamente agendadas com as pacientes.

#### 4.4 Randomização

A randomização para os dois grupos de intervenção (óleo de peixe ou placebo) foi realizada previamente por sorteio manual em grupos de dez, e distribuídas de acordo com os números sequenciais de identificação das pacientes.

Todo o processo de randomização foi realizado por técnico do Laboratório de Bioquímica do Núcleo de Nutrição e um dos pesquisadores do projeto, que não tinha contato com as pacientes nem com as análises realizadas.

Após a assinatura do Termo de Consentimento a paciente recebia um número de identificação. A sequência de randomização foi mantida em segredo até o final do período de suplementação, sendo que nem a equipe de campo nem as pacientes sabiam em qual grupo haviam sido sorteadas.

#### 4.5 Suplementação

A suplementação foi realizada por um período de 30 dias, antes que as pacientes fossem submetidas à cirurgia, período em que a maioria das pacientes aguardava a confirmação de exames de biopsia definitiva e outros exames pré-cirúrgicos eram realizados.

As pacientes do grupo óleo de peixe receberam por dia duas cápsulas de 1g de concentrado de óleo de peixe da marca Maxomega<sup>TM</sup>, totalizando 2 g por dia. Cada cápsula do suplemento continha 470mg de etil ésteres de 20:5n-3 (ácido eicosapentaenóico - EPA) e 390mg de 22:6n-3 (ácido docosahexaenóico - DHA), e correspondeu ao total de 1840mg de n3 por dia. O óleo continha 0,32%(w/w) de d-

alfa-tocoferol como antioxidante. O grupo placebo recebeu duas cápsulas de 1g de óleo mineral com igual aparência do óleo de peixe.

Todas as pacientes foram orientadas a consumir as cápsulas duas vezes ao dia, dividida em duas doses, sempre próximo às refeições.

A suplementação foi realizada por um período de trinta dias, no qual as pacientes recebiam as cápsulas a serem consumidas em duas etapas de quinze dias. Este procedimento foi realizado como forma de melhorar a adesão das participantes ao projeto, devido ao maior contato com as pesquisadoras durante o trabalho, bem como para avaliar o consumo do suplemento, já que era solicitado que estas retornassem os fracos entregues anteriormente com as cápsulas que por ventura não tivessem sido consumidas.

#### **4.6 Coleta de dados**

Ao ingressarem no projeto, era agendada com as pacientes a data de início da suplementação que precedia da realização da coleta de sangue, realização de questionário sócio econômico e avaliação antropométrica.

Com as pacientes em jejum, era colhido aproximadamente 3ml de sangue em frasco contendo anticoagulante EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid*). Este sangue era imediatamente transportado em refrigeração até o Laboratório de Malária da Universidade de Brasília onde era centrifugado para separação do soro, seguido de separação de células mononucleadas para realização, para realização de análises posteriores. As amostras eram armazenadas a temperatura de -70°C por até um mês, até a realização das análises.

Para a avaliação antropométrica foi realizado aferição de peso em balança Toledo®, com capacidade de 200Kg e precisão de 100g; altura, utilizando estadiômetro de metal, com 200cm e precisão de 1mm, acoplado à balança; circunferência da cintura, medida com fita métrica inelástica de material plástico com 2mm de precisão; e bioimpedância elétrica, realizada com instrumento BIA quantum II (RJL Systems), com frequência de 50khz.

Foi também realizada avaliação do consumo alimentar por meio de recordatório alimentar, por telefone, em dois dias não consecutivos, baseado no método de múltiplas passagens proposto pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América (USDA) (CONWAY *et al.*, 2003). Foram considerados para fins deste estudo os valores de consumo de energia total, carboidratos, proteínas, lipídios totais, ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados. Foram também estimados os consumos individuais de alguns ácidos graxos como o 16:0, 18:0, 18:1, 20:5 n-3 e 22:6 n-3.

Também foram colhidas informações das pacientes biópsias das pacientes, em prontuário, a fim de observar os resultados de classificação histológica do tumor, análise imunohistoquímica de HER2 (receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2), receptoe de estrogênio (RE) e receptor de progesterona (RP).

Ao final da suplementação, foram repetidas a coleta de sangue, avaliação antropométrica e recordatório alimentar.

#### **4.7 Separação de células mononucleadas do sangue periférico**

O isolamento das células mononucleadas do sangue periférico colhido das pacientes foi realizado por meio de separação por gradiente de densidade em

suspensão de Histopaque<sup>®</sup> - 1077 (Sigma- Aldrich), segundo protocolo do fabricante. O critério de escolha do reagente considerou sua baixa contaminação por hemácias no isolado celular, que podem interferir nas análises.

Para a separação das células foram utilizados 3ml de Histopaque<sup>®</sup> , em temperatura ambiente, para aproximadamente 3ml de sangue total, e centrifugado a 400 x *g* por 30 minutos em temperatura ambiente. Centrifugação realizada a temperaturas mais baixas, como 4°C, poderiam resultar em aglutinação celular e menor recuperação das células.

Após a centrifugação eram formadas quatro fases: soro, células mononucleadas, Histopaque<sup>®</sup> e hemácias. As células monucleadas foram aspiradas com pipeta descartável de 2ml e ressuspendidas em 10 ml de PBS (*phosphate buffered saline solutions*) em um novo tubo para lavagem. Após centrifugação a 250 x *g* por 10 minutos, o sobrenadante era descartado e as células eram ressuspendidas em 5ml de PBS para nova lavagem.

Ao final da segunda lavagem, as células separadas eram estocadas em 1000µl de Trizol Reagent<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich) e armazenadas em freezer a temperatura de -70°C, por até um mês.

#### **4.8 Determinação dos níveis de transcrito do gene da *FASN* (ácido graxo sintase)**

#### 4.8.1 Extração de RNA Total e Síntese de cDNA

A extração de RNA total das células mononucleadas do sangue periférico foi realizada utilizando Trizol Reagent® (Sigma-Aldrich) de acordo com as recomendações do fabricante.

As células foram homogeneizadas em Trizol Reagent® (1 ml para  $5-10 \times 10^6$  células), logo após a separação destas e estocadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  até a realização da separação do RNA.

Após serem descongeladas, era adicionado às amostras 200µl de clorofórmio, e estas eram incubadas por 3 minutos à temperatura ambiente e em seguida centrifugadas a  $12000 \times g$  por 15 minutos a temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  para separação da fase orgânica (contendo proteína), uma interfase (contendo DNA) e fase aquosa (contendo RNA). A fase aquosa era transferida para um novo tubo e em seguida, adicionado 500µl de álcool isopropílico e a amostra centrifugada a  $12000 \times g$  por 10 minutos a temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  para isolar o RNA. Ao *pellet* de RNA formado era adicionado 1ml etanol 75% e centrifugado a  $7500 \times g$  por 5 minutos, para remoção de impurezas. Após a lavagem, o *pellet* era seco a temperatura ambiente e ressuspendido em 20 µl água de água mili-Q, e estocado a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

A concentração do RNA total era determinada por leitura a 260 nm em espectrofotômetro (UV-1800 UV-VIS Spectrophotometer, Shimadzu, Kyoto, Japão), e dada pela fórmula:

$$\text{Concentração de RNA } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times 40 \times \text{fator de diluição}$$

Onde,  $A_{260}$  é absorvância da amostra a 260nm, 40 é o coeficiente médio de extinção do RNA (Azevedo et al., 2010).

O grau de pureza das amostras de RNA também foi determinado por espectrofotometria calculando a razão das absorvâncias a  $A_{260}/A_{280}$ nm para verificação de contaminação com proteínas (Azevedo et al., 2010).

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 2 $\mu$ g de RNA total utilizando o kit High Capacity cDNA (Applied Biosystems), de acordo com as recomendações do fabricante.

Era preparada uma reação com volume final de 20 $\mu$ l e esta era incubada em termociclador a 25°C por 10 minutos, a 37°C por 120 minutos, a 85°C por 5 minutos, e resfriado a 4°C para ser estocado.

Foi realizada reação de síntese de cDNA sem a enzima transcriptase reversa como controle negativo e uma alíquota da amostras foi submetida a reação da polimerase em cadeia em tempo real (qPCR) para verificar ausência de contaminação por DNA genômico.

#### **4.8.2 Determinação dos Níveis de mRNA do Gene *FASN***

As concentrações relativa de mRNA do gene *FASN*, foi determinada pela amplificação utilizando-se o sistema de reação da polimerase em cadeia em tempo real (qPCR; 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems). A qPCR foi realizada utilizando 1 $\mu$ l de cDNA, 5  $\mu$ l de SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) e 500 nmol/L (concentração final) de cada iniciador (Tabela 2), com volume final de 10 $\mu$ l.

Tabela 2 - Sequência dos iniciadores utilizados para ensaio qPCR para os genes *FASN* e *Actb*

Gene	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Número de acesso do GenBank	Referência
<i>FASN</i>	GTGAGGCTGAGGAGAC ( <i>forward</i> ) GGCACGCAGCTTGTAGTAGA ( <i>reverso</i> )	NM_004104	Wang et al., 2008
<i>Actb</i>	CATGTACGTTGCTATCCAGGC ( <i>forward</i> ) CTCCTTAATGTCACGCACGAT ( <i>reverso</i> )	NM_001101	Applied Biosystems®

A detecção do gene de interesse foi realizada empregando-se um sistema de reação de 40 ciclos (desnaturação: 95° C por 15 s; anelamento/extensão: 60° C por 60 s; estágio da curva de dissociação: 95° C por 15 s, 60° C por 60 s, 95° C por 15 s e 60° C por 15 s). Todas as reações foram feitas em triplicata e a amplificação e especificidade de cada produto amplificado foi verificada a partir da curva de dissociação.

A eficiência de amplificação da qPCR (reação da polimerase em cadeia em tempo real) foi avaliada através da realização de curvas padrão para o fragmento amplificado nas seguintes diluições: 1:5; 1:10; 1:20; 1:50; 1:100; 1:150; 1:250.

Para determinação da eficiência das reações, curvas-padrão de cada gene de interesse foram construídas a partir do valor do ciclo de amplificação (CT) versus log da concentração de cDNA e a eficiência foi determinada a partir do valor do coeficiente angular da reta, pela equação:

$$E (\%) = (10^{-1/\text{inclinação}} - 1) \times 100$$

Onde, E corresponde à eficiência da reação, e a inclinação corresponde ao valor do coeficiente angular da reta. A eficiência da qPCR (reação da polimerase em cadeia em tempo real) foi considerada válida entre 90 a 110%. No presente trabalho a

eficiência da reação para amplificação do gene da FASN foi de 99%, e de 98% para Actb.

A expressão gênica relativa foi calculada utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). A expressão dos genes foi calculada utilizando os valores do CT e os resultados de expressão gênica foram expressos como o número de vezes expresso em relação ao controle endógeno. Todas as amostras foram realizadas em triplicatas e normalizadas em relação ao gene constitutivo  $\beta$ -actina (Actb).

#### **4.9 Determinação dos níveis séricos de FASN por ensaio imunoenzimático (ELISA)**

A quantificação da enzima FASN no soro das pacientes foi feita através do kit: FASN-detect™ ELISA (FASNGen, Baltimore, USA). A leitura das placas foi realizada no leitor SPECTRAMax 190 para ELISA. Todo o protocolo utilizado seguiu os procedimentos descritos pelo fabricante.

Foram adicionados 100 $\mu$ l de amostra e 100 $\mu$ l de cada padrão à placa de diluição e adicionado 100 $\mu$ l do diluente contendo anticorpo de detecção marcado com biotina. Uma alíquota de 150 $\mu$ l desta solução foi acondicionada à placa de captura de 96 poços e incubada em agitador por 90 minutos a temperatura ambiente. Após o período de incubação as placas foram lavadas cinco vezes com tampão de lavagem. 100 $\mu$ l do conjugado da enzima FASN foram adicionados a cada poço e incubados durante 60 minutos em agitador a temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas com o tampão por cinco vezes. Foram adicionados 100 $\mu$ l do substrato tetrametilbenzidina (TMB) a cada poço e o material foi incubado em agitador durante 15 minutos a temperatura ambiente. A reação foi interrompida

com a adição de 100µl de solução de parada. As placas foram lidas a 450nm de absorbância.

#### **4.10 Análise de ácidos graxos de fosfolípido sérico**

Para a análise dos ácidos graxos no soro sanguíneo foi utilizado 1ml de amostra, descongelada em temperatura ambiente. A extração de lipídios totais séricos foi realizada de acordo com o método de Folch, Less, Stanley (1957) com 5ml de solução clorofórmio-metanol 2:1 (v/v). A mistura foi agitada por 1 minuto e centrifugada por 5 minutos a 2500rpm em temperatura ambiente, para separação em fases. A fase orgânica inferior, que contém os lipídios, foi filtrada em filtro de papel com 110mm de diâmetro e transferida para tubo previamente pesado. Em seguida, o solvente foi evaporado sob N<sub>2</sub> gasoso e deixado em dessecador por 40 minutos. O total de lipídios/ml de soro foi determinado gravimetricamente e foram adicionados 50 µl de hexano ao total de lipídio extraído.

A partir do total de lipídios extraídos, a fração fosfolipídica sérica foi separada por cromatografia de camada delgada (CCD) de sílica-gel, com sistema de solventes: hexano: éter dietílico: ácido acético (80:20:2 v/v/v) de acordo com a metodologia de Christie (2003). Foram utilizadas placas cromatográficas unidimensionais 20X20 cm, impregnadas com sílica-gel e com indicador fluorescente (Analtech, Inc Newark, Dinamarca). A limpeza prévia das placas foi feita com solução de clorofórmio-metanol (1:1, v/v) em cuba cromatográfica de vidro (27,5 x 27,5 x 7,5 cm; Sigma-Aldrich) com fluxo ascendente de solventes até o seu limite superior. Em seguida, as placas foram ativadas em estufa térmica à temperatura de 100° C durante 40 minutos. Em cada placa ativada foram marcados os pontos e

faixas de aplicação e os respectivos limites da corrida cromatográfica com lápis grafite comum. Em seguida, foi aplicado o total de lipídio extraído por faixa da placa utilizando seringa vítrea de microvolume de 10  $\mu$ l. As placas foram submetidas à ação capilar do sistema de solventes para lipídios neutros em cuba cromatográfica de vidro até o limite superior de 1,5 cm por aproximadamente 50 minutos. As bandas de fosfolipídios foram identificadas sob luz ultravioleta, removidas das placas e transferidas para tubos de vidro com auxílio de funil de vidro. Os fosfolipídios de cada amostra foram eluídos em solução de clorofórmio-metanol (2:1, v/v), agitados por 1 minuto e filtrados em filtro de papel com 110mm de diâmetro.

Foram adicionados no filtro 1ml de clorofórmio e 1 ml de KCL (0,88%) em solução aquosa na amostra. A mistura foi agitada por 1 minuto e centrifugada por 5 minutos em temperatura ambiente a 2500rpm, para separação em duas fases. A fase orgânica inferior, que contém os fosfolipídios, foi transferida para um tubo de vidro e o solvente foi evaporado sob  $N_2$ .

Os ácidos graxos dos fosfolipídios foram esterificados por metilação ácida. Foram adicionados 1,5ml de metanol e 300  $\mu$ l de HCl a 8% em metanol à amostra de fosfolipídios. A mistura foi agitada em vortex por 1 minuto e em seguida submetida à temperatura de 100°C por 60 minutos. Em seguida a amostra foi resfriada rapidamente em água corrente e foi adicionado 1ml de hexano e 1 ml de água destilada. Após agitação em vortex foi retirada a fase superior (hexano), feita a secagem em nitrogênio e em seguida eluição em 100 $\mu$ l de hexano. A amostra de metil-ésteres de ácidos graxos foi transferida para *vial* e armazenada a temperatura de -20°C para posterior análise por cromatografia gasosa.

Para a análise por cromatografia gasosa, foi utilizado o volume de injeção de 1 $\mu$ l da amostra de metil-ésteres de ácidos graxos em cromatógrafo a gás (Shimadzu

modelo 17A). A separação foi feita utilizando coluna capilar flexível de sílica de alta resolução, com dimensão de 100m comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno. A coluna de 100m foi utilizada por ser recomendada para a separação de isômeros trans. O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio e os gases responsáveis pela manutenção da chama foram o oxigênio e o nitrogênio.

O detector do cromatógrafo foi por ionização de chama (FID - Flame Ionization Detector) que, juntamente com o injetor foi mantido a 250°C. O gradiente de temperatura utilizado foi 125°C por 3 minutos, 125-170°C a 10°C por minuto, 170°C por 5 minutos, 170-175°C a 5°C/minuto, 175°C por 1 minuto, 175-185°C a 2°C/minuto, 185°C por 1 minuto, 185-195°C a 1°C/minuto, 190°C por 1 minuto, 190-240°C a 5°C/minuto, 240°C por 8 minutos. O tempo de corrida foi de aproximadamente 45 minutos.

O injetor foi utilizado em modo *split* (1:50), os ácidos graxos foram identificados por comparação com o tempo de retenção de padrões de ácidos graxos (Sigma<sup>®</sup>), utilizados como padrões externos. Os resultados foram expressos em percentual de área de detecção do ácido graxo em relação à área total dos ácidos graxos identificados nos cromatogramas.

#### **4.11 Análise dos dados**

A digitação do banco de dados e as análises estatísticas foram realizadas com o pacote estatístico SPSS 19.0 para Windows. A normalidade da distribuição dos dados foi avaliada utilizando-se os testes Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk.

Os resultados das análises descritivas foram apresentados em percentagens, médias e desvio padrão. Os Testes Qui-quadrado e Exato de Fisher

foram aplicados para testar as diferenças entre as variáveis categóricas no momento basal entre os grupos de tratamento. O teste T de Student ou de Mann Whitney foi utilizado para comparar desfechos contínuos intergrupos se distribuição simétrica ou assimétrica, respectivamente. Teste T pareado foi aplicado para detectar diferenças intragrupo nos momentos basal e final quando variável de desfecho apresentou-se simétrica.

Foi utilizado como nível de significância valores de  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

Um total de 108 pacientes selecionadas de acordo com os critérios de inclusão e exclusão foram convidadas para participar do estudo (Figura 4). Destas, 27 recusaram participar, por não apresentarem interesse no estudo (n=20), por dificuldades em comparecer às avaliações (n=6), ou por não residirem no Distrito Federal (n=1).

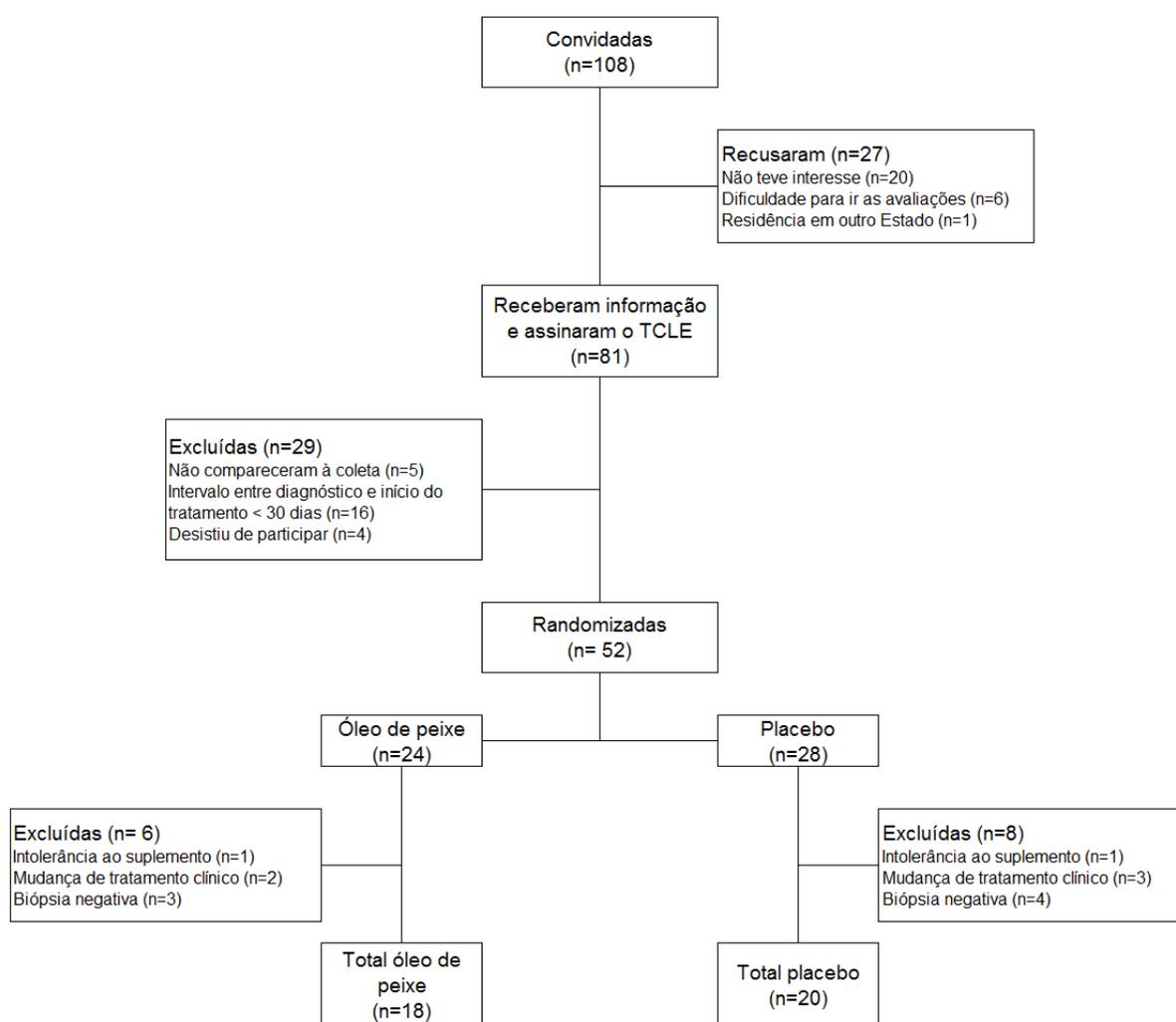


Figura 4 - Fluxograma do recrutamento e randomização de pacientes envolvidas no estudo

Portanto, 81 pacientes consentiram participar do estudo. Entretanto, destas, 29 foram excluídas antes da randomização por não comparecerem à primeira coleta de dados (n=5), por iniciarem o tratamento antes dos 30 dias necessários para a suplementação (n=16), ou por desistirem de participar da pesquisa (n=4). No total, 52 pacientes foram randomizadas. Deste total, 7 pacientes foram excluídas durante o estudo por apresentaram intolerância à intervenção (n = 2) ou por mudança de tratamento clínico inicialmente previsto (n = 5). Completaram o estudo 45 pacientes, dos quais 7 tiveram confirmação de biopsia negativa para câncer de mama. Assim, 38 pacientes foram incluídas nas análises finais que após abertura do cegamento se dividiram em 18 pacientes suplementadas com óleo de peixe e 20 no grupo placebo.

Não foram observadas diferenças significativas na idade, anos de estudos, renda, estado civil, consumo de tabaco, presença de outras doenças, estado de menopausa e prática de atividade física entre os grupos óleo de peixe ou placebo (Tabela 3).

Entre as características clínicas observadas, a maioria das pacientes apresentou carcinoma ductal infiltrante, de acordo com a classificação histológica, representando 55% das mulheres do grupo óleo de peixe e 65% das mulheres do grupo placebo. Também foi observado que a maioria das pacientes, em ambos os grupos, apresentavam câncer positivo para receptores de estrogênio (RE), sendo 66,7% no grupo óleo de peixe e 65% no grupo placebo, e para receptores de progesterona (RP), sendo 61,1% no grupo óleo de peixe e 50% no grupo placebo (Tabela 4).

Tabela 3 - Perfil sócio-demográfico das pacientes portadoras de câncer de mama incluídas no estudo, randomizadas para os grupos óleo de peixe e placebo.

	Grupos		P
	Óleo de peixe n=18	Placebo n=20	
<b>Idade em anos (média ± DP)</b>	48,1±8,70	53,4±7,75	0,058
<b>Anos de estudo (média ± DP)</b>	6,7±4,0	9,2±4,0	0,092
<b>Renda em reais (média ± DP)</b>	1428±937	1707±943	0,392
<b>Estado civil % (n)</b>			0,615
Solteira	16,7 (3)	15 (3)	
Casada	66,7(12)	50 (10)	
Divorciada/ viúva	16,6 (3)	35 (7)	
<b>Fumante % (n)</b>			0,822
Nunca fumou	50 (9)	55 (11)	
Ex-fumante	27,8 (5)	30 (6)	
Fumante	22,2 (4)	15 (3)	
<b>Doenças associadas % (n)</b>			0,846
Diabetes/ Dislipidemia	11,1 (2)	10 (2)	
Hipertensão	22,2 (4)	30 (6)	
Outras	28,8 (7)	30 (6)	
Nenhuma	22,2 (4)	30 (6)	
<b>Menopausa % (n)</b>			0,320
Sim	50 (9)	70 (14)	
Não	50 (9)	30 (6)	
<b>Prática de atividade física % (n)</b>			0,626
1 a 2 vezes por semana	-	10 (2)	
3 a 4 vezes por semana	11,1 (2)	5 (1)	
Mais de 5 vezes por semana	22,2 (4)	15 (3)	
Nunca	66,7 (12)	70 (14)	

Tabela 4 - Características clínicas das pacientes incluídas no estudo, randomizadas para os grupos óleo de peixe e placebo

	Grupos		P
	Óleo de peixe n=18	Placebo n=20	
<b>Classificação histológica % (n)</b>			0,589
Carcinoma ductal <i>in situ</i> (CDIS)	17 (3)	5 (1)	
Carcinoma ductal infiltrante (CDI)	55 (10)	65 (13)	
CDI + CDIS	11 (2)	5 (1)	
s/ informação	17 (3)	25 (5)	
<b>HER2 % (n)</b>			0,600
HER2+	33,3 (6)	25,0 (5)	
HER2-	33,3 (6)	50,0 (10)	
s/ informação	33,3 (6)	25,0 (5)	
<b>RE % (n)</b>			1,000
RE +	66,7 (12)	65,0 (13)	
RE -	11,1 (2)	10,0 (2)	
s/ informação	22,2 (4)	25,0 (5)	
<b>RP % (n)</b>			0,830
RP +	61,1 (11)	50,0 (10)	
RP -	16,7 (3)	25,0 (5)	
s/ informação	22,2 (4)	25,0 (5)	

RE: receptor de estrogênio; RE+: biópsia positiva para receptores de estrogênio; RE-: biópsia negativa para receptores de estrogênio; RP: receptor de progesterona; RP+: biópsia positiva para receptores de progesterona; RP-: biópsia negativa para receptores de progesterona; HER2: receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2; HER2+: biópsia positiva para receptores de fator de crescimento epidérmico humano 2; HER2-: biópsia negativa para receptores de fator de crescimento epidérmico humano 2.

A tabela 5 apresenta os dados antropométricos e dietéticos das participantes. Em ambos os grupos, a maioria das mulheres apresentaram sobrepeso ou obesidade, de acordo com a classificação de IMC, sendo 78% das mulheres do grupo óleo de peixe e 70% das mulheres do grupo placebo.

Tabela 5 - Estado nutricional e consumo dietético das pacientes incluídas no estudo, randomizadas para os grupos óleo de peixe e placebo.

	Grupos		P
	Óleo de Peixe (n=18) (média±DP)	Placebo (n=20) (média±DP)	
<b>Antropometria</b>			
Peso (kg)	69,81±12,87	66,1±8,21	0,294
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	28,39±5,58	27,24±3,38	0,441
Eutrofia % (n)	22 (4)	30 (6)	0,916
Sobrepeso % (n)	45 (8)	45 (9)	
Obesidade % (n)	33 (6)	25 (5)	
Circunferência da cintura	95,93±13,31	92,97±7,66	0,411
% Gordura corporal	37,11±8,77	38,66±5,63	0,599
<b>Consumo dietético</b>			
Energia (Kcal)	1400±374	1251±410	0,250
Kcal/ kg	21±5	29±6	0,371
Carboidratos (g)	183±68	160±51	0,520
Proteínas (g)	63±17	54±21	0,173
Lipídios (g)	50±19	44,70±20	0,365
Fibra (g)	13±6	12±5	0,681
Ácidos graxos saturados (g)	13±7	10±5	0,293
Ácidos graxos monoinsaturados (g)	14±6	12±6	0,483
Ácidos graxos poliinsaturados (g)	9±3	10±7	0,704
16:0 (g)	7±4	6±3	0,397
18:1 (g)	13±6	11±6	0,483
18:0 (g)	3±2	3±1	0,447
20:5 n-3 (g)	0,04±0,10	0,006±0,006	0,494
22:6 n-3 (g)	0,11±0,29	0,02±0,01	0,242

DP – desvio padrão; 16:0 – ácido palmítico; 18:0 – ácido esteárico; 18:1 – ácido oleico; 20:5 n-3 – ácido eicosapentaenoico; 22:6 n-3 – ácido docosaenoico.

Não se verificou diferença no consumo de nutrientes entre os dois grupos pesquisados. O consumo energético diário médio, antes da suplementação, foi de 1400±374 Kcal entre as pacientes do grupo óleo de peixe e 1251±410 Kcal no grupo placebo, sem diferença significativa entre os grupos. O consumo médio de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados foi de 13±7g, 14±6g e 9±3g, respectivamente, no grupo óleo de peixe, e 10±5g, 12±6g e 10±7g, respectivamente, no grupo placebo. O consumo de 16:0 foi de 7±4g no grupo óleo de peixe e 6±3g no grupo placebo, sem diferença significativa entre as médias (Tabela 5).

O consumo médio inicial de 20:5 n-3 foi de  $0,04 \pm 0,10$ g no grupo óleo de peixe e  $0,006 \pm 0,006$ g no grupo placebo, e de 22:6 n-3 foi de  $0,11 \pm 0,29$ g e  $0,02 \pm 0,01$ g, no grupo óleo de peixe e no grupo placebo, respectivamente, sem diferença significativa entre as médias (Tabela 5).

Com relação à composição de ácidos graxos dos fosfolípidios plasmáticos (Tabela 6), antes da intervenção, o grupo óleo de peixe apresentou prevalência significativamente maior de 16:0 ( $31,08 \pm 7,25\%$ ) do que o grupo placebo ( $26,05 \pm 4,74\%$ ) ( $p=0,016$ ). Não foi observada diferença no total de ácidos graxos saturados entre os grupos. Em relação ao total de ácidos graxos poli-insaturados, o grupo placebo apresentou média significativamente maior ( $32,62 \pm 6,31\%$ ) do que o grupo óleo de peixe ( $27,23 \pm 8,81\%$ ) ( $p=0,038$ ). Ainda, no grupo placebo, a média de ácidos graxos n-6 ( $28,89 \pm 5,44\%$ ) foi significativamente maior quando comparado com o grupo óleo de peixe ( $22,95 \pm 9,27\%$ ) ( $p=0,021$ ), bem como apresentou razão n-6/n-3 significativamente maior ( $8,79 \pm 3,37\%$ ) do que o grupo óleo de peixe ( $6,62 \pm 3,02\%$ ) ( $p=0,049$ ). Foi observada também, diferença significativa entre os grupos na razão de ácidos graxos 18:0/18:1, sendo maior no grupo óleo de peixe ( $4,55 \pm 2,29\%$ ) comparado com o grupo placebo ( $2,92 \pm 1,21\%$ ) ( $p=0,008$ ).

Antes da suplementação, o ácido graxo 20:5 n-3 representava  $0,69 \pm 0,85\%$  dos fosfolípidios séricos, no grupo óleo de peixe, e  $0,43 \pm 0,48\%$  no grupo placebo. O ácido graxo 22:6 n-3 representava  $3,54 \pm 2,32\%$  no grupo óleo de peixe e  $3,22 \pm 1,60\%$  no grupo placebo. Para ambos ácidos graxos, não foi observada diferença significativa nas médias encontradas. Após a intervenção, no grupo óleo de peixe, houve aumento na quantidade de 22:6n-3 ( $4,51 \pm 4,59\%$ ;  $p=0,063$ ), e aumento significativo da quantidade de 20:5n-3 ( $1,52 \pm 0,77\%$ ;  $p=0,005$ ). Também foi observado, como esperado, aumento da média de n-3 total ( $p=0,004$ ) e redução da

razão n-6/n-3 ( $p=0,002$ ). Os resultados dos ácidos graxos poli-insaturados após a intervenção são condizentes com o efeito esperado da suplementação, na qual os ácidos graxos foram incorporados nos fosfolípidios séricos do grupo suplementado com óleo de peixe.

Tabela 6 - Composição de ácidos graxos dos fosfolipídios plasmáticos, em percentual, das pacientes randomizadas de acordo com os grupos de estudo.

	Grupos		P
	Óleo de Peixe (n=18) (média±DP)	Placebo (n=20) (média±DP)	
<b>16:0 - ácido palmítico</b>			
Inicial	31,08±7,25	26,05±4,74	0,016
Final	30,17±6,0	25,91±4,60	0,020
p-valor	0,573	0,842	
<b>18:0 - ácido esteárico</b>			
Inicial	16,67±1,46	15,80±2,35	0,211
Final	17,32±3,23	15,80±2,35	0,144
p-valor	0,381	0,852	
<b>18:1 9c - ácido oleico</b>			
Inicial	4,36±1,65	5,73±1,55	0,130
Final	4,53±1,68	5,37±1,48	0,118
p-valor	0,608	0,305	
<b>20:4 n-6 - ácido araquidônico</b>			
Inicial	8,56±4,09	10,61±2,80	0,081
Final	8,07±2,81	10,31±2,76	<b>0,020</b>
p-valor	0,479	0,557	
<b>20:5 n-3 - ácido eicosapentaenoico</b>			
Inicial	0,69±0,85	0,43±0,48	0,285
Final	1,52±0,77	0,85±0,94	<b>0,010</b>
p-valor	<b>0,005</b>	0,171	
<b>22:6 n-3 - ácido docosaexaenoico</b>			
Inicial	3,54±2,32	3,22±1,60	1,00
Final	4,51±4,59	3,90±2,18	0,374
p-valor	<b>0,063</b>	0,212	
<b>AG saturados</b>			
Inicial	59,56±10,57	54,32±7,71	0,091
Final	58,62±6,93	54,92±52,51	0,116
p-valor	0,726	0,756	
<b>AG monoinsaturado</b>			
Inicial	11,64±5,67	10,97±4,02	0,831
Final	10,45±2,67	10,13±2,68	0,726
p-valor	0,298	0,351	
<b>AG poli-insaturados</b>			
Inicial	27,23±8,80	32,62±6,31	0,038
Final	29,28±7,45	33,26±6,59	0,094
p-valor	0,263	0,579	
<b>Total n-3</b>			
Inicial	4,27±2,16	3,72±1,83	0,408
Final	6,17±2,33	4,85±2,87	0,138
p-valor	<b>0,004</b>	0,138	
<b>Total n-6</b>			
Inicial	22,95±9,27	28,89±5,44	<b>0,021</b>
Final	23,10±6,17	28,41±6,15	0,013
p-valor	0,935	0,661	
<b>Razão n-6/n-3</b>			
Inicial	6,62±3,02	8,79±3,37	<b>0,049</b>
Final	4,15±1,71	7,08±3,57	<b>0,004</b>
p-valor	<b>0,002</b>	0,170	
<b>Razão 18:0/18:1</b>			
Inicial	4,55±2,29	2,92±1,24	<b>0,008</b>
Final	3,52±1,76	3,56±2,95	0,165
p-valor	0,758	0,467	

Com relação à enzima FASN, inicialmente, a média da concentração da proteína no soro foi de  $118,79 \pm 76,71$  ng/ml, sendo de  $128,94 \pm 72,86$  ng/ml no grupo óleo de peixe e  $109,66 \pm 80,77$  ng/ml no grupo suplementado, sem diferença entre os grupos (Figura 5).

Após a suplementação a média dos valores séricos da proteína FASN, no grupo óleo de peixe foi de  $120,78 \pm 51$  ng/ml, e no grupo placebo  $104,89 \pm 44,28$  ng/ml sem diferença significativa intra ou entre os grupos (Figura 5).

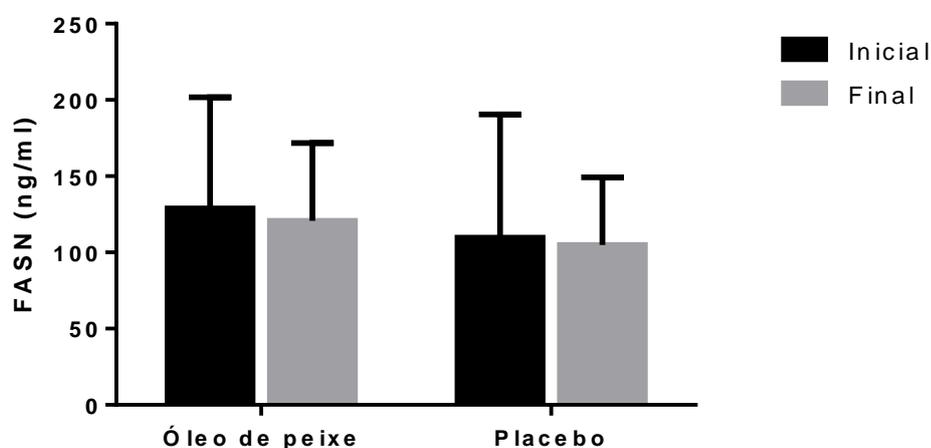


Figura 5 - Concentração da FASN no soro das pacientes incluídas no estudo, antes e após a suplementação. Dados apresentados como média  $\pm$  desvio-padrão. Grupo óleo de peixe: inicial  $128,94 \pm 72,86$  ng/ml e final  $120,78 \pm 51$  ng/ml; Grupo placebo: inicial  $109,66 \pm 80,77$  ng/ml e final  $104,89 \pm 44,28$  ng/ml. Não foram observadas diferenças significativas intra e entre grupos.

A figura 6 apresenta os níveis do transcrito (mRNA) da *FASN* nas células mononucleadas do sangue periférico das pacientes, no momento basal, antes da intervenção, normalizados com os valores do gene constitutivo de  $\beta$ -actina. Observou-se que os níveis relativos de mRNA eram semelhantes entre os grupos.

Após o período de suplementação, as pacientes randomizadas para o grupo óleo de peixe, apresentaram aumento não significativo nos níveis de transcrito da *FASN*, em relação ao período antes da intervenção, sendo a média observada de

1,26±0,52 ( $p=0,074$ ), enquanto no grupo placebo a média foi de 1,09±0,51 ( $p=0,970$ ). Em ambos os casos não se observou diferenças significativas intra ou entre os grupos (Figura 6).

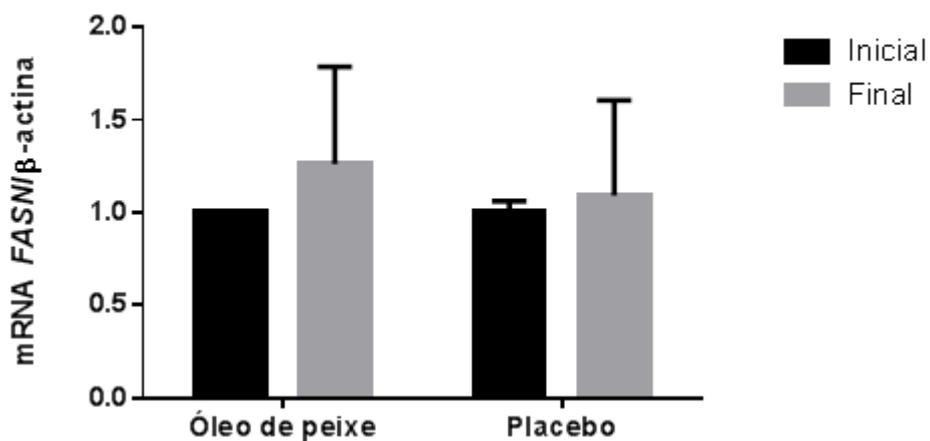


Figura 6 - Quantificação de níveis de mRNA da *FASN* nas células mononucleadas do sangue periférico das pacientes incluídas no estudo, antes e após a suplementação. Dados apresentados como média ± desvio padrão. Grupo óleo de peixe: inicial 1,002±0,003 e final 1,26±0,52; Grupo placebo: inicial 1,00±0,05 e final 1,09±0,51. Não foram observadas diferenças significativas intra e entre grupos.

## 6 DISCUSSÃO

Em estudo realizado por nosso grupo de pesquisa, foi investigada a mudança no perfil de ácidos graxos nos fosfolipídios plasmáticos em pacientes com câncer de colo de útero, virgens de tratamento. Comparado com mulheres saudáveis, foi observada uma maior concentração dos ácidos graxos 18:0, 24:0 e maior razão de 18:0/18:1, e menor concentração de ácidos graxos 16:0 e 18:2 n-3, nas mulheres portadoras de câncer. Os resultados do estudo sugeriram alterações no metabolismo de ácidos graxos na situação de câncer (LISBOA et al., 2008).

Considerando as alterações no metabolismo de lipídios no câncer, sendo a ativação da lipogênese *de novo* uma característica dos cânceres agressivos, estudo realizado por Rysman et.al. (2010), investigou os efeitos da lipogênese, especificamente na mudança da composição de fosfolipídios, em células de câncer. Linhagem de células de câncer de próstata foi tratada com *soraphen*, um inibidor da lipogênese, e após o tratamento, observou-se redução dos níveis dos ácidos graxos 16:0, 18:0 e 18:1, bem como dos níveis totais de ácidos graxos saturados e monoinsaturados na composição dos fosfolipídios e aumento da concentração de poli-insaturados. Efeitos similares foram observados também em linhagens de células de câncer de mama e de câncer colorretal. Os resultados sugeriram que em células de câncer o aumento de ácidos graxos saturados e monoinsaturados na composição de fosfolipídios poderia estar associado ao aumento da lipogênese. Para avaliar se havia associação do aumento de ácidos graxos saturados nos fosfolipídios com o aumento da lipogênese *in vivo*, foi analisada a expressão da FASN por meio de Western blot em tecidos de câncer de próstata e tecidos normais. Análise da composição de fosfolipídios dos tecidos mostrou que a composição de

ácidos graxos era diferente entre os tecidos lipogênicos e os não lipogênicos. Os tumores com super expressão da FASN mostraram um aumento consistente dos ácidos graxos saturados e monoinsaturados e redução de poli-insaturados, comparado com tecidos normais.

Outro estudo, *in vitro*, realizado por Ravacci et. al. (2013), utilizou linhagem de células de epitélio mamário, e uma linhagem de células epitélio mamário modificada para super expressar HER2 (receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2), para verificar os efeitos da transformação oncogênica que ocorre no câncer de mama devido à expressão de HER2. Foi observado que as células com alta expressão de HER2 apresentavam modificações na composição de lipídios da membrana, com aumento de ácidos graxos saturados como 16:0, e redução de DHA (22:6 n-3). Foi encontrado também que nestas células a expressão da proteína da FASN era maior. Ao tratar as células com ácido graxo 22:6 n-3 foi observado redução da expressão da FASN, bem como redução de ácidos graxos saturados na membrana das células. Os autores concluíram que a super expressão de HER2 ativa as vias de sobrevivência e de proliferação das células cancerígenas e modifica o perfil lipídico da membrana, mediado pela FASN.

No presente estudo, foi observado que entre os grupos de estudo havia diferença significativa em alguns ácidos graxos dos fosfolipídios séricos, antes mesmo da intervenção. O grupo óleo de peixe apresentou maior prevalência de 16:0 e maior razão 18:0/18:1, e menor prevalência de ácidos graxos poli-insaturados e n-6 e razão n-6/n-3, comparado com o grupo placebo, indicando a possibilidade de diferença no metabolismo de lipídios entre os grupos.

Após o período de suplementação, foi observado aumento significativo da concentração de 22:5 n-3 nos fosfolipídios plasmáticos das pacientes do grupo óleo

de peixe. Entretanto, em relação ao 22:6 n-3, o aumento da concentração desse ácido graxo não foi significativo.

Com o objetivo de investigar a taxa de incorporação de ácidos graxos 20:5 n-3 e 22:6 n-3 após suplementação, estudo incluindo 20 indivíduos utilizou suplementação de óleo de peixe composto por 1296mg de 22:5 n-3 e 864mg de 22:6 n-3 por dia, mais uma cápsula de vitamina E contendo 400UI, durante 8 semanas. Após o tratamento, foi observado aumento significativo de 245% na concentração de 20:5 n-3, e de 73% na concentração de 22:6 n-3, nos fosfolipídios plasmáticos (CAO et al., 2006). Outro estudo que também avaliou a concentração de 22:6 n-3 após suplementação, utilizou uma dose de 1,8g de 22:6 n-3 por dia durante 5 meses, com 25 pacientes portadoras de câncer de mama, observou que havia grupo com alta incorporação do ácido graxo nos fosfolipídios plasmáticos, e grupo com baixa incorporação de 22:6 n-3 (BOUGNOUX et al., 2009). Considerando os resultados observados nos estudo acima apresentados, o fato de não ter sido observado aumento significativo na concentração de 22:6n-3 nos fosfolipídios plasmáticos após a suplementação com óleo de peixe, em nosso estudo, pode ter ocorrido devido a dose ou tempo de suplementação, bem como pela possível incorporação proporcionalmente menor de 22:6-n3 comparado com 20:5 n-3, sugerido pelo estudo de Cao et al. (2006). Outra possibilidade é devido a diferença de incorporação do ácido graxo 22 n-3 nos fosfolipídios entre os indivíduos após o consumo da suplementação, como observado no estudo de Bougnoux et al. (2009).

É conhecido que a FASN pode estar super expressa em células de câncer de mama (WANG et. al., 2001), e estudo realizado por Wang et. al., 2004, demonstrou que as células podem excretar FASN para o meio extracelular, podendo esta ser identificada no soro de pacientes com câncer de mama e utilizada como um

marcador tumoral. A sua expressão estaria associada ao estágio do tumor, sendo maior em estágio mais avançados (KAO et. al., 2013; NOTARNICOLA et. al, 2012; ZAYTSEVA et. al; 2012).

Analisando o nível de proteína da FASN no soro das pacientes incluídas no estudo, foi encontrada concentração média de  $118,79 \pm 76,71$  ng/ml. Outro trabalho realizado pelo nosso grupo de pesquisa também analisou a FASN no soro de pacientes portadoras de câncer de mama utilizando o mesmo kit de análise, e encontrou uma concentração média de  $132,51 \pm 95,05$  ng/ml, semelhante ao observado no presente trabalho (HOFFMANN, 2011).

Após o período de intervenção, não foi observado diferença significativa nas concentrações da proteína da FASN no soro das pacientes, bem como nos seus níveis de transcrito. Entretanto, estudo realizado por Menendez et. al. (2004) avaliou o papel dos ácidos graxos n-3 e n-6 na atividade enzimática e expressão de proteína da FASN em linhagem de células de câncer de mama, e encontrou resultado divergente do observado em nosso estudo. Entre os ácidos graxos testados o 18:3 n-3 e o 22:6 n-3 reduziram a atividade da FASN em 61% e 37%, respectivamente, sendo o 18:3 n-6 foi o mais efetivo, reduzindo em 75% a atividade da enzima. Já o 20:5 n-3, 18:2 n-6 e 20:4 n-6, não apresentaram efeito. Os pesquisadores também avaliaram se os ácidos graxos poderiam influir na expressão da proteína da enzima, e foi verificado que os ácidos graxos que reduziram a atividade da FASN, também reduziram a expressão da proteína.

Outro estudo, *in vitro*, realizado por Ravacci et. al. (2013), também observou resultado semelhante do ácido graxo 22:6 n-3 na expressão da FASN. Linhagem de células de epitélio mamário, e uma linhagem de células epitélio mamário modificada para super expressar HER2 (receptor de fator de crescimento epidérmico humano

2), foram tratadas com ácido graxo 22:6 n-3 e foi observado redução da expressão da proteína da FASN.

Estudos *in vitro* já observaram que os ácidos graxos 20:5 n-3 e 22:6 n-3 podem reduzir a viabilidade de células de câncer por meio dos produtos da peroxidação lipídica. Trabalho realizado por Chajès et al. (1995) com o objetivo de investigar possíveis mecanismo envolvidos com a redução da morbidade e mortalidade por câncer de mama associados a presença de ácidos graxos poli-insaturados na dieta, tratou linhagens de células de câncer de mama com ácidos graxos n-3 e n-6 para observar seus efeitos na proliferação celular. Foi observado que os ácidos graxos 20:5 n-3 e 22:6 n-3 foram os mais efetivos em reduzir o crescimento celular, entretanto na presença de vitamina E na concentração de 10µM restaurou completamente o crescimento celular. Outro estudo com resultado semelhante, foi o realizado por Germain et al. (1998) que tratou linhagem de células de câncer de mama com ácidos graxos poli-insaturados durante 6 dias. Foi observado que dentre os ácidos graxos utilizados, o 22:6 n3 foi o mais efetivo em aumentar a citotoxicidade da droga doxorubicina por meio da formação de hidroperóxidos lipídicos, reduzindo assim a viabilidade celular. Entretanto na presença do antioxidante d-α-tocoferol, este efeito foi extinto.

A suplementação de óleo de peixe utilizada em nosso estudo continha em sua composição o antioxidante α-tocoferol. Os estudos apresentados sugerem que a presença do antioxidante pode anular os efeitos dos ácidos graxos 20:n-3 e 22:6 n-3 quanto a redução do crescimento celular devido aos produtos formados pela peroxidação lipídica. Ainda não se sabe se a presença do antioxidante também poderia estar envolvida nos mecanismos relacionados à expressão da FASN.

Ao contrário do observado na literatura, a suplementação com óleo de peixe rico em ácidos graxos 20:5 n-3 e 22:6 n-3 não alterou a expressão da enzima da FASN no soro, nem de seu transcrito em células mononucleados das pacientes incluídas no estudo. A dose, e tempo de tratamento utilizados, bem como a presença de d- $\alpha$ -tocoferol como antioxidante no óleo de peixe, assim como um possível diferença no metabolismo de lipídios entre os grupos sugerida pela diferença na composição de ácidos graxos nos fosfolipídios séricos entre os grupos, podem ter interferido na observação do resultado. Ainda, uma das limitações do estudo foi o fato de não ter sido possível o acesso às informações de estadiamento da doença, que de acordo com a literatura (KAO et. al., 2013; NOTARNICOLA et. al, 2012; ZAYTSEVA et. al; 2012) também pode estar relacionada com a expressão da FASN.

Portanto, sugere-se que novos estudos sejam realizados com o intuito de investigar os mecanismo dos ácidos graxos 20:5 n-3 e 22:6 n-3 envolvidos na expressão da FASN.

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo permitem concluir que a intervenção realizada com a suplementação de óleo de peixe rico em ácidos graxos n-3 durante 4 semanas em paciente portadoras de câncer de mama recém diagnosticadas, antes do início do tratamento da doença, não modificou de forma significativa a concentração de proteína da FASN no soro das pacientes, bem como o nível de seu transcrito em células mononucleadas do sangue periférico.

## REFERÊNCIAS

AZEVEDO, M.O. et al. Técnicas básicas em Biologia Molecular. Editora Universidade de Brasília. Brasília, Brasil, 2010.

BOUGNOUX, P et al. Cytotoxic drugs efficacy correlates with adipose tissue docosahexaenoic acid level in locally advanced breast carcinoma. *British Journal Of Cancer*, Londres, v. 79, n. 11/12, p.1765-1769, abr. 1999.

BOUGNOUX, P. et al. Dietary long-chain omega-3 fatty acids of marine origin: A comparison of their protective effects on coronary heart disease and breast cancers. *Progress In Biophysics And Molecular Biology*, Oxford, v. 90, n. 1, p.299-235, jan. 2006.

BOUGNOUX, P. et al. Improving outcome of chemotherapy of metastatic breast cancer by docosahexaenoic acid: a phase II trial. *British Journal Of Cancer*, Londres, v. 101, n. 12, p.1978-1985, dez. 2009.

BUELL, P. Changing incidence of breast cancer in Japanese-American women. *Journal Of The National Cancer Institute*, Cary, v. 51, n. 5, p.1479-1483, nov. 1973.

CAO, J. et al. Incorporation and clearance of omega-3 fatty acids in erythrocyte membranes and plasma phospholipids. *Clinical Chemistry*, Nova Iorque, v. 52, n. 12, p.2265-2272, dez. 2006.

CATERINA, R. D. N-3 Fatty Acids in Cardiovascular Disease. *The New England Journal Of Medicine*, Boston, v. 364, n. 25, p.2439-2450, jun. 2011.

CHAJÈS, V. et al. Influence of n-3 fatty acids on the growth of human breast cancer cells in vitro: Relationship to peroxides and Vitamin-E. *Breast Cancer Research And Treatment*, Dordrecht, v. 34, n. 3, p.199-212, abr. 1995.

CHRISTIE, W. W. *Lipid Analysis: Isolation, Separation, Identification and Structural Analysis of Lipids*. Shepperton: The Oil Press, 2003.

CONWAY, J. M. et al. Effectiveness of the US Department of Agriculture 5-step multiple-pass method in assessing food intake in obese and nonobese women. *American Journal Of Clinical Nutrition*, Bethesda, v. 77, n. 5, p.1171-1178, maio 2003.

CURI, R. et al. *Entendendo a gordura: os ácidos graxos*. Barueri: Manole, 2002.

DEVLIN, T. M. Manual de bioquímica com correlações clínicas. 6. ed. São Paulo: Blücher, 2007.

FOLCH, J; LEES, M; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. The Journal Of Biological Chemistry, Baltimore, v. 226, n. 1, p.497-509, maio 1957.

GERMAIN, E. et al. ENHANCEMENT OF DOXORUBICIN CYTOTOXICITY BY POLYUNSATURATED FATTY ACIDS IN THE HUMAN BREAST TUMOR CELL LINE MDA-MB-231: RELATIONSHIP TO LIPID PEROXIDATION. International Journal Of Cancer, Nova Iorque, v. 75, n. 4, p.578-583, fev. 1998.

HOFFMANN, M. S. Enzima ácido graxo sintase e sua relação com o estado nutricional e o consumo alimentar: um retrato de portadoras de câncer de mama atendidas no hospital universitário de Brasília. 2011. 96 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Nutrição Humana, Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

JEMAL, A. et al. Global Cancer Statistics. Ca: Cancer Journal For Clinicians, Nova Iorque, v. 61, n. 2, p.69-90, mar. 2011.

JIN, Q. et al. Fatty acid synthase phosphorylation: a novel therapeutic target in HER2-overexpressing breast cancer cells. Breast Cancer Research, Londres, v. 12, n. 6, p.1-15, nov. 2010.

KAO, Y. et al. Fatty acid synthase overexpression confers an independent prognosticator and associates with radiation resistance in nasopharyngeal carcinoma. Tumor Biology, Basileia, v. 34, n. 2, p.759-768, abr. 2013

KUCHIBA, A. et al. Body Mass Index and Risk of Colorectal Cancer According to Fatty Acid Synthase Expression in the Nurses' Health Study. Journal Of The National Cancer Institute, Cary, v. 104, n. 5, p.415-420, mar. 2012.

KUHAJDA, F. P. et al. Fatty acid synthesis: A potential selective target for antineoplastic therapy. Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America, Washington, v. 91, n. 14, p.6379-6383, jul. 1994.

KUHAJDA, F. P. Fatty-Acid Synthase and Human Cancer: New Perspectives on Its Role in Tumor Biology. Nutrition, Burbank, v. 16, n. 3, p.202-208, mar. 2000.

KUMAR-SINHA, C. et al. Transcriptome Analysis of HER2 Reveals a Molecular Connection to Fatty Acid Synthesis<sup>1</sup>. Cancer Research, Baltimore, v. 63, n. 1, p.132-139, jan. 2003.

LISBOA, A. Q. et al. Altered plasma phospholipid fatty acids and nutritional status in patients with uterine cervical cancer. *Clinical Nutrition*, Oxford, v. 27, n. 3, p.371-377, jun. 2008.

LIU, H. et al. Biochemistry, molecular, biology, and pharmacology of fatty acid synthase, an emerging therapeutic target and diagnosis/prognosis marker. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, Madison, v. 1, n. 1, p.69-89, ago. 2010

MEDES, G.; THOMAS, A.; WEINHOUSE, S. Metabolism of Neoplastic Tissue. IV. A Study of in Neoplastic Tissue Slices in Vitro Lipid Synthesis. *Cancer Research*, Baltimore, v. 13, n. 1, p.27-29, jan. 1953

MENENDEZ, J. A. et al. Overexpression and hyperactivity of breast cancer-associated fatty acid synthase (oncogenic antigen-519) is insensitive to normal arachidonic fatty acid-induced suppression in lipogenic tissues but it is selectively inhibited by tumoricidal alpha-linolenic and gamma-linolenic fatty acids: a novel mechanism by which dietary fat can alter mammary tumorigenesis. *International Journal Of Oncology*, Atenas, v. 24, n. 6, p.1369-1383, jun. 2004

MENENDEZ, J. A.; LUPU, R. Fatty acid synthase and lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nature*, Londres, v. 7, n. 10, p.763-777, out. 2007.

MENENDEZ, J. A. et al. Fatty acid Synthase: Association with insulin Resistance, type 2 diabetes, an cancer. *Clinical Chemistry*, Nova Iorque, v. 55, n. 3, p.425-438, mar. 2009.

MENKE, C. H. et al. *Rotinas em Mastologia*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Controle dos cânceres do colo do útero e da mama: Cadernos de Atenção Básica, nº13. 2. ed. Brasília: Editora MS, 2013 a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Controle do câncer de mama: Documento de consenso. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <[http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/0129ba0041fbbc01aa4fee936e134226/Apresentacao+Estimativa+2014\\_final+corrigido+tireoide.pdf?MOD=AJPERES&CACHEID=0129ba0041fbbc01aa4fee936e134226](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/0129ba0041fbbc01aa4fee936e134226/Apresentacao+Estimativa+2014_final+corrigido+tireoide.pdf?MOD=AJPERES&CACHEID=0129ba0041fbbc01aa4fee936e134226)>. Acesso em: 28 nov. 2013 b.

NELSON, David L.; COX, Michael M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 5. ed. São Paulo: Artmed, 2011.

NOTARNICOLA, M. et al. Serum Levels of Fatty Acid Synthase in Colorectal Cancer Patients Are Associated with Tumor Stage. *Journal Of Gastrointestinal Cancer*, Nova lorque, v. 43, n. 3, p.508-511, set. 2012.

OLIVERAS, G. et al. Novel anti-fatty acid synthase compounds with anti-cancer activity in HER2+ breast cancer. *Annals Of The New York Academy Of Sciences: Toward Personalized Medicine for Cancer*, Nova lorque, v. 1210, n. 1, p.86-92, out. 2010.

OLIVERAS-FERRAROS, C. et al. AMPK-sensed cellular energy state regulates the release of extracellular Fatty Acid Synthase. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, Nova lorque, v. 378, n. 3191, p.488-493, jan. 2009.

PIZER, E. S. et al. Fatty Acid Synthase Expression in Endometrial Carcinoma: Correlation with Cell Proliferation and Hormone Receptors. *Cancer*, Filadélfia, v. 83, n. 3, p.528-237, ago. 1998

PORTA, R. et al. Fatty acid synthase expression is strongly related to menopause in early-stage breast cancer patients. *Menopause*, Nova lorque, v. 21, n. 2, p.1-4, ago. 2013.

RASHID, A. et al. Elevated expression of fatty acid synthase and fatty acid synthetic activity in colorectal neoplasia. *American Journal Of Pathology*, Nova lorque, v. 150, p.201-208, jan. 1997.

RAVACCI, G. R. et al. Lipid raft disruption by docosahexaenoic acid induces apoptosis in transformed human mammary luminal epithelial cells harboring HER-2 overexpression. *Journal Of Nutritional Biochemistry*, Stoneham, v. 24, n. 3, p.505-515, mar. 2013.

RYSMAN, E. et. al. De novo Lipogenesis Protects Cancer Cells from Free Radicals and Chemotherapeutics by Promoting Membrane Lipid Saturation. *Cancer Research*, Baltimore, v. 70, n. 20, p.8117-8126, out. 2010.

SIMOPOULOS, A. P. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *The American Journal Of Clinical Nutrition*, Bethesda, v. 54, n. 3, p.538-563, set. 1991.

SUL, H. S.; WANG, D. Nutritional and hormonal regulation of enzymes in fat synthesis: studies of fatty acid synthase and mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase gene transcription. *Annual Review Of Nutrition*, Palo Alto, v. 18, n. 1, p.331-351, jul. 1998.

VANCE, D. E.; VANCE, J. E. *Biochemistry of lipds, lipoproteins and membranes*. 4. ed. Paris: Elsevier, 2004.

VAZQUEZ-MARTIN, A. et al. Fatty acid synthase activity regulates HER2 extracellular domain shedding into the circulation of HER2-positive metastatic breast cancer patients. *International Journal Of Oncology*, Atenas, v. 35, n. 6, p.1369-1376, dez. 2009.

WANG, Y. et al. Fatty acid synthase (FAS) expression in human breast cancer cell culture supernatants and in breast cancer patients. *Cancer Letters*, Virginia, v. 167, n. 1, p.99-104, jun. 2001.

WANG, Y. Y. et al. Fatty acid synthase as a tumor marker: its extracellular expression in human breast cancer. *Journal Of Experimental Therapeutics And Oncology*, Londres, v. 4, n. 2, p.101-110, jan. 2004.

WANG, W. Q. et al. Increased fatty acid synthase as a potential therapeutic target in multiple myeloma. *Journal Of Zhejiang University*, Hangzhou, v. 9, n. 6, p.441-447, jun. 2008.

WALL, R. et al. Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. *Nutrition Reviews*, Nova York, v. 68, n. 5, p.280-289, maio 2010.

WARBURG, O. On the Origin of Cancer Cells. *Science*, Washington, v. 123, n. 3191, p.309-3014, fev. 1956.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cancer. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>>. Acesso em: 21 out. 2013.

WYNDER, E.; ROSE, D.; COHEN, L. Diet and breast cancer in causation and therapy. *Cancer*, Filadélfia, v. 58, n. 8, p.1804-1813, out. 1968.

ZAYTSEVA, Y. Y. et al. Signaling and Reduces Metastasis in Colorectal Cancer Inhibition of Fatty Acid Synthase Attenuates CD44-Associated. *Cancer Research*, Baltimore, v. 75, n. 6, p.1504-1517, mar. 2012.

ZHANG, L.; JOSHI, A. K.; SMITH, S.. Cloning, Expression, Characterization, and Interaction of Two Components of a Human Mitochondrial Fatty Acid Synthase: MALONYLTRANSFERASE AND ACYL CARRIER PROTEIN. *The Journal Of Biological Chemistry*, Baltimore, v. 278, n. 41, p.40067-40074, out. 2003.

ZHENG, J. et al. Intake of fish and marine n-3 polyunsaturated fatty acids and risk of breast cancer: meta-analysis of data from 21 independent prospective cohort studies. *Bmj*, Londres, v. 346, n. 26, p.1-10, jun. 2013.

## ANEXOS



Universidade de Brasília  
Faculdade de Ciências da Saúde  
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/FS

**PROCESSO DE ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA**

Registro do Projeto no CEP: 72/09

Título do Projeto: Efeito da Suplementação com ácido graxo n-3 no estado nutricional, qualidade de vida, resposta imunitária e atividade da enzima ácido graxo sintase de pacientes portadores de tumores de mama em tratamento quimioterápico.

Pesquisadora Responsável: Meg Schwarcz Hoffmann

Data de Entrada: 04/08/2009

Com base na Resolução 196/96, do CNS/MS, que regulamenta a ética em pesquisa com seres humanos, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, após análise dos aspectos éticos e do contexto técnico-científico, resolveu **APROVAR** o projeto 72/09 com o título: “Efeito da Suplementação com ácido graxo n-3 no estado nutricional, qualidade de vida, resposta imunitária e atividade da enzima ácido graxo sintase de pacientes portadores de tumores de mama em tratamento quimioterápico”, analisado na 8ª Reunião Ordinária, realizada no dia 8 de Setembro de 2009.

A pesquisadora responsável fica, desde já, notificada da obrigatoriedade da apresentação de um relatório semestral e relatório final sucinto e objetivo sobre o desenvolvimento do Projeto, no prazo de 1 (um) ano a contar da presente data (item VII.13 da Resolução 196/96).

Brasília, 10 de Setembro de 2009.

Prof. Volnei Garrafa  
Coordenador do CEP-FS/UnB



**GOVERNO DO DISTRITO FEDERAL**  
**SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE**  
 Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA/SES-DF

PARECER Nº 0438/2011

**PROTOCOLO Nº DO PROJETO:** 383/2011 – EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO GRAXO N-3 NO ESTADO NUTRICIONAL, QUALIDADE DE VIDA, RESPOSTA IMUNITÁRIA E ATIVIDADE DE ENZIMA ÁCIDO GRAXO SINTASE DE PACIENTES PORTADORES DE TUMORES DE MAMA EM TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO.

**Instituição Pesquisada:** Secretaria de Saúde do Distrito Federal/SES-DF.

**Área Temática Especial:** Grupo III (não pertencente à área temática especial), Ciências da Saúde.

**Validade do Parecer:** 03/10/2013

Tendo como base a Resolução 196/96 CNS/MS, que dispõe sobre as diretrizes e normas regulamentadoras em pesquisa envolvendo seres humanos, assim como as suas resoluções complementares, o Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal, após apreciação ética, manifesta-se pela **APROVAÇÃO DO PROJETO**.

Esclarecemos que o pesquisador deverá observar as responsabilidades que lhe são atribuídas na Resolução 196/96 CNS/MS, inciso IX.1 e IX.2, em relação ao desenvolvimento do projeto. Ressaltamos a necessidade de encaminhar o relatório parcial e final, além de notificações de eventos adversos quando pertinentes no prazo de 1 (um) ano a contar da presente data (item II.13 da Resolução 196/96 CNS/MS).

Brasília, 03 de outubro de 2011.

Atenciosamente,

Maria Rita Carvalho Garbi Novaes  
 Comitê de Ética em Pesquisa/SES-DF  
 Coordenadora

AL/CEP/SES-DF

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Cara paciente:

Gostaríamos de convidá-la a participar de uma pesquisa intitulada: **“Efeito da suplementação com ácido graxo n-3 no estado nutricional, qualidade de vida, resposta imunitária e atividade da enzima ‘ácido graxo sintase’ de pacientes portadoras de tumores de mama”**.

A sua participação é voluntária, estando igualmente livre para desistir a qualquer momento, sem que por isso seja alterado o seu plano de tratamento. Agradeceríamos que preenchesse os questionários em anexo, após leitura atenta desta informação e quando não tiver dúvidas quanto aos seus direitos enquanto participante.

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília e Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Saúde-DF. Esta tem por objetivo avaliar o estado nutricional e a resposta imune de mulheres portadoras de câncer de mama antes e depois de uma suplementação com ácido graxo n-3. Esta suplementação terá a duração de 04 semanas, e será iniciada logo após o diagnóstico médico, e anterior ao tratamento. Espera-se que a suplementação com ácido graxo n-3 melhore a resposta ao tratamento reduza os efeitos colaterais, aumente a atividade das células de defesa do corpo e melhore a qualidade de vida da paciente. Em alguns casos a suplementação poderá levar a diarreia, perda de gordura nas fezes e aumento do tempo de sangramento.

Ao aceitar participar desta pesquisa, haverá um sorteio para definir se você irá fazer parte do grupo de pacientes que irá receber cápsulas de óleo com ácido graxo n-3 ou outro, chamado de grupo controle, que receberá óleo mineral. Estes óleos serão fornecidos para serem ingeridos 2 vezes ao dia durante 04 semanas, concomitante ao seu tratamento. Nem você nem o pesquisador saberão a qual grupo você foi sorteado, até o término da pesquisa. Este procedimento é necessário para avaliar com maior clareza se o óleo contendo ácido graxo n-3 ajuda a melhorar a qualidade de vida do paciente.

A coleta de dados será realizada em dois momentos diferentes, no início e ao final da suplementação e a cada encontro serão colhidas as seguintes informações:

- ✓ Informações sobre sua alimentação;
- ✓ Informações referentes à sua qualidade de vida, pelo preenchimento de questionários;
- ✓ Medidas de peso e altura e dados da bioimpedância elétrica, um exame não invasivo e indolor, para determinação da composição corpórea;
- ✓ Coleta de cerca de 20 ml de sangue venoso para avaliação exames bioquímicos (feito com kit esterilizado e individual); de hemograma, perfil lipídico, glicose, albumina, enzima ácido graxo sintase, ácidos graxos e marcadores inflamatórios.
- ✓ Nos encontros subseqüentes, serão questionados sobre a adesão e possíveis intolerâncias e aversões à suplementação.

Todos os dados e amostras serão feitos e colhidos pela própria pesquisadora ou pela equipe treinada e participante da pesquisa.

Toda a informação será coletada sem nenhum dado que possa levar à sua identificação, tal como o seu nome ou data do seu nascimento. É extremamente importante que seu anonimato seja assegurado, e

que apenas os profissionais da saúde envolvidos com a pesquisa tenham acesso à informação onde conste o seu nome.

Posteriormente, a transferência dos seus dados será realizada apenas para a análise estatística. Nenhuma referência ao seu nome estará disponível nesta análise. Todas as informações fornecidas pela senhora ficarão sob a guarda da equipe e sob a responsabilidade da coordenadora da pesquisa. O seu nome não aparecerá na publicação que se planeja realizar.

Os resultados obtidos serão divulgados para a comunidade científica (médicos, nutricionistas, enfermeiros) com o objetivo de beneficiar o acompanhamento e a orientação nutricional do paciente com câncer, podendo, eventualmente, tornar a terapia nutricional prestada aos seus pacientes, mais direcionada e eficiente.

As pessoas abaixo indicadas terão todo o prazer em responder as questões adicionais que possa ter a respeito deste projeto. Caso não estejam presentes, poderão ser chamadas por um funcionário.

Contatos:

Elemácia M. Paixão (61) 9642-1888, Marina Kiyomi Ito (61) 3307-2510, Ana Carolina (61) 91161292, Karina Souza (61) 8611-2561.

Se não quiser participar nesta pesquisa, gostaríamos que traçasse um risco sobre o questionário, assiná-lo e devolvê-lo. É importante referir que o fato de não participar não terá influencia no seu plano de tratamento.

Li esta informação e quero ( ) participar deste projeto.

Não quero ( ) participar deste projeto.

Nome do paciente (ou do representante legal):

---

Assinatura:

---

Assinatura pesquisador responsável:

Observação: Este documento será assinado em duas vias, e suas folhas serão rubricadas. Uma via ficará com o paciente e a outra com o pesquisador responsável.



Universidade de Brasília  
 Faculdade de Ciências da Saúde  
 Departamento de Nutrição  
 Pesquisa sobre doenças crônicas não-transmissíveis

Código identificador						
-------------------------	--	--	--	--	--	--

**PROJETO ONCONUT ( FICHA 1)**

**AValiação Socioeconômica e Cultural**

<b>Endereço</b>	<b>completo:</b>
_____	
_____	
_____	
<b>CEP:</b> _ _ - _ - _ - _	<b>Bairro:</b>
_____	
<b>Cidade:</b> _____	
<b>Data da entrevista:</b> ____ / ____ / ____	
<b>Entrevistadores:</b>	<b>a)</b>
_____	
<b>b)</b>	
_____	
<p><b>ENTREVISTADOR: LEIA para o entrevistado o formulário de esclarecimento sobre a pesquisa e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Caso ele realmente concorde em participar voluntariamente do projeto e assine o TCLE, prossiga com o questionário. Caso contrário, atenda aos procedimentos previstos para "Recusa".</b></p>	
<b>1.</b>	<b>Nome</b>
_____	<b>completo:</b>
_____	
_____	
<b>Registro</b>	<b>HUB:</b>
_____	

<p>Telefone residencial: _____</p> <p>Telefone comercial (ou de recados): _____</p> <p>Celular: _____</p> <p>Endereço eletrônico: _____</p>	
<p><b>2. Quantas pessoas residem, de forma permanente, no seu domicílio?</b>  <b>ENTREVISTADOR: Inclui parentes da família principal, agregados (pessoas que moram junto e de modo permanente) e empregada doméstica que durma no emprego e não tenha residência no DF.</b> _____</p>	
<p><b>3. Qual a sua data de nascimento?</b>  _____ / _____ / _____</p>	
<p><b>4. Qual o seu estado civil?</b>  <b>ENTREVISTADOR: Leia as opções 1 a 4.</b></p> <p>1. <input type="checkbox"/> Casada (inclui união consensual)</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Desquitada, divorciada ou separada</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Viúva</p> <p>4. <input type="checkbox"/> Solteira</p> <p>5. <input type="checkbox"/> não sabe/não respondeu</p>	
<p><b>5. Até que série a senhora estudou?</b> _____</p> <p>0. <input type="checkbox"/> menos de um ano</p> <p>1. _____ anos e _____ meses</p> <p><b>ENTREVISTADOR: Calcular o tempo de estudo no momento da entrevista.</b></p>	
<p><b>6. Atualmente a Sra tem um trabalho ou atividade remunerada?</b></p> <p>0. <input type="checkbox"/> Não</p> <p>1. <input type="checkbox"/> Sim.</p>	
<p><b>7. Para nossa pesquisa, é importante classificar os entrevistados segundo níveis de renda da família. Como já dissemos anteriormente, as informações colhidas são de uso exclusivo da pesquisa e são confidenciais. Por favor, responda-me: Contando com salário, pensão, aposentadoria, aluguel, “bicos”, qual a renda familiar mensal?</b></p> <p>1. R\$ _____</p>	

<p>2. <input type="checkbox"/> A família não tem renda</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Não sabe/ Não respondeu</p>	
<b>DOENÇAS E TRATAMENTOS REFERIDOS</b>	
<p><b>Algun profissional de saúde disse que a Sra tem:</b></p> <p><b>8. Pressão alta?</b></p> <p>0. <input type="checkbox"/> Não</p> <p>1. <input type="checkbox"/> Sim, toma medicação? qual? _____</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Não lembra/não sabe</p>	
<p><b>9. Colesterol alto?</b></p> <p>0. <input type="checkbox"/> Não</p> <p>1. <input type="checkbox"/> Sim, toma medicação? qual? _____</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Não lembra/não sabe</p>	
<p><b>10. Alto nível de açúcar no sangue?</b></p> <p>0. <input type="checkbox"/> Não</p> <p>1. <input type="checkbox"/> Sim, toma medicação? qual? _____</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Não lembra/não sabe</p>	
<p><b>11. A Sra tem outra doença que precise de medicação constante?</b></p> <p>0. <input type="checkbox"/> Não</p> <p>1. <input type="checkbox"/> Sim, qual: _____ 2. <input type="checkbox"/> Medicamento, qual(is): _____</p> <p><i>ENTREVISTADOR: Anote a doença e a medicação específica.</i></p>	
<p><b>12. A Sra faz uso de produtos ou suplementos (chás, pós, sucos) para melhorar a saúde? Se não pular para 13</b></p> <p>0. <input type="checkbox"/> Não</p> <p>1. <input type="checkbox"/> Sim, qual e por quanto tempo? _____</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Não lembra/não sabe</p>	
<p><b>13. A Sra já parou de menstruar, já entrou na menopausa?</b></p> <p>0. <input type="checkbox"/> Não</p> <p>1. <input type="checkbox"/> Sim</p>	
<b>BEBIDA ALCOÓLICA</b>	
<p><b>14. Com que frequência a Sra toma bebidas que contém álcool?</b></p> <p><i>ENTREVISTADOR: Leia as opções.</i></p> <p>1. <input type="checkbox"/> Nunca</p>	

<p>2. <input type="checkbox"/> Raramente (uma vez por mês ou menos)</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Até uma vez por semana</p> <p>4. <input type="checkbox"/> Duas a três vezes por semana</p> <p>5. <input type="checkbox"/> Quatro ou mais vezes por semana</p> <p><b>Não leia</b> 6. <input type="checkbox"/> Não sabe/Não respondeu</p> <p>7. Qual bebida costuma consumir? _____</p> <p>Quantidade? _____</p>	
<b>ATIVIDADE FÍSICA</b>	
<p><b>15. A Sra realiza alguma atividade física regular?</b></p> <p>0. <input type="checkbox"/> Não (<i>Se não pular para 18</i>)</p> <p>1. <input type="checkbox"/> Sim</p>	
<p><b>16. Qual o tipo de atividade física a Sra realiza?</b></p> <p>1. <input type="checkbox"/> Caminhada</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Hidroginástica</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Ginástica</p> <p>4. <input type="checkbox"/> Musculação</p> <p>5. <input type="checkbox"/> Outros</p>	
<p><b>17. Com que frequência a Sra pratica a atividade física?</b></p> <p>1. <input type="checkbox"/> Uma a duas vezes por semana</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Três a quatro vezes por semana</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Mais de cinco vezes por semana</p>	
<b>USO DE TABACO</b>	
<p><b>ENTREVISTADOR: Lembre-se que, por definição, fumante é aquele que fuma, ou fumou, até 100 cigarros por ano ou 2 cigarros por semana. Leia as opções 1 a 3.</b></p> <p><b>18. A Sra é:</b></p> <p>1. <input type="checkbox"/> Não fumante, nunca fumou (<i>Se não pular para 20</i>)</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Ex – fumante (parou de fumar há mais de seis meses)</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Fumante (atualmente ou parou há menos de seis meses)</p>	
<p><b>19. Quantos cigarros a Sra fuma(va) por dia?</b></p> <p><b>ENTREVISTADOR: No caso de menos de um cigarro por dia, assinale 0(zero).</b></p> <p>1. _____ cigarros por dia</p>	
<b>DADOS DA DOENÇA E TRATAMENTO</b>	
<b>ENTREVISTADOR: Colher informação em prontuário, não perguntar.</b>	
<p><b>20. Subtipo?</b></p> <p>1. <input type="checkbox"/> Lodular                      2. <input type="checkbox"/> Ductal</p>	
<p><b>21. Hormonal?</b></p>	

0. <input type="checkbox"/> Não	1. <input type="checkbox"/> Sim	
<b>22. Qual o estadiamento clínico da doença?</b> 1. _____		
<b>ANTROPOMETRIA</b>		
<p><b>Agora vou verificar suas medidas. Para isso é necessário que a Sra retire seus sapatos (chinelos, sandálias, etc) e suba na balança.</b></p>		
<p><b>PESO</b></p> <p>23. _____, _____ kilogramas</p>		
<p><i>ENTREVISTADOR: Se houver alguma intercorrência que tenha impossibilitado a aferição do peso, descreva-a aqui:</i> _____</p>		
<p><b>ALTURA</b></p> <p>24. _____, _____ metros</p>		
<p><i>ENTREVISTADOR: Se houver alguma intercorrência que tenha impossibilitado a medida da altura, descreva-a aqui:</i> _____</p>		
<p><b>PESO USUAL</b></p> <p><b>25. O seu peso se manteve constante no último ano?</b></p> <p>0. <input type="checkbox"/> Não</p> <p>1. <input type="checkbox"/> Sim, qual o peso? _____, _____ kilogramas (<i>pular para 27</i>)</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Não lembro/não sei</p>		
<p><b>26. Se modificou, qual foi a mudança?</b></p> <p>1. <input type="checkbox"/> Ganho _____, _____ kilogramas</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Perda _____, _____ kilogramas</p>		
<p><i>ENTREVISTADOR: A medida refere-se à quantidade de peso modificada e não ao peso final.</i></p>		
<p><b>CIRCUNFERÊNCIA ABDOMINAL</b></p> <p>27. _____ centímetros</p>		
<p><i>ENTREVISTADOR: Se houver alguma intercorrência que tenha impossibilitado a medida da circunferência da cintura, descreva-a aqui:</i> _____</p>		

**BIA**

**28. Resistência:** \_\_\_\_\_ média:

**29. Reactância:** \_\_\_\_\_ média:

**30. Ângulo de fase:** \_\_\_\_\_

**FINALIZAR A ENTREVISTA – fazer o *check-list***

- Antes de iniciar, assegurar-se de que a voluntária procedeu à coleta sanguínea, recebeu lanche e está confortável.
- Preencher completamente a ficha 1 e o questionário de qualidade de vida, com conferência posterior se ficou alguma resposta em branco.
- Em casos de dúvidas, resolver imediatamente não deixando para depois.
- Informe que a voluntária será procurada em dois momentos posteriores para as coletas dos RECs 24h.
- Organizar o próprio material e acondicionar adequadamente :  formulários  balança  antropometro  fita  lanche.
- Agradeça pela entrevista, colabore na reorganização do ambiente e certifique-se que não está deixando nada espalhado ou esquecido e despeça-se educadamente.





53. Quantas vezes por mês: _____	
54. Qual o tipo de peixe mais consumido: _____	

Nome da paciente: \_\_\_\_\_ Registro: \_\_\_\_\_

Data de atendimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### PRESCRIÇÃO DO SUPLEMENTO NUTRICIONAL

1. Ingerir uma cápsula no almoço e uma cápsula no jantar junto com a refeição durante 15 dias.
2. Ao final dos 15 dias, uma das pesquisadoras do projeto entrará em contato para confirmar o novo encontro e entregar outro frasco de suplemento.
3. Qualquer dúvida, por favor, entre em contato (segue lista dos nomes e telefones das pesquisadoras).

---

Carimbo e assinatura

OBSERVAÇÕES: \_\_\_\_\_

<b>RETORNO</b>	
Data	
Horário	
Local	